

## 冷冻保护剂对不同质量精液顶体完整性的影响\*

张 益<sup>1</sup>, 陈 莹<sup>2△</sup>, 计 垣<sup>1</sup>, 李 红<sup>1</sup>, 杨继高<sup>1</sup>, 孙大光<sup>1</sup>, 杨 柳<sup>1</sup>, 黄 静<sup>1</sup>

(1. 重庆市人口和计划生育科学技术研究院出生缺陷与生殖健康重庆市市级重点实验室 400020;

2. 重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心 400016)

**摘要:**目的 探讨冷冻保护剂对不同质量精液顶体完整性的影响。方法 采集青壮年自愿者 500 份精液标本,按照 WHO 推荐方法进行精液分析,并将其分为 6 组:正常组、少精子组、畸形精子组、弱精子组、少弱精子组、少弱畸形精子组。将各组精液分为 3 份用于试验。冷冻保护剂用甘油、卵黄及柠檬酸钠配制,精液于液氮中缓冻,1 个月后复苏,采用巴氏染色,光镜下观察顶体完整性。结果 解冻后,加与不加冷冻保护剂的各组精子顶体完整率比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );冷冻前,畸形精子组与少弱畸形精子组精子顶体完整率与其他组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 冷冻保护剂在精液冷冻保存中能保护精子的结构和功能。

**关键词:**精液保存;冷冻;顶体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.18.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)18-1820-02

### Influence of cryoprotectant on acrosome integrity of different quality of sperm\*

Zhang Yi<sup>1</sup>, Chen Ying<sup>2△</sup>, Ji Yuan<sup>1</sup>, Li Hong<sup>1</sup>, Yang Jigao<sup>1</sup>, Sun Daguang<sup>1</sup>, Yang Liu<sup>1</sup>, Huang Jing<sup>1</sup>

(1. Municipal Key Laboratory of Birth Defects and Reproductive Health, Institute of Population and Family Planning Science and Technology of Chongqing, Chongqing 400020, China; 2. Assisted Reproductive Center,

First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** Objective To explore influence of cryoprotectant on acrosome integrity of different quality of sperm. Methods 500 semen samples from young volunteers were collected. Semen analysis was conducted according to the WHO recommended methods. They were divided into 6 groups: normal group, less sperm group, malformed sperm group, weak sperm group, less-weak sperm group and less-weak-malformed sperm group. Cryoprotectant were prepared using glycerol, egg yolk and sodium citrate. Semen samples were frozen slowly in liquid nitrogen and recovered after one month. Papanicolaou stain was employed and acrosome integrity was observed by light microscopy. Results Comparison of rates of acrosome integrity between groups with and without cryoprotectant after thawing, there was statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Before freezing, it was also statistically significant difference when compared the rates of acrosome integrity in malformed sperm group, less-weak-malformed sperm group to those in other groups ( $P < 0.05$ ). Conclusion Cryoprotectant can protect effectively the structure and function of sperm in the process of semen cryopreservation.

**Key words:** semen preservation; freezing; acrosome

随着辅助生殖技术的广泛开展及人类精子库的建立,精液冷冻技术的应用越来越广泛。精液冷冻复苏过程中,精子将经历冰晶形成、细胞内外渗透压变化等过程,易造成精子结构和功能的损伤。顶体位于精子头部,其内富含多种蛋白水解酶,在精子穿过卵子放射冠、透明带等的受精过程中发挥主要作用,故精子顶体与精子功能关系密切。顶体完整性是评价顶体的重要指标之一。现就冷冻保护剂对男性精子顶体完整率的影响进行研究。

### 1 材料与方 法

**1.1 标本采集** 500 份精液取自青壮年自愿者,职业以学生为主,年龄 18~25 岁,无遗传性疾病家族史,无外伤及性功能障碍史,体检无外生殖器疾病,近期无致畸因素接触史。进入试验前签署供精知情同意书。

**1.2 精液标本收集、分析及分组** 禁欲 2~7 d,手淫取精存于取精杯内,置 37℃ 水浴箱内液化。待精液完全液化后,按《WHO 人类精液及精子——宫颈黏液相互作用实验室检验手

册》(第 4 版)进行精液质量的常规分析<sup>[1]</sup>,畸形精子症:精子正常形态率低于 15%;弱精子症:精子活力(a+b 级) < 50%;少精子症:精液密度低于  $20 \times 10^6$ /mL。根据上述质量分析将精液分为 6 组:正常组、少精子组、畸形精子组、弱精子组、少弱精子组、少弱畸形精子组。各组精液分为 3 份用于试验。

