



精子冷冻保存技术及研究进展

平述煌 杨世华

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650224)

【摘要】 精子冷冻是辅助生殖技术的基础,能够有效的保存有价值的基因资源。文章回顾了近些年来国内外精子冷冻保存的重要研究成果,分析了精子的来源、冷冻预处理、冷冻和解冻方法、防冻剂的选择及其加入去除方式的选择等因素对精子冷冻效果的影响。文章还总结了精子冷冻效果的评价方法,展望精子冷冻技术的发展方向和应用前景。

【关键词】 精子冷冻; 防冻剂; 冷冻评估

【中图分类号】 S814.8 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0067-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.03.017

Progress on Sperm Cryopreservation

PING Shu-huang, YANG Shi-hua

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224)

【Abstract】 Sperm cryopreservation has revolutionized the field of assisted reproduction, and it can provide an effective way to preserve valuable genetic resources. This review contained information relating to the cryopreservation of animal semen through a summary of significance research results about domestic and foreign sperm cryopreservation in recent years, and the topics discussed that the effect of semen collection, freezing pretreatment, freezing and thawing methodologies, cryoprotectant selection and methods of its addition and removal on sperm cryopreservation. In addition, this review also focus on evaluation criteria for post-thaw spermatozoa, proposing prospect on anticipation about research orientation of sperm cryopreservation and its application.

【Key words】 Sperm cryopreservation; Cryoprotectant; Freezing-thawing evaluation

精子冷冻是一个复杂的过程,影响冷冻效果的因素主要包括精子的来源、冷冻稀释液和防冻剂的选择、冷冻和解冻方法的选择。在精子的冷冻过程中外来的压力,如冷休克、防冻剂的毒性、冰晶的形成、渗透压的改变,都会造成精子结构和功能的损伤,其损伤程度则由精子自身对外来压力的耐受能力来决定。不同物种或同物种不同个体的精子在大小、形态、生物化学等方面不同,对外来压力的承受能力也就不同,需要对每一个保存处理环节进行适宜的选择,并综合考虑多个因素的作用,以此优

化冷冻程序。本文就精子的来源、冷冻前预处理、冷冻/解冻方法、防冻剂对冷冻效果的影响和解冻后精子的质量评估这两方面做综述。

1 精液的采集

根据供精动物的睾丸状态,采集精子主要有两种:活体采精和离体附睾取精。

1.1 活体采精

活体采精是借助于外来诱导刺激或自然情况下让动物自主排精。该方法能够有效地减少动物

[基金项目] 国家自然科学基金(31071279)。

[作者简介] 平述煌(1985-),男,硕士生,主要从事动物辅助生殖技术的研究。E-mail: pingshuhuang1985@163.com。

[通讯作者] 杨世华(1972-),教授,主要从事动物生殖生物学研究, E-mail: yshhm@163.com。

损伤,具有很好的实验重复性。特别对濒危、珍贵动物,活体采精是获取精液的主要方法,能大大提高动物的利用价值。

对于哺乳动物,常采用的采精方法有人工假阴道诱导排精、手握阴茎刺激排精、电刺激排精。前两种方法比较简单、便捷,且设备投入较少,主要用于已经完全驯化的家畜和实验动物。而对于育种价值高而失去爬跨能力、不明原因不育等不适宜常规方法采精的家畜、野生动物,阴茎或直肠电刺激采精方法就很重要。

此外,鸟类精子的采集方法主要是腹按摩或推拿诱导射精法;鱼类精子的采集方式主要是洗提法;爬行类动物精子的采集方式主要是腹部按摩法;两栖类动物的精子的采集方法主要是腹部挤压法或精囊穿刺法。

1.2 附睾离体取精

在野外状态下采集濒死或死亡时间不长的雄性尸体内附睾精子,或者活体采精无法完成采精的动物也可以通过手术或致死后获取附睾精子。也可以从屠宰场动物尸体上分离、或宠物收容站的流浪宠物去势、或为了疫苗生产牺牲的非人灵长类动物中分离附睾及睾丸,并可以在 4℃ 保存,清洗处理后从附睾中分离精子。

2 冷冻前精液预处理

2.1 精子的优选

不同物种或同一物种不同个体间的精液品质有很大的差异。一般情况下,冷冻前精液质量越高,解冻后精子的活力会越好^[1]。为了获取高的活精子比例,常常会对所冷冻的精子进行优选处理,尤其是鲜精活力较低的精子,以提高精液质量。目前,常采用的优选方法有离心法和上游法。

