

聂晓伟,谈 勇,徐福松,等. 中药提取液在大鼠附睾精子冷冻保存中的应用效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):145-147.

中药提取液在大鼠附睾精子冷冻保存中的应用效果

聂晓伟¹, 谈 勇¹, 徐福松¹, 刘承勇¹, 陈 娟¹, 钱 云¹, 王公金²

(1. 南京中医药大学第一附属医院生殖医学科, 江苏南京 210029; 2. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014)

摘要:对菟丝子、淫羊藿水提液进行分离纯化,并将水提液加入大鼠精液冷冻保护剂中,对大鼠附睾尾部精子进行冷冻保存,并评估冷冻前后精子活率指数,采用伊红染色评估精子畸形率。结果表明:添加菟丝子、淫羊藿水提液的冷冻保护剂可以提高解冻后精子活率指数。菟丝子、淫羊藿水提液在大鼠精液冷冻保存过程中有一定的保护作用。

关键词:淫羊藿;菟丝子;大鼠;附睾精子;精子活率指数

中图分类号: R321.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0145-03

精液冷冻保存技术已有 200 多年的历史。人的精液冷冻保存可以追溯到 20 世纪 40 年代末。目前,精液冷冻保存在我国主要应用于人类精子库,目前,已经建立了较为成熟的精液冷冻保存体系。全国各生殖中心对人精液冷冻保护剂的需求量比较大,市场上人精液冷冻保存剂几乎全部被国外的生物公司所垄断,国内只有部分科研院所自行配制畜禽精液冷冻保护剂,还没有我国自行开发的人类精液冷冻保护剂应用于临床。笔者前期研究表明,对少弱精患者进行精液冷冻保存,可以获得尽可能多的处理后活动精子总数(PTMS),并应用于宫腔内人工授精(IUI),使更多的患者可以接受 IUI 治疗,减少治疗费用,让不孕不育患者以最小的代价获得妊娠^[1]。现有的人类精液冷冻保存系统适合人的正常精液。本研究探讨中药水提液对大鼠精液冷冻保存效果,旨在为冷冻保存少弱精患者精液提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

15 周龄清洁级 SD 雄性大鼠(南京医科大学实验动物中心),取附睾精子用于冷冻保存研究。菟丝子(安徽井泉集团中药饮片有限公司),批号:20110803。淫羊藿(安徽省万生中药饮片有限公司),批号:20110701。2 种药材均购自江苏省中医院药剂科。M16 Medium(Sigma 公司),批号:11A832。

1.2 方法

1.2.1 菟丝子、淫羊藿中药提取液的制备 取干净菟丝子、淫羊藿各 500 g,分别加 8 倍蒸馏水(4 000 mL)浸泡 30 min,武火煮沸,文火再煮 30 min,滤布过滤,滤渣再加 5 倍量水(2 500 mL),同上法再处理 2 次,各煮沸 30 min,合并 3 次滤液。将合并的滤液旋蒸,浓缩至 1 000 mL。将浓缩液置于冰箱中静置沉淀,去除悬浮粒子(24 h)。将菟丝子滤液于 70 ℃ 水浴中浓缩至 1 g/mL(每 mL 药液相当于 1.00 g 生药量),

淫羊藿滤液浓缩至 2 g/mL(每 mL 药液相当于 2.00 g 生药量)。将浓缩滤液 2 500 r/min 离心 20 min,取上清液 200 mL,加入等量蒸馏水稀释后过夜,2 500 r/min 离心 20 min 后再 30 000 r/min 高速离心 20 min,提取上清液最终定量为菟丝子 0.5 g/mL(每 mL 药液相当于 0.50 g 生药量),淫羊藿滤液浓缩至 1.00 g/mL(每 mL 药液相当于 1.0 g 生药量)。将上清液经 0.45 μm 滤器过滤,冷藏保存备用。

1.2.2 固体物质含量测定 取菟丝子、淫羊藿水提取液各 2 mL,置恒重的称量瓶中,于 120 ℃ 电热恒温干燥箱中干燥 3 h,使溶液缓慢挥发,直到其中的固体成分完全干燥为止,准确称量,重复 2 次,取平均值。溶液固含量计算见公式(1):

$$\text{固含量} = \frac{\text{干燥后固体重量}}{\text{溶液总重量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 稀释液的配制 375.0 mmol/L Tris(51.11 mg/mL) + 124.0 mmol/L 柠檬酸(26.06 mg/mL) + 41.0 mmol/L 葡萄糖(8.12 mg/mL)。50 mL 稀释液含 2.555 5 g Tris + 1.303 g 柠檬酸 + 0.406 g 葡萄糖。用 375.0 mmol/L Tris 将稀释液的 pH 值调整到 7.0,用三蒸水将渗透压调整到 375 mOsm。