**1.3 精液冷冻** 精液冷冻采用 3 步法,冷冻保护剂用甘油、卵黄及柠檬酸钠配制<sup>[2]</sup>。将配制的精液保护剂 37℃ 预热,取已液化精液与预热的冷冻保护剂以体积比 1:1 混匀,置于充满液氮蒸汽的器皿内,先于距液氮液面 5 cm(-80℃)处静置 15 min,然后置于液面 10 min,最后浸入液氮中。1 个月后复苏。

**1.4 精子染色** 采用改良巴氏染色法:(1)将干燥的精液涂片用等量混合的 95% 乙醇和乙醚固定 5~15 min;(2)用 80%、70%、50% 梯度乙醇各浸 1~2 min,最后浸入蒸馏水中;(3)苏木素染色 3 min,酸性乙醇分色,其间每一步骤均依次用流水漂洗 3 min,Scott 溶液漂洗 4 min;(4)蒸馏水浸洗 1 次后用 50%、70%、80%、95% 梯度乙醇各浸 1 min;(5)用橙黄 G6 染液染色

2 min, 浸入 95% 乙醇 2 次, 每次 1~2 min; (6) 用 EA50 染液染色 5 min, 浸入 95% 乙醇 3 次, 每次 1 min, 然后浸入无水乙醇 2 min; (7) 用二甲苯透明 3 次, 每次 1 min, 封片。

**1.5 精子顶体完整率的评估** I 型: 顶体完整, 精子外形正常, 着色均匀, 顶体边缘整齐, 有时可见清晰的赤道板; II 型: 顶体轻微膨胀, 精子质膜(顶体膜)疏松膨大; III 型: 顶体破坏, 精子质膜严重膨胀受损, 着色浅, 边缘不整齐; IV 型: 顶体全部脱落, 精子核裸露。I 型是顶体正常的精子, II、III、IV 型均为顶体不完整。在光镜下, 每份样本分析 200 个精子, 计算顶体完整率。顶体完整率=有完整顶体的精子数/精子总数 $\times 100\%$ 。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用两样本比较的 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

500 份精液中正常精子 370 份, 少精子 20 份, 畸形精子 10 份, 弱精子 60 份, 少弱精子 30 份, 少弱畸形精子 10 份。

解冻后, 加与不加冷冻保护剂的各组精子顶体完整率比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 畸形精子组与少弱畸形精子组冷冻前精子顶体完整率与其他组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 畸形精子组冷冻前与加保护剂解冻后顶体完整率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同质量精液冷冻前、后顶体完整率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	冷冻前	解冻后	
			加保护剂	不加保护剂
正常组	370	77.12 $\pm$ 3.54	76.95 $\pm$ 3.54	65.85 $\pm$ 4.40*
少精子组	20	75.50 $\pm$ 3.26	74.83 $\pm$ 2.86	65.77 $\pm$ 2.64*
畸形精子组	10	69.35 $\pm$ 3.45#	65.10 $\pm$ 2.01 $\Delta$	57.90 $\pm$ 1.87*
弱精子组	60	75.93 $\pm$ 2.86	74.96 $\pm$ 3.05	64.57 $\pm$ 3.88*
少弱精子组	30	75.35 $\pm$ 2.74	74.53 $\pm$ 2.44	64.55 $\pm$ 3.72*
少弱畸形精子组	10	68.60 $\pm$ 3.54#	67.7 $\pm$ 2.57	59.95 $\pm$ 3.55*

\*:  $P < 0.05$ , 与加保护剂比较; #:  $P < 0.05$ , 与冷冻前正常组、少精子组、弱精子组及少弱精子组比较。 $\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与畸形精子组冷冻前比较。

## 3 讨 论

顶体是精子头部前端溶酶体样细胞器, 紧贴于细胞膜下。顶体内含多种酶类, 这些酶类在发生顶体反应时被释放出来而使精子穿过卵丘细胞层和透明带, 使精子与卵子融合, 所以, 完整的顶体是影响精子正常受精的重要因素<sup>[3]</sup>。只有具备完整顶体的精子才能出现顶体反应, 顶体反应是精子穿过透明带的关键<sup>[4]</sup>。顶体不完整常包括以下情况: 顶体缺乏、顶体体积小、泡状顶体、无内容物或电子密度降低等, 这些类型的精子顶体酶缺失或活性降低, 精子不能穿越放射冠和透明带导致受精率降低<sup>[5]</sup>。精子顶体完整率的检测可采用普通光镜、扫描电镜、透射电镜和荧光显微技术等, 精子染色方法包括三色法、考马斯亮蓝法、瑞-姬氏染色法及巴氏染色法等<sup>[6-8]</sup>, 巴氏染色法操作简便, 应用更广泛。精子经过巴氏染色后可清楚显示精子顶体的大小和形态, 因此, 可以作为预测精子受精能力的一个指标<sup>[9]</sup>。精液冷冻和复苏过程中精子会受到多种损伤, 如冷休克、冷冻损伤、氧化应激、细胞膜成分改变、冷冻保护剂的化学毒性和渗透性损伤等<sup>[10]</sup>。冷冻保存后精子超微结构的改变主要在顶体<sup>[11]</sup>, 有研究发现冷冻前与解冻后精子顶体的完整性

