

# 冷冻人精子的染色体畸变分析

# Analysis on Chromosome Aberration of Cryopreservative Human Spermatozoa

蔡 敏<sup>1</sup>/厉广坤<sup>1</sup>/李蜀婧<sup>2</sup>

(1. 重庆市人口与计划生育科学研究院, 重庆 400020; 2. 中国人民解放军第三军医大学检验系, 重庆 400038)

CAI Min<sup>1</sup>, LI Guang-kun<sup>1</sup>, LI Shu-jing<sup>2</sup>

(1. Institute Of Chongqing National Population And Family Planning Sciene, Chongqing 400020, China; 2. Laboratory Department of The Third Military Medical School, PLA. Chongqing 400038, China)

**【摘要】**背景与目的: 人精液冷冻是辅助生殖技术的重要环节。自国家批准设立人类精子库, 冷冻精子在辅助生殖中大量应用, 对冷冻保存后人精子染色体的畸变研究就更加重视。本文就冷冻保护剂(Cryoprotective mediem, CPM)对人精子染色体畸变进行了分析。材料与方法: 分为4个冷冻保护剂组。I组: 甘油-卵黄柠檬酸型(G-Y-C); II组: 甘油-蜂蜜型(G-H); III组: 甘油-HEPES-HTY型(G-H-H); IV组: 甘油-Tyrede型(G-T)。将加入CPM的人精子采用缓冻法处理, 于冻后半年取出, 以37℃水浴复温后作人精子染色体畸变分析。结果: 4组CPM的精子染色体断裂率和畸变率均没有显著提高( $P > 0.05$ )。结论: 这4种CPM在临床上应用是可靠的。

**【关键词】**精子; 冷冻保护剂; 精子染色体

中图分类号: Q343

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)01-0022-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: Human semen cryopreservation is an important link of assisted reproductive techniques. After human sperm storeroom was approved by the government, human cryopreservative spermatozoa was widely used in assisted reproductive techniques. It has become more important to study on chromosome aberration of human cryopreservative spermatozoa. In this report, we analyze the chromosome aberration of human cryopreservative spermatozoa brought by CPM. MATERIAL AND METHODS: Firstly, we classified the CPM into four groups. First group: glycerol-egg yolk-sodium citrate(G-Y-C); second group: glycerol-honey(G-H); third group: glycerol-HEPES-hty(G-H-H); fourth group: glycerol-tyrede(T-G). Secondly, the mixture of spermatozoa and CPM were done with slow freezing method. Finally, after half a year, we analyzed the human chromosome aberration. We took it out to come back to normal temperature in 37℃ water. RESULTS: Rate of chromosomal breakage and rate of aberration had not striking increased among the four groups. CONCLUSION: The four groups, sacceded with CPM are trust able in clinical application.

**【KEY WORDS】** spermatozoa; cryopreservative medium(CPM); spermatozoa chromosome

人类从发现低温对精子的保存作用到使用冷冻精液作人工授精, 中间历经几百年, 仅对人类精液的冻贮研究就历时200年。其中成功与否的首要条件是人精子超低温冻贮, 而冷冻保护剂(Cryoprotective medium, CPM)的选择, 是人精子超低温冻贮成功与否的关键。

自Polge等<sup>[1]</sup>1949年采用甘油作精液的冷冻保护剂始, 人类对CPM的研究已有半个世纪<sup>[2]</sup>。经过反复筛

选, 逐渐形成眼下常用的三大类型冷冻保护剂, 即单一甘油型、甘油复合型、无甘油型。其中使用最广泛的是甘油复合型。

科技发展和社会进步, 尤其环境保护意识增强, 社会对冷冻精液的质量要求越来越高, 希望它既能治疗不孕症的生育问题, 又能保证生育的后代健康聪明。正是基于这一出发点, 本研究通过对目前我国普遍使用的几

收稿日期: 2004-04-08; 修订日期: 2004-06-30

基金项目: 重庆市科委重点项目(No. 20030292)

作者简介: 蔡敏(1958-), 女, 江苏省扬州人, 主任医师, 研究方向: 人类生殖细胞与早期胚胎遗传学。

种 CPM 进行人精子染色体畸变分析,就这几种 CPM 的可靠性进行评估,从一定层面上检测精液冷冻技术的科学性、可靠性,为人类精液冷冻技术的广泛应用,为供精人工授精更广泛应用于临床,提供实证依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人精液取自健康的青壮年自愿者,近期无致畸因素接触史,已生育正常后代,年龄在 28~35 周岁。鼠卵取自 6~8 周龄雌性金黄地鼠。

