维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0056-04

冷冻对人精子结构及功能的影响

汤召兵，陈在贤

（重庆医科大学临床学院泌尿外科　重庆　400016）

【摘　要】目的：研究冷冻对人精子结构和功能的影响。方法：采集健康已生育25～35岁男性供精者精液作标本，7.5%单一甘油为冷冻保护剂(Cryopreservative agent,CPA)、每份精液分别采用速、缓降温法冷冻，冻前、后分别作精液常规分析、精尾低渗肿胀试验、精子超微结构、精子穿卵试验。结果：复温后未加CPA者,均未见有复苏存活的精子；加CPA者，精子存活率、活动率、精尾低渗肿胀率、精子超微结构相对完整的百分率、穿卵率均显著下降,速冻法比缓冻法下降更明显。结论：7.5%单一甘油对人类精子具有显著的冷冻保护作用，精液冻贮对精子的结构及功能均有不同程度的损害，不同的降温速度对人精子产生不同的冷冻损伤，缓冻法降温冻贮人类精液的方法简单经济，能较好地较长时期地保持人精子功能和结构完整性。

【关键词】甘油冷冻保护剂；穿卵试验；精子超微结构

【中国图书分类法分类号】R339.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-06-15

Effects of freezing on human spermatozoal function and structure

TANG Zao-bin, et al

（Department of Urology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

【Abstract】 *Objective*: This experiment was designed to evaluate the effects of freezing on human spermatozoal function and structure. *Methods*: Semen samples were collected from normal fertile 25～35 year old donors, 7.5% pure glycerol was used as cryopreservative agent(CPA),and every sample was frozen at slow cooling rate and fast cooling rate. *Results*: After freezing—thawing, the whole spermatozoa in the semen without CPA was seen dead; in the semen with CPA, the mean percentage of motility of spermatozoa、spermatozoa tail swelling、spermatozoa with relatively intact head ultrastructure and zona—free hamster ova penetrated by spermatozoa frozen was significantly lower than that of fresh spermatozoa, and the percentage of every criterion described previously of frozen—thawed spermatozoa cooled at fast rate was significantly lower than that in frozen—thawed spermatozoa cooled at slow rate. *Conclusion*: Spermatozoal structure and function were damaged to various degrees by freezing—storing—thawing treatment. 7.5% pure glycerol can cryopreserve human spermatozoa, various cooling rates will cause various freezing injury to human spermatozoa, the slow cooling rate is superior to the fast cooling rate and can keep human spermatozoal structure and function fairly well for a relatively long term.

【Key words】 Glycerol-cryopreservative agent; Spermatozoa penetrate zona—free hamster ova assay; Spermatozoa ultrastructure

供精作人工受精来解决不可治愈或不可逆转的男性不育症逐渐被患者接受，而冻精作为供精又逐渐代替了新鲜精液。冻精的使用主要有如下优点：①可随时供需要，使用方便；②可根据受精夫妇特征来选择供精；③可将供精运送到远离供者所在地的受者使用；④可避免传染性疾病的传播，如AIDS、乙型肝炎；⑤可用于生殖保险。但CPA及冷冻复温过程对精子的功能结构均有不同程度的影响，从而影响供精的生育力，故选择一种适当的CPA及冷冻降温速度至关重要。

作者介绍：汤召兵（1967-　），男，硕士

1　材料与方法

1.1　材料

人精液标本：采集已生育25～35岁健康男子精液标本10份，5～10周龄雄性金黄地鼠，BWW液。

1.2　方法

新鲜精液标本液化后作精液常规分析各指标达到WHO规定标准者纳入本实验。10份不加CPA、10份加CPA、每份标本均分成3份。1份作新鲜精液之精尾低渗肿胀试验[1]、穿卵试验[2]、电镜观察，2份用于冻贮。加CPA者将其准确测量体积后，在25℃室温下，按1滴/min的速度加入甘油，边加边摇均，使甘油在精液－甘油混合液中之终浓度为7.5%，加好甘油的标本均分为2份，用1ml安瓿分装，酒精喷灯熔

维普资讯 http://www.cqvip.com

封，分别以缓、速降温法冻贮。缓冻法第一步：置入4℃冰箱内20分钟(降温速度1～2℃/min)，第二步：置于液氮蒸气层内（距液氮面10cm，-80℃）10min（降温速度5～7℃/min），第三步，投入液氮中（-196℃）冻贮。速冻法：直接投入液氮降温并贮存其中，在液氮内冻贮5～7个月后，取出标本在37℃水浴中解冻复温，复温后之标本与新鲜标本作相同的实验观察。

