

• 临床研究 •

附睾穿刺来源精子冷冻中添加褪黑素的效果研究

罗萌萌, 张云霄, 田蕊, 赵铭佳

【摘要】 目的 研究附睾穿刺来源精子冷冻中添加褪黑素对精子冷冻效果的影响。方法 收集 2020-10/2021-03 月到作者医院就诊的梗阻性无精子症男性行诊断性附睾穿刺来源精子 62 份, 与患者沟通取得知情同意, 检测精液的存活率、运动能力、DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)等指标。随机分为不添加额外保护剂的空白对照组和添加褪黑素的实验组, 采用 Vitro 商品化精子冷冻液微量冷冻载杆冷冻, 液氮保存 24h 后复苏, 检测精液复苏后精子的各项指标, 分析冷冻保护剂效果。结果 冷冻复苏后实验组与对照组比较, 精液的存活率无统计学差异; 精子丙二醛(malondialdetioxidant, MDA)和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)较低, 精子 DFI 较低, 精子顶体完整性较高。结论 附睾穿刺来源精子冷冻中添加褪黑素作为冷冻补充剂, 对冷冻复苏附睾精子具有提高 DNA 和顶体完整性, 降低氧化损伤水平的作用。

【关键词】 梗阻性无精子症; 附睾穿刺来源精子; 精子冷冻; 冷冻保护剂; 精子活力

【中图分类号】 R 698⁺. 2

【文献标识码】 A

doi:10.13730/j.issn.1009-2595.2022.01.003

Study on Adding Melatonin in the Freezing of Epididymal Sperm

LUO Mengmeng, ZHANG Yunxiao, TIAN Rui, ZHAO Mingjia. Department of Reproductive Genetics, Maternal and Child Health Hospital of Tangshan City, Tangshan Hebei 063000, China

【Abstract】 **Objective** To study the freezing effect of adding melatonin to frozen epididymal sperm. **Methods** A total of 62 samples of sperm from obstructive azoospermia men who were admitted to author's hospital from October 2020 to March 2021 underwent diagnostic epididymal puncture were collected, the informed consent was obtained by communicating with the patients, and the survival rate of semen, exercise capacity, and DNA fragmentation index (DFI) were tested. These samples were randomly divided into a blank control group without additional protective agent and an experimental group with melatonin. All samples were frozen with Vitro commercial sperm freezing liquid micro-freezing rod, and were stored in liquid nitrogen for 24 hours and then recovered, and the sperm was detected after the recovery of the semen. The effects of cryoprotectants were analyzed. **Results** After freezing and resuscitation, the survival rate of semen between the experimental group and the control group was not statistically different; the sperm malondialdetioxidant (MDA) and intracellular reactive oxygen species (ROS) were lower, the sperm DFI was lower, and the sperm acrosome integrity was higher. **Conclusion** The addition of melatonin in the freezing of epididymal sperm as a freezing supplement has the effect of improving the integrity of DNA and acrosome, and reducing the level of oxidative damage to the frozen resuscitation of epididymal sperm.

【Key words】 Obstructive azoospermia; Epididymal sperm; Sperm freezing; Cryoprotectant; Sperm motility

作为人类生育力保存的重要部份, 精子冷冻由于精子特殊的细胞结构和功能完全不同于卵母细胞和体细胞, 具有特殊性。由于活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和脂质过氧化加剧的氧化应激原因

和冰晶形成等物理原因造成的精子细胞膜破坏精子活率降低、顶体和 DNA 完整性降低、冷冻复苏后可参与受精过程的精子少、受精效果和胚胎发育差, 在附睾穿刺来源精子冷冻过程中更加明显^[1]。因此, 本研究在附睾穿刺来源精子冷冻中加入具有细胞内抗氧化活性的褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺, 分子式 $C_{13}N_2H_{16}O_2$, 分子量 232.27), 研究其对附睾穿刺来源精子冷冻效果的影响作用。

【基金项目】 河北省医学科学研究课题(20191524)