**1.2 实验分组** 按不同的保护剂分组。I 组:甘油-卵黄柠檬酸型(G-T-C); II 组:甘油-蜂蜜型(G-H); III 组:甘油-HEPES-HTY 型(G-H-H); IV 组:甘油-改良 Tyrede 型(G-T)。每组在作实验时同时设一未加保护剂和未冻的正常对照组。

**1.3 实验方法** 将加入保护剂的精液分装于 1 ml 冷冻管内,采用缓冻法降温。冻贮精液于冻后 6 月取出,37℃水浴,复温后作精子染色体分析。人精子染色体制备按我室在黄天华方法基础上改进的方法制备<sup>[2]</sup>。

**1.4 分析标准** 参照黄天华等精子染色体畸变分析方法<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

**2.1 各冷冻保护剂冷冻前后精子染色体核型分析** I 组:G-Y-C 型,共分析 152 套精子染色体,其中数

目畸变的有 6 套(3.95%),均为亚单倍体;结构畸变有 7 次(4.60%),畸变类型主要为染色体断裂、染色单体断裂和单体互换(表 1)。与冻前正常对照组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。

II 组:G-H 型,共分析 132 套精子染色体,其中数目畸变的 5 套(3.12%),4 套为亚单倍体,1 套为超单倍体;结构畸变 6 次(4.60%),畸变类型为无着丝粒断片、染色单体断裂和单体互换(表 2)。与正常对照组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )

III 组:G-H-H 型,共分析 160 套人精子染色体,其中数目畸变的 7 套(4.38%),多为亚单倍体;结构畸变有 7 次(4.30%),畸变类型主要为染色单体断裂、环状染色体、染色单体断裂和单体互换(表 3)。与正常对照组比较无明显增高( $P > 0.05$ )

IV 组:G-T 型,共分析 140 套人精子染色体,其中数目畸变 3 套(2.10%),均为亚单倍体;结构畸变有 5 次(4.10%),畸变类型为染色单体断裂、无着丝粒断片和染色单体互换(表 4)。与正常对照组进行比较,无统计学差异( $P > 0.05$ )。

**2.2 正常对照组与 4 组冷冻保护剂人精子染色体畸变研究** 在精子染色体畸变中,亚单倍体往往由于技术上的原因所致。鉴此,单就断裂率和结构畸变率作了一个组间比较,结果无差异(表 5)。

表 1 正常对照组与 G-Y-C 组人精子染色体核型分析

Table 1 Comparative on chromosomal karyotype of human spermatozoa between G-Y-C group's and normal group

Group	Analysis of the sperm chromosomal karyotype	Abrration		The propotion of sex chromosome X: Y	Rate of aberration ( $\times 10^{-2}$ )
		Number	Structure		
The normal	160	4	6	80:80	6.25
G-Y-C group	152	6	7	77:75	8.55

表 2 正常对照组与 G-H 组人精子染色体核型分析

Table 2 Comparative on chromosomal karyotype of human spermatozoa between G-H group's and normal group

Group	Analysis of the sperm chromosomal karyotype	Abrration		The propotion of sex chromosome X: Y	Rate of aberration ( $\times 10^{-2}$ )
		Number	Structure		
The normal	300	8	13	151:149	7.00
G-H-C group	132	5	6	67:65	8.33

表 3 正常对照组与 G-H-H 组人精子染色体核型分析

Table 3 Comparative on chromosomal karyotype of human spermatozoa between G-H-H group's and normal group

Group	Analysis of the sperm chromosomal karyotype	Abrration		The propotion of sex chromosome X: Y	Rate of aberration ( $\times 10^{-2}$ )
		Number	Structure		
The normal	162	4	6	81:81	6.17
G-H-H group	160	7	7	81:79	8.75

表 4 正常对照组与 G-T 组人精子染色体核型分析

Table 4 Comparative on chromosomal karyotype of human spermatozoa between G-T group's and normal group

Group	Analysis of the sperm chromosomal karyotype	Abrration		The propotion of sex chromosome X: Y	Rate of aberration ( $\times 10^{-2}$ )
		Number	Structure		
The normal	203	9	2	105:98	7.00
G-T group	140	5	4	75:65	8.33



表 5 正常对照组与四组冷冻保护剂人精子染色体畸变分析

Table 5 Comparative on chromosomal aberrations of human spermatozoa between the four group, sacceded with CPM and normal group

Group	Analysis of the sperm chromosomal karyotype	Rate of breakage ( $\times 10^{-2}$ )	Rate of structure abrriation ( $\times 10^{-2}$ )
The normal	825	4.12(34)	3.27(27)
G-Y-C group	152	5.26(8)	4.60(7)
G-H group	132	5.30(7)	4.55(6)
G-H-H group	160	6.25(10)	4.38(7)
G-T group	140	3.57(5)	2.85(4)

