维普资讯 http://www.cqvip.com

390-392

(21)

文章编号：0253-3626(2000)04-0390-03

人精液的冻贮研究

尹志康，陈在贤，刘 航，汤召兵，蒲 军
（重庆医科大学临床学院泌尿外科 重庆 400016）

R321-33

摘 要：**目的** 研究在T-G型冷冻保护剂(Cryopreservative medium、CPM)作用下，速缓冻贮法对人精子结构和功能的影响。**方法** 随机双盲对照，将45份正常精液随机分组，加与不加CPM，以速缓冷冻法分别进行冻贮，冻贮前后分别进行常规分析、低渗肿胀试验、穿卵试验、超微结构观察及精子染色体分析。**结果** 未加CPM组冻贮后的精液未见有精子复苏，经冷冻保存的精子质量明显降低，缓冻法对精子的影响显著小于速冻法，精子染色体的畸变率及X/Y精子比例均未见明显变化。**结论** 速、缓冻贮对人精子均有负面影响，缓冻法优于速冻法，两法对精子染色体畸变率和性染色体比例未产生明显影响。

关键词：冷冻保护剂；精液冻贮；穿卵试验；精子染色体；精子超微结构
中国图书分类法分类号：R339.2；R446.19 **文献标识码**：A **收稿日期**：2000-01-20

CPM

The study of cryopreservation in human spermatozoa

YIN Zhi-kang. et al
（Department of Urology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

Abstract: **Objective** To study the effect of slow or quick freezing- storing on the function and ultrastructure of human spermatozoa with T-G type cryopreservative medium(CPM) as cryoprotectant during a longer period. **Methods** 45 normal semen samples were subjected to cryopreservation with or without T-G type CPM and slow or quick freezing- storing respectively. Fresh and frozen-thawed semen were examined by the routine analysis of semen and spermatozoa hypoosmotic swelling test and spermatozoa in vitro penetrate zona-free hamster ova assay and spermatozoa head ultrastructure observation and spermatozoa chromosome analysis. **Results** No spermatozoa in cryopreservated semen without T-G type of CPM was alive after thawed. The quality of frozen-thawed human semen by slow and quick freezing- storing methods with T-G type CPM was significantly lower than that of fresh semen($P<0.01$) and the effect of slow freezing method was smaller than that of quick freezing method($P<0.01$). Neither of the methods increased the rate of spermatozoa chromosome abnormalities and X/Y ratio of human spermatozoa($0.90< P<0.95$). **Conclusion** Both cryopreservation methods have negative effect on human spermatozoa and the slow freezing method is better than the quick one. The sperm chromosome and X/Y spermatozoa ratio are not significantly affected by the two methods.

Key Words: Cryopreservative medium(CPM); Semen freezing-storing; Spermatozoa penetrate zona-free hamster ova assay; Spermatozoa chromosome; Spermatozoa ultrastructure.

影响人类精子冻贮后效果的主要因素有：冻贮方法、CPM类型及冻贮时间等。目前精液冻贮主要分为速冻和缓冻法两大类。两法的优劣众说不一[1-4]。T-G型CPM是一种新型无卵黄复合型CPM，用T-G型CPM作保护剂对人类精子冻贮后结构及功能变化的影响尚缺乏系统资料。至今对精液冻贮的研究几乎都是孤立地考察到某一个指标的变化，而对精液的多个指标及长时间冻贮对精子结构和功能变化的影响的研究还未见报道。本研究采用T-G型CPM，以速、缓冻法冻贮45份人精液近1年，系统地研究了在T-G型CPM保护下速、缓冻法对人精子结构和功能变化的影响。

1 材料与方法

1.1 T-G型CPM按Mahadevan M等[5]方法配制。

1.2 收集25～35岁已育健康男子精液，液化后经精液常规分析，达到世界卫生组织（WHO）规定标准者共45份。

1.3 10份精液不加CPM，35份加T-G型CPM，均以速缓冻法分别进行冻贮。

1.4 每份精液冷冻前后均对照地进行常规分析、低渗肿胀试验、穿卵试验、精子染色体分析及超微结构观察。其中前4项按张秀成所著方法检测[6]，精子超微结构分类及其完整率

作者介绍：尹志康（1970- ），男，住院医师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

计算方法参照Mahadevan[7]的描述和方法进行：

1.5 缓冻法：将配制好的T-G型CPM在4℃预冷与精液1:1的比例混匀，置家用冰箱冷冻室(4℃)20min后，再放至液氮蒸气距液面2cm处(-80℃)10min，最后浸入液氮中。