【作者单位】 063000 河北唐山, 唐山市妇幼保健院生殖遗传科(罗萌萌、田蕊、赵铭佳), 病理科(张云霄)

1 对象和方法

1.1 研究对象

研究收集 2020-10/2021-03 月在作者医院就诊的无精子症男性行诊断性附睾穿刺来源精子 62 份。纳入标准:20~45 岁;附睾穿刺手术顺利;穿刺精子较多(平均每高倍视野不少于 10 条);穿刺来源精子中主要为活动精子(平均每高倍视野不少于 5 条);对本次研究知情,同意参与研究并签署知情同意书。排除标准:附睾穿刺物中组织液过多呈凝块状;穿刺液中非精子细胞(主要是白细胞、上皮细胞和圆细胞)过多(平均每高倍视野大于 10 个);5 年以上不明原因不育;患有严重的糖尿病、遗传代谢病、免疫性疾病、肿瘤或吸毒的男性。每份精液混匀后检测精液的存活率、运动能力、DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)等指标,平均分成不添加额外保护剂的空白对照组和添加褪黑素的实验组。采用 Vitrolife 商品化精子冷冻液,装入人工授精管液氮熏蒸后液氮保存 24h 后复苏,检测精液复苏后精子的各项指标,分析冷冻保护剂效果。实验经伦理委员会批准通过,实验后所有精液样本全部依据生物安全规定按照医疗废物处理。

1.2 实验方法

1.2.1 附睾穿刺 嘱患者取结石体位,局部消毒麻醉后,左手暴露附睾头部并固定,右手取 5 ml 注射器避开表皮血管穿刺,进针有突胀感后吸取约 0.5 ml 附睾液并转移到已加入预热至室温的 SpermRinse 培养液(Vitrolife, 瑞典)35 mm 平皿中^[2]。高倍镜下观察活动精子,检测并记录各项精子参数后,全部连同培养液转移至 15 ml 离心管, SpermGrad 微量梯度液(Vitrolife, 瑞典)280 g 离心 10 min, 留取沉淀 0.2 ml 混匀^[3]。

1.2.2 附睾精子冷冻和复苏 对照组 0.2 ml 附睾精子沉淀中加入 0.2 ml Vitrolife 精子冷冻保护液(Gotenberg, 瑞典),充分吹打混合,实验组额外添加褪黑素(索莱宝, 北京)至终浓度 1 mol/L,注射器连接人工授精管(PCC, 山东)吸取混合液至授精管中段,采用热封口两端封口,液氮平面上方 10 cm 悬吊 15 min 后,装入标注好信息的冷冻套管中放入液氮罐保存。复苏时将授精管从液氮冻存位置迅速取出,37℃ 边水浴边搅动使之受热均匀,10 min 后转移到 37℃ 预热的空试管中进行各项检测并记录^[4]。

1.2.3 精子活率检测 精子膜低渗膨胀试验:按《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)标准^[5],取 20 μ l 精液加入到 200 μ l 低渗试剂(含有果糖和柠檬酸)中,37℃ 保温 5 min,此时将各种尾部

肿胀精子计为活精子,计算 200 个精子中肿胀精子的百分率。伊红-苯胺黑精子试验:取 20 μ l 精液和等体积伊红-苯胺黑悬液,混匀静置 30 s,干燥封片并计数染色精子(死精子)和非染色精子(活精子)。

1.2.4 精液微量丙二醛(malondialdetioxidant, MDA)检测 精子膜脂类过氧化反应的程度以硫代巴比妥酸(thio barbituric acid, TBA)比色法测定反应产物 MDA 浓度表示。采用 TBA 试剂盒(贝博生物, 中国)取待测精子悬液 0.1 ml 为测定管,并设标准管及标准空白管,严格按照说明书操作,分别加入试剂得红色反应物,检测值为原始 MDA,再换算为精子浓度 20×10^6 /ml 的修正 MDA 值,以 nmol/ 10^9 精子表示,以减小由于精子浓度不同引起的误差^[6]。

