

泌尿生殖医学临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002012

快速复温与慢速复温解冻对精子质量的影响

陈钢鑫¹, 康跃凡¹, 林典梁¹, 孙 艳¹, 邱华红², 曾凡湘³, 郑备红¹

(福建省妇幼保健院, 福建医科大学附属医院 1. 生殖中心; 2. 院检验科; 3. 药剂科, 福州 350001)

【摘要】目的:探讨 2 种精液解冻方法对精子质量的影响。**方法:**筛选福建省妇幼保健院生殖中心的精液样本 50 例, 每个样本均分 2 份后进行液氮蒸汽法冷冻, 2 组冷冻精液分别采用快速复温和慢速复温解冻后比较 2 组精液的解冻效果。解冻效果包括精子动力学参数, 形态学参数, 精子 DNA 碎片指数 (sperm DNA fragmentation index, DFI), 精子解冻后在室温下 1、3、6、24 h 后的活动率, 非连续密度梯度离心后的精子动力学参数。**结果:**2 组精子解冻后的精子动力学参数、精子正常形态率间的差异无统计学意义 ($P>0.01$), 快速组的精子 DFI, 精子头、体、尾部畸形率, 畸形精子指数 (teratozoospermia index, TZI), 精子畸形指数 (sperm deformity index, SDI) 比慢速组更低 ($P<0.01$), 2 组精子解冻后在室温保存 1、3 h 后精子动力学参数间的差异无统计学意义 ($P>0.01$), 而快速组解冻后在室温保存 6、24 h 后的精子动力学参数比慢速组更好 ($P<0.01$)。2 组进行非连续密度梯度离心后精子浓度、总活动精子数、前向运动精子活动率、精子回收率的差异无统计学意义 ($P>0.01$)。**结论:**对于液氮蒸汽法冷冻的精液来说, 快速复温解冻比慢速复温解冻对精子的损伤较小, 其解冻效果更好。

【关键词】精液冷冻; 快速复温解冻; 慢速复温解冻; 精子质量

【中图分类号】R715.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-11-01

Effect of fast thawing and slow thawing on sperm quality

Chen Gangxin¹, Kang Yuefan¹, Lin Dianliang¹, Sun Yan¹, Qiu Huahong², Zeng Fanxiang³, Zheng Beihong¹

(1. Reproductive Center; 2. Clinical Laboratory; 3. Pharmacy Department, Fujian Provincial Maternity and Children's Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of fast thawing and slow thawing methods on the sperm quality. **Methods:** A total of 50 semen samples were screened out from the Reproductive Center of Fujian Provincial Maternal and Children's Hospital, and each sample was aliquoted into two parts and then cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. The two parts of the same semen were divided into two groups based on the methods used for thawing, i.e., fast thawing or slow thawing, and were observed for the difference in the thawing effect. The thawing effect included sperm kinetic parameters, morphological parameters, sperm DNA fragmentation index (DFI), sperm motility at 1 h, 3 h, 6 h, and 24 h after thawing when kept at room temperature, and kinetic parameters of sperms after a discontinuous density gradient centrifugation. **Results:** There were no significant differences between the two groups in the sperm kinetic parameters and percentage of sperms with normal morphology after thawing ($P>0.01$). Compared with the slow thawing group, the fast thawing group had significantly reduced values of the following: sperm DFI, deformity rate of sperm head, body, and tail, teratozoospermia index (TZI), and sperm deformity index (SDI) ($P<0.01$). There were no significant differences between the two groups in the sperm kinetic parameters at 1 h and 3 h after thawing when kept at room temperature ($P>0.01$), but the fast thawing group had significantly improved sperm kinetic parameters at 6 h and 24 h after thawing ($P<0.01$). There were no significant differences between the two groups in the sperm density, total motile sperm count, forward sperm motility, and sperm recovery after a discontinuous density gradient centrifugation ($P>0.01$). **Conclusion:** Fast thawing is better than slow thawing for semen cryopreserved by liquid nitrogen vapor due to less damage produced to sperms by the former.

