

论著·临床研究

人类精子不同冷冻保存方法的效果研究*

梁 齐, 黄卫东, 孙 健, 左亚军, 邵秀花
(新疆佳音医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **目的** 观察分析人类精子在不同冷冻方法下的保存和复苏效果, 为利用单精子卵细胞质内注射技术(ICSI)辅助治疗梗阻性无精子症不育患者提供帮助。**方法** 选取 2020 年 1 月 1 日至 12 月 31 日该院 91 例就诊患者, 正常精液标本 40 例, 睾丸穿刺取精液标本 51 例。将每份精液三等分, I 组使用普通冷冻管、II 组使用 0.25 mL 麦管、III 组使用超微量麦管进行冷冻。多组间比较采用方差分析, 其两两比较采用最小显著差异法(LSD 法), 冷冻前后采用配对 *t* 检验。**结果** 3 种载体冷冻复苏后精子总活力比例[I 组(35.68±13.65)%、II 组(38.03±12.08)%、III 组(40.13±12.03)%]与冷冻前[(72.70±18.14)%]比较, 均显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。在正常精液标本中, III 组冷冻复苏后精子总活力和前向运动精子比例较高, III 组复苏率[(56.07±11.60)%]高于 I 组[(49.05±12.82)%], 差异有统计学意义($P<0.05$); 睾丸穿刺取精液标本中, II 组和 III 组冷冻复苏后活动精子比例[(22.59±8.02)%、(24.47±8.61)%]高于 I 组[(17.77±9.63)%], 且 II 组和 III 组复苏率[(49.72±18.37)%、(52.96±17.55)%]均高于 I 组[(34.73±25.09)%], 差异有统计学意义($P<0.05$), 3 种载体间复苏率由高到低排序为 III 组>II 组>I 组。**结论** 3 种冷冻方法中超微量麦管最利于人类精子的冷冻保存, 无论是对于正常来源的精子还是睾丸切开显微取精手术获取的精子, 均表现出最佳保存效果。

[关键词] 冷冻方法; 精子冷冻保存; 冷冻复苏

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.07.008

中图法分类号:R711.6

文章编号:1009-5519(2025)07-1575-03

文献标识码:A

Effects of different freezing methods on cryopreservation of human sperm*

LIANG Qi, HUANG Weidong, SUN Jian, ZUO Yajun, SHAO Xiuhua
(Xinjiang Jiayin Hospital, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

[Abstract] **Objective** To observe and analyze the preservation and recovery effects of human sperm under different freezing methods, so as to provide help for the assisted treatment of obstructive azoospermia infertility patients with ICSI technology. **Methods** A total of 91 patients in the Jiayin Hospital from January to December 31 were selected, including 40 normal semen samples and 51 semen samples obtained by testicular puncture. Each portion of semen was divided into three equal parts. Group I was frozen using ordinary cryotubes, Group II was frozen using 0.25 mL straw tubes, and Group III was frozen using ultra-micro straw tubes. Analysis of variance was used for comparisons among multiple groups, the least significant difference method (LSD method) was used for pairwise comparisons, and paired *t*-tests were used before and after freezing. **Results** Compared with before freezing (72.7%), the total motility ratio of sperm after cryopreservation using three different carriers (Group I : 35.68%, Group II : 38.03%, Group III : 40.13%) was significantly reduced ($P<0.05$). In normal semen samples, the total sperm motility and proportion of forward moving sperm were higher in group III after freezing and thawing. The recovery rate of group III (56.07%) was higher than that of group III (49.05%), and the difference was significant ($P<0.05$); In the semen samples obtained by testicular puncture, the proportion of active sperm after frozen resuscitation in Group II and Group III (22.59%, 24.47%) was higher than that in Group I (17.77%), and the resuscitation rates in Group II and Group III (49.72%, 52.96%) were also higher than those in Group I (34.73%), with statistical significance ($P<0.05$). The resuscitation rates among the three carriers were ranked from high to low as Group III > Group II > Group I. **Conclusion** Among the three freezing methods, ultra-micro straws are most conducive to

* 基金项目:新疆维吾尔自治区卫生健康委员会青年医学科技人才专项科研项目(WJWY-201925)。

作者简介:梁齐(1980—), 本科, 副主任医师, 主要从事生殖医学及泌尿男科方面的研究。

网络首发 <https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250616.1854.036>

the cryopreservation of human sperm, showing the best preservation effect for both normal source sperm and sperm obtained through testicular incision and microscopic sperm retrieval surgery.