1.2.5 精子细胞氧化应激 ROS 检测 化学发光探针(鲁米诺)法检测精子细胞的氧化应激 ROS 水平:向 400 μ l 洗涤后的精子悬液中加入 4 μ l (25 mmol/L)鲁米诺试剂和 8 μ l (1550 IU/ml)辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)溶液,保持 37℃ 收集化学发光信号 5 min^[7]。

1.2.6 DFI 检测 DFI 检测采用世界卫生组织(world health organization, WHO)推荐瑞-吉染色法:待测精液中加入琼脂糖、酸溶液和裂解液后脱水行瑞-吉染色,高倍光学显微镜下计数,DNA 完整性较差的呈现小及无晕轮精子,其百分率作为 DFI^[8]。

1.2.7 精子顶体完整性检测 取 5 μ l 精子悬液制做涂片,4℃ 下豌豆凝集素荧光标记(fluorescein isothiocyanate-pisum sativum agglutinin, FITC-PSA)染色液浸泡 1 h,450 nm 荧光显微镜观察,精子头部前半部分染色为顶体完整,计数并计算百分率^[9]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补充褪黑素对精子存活率的影响

冷冻复苏后实验组与对照组比较,精子整体存活率无统计学差异($P > 0.05$),见表 1。

2.2 补充褪黑素对精子氧化指标的影响

冷冻复苏后实验组与对照组比较,精子的 MDA 和细胞内 ROS 较低(P 均 < 0.05),见表 2。

2.3 补充褪黑素对 DNA 完整性和顶体完整性的影响

冷冻复苏后实验组与对照组比较,精子 DFI 较低,精子顶体完整性较高(P 均 < 0.05),见表 3。

表 1 两组精子存活率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of survival rate of sperm between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	精子膜低渗膨胀试验(%)	伊红-苯胺黑精子试验(%)
对照组	31	25.04 ± 2.21	17.28 ± 3.42
实验组	31	24.33 ± 2.87	18.52 ± 3.61
<i>t</i> 值		1.091	1.388
<i>P</i> 值		0.279	0.170

表 2 两组精子氧化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of sperm oxidation indexes between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	精子微量 MDA (nmol/10 ⁹)	精子细胞氧化应激 ROS(U/ml)
对照组	31	28.04 ± 1.17	53.11 ± 3.24
实验组	31	21.62 ± 1.89	44.75 ± 4.30
<i>t</i> 值		16.080	8.645
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

表 3 两组精子完整性相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of sperm integrity related indicators between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	精子 DFI(%)	精子顶体完整性(%)
对照组	31	75.04 ± 2.20	22.28 ± 1.72
实验组	31	54.33 ± 2.55	36.52 ± 2.09
<i>t</i> 值		34.240	29.290
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

3 讨论

冷冻复苏过程中,精子发生氧化应激是造成精子复苏后活力减低,受精能力下降的主要原因之一^[10]。附睾穿刺来源精子在抗氧化应激方面明显更差^[11]。可能原因是多数梗阻性无精子症男性患者的附睾局部环境中炎性刺激的持续存在,造成精子持续处于氧化应激状态,精子内部抗氧化活性因子的水平明显低于正常取精精子^[12]。

在近几年的研究中,褪黑素及其复合物在神经系统治疗新型阿尔茨海默症^[13]、通过 p53 途径调节糖脂代谢保护糖尿病和肥胖症的肝功能等很多方面,都表现出安全并且有效的体内抗氧化作用^[14]。附睾穿刺精子处理后需要卵胞浆内单精子注射与卵细胞结合^[15]。褪黑素对卵子安全性已经在动物实验中得到证实,并且在一定程度上改善卵母细胞成熟度,对胚胎早期发育有益^[16]。在对猪卵细胞的实验中,提示其作用机制可能是褪黑素的抗凋亡和抗氧化活性一方面促进了核成熟,经褪黑素处理的卵子皮质颗粒和线粒体呈较好的正态分布,线粒体膜电位较高,另一方面抑制

