

# 精液样本保存方式对精子 DNA 碎片率检测影响的实验研究

黄 诚, 陆碧玉, 代元平, 黄李霜, 杨金铃, 黄丽华, 陈大宇, 蔡 稔, 严提珍 (柳州市妇幼保健院医学遗传科 / 柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室, 柳州市生殖医学重点实验室, 广西柳州 545001)

**摘要:** **目的** 研究精液样本新鲜度对精子 DNA 碎片率 (DNA fragmentation index, DFI) 检测结果的影响, 探讨在实际工作中该如何正确保存样本。 **方法** 随机选择 38 份 2020 年 12 月期间柳州市妇幼保健院生殖中心男科门诊日常送检的精液样本, 采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 进行精子 DFI 检测, 每个样本充分液化后混匀分成 4 等份, 分为 A, B, C 和 D 共 4 组: A 组当即检测, 然后放置室温保存, 每 2h 再测 1 次, 共测得 A1, A2, A3 三组数据; B 组放置 2℃~8℃冰箱保存, 每 24h 检测 1 次, 连测 3 天, 共获得 B1, B2, B3 三组数据; C 组放置 -20℃冰箱冷冻, 每周解冻测 1 次, 测完放回冰箱复冻, 连测 4 周, 共获得 C1, C2, C3, C4 四组数据; D 组放 -20℃冰箱冷冻, 30 天后解冻检测 1 次, 获得 D1 组数据。将新鲜样本当即检测组 (A1 组) 作为对照组, 与其他组的 DFI 结果进行单因素配对 *t* 检验, 验证样本在不同保存方式下的结果变化。 **结果** A1 组 DFI 较 A2, C1, C2, C3, C4 和 D 组 [14.33 (5.72 ~ 22.94) % vs 14.68 (6.72 ~ 22.54) %, 14.59 (6.52 ~ 22.66) %, 14.73 (6.62 ~ 22.95) %, 14.91 (6.89 ~ 22.93) %, 14.96 (7.20 ~ 22.72) %, 14.65 (6.85 ~ 22.45) %], 差异无统计学意义 (*t* = -0.827, -1.003, -1.483, -1.834, -1.786, -0.844, 均 *P* > 0.05); A1 组 DFI 低于 A3, B1, B2, B3 组 [14.33 (5.72 ~ 22.94) % vs 16.44 (8.07 ~ 24.81) %, 20.99 (11.93 ~ 30.05) %, 20.71 (11.19 ~ 30.23) %, 23.10 (12.57 ~ 33.63) %], 差异具有统计学意义 (*t* = -3.091, -6.172, -5.108, -6.056, 均 *P* < 0.05)。 **结论** 为保障精子 DFI 检测结果的可靠性, 精液样本应在采集后 2h 内完成检测, 样本在室温或 2 ~ 8℃放置时间过长会使检测结果偏高, 若需较长时间保存建议及时将新鲜样本放置 -20℃冰冻保存, 时长可达一个月。

**关键词:** 精子 DNA 碎片率; 流式细胞术; 样本保存

中图分类号: R446.19 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 03-180-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.033

## Experimental Study on the Effect of Semen Sample Preservation on Sperm DNA Fragmentation Index Test

HUANG Cheng, LU Bi-yu, DAI Yuan-ping, HUANG Li-shuang, YANG Jin-ling, HUANG Li-hua, CHEN Da-yu, CAI Ren, YAN Ti-zhen (Department of Medical Genetics, Liuzhou Maternal and Child Health Hospital / Liuzhou Key Laboratory of Birth Defect Prevention and Control / Liuzhou Key Laboratory of Reproductive Medicine, Guangxi Liuzhou 545001, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of semen sample freshness on the results of DNA fragmentation index (DFI), and explore how to properly preserve the samples in practical work. **Methods** 38 semen samples were randomly selected from the male outpatient department of the Reproductive Center of Liuzhou Maternal and Child Health Hospital during December 2020. Flow cytometry (FCM) was used to detect the DFI of sperm. After each sample was fully liquefied, it was mixed and divided into four equal parts, and divided into four groups: group A was tested immediately, then stored at room temperature, and tested again every two hours for the data obtained from three groups of A1, A2 and A3. Group B was stored in a refrigerator at 2℃~8℃, and tested once every 24 hours for 3 days to obtain data from three groups: B1, B2 and B3. Group C was frozen in the refrigerator at -20℃, thawed and tested once a week. After the test, it was put back into the refrigerator for refreezing, and tested for 4 weeks to obtain data from four groups of C1, C2, C3 and C4. Group D was frozen in the refrigerator at -20℃ and thawed once after 30 days to obtain the data of group D1. The fresh sample immediate detection group (group A1) was taken as the control group, and the DFI results of other groups were tested by paired *t*-test to verify the changes in the results of

