

## 封闭式薄片法对人类微量精子超快速玻璃化冷冻的研究

马 超, 胡明广, 王赞滔, 邵小光\*

(大连市妇女儿童医疗中心生殖医学中心, 大连 116000)

**【摘要】** 目的:通过应用封闭式薄片法对人类微量精子进行超快速玻璃化冷冻,旨在寻找一种微量精子冷冻的最佳方法。方法:选取于大连妇儿生殖中心就诊的正常男性精液标本 20 例,精液上游处理后用于实验。首先用含冷冻保护剂的不同微滴量(0.5 $\mu$ l, 1.0 $\mu$ l, 3.5 $\mu$ l)对冷冻效果进行比较,以期找到微量精子冷冻的最佳微滴量。同时用无冷冻保护剂法对微量精子进行冷冻,并与冷冻保护剂组进行比较。结果:3 组冷冻微滴量解冻后精子的回收率、活动率及存活率比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。无冷冻保护剂组与冷冻保护剂组的解冻后精子回收率、活动率及存活率比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:封闭式薄片法超快速冷冻人类微量精子,解冻后可获得较高的精子回收率、活动率与存活率。无冷冻保护剂法冷冻微量精子,解冻后与冷冻保护剂法的结果相似。

**【关键词】** 微量精子;冷冻保存;冷冻保护剂;回收率

中图分类号:R321.33 文献标志码:A 文章编号:1004-7379(2015)10-0762-03

DOI:10.13283/j.cnki.xdfckjz.2015.10.011

**Research on ultra-rapid cryopreservation of small number of spermatozoa in Closed-Sheet method.** Ma Chao, Hu Mingguang, Wang Zantao, et al. Reproductive Medicine Center, Dalian Municipal Women and Children's Medical Center, Dalian 116000

**【Abstract】** Objective: To use the Closed-Sheet method to cryopreserve small numbers of human spermatozoa ultra-rapidly, with the aim of finding the best way to cryopreserve. **Methods:** Normal semen samples from 20 patients were collected at Dalian Municipal women and children's Medical Center Reproductive Center. Semen samples were prepared by swimming-up for the experiment. In order to find the best volume of droplets for freezing small numbers of human spermatozoa with cryoprotectants, the freezing effect was compared with different volume, respectively 0.5 $\mu$ l, 1.0 $\mu$ l, 3.5 $\mu$ l. At the same time, we tried to cryopreserve small numbers of human spermatozoa without cryoprotectants, and compared with cryoprotectants group. **Results:** No significant difference was observed in the sperm recovery rate, motility rate and viability rate among the three groups. No significant difference was observed in the sperm recovery rate, motility rate and viability rate between the spermatozoa cryopreserved without cryoprotectants and with cryoprotectants. **Conclusion:** The Closed-Sheet method is a highly effective method for cryopreservation of small numbers of human spermatozoa ultra-rapidly, we can obtain a higher recovery rate, motility rate and viability rate after thawing. Cryoprotectants-free has the same cryoprotecting effect as cryoprotectants.

**【Key words】** Small numbers of human spermatozoa; Cryopreservation; Cryoprotectants; Recovery rate

人类精子冷冻技术在 1953 年经 Bung 等<sup>[1]</sup>研究获得成功,目前已在辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)中常规开展。然而对于无精症尤其是非梗阻性无精症患者(nonobstructive azoospermia, NOA)来说,即使首次睾丸活检发现精子,下次活检也约有 30% 的失败风险<sup>[2]</sup>。为了避免反复外科手术对睾

丸的损伤,降低取卵日取精失败的风险,对首次活检发现的微量精子进行冷冻,显得十分必要。对于 NOA 患者睾丸精子的冷冻保存,因其数量极少,且精子细胞膜尚未完全成熟,精子核 DNA 的稳定性较差,采用常规精液冷冻保存技术效果很差<sup>[3]</sup>。因此,找到一种合适的微量精子冷冻方法,提高微量精子冷冻解冻后的复

