

槲皮素对绵羊精液冷冻保存效果的影响

刘伟俊^{1,2,3}, 张振良^{2,3}, 王晶晶^{2,3}, 刘显成^{2,3}, 吕占民^{2,3}, 唐玲^{1,2,3}, 华雨萱^{1,2,3}, 王锐刚^{2,3},
张云云^{1,2,3}, 赵学明^{2,3,4*}, 万鹏程^{1,2,3*}

(1. 新疆农业大学动物科学学院, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所,
新疆石河子 832000; 3. 省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 新疆石河子 832000;
4. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 为探究槲皮素 (Quercetin, QUE) 对绵羊精液冷冻保存效果的影响, 本研究在绵羊精液冷冻保存稀释液中添加不同浓度的 QUE (0、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$), 检测冷冻-解冻后精子活力、抗氧化能力及线粒体膜电位等指标。结果表明: 与对照组相比, 添加 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的精液在解冻后精子的活率、活力、直线运动速率、曲线运动速率、鞭打频率、平均运动速率、直线性、摆动性显著提高, 显著降低了活性氧水平、顶体损伤率, 显著提高了线粒体膜电位水平和谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 含量。因此, 在绵羊精液冷冻保存稀释液中添加 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 可以显著改善绵羊精液冷冻保存质量, 提高其抗氧化能力。

关键词: 绵羊; 槲皮素; 精子; 冷冻保存

中图分类号: S826.3

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20241112-04

绵羊人工授精技术作为家畜常用的辅助生殖技术, 能够充分发挥优质种公羊的繁殖潜力, 快速扩繁优良种群, 推动家畜遗传改良进程, 该技术一般采用新鲜精液、低温保存精液或冷冻精液。精液保存作为绵羊人工授精技术的关键环节, 精液质量直接影响人工授精的成功率^[1-2]。Hill 等^[3]研究表明, 新鲜精液人工授精后母羊的受胎率 (82.20%) 显著高于冷冻精液人工授精后母羊的受胎率 (71.60%)。相比其他 2 种保存

方式, 冷冻保存具有保存时间长、便于运输等优势^[4-5]。然而, 在冷冻保存过程中, 精液会产生活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS), 导致精子抗氧化酶活性下降, 进而影响精子顶体和膜的完整性^[6-8]。这些因素共同影响了绵羊精液冷冻保存的效果。抗氧化剂可通过清除 ROS 减少或预防氧化应激的发生, 从而在冷冻保存中起到保护作用^[9]。

槲皮素 (Quercetin, QUE) 也称栎精或槲皮黄素, 是一种具有强大生物活性的天然黄酮类化合物, 广泛存在于多种水果、蔬菜和药用植物的花、茎、叶、果实和种子中, 通常以糖苷形式存在, 如槲皮苷、芦丁和金丝桃苷。QUE 因其显著的抗氧化能力而备受关注^[10]。在山羊^[11]、猪^[12]的冷冻稀释液中添加 QUE 可改善精子的运动能力、抗氧化酶活性。然而, QUE 在绵羊精液冷冻保存中的应用尚未见报道。本实验探究了 QUE 对绵羊精液冷冻保存效果的影响, 为进一步优化绵羊精液冷冻保存稀释液的配方提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂和仪器 三羟基氨基甲烷 (Tris (Hydroxy

收稿日期: 2024-11-12; 修回日期: 2025-01-13

资助项目: 兵团重点领域科技攻关项目 (2024AB017); 财政部和农业农村部: 国家绒用羊产业技术体系 (CARS-39-07); 新疆维吾尔自治区天山英才—青年科技拔尖人才项目 (2022TSY CCX0124); 新疆维吾尔自治区天池英才 (赵学明); 新疆维吾尔自治区羊产业技术体系 (XJARS-09-26)

作者简介: 刘伟俊 (1998-), 男, 江西赣州人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: a974229676@qq.com; 并列第一作者: 张振良 (1994-), 男, 甘肃武威人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zhangzhenliang27@163.com

