

技术与方法

伐地那非预处理对精子冷冻效果的影响

卢克敏^{1,2}, 邹沙沙², 陈向锋^{2#}, 刘 强^{1#}

1. 上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海市生殖医学重点实验室, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院生殖医学中心, 上海市人类精子库, 上海市辅助生殖与优生重点实验室, 上海 200135

[摘要] **目的**·探索伐地那非预处理对精子冷冻复苏后活力的影响。**方法**·在上海市人类精子库随机收集 30 例捐献者的精液标本, 并将收集的每例精液平均分成 6 份, 1 份用于冷冻前指标测定, 其余 5 份分别用 0、0.4、4.0、40.0、400.0 $\mu\text{g/mL}$ 的伐地那非孵育 5 min。按精液与保护剂 2:1 的比例添加保护剂, 采用一步熏蒸法进行冷冻, 冷冻复苏后分别检测每份标本的前向运动精子、精子活力及正常精子形态等参数。**结果**·复苏后, 0、0.4、4.0、40.0、400.0 $\mu\text{g/mL}$ 伐地那非处理后的前向运动精子百分率分别为 $(41.47 \pm 9.80)\%$ 、 $(42.57 \pm 9.60)\%$ 、 $(47.77 \pm 8.55)\%$ 、 $(37.27 \pm 8.47)\%$ 、 $(26.37 \pm 6.99)\%$ 。与对照组 (0 $\mu\text{g/mL}$ 伐地那非组) 比较, 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 伐地那非处理后的精子复苏后活力有显著改善, 差异有统计学意义 ($P=0.034$)。**结论**·适当浓度的伐地那非预处理精液能提高精子冷冻复苏后的活力; 然而伐地那非浓度过大, 可能对精子有毒害作用。

[关键词] 伐地那非; 冷冻保存; 精子活力**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.10.024 **[中图分类号]** R698.2 **[文献标志码]** B

Effect of vardenafil pretreatment on the activity of post-thaw sperm

LU Ke-min^{1,2}, ZOU Sha-sha², CHEN Xiang-feng^{2#}, LIU Qiang^{1#}

1. Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine; Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Center for Reproduction Medicine, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Human Sperm Bank; Shanghai Key Laboratory for Assisted Reproduction and Reproductive Genetics, Shanghai 200135, China

[Abstract] **Objective**·To explore the effect of vardenafil pretreatment on the post-thaw sperm activity. **Methods**·Semen samples were randomly collected from 30 donors in Shanghai Human Sperm Bank. Then, each semen sample was aliquoted into six parts. One was immediately assayed for sperm activity without any treatment as the original control. The other five parts were incubated with vardenafil at 0, 0.4, 4.0, 40.0, and 400.0 $\mu\text{g/mL}$ respectively for five minutes. The protective agent was added according to the semen: protective agent ration (2:1), and the fumigation method was used for cryopreservation. After thawing, each specimen was examined for various parameters, including progressive motility, total motility and normal sperm morphology. **Results**·After thawing, the progressive sperm rates were $(41.47 \pm 9.80)\%$, $(42.57 \pm 9.60)\%$, $(47.77 \pm 8.55)\%$, $(37.27 \pm 8.47)\%$, and $(26.37 \pm 6.99)\%$ in the groups treated with 0, 0.4, 4.0, 40.0, and 400.0 $\mu\text{g/mL}$ of vardenafil, respectively. Compared to the control group (0 $\mu\text{g/mL}$ of vardenafil), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ of vardenafil could significantly improve the post-thaw sperm motility ($P=0.034$). **Conclusion**·Vardenafil pretreatment can improve the activity of the post-thaw sperm; however, it may be toxic to sperm at the high concentration.