\* 通讯作者 Email:shaoxiaoguang03@sina.com

苏率、活动率及存活率,已成为全世界 ART 中的一项难题。近年随着对微量精子冷冻技术研究的不断深入,寻找一种微量体积的冷冻载体,采用超快速玻璃化冷冻方式,将有助于提高微量精子解冻后的回收率和存活率<sup>[4]</sup>。本研究首次创新性的运用封闭式薄片法对微量精子进行超快速冷冻,并取得满意的成效。

1 材料与方法

1.1 资料收集与分组 选取 2015 年 3~5 月在大连妇女儿童医疗中心生殖医学中心就诊的 20 例患者的精液标本。患者均禁欲 2~7 天,手淫法取精。冷冻前精液参数均达到世界卫生组织(WHO)第 5 版人类精液检查和处理实验室手册中的正常值(精子密度  $\geq 15 \times 10^6 / \text{mL}$ , 前向运动精子比率 32%, pH 7.0~7.5)。精子上游法处理后备用。20 例标本在添加冷冻保护剂条件下,根据微滴量不同分为 3 组(0.5 $\mu\text{l}$ , 1.0 $\mu\text{l}$ , 3.5 $\mu\text{l}$ ),根据是否添加冷冻保护剂分为两组,分别比较解冻后精子回收率、活动率及存活率。本研究获得大连妇女儿童医疗中心生殖中心伦理委员会批准,20 例患者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 冷冻载体的制备 本研究所用冷冻载体是由自制无毒聚丙烯薄片和常规精子冷冻管组成。精子冷冻管为 1.8ml 规格的 Crkyo Tube™ Vials (NUNC, DENMARK)。冷冻薄片使用无菌手术刀裁剪,规格为 32mm $\times$ 8mm $\times$ 0.3mm,实验前用 75% 酒精消毒处理。封闭式薄片冷冻载体构造,见图 1。

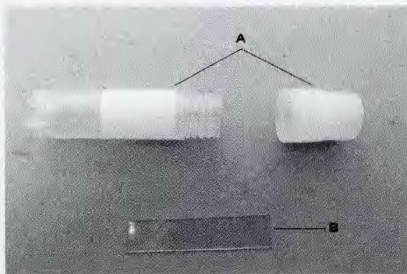


图 1 封闭式薄片冷冻载体构造图  
A:精子冷冻管;B:自制薄片

1.2.2 冷冻解冻过程 (1)冷冻液的配制:冷冻保护剂组选取商品化精子冷冻保护剂(Quinn's Advantage SAGE, USA),与含 10% 人血清白蛋白的 HEPES 缓冲液按 1:1 混合,37 $^{\circ}\text{C}$  预温备用。无冷冻保护剂组直接使用 10% 人血清白蛋白的 HEPES 缓冲液。(2)冷冻过程:在培养皿中(BD FALCON 1006)做好 50 $\mu\text{l}$  长条液滴,矿物油覆盖,移液器吸取 1~2 $\mu\text{l}$  上游好的精子加入液滴中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$  预温 10min。将冷冻液加在冷冻薄片前段,并使用显微操作系统(RI-Integra Ti)注射针吸取 10 根向前运动精子,立即加入冷冻微滴中,用无菌镊子将冷冻薄片放入精子冷冻管中,旋紧螺帽,放置液氮上方 1cm 熏蒸 2min,投入液氮中保存至少 72h 以上。(3)解冻过程:将 3ml 矿物油加至培养皿(BD FALCON 3001),37 $^{\circ}\text{C}$  预温备用。将精子冷冻管从液氮中取出,旋开螺帽,将载有微量精子的冷冻薄片置于 37 $^{\circ}\text{C}$  矿物油中复苏,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 2min,即可对解冻后精子进行评估。

1.2.3 解冻后精子相关指标评估 用 200 $\times$  尼康倒置显微镜(TE2000-U)对解冻后微滴进行观察,计数精子数量。根据 WHO 第 5 版人类精液检查和处理实验室手册中的标准评估精子活动率(活动率=a+b+c 级精子/回收精子数)。利用显微操作系统 ICSI 注射针将复苏精子转移到低渗肿胀微滴中,通过精子尾部卷曲来辨别活精子,并计算解冻精子存活率(存活率=尾部卷曲精子数/回收精子数)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件处理数据。计数资料采用率表示,采用卡方检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同微滴量的冷冻效果比较 0.5 $\mu\text{l}$ 、1.0 $\mu\text{l}$  和 3.5 $\mu\text{l}$  3 组微滴量解冻后精子的回收率、活动率及存活率比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