* 通信作者: 万鹏程 (1977-), 男, 重庆人, 博士, 研究员, 主要从事绵羊繁育与家畜胚胎生物技术研究, E-mail: 1870 0990@qq.com; 赵学明 (1979-), 男, 博士, 研究员, 主要从事家畜胚胎生物技术研究, E-mail: zhaoxueming@caas.cn

methyl) Aminomethane, Tris)、2,7,-DCFHDA、青链霉素购自北京索莱宝科技有限公司;无水柠檬酸、无水葡萄糖购自日本 Wako 公司;QUE、花生凝集素购自美国默克生物公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自上海碧云天生物技术有限公司;CellTracker™ blue CMF2HC 购自美国赛默飞世尔科技公司。精子分析仪[MD06200C, 南宁松景天伦生物科技有限公司(迈朗)], 分析天平(AS 60/220.R2, RADWAG), 精子冷冻仪(CL-5500, Cryologic)。

1.1.2 溶液配制 基础稀释液: 3.04 g Tris、1.554 g 无水柠檬酸、1.136 g 无水葡萄糖、100 mL 超纯水。冷冻稀释液: 在基础稀释液的基础上添加 20% 的卵黄、6% 的甘油、不同浓度的 QUE, 按照 QUE 浓度不同分为 5 组, 分别为 0 (对照组)、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 添加组, 现用现配。

1.1.3 精液采集 试验羊选取新疆 184 团屯旺牧业有限责任公司的性欲旺盛且繁殖性能高、体型外貌良好、睾丸大小适中的 10 只 2~3 岁的纯种多胎萨福克羊公羊。通过人工假阴道采集精液, 每只公羊每隔 1 d 采 2 次精液, 采集后 20 min 内运到实验室进行品质评估。选择精子密度为 2.5×10^9 个/mL 以上, 活率 0.75 以上的方可用于试验。将检测合格后的至少 3 只公羊的精液混合均匀, 以消除个体差异。

1.2 实验方法

1.2.1 精液的冷冻和解冻 1) 精液冷冻: 将 1.1.3 中混匀的精液平均分为 5 份, 用 37℃ 预热的未添加 QUE 和添加 10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ QUE 的冷冻稀释液将每组精液稀释至 8×10^7 个/mL。将稀释好的精液用精液自动灌装分装到 0.25 mL 细管中, 然后放入 4℃ 冰箱平衡 2 h, 使精液缓慢降温到 4℃, 待平衡结束将精液放入程序化冷冻仪中进行冷冻。冷冻程序: 冷冻时间为 7 min, 精液从 4℃ 降至 -10℃ 为慢速冷冻需要 2.5 min, -10℃ 降到 -100℃ 用时 2.5 min, 然后经过 2 min 从 -100℃ 降至 -140℃, 冻精完毕。

2) 精液解冻: 将细管冻精从液氮罐中取出, 在空气中摇晃 2 s 将细管表面的液氮挥发完毕, 再置于 37℃ 水浴锅中, 1 min 后取出擦干表面水分, 用剪刀剪去封口端, 将精液沿着封口缓慢倒入离心管中备用。

1.2.2 精液冷冻后质量和运动参数测定 将解冻后的精液, 取 10 μL 滴在载玻片上, 使用精子分析仪精子辅助

分析系统(CASA), 在 400× 显微镜下随机观察 6 个视野, 检测精子数量应大于 300 个 ($n > 300$) 记录精子的活率、活力、直线运动速率 (Straightline Velocity, VSL)、曲线运动速率 (Curvilinear Velocity, VCL)、鞭打频率 (Beat Cross Frequency, BCF)、平均运动速率 (Velocity Average Path, VAP)、直线性 (Linearity, LIN)、摆动性 (Wobble, WOB)。

1.2.3 线粒体膜电位检测 按 JC-1 试剂盒 (C2006) 说明书配制工作液, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 最后取 10 μL 染色后的精液进行压片, 在荧光显微镜下进行检测, 对照组与实验组每组拍 6 组视野, 且保持拍照参数一致, 检测精子数量应大于 300 个 ($n > 300$), 至少进行 3 次生物学重复。膜电势的计算为红色荧光 (聚集体) 与绿色荧光 (单体) 的比值, 使用 Image J 软件分析 JC-1 红、绿荧光的平均荧光强度值。

1.2.4 顶体损伤检测 使用 FITC-PNA 试剂盒 (L7381) 进行顶体损伤检测, 严格按试剂盒说明书配制工作液, 最后取 10 μL 染色后的精液进行压片, 在荧光显微镜下进行检测, 对照组与实验组每组拍 6 组视野, 且保持拍照参数一致, 检测精子数量应大于 300 个 ($n > 300$) 至少进行 3 次生物学重复。未发生顶体损伤的精子不会与探针结合; 发生顶体损伤精子的头部会与探针结合, 发出蓝色荧光。

