

# 新型冷冻载体 Cell Sleeper 在微量人 精子冷冻中的应用

邹宇洁 杨菁 尹太郎 徐望明 吴庚香 张怡  
武汉大学人民医院生殖医学中心 湖北 武汉 430060

**摘要** 目的:评价一种新型的冷冻载体 cell sleeper 用于微量人类精子的冷冻效果。方法:将 60 例患者的精液标本液化, PureSperm 梯度离心处理后进行两部分实验。第一部分运用 cell sleeper 在不同液量(0.5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l 和 2  $\mu$ l)含有冷冻保护剂的液滴进行精子冷冻,液氮中冷冻 2 周,比较冻融前后各组精子存活率和活力,以找到 cell sleeper 用于微量精子冷冻的最佳液量条件。在第一部分实验摸索的液量条件下,进行第二部分 cell sleeper 中进行单精子冷冻,并与常规冻存管进行比较。结果:第一部分实验中,三组精子解冻后的活力和存活率均较冷冻前下降,但三组间解冻后精子存活率和活力比较无差异。第二部分实验中,cell sleeper 组精子解冻后的回收率和存活率明显高于常规冻存管组。结论:cell sleeper 是一种理想的微量精子冷冻载体,解冻后可保证较高的精子回收率和存活率。

**关键词** 微量精子;冷冻保存;cell sleeper;回收率

**中图分类号** R711.6 **文献标识码** A **文章编号** 1671-8852(2013)02-0205-04

## Cell Sleeper: A New Type of Cryopreservation Carrier for Small Quantity of Human Spermatozoa

ZOU Yujie, YANG Jing, YIN Tailang, XU Wangming, WU Gengxiang, ZHANG Yi

Reproductive Medicine Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

### Abstract

**Objective:** To evaluate cell sleeper as a new type of cryopreservation carrier for small quantity of human spermatozoa. **Methods:** After liquefaction and PureSperm centrifugation of spermatozoa from 55 male volunteers, the study was designed into two parts. First part: compare the viability and motility of frozen-thawed spermatozoa cryopreserved by cell sleeper in different volume sizes. Second part: compare the recovery and viability rate of frozen-thawed spermatozoa using cell sleeper and conventional cryotube. **Results:** In the first part, the viability and motility of post-thawed spermatozoa were significantly lower than that of pre-freezing spermatozoa, but no significant difference was found among post-thawed spermatozoa cryopreserved in different volume sizes. In second part, the recovery rate and viability of post-thawed spermatozoa in cell sleeper group were significantly higher than that of conventional cryotube. **Conclusion:** Cell sleeper is ideal for cryopreservation for small quantity of human spermatozoa with high recovery rate and viability.

**Key Words** Small Quantity of Spermatozoa; Cryopreservation; Cell Sleeper; Recovery Rate

人类精子的冷冻保存是辅助生殖技术领域重要部分。自从1953年Bung和Sherman<sup>[1]</sup>首次成功冻存人精子,此后研究人员开展一系列大量科学研究,致力于精子冻存技术的优化。对于无精症患者,前次体外受精的失败意味着需要重新、甚至反复地睾丸或附睾穿刺取精,患者在必须忍受肉体痛苦时也会导致睾丸的炎症、疤痕的形成、血睾屏障的损坏以及抗精子抗体的产生,导致生精功能的进一步恶化。因此,进行微量精子的有效冷冻,尽可能地避免对睾丸或附睾的损伤显得非常重要。但是,由于睾丸或附睾精子自身具有活力低和数目少的特点,传统的冷冻技术对其并不适用,致使微量精子的冻存技术一直是男性生育力保存领域的瓶颈之一<sup>[2]</sup>。因此,如何提高微量精子冷冻后的回收率和复苏率,如何减轻冷冻损伤,以及如何找到合适的冷冻载体和更合适的冷冻方法等,也存在多方面的难题需要克服。本研究在国内首次运用一种新型的冷冻载体 cell sleeper,进行微量精子的冷冻,并与传统的精子冷冻方法进行比较,取得了初步成效。