[Key words] Freezing method; Sperm cryopreservation; Cryop reservation

近年来,随着人们生活环境的改变及不良生活习惯等因素,导致不孕不育夫妇数量增加。世界卫生组织数据显示,全世界不孕不育的育龄夫妇约占 10%,因男性因素导致的不育症近半数^[1],其中无精子症患者病率为 10%~20%^[2],成为男性不育的重要因素。随着医疗技术水平的不断提高,人类辅助生殖技术快速发展^[3],梗阻性无精子症患者通过经皮睾丸精子抽吸术(TESA)可找到少量精子,新鲜或冻融的睾丸精子在卵胞浆内单精子显微注射技术(ICSI)辅助下可获得自己的后代,实现生育梦想^[4]。而精子冷冻技术为人类辅助生殖治疗提供了有力支撑,该技术的成熟与发展为患者保存精子以备后续辅助生殖治疗提供有利条件^[5]。将睾丸精子进行冷冻保存使梗阻性无精子症患者免受反复穿刺造成的损伤,也可保证女方取卵当日有可用的精子。研究表明,新鲜和冻融睾丸精子经 ICSI 后的受精率和流产率等方面差异均无统计学意义^[6-8],但常规冷冻下的冻融精子存活率低、活力差,效果并不理想^[4]。因此,探索复苏率更高的睾丸精子冷冻方法,为促进人类辅助生殖技术的发展和无精子症患者生育后代提供保障。本研究就人类精子冷冻保存的不同方法进行比较研究,采用普通冷冻管、冷冻麦管、超微量麦管对正常精液精子及睾丸取精精子进行冷冻,评估冷冻前后精子的存活率和复苏率的差异,并追踪随访结合 ICSI 后的妊娠结局,探索梗阻性无精子症患者的精子保存新方法,也为借助辅助生殖技术实现梗阻性无精子症患者的生育梦想提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料收集 选取 2020 年 1 月 1 日至 12 月 31 日本院就诊的 91 例患者作为研究对象,其中精液正常标本 40 例,均来自患者手淫取精获得的精子。精液指标符合以下条件:精子前向运动精子比例≥32%,精子总活力比例≥40%,精子浓度≥15×10⁶ mL⁻¹,精子总数≥39×10⁶ mL⁻¹。睾丸穿刺取精获得精子标本 51 例,均来自梗阻性无精子症患者。本研究经本院医学伦理委员会批准,签署知情同意书并通过伦理审查(批号:19-01-KY)。

1.1.2 主要载体和试剂 普通冷冻管(Corning, 美国),0.25 mL 冷冻麦管(CryoBio System, 法国)、超微量冷冻麦管(江苏泰利达);甘油(Sigma, 美国),Fasrun 冷冻保护剂组合(包含冷冻液、解冻液、培养液,江苏泰利达),G-MOPS plus(Vitrolife, 瑞典)^[9]。

1.1.3 梗阻性无精子症患者诊断标准 2 次精液标本,每次间隔 2 周以上,离心沉淀后均未见到精子,并且经诊断性睾丸活检可见精子。病理报告生精功能正常。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 精液浓度稀释调整到 3×10⁶ mL⁻¹~5×10⁶ mL⁻¹,并采用 Makler 板计数精子数目和活动精子数目,计算睾丸穿刺取精精子冷冻前活动率和精液正常精子前向运动精子比例及总活力。将每份精液三等分,分为 3 组,Ⅰ组使用普通冷冻管、Ⅱ组使用 0.25 mL 麦管、Ⅲ组使用超微量麦管,在液氮中至少冻存 24 h 后再解冻复苏,进行精子数目计数及活动精子数目计数并计算复苏率^[10]。