### 3 讨 论

人类精液冷冻保护剂在人精子冷冻 - 复温过程中起着关键性的作用。如果在没有 CPM 的情况下直接将精液放入液氮中, 精子复苏后存活率及活率均很低, 超微结构损害明显<sup>[4]</sup>, 因此加入适当的 CPM 可以起保护作用, 使精子及遗传物质少受损害。Karabinus 等<sup>[5]</sup>分别用蛋黄 - 柠檬酸盐及牛奶作为 CPM 对牛精子进行冷冻保存, 发现两种 CPM 对复苏后精子染色质结构损害有差异, 蛋黄 - 柠檬酸盐能更好地保护精子染色质结构。近年来随着人们对环境问题的日愈重视, 不同的 CPM 是否造成人精子染色体畸变、诱发基因突变、导致出生婴儿的畸变率比自然受孕出生的婴儿高? 这些问题不弄清楚, 直接影响冻精在临床上的应用前景。本文就现在常用的 4 种 CPM 作精子染色体畸变分析, 实验结果显示: 冷冻后, 精子染色体断裂率和畸变率均没有显著

增高 ( $P > 0.05$ )。与 Okada 和 Martim 的报道一致<sup>[6,7]</sup>, 这说明 CPM 在临床上应用是可靠的。

### 参考文献:

- [1] Polge G, Smith AU, Parkes AJ. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures[J]. *Nature London*, 1949, 164: 666 - 669.
- [2] 黄天华, 高晓平, 漆 著, 等. 人精子染色体研究: 一种稳定的人精子染色体制备技术 [J]. *遗传与疾病*, 1987, 4: 174 - 176.
- [3] 黄天华, 黄建民, 蔡 敏. 9 例正常男性 536 个精子染色体核型分析[J]. *癌变·畸变·突变*, 1995, 7(1): 15 - 19.
- [4] 汤召兵, 陈在贤. 甘油冷冻保护剂及降温速度对人精子功能及染色体的影响[J]. *生殖与避孕*, 2000, 20(6): 338 - 341.
- [5] Karabinus DS, Evenson DP, Kaproth MT, et al. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull spe [J]. *J Dairy Sei*, 1991, 74(11): 3 836 - 3 848.
- [6] Okada S, Suzumori K, Yagami Y. Cytogenetic effects of cryopreservation on human sperm: assessment using an improved method for analyzing human sperm chromosomes [J]. *J Obstet Gynecol*, 1995, 21: 641 - 647.
- [7] Martin RH, Ko E, Rademaker A, et al. Effect of cryopresrvation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm[J]. *Mol Reprod Dev*, 1991, 30: 159.

(上接第 21 页)

- [9] Ogawa Y, Yoshida H. Klinefelter syndrome[J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(2): 327 - 332.
- [10] Abdelmoula NB, Amouri A, Portnoi MF, et al. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization assessment of sex-chromosome mosaicism in Klinefelter's syndrome[J]. *Ann Genet*, 2004, 47(2): 163 - 175.
- [11] Kent-First M. The Y chromosome and its role in testis differentiation and spermatogenesis[J]. *Semin Reprod Med*, 2000, 18(1): 67 - 80.
- [12] 程 烽, 张宝珍, 朱忠勇. 507 例男性不育症患者细胞遗传学分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2001, 9(3): 38 - 39.
- [13] Jian-Hong Li, Tian-Hua Huang, Xue-Wu Jiang, et al. 46, XX male sex reversal syndrome[J]. *Asian J Androl*, 2004, 6: 165 - 167.
- [14] Tiepolol, Zufardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the Y

chromosome in man[J]. *Hum Genet*, 1976, 34: 119 - 124.

- [15] Vogt PH, Eddmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11[J]. *Hum Mol Gene*, 1996, 5: 933 - 943.
- [16] Kent-First M, Mualen A, Schultz J, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53: 27 - 41.
- [17] Lawrence C, Layman. Genes for causing male infertility [J]. *Reproduction & Contraception*, 2002, 13(4): 193.
- [18] 张咸宁, 胡志红, 曹凤根, 等. 无精症、少精症患者中 AZF 缺失的检测[J]. *生殖与避孕*, 2002, 22(6): 342 - 344.
- [19] Sargin CF, Berker-Karauzum S, Manguoglu E, et al. AZF microdeletions on the Y chromosome of infertile men from Turkey[J]. *Ann Genet*, 2004, 47(1): 61 - 68.