有显著差异<sup>[12]</sup>。冷冻-解冻过程引起精子头部浆膜出现广泛肿胀、破损, 顶体结构异常显著增多, 顶体内内容物丢失, 甚至顶体帽脱落<sup>[13-14]</sup>。孙研等<sup>[15]</sup>发现冷冻过程本身、冷冻保护剂和冷冻速度对精液顶体完整率没有影响, 其观点与本研究结果不同, 这可能与本研究对象为正常精液有关。冷冻前精液质量与精液顶体完整率有关, Esteves 等<sup>[4]</sup>发现通过上游法优选的精液在解冻后有更高的顶体完整率。

本研究表明, 不加冷冻保护剂的精液解冻后与冷冻前及加冷冻保护剂解冻后顶体完整率的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明冷冻保护剂在精液冷冻复苏过程中能有效防止渗透压改变、冰晶形成、氧化应激等对精子结构和功能的损伤, 甘油-卵黄-柠檬酸钠作为常用的冷冻保护剂具有较好的抗冷冻损伤作用。

本研究结果显示冷冻前, 畸形精子组与少弱畸形精子组顶体完整率与其他组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这可能与畸形精子本身形态异常比率较高有关。畸形精子组冷冻前与加冷冻保护剂解冻后顶体完整率差异有统计学意义, 而少弱畸形精子组却没有差异, 这可能是由于本研究样本来源于健康志愿者而非不育人群, 少弱畸形精子样本量较少有关。但本研究结果反映了精子本身形态异常对精液冷冻效果的影响, 对寻求更好的冷冻方法提供了一些思路。

## 参考文献:

- [1] 世界卫生组织. 人类精液及精子——宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M]. 谷翊群, 陈振文, 于和鸣, 等, 译. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 5-6.
- [2] 马春杰, 文任乾, 唐运革, 等. 冷冻保存对人精子运动特征的影响[J]. 中华男科学杂志, 2008, 22(12): 19-21.
- [3] Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, et al. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function[J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(10): 432-438.
- [4] Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing[J]. Hum Reprod, 2000, 15(10): 2173-2179.
- [5] 郭航, 刘睿智, 孙妍, 等. 顶体完整率与形态正常精子百分率及精子密度的关系[J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(5): 663-664.
- [6] Nagy S, Jansen J, Topper EK, et al. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles[J]. Biol Reprod, 2003, 68(5): 1828-1835.
- [7] 杨麦贵, 郝晓柯, 张竹映, 等. 一氧化氮对精子膜功能完整性的影响[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(24): 2266-2268.
- [8] Marshburn PB, Stovall DW, Hammond MG, et al. Fertility rates in men with normal semen characteristics; spermatozoal testing by induction of the acrosome reaction and Wright-Giemsa staining for subtle abnormal forms[J]. Obstet Gynecol, 1991, 77(2): 250-255.
- [9] 宋雨, 刘雨生, 童先宏, 等. 少、弱精子症(下转第 1825 页)

如家庭、朋友、就业机会以及青少年自身心理因素等造成了他们态度的不稳定性。(2)干预覆盖面大,但次数有限,力度不够。干预的内容无法深入每个受干预者的内心,也就无法改变受干预者的态度和行为。对 AIDS 的反歧视教育是一个长期、艰巨的任务,不是靠某个项目团队在一朝一夕之内就能完成的。按照行为的知行理论,要形成健康的行为必须有正确的知识作基础,良好的态度与信念作动力<sup>[9]</sup>。行为理论认为,要想使某人形成某种行为,首先必须相信该行为将会带来好处<sup>[10]</sup>。所以要强化目标人群的社会责任感,坚定预防艾滋病的信念,端正对待艾滋病的态度,从控制行为入手,提高认知水平。Szwarcwald<sup>[11]</sup>等研究结果表明,对艾滋病感染者的羞辱或歧视程度与对艾滋病相关知识的了解程度成反比。戴敏<sup>[12]</sup>等人调查结果也表明,农村居民艾滋病防治知识的多少与其对艾滋病者的态度相关。因此,健康教育的内容应该有针对性,不仅要包括 AIDS 的一些常识问题,还应包括一些心理、伦理道德及人文关怀等方面的知识。在校外青少年中开展同伴教育具有积极作用。一项来自四川省成都市的研究显示,在流动人口中开展为期 1 年的同伴教育后,目标人群对 AIDS/性传播性疾病(sexually transmitted diseases, STD)的知识水平、防范意识等态度都有了显著的提高<sup>[13]</sup>。政府部门应当制定相应的工作政策,将 AIDS 防治工作纳入日常工作的范畴,创造政府牵头、部门协作、全社会参与的局面<sup>[14-15]</sup>。鼓励市、县医疗卫生机构和其他方面的专业人员深入乡村,支持乡村开展 AIDS 防治健康干预活动,还要强调村干部在 AIDS 防治健康教育活动中的责任和义务。只有这样,才能把 AIDS 防治健康干预活动从单个的、不确定的项目活动方式转变为普及的、持久的基础工作方式,从而使得农村 AIDS 防治工作得以长期、持续开展。

