

精子在体外两种培养液获能的实验比较研究*

梁晓东^a, 骆强翔^a, 张伟明^b, 莫淦文^a, 郭江华^a, 廖勇彬^a

(江门市中心医院 a. 生殖医学诊疗中心; b. 病案科, 广东江门 529000)

摘要:目的 比较研究精子在体外两种培养液获能的情况, 对比两种精子获能培养液的质量。方法 按照精液分析检查要求和精液分析的结果收集该中心 48 份精液样本, 采用密度梯度离心法分离精子, 调整精子浓度后, 把精子悬液分别置于 Quinn's HTF 和 Vitrolife IVF plus 精子培养液中, 分别在 0, 4, 6, 8 和 10 h 五个时间点取精子悬液进行单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)的定位染色, 并对发出荧光信号的精子进行分类计数, 用混合效应模型比较两种培养液的荧光染色结果。结果 获能精子的顶体区发出绿色荧光, 顶体区有荧光的精子百分率(AA%)随着时间延长而增加, 混合效应模型对比分析两种培养液的 AA% 的结果显示两者差异无统计学意义。结论 荧光染色的结果显示获能精子的比例随时间变化而增加, 两种培养液差别不大, 提示都能提供有利于精子受精功能发挥的环境。

关键词:精子获能; 培养液; 单唾液酸四己糖神经节苷脂

中图分类号: R446.19 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)04-124-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.030

Experimental Comparative Study on Capacitation of Sperm in Two Kinds of Culture Media in Vitro

LIANG Xiao-dong^a, LUO Qiang-xiang^a, ZHANG Wei-ming^b, MO Gan-wen^a,

GUO Jiang-hua^a, LIAO Yong-bin^a (a. Center of Reproductive Medicine Diagnosis and Treatment;

b. Department of Medical Records, Jiangmen Central Hospital, Guangdong Jiangmen 529000, China)

Abstract: Objective To compare and analyze the quality of two kinds of sperm capacitation medium. Methods According to the results of semen analysis and semen analysis, 48 semen samples were collected from the center, and the sperm were separated by density gradient centrifugation. After adjusting the sperm concentration, the sperm suspension was placed in Quinn's HTF and Vitrolife IVF plus sperm culture medium, respectively. The sperm suspension was taken at five time points of 0, 4, 6, 8 and 10 h respectively for GM1 localization staining, and the sperm with fluorescent signal was classified and counted. The mixed effect model was used to compare the fluorescence staining results of the two culture medium. Results The acrosome area (AA) of enabled sperm emitted green fluorescence, and the percentage of fluorescent sperm in the acrosome area (AA%) increased with time. The results of comparative analysis of AA% of the two cultured nights by mixed effect model showed that there was no significant difference between the two cultured nights. Conclusion The results of fluorescence staining showed that the percentage of capacitated sperm increased with time, and both media could play the role of sperm capacitation.

Keywords: sperm capacitation; culture media; GM1 ganglioside

辅助生殖实验室在胚胎培养时需要各种不同种类的培养液, 这些培养液的质量好坏直接影响到辅助生殖技术的成功率。其中所使用的精子培养液, 是在精子优化分离后添加的精子悬浮液, 由于它能影响受精结局, 有必要通过性能评估实现实验室试剂的质量控制。目前评估的方法主要是精子存活试验, 这个试验是通过观察精子在不同时间点精子的活力来分析精子培养液质量的方法。然而, 精子活动能力只是评价的一个方面, 更重要的是受精过程中培养液是否能使精子获能或顶体反应等环节得到最大的发挥。能否通过检测获能环节相关的标记物的改变来反映培养液质量呢? 现已知

道, 精子获能伴有膜胆固醇外流的现象, 最终使脂筏结构重新分布^[1-2], 从而使脂筏结构内单唾液酸四己糖神经节苷脂(GM1)的位置改变。GM1 是分布于细胞膜上的一种富含唾液酸的鞘糖脂, 是构成脂筏结构的重要成分, 可通过分析 GM1 的位置改变反映精子获能相关膜脂筏结构的改变^[3]。由于 GM1 能与霍乱毒素 B 亚基(CTB)发生迅速结合, 只要把荧光素标记在霍乱毒素 B 亚基上, 就可以对精子膜上的 GM1 进行定位染色检测^[4-5]。本研究将尝试用 CTB 对精子膜进行染色, 并且从不同时间点对不同培养基精子的染色结果进行计数检测, 探讨提供精子功能环境所适合的精子培养液。

