

## 异柠檬酸在精子冻融中保护作用的初探

赵 凯<sup>1</sup>, 陈 伟<sup>2</sup>, 徐爱明<sup>1</sup>, 张建中<sup>1</sup>, 华艺博<sup>1</sup>, 王增军<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学附属南京医院泌尿外科, 江苏 南京 210006)

**[摘要]** 目的:探讨异柠檬酸在精子冻融中的保护作用和机制。方法:选取 16 例健康生育男性的精液样本,分析精液常规参数后,将每份精液 1 式 5 份,1:1 加入冷冻保护剂后混匀,不含异柠檬酸的为阴性对照组,实验组分别添加 1.25、2.50、3.75、5.00 mmol/L 浓度的异柠檬酸,冷冻复苏后进行精液常规分析。同时另选取 9 例健康生育男性的精液样本,采用荧光染料 5,5',6,6'-四氯-1 和 1',3,3',3'-四乙基苯并咪唑基羰化青碘(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide,JC-1) 单标法检测复苏后精子细胞的线粒体膜电位。结果:复苏后 G3 组前向运动精子百分率(PR)升高( $P < 0.01$ ),G2 组 PR 升高( $P < 0.05$ ),G3 组精子浓度上升( $P < 0.05$ );G3 组精子复苏后线粒体膜电位较对照组增大( $P < 0.05$ )。结论:精液冷冻保护剂中添加适宜浓度的异柠檬酸可以保护冷冻复苏后精子线粒体功能,提高复苏后精子活力和浓度。

**[关键词]** 异柠檬酸;前向运动精子;线粒体膜电位;精液;冷冻保护剂

**[中图分类号]** R392.69

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)02-165-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170206

## Preliminary study on the protective effect of isocitric acid in sperm cryopreservation

Zhao Kai<sup>1</sup>, Chen Wei<sup>2</sup>, Xu Aiming<sup>1</sup>, Zhang Jianzhong<sup>1</sup>, Hua Yibo<sup>1</sup>, Wang Zengjun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Urology, Nanjing First Hospital, NJMU, Nanjing 210006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the potential protective effects and mechanism of isocitric acid in post-thawing sperm. **Methods:** After routine semen analysis, semen samples from 16 fertile males were selected. Every sample was equally divided into five groups. One group was mixed with routine protectant as negative control, and the other groups were mixed with modified protectant containing different concentration of isocitric acid. After and before thawing, the sperm samples were subjected to CASA for analysis and flow cytometry for mitochondrial transmembrane potential, respectively. **Results:** The percentage of forward movement sperm in G2 and G3 group was higher than that of the control group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). Sperm concentration of G3 group also increased ( $P < 0.05$ ). The mitochondrial membrane potential in the G3 group was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Adding a certain concentration of citric acid in the cryoprotectant can reduce the damage of the mitochondria during the freezing and thawing.

**[Key words]** isocitric acid; sperm forward motility; mitochondrial transmembrane potential; sperm; cryoprotectant

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 165-168]

目前全世界有超过 7 000 万对夫妇正受到不孕不育的影响,其中男性因素占到一半以上<sup>[1]</sup>。精子冷冻保存技术的发展使精子细胞能在超低温环境中得到稳定保存,为患有少弱精症及需要进行放疗的患者保存生育力提供了一种重要的方法<sup>[2]</sup>。冷冻

保护剂配制的好坏直接关系到复苏后精液的质量,是影响人工授精成功率的主要因素之一<sup>[3]</sup>。甘油-卵黄冷冻剂是应用广泛的精子冷冻保护剂,由于其配制方便和稳定性高,被世界各地的生殖中心所采用。目前保护剂研究的热点主要是在现有基础上添加辅助成分提高冷冻后精子的复苏率、活性等指标<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究中发现冻融后精子中异柠檬酸的减少可能与其活力下降相关<sup>[5]</sup>。在现有保护剂中添加适量异柠檬酸,通过对冻融前后精子的动力学相关参数和线粒体功能检测,探讨其在精子冷冻保护中

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81270685, 81402104)