1.2.5 ROS 水平测定 使用 2,7,-DCFHDA 试剂盒 (CA1410) 测定 ROS 含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。取 10 μL 处理完毕的精液进行压片, 在荧光显微镜下进行检测, 对照组与实验组每组拍 6 组视野, 且保持拍照参数一致, 检测精子数量应大于 300 个 ($n > 300$), 至少进行 3 次生物学重复。在相同染色条件下和拍照参数条件下, ROS 水平越高, 绿色荧光强度越高。

1.2.6 谷胱甘肽水平检测 使用 CellTracker™ blue CMF2HC 试剂盒 (C2110) 测定谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。取 10 μL 处理后的精液进行压片, 在荧光显微镜下进行检测, 对照组与实验组每组拍 6 组视野, 且保持拍照参数一致, 检测精子数量应大于 300 个 ($n > 300$), 至少进行 3 次生物学重复。在相同染色条件下和拍照参数条件下, GSH 水平越高, 蓝色荧光强度也会越高。

1.3 统计与分析 实验结果使用 Image J 软件分析平均

荧光强度，使用 Graphpad Pism9.5 对数据进行单因素方差分析并绘制图片，试验重复 3 次（ $n=3$ ）。

2 结 果

2.1 QUE 对精子冷冻后活率和活力的影响 由表 1 可知，精子活率随着 QUE 浓度的增加呈现先升高后降低的趋势，10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的精子活率均显著高于对照组和 40 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组，其中 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组最高（ $P<0.05$ ）。精子活力随着 QUE 浓度的增加呈现先升高后降低的趋势，10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的精子活力均显著高于对照组和 40 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组，其中 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组最高（ $P<0.05$ ）。

2.2 QUE 对精子冷冻后运动能力的影响 由表 1 可知，30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的 VSL、BCF、VAP、LIN、WOB、VCL 显著高于其余各组，40 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的 VCL 显著低于其余各组，对照组、10、20 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组之间

差异不显著。

2.3 QUE 对精子冷冻后 ROS 的影响 由图 1 可知，10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的精子 ROS 水平显著低于对照组和 40 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组，其中 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组组间差异不显著，30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组显著低于 20 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组，为所有组中最低。

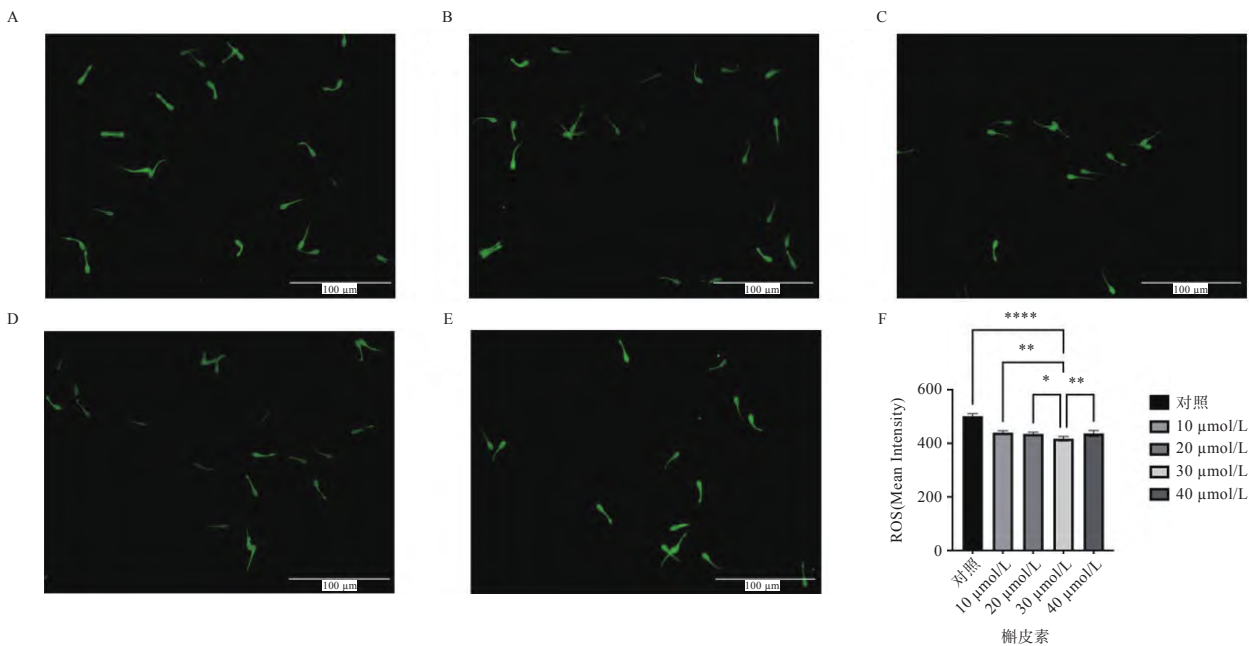
2.4 QUE 对精子冷冻后 GSH 的影响 由图 2 可知，30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的 GSH 水平显著高于对照组和其他实验组，其余各组之间差异不显著。