* 基金项目: 江门市医疗卫生领域科技计划项目(2015002)。

作者简介: 梁晓东(1983—), 男, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 精子相关功能与生殖助孕技术, E-mail: 229290147@qq.com。

通讯作者: 廖勇彬, 男, 医学博士, 主任医师, E-mail: 836944528@qq.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 男性精液样本来自于本中心日常做精液检查的患者。简单了解男方职业和不良生活史等信息后,选取非高温环境工作、没有不良生活史患者留取的精液标本。只有完全液化的且高于WHO第五版精液检查的正常参考值的精液标本才纳入本研究中。所有患者均知情同意并经医院伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂:密度梯度离心液选用 CooperSurgical 公司的 PureCeption™ (40/80) (REF ART-2040, ART-2080), Vitrolife IVF plus 培养液购自 Vitrolife 公司, Quinn's HTF 精子培养液 (REF ART-1020) 购自 CooperSurgical 公司, 精子标记染色液采用 Thermofisher 公司的 CTB-AlexaFluor 488 连接物 (REF C22841), 固定液多聚甲醛来自于北京索莱宝生物有限公司。

1.2.2 仪器:计算机辅助精液分析系统(西班牙 Microptic 公司)和 Nikon 80i 荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 方法

1.3.1 精液采集:精液标本留取当天要求禁欲 3~5 天,采用手淫法取精且收集到无毒的容器内。

1.3.2 精液分析:精液标本待其完全液化后按照 WHO 第五版精液检查的操作规程测量精液量、精子浓度、精子活力及形态。

1.3.3 精液处理:采用不连续的密度梯度离心法分离精子,精子洗涤后分别用 Quinn's HTF 培养液和 Vitrolife IVF plus 培养液重悬。然后再次分析处理后的精子浓度与活力。把精子浓度调整成 $(5\sim10)\times10^6/\text{ml}$ 后分别把两种培养液中精子悬液分装成 5 份,置于 37°C , $5\%(\text{v/v})\text{CO}_2$ 培养箱中获能培养。于 0, 4, 6, 8 和 10 h 五个时间点分别把精子悬液取出,进行 GM1 的定位染色。

1.3.4 精子膜 GM1 的定位染色:参照 MOODY 等^[6]的方法。基本步骤为:先把精子悬液离心去上清,用 2 g/dl 多聚甲醛于 37°C 固定 15 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤三次后,再次调整精子浓度为 $20\times10^6/\text{ml}$ 左右,然后加入等体积的 $50\times10^{-6}\text{g/ml}$ 的 CTB-Alexa Fluor 488 连接物染色 15 min。染色结束以后再次使用 PBS 洗涤三次,重悬精子沉淀物并涂片。使用荧光显微镜在激发波长 492 nm,发射波长 520 nm 滤光片下观察分析染色结果,再按照 MOODY 等^[6]的方法对至少 200 条精子进行分类计数,计算顶体区有荧光的精子百分率(AA%)。

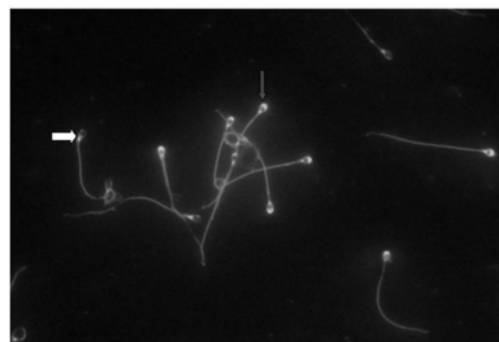
1.4 统计学分析 对于定量检测的结果使用均数

±标准差($\bar{x}\pm s$)的方式表达。各时间点精子的 AA%在不同培养基中的比较,属于重复测量资料的比较,使用混合效应模型分析。所有的分析过程使用 SPSS25.0 软件进行, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精液样本的总体情况分析 符合条件的精液样本共有 48 份,其中:精液量为 $3.7\pm1.6\text{ ml}$,精子浓度为 $(58.75\pm7.88)\times10^6/\text{ml}$,精子活动率(前向运动加非前向运动百分率)为 $(51.55\pm15.62)\%$,精子形态正常率为 $(6.04\pm2.31)\%$ 。