\*通信作者(Corresponding author), Email: zengjunwang@njmu.edu.cn

的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

25 份精液标本分别来源于 2015 年 9—11 月南京医科大学第一附属医院人类精子库的 25 名供精志愿者,年龄( $23.6 \pm 2.4$ )岁,身体健康,无家族遗传病史,无泌尿系统外伤史,体格检查睾丸、附睾、输精管均正常。本次研究由南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准,并获得志愿者知情同意。禁欲 3~5 d,通过手淫法收集精液标本置于特定无菌容器内,对本标本进行保温处理,在精液液化后采用计算机辅助精液分析仪 CASA 对精子常规参数进行测定。根据 WHO 制定的《人类精液检查与处理实验室手册》(5 版)选择入组精液标准:体积 $\geq 1.5$  mL, pH $\geq 7.2$ ,前向运动精子(PR) $\geq 32\%$ ,精子浓度 $\geq 15 \times 10^6$  个/mL,总活力(PR+NP) $\geq 40\%$ 。精子冷冻保护剂(WHO 推荐的甘油-卵黄-柠檬酸盐保护剂)、异柠檬酸三钠盐(Sigma-Aldrich 公司,美国),精子培养基(BWW)medium(GenMed Scientifics 公司,美国),Percoll gradient 分离液(GE Healthcare, Piscataway 公司,美国),JC-1 染料(Sigma-Aldrich 公司,美国),计算机辅助精液分析系统 CASA (IVOS, Hamilton-Thorn Research 公司,美国),精子计数仪(Markler 公司,以色列),流式细胞仪(BD Biosciences 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 精子冷冻复苏程序

待精液完全液化后,取少量的精液通过 CASA 测定精子的活力和密度等参数后,将含不同浓度异柠檬酸的冷冻保护剂按 1:1 的体积缓缓加入精液并置于冻存管中,轻轻颠倒混匀,平衡后转移到程序降温仪,由室温 20℃逐渐降温至-80℃,大约持续 40 min 后迅速移至液氮中保存。1 周后,将冻存管取出立即放入 37℃预热水浴锅中,复苏 7 min 后取出。

#### 1.2.2 实验分组

16 份用于精液常规分析的样本,每份精液均等分为 5 份。不加入异柠檬酸的作为阴性对照组。根据预实验的结果,选取 1.25~5.00 mmol/L 4 种浓度进行研究。G1、G2、G3、G4 组中分别向精子冷冻保护剂中加入浓度为 1.25、2.50、3.75、5.00 mmol/L 的异柠檬酸作为实验组,经精子冷冻复苏程序后进行精液常规分析。根据实验结果选择适宜浓度,并以此浓度异柠檬酸处理另外 9 例健康生育男性精液样本作为实验组,再进行精子线粒体膜电位检测,进一步研

究加药前后线粒体功能的变化。

#### 1.2.3 精子参数测定和分析

取各组复苏后的精液,用移液器吸取 10  $\mu$ L 充分混匀的精液,加入到 Markler 计数板,测定各组复苏后的精液常规参数,实验重复 3 次以上。

#### 1.2.4 线粒体膜电位的测定

取复苏后实验组和对照组的精液通过双层(80%和 40%)非连续性 Percoll 梯度离心法分离,此时各组精子活力达到 80%,添加 JC-1 染料使得终浓度为 10  $\mu$ g/mL,避光 37℃孵育 20 min 后 PBS 洗 2 遍。将悬液通过流式细胞仪检测 10 000 个细胞在 488 nm 的激发波长下的平均荧光强度值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析,数据以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各实验组和对照组比较采用随机区组设计的方差分析,实验组和对照组线粒体膜电势比较采用配对 *t* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 复苏后各组精子前向运动比率比较

前向运动精子的比例 G3 组[(47.6  $\pm$  8.0)%]与 G2 组 [(43.6  $\pm$  7.9)%] 均高于对照组 [(40.9  $\pm$  7.6)%],G1 组 [(39.1  $\pm$  9.7)%]、G4 组 [(38.3  $\pm$  9.9)%]略低于对照组[(40.9  $\pm$  7.6)%],但与对照组之间的差异没有统计学意义(图 1)。