2.5 QUE 对精子冷冻后顶体损伤率的影响 由图 3 可知，30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组顶体损伤率显著低于对照组和其他实验组。

2.6 QUE 对精子冷冻后线粒体膜电位的影响 由图 4 可知，30 $\mu\text{mol/L}$ QUE 组的线粒体膜电位水平高于对照组和其他实验组（ $P<0.05$ ）。

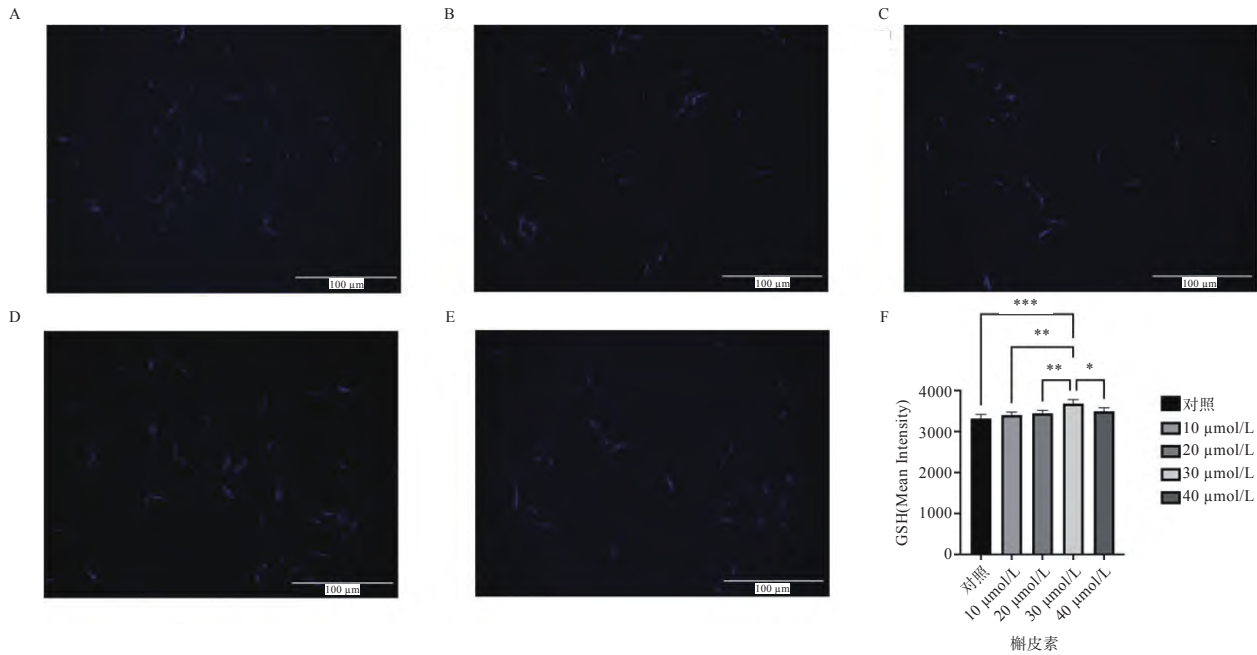
表 1 QUE 对精子活率、活力和运动性能的影响								
QUE, $\mu\text{mol/L}$	活率,%	活力,%	VSL, $\mu\text{m/s}$	VCL, $\mu\text{m/s}$	BCF,Hz	VAP, $\mu\text{m/s}$	LIN,%	WOB,%
0	40.58 $\pm$ 2.62 ^c	31.88 $\pm$ 5.78 ^c	16.89 $\pm$ 0.25 ^c	37.56 $\pm$ 0.48 ^b	0.79 $\pm$ 0.02 ^b	26.40 $\pm$ 0.28 ^b	44.33 $\pm$ 2.08 ^b	82.00 $\pm$ 3.05 ^b
10	63.90 $\pm$ 2.46 ^b	45.33 $\pm$ 5.39 ^b	17.26 $\pm$ 0.50 ^b	37.47 $\pm$ 1.03 ^b	0.77 $\pm$ 0.01 ^b	27.16 $\pm$ 0.99 ^{ab}	46.00 $\pm$ 0.57 ^b	86.67 $\pm$ 1.53 ^b
20	65.16 $\pm$ 4.86 ^b	47.69 $\pm$ 5.47 ^b	17.30 $\pm$ 0.66 ^b	38.75 $\pm$ 1.25 ^b	0.81 $\pm$ 0.06 ^b	27.66 $\pm$ 1.33 ^{ab}	46.33 $\pm$ 0.57 ^b	86.33 $\pm$ 2.08 ^b
30	77.52 $\pm$ 6.57 ^a	58.29 $\pm$ 2.50 ^a	18.90 $\pm$ 0.78 ^a	40.73 $\pm$ 0.84 ^a	0.96 $\pm$ 0.06 ^a	28.80 $\pm$ 0.69 ^a	50.33 $\pm$ 1.15 ^a	92.00 $\pm$ 2.00 ^a
40	45.89 $\pm$ 4.78 ^c	26.90 $\pm$ 2.75 ^c	16.95 $\pm$ 0.68 ^c	34.98 $\pm$ 0.68 ^c	0.84 $\pm$ 0.07 ^b	27.17 $\pm$ 1.78 ^{ab}	45.25 $\pm$ 0.50 ^b	84.33 $\pm$ 1.53 ^b