1.2.4 基础液的配制 基础液 I: M16 培养液 + 50 μg/mL 硫酸链霉素 + 75 μg/mL 青霉素 + 0.1 mol/L 棉籽糖 + 0.05% SDS + 20% 卵黄(95%)。基础液 II: 首先自行配制 mKRB 培养液,配方如下: CaCl₂ · 2H₂O 1.71 mmol/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.19 mmol/L, KCl 4.78 mmol/L, KH₂PO₄ 1.19 mmol/L, NaHCO₃ 25.07 mmol/L, NaCl 94.6 mmol/L, 葡萄糖 5.56 mmol/L, 丙酮酸钠 0.5 mmol/L, 乳酸钠 21.58 mmol/L, 硫酸链霉素 50 μg/mL, 青霉素 75 μg/mL。在 mKRB 培养液中一次性加入 0.1 mol/L 棉籽糖、0.05% SDS、20% 卵黄。基础液 I、基础液 II 加入卵黄后,连续混匀 30 min 后 6 000 r/min 离心 30 min,取上清后再次离心 30 min,用 HCl 调整溶液 pH 值为 7.3,然后用 0.45 μm 滤膜过滤,将配制好的基础液低温保存备用。

1.2.5 试验分组 试验 I: 对照组 C1: PBS(5%) + 基础液 I(95%); 菟丝子组 T1A: 0.5 g/mL 菟丝子提取液(1%) + PBS(4%) + 基础液 I(95%); 菟丝子组 T1B: 0.5 g/mL 菟丝子提取液(2.5%) + PBS(2.5%) + 基础液 I(95%); 菟丝子组 T1C: 0.5 g/mL 菟丝子提取液(5%) + 基础液 I(95%)。淫羊藿组 Y1A: 1 g/mL 淫羊藿提取液(1%) + PBS(4%) + 基础液 I(95%); 淫羊藿组 Y1B: 1 g/mL 淫羊藿提取液(2.5%) + PBS(2.5%) + 基础液 I(95%); 淫羊藿组 Y1C:

收稿日期: 2013-05-30

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目[编号: 苏政办发(2011)6 号]; 江苏省中医药局科技项目(编号: LZ11025)。

作者简介: 聂晓伟(1981—),男,内蒙古丰镇人,博士研究生,助理研究员,从事生殖医学、生殖生物学研究。E-mail: niexiao5715@163.com。

1 g/mL 淫羊藿提取液(5%) + 基础液 I (95%)。将大鼠精液与冷冻液按 1 : 1、1 : 2(体积比)混合,分装于冷冻麦管中。

试验 II :对照组 C2:PBS(10%) + 基础液 I (90%);菟丝子组 T2A:0.5 g/mL 菟丝子提取液(2.5%) + PBS(7.5%) + 基础液 I (90%);菟丝子组 T2B:0.5 g/mL 菟丝子提取液(5%) + PBS(5%) + 基础液 I (90%);菟丝子组 T2C:0.5 g/mL 菟丝子提取液(10%) + 基础液 I (90%)。淫羊藿组 Y2A:1 g/mL 淫羊藿提取液(2.5%) + PBS(7.5%) + 基础液 I (90%);淫羊藿组 Y2B:1 g/mL 淫羊藿提取液(5%) + PBS(5%) + 基础液 I (90%);淫羊藿组 Y2C:1 g/mL 淫羊藿提取液(10%) + 基础液 I (90%)。将大鼠精液与冷冻液按 1 : 1、1 : 2(体积比)混合,分装于冷冻麦管中。

试验 III :对照组 C3:基础液 II ;菟丝子组 T3A:0.5 g/mL 菟丝子提取液(0.5%) + 基础液 II (99.5%);菟丝子组 T3B:0.5 g/mL 菟丝子提取液(1%) + 基础液 II (99%);菟丝子组 T3C:0.5 g/mL 菟丝子提取液(1.5%) + 基础液 II (98.5%)。淫羊藿组 Y3A:1 g/mL 淫羊藿提取液(1.5%) + 基础液 II (98.5%);淫羊藿组 Y3B:1 g/mL 淫羊藿提取液(2.5%) + 基础液 II (97.5%);淫羊藿组 Y3C:1 g/mL 淫羊藿提取液(3.5%) + 基础液 II (96.5%)。

各组精液冷冻保护液配制完成后,均经 0.22 μm 滤器过滤后备用。

1.2.6 附睾尾部精子的获取与稀释 每只大鼠用 2 mL 10% 水合氯醛腹腔麻醉后解剖,分离附睾尾,放置于盛有 2 mL 稀释液的 353037 培养皿中,取附睾尾部浆液分析测定精子密度(*N*)、精子活率(*SMI*),用稀释液将精子密度调整到 2 000 万/mL 备用。使用 Makler 计数板调整密度。