2.2 冷冻保护剂组与无冷冻保护剂组的冷冻效果比较 冷冻保护剂组与无冷冻保护剂组均选取 1.0 $\mu\text{l}$  冷冻微滴量。冷冻与无冷冻保护剂组解冻后精子的回收率、活动率及存活率比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 不同微滴量微量精子冷冻解冻后相关指标的比较

分组	n	每管冷冻精子数(n)	冷冻精子总数(n)	回收率(%)	活动率(%)	存活率(%)
0.5 $\mu\text{l}$	20	10	200	95.5(191/200)	41.88(80/191)	67.02(128/191)
1 $\mu\text{l}$	20	10	200	94.5(189/200)	38.09(72/189)	69.31(131/189)
3.5 $\mu\text{l}$	20	10	200	91.5(183/200)	42.08(77/183)	73.22(134/183)
P				0.224	0.675	0.419

表 2 冷冻保护剂组与无冷冻保护剂组冷冻解冻后相关指标的比较

分组	n	每管冷冻精子数(n)	冷冻精子总数(n)	回收率(%)	活动率(%)	存活率(%)
冷冻保护剂组	20	10	200	94.5(189/200)	38.09(72/189)	69.31(131/189)
无冷冻保护剂组	20	10	200	93.5(187/200)	47.06(88/187)	72.73(136/187)
P				0.674	0.079	0.466

### 3 讨论

人类精子冷冻技术在 ART 中已常规开展,但对于 NOA 患者来说,因其睾丸中精子数量极少,且精子细胞膜尚未完全成熟,精子核 DNA 的稳定性也较差,因此这些精子进行冷冻保存复苏后的回收率、活动率及存活率明显偏低,传统的冷冻技术并不适用。因此,找到一种合适的微量精子冷冻方法,已成为全世界 ART 中的一项难题。迄今为止,国内外研究者采用多种方法对微量精子进行冷冻,并取得了一定的成效,包括人类或仓鼠空透明带法(empty zona pellucida)<sup>[5]</sup>、冷冻环法(Cryoloop)<sup>[6]</sup>、微型管法(Mini-Straw)<sup>[7]</sup>、ICSI 针法<sup>[8]</sup>、冷冻薄膜(Cryotop)及 Cell sleeper 法<sup>[9]</sup>、极体活检针法<sup>[10]</sup>等。根据冷冻方法不同,解冻回收率可达 59%~100%,存活率可达 8%~85%<sup>[10]</sup>。但上述方法均存在不同程度的弊端,如空透明带法,无法避免外来源性蛋白污染,带来一系列生物学和伦理学难题;冷冻环法,冷冻液滴承载于表面薄膜上,其存储体系不够稳固,对操作要求过高。冷冻薄膜法是一种开放的储存体系,精子与液氮直接接触,无法避免交叉感染的风险等。

本研究首次创新性的应用封闭式薄片法超快速冷冻人类微量精子,解冻后对精子进行原位复苏,取得了较高的精子回收率、活动率及存活率。本研究的创新点在于:(1)优化的冷冻载体,使得实验操作更简便。本研究创新性的采用自制冷冻薄片,无毒,无色透明,具有透光性,显微操作过程更方便,并取得了较好的冷冻效果。(2)封闭式的冷冻方式,保证了精子不与液氮直接接触,避免了液氮中病原体的污染。(3)原位复苏方式,降低了解冻后精子的丢失,提高了精子回收率。(4)取材方便,薄片采用手工自制,联合商品化精子冷冻管,大大降低了实验成本。