【Key words】semen cryopreservation; fast thawing; slow thawing; sperm quality

作者介绍: 陈钢鑫, Email: 286188243@qq.com,

研究方向: 生殖医学。

通信作者: 郑备红, Email: 286188243@qq.com。

基金项目: 福建省妇幼保健院内科资助项目 (编号: 闽妇保院研 17-30)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190321.1502.006.html>

(2019-03-22)

20 世纪 50 年代, Polge 第 1 次在 $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下成功冷冻了牛精液标本, 并在次年解冻精液后采用供精人工授精技术 (artificial insemination with donor semen, AID) 使母牛成功受孕。1953 年, 艾奥瓦大学科学家采用相同的技术成功受孕并产下人类第一例 AID 婴儿。从此精液冷冻解冻技术被广泛应用于各个领域, 精液冷冻技术为人类生育力保存提供了基础, 精子库的成立标志着这项技术的成熟^[1]。在这项技术的应用过程中, 人们逐渐认识到精液在冷冻解冻过程中会对精子造成一定的损伤^[2-3], 如何最大限度地减小冷冻解冻对精子的损伤越来越受关注。目前精液冷冻方法有多种, 然而对精液解冻的研究较少, 本文旨在研究 2 种精液解冻方法对精子质量的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究收集了 2017 年 2 至 9 月在我院生殖中心就诊的患者精液标本 50 例。患者已排除生殖道感染及精索静脉曲张等男性常见疾病。收集的标本均达到精液冷冻标准。本研究经福建省妇幼保健院伦理委员会批准。

1.2 主要仪器与试剂

深圳华康生物医学工程有限公司精子染色液 (Diff-Quik 法); 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司精子 DNA 碎片染色试剂 (瑞吉染色法); 瑞典 Vitrolife 公司 SpermGrad 梯度液、IVF 洗精液、IVF 受精培养液; 美国 Cook 公司 Sperm Cryopreservation Buffer 精子冷冻液; 以色列 Sefi Medical Instruments 公司 Makler 精子计数板; 墨西哥 Coring 公司精液冷冻管; 德国蔡司 Primostar 光学显微镜。

1.3 方法

1.3.1 精液收集 志愿者禁欲 2~7 d, 采用手淫法取出精液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内液化, 标本完全液化后进行相关精液参数分析, 精液分析均由双人核对后取平均值, 达到冷冻标准的标本纳入本研究。

1.3.2 精液冷冻标准 每份精液标本混匀后严格按照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版) 标准^[4]进行精液常规分析、形态学分析, 将达到冷冻标准的样本分组冷冻 (精液冷冻标准为精液液化时间 $<60\text{ min}$, 活动精子总数 $>12 \times 10^6$, 精液量 $>2\text{ mL}$, 浓度 $>60 \times 10^6\text{ 个/mL}$, 前向运动精子率 $>60\%$, 精子正常形态率 $>4\%$)。

1.3.3 精液分组冷冻 每份精液混匀后分成两组各 1 mL , 将精液与精液冷冻液按 1:1 逐滴加入安培管内后混匀, 2 组标本在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷适应 30 min 后在液氮表面 30 cm 处静置 15 min , 然后迅速投入 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中保存。

1.3.4 精液解冻复苏 1 周后将样本从 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中迅速取出解冻复苏。其中 1 组在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 10 min 复苏 (快速复苏组), 1 组在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 空气中静置 30 min 复苏 (慢速复

苏组)。解冻后将安培管用无菌纱布擦干, 打开封口混匀后进行相关参数分析。

1.3.5 解冻后精液质量分析 精液解冻后分别分析 2 组精子动力学参数, 精子形态学参数, 精子 DNA 碎片指数 (sperm DNA fragmentation index, DFI), 精子室温下保存 1、3、6、24 h 的动力学参数, 非连续密度梯度离心后精子活动率与回收率。

1.3.6 精液常规分析 采用手工法分析精子浓度、前向运动精子百分率 (PR%)、非前向运动精子百分率 (NP%)、活动精子总数。评判方法参照 WHO 标准^[4]。

1.3.7 精液形态学分析 采用快速 Diff-Quik 染色法 (参照操作说明书), 普通光学显微镜下 10×100 倍油镜下观察 200 条以上精子, 计数精子头部、体部和尾部异常、包浆小滴数, 计算正常形态精子百分率、畸形精子指数 (teratozoospermia index, TZI)、精子畸形指数 (sperm deformity index, SDI), 评判方法参照 WHO 标准^[4]。

1.3.8 精液 DFI 指数分析 采用 SCD 法进行精液染色 (参照操作说明书), 在普通光学显微镜 10×100 倍镜下观察 500 个以上精子, 计算精子 DFI (评判标准参照图 1)。计算精子 DFI (%) = 存在 DNA 碎片的精子数/观察精子的总数 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学分析