**基金项目:** 广西壮族自治区卫生和计划生育委员会科研课题 (流式细胞术检测精子 DNA 碎片率的室内质量控制研究 (Z20180038); 精子过量残留细胞质对辅助生殖技术临床结局的相关性研究 (Z20190165), 非梗阻性无精子症的遗传因素分析及临床干预研究 (Z20211191); 柳州市科技计划项目 (2018AF10501); 柳州市医学遗传研究中心培养建设; 广西医学高层次人才培养计划资助 (G202003028); 柳州市个十百人才工程专项资金资助。

**作者简介:** 黄诚 (1986-), 男, 本科, 副主任技师, 研究方向: 检验医学、生殖医学、遗传学, E-mail:191445086@qq.com。

**通讯作者:** 严提珍 (1980-), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 分子生物学, 遗传学, E-mail:439078813@qq.com。

samples under different storage methods. **Results** The DFI of group A1 was not significantly different from that of groups A2, C1, C2, C3, C4 and D1 [14.33 (5.72 ~ 22.94) % vs 14.68 (6.72 ~ 22.54) %, 14.59 (6.52 ~ 22.66) %, 14.73 (6.62 ~ 22.95) %, 14.91 (6.89 ~ 22.93) %, 14.96 (7.20 ~ 22.72) %, 14.65 (6.85 ~ 22.45) %], and the differences were statistically significant ( $t=-0.827, -1.003, -1.483, -1.834, -1.786, -0.844$ , all  $P>0.05$ ). The DFI of group A1 was lower than that of groups A3, B1, B2 and B3 [14.33 (5.72 ~ 22.94) % vs 16.44 (8.07 ~ 24.81) %, 20.99 (11.93 ~ 30.05) %, 20.71 (11.19 ~ 30.23) %, 23.10 (12.57 ~ 33.63) %], and the differences were statistically significant ( $t=-3.091, -6.172, -5.108, -6.056$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** In order to ensure the reliability of the sperm DFI test results, the semen samples should be tested within 2h after collection. If the samples are stored at room temperature or 2 ~ 8℃ for too long, the test results will be high. If it needs to be stored for a long time, it is recommended to put the fresh samples at -20℃ for frozen storage, which can last for one month.

**Keywords:** sperm DNA fragmentation index; flow cytometry; sample preservation

精子DNA是男性将遗传物质传递给子代的载体,许多研究表明精子DNA损伤会影响自然受精、胚胎发育以及辅助生殖的妊娠结局,并与男性不孕和复发性流产密切相关。当前业界广泛认为精子DNA碎片率(DNA fragmentation index, DFI)可以较好反映整体精子DNA受损程度,现已列为衡量精子质量的一项独立指标<sup>[1-3]</sup>。相对于常规的活力和生化检测,DFI更侧重于反映精子遗传物质的健康度。如今用于检测精子DNA完整性的方法有很多,其中应用最普遍的是精子染色质结构分析法(sperm chromatin structure analysis, SCSA),并且该方法可以在流式细胞仪上运用。流式细胞术(flow cytometry, FCM)是分析分类单个细胞组群最为高效准确的技术,用流式细胞仪检测精子DFI可以在短时间内检测大量精子,将不同荧光信号的精子进行分类即可算出DFI,结果更为客观准确<sup>[4]</sup>。但在整个实验流程中依然存在可能会影响检测结果的因素,当精液样本留存时间过长可能出现精子核物质降解、微生物滋生、精子形态改变甚至破裂等情况<sup>[5-6]</sup>。所以在实际工作中精子DFI检测的样本时效不容忽视,本实验将研究样本新鲜度对精子DFI检测结果的影响,探讨在实际工作中该如何保存样本。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 随机选择2020年12月期间柳州市妇幼保健院生殖中心男科门诊日常送检的精液样本。纳入标准:①通过精液常规结果排除无精少精症患者;②排除样本液化不全患者。最终选取38份样本(样本提供者年龄26~52岁)。本研究经医院伦理委员会批准(文件号:科研-2018-004),患者知情同意。

