

不同浓度乙醇对人精子形态、前向运动力和DNA碎片指数影响的体外实验研究

许鹏宇, 李冬秀, 郭瑞娟, 程立立

(河北医科大学第三医院生殖医学科, 石家庄 050051)

摘要: 目的 探索不同浓度乙醇对体外培养的人精子形态、前向运动力和DNA碎片指数的影响。方法 采用密度梯度离心法处理精液后将回收的30份精子混悬于不同乙醇浓度的精子培养液中, 其中对照组0 mg/dl (A组), 实验组(低浓度)20 mg/dl (B组), C组(中浓度)80 mg/dl和D组(高浓度)160 mg/dl。6h后检测各组正常形态精子比例、前向运动精子以及精子DNA碎片指数。结果 B组正常形态精子(9.60±2.13)%与A组(10.23±2.48)%相比, 差异无统计学意义($P=0.128$)。C组(8.03±1.96)%和D组(5.23±1.23)%正常形态精子低于A组, 差异有统计学意义($P=0.011, 0.000$)。前向运动精子比例依次下降[A组(73.03±2.83)%, B组(63.13±4.22)%, C组(53.03±3.05)%, D组(45.07±2.97)%], 差异有统计学意义($F=283.454, P=0.000$)。D组精子DFI(20.30±5.06)%, 高于A组(12.37±3.68)%, B组(12.67±3.78)%和C组(15.70±4.06)%, 差异均有统计学意义($P=0.000, 0.000, 0.001$)。B组、C组精子DFI高于A组, 但差异均无统计学意义($P=0.804, 0.339$)。B组与C组精子DFI比较, 差异亦无统计学意义($P=0.478$)。结论 乙醇可降低体外培养精子的运动力、正常形态精子的比例, 升高精子DNA碎片指数。

关键词: 乙醇; 正常形态精子; 前向运动; 精子DNA碎片指数; 体外培养

中图分类号: R446.19 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 03-097-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.03.025

Study on the Effects of Different Concentration Alcohol on Motility, Morphology and DNA Fragment Index of Spermatozoa Cultured in Vitro

XU Peng-yu, LI Dong-xiu, GUO Rui-juan, CHENG Li-li

(Reproductive Medicine Center, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Objective To explore the effects of different concentration alcohol on motility, morphology and DNA fragment index of spermatozoa cultured in vitro. **Methods** Thirty spermatozoa samples were prepared by density gradient centrifugation and the recovered spermatozoa was suspended in the culture medium with different concentration of alcohol. The control group with concentration of alcohol 0 mg/dl was named as group A, the experimental groups with concentration of alcohol 20mg/dl, 80mg/dl and 160mg/dl were named as group B (low concentration), group C (medium concentration) and group D (high concentration). 6 hours later, the ratio of progressive motility, normal morphology and spermatozoa DNA fragmentation index (DFI) were detected in each group. **Results** There was no significant difference ($P=0.128$) between group B (9.60±2.13)% and A (10.23±2.48)% about the ratio of normal morphology spermatozoa, but the ratio of normal morphology spermatozoa in group C (8.03±1.96)% and group D (5.23±1.23)% were significantly lower than that in group A ($P=0.011, 0.000$). The ratio of progressive motility [group A (73.03±2.83)%, group B (63.13±4.22)%, group C (53.03±3.05)%, group D (45.07±2.97)%] decreased and the difference was statistically significant ($F=283.454, P<0.05$). Spermatozoa DNA fragmentation index (DFI) of group D (20.30±5.06)% was higher than that of group A (12.37±3.68)%, group B (12.67±3.78)% and group C (15.70±4.06)%, and the difference was statistically significant ($P=0.000, 0.000, 0.001$). DFI in group B and group C was higher than that in group A, but the difference was not statistically significant ($P=0.804, 0.339$). Also, there was no significant difference between groups B and group C ($P=0.478$). **Conclusion** Alcohol can reduce the ratio of progressive motility and normal morphology sperm and increase sperm DFI.