分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用两独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.01$ 。

2 结果

2.1 一般资料

筛选的 50 例正常男性志愿者年龄、禁欲天数、精液体积、精液 pH 值、精子密度、精子活力、精子正常形态率等均达到了精液冷冻的标准, 详见表 1。

表 1 冷冻前精子质量 ($\bar{x} \pm s, n=50$)

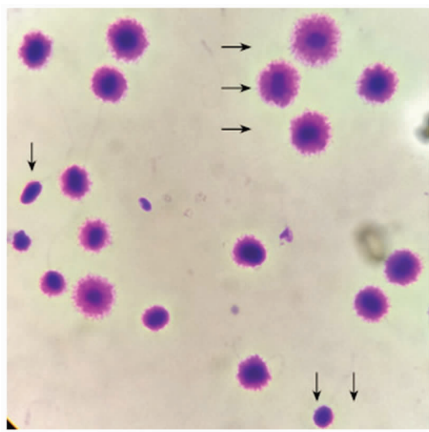
指标	指标值
样本量 (n)	50
年龄 (岁)	28.55 ± 6.96
禁欲天数 (d)	3.71 ± 2.63
精液体积 (mL)	3.51 ± 0.62
精浆 pH 值	7.21 ± 0.32
浓度 (10^6 个/mL)	80.94 ± 26.08
前向运动精子 (PR%)	59.76 ± 4.91
非前向运动精子 (NP%)	4.58 ± 1.49
活动精子总数 ($\times 10^6$)	25.94 ± 8.26
正常形态率 (%)	12.52 ± 5.02
头部畸形率 (%)	85.14 ± 6.46
体部畸形率 (%)	12.92 ± 7.13
尾部畸形率 (%)	6.80 ± 3.56
胞浆小滴 (%)	1.50 ± 1.30
SDI	1.06 ± 0.15
TZI	1.21 ± 0.13
DFI	10.68 ± 2.68

2.2 解冻后 2 组精子动力学、形态学参数及 DFI 指数的比较

2 组精液解冻后精子动力学相关参数均未见统计学差异 ($P>0.01$)。由于冷冻时精子稀释了 1 倍, 2 组解冻后的精子浓度均下降了一半。解冻后的 2 组精子正常形态率, 头部畸形率均未见统计学差异 ($P>0.01$), 精子体、尾部的畸形率, SDI、TZI 均有统计学差异, 其中快速组的精子损伤较小 ($P<0.01$)。解冻后 2 组精液中快速组较慢速组对精子的 DNA 损伤更小, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。详见表 2。精子 DNA 碎片评价标准如图 1 所示。

表 2 解冻后 2 组间精子动力学、形态学及 DFI 指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=50$)

相关参数	慢速组	快速组	t 值	P 值
精子浓度 (10^6 个/mL)	42.66 ± 11.59	41.94 ± 10.65	0.835	0.408
前向运动精子 (PR%)	32.86 ± 6.35	34.86 ± 6.25	-2.252	0.029
非前向运动精子 (NP%)	2.76 ± 1.06	2.60 ± 1.08	0.774	0.443
活动精子总数 (10^6 个)	15.28 ± 5.39	16.08 ± 5.02	-0.625	0.532
正常形态率 (%)	11.76 ± 4.26	11.62 ± 4.37	0.505	0.616
头部畸形率 (%)	84.02 ± 5.82	82.46 ± 4.53	2.356	0.023
体部畸形率 (%)	23.40 ± 5.62	18.20 ± 6.71	6.352	0.000
尾部畸形率 (%)	31.22 ± 7.34	22.58 ± 7.99	8.174	0.000
胞浆小滴 (%)	0.74 ± 1.24	1.02 ± 1.39	-1.784	0.074
SDI	1.39 ± 0.11	1.24 ± 0.12	-0.818	0.000
TZI	1.58 ± 0.09	1.40 ± 0.13	-8.555	0.000
DFI	22.24 ± 3.29	12.98 ± 3.68	13.613	0.000



普通光学显微镜 10×100 倍镜下

注: 精子头部周围产生大光晕者表示正常精子 (三处)。精子头部周围仅见小光晕或无光晕 (→ 处)、单侧光晕厚度小于精子头部直径 1/3 者表示该精子存在 DNA 碎片 (二处)