1.2.2 冷冻及复苏方法 使用普通冷冻管冷冻及复苏方法:将精液或睾丸组织标本悬液装入冷冻管中,等体积逐滴加入冷冻保护剂,充分混匀后,于液氮液面 5 cm 处熏蒸 10 min,后转入液氮液面 1 cm 处熏蒸 5 min,之后转入液氮中冷冻保存,解冻时于液氮罐中取出冷冻管,拧松瓶盖后,于 37℃水浴中孵育 10 min 后即可进行计数。

使用 0.25 mL 麦管及微量麦管冷冻及复苏方法:精液或睾丸组织悬液标本,按冷冻保护剂和精子悬液 2:1 的比例混匀,装入冷冻麦管后封口,在液氮 5 cm 处水平熏蒸 10 min,熏蒸结束后移入液氮中保存,复苏时取出麦管,擦掉管壁上的霜,37℃水浴复苏,剪去封口两端,将样本滴入复苏液中,于 37℃培养箱中至少孵育 30 min 后进行计数。

1.3 统计学处理 应用 SPSS22.0 统计软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用最小显著差异法(LSD 法),冷冻前后采用配对 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常精液精子冷冻复苏前后情况 对于正常精液精子,冷冻前精子总活力为(72.70±18.14)%,前向运动精子比例为(59.73±15.35)%。采用配对 *t* 检验比较冷冻前与冷冻复苏后精子的总活力和前向运动精子比例,结果得出Ⅰ组冷冻前后总活力差异有统计学意义(*t*=17.543, *P*<0.001),Ⅱ组冷冻前后总活力差异有统计学意义(*t*=16.129, *P*<0.001),Ⅲ组冷冻前后总活力差异有统计学意义(*t*=15.926, *P*<0.001);Ⅰ组冷冻前后前向运动精子比例差异有统计学意义(*t*=17.075, *P*<0.001),Ⅱ组冷冻前后前向运

动精子比例差异有统计学意义($t = 16.165, P < 0.001$),Ⅲ组冷冻前后前向运动精子比例差异有统计学意义($t = 16.443, P < 0.001$)。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组的复苏率组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),总活力与前向运动精子比例组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。Ⅲ组冷冻复苏后精子的总活力、前向运动精子比例均较高。精液冷冻后分析 3 种冷冻载体的复苏率,Ⅲ组的复苏率最高。Ⅲ组与Ⅰ组相比,复苏率高且差异有统计学意义($P < 0.05$),Ⅲ组比Ⅱ组复苏率高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 精液正常精子冷冻复苏后情况($\bar{x} \pm s, \%$)			
组别	总活力	前向运动精子比例	复苏率
Ⅰ组	35.68±13.65	25.03±10.32	49.05±12.82
Ⅱ组	38.03±12.08	27.38±9.36	52.56±10.02
Ⅲ组	40.13±12.03	29.11±11.49	56.07±11.60 ^a
F	1.608	2.370	4.099
P	0.205	0.098	0.019

注:与Ⅰ组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 睾丸取精液精子冷冻复苏情况 对于睾丸取精液精子,冷冻前活动精子比例为(42.19±12.37)%。冷冻前后活动精子比例明显下降,采用配对 t 检验比较冷冻前与冷冻复苏后精子的活动精子比例,结果得出Ⅰ组冷冻前后活动精子比例差异有统计学意义($t = 10.956, P < 0.001$),Ⅱ组冷冻前后活动精子比例差异有统计学意义($t = 10.874, P < 0.001$),Ⅲ组冷冻前后活动精子比例差异有统计学意义($t = 10.871, P < 0.001$)。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组活动精子比例和复苏率组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。Ⅱ组和Ⅲ组冷冻复苏后活动精子比例均显著高于Ⅰ组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而Ⅲ组活动精子比例与Ⅱ组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。Ⅲ组与Ⅱ组复苏率均显著高于Ⅰ组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而Ⅲ组复苏率与Ⅱ组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 睾丸取精精子冷冻复苏后情况($\bar{x} \pm s, \%$)		
组别	活动精子比例	复苏率
Ⅰ组	17.77±9.63	34.73±25.09
Ⅱ组	22.59±8.02 ^a	49.72±18.37 ^a
Ⅲ组	24.47±8.61 ^a	52.96±17.55 ^a
F	6.785	2.870
P	0.002	<0.001