Keywords: alcohol; normal morphology spermatozoa; progressive motility; spermatozoa DNA fragmentation index; in vitro culture

基金项目: 河北省卫健委项目 (No:20190623)。

作者简介: 许鹏宇 (1985-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 辅助生殖技术及男性不育的诊治, E-mail: xupengyushen@163.com。

通讯作者: 李冬秀, 女, 博士, 副主任医师, 主要研究方向: 辅助生殖实验室技术及女性不孕症的诊治, E-mail: lidongxiu1976@163.com。

不良生活方式对男性生育力的潜在影响越来越受到广大学者的重视,尤其是饮酒。乙醇对男性生育力产生不利影响,具体的影响机制仍不清楚^[1]。有学者认为乙醇通过干扰性腺轴的激素分泌、附属性腺的功能以及对睾丸直接毒副作用,从而影响精液质量^[2-4],但也有研究认为饮酒不影响男性精液质量^[5]。以上研究绝大多数基于研究对象饮酒后的生育力评估,鲜有文献报道乙醇对体外精子的直接影响。本课题搜集30份门诊检查正常的废弃精液,采用密度梯度离心法处理精液后将回收的精子混悬于含不同浓度乙醇的精子培养液1005中,6h后检测各组精子的前向运动精子前向运动能力、正常形态精子比例以及精子DNA碎片指数(DNA fragment index, DFI)的变化,探讨乙醇对体外培养精子的直接影响,为我们的临床工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2018年6月~2019年3月在我院生殖门诊就诊的男性患者,年龄18~35岁,排除高血压、冠心病、慢性肾病等慢性疾病患者;经男科医生专科查体,生殖器发育正常、无精索静脉曲张、近期无泌尿生殖系统感染;禁欲2~7天,精液常规、形态检测正常;无吸烟、饮酒、药物滥用等不良嗜好者。

1.2 仪器与试剂 精子活力检测系统(北京伟力);相差显微镜(OLYMPUS);精子染色液(深圳华康);精子核DNA完整性检测试剂盒(深圳华康);精子冲洗液(美国SAGE);梯度离心培养液(美国SAGE);无水乙醇(天津永大)。

1.3 方法

1.3.1 精液处理:患者采用手淫法取精,将符合标准的30份精液进行密度梯度离心。15ml的锥形离心管先加入1ml 80%的密度梯度液,再缓慢加入1ml 40%的密度梯度液,将2ml混匀的精液缓慢加入梯度液上方,300g离心20min。离心后去精液及梯度液,将精子沉淀混悬于2ml的1005中,混匀,300g离心5min。离心后去上清,将精子沉淀重新混悬于1005中,调整浓度至 $(10 \sim 50) \times 10^6/\text{ml}$,实验组将精子混悬于不同乙醇浓度的1005中培养。乙醇终浓度分别为对照组0mg/dl(A组),实验组(低浓度)20mg/dl(B组)、C组(中浓度)80mg/dl、D组(高浓度)160mg/dl。将精子混悬液置于35℃的二氧化碳培养箱中,6h后检测精子前向运动能力、形态及精子DFI。

1.3.2 精子前向运动力和精子形态的检测:应用伟力精子活力检测系统进行精子活力分析,采用diff-quick染色法对精子进行染色,1000倍显微镜下行精子形态分析。所有操作均由两名经验丰富的男科实验室人员共同完成,严格参照WHO《人类精液