2.1.1 离心法:普通的离心处理可以去除精液中的精浆和上皮细胞^[2],而密度梯度离心法,可以根据精子的密度将不同活力、形态的精子进行分离。这样能够有效地富集有活力、形态正常的精子,去除杂质细胞和死精子,同时分离出遗传物质不正常的精子^[3]。

2.1.2 上游法:用于分离出有活力和无活力的精子,增加精液中运动精子的百分率。同时,上游法可以去除精浆、无活力的精子、杂质细胞、无定形物质等,避免精子获能和发生顶体反应,有效的改善冷冻精子的运动特性、顶体状态和质膜完整性,提

高精液品质^[4]。相比离心去除精浆和死精子而言,上游法具有不造成精子亚致死性损伤的优点^[5]。

2.2 预冷处理

冷冻前进行预冷处理,其目的是保证精子有一段适应低温的过程,同时又能使渗透性防冻剂充分渗透进精子细胞内发挥作用,减少、甚至避免精子的冷休克损伤,进而起到抗冻保护作用。

目前,常采用的方法是水浴平衡法,一般从室温降到 4℃ 或 5℃,便于精子以改变质膜结构来适应低温环境。对防冻剂毒性不太敏感的精子,直接将防冻剂加入到稀释液中,保证防冻剂充分进入细胞内,达到保护精子免受损伤的作用;对防冻剂表现出毒性的精子,通常先用无防冻剂的冷冻稀释液稀释精液,并添加一定浓度的卵黄或脱脂奶,在低温条件下加入含防冻剂的冷冻液,并在低温环境中平衡一定的时间,以保证防冻剂充分进入细胞。

3 冷冻液和防冻剂

3.1 冷冻稀释液

主要包括两性离子、果糖、Tris 卵黄缓冲液、Tris-Tes 卵黄缓冲液、柠檬酸盐、TEST 柠檬酸盐卵黄缓冲液等。其主要作用是优化精子所处环境的渗透压与 pH 值,为精子提供能量,防止精子细胞内磷脂的流失并起着防冻剂的作用,防止细菌污染,去除高度稀释对精子的负面影响,给精子适应外界环境创造有利条件^[6]。

稀释液不仅是精子冷冻的介质,而且直接影响着精子的冷冻成活率。目前常用的冷冻稀释液有:灵长类的 TTE 和 TEST、马的 INRA 96、牛的 Triladyl ((R))、鸟类的 EK、鱼类的盐溶液等。

3.2 防冻剂

适当防冻剂的加入,可以有效减少精子冷冻过程中的冷冻损伤。常用的防冻剂主要包括两大类:渗透性防冻剂和非渗透性防冻剂。渗透性防冻剂是一类含有-OH 基的小分子化合物,如甘油、二甲基亚砷、乙二醇、丙二醇等,它们可以自由通过细胞膜;非渗透性防冻剂是一类不能透过细胞膜的大分子物质,如卵黄、糖类、脂蛋白等,主要增加细胞膜结构的稳定性和缓解冷冻损伤。不同物种精子的防冻剂选择应根据预实验、或逐个试验筛选其对该物种精子冷冻保护效果。

不同物种的精子对不同防冻剂毒害作用的承受能力和其渗透性也不同。如乙二醇对猕猴精子

细胞的渗透性强于其它渗透性防冻剂,可以应用到猕猴精子冷冻中^[7];DMSO 可以用于短尾猴精子冷冻保存中^[8],但不适于猕猴精子的冷冻保存^[9],这与精子细胞自身的毒性承受能力有关。

3.3 防冻剂的加入与去除方式

精子质膜对不同的渗透性防冻剂的通透性不同,在冷冻前添加防冻剂和解冻后去除防冻剂所产生的渗透压变化可能会造成细胞的损伤。因此,在添加和去除防冻剂时,尽量避免渗透压的剧烈变化。防冻剂的加入与去除大致分为两类:一步和多步加入去除法。多步加入或去除防冻剂,能够改善冷冻/解冻精子的功能^[10];在低温条件下加入防冻剂,可以提高冷冻/解冻精子的活力^[11]。对于那些对防冻剂敏感的精子,应该优先考虑多步法加入或去除防冻剂。