图 1 精子 DNA 碎片异常评价标准

2.3 精子解冻后在室温下保存不同时间的 PR% 的比较

在室温下解冻后的 2 组精子活动力 3 h 内无明显差异 ($P>0.01$), 6 h 以后其活动力开始显著下降, 快速解冻较慢速解冻能延长精子在体外的存活时间 ($P<0.01$)。详见表 3, 散点图如图 2 所示。

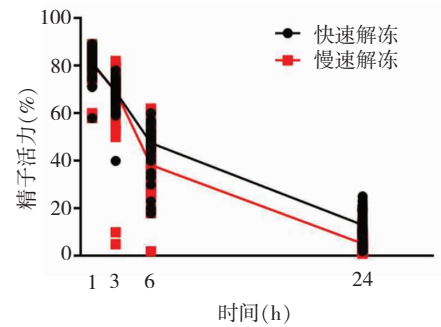


图 2 不同时段下精子 PR% 散点图

表 3 精子解冻后在室温下不同时间 PR% 的比较 ($\bar{x} \pm s, n=50$)

时间	慢速组	快速组	t 值	P 值
存活 1 h	80.66 ± 8.08	81.22 ± 5.30	-0.597	0.553
存活 3 h	69.28 ± 14.86	69.00 ± 5.83	0.132	0.895
存活 6 h	38.24 ± 11.57	47.48 ± 9.38	-6.533	0.000
存活 24 h	5.28 ± 3.62	13.10 ± 6.01	-9.589	0.000

2.4 非连续密度梯度离心后精子参数的比较

2 组解冻后经密度梯度离心后精子浓度、精子活动力、总活动精子数、精子回收率等均无统计学差异 ($P>0.01$), 详见表 4。

表 4 非连续密度梯度离心后精子参数比较 ($\bar{x} \pm s, n=50$)

相关参数	慢速组	快速组	t 值	P 值
精子浓度 (10^6 个/mL)	18.92 ± 11.31	20.14 ± 11.00	-2.160	0.035
前向运动精子 (PR%)	83.46 ± 7.24	84.68 ± 5.50	-1.630	0.110
非前向运动精子 (NP%)	2.78 ± 1.66	2.52 ± 1.09	0.925	0.360
总活动精子数 (10^6 个)	4.93 ± 0.42	5.25 ± 0.41	2.099	0.041
精子回收率 (%)	32.32 ± 16.22	33.65 ± 16.85	0.872	0.387

3 讨论

精液冷冻解冻技术是一项保存生育力的基本技术。目前研究主要方向为精子冷冻的效果, 主要包括精液冷冻对精子活动力、精子顶体、细胞膜、相关细胞器、细胞核等的影响^[4], 较少有人研究解冻方法对精子的影响。有报道表明精子冷冻解冻时由于渗透压的改变可能会导致解冻损伤的发生, 但其机制却未阐明^[5]。WHO 人类精液操作手册中给出了精液解冻的推荐方法, 其指出在液氮罐中取出精液后置于棉纸或支架上复温至室温即可使用^[6]。陈振文等^[7]在全国辅助生殖技术规范操作手册中提到, 在 37℃ 下水浴解冻的精液比在室温下自然解冻的复苏效果更好。两者提示了精液解冻时间与温度的不同可能会对精子造成不同的损伤。

本研究分析了冷冻的精子在快速复温与慢速复温解冻后的动力学参数、形态学参数、精子 DFI 指数以及解冻后不同时间段下的精子活动力。在动力

学方面,2 组精子的复苏率均约 50%,这与相关报道一致^[8-9]。这说明冷冻确实对部分精子造成了一些不可逆的损伤。解冻后 2 组的精子活动力差异不大,2 种解冻法对精子动力学的影响不大。在形态学方面,快速解冻组的形态学参数均比慢速组损伤较小,但正常形态率未见明显差异。在 DFI 指数方面,有研究^[10-11]表明精液冷冻解冻会导致精子核 DNA 受损,本结果证实了这个观点。慢速解冻明显增加了精子核 DNA 的损伤,这说明慢速解冻不但在宏观上增加了精子头部的畸形率,而且也造成了精子头部微结构的损伤。这主要是因为解冻过程对顶体造成了损伤,使精子在回温或者冰晶消除后造成了 DNA 片段发生了不可逆的断裂,进而游离出细胞核。在存活时间方面,未经冷冻的精子平均活动时间为 3~4 d^[12]。实验结果表明精液冷冻后其存活时间会缩短,这与文献^[13]报道一致。2 组精子的活动力在 3 h 内无明显差异,6 h 后其活动力开始显著下降,快速解冻较慢速解冻能延长精子在体外的存活时间。