**1.2 仪器与试剂** 本实验使用试剂为深圳华康生产的吖啶橙染色液,样本检测使用美国BD FACS Via流式细胞仪。

## 1.3 方法

**1.3.1 实验分组:** 每个样本充分液化后混匀分成4

等份,分为A, B, C, D共4组:A组当即检测,然后放置室温保存,每2h再测1次,共测得A1, A2, A3三组数据;B组放置2~8℃冰箱保存,每24h检测1次,连测3天,共获得B1, B2, B3三组数据;C组放-20℃冰箱冷冻,每周解冻测1次,测完放回冰箱复冻,连测4周,共获得C1, C2, C3, C4四组数据;D组放置-20℃冰箱冷冻,30天后解冻检测1次,获得D1组数据。

**1.3.2 检测方法:** 按SCSA法对精子细胞进行染色,每个样本采用中等流速计数10 000个精子。正常精子由于DNA双链结构完整其荧光信号以530nm为主,而DNA异常精子由于存在单链片段而携带640nm荧光信号会偏离正常群体,最后统计异常精子占总精子的比例即为精子DFI。

**1.4 统计学分析** 采用SPSS 23.0统计软件分析,将新鲜样本当即检测组(A1组)DFI结果与其他组的检测结果分别进行配对 $t$ 检验,验证样本在不同条件保存后的结果变化, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 检测组与不同保存方式组DFI水平比较** 结果见表1。将新鲜样本当即检测组(A1组)作为对照组,与其他组DFI检测结果进行两两比较,A1组DFI与A2组间比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),与A3组间比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。对比结果显示新鲜样本在室温保存下2h内检测结果比较稳定,放置4h后检测结果升高,A1组与B1, B2, B3组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.001$ );对比结果显示2~8℃不能保持精子DNA结构稳定。A1组与C1, C2, C3, C4和D1组的组间比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ ),对比结果显示-20℃冰冻可使样本稳定长达一个月,且期间样本经过反复冻融检测结果也无明显波动。

## 3 讨论

精子是以极小的体积将遗传物质和有限能量高度整合的生殖细胞。精核表面白的鱼精蛋白

(protamine, HP)可形成大量二硫键使精子染色体高度压缩,从而在一定程度上保护DNA免受伤害,使精子对各种外界环境因素有较强的抵抗力<sup>[7-8]</sup>。精子离体后随着时间的推移,染色质结构会由于表面蛋白的降解发生松散,对于本实验的DNA完整性检测会造成一定干扰<sup>[9]</sup>。此外流式细胞仪主要用于检测单细胞悬液,要求精子形态必须保持完好,若样本不新鲜精子细胞可能发生肿胀、破裂或者微生物滋生等也会影响仪器的信号收集<sup>[10-11]</sup>。

表1 立即检测组与不同保存方式组两两比较

| 组别 | DFI水平比较(%)            | 95%CI          | t      | P      |
|----|-----------------------|----------------|--------|--------|
| A1 | 14.33 (5.72 ~ 22.94)  |                |        |        |
| A2 | 14.68 (6.72 ~ 22.54)  | -1.21 ~ 0.51   | -0.827 | 0.414  |
| A3 | 16.44 (8.07 ~ 24.81)  | -3.50 ~ -0.73  | -3.091 | 0.004  |
| B1 | 20.99 (11.93 ~ 30.05) | -8.84 ~ -4.47  | -6.172 | <0.001 |
| B2 | 20.71 (11.19 ~ 30.23) | -8.90 ~ -3.85  | -5.108 | <0.001 |
| B3 | 23.10 (12.57 ~ 33.63) | -11.71 ~ -5.84 | -6.056 | <0.001 |
| C1 | 14.59 (6.52 ~ 22.66)  | -0.77 ~ 0.26   | -1.003 | 0.323  |
| C2 | 14.73 (6.62 ~ 22.95)  | -0.95 ~ 0.15   | -1.483 | 0.147  |
| C3 | 14.91 (6.89 ~ 22.93)  | -1.22 ~ 0.06   | -1.834 | 0.075  |
| C4 | 14.96 (7.20 ~ 22.72)  | -1.34 ~ 0.08   | -1.786 | 0.082  |
| D1 | 14.65 (6.85 ~ 22.45)  | -1.07 ~ 0.44   | -0.844 | 0.404  |