4 冷冻与解冻方法

在精子的冷冻过程中,冷冻速率会影响到精子细胞内外溶液的渗透压和 pH 的平衡,是深低温冷冻保存的一个决定性因素。理论上,过慢的冷冻速率会使细胞内外的渗透压平衡得到维持,但会导致细胞过度脱水,并过分升高胞内盐浓度而造成盐害;过快的冷冻速率会使细胞水分不能充分流出,从而导致巨大胞内冰晶的形成,进而造成细胞损伤。冷冻过程中,保证精子生存的一个理想状态应该是在冷冻速率的一个平衡点。

目前,根据降温速率和降温程序的不同将冷冻方法主要归结成五种类型:快速冷冻法、慢速冷冻法、玻璃化冷冻法、定向结冰冷冻法和干燥冷冻法。

4.1 快速冷冻法

将精液加到冷冻液中混匀,装入冷冻麦管或冷冻管后,不经过降温前期的冷平衡而放在液氮面上方的适当高度,利用液氮蒸汽降温至低于 -30°C 后,直接投入液氮中进行低温冷冻保存。这种方法在动物精子冷冻保存中应用的很少。

4.2 慢速冷冻法

慢速冷冻法是最常用的动物精子冷冻保存方法,也是中小型动物精子冷冻的首选技术。将精液加到冷冻液中混匀,装入冷冻麦管,然后用程序冷冻仪控制完成降温过程或利用液氮蒸汽直接降温,降温至低于 -30°C ,最终投入液氮中进行保存^[12]。

4.3 玻璃化冷冻法

该方法主要包括快速降温和快速复温两个过

程:快速降温是为了避免冷冻过程中细胞内冰晶的形成,快速复温可防止过冷玻璃态下重结晶的发生,从而减少冰晶对细胞的损伤^[13]。该方法冷却速率快,很多情况下需要增加渗透性防冻剂的浓度,需要选择对细胞毒性小的防冻剂,这是目前研究精子玻璃化冷冻的重点方向。

4.4 定向结冰精子冷冻法

定向结冰精子冷冻仪(MTG516)是以色列科学家专门为大容量冷冻精液而设计的,可以冷冻 2 mL、5 mL、8 mL 容量的精液,已成功运用在精液量大的野生动物上,如大象^[14],犀牛^[15],兔^[16]等以及二次重复冷冻牛的精子^[17]。该方法是将装有已预冷精液的中空玻璃冷冻管放入预先设置、平衡的低温舱内口,通过一定速率推动冷冻管进入冷冻仓,致使样品中水分形成有序的冰晶,降低冰晶对精子的损伤;解冻时,通过在冷冻管孔内外的温热水流动,迅速、均一地精液解冻,防止大容量精液的重结晶形成。

4.5 干燥冷冻法

该方法主要包括冷冻、干燥和保存三个过程,并已成功利用在小鼠精子冷冻保存中^[18]。在冷冻的过程中,细胞内形成冰晶是不可避免的,但只要不形成对细胞有损伤的大冰晶,是不会对精子造成损伤的;随后将冷冻好的精液转入真空冷冻干燥机中进行干燥处理,使精液中固态的玻璃化冰直接汽化成气态,进而使精子免受胞内冰晶所造成的损伤;在保存过程中,该技术不需要液氮或干冰,可在 4°C 长期保存,室温下可长途运输,因此节省了储存空间,减少了运输成本,更经济、更实用地保存种质细胞^[19]。虽然通过该技术所获得的精子都是死精子,且精子已经失去运动能力和受精能力,但所得精子染色体的完整率很高,可以借助于胞浆内单精子注射技术获取体外胚胎。

5 精液活力检测

5.1 结构完整性检测

5.1.1 质膜完整性:质膜完整性是评估冷冻精子质量和功能的一个重要指标。目前,用于检测质膜完整性的常用方法有曙红/苯胺黑染色法、低渗膨胀试验和荧光染色法。荧光染色法是当前使用最多的方法,常用的荧光染料大致可以分成两大类:染活精子的特异性荧光染料如 CFDA、SYBR-14 等,这类染料可以进入质膜完整的精子细胞内,是膜通透