### 2.2 复苏后各组精子浓度比较

G3 组精子浓度[(45.8  $\pm$  7.7) $\times 10^6$  个/mL]较对照组 [(41.7  $\pm$  7.6) $\times 10^6$  个/mL] 明显升高 ( $P < 0.05$ )。G2 组[(42.8  $\pm$  9.1) $\times 10^6$  个/mL]略高于对照组,G1 组 [(39.7  $\pm$  6.9) $\times 10^6$  个/mL]、G4 组 [(40.4  $\pm$  9.0) $\times 10^6$  个/mL]较对照组稍有下降,差异无统计学意义(图 2)。

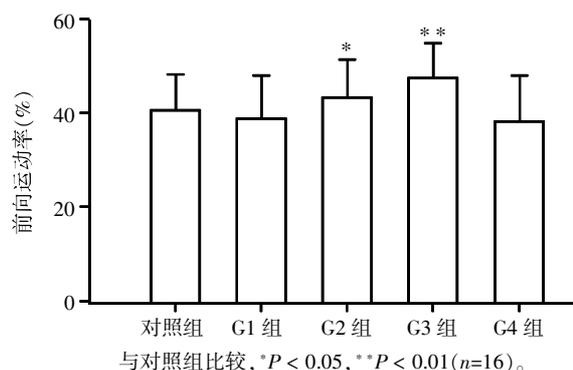


图 1 复苏后各实验组与对照组精子前向运动比较

Figure 1 Comparison of PR of the post-thawing sperm

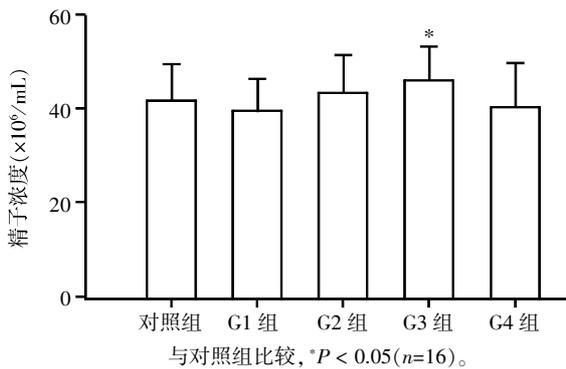
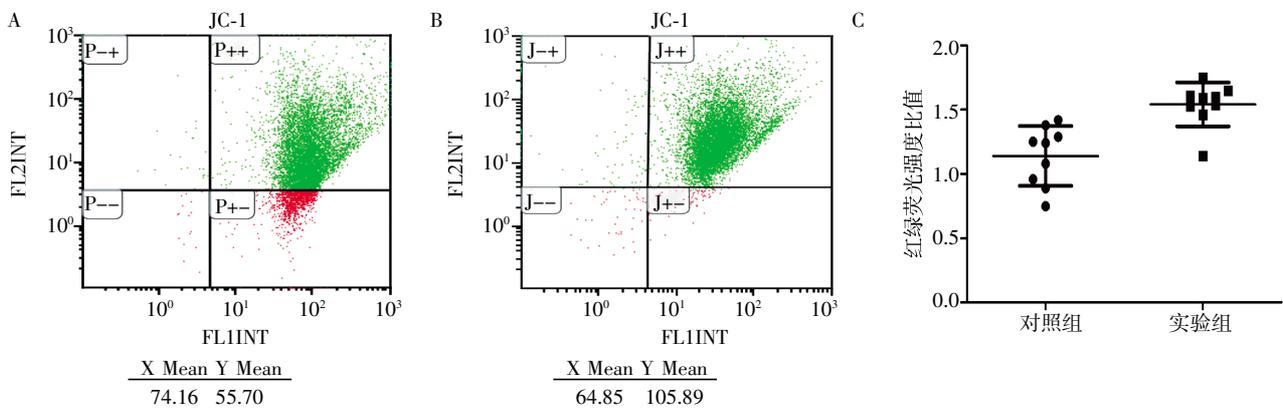


图 2 复苏后各实验组与对照组精子密度比较

Figure 2 Comparison of sperm density of the post-thawing sperm



A: 流式细胞术测定对照组红、绿荧光强度值; B: 流式细胞术测定实验组红、绿荧光强度值; C: 散点组表示红绿荧光强度值的比值, 实验组 ( $1.54 \pm 0.23$ ) 高于对照组 ( $1.14 \pm 0.17$ ),  $P < 0.05$  ( $n=9$ )。