2.2 精子膜 GM1 的定位染色 染色结果见图 1。其中顶体前区(AA)发出绿色荧光信号的是已获能的精子(图 1 黑色箭头),而精子头部没有荧光信号的是非获能精子(图 1 白色箭头),与 MOODY 等^[6]的研究结果一致。



(40×, 激发波长 492 nm, 发射波长 520 nm)

图 1 精子膜 GM1 的定位染色

2.3 两种培养液之间 GM1 染色结果的分析比较

各时间点精子的活动率和 AA%见表 1 和图 2。从图 2 可以看出, AA%随着时间延长而升高,表明获能精子随着时间的延长而增加,而两种培养液曲线基本接近。把测量时间作为重复因子,培养液分组作为主体,使用混合效应模型进行分析,结果显示两种培养液之间的 AA%差异无统计学意义($t=0.096$, $P=0.923$)。

表 1 两种培养液在不同时间点的精子活动率与 AA%结果比较[$(\bar{x}\pm s)\%$]

培养液类别	测量时间(h)	精子活动率	AA
Quinn's HTF 精子培养基	0	96.23±2.11	18.30±1.74
	4	88.43±3.40	24.14±3.74
	6	82.73±4.26	37.16±5.16
	8	76.78±7.98	44.97±5.16
	10	69.56±6.65	48.34±3.24
Vitrolife IVF plus 培养基	0	94.98±1.72	18.04±2.74
	4	89.34±3.00	21.00±3.99
	6	83.43±6.42	36.04±3.75
	8	75.37±7.87	47.46±6.62
	10	70.80±7.00	49.19±2.38

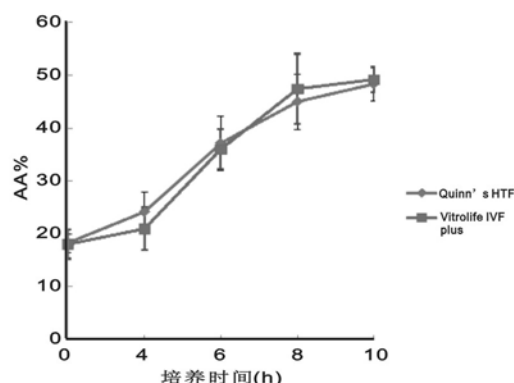


图2 不同时间点两种培养液的AA%

3 讨论 随着宫腔内人工授精技术和常规体外受精技术在辅助生殖领域的广泛应用,人们对于技术中所使用培养液的质量越来越重视。培养液的好坏直接关系着妊娠结局和实验室的质量控制结果。在这些辅助生殖技术中,精液处理过程是其中重要的一环,当中所用的精子培养液可以提供精子超激活运动中的能量需要,因此目前对于精液培养液在维持精子活动方面的评判,主要通过在不同的培养时间点分析精子活力或者精子运动轨迹参数来进行^[7]。而在另一方面,这些培养液还具有在体外条件下使精子发生获能的功能,以进一步为精卵的结合提供环境^[8]。故此研究者更关心的可能是精子受精能力的获得及精子功能的发挥等对精卵融合的直接影响因素。GM1在精子获能时重新定位的现象,为我们提供了一种研究工具用于评估精液培养液在发挥精子受精功能方面的作用。先前已经有学者报道使用这一工具对比了几种商品化的精子培养液,发现各种培养液在促进精子功能方面的不同^[9]。由于我中心生殖实验室经常使用Vitrolife IVF plus培养液和Quinn's HTF培养液作为精子维持液,故此研究中使用了这两种培养液来比较,结果说明两种培养液均能提供发挥受精功能的环境,但这一结论仍需要生殖实验室的各种胚胎培养数据的支持和结合实际受精情况综合分析^[10]。