1.3 统计学处理

实验所得数据均以 $\bar{x}\pm s$ 差表示，各指标均采用原始资料自身配对 t 检验进行组间差异显著性检验。

2 结 果

2.1 精液常规分析、精尾低渗肿胀试验及穿卵试验

冷冻复温后，10份未加CPA的精液均未见复苏活动的精子，10份加7.5%甘油的精液的精子活动率、存活率、精尾低渗肿胀率、穿卵率均下降（见表1），前三者的复苏率（$\frac{\text{冻后检测值}}{\text{冻前检测值}}\times 100\%$）分别为：缓冻法：68.8%、65.6%、73.5%，速冻法：47.7%、47.8%、32.9%。

表1 冷冻前后精子活动率、存活率、尾低渗肿胀率、穿卵率（加CPA组）

检测指标(%)	冻前	冻后	
		缓冻法	速冻法
活动率	66.2±6.72a	44.4±7.8b	31.6±6.9c
存活率	77.4±7.41a	51.5±10.76b	37.0±8.7c
精尾低渗肿胀率	69.7±7.02a	42.4±5.83b	26.7±4.1c
穿卵率	44.1±28.3*	32.4±25.3▲	14.5±11.
受精指数	1.8±0.96*	1.4±0.68▲	1.0±0*

每指标a与b、c，b与c之间统计分析结果均 $P<0.01$，*、▲与*比较 P 值均<0.01，*与▲比较 $P>0.1$

在指标间的相关分析中，活动率与存活率在冻前、冻后都存在显著相关性，分别是：$r=0.88$，$P<0.01$；缓冻法后：$r=0.92$，$P<0.01$；速冻法后：$r=0.59$，$P<0.05$；在缓冻法冻后，精子穿卵率与活动率有显著相关性($r=0.73$)；其余指标间均无显著相关性($P>0.2$)。

2.2 精子超微结构

将精子超微结构完整性按MAHADEVAN[1]的描述分组，1组：质膜顶体完整无损，2组：与1组相似，但质膜肿胀或破损，3组：与2组相似，顶体完整，但顶体肿胀，4组：外层顶体膜破损，顶体物质漏出、分散或浓集，外层顶体膜可形成囊泡，5组：内层顶体膜存在但有破损，大部分顶物质丢失或以小的浓缩碎片存在，6组：内层顶体膜缺失，核膜破损，裸核精子(图1～6)。观察结果见表2。

表2 冻贮前后精子超微结构完整性6个分组精子所占百分率（加CPA组）

组别	冻前	冻后	
		缓冻法	速冻法
1	14.86±7.36	4.43±3.99	1.14±1.21
2	38.00±8.49	27.72±4.27	18.00±4.97
3	24.71±8.90	16.71±4.89	11.43±2.73
4	6.43±2.51	10.43±4.58	10.00±8.27
5	12.43±4.20	34.43±5.11	51.29±10.48
6	3.57±3.82	6.57±.61	8.14±5.15
1+2+3	77.57±6.29	48.86±7.95	30.57±6.74

1、2、3组为质膜、顶体相对完整的精子，4、5、6组为质膜及顶体破坏的精子。除第4组外，其余各组冻前、缓冻法、速冻法之间 P 值均<0.01。

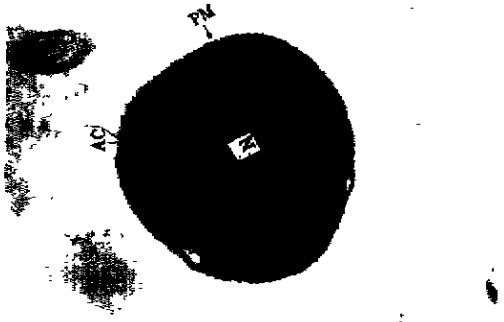


图1 1组：精子头部质膜(PM)、顶体(AC)完整无损(×30000)



图2 2组：精子头部质膜(PM)肿胀或破损、顶体(AC)完整(×20000)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图3　3组：精子头部质膜(PM)肿胀破损、顶体(AC)完整但肿胀(×30000)