[Key words] vardenafil; cryopreservation; sperm motility

精子冷冻在不孕症治疗中具有重要地位, 精液冷冻后的活力与人工授精的成功率关系密切^[1]。多年来人们一直在探索通过改变冷冻保护剂的配方和冷冻复苏方法来提高精子的冷冻效果, 而鲜有通过冷冻前处理精子来提高冷冻复苏率^[2]。在应用化学药物改善精液质量的研究方面, 对少弱精症的新鲜精液的研究报道较多, 而

对冷冻复温的研究甚少^[3]。研究^[4]表明, 磷酸二酯酶 (phosphodiesterase 5, PDE5) 抑制剂在体外能改善精子的活力。伐地那非是一种新型 PDE5 抑制剂, 常用于阴茎勃起功能障碍的治疗^[5]。本课题组就不同浓度伐地那非预处理精子对精子冷冻复苏后活力及顶体完整性的影响进行研究。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81501243, 81571488); 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (201440009); 上海交通大学医学院附属仁济医院种子基金 (RJZZ14-017) (National Natural Science Foundation of China, 81501243, 81571488; Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning, 201440009; Foundation of Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, RJZZ14-017)。

[作者简介] 卢克敏 (1988—), 男, 初级技师, 硕士生; 电子信箱: lukemin999@163.com。**[通信作者]** 刘 强, 电子信箱: qliu0122@shsmu.edu.cn。陈向锋, 电子信箱: allanbacon@163.com。# 为共同通信作者。

1 材料与方法

1.1 精液收集和准备

30 例精液标本来源于 2017 年 10 月至 2017 年 12 月
在上海市人类精子库捐精的体检者。年龄 20 ~ 30 岁, 平均 (25.6±3.4) 岁。取精液前禁欲 2 ~ 7 d。常规洗手液
洗手, 消毒外生殖器后手淫取精液于无菌杯内。待精液液
化后, 分析精子活力及前向运动精子百分率。将精子计数
>5×10⁷/mL、精子活力 >50% 者为入选对象。所有精子
捐献者了解本实验研究内容并签署了知情同意书。

1.2 伐地那非工作液的制备

称取伐地那非干粉 160 mg, 溶于 10 mL 生理盐水
中, 配置成浓度为 16 mg/mL 的母液。再采用逐级稀释
法, 按照 1:10 的稀释比例, 依次配制成浓度为 1.6、0.16、
0.016 mg/mL 的伐地那非工作液。

1.3 实验分组和方法

精液样本分为 5 组, 记为 G0、G1、G2、G3、G4。
每份精液样本分别抽取 487.5 μL, 分装在 5 支试管内,
分别加入 12.5 μL 生理盐水 (G0) 以及 12 μL 浓度为
0.016 mg/mL (G1, 终浓度为 0.4 μg/mL)、0.16 mg/mL
(G2, 终浓度为 4.0 μg/mL)、1.6 mg/mL (G3, 终浓度为
40.0 μg/mL)、16 mg/mL (G4, 终浓度为 400.0 μg/mL) 的
伐地那非生理盐水溶液。将各试管轻轻振荡后室温孵育 5
min。加入保护剂 (10670010F, ORIGIO, 丹麦), 并充分
混匀, 精液与保护剂的比例为 2:1。室温平衡 5 min 后装
入 1.0 mL 的冷冻管中, 直接置于 CRYOPLUS 1 型一步熏

蒸仪 (美国 Forma Scientific) 中, 完成冷冻后置于液氮中
保存。24 h 后将精液标本取出, 立即置于 37 ℃ 水浴锅中
复温 5 min。

按照世界卫生组织 (WHO) 出版的《人类精液
检验与处理实验室手册》(第 5 版)^[6] 进行精液常规分
析。在 Makler 计数板中加入 5 μL 完全液化的样本, 使用
WLJY9000 型伟力彩色精子质量分析系统进行精液常规计算
机辅助分析, 计算冷冻后各组的精子活力及前向运动精子
百分率。精子形态学染色采用改良巴氏染色法。采用人工
分析方法, 显微镜下计数 200 条精子, 计算其形态正常率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 定量数据以
 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用配对 *t* 检验。*P*<0.05 表明差异
具有统计学意义。

