

〔文章编号〕 1007-0893(2021)06-0038-02

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.06.014

不同精液解冻方法对精子质量的影响

陈棧焜 黄绮云 池霖生 马文敏

(佛山市妇幼保健院, 广东 佛山 528000)

〔摘要〕 **目的:** 分析不同精液解冻方法对精子质量的影响。**方法:** 择取 2018 年 1 月至 2020 年 8 月佛山市妇幼保健院生殖中心的 200 份精液样本, 每份样本再均分成 2 份后予以液氮蒸汽法冷冻处理, 之后分别通过快速复温法、慢速复温法对样本予以解冻处理, 比较分析两组不同精液解冻法下精子质量, 包括精子浓度、活动精子总数、非前向运动精子、前向运动精子、头部畸形率、正常形态率、胞浆小滴、尾部畸形率、体部畸形率、畸形精子指数、精子 DNA 碎片指数、精子畸形指数, 以及解冻后精子在室内温度条件下存活 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 的前向运动精子百分率。**结果:** 两组精子浓度、活动精子总数、非前向运动精子、前向运动精子、头部畸形率、正常形态率、胞浆小滴比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 快速复温法组精子尾部畸形率、体部畸形率、畸形精子指数、精子 DNA 碎片指数、精子畸形指数均低于慢速复温法组, 组间比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组解冻后精子在室温度存活 1 h、3 h 前时向运动精子百分率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 存活 6 h、12 h、24 h 快速复温法组的前向运动精子百分率高于慢速复温法组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 针对经过液氮蒸汽法冷冻的精液而言, 相比于慢速复温法, 快速复温法解冻精子质量更佳, 解冻效果更好。

〔关键词〕 精液解冻; 快速复温法; 慢速复温法; 精子质量

〔中图分类号〕 R 715.2 〔文献标识码〕 B

在精液冷冻解冻技术运用中, 精子受损问题逐渐受到重视, 临床研究也将重点转移至如何减轻冷冻解冻这一过程对精子造成的损伤^[1]。现阶段, 精液冷冻技术涉及到很多种, 但在解冻方法方面的研究却较少。本研究分析两种不同精液解冻方法对精子质量的影响, 具体内容如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

择取 2018 年 1 月至 2020 年 8 月本院生殖中心的 200 份精液样本, 样本的精液质量均达到正常, 排除精索静脉曲张、生殖道感染等常见男性疾病病例, 排除畸形精子太高、精子数目太少等样本。

1.2 主要仪器与试剂

精子染色液 (Diff-Quik 法, 深圳华康生物医学工程有限公司); 精子 DNA 碎片染色试剂 (瑞吉染色法, 安徽安科生物工程 (集团) 股份有限公司); SpermGrad 梯度液、IVF 洗精液、IVF 受精培养液 (瑞典 Vitrolife 公司); Sperm Cryopreservation Buffer 精子冷冻液 (美国 Cook 公司)。

1.3 方法

所有志愿者均需要禁欲 2~7 d, 通过手淫方式获得精液, 将精液样本置于 37 °C 恒温水浴箱予以液化处理, 之后分析相关参数, 每份冷冻精液均需符合标准要求^[2]。每份样本

平均分成 2 份, 每份 1 mL, 对所选精液样本予以液氮蒸汽法冷冻处理, 按照 1:1 的比例在装有精液的安培管内加入精液冷冻液并混匀, 之后对样本予以 4 °C 冷适应处理, 时间为 30 min, 然后置于液氮表面 30 cm 位置 15 min, 再快速投入 -196 °C 液氮内予以保存。1 周之后, 分别通过快速复温法和慢速复温法对样本予以解冻处理, 其中快速复温法组是将安培管取出后置于 37 °C 水浴锅中水浴复温 10 min; 慢速复温法组是将安培管取出后置于 25 °C 空气中复温 30 min。解冻后通过无菌纱布将安培管擦干, 再将封口打开并混匀, 分析相关精液参数。

1.4 观察指标

参照《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^[3] 比较分析两组不同解冻法下的精子质量, 包括精子浓度、活动精子总数、非前向运动精子、前向运动精子、头部畸形率、正常形态率、胞浆小滴、尾部畸形率、体部畸形率、畸形精子指数、精子 DNA 碎片指数、精子畸形指数, 以及解冻后精子在室内温度条件下存活 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 的前向运动精子百分率。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

〔收稿日期〕 2020-12-01

〔作者简介〕 陈棧焜, 女, 主管技师, 主要研究方向是辅助生殖技术实验室方向。

2 结果

2.1 解冻后两组精子质量指标比较

解冻后两组精子浓度、活动精子总数、非前向运动精子、前向运动精子、头部畸形率、正常形态率、胞浆小滴比较，

差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)；快速复温法组精子尾部畸形率、体部畸形率、畸形精子指数、精子 DNA 碎片指数、精子畸形指数均低于慢速复温法组，组间比较，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 解冻后两组精子质量指标比较

($n = 200, \bar{x} \pm s$)

组别	精子浓度/ $\times 10^6$ 个 \cdot mL ⁻¹	活动精子总数/ $\times 10^6$ 个	非前向运动精子/%	前向运动精子/%	头部畸形率/%	正常形态率/%
慢速复温法组	42.37 \pm 11.39	15.30 \pm 5.41	2.81 \pm 1.12	32.78 \pm 6.52	84.01 \pm 5.33	11.67 \pm 4.30
快速复温法组	41.89 \pm 10.56	16.10 \pm 5.11	2.59 \pm 1.10	34.79 \pm 6.30	82.35 \pm 4.41	11.59 \pm 4.41