图4　4组：精子头部质膜缺失、顶体肿胀、顶体物质(AM)浓集、顶体外膜(OA)、顶体内膜(IA)、核(N)(×30000)

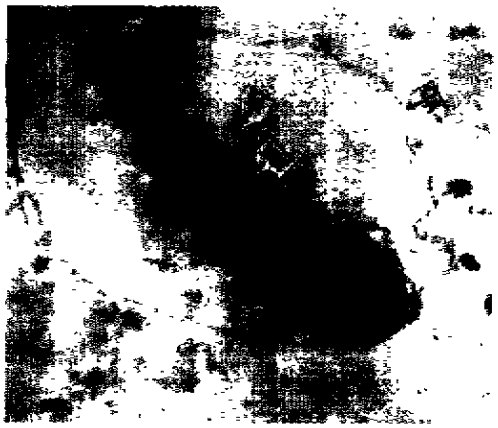


图5　5组：精子头部质膜缺失、顶体外层膜(OA)、内层膜(IA)破损、顶体物质丢失，核膜(NM)、核(N)(×30000)

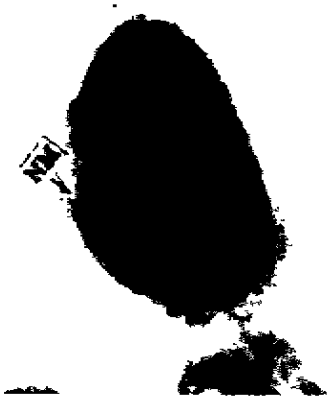


图6　6组：精子顶体丢失(裸核精子)核膜(NM)破损、核(N)(×25000)

将超微结构相对正常的精子百分率分别与精子活动存活率、精尾低渗肿胀率进行相关性分析，只有冻前，其与低渗肿胀率有显著相关性($r=0.87$，$P<0.05$)，其余均无显著相关性。

3　讨　论

3.1　单一甘油冷冻保护剂对人精子结构及功能的影响

虽然人精液冷冻研究已有200多年的历史，由于没有使用CPA，精子冷冻后未能复苏，1949年Polge等首先意外发现甘油对冻贮中的精子具有特殊的保护作用后，精液冻贮才开始得到发展，此后，一些学者陆续开始对甘油作为人精子冷冻保护剂进行研究，并发展成了多型甘油复合剂作为CPA，它们对冻贮的精子均有不同程度的保护作用。

精液在冷冻一复温过程中，精子内、外都有冰晶形成，使细胞内、外溶液中电解质浓度增高，从而使精子膜稳定性降低，细胞内体积增大引起精子膜稳定性降低，精子破裂死亡。甘油是一种渗透性冷冻保护剂，加入精液后它能很快进入精子内，使其脱水从而减少或防止精子内冰晶形成，同时也降低了细胞内外溶液中电解质浓度，也就减少了冷冻对精子的损伤[2]。未加CPM冷冻后的精子核周存在大量的冰晶，加入CPM者冷冻后，精子顶体、质膜及核膜保持了相对完整性，在顶体内未发现冰晶[3]。本实验未加CPA者冻融后精子未能复苏；加入7.5%单一甘油冷冻复温后，获得了较高的精子活动率、存活率、精尾低渗肿胀率、穿卵率、超微结构相对完整的精子百分率，与其他作者报道的结果一致[1,4]，高于Cohen等报道的结果[5]，可见，7.5%单一甘油的确具有良好的冷冻保护作用。且具有廉价、操作简单及添加后不改变精子浓度等优点。另一方面，甘油对人精子有毒性作用，它将降低精子的存活率、活动率及具有完整质膜或顶体的精子百分率[1,6]。甘油的毒性与其浓度有关[4]。一般认为甘油在精液中的最适宜浓度为5%～10%[4,7]，当甘油浓度＞15%时，精子膜及顶体的细微结构将受到损害。