了内质网氧化应激,经褪黑素处理后卵子的 B 淋巴细胞瘤 2 基因(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的表达均显著加强,早期凋亡率低^[17]。

附睾穿刺来源精子的冷冻复苏,很多情况下是解决男性患者本身精子发生不良只能附睾穿刺取精,或者患病后需要用药治疗提前保存精子对有生育力保存的需求。包括性成熟之前需要接受免疫抑制剂或抗癌治疗,尤其是造血干细胞移植前处理的青春期前男性。对大鼠实验研究提示,组蛋白到鱼精蛋白过渡精子发生过程中,瘦素抑制细胞合成,褪黑素处理可降低瘦素的这种作用^[18]。这种对组蛋白修饰的间接作用,在抗六价铬等的毒理性作用时仍然明显。此外,六价铬对精原干细胞凋亡信号转导和诱导小鼠附睾生精小管的组织学变化方面的作用也能被褪黑激素的外源性保护所减低,实验还通过监测产仔评估了实验雄性小鼠的生育能力,印证了褪黑激素的作用^[19]。

研究证明,褪黑激素能有效缓解小鼠附睾精原干细胞损失和凋亡。可能机制是褪黑激素促进一些沉默调节蛋白的表达,进而影响 p53 乙酰化,降低精原细胞的凋亡率^[20]。附睾穿刺来源精子冷冻保存中添加褪黑素有可能改善精原干细胞烷化剂诱导损伤的作用。在鼠类游泳实验中,过度强制运动导致抗氧化酶普遍降低,精子凋亡增加。实验中添加褪黑激素似乎诱导了抗氧化酶的产生,可以改善精子参数^[21]。

一项褪黑素在人类精子冷冻中的影响研究,对人类精子的参数,如运动性、膜完整性、存活率和细胞内活性氧类物质的水平进行了分析,与精子的半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)的活性和蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)磷酸化进行了联合评价,提示褪黑素可能通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 信号传导途径发挥其减小精子冷冻复苏损伤的作用^[22]。

精子的评价指标主要分为以妊娠率为代表的体内效果和以精子活动性、膜完整性、DNA 完整性、顶体完整性、精子内部结构和物质测定为主的体外检测两种。前者需要多中心长时间联合分析,后者在附睾穿刺取精研究中较为重要的是精子的膜与遗传物质完整,精子内部活性物质稳定^[23]。在多家不育诊所横断面观察研究中,已经通过 Halosperm 技术和末端脱氧核苷酸转移酶脱氧尿苷三磷酸切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end, TUNEL)分析表明,人类精子 DNA 碎片增加提示精

子的受损程度,是男性不育的因素之一。尤其是在冷冻复苏后应用胞浆内单精子注射等辅助生殖技术时,精子 DNA 损伤的比例与受精率和胚胎发育的不利结果相关^[24]。在另一项研究中,精子冷冻复苏后活力和运动能力均降低,精子细胞内 ROS 和 MDA 均升高,改变程度与精子受精能力负相关^[25]。本研究由于伦理原因,未能与成熟卵细胞结合,研究胚胎发育情况。