注：同列数据肩标含相同字母表示差异不显著（ $P>0.05$ ），不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。下表同。



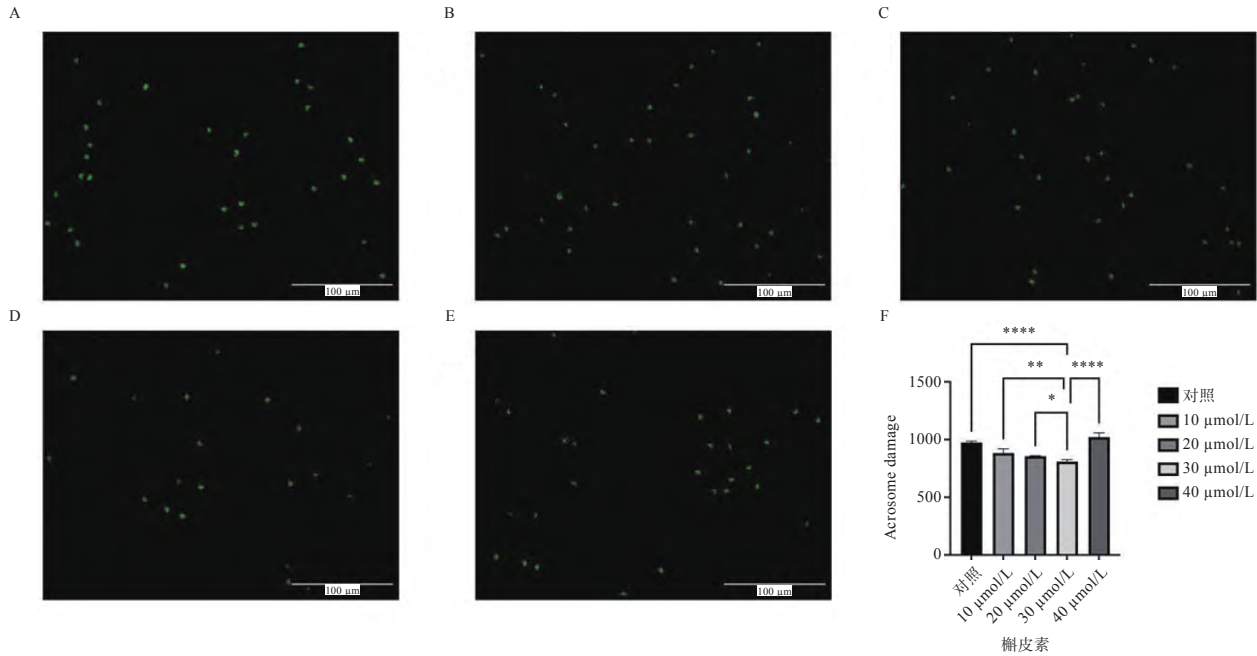
A: Control; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ QUE; C: 20 $\mu\text{mol/L}$ QUE; D: 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE; E: 40 $\mu\text{mol/L}$ QUE; 荧光显微镜 400 $\times$ 下进行检测。Bar=100 μm 。F: 不同组 ROS 染色的相对荧光强度。* 表示显著（ $P<0.05$ ），**、***、**** 表示极显著（ $P<0.01$ ），下图同。