性染料; 染死精子的特异性染料如 PI、Hoechst 33258、Yo-Pro-1、ethidium homodimer-1 等, 这类染料只能进入质膜不完整的精子, 是膜不通透性染料。通常情况下, 会将这两类联合使用, 其染色效果比用单独的染料染色好, 如 SYBR-14/PI 双染法^[20]、Hoechst 33342/PI 双染法^[21]等。

5.1.2 顶体完整性: 顶体反应是精子完成受精的前提条件, 而顶体的完整是保证顶体反应的必要条件。目前, 用于检测精子顶体状态的方法主要是荧光染色法, 即利用顶体素与花生凝集素(PNA)^[22]或豌豆凝集素(PSA)^[23]特异结合的特性, 用异硫氰酸荧光素(FITC)标记凝集素, 来检测精子的顶体完整性。

5.1.3 染色质完整性: 目前, 用于检测精子 DNA 完整性的方法主要是吖啶橙(AO)染色法, 其染色原理是染色质正常的精子能够保持其原有的双链结构, 与吖啶橙结合, 在荧光显微镜下呈现绿色; 染色质异常的精子, 其 DNA 会变性或解聚成单链结构, 与吖啶橙结合, 在荧光显微镜下呈现红色、桔红色或黄色^[24]。

5.1.4 线粒体活性: 线粒体的主要功能是为精子的运动提供能量, 因此通过检测精子的线粒体活性来预测精子的运动能力。目前, 一般采用荧光染色法来检测精子的线粒体活性, 常用的荧光染色法有 JC-1 染色法^[25]、Rhodamine 123 染色法^[24]和 DiOC6 (3)/PI 双染法^[26]。

5.2 功能检测

5.2.1 运动度: 运动度是指运动的精子占总精子数的百分比, 包括鲜精运动度、冷冻前精子运动度和复苏运动度。鲜精运动度反映了所取精子的品质; 冷冻前运动度反映了冷冻平衡方法的优劣和防冻剂的毒性; 复苏运动度反映了冷冻复苏后精子的运动情况, 用来衡量冷冻方法的优劣。目前, 常采用的运动度检测方法有光学显微镜直接计数法^[25]和计算机辅助精子分析(CASA)技术法^[22]。

5.2.2 受精能力: 体外间接评估精子受精能力的方法有半透明带结合试验^[27]和仓鼠裸卵穿透试验^[28]; 直接评估冷冻/复苏精子受精能力的方法有人工授精^[29]和体外受精^[30]。而利用冻精获得健康的新生个体是检测精子冷冻成功的“金”标准, 由于涉及受精、发育、妊娠管理等诸多因素, 往往利用冻精的囊胚发育率、或人工授精的怀孕率作为冻精受精能力的检测标准。

6 前景与展望

精子冷冻保存在保护濒危动物种质资源多样性、构建精子(基因)库、动物繁殖、不孕不育症治疗、避免非生殖季节原因无精子状况、以及增加受精研究的稳定性、便捷性等方面发挥着独特的作用。借助于辅助生殖技术, 冻精被越来越多用于生产体外或体内胚胎和缓解动物不育问题, 将来需要着重研究的方向主要体现在以下五个方面: (1) 个体化精子冷冻程序; (2) 化学成分明确的冷冻稀释液; (3) 低毒性的防冻剂; (4) 自动化精子冷冻仪; (5) 冷冻/解冻精子活力的准确预测

随着对生物多样性认识加深, 对物种的种质资源需求与保护越来越受关注, 无论是野生动物还是人们熟悉的驯化动物, 它们的种质细胞都需要相对安全的、不随时间变化的被保存起来, 以应对环境日益恶化对物种资源的威胁、缓解科学研究对现生动物的过度利用, 提高现有动物的利用率和利用价值。

参考文献:

- [1] Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing [J]. Hum Reprod 2000, 15(10): 2173 - 2179.
- [2] VandeVoort CA. High quality sperm for nonhuman primate ART: production and assessment [J]. Reprod Biol Endocrinol 2004, 2: 33 - 37.
- [3] Counsel M, Belling RP, Burton, Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim-up and density gradient centrifugation before cryopreservation [J]. J Assist Reprod Genet, 2004, 21(5): 137 - 142.
- [4] Chaveiro A., Santos P, Silva FM, et al. Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after swim-up treatment: a flow cytometric study [J]. Reprod Domest Anim, 2007, 42(1): 17 - 21.
- [5] Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime [J]. Hum Reprod, 1993, 8(7): 1087 - 1092.
- [6] Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results [J]. J Urol, 2003, 170(4 Pt 1): 1079 - 1084.
- [7] Agca, Y, Mullen S, Liu J, et al. Osmotic tolerance and membrane permeability characteristics of rhesus monkey (Macaca mulatta) spermatozoa [J]. Cryobiology 2005, 51(1): 1 - 14.
- [8] Feradis A H, Pawitri D, Suatha IK, et al. Cryopreservation of

- epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)* [J]. *J Med Primatol*, 2001, 30 (2): 100 – 106.
- [9] Si W, Zheng P, Li YH, et al. *Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (Macaca mulatta) sperm* [J]. *Am J Primatol* 2004 62 (4): p. 301 – 306.
- [10] Setyawan E, Cooper TG, Widiastih DA, et al. *Effects of cryoprotectant treatments on bovine sperm function and osmolyte content* [J]. *Asian J Androl* 2009 11 (5): 571 – 581.
- [11] Clarke G. N, Liu DY, Baker HW, et al. *Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant* [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2003 15 (7-8): 377 – 381.
- [12] Tao J, Du J, Kleinhans FW, et al. *The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa* [J]. *J Reprod Fertil*, 1995, 104 (2): 231 – 236.
- [13] Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. *Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success* [J]. *Reprod Biomed Online* 2003 6 (2): 191 – 200.
- [14] Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, et al. *Successful cryopreservation of Asian elephant (Elephas maximus) spermatozoa* [J]. *Anim Reprod Sci* 2009 115 (1-4): 255 – 266.
- [15] R, Goritz F, Saragusty J, et al. *First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros* [J]. *Theriogenology* 2009 71 (3): 393 – 399.
- [16] Si W, Hildebrandt TB, Reid C, et al. *The successful double cryopreservation of rabbit (Oryctolagus cuniculus) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant* [J]. *Theriogenology* 2006 65 (4): 788 – 798.
- [17] Saragusty J, Gacitua H, Zeron Y, et al. *Double freezing of bovine semen* [J]. *Anim Reprod Sci* 2009 115 (1-4): 10 – 17.
- [18] Kawase Y, Hani T, Kamada N, et al. *Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential* [J]. *Reproduction*, 2007, 133 (4): 841 – 846.
- [19] Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. *Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes* [J]. *Hum Reprod* 2008 23 (2): 233 – 239.
- [20] Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, et al. *Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes* [J]. *Cryobiology* 2009 58 (2): 181 – 189.
- [21] Yeste M, Lloyd RE, Badia E, et al. *Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro* [J]. *Anim Reprod Sci*, 2009 113 (1-4): 263 – 278.
- [22] Varisli O, Uguz C, Agca C, et al. *Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures* [J]. *Anim Reprod Sci* 2009 110 (3-4): 256 – 268.
- [23] Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, et al. *Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation* [J]. *Theriogenology* 2009 71 (9): 1425 – 1432.
- [24] Hu J. H, Li QW, Zan LS, et al. *The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing* [J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 117 (1-2): 11 – 17.
- [25] Sokolowska A, Garcia BM, Fernandez LG, et al. *Activated caspases are present in frozen-thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality* [J]. *Zygote* 2009: 1 – 9.
- [26] Castedo M, Ferri K, Roumier T, et al. *Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis* [J]. *J Immunol Methods* 2002 265 (1-2): 39 – 47.
- [27] Ozgur K, Patankar MS, Oehninger S, et al. *Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding* [J]. *Mol Hum Reprod* 1998 4 (4): 318 – 324.
- [28] Yanagimachi R. *Germ cell research: a personal perspective* [J]. *Biol Reprod* 2009 80 (2): 204 – 218.
- [29] O'Brien JK, Steinman KJ, Schmitt T, et al. *Semen collection, characterisation and artificial insemination in the beluga (Delphinapterus leucas) using liquid-stored spermatozoa* [J]. *Reprod Fertil Dev* 2008 20 (7): 770 – 783.
- [30] Yildiz C, Fleming C, Ottaviani P, et al. *Fresh and frozen-thawed sperm quality, nuclear DNA integrity, invitro fertility, embryo development, and live-born offspring of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mice* [J]. *Cryobiology* 2008 57 (2): 156 – 162.

修回日期) 2010-06-28