在实际工作中,实验室不一定能做到在收到精液样本就当即检测。现实情况往往是患者一次取精要做多种检测项目,精液常规项目需要优先检测,其他的生化、DFI,病原体等检测可能会留存一段时间后再集中检测。而有些机构甚至是外送检测。如果不对精液样本进行妥善保存会对检测结果有很大影响。通常保存细胞样本需要用到-80℃冰柜或者液氮,还要配合冻干保护剂,这对实验室场地设备和人员操作有较高要求<sup>[12]</sup>。细胞经过-20℃冰冻会形成冰晶对内部结构产生机械损伤,反复冻融后容易发生破裂<sup>[13]</sup>。然而精液由于其精浆蛋白胶体成分影响,直接放置-20℃冰冻再复融未见精子细胞有明显变化<sup>[14]</sup>。本研究中用流式细胞仪检测-20℃保存后的样本依然可以收集到精子细胞,且DFI检测值与新鲜原液相差无异,说明精子胞体和DNA结构没有因为冻融而明显破坏。与一些类似研究情况相符<sup>[15]</sup>。所以如果只为保障精子DFI检测准确度,用一般冰箱-20℃冷冻即可有效保存精液样本。同时也可考虑分装个别样本长期冰冻再分次检测来作为该项目的日常质控对照品。若条件允许,还可以进一步研究-80℃冰柜直接冷冻是否能更长时间保持样本稳定。

综上所述,为保障精子DFI检测结果的可靠性,

精液样本应在采集后2h内完成检测,样本在室温或2~8℃放置时间过长会使检测结果偏高,若需较长时间保存建议及时将新鲜样本放-20℃冰冻保存,时长可达一个月。

#### 参考文献:

- [1] 王楠. 染色质扩散法在重度低浓度精子患者精子DNA碎片指数检测中的应用[J]. 青岛医药卫生, 2019, 51(6): 467-469.  
WANG Nan. Application of chromatin diffusion method in detection of sperm DNA fragmentation index in patients with severe low concentration sperm[J]. Qingdao Medical Journal, 2019, 51(6): 467-469.
- [2] 毛宝宏, 杨杰, 王燕侠, 等. 精子DFI水平对配偶复发性流产影响的Meta分析[J]. 中国男科学杂志, 2020, 34(2): 32-37.  
MAO Baohong, YANG Jie, WANG Yanxia, et al. Sperm DNA fragmentation index and recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis[J]. Chinese Journal of Andrology, 2020, 34(2): 32-37.
- [3] DAHAN M H, MILLS G, KHOUDJA R, et al. Three hour abstinence as a treatment for high sperm DNA fragmentation: a prospective cohort study[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2021, 38(1): 227-233.
- [4] 杨芳, 陆金春, 刘园园, 等. 一种可反映人精子DNA损伤严重程度的流式细胞术的建立及评价[J]. 中华男科学杂志, 2020, 26(11): 989-995.  
YANG Fang, LU Jinchun, LIU Yuanyuan, et al. Establishment and evaluation of a flow cytometry technique reflecting the severity of human sperm DNA damage[J]. National Journal of Andrology, 2020, 26(11): 989-995.
- [5] 沈链链, 钟义红, 熊建平, 等. 流式细胞术检测细胞周期实验条件的影响因素分析[J]. 江苏大学学报(医学版), 2020, 30(1): 76-79.  
SHEN Lianlian, ZHONG Yihong, XIONG Jianping, et al. Analysis of influencing factors on experimental conditions of flow cytometry for detection of cell cycle[J]. Journal of Jiangsu University(Medicine Edition), 2020, 30(1): 76-79.
- [6] 曹敏, 张晓敏, 王培昌, 等. 破膜剂对流式细胞术检测小肠中ILC3频率的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(23): 2835-2838.  
CAO Min, ZHANG Xiaomin, WANG Peichang, et al. The effects of fixation/permeabilization reagents on flow cytometry detection for ILC3 frequency in the intestine[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41(23): 2835-2838.
- [7] 宋兵. 精子染色质损伤不育人群全基因组DNA甲基化变异研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.  
SONG Bing. Genome-wide DNA methylation study on male infertility with sperm chromatin integrity damage[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2020.
- [8] 倪吴花. 精子DNA完整性与基因甲基化及时间节