及精液-宫颈黏液相互作用实验手册》(5版)的标准进行。

1.3.3 精子DFI检测:应用精子染色质扩散法对精子核DNA完整性进行检测。试剂购于深圳华康,操作参照说明书进行。结果判读:常规显微镜下观察400个精子,晕环宽度/精子头直径 $\geq 2/3$ 为大晕环, $>1/4$ 且 $<2/3$ 为中晕环, $\leq 1/4$ 为小晕环,观察不到晕环为无晕环。大晕环和中晕环表示精子核DNA完整,小晕环和无晕环表示精子核DNA断裂。计算方法:DFI=(大晕环+中晕环精子数)/全部计数精子 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学分析 应用SPSS 17.0统计软件进行数据处理。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOV)进行显著性分析,对多组间有显著性差异的采用LSD法进行方差分析中的两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度乙醇对精子活动力和形态的影响 随着乙醇浓度增加,前向运动精子比例逐渐下降(A组73.03% \pm 2.83%,B组63.13% \pm 4.22%,C组53.03% \pm 3.05%,D组45.07% \pm 2.97%),采用单因素方差分析,差异有统计学意义($F=283.454$, $P=0.000$),对各组进行两两比较,各组间差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。正常形态精子随着乙醇浓度的增加而降低(A组10.23% \pm 2.48%,B组9.60% \pm 2.13%,C组8.03% \pm 1.96%,D组5.23% \pm 1.23%),差异有统计学意义($F=20.757$, $P=0.000$),B组正常形态精子比例与对照组、C组相比,差异无统计学意义($P=0.128$,0.295);C组、D组正常形态精子低于A组,差异有统计学意义($P=0.011$,0.000)。

2.2 不同浓度乙醇对精子DFI的影响 随着乙醇浓度增加精子DFI升高(A组12.37% \pm 3.68%,B组12.67% \pm 3.78%,C组15.70% \pm 4.06%,D组20.30 \pm 5.06%),采用单因素方差分析,差异有统计学意义($F=8.979$, $P<0.001$)。组间两两比较,D组精子DFI高于A组、B组和C组,差异有统计学意义($P<0.001$, $P<0.001$, $P=0.001$),而B组、C组精子DFI虽然高于A组,但差异均无统计学意义($P=0.804$,0.339),B组与C组精子DFI比较,差异亦无统计学意义($P=0.478$)。

3 讨论

虽然血睾屏障为精子的发生提供适宜的微环境,但有研究报道乙醇可以破坏睾丸的结构从而影响精子的生成^[6]。精子的发生是一个涉及神经内分泌、附属性腺和睾丸的复杂过程,尽管许多研究发现饮酒等不良习惯与精液质量相关^[6-7],但是乙醇

对男性精子的影响机制仍不明确。为了去除乙醇通过性腺轴及睾丸的生精功能对精子的影响,观察乙醇与精子直接接触对精子的影响,本课题组通过严格筛选,将30份正常精液处理后放入含不同浓度乙醇的精子培养液中培养。结果发现,精子与乙醇直接接触,对精子活力影响较大,培养液中乙醇浓度越高精子前向运动能力下降越明显。一项关于347例男性短期饮酒的横断面研究发现,5日内酒精摄入越多,精液质量越差^[8],这与我们的观点一致。文献报道每日饮酒与偶尔饮酒的男性相比,前者精液质量显著降低^[9],这可能是每日饮酒引起乙醇及其代谢产物在体内蓄积,从而引起精子质量下降。与精子前向运动能力相比,精子形态在低浓度乙醇时无显著改变,但是在中、高浓度乙醇作用下精子正常形态显著降低,因此我们推测乙醇对精子形态的影响小于精子前行运动能力。临床工作中饮酒患者检测精液,前行运动精子比例最先受到影响,大量饮酒后精子形态学检测也会受到影响。本课题虽然排除了激素、内分泌等因素对实验结果的影响,但是饮酒后乙醇在体内吸收代谢是一个复杂的理化过程,其结论不能完全代替体内实验。也有学者认为饮酒不影响男性精液质量^[5,10],因此对于乙醇对精液常规参数的影响,尤其饮酒后对精子质量的影响仍需进一步研究。