3.2　冷冻降温速度对人精子结构和功能的影响

精子在冷冻复温过程中，温度的变化必然会使其受到损伤。一种合适的降温速度可使精子受到相对较轻的冷冻损伤。精子从室温降至-196℃(液

维普资讯 http://www.cqvip.com

氮），将经历5个阶段，其中，冷休克期(从室温～5℃)和冰晶形成期(0℃～-15℃)两个温度段对精子影响较大。在冷休克期，因为其代谢功能受到影响，精子活动率及活力均下降，一般认为慢速(1～2℃/min)通过该期较为理想。在冰晶形成期，精子死亡数目增多，因而通过这一期尤为重要，以5～7℃/min速度降温为佳，降温过快易引起细胞内形成冰晶直接损伤精子膜和细胞器，而降温过缓，则细胞外首先结冰，造成细胞内外电解质浓度升高，也会引起精子死亡。采用计算机控制的分步降温法，能以较理想的降温速度通过各阶段。但因设备昂贵不便推广使用。本实验采用的分步降温法(缓冻法)为人工控制，方法简单易行，不需要特殊仪器，也能较理想地达到上述降温速度要求。

3.2.1 精子存活率、活动率、精尾低渗肿胀率、穿卵率、超微结构相对正常的精子百分率在冷冻后都有不同程度下降，与新鲜精液相比，除缓冻法冻后在穿卵率上的下降没有显著意义外（$P>0.1$），其余指标下降均有显著意义（$P<0.001$），速冻法比缓冻法下降更明显，两者间差异非常显著（$P<0.001$），超微结构的6个分组中，除第4组外，其余5组精子所占百分率在缓冻法与速冻法间分别均存在显著差异($P<0.01$)，这说明不同的降温速度会对人精子产生不同程度的冷冻损伤，而缓冻法对精子产生相对较轻的冷冻损伤，显著优于速冻法。实验结果还表明，缓冻法能保持较高的精子存活率、活动率、穿卵率及超微结构相对完整精子的百分率，4个指标的复苏率分别为68.8%、65.6%、73.5%、63%，与采用计算机控制的分步降温获得的复苏率比较一致[8-10]，说明该缓冻法能达到与后者相近的效果。

3.2.2 在各检测结果的相关性分析中，存活率与活动率之间在冻前、缓冻法、速冻法冻贮后都有很好的相关性，说明冷冻对这两方面的影响较一致；低渗肿胀率与超微结构相对正常的精子百分率在冻前存在较好的相关性，冻后失去了相关性，说明冷冻造成精子头部质膜和顶体损害与造成的尾部损害不一致；精子活动率与穿卵率在冻前没有显著相关性，在缓冻法后存在着较好的相关性，这与Marshburn的报道一致[10]。以上说明冷冻对人精子造成的影响在各个方面并不是完全一致的。

3.2.3 在精子超微结构的6个分组中，只有第一组的精子超微结构是完好无损的，本实验结果显示，在冻前只占14.86%，缓冻法冻贮后占4.4%，比其他作者报道的结果都要低[1]。造成这种差异的原因可能是①超薄切片制备方法上的不同；②本实验掌握分组的尺度更严格。

参 考 文 献

[1] Mahadevan MM, et al. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen[J]. Ferti steri 1984;41:287-293.

[2] Hong CY. The Lancet [J]. 1984;8374(25):460.

[3] Wanga CO, et al[J]. Acta-vet-scand. 1991;32(4):463-471.

[4] Pilikians, et al. Effect of various concentrations of glycerol on post-thaw motility and velocity of human spermatozoa [J]. Cryobiology, 1982;19:147-153.

[5] Louise weidel. Cryosurival of human spermatozoa frozen in eitht different buffer systems[J]. J-Andrology, 1987;8(1):41-47.

[6] Certol'a, et al. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservation, suorces of variabiloty and prediction of postthaw survival[J] .Inter J Androl. 1992;13(3):282.

[7] Alciohe Lordel O Armentano sive MD, et al. The addition of fructose or sodium citrate does not improve recovery rates of cryopreserved human spermatozoa[J].Int Ferti. 1996;41(3):304-309.

[8] 王沛涛，崔向东，李冰洁. 冷冻复温后处理对精子功能影响的研究[J]. 男性学杂志，1996;10(1):1-4.

[9] Sandroc, et al. Sutiability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm[J].Ferti-steri, 1996;66(5):793-804.

[10] Mashburn, et al. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination[J] .Ferti-steri. 1992;58:179-186.

[11] WHO.人精子实验技术手册[M]. 建桥大学出版社，第二版，1993;36-37.

[12] 黄天华. 人精子染色体研究—人精子/金黄地鼠卵实验系统的应用[J]. 遗传与疾病，1985;2(4):251-254.