注:与Ⅰ组比较,^a $P < 0.05$ 。

3 讨 论

人类精子冷冻技术的不断发展,为利用辅助生殖技术实现生育梦想创造希望。但目前常规的精液冷冻保存技术复苏回收率低,不适于微量精子冷冻,寻找合适的冷冻载体和方法是微量睾丸精子冷冻的研究重点^[11]。精子在冷冻保存过程中会损伤细胞的生

物学特性,影响精子在人类辅助生殖技术中受精的能力,因此,精子冷冻载体的正确选择对辅助生殖技术开展具有重要意义。

手术取精本身可获得的精子数量少,精子头部 DNA 稳定性差,细胞膜也未完全成熟^[12],精子冻融过程中受到温度和渗透压的影响,以及细胞冷冻后形成结晶,导致精子细胞、活动力及核酸等不同程度损伤,故常规冷冻效果不佳。本研究中,3 种冷冻载体的保存复苏效果比较表明,0.25 mL 麦管与超微量麦管冷冻效果相似,差异无统计学意义($P > 0.05$),冷冻后复苏率差异无统计学意义($P > 0.05$)。普通冷冻管的管壁厚,降温速率受影响大,而超微量麦管体积更小,降温速度更快,复苏后残留在管壁上的细胞更少,且成本低廉、操作简便、复苏率好、更适合睾丸取精患者。这部分患者精子珍贵且活动力较差,需要保证解冻后可获得实用量的精子^[13]。王乃辉等^[9]研究表明,0.25 mL 麦管冷冻效果与超微量麦管相似。因此,从成本及冷冻效果来看更推荐后者。本研究发现,虽然超微量麦管的冷冻效果优于传统的冷冻管,但复苏后 3 种冷冻载体的冷冻效果差异并不显著。本研究前期试验中发现,少、弱精子症患者精子浓度过低且活动力低,加入冷冻保护剂后,精液被稀释后浓度更低,再经过冷冻和复苏处理,复苏后精液情况变化较大,有时出现浓度偶见或活动力极低的情况,不利于准确计数和评估冷冻前后精子的存活率,在进行了 9 例实验后放弃这部分精液冷冻复苏实验。

本研究结果显示,采用超微量麦管冷冻稀少精子是较优选择,但该冷冻载体也存在一定程度的风险,解冻复苏后也会存在无精子可用或数量不足的可能。MARTIN 等^[14]报道睾丸精子和射精精子复苏失败的比例分别为 5.8%和 7.1%,在临床治疗中,仍有冷冻复苏后精子数量不足的病例发生。虽然目前国内外尚无公认有效的稀少精子冷冻方法,且冷冻技术发展也受到精子本身质量差异的影响^[15],但随着冷冻方法和载体的升级与改进,有望实现精子的高复苏率,提升可操作性,为梗阻性无精子症患者提供更优的生育保障治疗服务。

参考文献

[1] MARTIN R H. Cytogenetic determinants of male fertility [J]. Hum Reproduction Update, 2008, 14(4): 379-390.
[2] 贺勇凯,周青,高瑞松,等. 75 例无精子症患者病因分类及分析[J]. 中国医药科学, 2019, 9(2): 7-12.
[3] 郭启云,颜丹,刘颖,等. 体外受精胚胎移植患者焦虑、抑郁情绪与生育生命质量的相关性分析[J]. 中国实用护理杂志, 2017, 33(27): 2081-2086.
[4] 罗雪峰,朱文兵. 睾丸精子冷冻的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(7): 649-653. (下转第 1583 页)