1.6 速冻法：T-G型CPM与精液以1:1的比例混匀后直接浸入液氮中。

1.7 冻贮6～12个月(平均298.4天)的精液以37℃水浴复温后，作与冷冻前对应的各项目检测。

1.8 统计处理：采用 x^2 检验，及配对T检验。

2 结 果

2.1 未加CPM精液速缓冻贮复温后，未见有存活的精子。

2.2 加T-G型CPM的精液速缓冻贮两组复温后，精子活动率、存活率、低渗肿胀率、超微结构完整率及穿卵率，均明显低于新鲜精液对照组（$P<0.01$），缓冻组又显著高于速冻组（$P<0.01$），如图1。

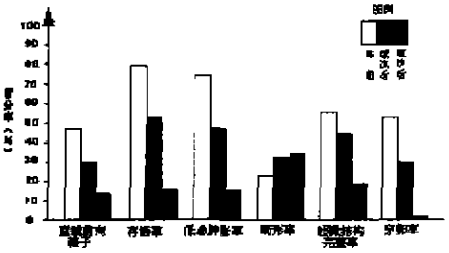


图1 加T-G型CPM组各指标间的比较

注：图中除畸形率在缓冻后和速冻后无明显差异外，其余各指标在冻前、缓冻后均有显著性差异（$P<0.01$）

2.3 速缓冻贮法对畸形率的影响没有差别（$P=0.21$），但与冻前组相比都明显增加了畸形精子的比例（$P<0.01$）。

2.4 冻前组（即正常人新鲜精液）共获得可分析精子染色体共203套，有2套数目异常（1.0%），分别为G组和D组染色体丢失，有9套为结构异常（4.4%），畸变率为5.4%。缓冻组共获得144套可分析染色体，有3套数目异常(2.1%)，分别为C组（2套）、G组（1套）染色体丢失，有6套是结构异常（4.2%），畸变率为6.3%。速冻组共获得可分析染色体120套，其中2套数目异常（1.7%），分别为E组、D组染色体丢失，5套结构异常（4.1%），畸变率为5.8%。X精子率和Y精子率没有显著性差异（$0.95>P>0.90$），见表1。在三个组的结构异常中，主要是染色单体断裂(ctb)、染色体断裂(csb)、单体互换（cte）、环状染色体（r），见图2；数目异常中都是亚单倍体，未发现超单倍体。三组间的精子染色体畸变率没有明显差异（见表2，$P>0.90$）。

表1 两种冻贮法后X和Y精子变化

	被分析核型	X精子	Y精子
冻前组	203	105	98
缓冻组	144	77	67
速冻组	120	64	56

$x^2=0.13$ $P>0.5$（自由度v=2）

表2 两种冻贮法后精子染色体畸变率变化

	被分析核型	结构异常	数目异常	自然畸变率
冻前组	203	9.00	2.00	5.4%
缓冻组	144	6.00	3.00	6.3%
速冻组	120	5.00	2.00	5.8%

$x^2=0.11$ $P>0.5$（自由度v=2）

将三组的结构异常与数目异常精子染色体进行比较，结果也没有统计学差异（$P>0.05$）。



图2 箭头示染色单体断裂(左)、环状染色体（右）

3 讨 论

3.1 T-G型CPM的特点

冷冻保护剂对精液的冻贮起关键性的作用。T-G型CPM是近年来发展起来的新型的甘油复合型CPM[5,8]，它以改良Tyrode's液（人精子保存液）为基础，加入人体白蛋白、蔗糖和甘油形成，与传统的甘油复合型CPM主要不同的是不含卵黄和非人体蛋白质。它具有两性离子缓冲系统，与含卵黄型CPM相比有如下优点：(1)可准确配制，较长时间保存；(2)消除了由卵黄而致的病毒感染和冻融后的大量颗粒与碎片；(3)避免了非人体蛋白质所致的过敏反应。Larson等的研究已提示T-G型CPM应用的良好前景[8]，但以此为保护剂对人精子功能结构的影响尚无全面的研究。

本实验以T-G型CPM比较了两种冻贮方法下的效果，在缓冻法中冻后精子活动率达53%，在速冻法中为20%，在活动率方面与文献报道一致，并且明显优于本课题小组同期所使用的其它保护剂。

3.2 T-G型CPM对精子的冷冻保护效果

冷冻保护剂对精子有明显的冷冻保护效果。从我们的实验结果发现，未加CPM组的精液冻贮后均

维普资讯 http://www.cqvip.com

未见有精子复苏。Rybouchkin等[9]发现不加CPM冻贮的精液，成十倍地增加了精子结构的畸变率。采用各种类型CPM冻贮的精液，均获得了不同程度的精子的复苏率。我们采用T-G型CPM冻贮的精液，也获得较好的精子复苏率，说明T-G型CPM对精子有明显的冷冻保护效果。