- 律的相关研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- NI Wuhua. A study of the correlation between gene methylation diurnal variation and sperm DNA integrity[D]. Guangzhou: South Medical University, 2020.
- [9] 白晶莹. 禁欲天数、精液优化处理后放置时间及温度对精子DNA碎片的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- BAI Jingying. Effect of abstinence days, storage time after semen optimization and temperature on sperm DNA fragments[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020.
- [10] 王家雄, 刘彩钊, 韩慕天, 等. 流式细胞术检测精液细胞异质性与精子质量的相关性研究[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(11): 1493-1498.
- WANG Jiaxiong, LIU Caizhao, HAN Mutian, et al. Correlation between seminal cell heterogeneity detected by flow cytometry and sperm quality[J]. Journal of Reproductive Medicine, 2020, 29(11): 1493-1498.
- [11] 甄国志, 麦福劲, 林冰, 等. 探讨精子核蛋白组型转换异常对精子DNA碎片指数的影响[J]. 中国实用医药, 2020, 15(22): 36-37.
- ZHEN Guozhi, MAI Fujin, LIN Bing, et al. Discussion on the influence of abnormal sperm nucleoprotein transition on sperm DNA fragment index[J]. China Practical Medicine, 2020, 15(22): 36-37.
- [12] 王晓涵. 采用-80℃冰箱冷冻保存人类精子的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2022.
- WANG Xiaohan. Study on cryopreservation of human spermatozoa in -80℃ freezer[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2022.
- [13] 朱子珏, 刘士玮, 顾本宏, 等. 高原低氧环境中汉族与藏族精子的蛋白质组学研究[J]. 高原科学研究, 2020, 4(4): 33-46.
- ZHU Zijue, LIU Shiwei, GU Benhong, et al. A proteomic research on spermatozoa of han Chinese and tibetans in high-altitude hypoxic environment[J]. Plateau Science Research, 2020, 4(4): 33-46.
- [14] 胡烨, 范宇平, 黄文强, 等. 精子DNA碎片指数对精子冷冻复苏率的影响[J]. 中国男科学杂志, 2019, 33(2): 21-23, 46.
- HU Ye, FAN Yuping, HUANG Wenqiang, et al. The effects of sperm DNA fragmentation index on the recovery rate of sperm cryopreservation[J]. Chinese Journal of Andrology, 2019, 33(2): 21-23, 46.
- [15] 陆金春, 吴振波, 唐山山, 等. 流式细胞术检测精子DNA损伤的标准化与质量控制初步研究[J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(2): 124-128.
- LU Jinchun, WU Zhenbo, TANG Shanshan, et al. Standardization and quality control for detection of sperm DNA damage by flow cytometry: A preliminary investigation[J]. National Journal of Andrology, 2021, 27(2): 124-128.

收稿日期: 2022-02-23

修回日期: 2023-02-01

(上接第137页)

- [10] LIU Huimin, LI Yuxin, GAO Fangyuan, et al. Serum clusterin: a potential marker for assessing the clinical severity and short-term prognosis of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure[J]. Disease Markers, 2020, 2020: 8814841.
- [11] 王友强, 兰由玉, 李世勇, 等. CCR5基因沉默对RA大鼠滑膜细胞炎症反应的影响[J]. 西部医学, 2021, 33(9): 1300-1304, 1310.
- WANG Youqiang, LAN Youyu, LI Shiyong, et al. Effect of CCR5 gene silencing on inflammation of synovial cells in rats with rheumatoid arthritis[J]. Medical Journal of West China, 2021, 33(9): 1300-1304, 1310.
- [12] LI Meng, SUN Xuehua, ZHAO Jie, et al. CCL5 deficiency promotes liver repair by improving inflammation resolution and liver regeneration through M2 macrophage polarization[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(7): 753-764.
- [13] 蔡晓娟, 沈毅, 朱晓红, 等. 整合终末期肝病模型在慢加急性肝功能衰竭预后判断及治疗中的应用[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(5): 446-452.
- CAI Xiaojuan, SHEN Yi, ZHU Xiaohong, et al. Evaluation of integrated model for end-stage liver disease model in predicting prognosis of acute-on-chronic liver failure and the choice of treatment[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Infectious Diseases(Electronic) Version, 2018, 12(5): 446-452.
- [14] 张蕾, 贺建勋, 范雪松, 等. 抗凝血酶Ⅲ活性联合CLIF-COFs评分对HBV相关慢加急性肝衰竭患者预后的评估价值[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(1): 36-40, 45.
- ZHANG Lei, HE Jianxun, FAN Xuesong, et al. Prognostic value of antithrombin Ⅲ activity combined with CLIF-COFs score in patients with HBV related chronic plus acute liver failure[J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2022, 21(1): 36-40, 45.
- [15] 朱立娜, 唐源, 黄初军, 等. 慢加急性肝衰竭患者血清白介素-17、白介素-6及肿瘤坏死因子-α的检测分析[J]. 中国当代医药, 2019, 26(36): 44-46.
- ZHU Lina, TANG Yuan, HUANG Chujun, et al. Detection and analysis of serum interleukin-17, interleukin-6 and tumor necrosis factor-α in patients with acute on chronic liver failure[J]. China Modern Medicine, 2019, 26(36): 44-46.

收稿日期: 2022-09-09

修回日期: 2022-12-08