图 3 实验组和对照组精子线粒体膜电位水平比较

Figure 3 Comparison of mitochondrial membrane potential in the experimental group and control group

受到关注<sup>[6]</sup>。黄东辉等<sup>[7]</sup>通过添加白蛋白到保护剂中使复苏后精子活力得到一定程度提高,精子亚显微结构损伤也有所减轻;Zhang 等<sup>[8]</sup>通过加入左卡尼丁发现对正常和弱精症患者精子的冷冻有保护作用,尤其是对弱精症患者有更好的效果。目前许多学者认为可以通过抗氧化应激来提高复苏后精子活力,有报道保护剂中添加维生素 C、D、E 使复苏后精子活力和 DNA 完整性都有所提高<sup>[9-10]</sup>。

异柠檬酸是一种与柠檬酸密切相关的有机化合物,作为底物参与三羧酸循环的过程。在三羧酸循环中,柠檬酸在顺乌头酸酶的催化下生成异柠檬酸。三羧酸循环,是需氧有机物产生能量的一系列化学反应,通过氧化糖类、脂肪和蛋白质来源的乙酰 CoA,生成 CO<sub>2</sub> 和以三磷酸鸟苷为形式的能量。在真核细胞中,三羧酸循环发生在线粒体基质,是机体和细胞获得能量的最好方式<sup>[11-12]</sup>。

本课题组前期研究中采用蛋白质组的方法研究精子冻融前后的差异蛋白,并通过差异蛋白

### 2.3 复苏后各组精子线粒体膜电位比较

线粒体膜电位反映精子内线粒体功能,经过 JC-1 染色后红色荧光平均荧光强度值/绿色荧光平均荧光强度值来表示大小。比值越高表示线粒体膜电位越高,意味着线粒体功能损伤较小。实验组平均比值高于对照组 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

## 3 讨论

近年来,甘油-卵黄-柠檬酸冷冻保护剂广泛用于人精液冷冻保存,获得了比较满意的效果。然而高浓度的甘油对精子有一定毒性作用,可引起精子超微结构的损害,因而改良冷冻保护剂的研究一直

受到关注<sup>[6]</sup>。黄东辉等<sup>[7]</sup>通过添加白蛋白到保护剂中使复苏后精子活力得到一定程度提高,精子亚显微结构损伤也有所减轻;Zhang 等<sup>[8]</sup>通过加入左卡尼丁发现对正常和弱精症患者精子的冷冻有保护作用,尤其是对弱精症患者有更好的效果。目前许多学者认为可以通过抗氧化应激来提高复苏后精子活力,有报道保护剂中添加维生素 C、D、E 使复苏后精子活力和 DNA 完整性都有所提高<sup>[9-10]</sup>。

异柠檬酸是一种与柠檬酸密切相关的有机化合物,作为底物参与三羧酸循环的过程。在三羧酸循环中,柠檬酸在顺乌头酸酶的催化下生成异柠檬酸。三羧酸循环,是需氧有机物产生能量的一系列化学反应,通过氧化糖类、脂肪和蛋白质来源的乙酰 CoA,生成 CO<sub>2</sub> 和以三磷酸鸟苷为形式的能量。在真核细胞中,三羧酸循环发生在线粒体基质,是机体和细胞获得能量的最好方式<sup>[11-12]</sup>。

本课题组前期研究中采用蛋白质组的方法研究精子冻融前后的差异蛋白,并通过差异蛋白

ACO2 进一步研究,提出精子冻融后位于其线粒体的 ACO2 蛋白发生降解,导致了其下游产物异柠檬酸生成减少,三羧酸循环被抑制,ATP 降低,最终导致精子复苏后活力下降<sup>[5,13]</sup>。本研究发现 G2 组、G3 组中前向运动精子的比率较对照组均有所上升,同时 G2 组、G3 组的精子浓度较对照组也升高,但 G2 组中精子浓度升高与对照组比较没有统计学意义。G3 组可能是一个比较适合的浓度。异柠檬酸的剂量较低时,对于精子活力的改善没有明显作用,随着药物浓度增加,精子活力和浓度都出现了上升趋势。然而 G4 组中随着给药浓度的增大,精子 PR 和浓度却出现下降。通过复习文献发现复苏后精子的活力和浓度受到保护剂溶液渗透压的影响<sup>[14]</sup>。异柠檬酸的给药剂量增大后,增加了保护剂溶液的渗透压,在 G4 组中可能由于渗透压的增加,反而导致了精子的损伤,因而出现前向运动精子和浓度的下降。G3 组中精子浓度的上升可能与异柠檬酸的抗线粒体损伤作用与溶液渗透压的共同作用有关,异柠