图 1 QUE 对精子 ROS 水平的影响



A: Control; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ QUE; C: 20 $\mu\text{mol/L}$ QUE; D: 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE; E: 40 $\mu\text{mol/L}$ QUE。荧光显微镜 400 $\times$ 下进行检测。Bar=100 μm 。F: 不同组 GSH 染色的相对荧光强度。

图 2 QUE 对精子 GSH 含量的影响



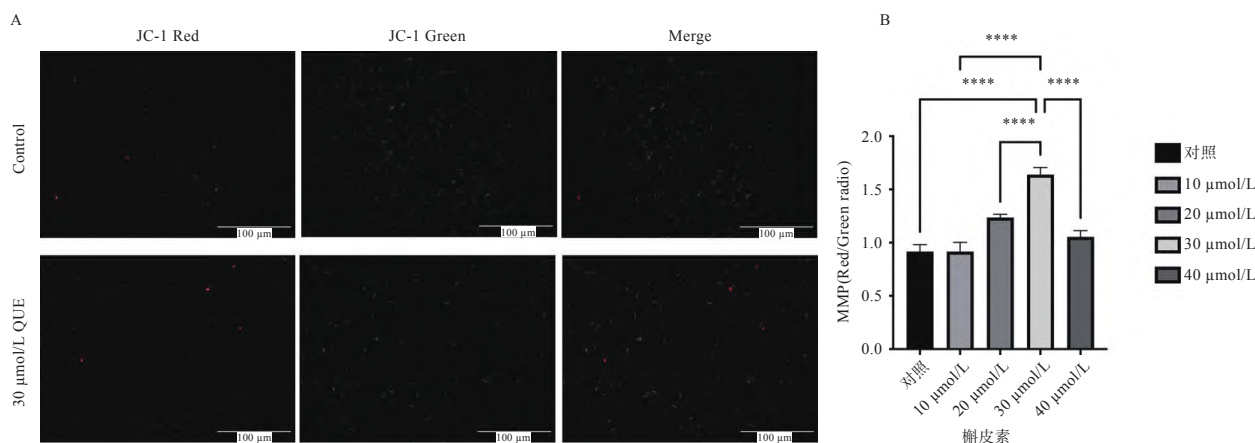
A: Control; B: 10 $\mu\text{mol/L}$ QUE; C: 20 $\mu\text{mol/L}$ QUE; D: 30 $\mu\text{mol/L}$ QUE; E: 40 $\mu\text{mol/L}$ QUE。荧光显微镜 400 $\times$ 下进行检测。Bar=100 μm 。F: 不同组顶体损伤染色荧光强度。

图 3 QUE 对精子顶体的影响

3 讨论

有研究表明,在精子冷冻过程中,由于 ROS 过量生成,打破了与抗氧化防御机制之间的动态平衡,精子存活时间缩短,活力降低^[13]。许多研究者尝试在冷冻稀释液中添加外源性抗氧化剂,以保护精子免受冷冻过

程中的损伤^[14]。本研究表明,在绵羊精液冷冻稀释液中添加 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 QUE 可改善精子冷冻保存效果,其中精子活率和活力别达到 77.52%、58.29%,VSL 为 18.90 $\mu\text{m/s}$,VCL 达到 40.73 $\mu\text{m/s}$,BCF 为 0.96 Hz,VAP 为 28.80 $\mu\text{m/s}$,LIN 和 WOB 为 50.33% 和 92.00%,顶体损伤率也显著降低。Bang 等^[15] 研究报道在狗精液