鉴于精子冷冻解冻技术主要应用于辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART),对于 ART 来说无论是 AID 还是体外受精,均要对解冻后的精子进行梯度离心处理。离心会对解冻后精子的活动力、回收率等造成影响^[14],因此本研究也分析了 2 组离心后的精子相关参数。实验结果表明快速解冻法离心后的效果虽与慢速组相比,差异无统计学意义,但需要更大的样本量来证实这个结果。

低温冷冻会对精子造成一些不可逆的损伤。其机制主要是精子冷冻过程中细胞内冰晶体的形成会对细胞壁造成机械性损伤,精子解冻过程中胞质内渗透压的改变会对细胞器造成损伤^[15]。精子比其他细胞更能耐受低温,精子细胞膜的脂质双层不饱和脂肪酸的流动性更强、所含的水分更少 (<50%)、冷冻解冻过程中形成的冰晶更少^[16]。但这并不意味着冷冻解冻不会影响精子的质量。Zribi 等^[17]的研究表明精子头部或尾部的冷冻解冻损伤往往是独立发生的,所以会造成实验中 2 组解冻方法对精子各个部位的损伤程度有所不同的现象。本研究结果表明精液冷冻解冻主要造成了体尾部的损伤,精液快速解冻对其损伤相对较小,且 2 组均出现了断尾的现象。精子体尾部是控制其运动的主要器官,主要结构由 2 根中心微管和周围的 9 组二联微管组成,在解冻过程中可能是残余的水分过多导致冰晶体的重形成造成微管断裂,最终影响了精子的质量。

本文分析了 2 种解冻方法对精子质量的影响,

总的来说快速解冻较慢速解冻方法效果更佳。建议精液解冻时进行快速解冻,授精时尽量缩短解冻后的精卵结合时间。

参 考 文 献

- [1] 卢文红,陈振文. 中、外精子库的发展和管理比较[J]. 生殖与避孕杂志,2014,34(2):102-107.
- [2] Isaac AV, Kumari S, Nair R, et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 494(3-4):656-662.
- [3] Ali M. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study[J]. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 2015, 13(10):633-644.
- [4] Zhang W, Li F, Cao H, et al. Protective effects of L-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation[J]. Zygote, 2016, 24(2):293-300.
- [5] 王尚乾,王 巍,张 炜. 人类精子冷冻损伤及保护的研究进展[J]. 中华男科学杂志,2013,19(3):262-265.
- [6] WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010: 16-20, 49-86.
- [7] 陈振文. 辅助生殖男性技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2016: 215-217.
- [8] 王亚楠,邹沙沙,肖 倩,等. 冷冻前平衡处理对人精子冻融后相关参数的影响[J]. 中华男科学杂志,2013,19(10):886-889.
- [9] Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing[J]. Human Reproduction (Oxford, England), 2000, 15(10):2173-2179.
- [10] 吴永根,郑九嘉,胡黎川,等. 精子 DNA 冷冻损伤易感性与精子活动力相关性[J]. 生殖医学杂志,2016,25(12):1095-1099.
- [11] 许观照,张丽红,王时灿,等. 精子冻存技术及上游法精子处理技术对精子 DNA 完整性的影响[J]. 生殖医学杂志,2013,22(12):945-950.
- [12] 王雪梅, Dennis Marchesi, 张 展,等. 三种精子处理方法对精子存活时间的影响[J]. 中国妇幼保健,2013,28(27):1764-1766.
- [13] Allamaneni SR, Agarwal A, Rama S, et al. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa[J]. Asian Journal of Andrology, 2005, 7(1):86-92.
- [14] 吴 颖,张欣宗,姚康寿. 两种精液处理方法对精液参数及冷冻效果的比较分析[J]. 中国男科学杂志,2010,24(9):40-42.
- [15] Yoon SJ, Rahman MS, Kwon WS, et al. Proteomic identification of cryostress in epididymal spermatozoa[J]. J Anim Sci Biotechnol, 2016, 7:67.
- [16] Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences[J]. Theriogenology, 2000, 53(1):47-58.
- [17] Zribi N, Feki CN, El EH, et al. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1):159-166.

(责任编辑:唐秋姗)