综上所述,附睾穿刺来源精子冷冻复苏中添加褪黑素作为冷冻补充剂,具有提高精子 DNA 和顶体完整性,及降低精子氧化损伤水平的作用。

参 考 文 献

- [1] 任枚琪,杨瀚云,史 潇. 精子功能的生理机制及研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2020,39(6):519-523
- [2] 张 迅,梁季鸿,申树林,等. 睾丸固定钳固定法在经皮附睾穿刺取精术中的应用价值[J]. 中华生殖与避孕杂志,2017,37(4):304-307
- [3] 刘 晃,郑厚斌,周 雨,等. 影响睾丸显微取精结局的相关因素分析(附 74 例报告)[J]. 中华生殖与避孕杂志,2019,39(4):317-321
- [4] 邵 帅,洪乐鹏,江 梅,等. 人类微量精子冷冻方法的研究进展[J]. 生殖医学杂志,2018,27(10):1027-1032
- [5] 张欣宗,姚康寿,熊承良.《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版与第 4 版精子形态评估标准的比较研究[J]. 中华男科学杂志,2011,17(11):989-992
- [6] 郭 颖,辛 玲,于和鸣. 精子氧化损伤及抗氧化剂的研究[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2012,31(6):475-478
- [7] 张 红,徐晨阳,郑荣梁. 活性氧及其清除剂对人精子功能的调控[J]. 自然科学进展,1999,9(5):393-398
- [8] 陈振文,谷龙杰. 精液分析标准化和精液质量评估—WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)出版[J]. 中国计划生育学杂志,2012,20(1):58-62
- [9] 孙培蓓,李 坤,郑东旺,等. 人精子中 Slo1 和 Slo3 钾离子通道共同参与调控精子获能过程[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2019,33(10):838-839
- [10] 张建瑞. 冷冻对人精子核 DNA 损伤、凋亡、线粒体膜电位的影响[D]. 济南:山东大学,2010
- [11] O'Flaherty C. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis[J]. Andrology,2019,7(5):662-668
- [12] Zhao H, Yu C, He C, *et al.* The immune characteristics of the epididymis and the immune pathway of the epididymitis caused by different pathogens[J]. Front Immunol,2020,11:2115
- [13] Benchekroun M, Romero A, Egea J, *et al.* The antioxidant additive approach for alzheimer's disease therapy: New ferulic (lipoic) acid plus melatonin modified tacrines as cholinesterases inhibitors, direct antioxidants, and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activators[J]. J Med Chem,2016,59(21):9967-9973
- [14] Zhao S, Li P, Wang P, *et al.* Nurr1 promotes lung cancer apoptosis via enhancing mitochondrial stress and p53-Drp1 pathway[J]. Open Life Sci,2019,14:262-274
- [15] Popal W, Nagy ZP. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes? [J]. Clinics(Sao Paulo),2013,68 Suppl 1(Suppl 1):125-130
- [16] Pang Y, Zhao S, Sun Y, *et al.* Protective effects of melatonin on the in vitro developmental competence of bovine oocytes[J]. Anim Sci J,2018,89(4):648-660
- [17] 贺亚娟. 褪黑素对猪卵泡发育与闭锁的影响研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2017
- [18] Almahboub FA, Singh HJ. Adverse effects of leptin on histone-to-protamine transition during spermatogenesis are prevented by melatonin in Sprague-Dawley rats [J]. Andrologia,2018,50(1):e12814
- [19] Lv Y, Zhang P, Guo J, *et al.* Melatonin protects mouse spermatogonial stem cells against hexavalent chromium-induced apoptosis and epigenetic histone modification[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2018,340:30-38
- [20] Li B, He X, Zhuang M, *et al.* Melatonin ameliorates busulfan-induced spermatogonial stem cell oxidative apoptosis in mouse testes [J]. Antioxid Redox Signal,2018,28(5):385-400
- [21] Moayeri A, Mokhtari T, Hedayatpour A, *et al.* Impact of melatonin supplementation in the rat spermatogenesis subjected to forced swimming exercise[J]. Andrologia,2018,50(3):e12907
- [22] Najafi A, Adutwum E, Yari A, *et al.* Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm[J]. Cell Tissue Res,2018,372(1):149-159
- [23] 黄 玲,伍细言,江 利,等. 精子 DNA 完整性与不明原因复发性流产的相关性[J]. 临床检验杂志,2021,39(4):278-280
- [24] Cankut S, Dinc T, Cincik M, *et al.* Evaluation of sperm DNA fragmentation via halosperm technique and TUNEL assay before and after cryopreservation[J]. Reprod Sci,2019,26(12):1575-1581
- [25] Pariz JR, Ranéa C, Monteiro RAC, *et al.* Melatonin and caffeine supplementation used, respectively, as protective and stimulating agents in the cryopreservation of human sperm improves survival, viability, and motility after thawing compared to traditional TEST-Yolk buffer[J]. Oxid Med Cell Longev,2019:6472945 (2021-11-17 收稿)