檬酸增加复苏后精子的活力,复苏后活动的精子数升高,同时因为渗透压变化未影响到精子的数量,因而这是 G3 组浓度(3.75 mmol/L)中精子密度上升的可能原因。我们选取 G3 组中异柠檬酸浓度为最适浓度进一步研究与线粒体膜电位的关系,发现对照组的精子线粒体膜电位较实验组降低,差异具有统计学意义。实验组线粒体损伤较对照组减轻。线粒体膜电位是用来反映线粒体功能的指标,线粒体膜电位越低说明线粒体功能受到损伤越严重,可能会导致能量生成障碍。目前已知精子运动主要由 ATP 供能<sup>[15]</sup>,其 ATP 的产生主要通过氧化磷酸化和糖酵解两个途径<sup>[16]</sup>。添加异柠檬酸到冻存液中补充了异柠檬酸生成的不足,减轻了三羧酸循环的抑制和复苏后精子 ATP 的下降,增加了线粒体膜电位,保护了线粒体功能,最终增加了复苏后前向运动精子百分率和精子浓度。

综上所述,添加适宜浓度的异柠檬酸可保护精子线粒体功能,提高复苏后精子的前向运动和浓度。由于实验样本还不够充足,后续需要增大样本量进一步研究。异柠檬酸可能是一种较好的添加剂,可以提高复苏后精子的活力,但复苏后精子浓度略有下降可能与给药浓度、药物本身特性等有关,值得进一步研究。通过对精子冻融机制的研究,为进一步改良冷冻保护剂,提高精子复苏率提供更好的方法。

#### [参考文献]

- [1] Nosrati R, Gong MM, San GM, et al. Paper-based quantification of male fertility potential[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(3):458-465
- [2] Jiang XP, Wang SQ, Wang W, et al. Enolase1 (ENO1) and glucose-6-phosphate isomerase (GPI) are good markers to predict human sperm freezability[J]. *Cryobiology*, 2015, 71(1):141-145
- [3] 黄东晖, 赵 虎, 熊承良, 等. 白蛋白与卵黄联合应用于人类精液冷冻保存的研究[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(2):115-119
- [4] 王尚乾, 王 巍. 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
- [5] Wang S, Wang W, Xu Y, et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation[J]. *Proteomics*, 2014, 14(2-3):298-310
- [6] 马春杰, 江 芳, 庄嘉明, 等. 甘油-卵黄-柠檬酸钠型冷冻保护剂未经冷冻对人精子运动学参数的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2010, 24(11):37-39, 42
- [7] 黄东辉, 赵 虎, 熊承良, 等. 白蛋白与卵黄联合应用于人类精液冷冻保存的研究[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(2):115-119
- [8] Zhang W, Li F, Cao H, et al. Protective effects of l-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation[J]. *Zygote*, 2016, 24(2):293-300
- [9] Taylor K, Roberts P, Sanders K, et al. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa[J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18(2):184-189
- [10] Kalthur G, Raj S, Thiagarajan A, et al. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3):1149-1151
- [11] Barnes SJ, Weitzman PD. Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster[J]. *FEBS Lett*, 1986, 201(2):267-270
- [12] Johnson JD, Mehus JG, Tews K, et al. Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(42):27580-27586
- [13] Tang M, Liu BJ, Wang SQ, et al. The role of mitochondrial aconitate (ACO2) in human sperm motility[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2014, 60(5):251-256
- [14] 柯文鸿, 姜 宏, 倪 丰, 等. 4 种精子冷冻液的比较[J]. *中国男科学杂志*, 2003, 17(3):182-183
- [15] Gogol P, Szczesniak-Fabianczyk B, Wierchos-Hilczner A. The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage[J]. *Reprod Biol*, 2009, 9(1):39-49
- [16] Miki K, Qu W, Goulding E H, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(47):16501-16506

[收稿日期] 2016-05-13