2 结果

与冷冻前精液相比, 前向运动精子百分率、活力、正
常形态率在冷冻后均有不同程度的下降, 差异均有统计
学意义 (*P*<0.05) (表 1)。进一步比较冷冻后各组前向
运动精子百分率、活力、正常形态率的差异。其中, G3
组、G4 组分别与 G0 组比较, 上述各参数下降明显, 差
异均有统计学意义 (*P*<0.05); G1 组各参数均高于 G0
组, 但 G1 组与 G0 组比较, 各参数差异无统计学意义
(*P*>0.05); G2 组各参数高于 G0、G1 组, 差异有统计学
意义 (*P*<0.05)。可见, 唯有 G2 组前向运动精子、精子
活力及正常形态精子的百分率均较 G0 组明显提高。

表 1 冷冻前后 5 组精子活力及正常形态率的比较 (*n*=30)
Tab 1 Comparison of sperm motility and morphology before and after cryopreservation (*n*=30)

组别	前向运动精子百分率			活力			正常形态率		
	($\bar{x} \pm s$)/%	<i>P</i> 值 ^①	<i>P</i> 值 ^②	($\bar{x} \pm s$)/%	<i>P</i> 值 ^①	<i>P</i> 值 ^②	($\bar{x} \pm s$)/%	<i>P</i> 值 ^①	<i>P</i> 值 ^②
冷冻前	69.70±7.95	—	—	82.13±7.21	—	—	37.65±6.27	—	—
G0	41.47±9.80	—	0.000	53.13±13.07	—	0.000	14.29±2.30	—	0.000
G1	42.57±9.60	0.182	0.000	54.60±11.90	0.185	0.000	15.01±2.18	0.251	0.000
G2	47.77±8.55	0.035	0.002	60.30±12.48	0.034	0.000	18.32±2.70	0.049	0.000
G3	37.27±8.47	0.021	0.000	47.47±10.22	0.027	0.000	12.01±2.18	0.068	0.000
G4	26.37±6.99	0.006	0.000	32.53±10.21	0.002	0.000	11.66±2.77	0.032	0.000

注: ① G1、G2、G3、G4 组分别与 G0 组比较; ② G0、G1、G2、G3、G4 组分别与冷冻前比较。

3 讨论

精子冻融技术是精子库的核心技术, 精子的冻后活

力是衡量精子冷冻效果的重要指标^[7]。人类精子的冷冻保
存, 包括精子与冷冻保护剂的混合、降温冷冻、超低温储
存和解冻复温等过程。这些过程中的物理化学效应直接

作用于精子, 影响精子的结构和功能^[8]。冷冻保存中的降温—复温过程形成的冰晶能造成精子机械损伤, 降低精子膜流动性, 破坏细胞膜的完整性^[9]。产生的超氧化物可导致脂质过氧化、DNA 碎片的形成和细胞骨架改变^[10]。此外, 冷冻过程还损伤精子内代谢酶的活性, 影响复苏后精子的活力和功能。研究者^[11]不断采用新的冷冻方法或者改良冷冻保护剂的配方, 以提高冷冻复苏率。蛋白、糖类、胆固醇等常被添加到保护剂中, 通过维持保护剂的渗透压、维持质膜流动性, 提高冷冻复苏率^[12]。

PDE5 主要集中分布于精子鞭毛。伐地那非能够抑制 PDE5 水解环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP), 升高细胞内 cGMP 的浓度。cGMP 能够促进精子新陈代谢, 提高精子的活力^[13]。cGMP 也能够激活环核苷酸门控通道增加钙离子内流, 而钙离子作为一种重要的第二信使, 在精子运动、成熟及获能等一系列过程中均起着非常重要的作用^[14]。另外, 伐地那非能部分地作用于 PDE1 和 PDE4, 提高细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的水平^[15]。细胞内 cAMP 含量的增加能激活依赖 cAMP 的蛋白激酶, 增加细胞的各种代谢率, 精子则表现为活力增强, 呼吸率、糖耗量提高, 在一定条件下可促使精子获能和顶体反应的发生。cAMP 在精子的代谢中起促进作用, 可提高精子的呼吸率、糖酵解^[14]。用 PDE 抑制剂孵育精子, 精子内 cAMP 的含量