## 1 资料与方法

### 1.1 精液标本收集和處理

精液标本均来自于2012年6月至9月在武汉大学人民医院生殖医学中心就诊的60名男性患者,事先签署知情同意书。禁欲2-7 d,手淫法取精于干燥消毒量杯中。室温液化后根据世界卫生组织精液实验室分析手册分析精液参数<sup>[3]</sup>。选用精子活动率>50%,精子计数>20×10<sup>6</sup>/ml,精液量>2 ml的精液标本。根据PureCep-tion™精液梯度离心法说明书进行相关离心操作。双层精子纯化液制备:离心管先加入2 ml底层液(PureCep-tion™ 80%),上层轻缓加入2 ml上层液(PureCep-tion™ 40%),再轻缓加入2.5 ml液化的精液,350 g离心20 min,弃上清,加入2 ml精子洗涤液(PureCep-tion™, SAGE, USA,含5 mg/ml HEPES缓冲人输卵管液及人血清白蛋白)重悬,250 g离心6 min,加入0.5 ml精子洗涤液以稀释。

### 1.2 Cell sleeper 运用于精子冷冻

Cell sleeper由透明无毒,具有生物相容性的聚丙烯制成,可耐受液氮-196℃的低温环境。Cell sleeper构造如图所示,由螺帽(A),套管(B)和内置的托盘(C)三部分组成(见图1)。使用时,将含有精子的液滴置于托盘中,将托盘平稳的送入套管内,再将螺帽旋紧,即构成精子冻存的封闭体系。Cell sleeper可通过商业途径购买得到,本研究中所使用的 cell sleeper 获赠于

日本仓敷医院生殖医学中心的 Yuji Endo 教授。

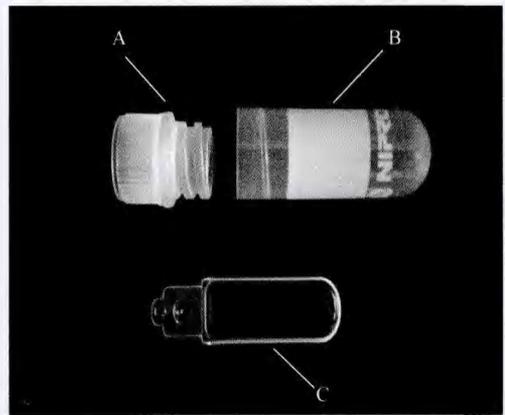


图1 Cell Sleeper 构造图

A为螺帽;B为套管;C为内置托盘

### 1.2.1 Cell sleeper 用于精子冷冻的液量条件摸索

商业化冷冻保护剂 Quinn's Advantage@ spermatozoa Freezing Medium(SAGE, USA)成分为10 mg/ml人血清白蛋白,甘油,蔗糖和庆大霉素的HEPES缓冲盐溶液。将梯度离心后优化的精子与冷冻保护剂按1:1体积比混合,室温下平衡3 min。移液枪吸取0.5 μl,1 μl和2 μl液滴置于 cell sleeper 的托盘上。将托盘放入套管中,旋紧螺帽,将 cell sleeper 依次置于4℃ 60 min和液氮蒸气(-80℃,约液氮面上10 cm)30 min,最后放入液氮中冷冻2周。解冻时将各 cell sleeper 从液氮中取出,37℃水浴5 min。计算不同液量组精子解冻后的活力和存活率,以期找到 cell sleeper 用于精子冷冻的理想液量条件。

### 1.2.2 单精子的玻璃化冷冻

精子梯度密度离心后,吸取3 μl置于培养皿中(BD FALCON, USA),37℃孵育。通过在第一部分实验摸索的液量条件下于托盘上准备精子冷冻保护剂液滴。运用显微操作系统的移液管(见图2),将单个精子转移到托盘的液滴中,每个液滴中转移5-6个精子。再将 cell sleeper 依次置于4℃ 60 min和液氮蒸气(-80℃,约液氮面上10 cm)30 min,最后放入液氮中冷冻2周。解冻时将各 cell sleeper 从液氮中取出,37℃水浴5 min。计算并比较各组精子回收率和存活率。

### 1.3 指标检测

### 1.3.1 伊红Y染色法测定精子存活率

对于第一部分实验中精子存活率测定,2 μl伊红Y染液与2 μl精子于载玻片上混匀,盖上盖玻片于400×显微镜下观察。死精子染色为红色,活精子因细胞膜保持完整镜下不着色。对于第二部分中单精子的存活