本研究在对比两种培养液的实验过程中采用了CTB结合染色法,主要基于GM1能与CTB能发生迅速结合的原理,但这种方法的关键是如何确定精子GM1在获能条件和非获能条件下的分布定位。MOODY等^[6]选取了凝集素受体作为参照,对每一条精子使用CTB与花生凝集素(PNA)对精子进行双染色,证实获能精子的GM1分布于顶体区。在本研究中,GM1在获能条件下的定位染色结果与MOODY等^[6]基本一致。另外,人类精子膜有着很高的胆固醇/磷脂的比例,故人类精子中需要较长的时间才可以获能。这个时间跟使

用的诱导物也有关系,实验室常用的培养液中的诱导物来源于清蛋白^[11-12],而添加清蛋白的培养液中至少要6 h才开始观察到获能现象的出现^[13]。在本研究中,从4 h开始观察不同时间点的顶体区有荧光信号的精子百分率(AA%),发现AA%随时间延长而增加,表明获能精子的数量逐渐增加。

一项有效的功能检测技术应当与临床诊断相关性好,能指导辅助生殖技术的使用策略,而且方法简单可行。对于不孕不育原因和辅助生殖技术结局的分析,传统的精液参数如精子浓度、形态等显然已经不能满足临床的需要,亟待开发新的精子功能分析项目,如精子DNA碎片检测等对精子发生、受精等过程出现的异常寻找男性不育的病因和指导辅助生殖技术的选择策略^[14]。而精子受精功能分析凭借其能在体外模拟精卵结合环境的优势被日益重视,在众多评估手段中使用CTB检测精子GM1定位的方法是一项独立于传统精液参数又能用来分析男性不育的病因的技术^[15]。过去人们基于获能现象及其信号传导途径的认识,逐渐发展出以蛋白质酪氨酸磷酸化的方法来检测精子获能。这种方法要做免疫印迹,耗时较长,而使用CTB的荧光素结合物来检测获能的方法简单,耗时短,花费少^[16],这些优点有望成为一项易于推广的精子功能分析的检测技术。

综上所述,本研究建立了使用CTB检测精子GM1定位的方法并以其对比分析了两种不同培养液中精子获能情况,为进一步研究培养液对临床结局的影响及该方法的临床价值打下了基础。

参考文献:

- [1] GADELLA B M, BOERKE A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization[J]. *Theriogenology*, 2016, 85 (1): 113-124.
- [2] YOSHIMOTO H, TAKEO T, IRIE T, et al. Fertility of cold-stored mouse sperm is recovered by promoting acrosome reaction and hyperactivation after cholesterol efflux by methyl-beta-cyclodextrin[J]. *Biol Reprod*, 2017, 96(2): 446-455.
- [3] OSTERMEIER G C, CARDONA C, MOODY M A, et al. Timing of sperm capacitation varies reproducibly among men[J]. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85 (5): 387-396.
- [4] ANDRISANI A, DONA G, TIBALDI E, et al. Astaxanthin improves human sperm capacitation by inducing Lyn displacement and activation[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(9): 5533-5551.
- [5] DONA G, ANDRISANI A, TIBALDI E, et al. Astaxanthin prevents human papillomavirus L1 protein binding in human sperm membranes[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(11): 427.
- [6] MOODY M A, CARDONA C, SIMPSON A J, et al.