本研究对不同冷冻微滴量(0.5 $\mu$ l, 1.0 $\mu$ l, 3.5 $\mu$ l)的冷冻效果进行了比较,结果发现三种微滴量冷冻效果相似,解冻后精子回收率,活动率以及存活率无统计学差异。而 Endo 等<sup>[4]</sup>运用 Cell Sleeper 法,发现 3.5 $\mu$ l 微滴量似乎可以获得更高的精子存活率。经分析,0.5 $\mu$ l 冷冻微滴体积过小,挥发过快,影响其内环境,对操作速度要求过高。3.5 $\mu$ l 冷冻微滴体积较大,解冻后扩大了对精子的查找范围,增加了寻找精子的难度。所以本研究选择 1.0 $\mu$ l 微滴作为标准冷冻微滴量,既能保证微滴足够微小,又便于实际操作。

众所周知,人类精子对冷冻保护剂是十分敏感的,在冷冻解冻过程中,冷冻保护剂会对细胞产生一系列化学毒性,从而降低解冻后精子的活动率和存活率<sup>[11]</sup>。Nawroth F 等<sup>[12]</sup>首次报道了采用无冷冻保护剂的玻璃化法冷冻精子获得成功。随后多研究资料显示,使用无冷冻保护剂的玻璃化法冷冻正常精液标本可取得与常规冷冻相同的临床效果<sup>[13]</sup>。另外,Chen 等<sup>[11]</sup>用 Cryotop

法对微量精子进行冷冻,证明了无冷冻保护剂可以取得与冷冻保护剂相似的结果,并且能够取得更高的染色体完整性和更低的 DNA 碎片率。本研究发现,冷冻保护剂组与无冷冻保护剂组对微量精子进行冷冻,解冻后两组精子回收率、活动率以及存活率无统计学差异。因此,是否添加冷冻保护剂并不能改变解冻后微量精子的相关指标,此结论同 Chen 等<sup>[11]</sup>报道相一致。

本研究初步探讨了封闭式薄片法超快速冷冻人类微量精子,并获得了理想的结果。在以后的研究中,我们会将此技术运用到睾丸活检获得微量精子的冷冻中,并对实验过程不断改进完善,相信不久的将来此技术能够在人类微量精子冷冻中推广使用。

### 参考文献

- [1] Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa[J]. Nature, 1953, 172: 767-768
- [2] Abdel Raheem A, Rushwan N, Garaffa G, et al. Factors influencing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome in men with azoospermia[J]. BJU Int, 2013, 112(2): 258-264
- [3] Schuster TG, Keller LM, Dunn RL, et al. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops[J]. Hum Reprod, 2003, 18(4): 788-795
- [4] Endo Y, Fujii Y, Shintani K, et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 24(3): 301-307
- [5] Walmsley R, Cohen J, Ferrara-Congedo T, et al. The first births and ongoing pregnancies associated with sperm cryopreservation within evacuated egg zonae[J]. Hum Reprod, 1998, 13(Suppl 4): 61-70
- [6] Desai NN, Blackmon H, Goldfarb J. Single sperm cryopreservation on cryoloops; an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 9(1): 47-53
- [7] Isachenko V, Isachenko E, Montag M, et al. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa[J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(3): 350-354
- [8] Sohn JO, Jun SH, Park LS, et al. Comparison of recovery and viability of sperm in ICSI pipette after ultra rapid freezing or slow freezing[J]. Fertil Steril, 2003, 80: 128
- [9] Endo Y, Fujii Y, Kurotsuchi S, et al. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia[J]. Fertil Steril, 2012, 98(6): 1423-1427
- [10] Kuznyetsov V, Moskovtsev SI, Crowe M, et al. Vitrification of a small number of spermatozoa in normozoospermic and severely oligozoospermic samples[J]. Syst Biol Reprod Med, 2015, 61(1): 13-17
- [11] Chen Y, Li L, Qian Y, et al. Small-volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants by using Cryotop[J]. Andrologia, 2015, 47(6): 694-699
- [12] Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants[J]. Cryo Lett, 2002, 23(2): 93-102
- [13] Isachenko V, Maettner R, Petrunina AM, et al. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants; new capillary technology[J]. J Androl, 2012, 33(3): 462-468

(收稿日期 2015-06-11)

第一作者简介:马超(1985-),男,大连市妇女儿童医疗中心生殖医学中心助理研究员、硕士研究生。主要研究方向:生殖医学。