A: 精子 JC-1 染色的结果, 荧光显微镜 400× 下进行检测。Bar=100 μm。B: 精子 JC-1 红、绿荧光比值。

图 4 QUE 对精子线粒体功能的影响

冷冻稀释液中添加 50 μmol/L 的 QUE 能显著提高狗精子冻融后的活率 (46.90%)。Cheraghi 等^[16]报道在人精液冷冻稀释液中添加 50 μmol/L 的 QUE 可显著提高冷冻复苏后精子的活率 (39.7%)。Batoool 等^[11]研究表明在山羊精液冷冻稀释液中添加 5 μmol/L 的 QUE 可以显著提高冻融精子的 VSL (55.00 μm/s) 和 VCL (119.67 μm/s)。可能由于物种不同, 物种间抗氧化机制的差异, QUE 的最适添加浓度有所不同。本实验与 Cheraghi 等^[16]和 Batoool 等^[11]的研究结果在具体浓度上有所不同, 但均表明在适宜浓度范围内 QUE 具有积极作用。冷冻过程中 ROS 的生成引发氧化应激, 导致严重的精子损伤, 破坏质膜并降低精子质量^[17]。精子质膜上含有大量的多不饱和脂肪酸 (PUFA), PUFA 上有被亚甲基分离的 2 条双链, 其中 C-H 键易在被 ROS 攻击下, 从脂肪酸侧链甲烯碳中夺取氢原子可启动脂质的过氧化, 使整个双链发生重组, 生成更稳定的脂质过氧化物。而脂质过氧化物可在金属离子的作用下发生脂质过氧化链式反应, 导致精子膜损伤甚至死亡。QUE 作为天然黄酮类抗氧化剂, 能够有效清除 ROS, 调节细胞膜内的脂质成分, 降低脂质过氧化对精子质膜的损伤, 降低顶体损伤率, 提高精子冻融后的活率、活力和运动指标。

QUE 可通过调节 GSH 水平来增强抗氧化能力, 这是因为当机体产生自由基时, 超氧化物歧化酶将迅速将自由基的 O_2^- 转化为 H_2O_2 , 并进一步催化为无毒 H_2O 和 GSH^[18]。而作为反应氢供体, GSH 水平决定了反应速率^[19]。本研究表明, 在绵羊精液冷冻稀释液中添加 30 μmol/L 的 QUE 可显著增加 GSH 含量, 降低 ROS

的生成。Kumar 等^[20]研究表明在山羊精液稀释液中添加 20 μmol/mL 的 QUE 可以显著增加精子存活率和 ROS 阴性比例, Bang 等^[15]研究表明在狗精液冷冻稀释液中添加 50 μmol/L 的 QUE 可显著降低 ROS 水平。在不同物种中, 精子抗氧化能力有所差异。本研究结果与 Kumar 等^[20]和 Bang 等^[15]的研究结果在具体浓度上有所不同, 但均表明在适宜浓度范围内 QUE 可降低精子冷冻过程中 ROS 水平。

Cheraghi 等^[16]研究报道在人精液冷冻稀释液中添加 50 μmol/L 的 QUE 可显著提高线粒体膜电位水平; Kumar 等^[20]研究表明在山羊精液稀释液中添加 20 μmol/mL 的 QUE 可以显著提高精子冻融后的线粒体膜电位水平。本实验结果表明在绵羊精液冷冻稀释液中添加 30 μmol/L 的 QUE 可以显著提高线粒体膜电位水平, 此结果与上述相关研究有差异。这可能是在不同物种中, 精子中的各种蛋白含量有所不同, 导致精子的抗氧化能力出现差距, 所以在 QUE 的最佳浓度上有所不同。精子的线粒体膜电位会在冷冻保存的过程中下降, 从而导致线粒体的功能出现障碍, ATP 产量下降, 无法在精卵结合过程中提供足够的能量, 导致受精率下降^[18]。QUE 作用的靶点主要是膜细胞器, 而线粒体是其中之一。QUE 与线粒体能相互作用主要是因为 QUE 的化学结构具有高度疏水性, QUE 的化学结构包括 3 个芳香环和 5 个羟基, 使其具有两亲性。苯环和平面结构构成分子的疏水部分, 使其能与疏水环境相互作用^[21], 而羟基构成极性部分^[22-23], 而正是由于这一个结构, QUE 可以与线粒体膜的极性-非极性部分呈亲亲和力, 改变了膜的通透性, 影响了氧化磷酸化活性, 及

膜电位水平^[23-27]。

4 结 论

本研究结果表明,在绵羊精液冷冻稀释液中添加 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 QUE 可显著提高冷冻解冻后精子的活率、活力以及 VSL、VCL、VAP、BCF、LIN、WOB、GSH 含量,降低 ROS 水平、顶体损伤率,提高精子线粒体膜电位水平。

参考文献:

- [1] 李景. 绵羊人工授精技术及其在青海省推广应用现状 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [2] 曹建武. 影响猪人工授精效果的因素及对策 [J]. 畜牧兽医学 (电子版), 2021(22): 24-25.
- [3] Hill J R, Thompson J A, Perkins N R. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: a survey[J]. Theriogenology, 1998, 49(4): 697-709.
- [4] 郭良勇, 周俊波, 曹访, 等. 添加褪黑素对湖羊精液冷冻保存效果的影响 [J]. 湖州师范学院学报, 2020, 42(10): 37-42.
- [5] Santiani A, Evangelista S, Sepúlveda N. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa[J]. Theriogenology, 2014, 82(6): 884-889.
- [6] Aitken R J, Drevet J R. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: a two-edged sword[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(2): 111.
- [7] Bucak M N, Ateşşahin A, Varışlı O. *et al.* The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process[J]. Theriogenology, 2007, 67(5): 1060-1067.
- [8] Hamilton T R, Mendes C M, de Castro L S, *et al.* Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1687657.
- [9] Bansal A K, Bilaspuri G S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions [J]. Vet Med Int, 2010, 2010: 686137.
- [10] Zhang C, Jiang D, Wang J, *et al.* The effects of TPT and dietary quercetin on growth, hepatic oxidative damage and apoptosis in zebrafish[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 224: 112697.
- [11] Batool I, Fayyaz M H, Hameed A, *et al.* QUercetin in semen extender improves frozen-thawed spermatozoa quality and in-vivo fertility in crossbred Kamori goats[J]. Front Vet Sci, 2024, 11: 1385642.
- [12] Tvrdá E, Debacker M, Ďuračka M, *et al.* Quercetin and naringenin provide functional and antioxidant protection to stored boar semen[J]. Animals (Basel), 2020, 10(10): 1930.
- [13] Silvestre M A, Yáñez J L, Peña F J, *et al.* Role of antioxidants in cooled liquid storage of mammal spermatozoa[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(7): 1096.
- [14] Desai N R, Mahfouz R, Sharma R, *et al.* Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study[J]. Fertil Steril, 2010, 94(4): 1541-1543.
- [15] Bang S, Qamar A Y, Tanga B M, *et al.* Quercetin improves the apoptotic index and oxidative stress in post-thaw dog sperm[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(15): 21925-21934.
- [16] Cheraghi E, Sajadi S M S, Soleimani Mehranjani M. The effect of QUercetin on the quality of sperm parameters in frozen-thawed semen of patients with Asthenospermia[J]. Andrologia, 2021, 53(9): e14167.
- [17] Anger J T, Gilbert B R, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results[J]. J Urol, 2003, 170(4 Pt 1): 1079-1084.
- [18] Uribe P, Villegas J V, Boguen R. Use of the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate for mitochondrial membrane potential assessment in human spermatozoa[J]. Andrologia, 2017, 49(9): e12753.
- [19] Granado-Serrano A B, Martin M A, Bravo L, *et al.* Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38[J]. Chem Biol Interact, 2012, 195(2): 154-164.
- [20] Kumar A, Prasad J K, Kumar N, *et al.* QUercetin in semen extender curtails reactive oxygen and nitrogen species and improves functional attributes of cryopreserved buck semen[J]. Cryobiology, 2024, 116: 104931.
- [21] Fiorani M, Guidarelli A, Blasa M, *et al.* Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extra-mitochondrial fraction of the flavonoid[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(5): 397-404.
- [22] Pawlikowska-Pawlega B, Gruszecki W I, Misiak L E, *et al.* The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(4): 605-612.
- [23] Beecher G R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake[J]. J Nutr, 2003, 133(10): 3248S-3254S.
- [24] Pawlikowska-Pawlega B, Gruszecki W I, Misiak L, *et al.* Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768(9): 2195-2204.
- [25] Vissenaekens H, Smagghe G, Criel H, *et al.* Intracellular quercetin accumulation and its impact on mitochondrial dysfunction in intestinal Caco-2 cells[J]. Food Res Int, 2021, 145: 110430.
- [26] Sato S, Mukai Y. Modulation of chronic inflammation by quercetin: the beneficial effects on obesity[J]. J Inflamm Res, 2020, 13: 421-431.
- [27] Veiko A G, Sekowski S, Lapshina E A, *et al.* Flavonoids modulate liposomal membrane structure, regulate mitochondrial membrane permeability and prevent erythrocyte oxidative damage[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862(11): 183442.

(责任编辑: 周会会)