精子DNA碎片指数(DFI)是近年来生殖医学领域评估精子质量的新指标,当DFI过高时会引起受精异常^[11],甚至胚胎发育停滞。有研究显示活性氧(ROS)与DFI密切相关,饮酒、吸烟等不良生活习惯会增加ROS含量,从而影响细胞线粒体功能^[12]。ROS同样会引起精子细胞膜发生过氧化反应,改变精子形态^[13],另一方面ROS作用于精子核酸及相关组蛋白,从而破坏精子DNA完整性^[14-15],引起精子DFI升高。我们的研究发现中低浓度乙醇对精子DFI影响较小,这可能是精子本身的自我保护机制在起作用,但是高浓度乙醇可显著增加精子DNA损伤和DFI升高,这可能是乙醇引起精子代谢异常,ROS增加,进而引起精子DNA损伤。有研究显示淋巴细胞DNA损伤后增加培养环境中的雌激素可促进DNA损伤的修复,但是精子由于细胞质的丢失,没有自我修复功能^[16-17],因此我们推测,即使体内环境有雌激素的干扰,当乙醇引起精子DFI升高后不会因为雌激素的作用而降低,与我们体外实验的结论一致。

综上所述,本研究去除了乙醇通过生殖内分泌系统、附属性腺以及对睾丸的直接损害等因素对精子的影响,观察到乙醇对体外精子的直接影响,即低浓度乙醇可降低精子活力、正常精子形态,较高

浓度可引起DFI升高。但是,乙醇进入体内后会发​​生复杂的理化反应,乙醇及其代谢产物对精子的影响及其机制仍需大样本多中心的深入研究。

参考文献:

- [1] LA VIGNERA S, CONDORELLI R A, BALERCIA G, et al. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature[J]. Asian Journal of Andrology, 2013, 15(2): 221-225.
- [2] BOERI L, CAPOGROSSO P, VENTIMIGLIA E, et al. Heavy cigarette smoking and alcohol consumption are associated with impaired sperm parameters in primary infertile men[J]. Asian Journal of Andrology, 2019, 21(5): 478-485.
- [3] JOANA VIEIRA, S, DANIEL C, MARIANA G, et al. Study on the short-term effects of increased alcohol and cigarette consumption in healthy young men's seminal quality[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45457.
- [4] OCZKOWSKI M, REMBISZEWSKA A, DZIENDZIKOWSKA K, et al. Beer consumption negatively regulates hormonal reproductive status and reduces apoptosis in Leydig cells in peripubertal rats[J]. Alcohol, 2019, 78: 21-31.
- [5] POVEY A C, CLYMA J A, MCNAMEE R, et al. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study[J]. Hum Reprod, 2012, 27(9): 2799-2806.
- [6] 冯永铭. 乙醇及其代谢物在家兔体内的死后分布及动态分布研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2018. FENG Yongming. Study on the postmortem distribution and dynamic distribution of ethanol and its metabolites in rabbits[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.
- [7] VERON G, TISSERA A D, BELLO R, et al. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics[J]. Fertil Steril, 2018, 110(1): 68-75.
- [8] HANSEN M L, THULSTRUP A M, BONDE J P, et al. Does last week's alcohol intake affect semen quality or reproductive hormones? A cross-sectional study among healthy young Danish men[J]. Reprod Toxicol, 2012, 34(3): 457-462.
- [9] CONDORELLI R A, CALOGERO A E, VICARI E, et al. Chronic consumption of alcohol and sperm parameters: our experience and the main evidences[J]. Andrologia, 2015, 47(4): 368-379.
- [10] MARTINI A C, MOLINA R I, ESTOFAN D et al. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality[J]. Fertility and Sterility 2004, 82(2): 374-377.
- [11] 梁晓东, 莫淦文, 纪鹏, 等. 精子DNA碎片指数(DFI)与体外受精结局的多因素 Logistic 回归分析[J]. 现代检验医学杂志 2019, 34(5): 59-63. LIANG Xiaodong, MO Ganwen, JI Peng, et al. Multivariate logistic regression analysis of sperm DNA fragment index(DFI) and outcome in vitro fertilization[J]. J Mod Lab Med, 2019, 34(5): 59-63.