- Validation of a laboratory-developed test of human sperm capacitation[J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(5): 408-422.
- [7] 梁嘉颖,郑毅春,李子涛,等. 辅助生殖中精子获能时间对精子质量参数的影响[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(15): 2462-2466.
- LIANG Jiaying, ZHENG Yichun, LI Zitao, et al. Effect of the incubating time following semen optimization on semen parameters[J]. *J Pra Med*, 2018, 34(15): 2462-2466.
- [8] UMEHARA T, KAWAI T, GOTO M, et al. Creatine enhances the duration of sperm capacitation; a novel factor for improving in vitro fertilization with small numbers of sperm[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(6): 1117-1129.
- [9] ANDRISANI A, DONA G, AMBROSINI G, et al. Effect of various commercial buffers on sperm viability and capacitation[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2014, 60(4): 239-244.
- [10] YIN Tailang, ZHANG Yi, LI Saijiao, et al. Culture media influenced laboratory outcomes but not neonatal birth weight in assisted reproductive technology[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog(Med Sci)*, 2015, 35(6): 932-937.
- [11] HERENG T H, ELGSTOEN K B, EIDE L, et al. Serum albumin and HCO_3^- regulate separate pools of ATP in human spermatozoa[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(5): 918-930.
- [12] LEAHY T, GADELLA B M. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4): 561-567.
- [13] PUGA MOLINA L C, LUQUE GUILLERMINA M, BALESTRINI PAULA A, et al. Molecular basis of human sperm capacitation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 72.
- [14] 何海洪,郭伟权,兰希,等. 严重生精障碍患者精子DNA碎片指数与血清Hcy水平的相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(4): 83-86.
- HE Haihong, GUO Weiquan, LAN Xi, et al. Study on the relationship between sperm DNA fragmentation index and Hcy level in patients with severe spermatogenesis[J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(4): 83-86.
- [15] CARDONA C, NERI Q V, SIMPSON A J, et al. Localization patterns of the ganglioside GM1 in human sperm are indicative of male fertility and independent of traditional semen measures[J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(5): 423-435.
- [16] BABIGUMIRA J B, SHARARA F I, JR GARRISON L P. Projecting the potential impact of the Cap-Score on clinical pregnancy, live births, and medical costs in couples with unexplained infertility[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(1): 99-106.
- 收稿日期: 2019-04-25
修回日期: 2019-05-05
- (上接 123 页)
- [8] BOKHARI F A, SHAKOORI T A, BUTT A, et al. TNF- α ; a risk factor for ischemic stroke[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2014, 26(2): 111-114.
- [9] WYTRYKOWSKA A, PROSBA-MACKIEWICZ M, NYKA W M. IL-1 β , TNF- α and IL-6 levels in gingival fluid and serum of patients with ischemic stroke[J]. *J Oral Sci*, 2016, 58(4): 509-513.
- [10] SHIMODA M, KANETO H, YOSHIOKA H, et al. Influence of atherosclerosis-related risk factors on serum high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with type 2 diabetes: Comparison of their influence in obese and non-obese patients[J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(2): 197-205.
- [11] MARTINIC-POPOVIC I, SIMUNDIC A M, DUKIC L, et al. The association of inflammatory markers with cerebral vasoreactivity and carotid atherosclerosis in transient ischaemic attack[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(16/17): 182-186.
- [12] BURACZYNSKA K, KURZEPA J, KSIAZEK A, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene polymorphism in stroke patients[J]. *Neuromolecular Med*, 2015, 17(4): 385-390.
- [13] TUTTOLOMONDO A, DI RAIMONDO D, PECORARO R, et al. Inflammation in ischemic stroke subtypes[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(28): 4289-4310.
- [14] ULRICH N H, DEHMEL T, WITTSACK H J, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinase-9 predict lesion volume in acute stroke[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(3): 379-382.
- [15] 温慧军,杨金锁,张建军. 急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块与血液炎症因子水平的关系[J]. *临床神经病学杂志*, 2012, 25(1): 54-56.
- WEN Huijun, YANG Jinsuo, ZHANG Jianjun. Relationship between carotid atherosclerosis plaque and levels of blood inflammatory factors in patients with acute cerebral infarction[J]. *Journal of Clinical Neurology*, 2012, 25(1): 54-56.
- [16] KABLAK-ZIEMBICKA A, PRZEWOLOCKI T, SOKOTOWSKI A, et al. Carotid intima-media thickness, hs-CRP and TNF- α are independently associated with cardiovascular event risk in patients with atherosclerotic occlusive disease[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1): 185-190.
- [17] 张瑛,戴启荷,陈立. 急性脑梗死患者神经功能恢复情况与炎症因子水平的相关性分析[J]. *安徽医学*, 2016, 37(5): 578-581.
- ZHANG Ying, DAI Qihe, CHEN Li. Correlation between neural function recovery and inflammatory factors in patients with acute stroke[J]. *Anhui Medicine Journal*, 2016, 37(5): 578-581.
- 收稿日期: 2019-01-13
修回日期: 2019-04-28