在 1 min 内上升, 最大呼吸率在数分钟后上升, 同时细胞内的 ATP 含量随之下降, 这说明 cAMP 能够促进精子代谢^[4]。cAMP 能通过激活 cAMP 蛋白激酶和增强呼吸功能, 增加精子的活力。冷冻和复苏过程会损伤精子内的代谢酶。伐地那非预处理精液能使冷冻前细胞内积累充分的 cGMP 和 cAMP, 提高细胞内的 cGMP 和 cAMP 水平, 从而能在水解 ATP 酶活性低的情况下维持精子活力。

本研究发现, 当伐地那非的孵育浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与空白对照组相比, 复苏后精子活力水平显著提高; 当伐地那非的孵育浓度为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 时, 复苏后精子的活力有所提高, 但是精子活力提高的幅度没有 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时大; 而当伐地那非的孵育浓度为 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 400.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与空白对照组相比, 复苏后精子的活力反而降低。这种情况的出现, 可能是由于当伐地那非浓度较低时, 其对精子的作用有限, 精子细胞内积累的 cGMP 和 cAMP 水平较低; 而伐地那非浓度过大时, 其对精子的刺激作用虽较强, 但会增加冷冻之前精子生命物质的代谢消耗, 影响精子复苏后的活力, 因而冷冻效果较差。

综上所述, 冷冻前以适当浓度的伐地那非与精子共孵育, 能够提高冷冻后精子的活力。但伐地那非对精子的顶体反应率和受精能力是否有影响, 对子代是否有毒性作用, 仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李媛, 冯怀亮, 陈子江, 等. 精子的冷冻保存 [M]// 李媛, 人类辅助生殖实验技术. 北京: 科学出版社, 2008: 182-190.
- [2] 刘勇, 肖玉芳, 赵东, 等. 人类精液一步熏蒸法冻融的实验研究 [J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(3): 227-230.
- [3] Archer SL, Roudebush WE. Enhancement of sperm motility using pentoxifylline and platelet-activating factor [M]// White-Cooper H. Spermatogenesis. New York: Humana Press, 2013: 241-245.
- [4] Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, et al. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity [J]. Asian J Androl, 2008, 10(1): 115-133.
- [5] Francis SH, Morris GZ, Corbin JD. Molecular mechanisms that could contribute to prolonged effectiveness of PDE5 inhibitors to improve erectile function [J]. Int J Impot Res, 2008, 20(4): 333-342.
- [6] World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [M]. 5th ed. Switzerland: WHO, 2010: 7-106.
- [7] Nijs M, Ombelet W. Cryopreservation of human sperm [J]. Hum Fertil (Camb), 2001, 4: 158-163.
- [8] 王尚乾, 王巍, 张炜. 人类精子冷冻损伤及保护的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(3): 262-265.
- [9] Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model [J]. J Exp Zool, 1993, 265(4): 432-437.
- [10] Tatone C, Di Emidio G, Vento M, et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells [J]. Gynecol Endocrinol, 2010, 26(8): 563-567.
- [11] Woods EJ, Benson JD, Agca Y, et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues [J]. Cryobiology, 2004, 48(2): 146-156.
- [12] 朱杰, 吴丽敏, 金仁桃, 等. 不同浓度的蔗糖溶液快速冻存人类精子的实验研究 [J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(11): 1009-1013.
- [13] Cisneros MA, Sánchez DP. cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation [J]. FEBS Lett, 2012, 586(2): 149-153.
- [14] 王勇, 桂耀庭. 钙离子通道在精子运动中的作用及其临床意义 [J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(9): 878-881.
- [15] 卢克敏, 卢慧, 李铮. PDE5 抑制剂对精子活力及受精功能影响的研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2012, 32(8): 1010-1013.

[收稿日期] 2018-03-12

[本文编辑] 崔黎明