图2 Cell Sleeper 工作图

图中所示为通过显微操作系统的移液管,将单个精子转移到 cell sleeper 的内置托盘上含有冷冻保护剂的液滴中

率测定,通过显微操作系统的移液管将精子转移到 1  $\mu\text{l}$  伊红 Y 染液滴中,于载玻片上混匀,盖上盖玻片于 400 $\times$  显微镜下观察。

**1.3.2 精子活力评估** 采用 makler 板,在 400 $\times$  的光学显微镜下随机取 5 个视野,计数所看到的精子总数和前向活动精子总数(WHO 分类中的 a 和 b 级),前向活动精子总数除以精子总数 $\times 100\%$ 即定义为前向活动精子百分率。

**1.4 统计分析** 数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件进行。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差表示,通过软件分析进行独立  $t$  检验,计数资料采用率表示,通过软件分析进行卡方检验。 $P < 0.05$  表示比较具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 Cell sleeper 用于精子冷冻的液量条件摸索

对于 0.5, 1.0, 2  $\mu\text{l}$  液滴组,比较冷冻前后生理学参数显示(见表 1),精子冷冻后的存活率和活力均低于冷冻前的存活率和活力,但三组不同液量间精子解冻后的存活率和活力相比较无明显差异。

表 1 不同液量液滴的精子冷冻前后存活率和活力比较

组别	例数	冷冻前		解冻后	
		存活率(%)	活力(%)	存活率(%)	活力(%)
0.5 $\mu\text{l}$ 组	55	66.3 $\pm$ 2.9	64.8 $\pm$ 2.5	49.5 $\pm$ 2.4*	48.6 $\pm$ 2.6*
1 $\mu\text{l}$ 组	55	66.3 $\pm$ 2.9	64.8 $\pm$ 2.5	48.8 $\pm$ 2.1*	48.1 $\pm$ 2.3*
2 $\mu\text{l}$ 组	55	66.3 $\pm$ 2.9	64.8 $\pm$ 2.5	49.9 $\pm$ 2.2*	49.1 $\pm$ 2.2*

与解冻前精子相比较, \*  $P < 0.05$

**2.2 单精子的玻璃化冷冻** 将 cell sleeper 运用于单精子的冷冻保存,并与常规冻存管冷冻后精子的回收率和存活率进行比较。可看到 cell sleeper 可保证冻存精子基本得到原位复苏,大大降低了精子的丢失率,而且存活率也较常规冻存管组明显增加(见表 2)。

表 2 Cell Sleeper 和常规冻存管组精子冷冻前后的回收率和存活率比较

组别	冷冻精子数目	解冻后	
		精子数目	回收率(%) 存活率(%)
Cell sleeper 组	45	43	95.6* 50.1*
常规冻存管组	50	13	26.0 21.2

与常规冻存管组解冻后精子相比较, \*  $P < 0.05$

## 3 讨论

本研究首次在国内运用 cell sleeper 进行微量人精子的冷冻保存,并在解冻后获得较好的回收率和存活率。Endo 等人<sup>[4]</sup>曾运用 cell sleeper 进行微量精子的冷冻研究,在实验中设计了液滴表面滴加矿物油和无矿物油覆盖组进行对比,发现无矿物油覆盖组的精子解冻后存活率和活力均高于矿物油覆盖

组,所以本实验基于 Endo 研究结论的基础,采用无矿物油覆盖的液滴进行微量精子冷冻。本研究中进一步将液滴量对比细化为 0.5  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  和 2  $\mu\text{l}$ ,发现三组之间精子解冻后的存活率和活力无明显差别,这与 Endo 的研究结论是一致的。考虑到 0.5  $\mu\text{l}$  液量过少,增加操作难度,所以我们选择 1  $\mu\text{l}$  为 cell sleeper 进行精子冷冻的理想液量,既保证液量精准微小,又便于实际操作可行。另外,Endo 等人运用商业化购买的 SpermFreeze 精子冷冻保护剂为单精子冷冻的液滴环境,本研究中选用商业化购买的 Quinn's Advantage 精子冷冻保护剂,精子解冻后均取得较满意存活率和活力。通过与传统冻存管进行精子冷冻相比较,本实验进一步证明,传统的精子冷冻方法对于微量精子并不适用,精子有可能因为遗失在液体转移过程中的任何一步,比如遗留在冻存管管壁上。Cell sleeper 能够保证微量精子原位冷冻后,在显微镜观察下原位复苏,大大提高回收率,这对于原本来源宝贵的微量精子而言非常有实际意义。