3.3 冷冻复温过程对精子产生机械性和化学性损害

冷冻复温过程对精子造成不同程度的损害，本文结果表现为精子活力、存活率、低渗肿胀率、穿卵率及超微结构完整率等均较冷冻前明显降低（$P<0.01$）。穿卵率能够评价精液冻贮后精子受损伤的程度。损害机理可能是在超低温下，细胞内外的水是以冰晶的形式存在的，在复温过程中又发生“再结晶”导致机械性损伤，破坏细胞原生质结构；并使电解质的浓度升高导致细胞的化学性损害[10,11]。

3.4 缓冻法优于速冻法

不同的冷冻方法对精子的损害程度不同，实验结果发现缓冻法复温后精子的活力、存活率、低渗肿胀率、超微结构完整率及穿卵率均远远高于速冻法，超微结构受损伤的精子明显降低（$P<0.01$）。作者认为速冻法将精液从常温直接浸入液氮中，温差大，降温率极快，精子来不及调整自己的功能状态以适应冷环境的刺激，而造成了更大程度的冷冻损害。缓冻法将精液从常温到4℃，让精子有较长时间的冷适应，减少了“冷休克”对精子的损伤；从4℃到-20℃是冰晶大量形成温区，其中包括“危险温区”（0～-10℃）[12]，迅速跨越此区，减少了细胞内冰晶的形成，使细胞内的水份尽快进入玻璃状态，减轻了对精子的损伤。故缓冻法优于速冻法。

3.5 精液冻贮对精子畸形率的影响

冷冻对精子畸形率的影响报道较少，本研究发现两种冻贮法均明显提高了精子的畸形率（$P<0.01$），其原因为降温复温过程冰晶形成后的机械损伤，细胞内外电解质失衡的化学损伤，破坏了精子的超微结构，使顶体物质流失，甚至精子头部核崩解流出，从而导致镜下小头和无头精子的增加。

3.6 T-G型CPM对精子遗传物质的影响

Rybouchkin等[9]发现不加CPM的冻贮，成十倍地增加了精子结构的畸变。从我们采用T-G型CPM冻贮的精液精子染色体的分析中发现，速缓冻贮法均未导致精子染色体畸变率及X/Y精子比率的变化（$P<0.01$）。说明T-G型CPM对精子有明显的冷冻保护效果。

4 结 论

T-G型CPM对冻精有明显的保护作用，在该CPM作用下速、缓冻贮对人精子均有显著的负面影响，缓冻法明显优于速冻法，两法对精子染色体畸变率和性染色体比例未产生明显影响。

参 考 文 献

[1] Check DJ, Katsoff D, Check JH. Effect of an intermediate hold with vapor freezing on subsequent hypoosmotic swelling in thawed sperm[J].Arch Androl 1995 ;35(1):79-81.

[2] Taylor PJ,Wilson J,Loylock R,et al.. A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen[J].Ferfil Steril 1982;37:100-103.

[3] Verheyen G, Pletincx I, Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm[J]. Hum Reprod 1993;8(10):1678-1684.

[4] Serafini P, Marrs RP. Computerized staged-freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova[J]. Fertil Steril 1986;45(6):854-858.

[5] Mahadevan MM, Trounson Ao. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa[J].Andrologia 1983; 15:355-359.

[6] 张秀成. 精子检测与分离[M]. 北京科学技术出版社，1993.

[7] Mahadevan MM, Trounson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen[J]. Fertil Steril 1984;41:287-293.

[8] Larson JM, McKinney KA, Mixon BA et al.An intrauterine insemination-ready cryopreservation method conpared with sperm recovery after conventional freezing and posr-thaw processing[J].Fertil Steril 1997;58:143-148.

[9] Rybouchkin AV, De Sutter P, Dhont M.Unprotected freezing of human spermatozoa exerts a detrimental effect on their oocyte activating capacity and chromosome integrity[J]. Zygote 1996 ;4(4):263-268.

[10] Henry MA, Noiles EE, Gao Denry MA et al. Cryopreservation of human spermatozoa.IV.The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity,and mitochondrial function[J].Fertil Steril 1993;60:911-918.

[11] Mazur P.Freezing of living cells:mechanisms and implications[J].Am J Physiol 1984;247:C125-142.

[12] Check ML, Check DJ, Check JH, Long R. Effect of shortened exposure time to the critical period for ice crystal formation on subsequent post-thaw semen parameters from cryopreserved sperm[J]. Arch Androl 1994 ;32(1):63-67.