#### 参考文献:

- [1] 石晓燕,余小鸣,段春明,等.校外青少年 AIDS 相关知识态度及危险行为调查[J].中国 AIDS 性病,2008,14(1):52-54.
- [2] 罗树杰.校外青少年高危行为与艾滋病易感性初探:以广西为例[J].广西民族学院学报:哲学社会科学版,2006,28(3):39-42.
- [3] 常春,陈磊,孙昕寰,等.以整体观分析校外青少年对艾滋

病的易感脆弱性[J].北京大学学报:医学版,2007,39(2):132-135.

- [4] 李雨波,李英华,王新伦,等.农村社区常住居民艾滋病防治健康教育模式试点研究[J].中国健康教育,2008,24(12):896-899.
- [5] 徐哲懿.青少年艾滋病健康教育项目的研究[J].中国健康教育,2006,22(7):538-539.
- [6] 唐小清,张丽伟.重庆市 454 名职业学校学生 AIDS 相关知识、态度、行为、需求调查[J].重庆医学,2010,39(13):1719-1719.
- [7] 范珊荣,李勇.社区流动人口艾滋病知识及健康教育效果评估[J].现代预防医学,2002,29(2):230-231.
- [8] 刘丰海,敬新苗.农村校外青少年 AIDS 防治知识健康教育策略分析[C]//中华预防医学会,中国疾病预防控制中心,中国健康教育协会.2008 中国健康教育与健康促进大会论文集.北京:中华预防医学会,2008:194.
- [9] 吕姿之.健康教育与健康促进[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998.
- [10] Fitzgerald K, Chakraborty J, Shah T, et al. HIV/AIDS knowledge among female migrant farm workers in the midwest[J]. J Immigr Health, 2003, 5(1):29-36.
- [11] Szwarcwald CL, Barbosa-Júnior A, Pascom AR, et al. Knowledge, practices and behaviours related to HIV transmission among the Brazilian population in the 15-54 years age group, 2004[J]. AIDS, 2005, 19 Suppl 4: S51-58.
- [12] 戴敏,易辉容,王志勇,等.流动人口艾滋病认知状况及高危行为[J].预防医学情报杂志,2007,23(5):528-531.
- [13] 钟琛,张继昌,包静梅.同伴教育在流动人口艾滋病干预中的运用[J].预防医学情报杂志,2004,20(4):421-422.
- [14] 曾艺,贺加.以社区为基础的流动人口 AIDS 干预作用与对策探讨[J].重庆医学,2008,37(18):2128-2129.
- [15] 李雨波,李英华,王新伦,等.农村社区常住居民艾滋病防治健康教育模式试点研究[J].中国健康教育,2008,24(12):896-899.

(收稿日期:2010-12-08 修回日期:2011-04-11)

(上接第 1821 页)

- 中精子形态缺陷类型及发生率的检查分析报告[J].中华男科学杂志,2007,21(7):27-30.
- [10] Critser JK, Mobraaten LE. Cryopreservation of murine spermatozoa[J]. ILAR J, 2000, 41(4):197-206.
  - [11] Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, et al. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000, 91(1):65-70.
  - [12] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function[J]. Reprod Fertil Dev, 1995,

7(4):871-891.

- [13] Barthelemy C, Royere D, Hammah S, et al. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation[J]. Arch Androl, 1990, 25(1):29-40.
- [14] Mahadevan MM, Trounson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen[J]. Fertil Steril, 1984, 41(2):287-293.
- [15] 孙研,薛百功,李哲,等.精子优选和精液冷冻对顶体完整率的影响[J].实用医学杂志,2005,21(21):2421-2422.

(收稿日期:2011-02-22 修回日期:2011-04-15)