组别	胞浆小滴/%	尾部畸形率/%	体部畸形率/%	畸形精子指数	精子 DNA 碎片指数	精子畸形指数
慢速复温法组	0.78 \pm 1.25	31.14 \pm 7.25	23.13 \pm 5.36	1.61 \pm 0.10	22.41 \pm 3.33	1.41 \pm 0.13
快速复温法组	1.11 \pm 1.41	22.60 \pm 7.88 ^a	18.13 \pm 6.85 ^a	1.38 \pm 0.20 ^a	12.89 \pm 3.71 ^a	1.31 \pm 0.20 ^a

与慢速复温法组法比较，^a $P < 0.05$

2.2 解冻后两组精液在室温下不同时间前向运动精子百分率比较

两组精液解冻后精子在室温度存活 1 h、3 h 前向运动精

子百分率比较无统计学差异 ($P > 0.05$)；存活 6 h、12 h、24 h 快速复温法组的前向运动精子百分率高于慢速复温法组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 2。

表 2 解冻后两组精液在室温下不同时间前向运动精子百分率比较

($n = 200, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	存活 1 h	存活 3 h	存活 6 h	存活 12 h	存活 24 h
慢速复温法组	80.49 \pm 8.10	69.33 \pm 14.82	38.31 \pm 11.67	15.41 \pm 9.71	5.31 \pm 3.49
快速复温法组	81.32 \pm 5.28	69.12 \pm 5.79	47.50 \pm 9.23 ^b	22.13 \pm 7.41 ^b	13.20 \pm 6.11 ^b

与慢速复温法组法比较，^b $P < 0.05$

3 讨论

精子经过低温冷冻处理会产生一定不可逆性损伤，主要是因精子冷冻期间细胞内形成冰晶体，对细胞壁产生机械性损伤，同时在解冻期间，胞质内渗透压的改变损伤细胞器。本研究针对液氮蒸汽法冷冻精液予以不同方法解冻处理，结果显示，解冻后两组精子浓度、活动精子总数、非前向运动精子、前向运动精子、头部畸形率、正常形态率、胞浆小滴比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)；快速复温法组精子尾部畸形率、体部畸形率、畸形精子指数、精子 DNA 碎片指数、精子畸形指数均低于慢速复温法组，组间比较，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，从精子 DNA 碎片指数来看，有学者指出经过冷冻解冻过程的精液会损害其精子核 DNA^[4]，这在本研究中也得到证实，而且慢速复温法会使其损伤程度加重，慢速复温法不仅会使精子头部畸形率增加，而且使精子头部微结构受到一定损伤，在复温期间损伤顶体，复温或冰晶消失之后，精子 DNA 片段出现不可逆性改变断裂，在细胞核中游离。通常情况下，精子在未冷冻处理条件下可存活 3~4 d，但经过冷冻处理之后，精子存活时间将明显缩短^[5]，在两种复温方法下精子存活 3 h 之内的前向运动精子百分率对比无显著区别，复温 6 h 之后精子活动力降低，但相比于慢速复温法，快速复温法的精子活动力更优，说明快速复温法可以使冷冻后的精子存活时间延长。

相比于其他细胞，精子对低温的耐受度更高，其细胞膜脂质双层不饱和脂肪酸具备较强的流动性，而且所含水分在 50% 以内，冷冻解冻期间会产生比较少的冰晶，但这不能代表精液冷冻后其质量不会受到影响。据相关研究指出，

通常情况下精子冷冻解冻中，其头部或尾部受到的损伤具备独立性^[6]，本研究中两组不同解冻方式对不同部位造成的损伤也表明存在差异，体尾部损伤为主要损伤，快速解冻可以减轻损伤，另外两组均有断尾情况出现，精子体尾部作为主要器官，控制其运动，组成包括两根中心微管以及周围九组二联微管，解冻期间因水分大量残余使得冰晶体重新形成，进而使得微管断裂，对精子质量产生影响。

综上所述，针对经过液氮蒸汽法冷冻的精液而言，相比于慢速复温法，快速复温法下精子质量更佳，解冻效果更好。

[参考文献]

- (1) 李超强, 朱凯欣, 冯兰青, 等. 新型超微量冷冻载体在人类精子冻融中的应用价值 (J). 中国计划生育学杂志, 2020, 28(6): 815-818.
- (2) 马金霞, 钱立新, 孙红勇, 等. 冷冻精液行供精质量分析 (J). 南京医科大学学报 (自然科学版), 2005, 25(11): 799-801.
- (3) 世界卫生组织, 著. 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等, 译. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册 (M). 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- (4) 马晓萍, 高晓勤, 周桦, 等. 冷冻保存对正常和不育症精子 PH-20 表达和凋亡的影响 (J). 解剖学报, 2017, 48(1): 87-91.
- (5) 周雪, 王燕蓉, 田龙, 等. 冷冻复苏过程对人精子印记基因 SNRPN 和 GRB10DNA 甲基化及表达的影响 (J). 山东大学学报 (医学版), 2017, 55(1): 54-59.
- (6) 马晓萍, 高晓勤, 丁贤胜, 等. 冷冻保存对人精子膜蛋白 PH-20 和透明质酸酶活性的影响 (J). 解剖学杂志, 2016, 39(5): 561-564, 615.