Cell sleeper 在微量精子冷冻的应用方面具有以下明显优势。第一,载液量微量且精确,液滴表面积

大,精子降温速度快而均匀。第二,cell sleeper 可通过商业途径方便购买获得,托盘液滴中放入的精子数目可随病人睾丸或附睾穿刺取精时的实际情况灵活掌握。第三,cell sleeper 材料具有生物相容性,不会对生殖细胞具有毒性作用。第四,cell sleeper 材料无色透明,具有光学透性,操作全程可在显微镜下观察和控制精子的位置,避免操作的盲目性。

自从 2002 年 Nawroth<sup>[5]</sup> 首次报道微量精子冷冻保存获得成功以来,很多研究者<sup>[6]</sup> 在这方面先后作了大量研究,并一致认为,寻找到小体积的理想冷冻载体,将有助于提高精子冷冻后的存活率和回收率。迄今为止,国内外学者采用各种不同的载体冷冻微量精子,取得了一定的进展,包括鼠空的透明带, cryoloop 环, 铜环, cryotop 等等<sup>[7-10]</sup>。但以上载体也存在各自的弊端。使用鼠空的透明带冻存微量人精子<sup>[7]</sup>, 将无法避免外来异源性蛋白的污染,带来一系列生物学和伦理学难题,而且这种方法对于显微操纵系统的精确度和熟练程度有较高要求。而使用 cryoloop 环时液量(约 3  $\mu$ l)<sup>[8,9]</sup> 承载于表面的薄膜上,薄而脆弱,存储体系不够稳固,操作时要求动作平稳轻柔。Cryotop 作为微量精子的冷冻载体<sup>[10]</sup>,在回收率和存活率方面取得较理想的结果,但 cryotop 是一种开放的细胞储存体系,存在与液氮接触的机会,无法避免通过液氮导致交叉感染的潜在风险。相比于以上冷冻载体,使用 cell sleeper 冷冻微量精子具有如下优点。首先 cell sleeper 构成上与生物材料无关,可以完全免除异源性蛋白的干扰;其次,整个装置小而稳固,液体承载于托盘内,冷冻时构造成相对封闭的体系,不与液氮直接接触。

由于临床上获得睾丸或附睾穿刺精子非常宝贵,所以本实验的研究对象采用健康男性的正常精子,初步探讨了 cell sleeper 在其冷冻保存的应用。在下一步研究中,我们将 cell sleeper 运用于睾丸或附睾穿刺精子的冷冻保存,以期进一步将解冻的精子运用于单精子胞浆注射及相应临床结局的观察。

## 参考文献

- [1] Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa[J]. Nature, 1953, 172(4 382): 767-768.
- [2] AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, et al. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review [J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(2): 153-164.
- [3] World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction[M]. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1999.
- [4] Endo Y, Fujii Y, Shintani K, et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa[J]. Reproductive BioMedicine Online, 2012, 24(3): 301-307.
- [5] Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, et al. Successful cryopreservation of human spermatozoa by direct plunging into liquid nitrogen(vitrification)without cryoprotectants(abstract)[J]. Fertile and Sterile, 2002, 78(3 Suppl):S129.
- [6] Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. Vitrification for mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success[J]. RBM Online, 2003, 6(2):191-200.
- [7] Hsieh YY, Tsai HD, Chang CC, et al. Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae[J]. Fertil Steril, 2000, 73(4): 694-698.
- [8] Desai NN, Blackmon H, Goldfarb J. Sperm cryopreservation on cryoloops: an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa[J]. Reproductive Biomedicine Online 2004, 9(1):47-53.
- [9] 蒋凌英, 靳镭, 朱桂金, 等. 精子冷冻环无保护剂玻璃化冷冻方法的初步研究[J]. 生殖医学杂志, 2006, 15(4): 234-236.
- [10] Endo Y, Fujii Y, Shintani K, et al. Single spermatozoon freezing using Cryotop[J]. Mamm Ova Res, 2011, 28: 47-52.

(2012-12-25 收稿)

编辑 张峻