1.2.7 装管 将精液与冷冻保护液按照 1 : 2(体积比)分装于冷冻麦管和冷冻管中。

1.2.8 冷冻与解冻 将分装好的麦管或冷冻管放入 4 ℃ 冰箱 30 min,在距离液氮表面 1 ~ 2 cm 的液氮蒸汽中熏蒸 10 min,然后直接投入液氮中。将冷冻麦管从液氮中取出,37 ℃ 水浴中静置 10 s,然后将冻存精液转移到 353037 培养皿中,在 37 ℃ 培养箱中培养 10 min,检测解冻后精子活率及畸形率。将冷冻管从液氮中取出,37 ℃ 水浴中静置 10 min,完全解冻后检测精子活率及畸形率。

1.2.9 精子活率测定 滴 1 滴精液于载玻片表面,加载盖玻片,记录活动精子数、前向活动精子数、不活动精子数,精子活率指数计算公式如下:

精子活率指数 = 活动精子数 + $\frac{\text{前向活动精子数} \times 20}{2}$ (2)

1.2.10 精子畸形率测定 将冷冻前、解冻后的精子悬液滴于清洁载玻片上,均匀推片后用无水乙醇固定 10 min,用 2% 伊红水溶液染色 30 min,高倍镜下每只大鼠检查 500 个完整的精子,记录正常、头部畸形(无钩、胖头、断头)、尾部畸形精子数(双尾、尾折叠、断尾)。

1.2.11 数据处理 采用 SPSS 17. 0、SigmaPlot 12.0 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 中药水提液固体物质含量的测定

由表 1 可知,TSZ 固含量 = 干燥后固体重量/溶液总重量 × 100% = 0.050 3/1.092 1 × 100% = 4.61%;YYH 固含量 = 干燥后固体重量/溶液总重量 × 100% = 0.254 9/2.059 2 × 100% = 12.38%。

表 1 中药水提液固体物质含量

水提液	蒸发皿重 (g)	加入溶液后 蒸发皿重 (g)	溶液重量 (g)	干燥后 蒸发皿重 (g)	固含物重量 (g)
TSZ-1	57.972 9	59.060 6	1.087 7	58.021 8	0.048 9
TSZ-2	54.089 1	55.185 5	1.096 4	54.140 7	0.051 6
平均值			1.092 1		0.050 3
YYH-1	45.055 6	47.138 1	2.082 5	45.309 5	0.253 9
YYH-2	59.115 4	61.151 2	2.035 8	59.371 2	0.255 8
平均值			2.059 2		0.254 9

2.2 菟丝子、淫羊藿水提液在大鼠精液冷冻保存中的应用效果

从表 2、表 3 可以看出,虽然试验 I、试验 II 可能由于本身设计存在问题,并没有取得理想的冷冻效果,但在添加了 1% 的 0.5 g/mL 菟丝子提取液的 T1A 和 2.5% 的 1 g/mL 淫羊藿提取液的 Y1B、Y2A 组中,意外检测到了活动精子的存在。这一结果足以证明,菟丝子、淫羊藿水提液在大鼠精液冷冻过程中具有一定的保护作用。

表 2 基础液 I (95%) 配制的冷冻保护剂冷冻效果

分组	混合 比例	精子活率指数(%)		畸形率(%)	
		冷冻前	解冻后	冷冻前	解冻后
C1	1 : 1	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	21.67 ± 1.53
	1 : 2	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	20.00 ± 1.00
T1A	1 : 1	64.0 ± 3.80	2.87 ± 0.27a	13.33 ± 1.53	19.33 ± 1.53
	1 : 2	64.0 ± 3.80	7.33 ± 1.05A	13.33 ± 1.53	20.33 ± 1.53
T1B	1 : 1	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	21.33 ± 0.58
	1 : 2	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	19.33 ± 0.58
T1C	1 : 1	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	21.33 ± 0.58
	1 : 2	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	20.67 ± 0.58
Y1A	1 : 1	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	22.67 ± 0.58
	1 : 2	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	22.33 ± 0.58
Y1B	1 : 1	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	21.67 ± 1.53
	1 : 2	64.0 ± 3.80	2.03 ± 0.17	13.33 ± 1.53	22.33 ± 1.15
Y1C	1 : 1	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	23.67 ± 1.15
	1 : 2	64.0 ± 3.80	0	13.33 ± 1.53	24.67 ± 1.15

注:同列数据后相同字母不同大写、小写表示差异显著(*P* < 0.05)。

表 3 基础液 I (90%) 配制的冷冻保护剂冷冻效果

分组	混合 比例	精子活率指数(%)		畸形率(%)	
		冷冻前	解冻后	冷冻前	解冻后
C2	1 : 1	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	21.33 ± 0.58
	1 : 2	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	22.33 ± 0.58
T2A	1 : 1	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	24.33 ± 1.53
	1 : 2	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	25.00 ± 1.00
T2B	1 : 1	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	24.67 ± 1.15
	1 : 2	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	26.33 ± 0.58
T2C	1 : 1	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	25.33 ± 1.15
	1 : 2	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	24.33 ± 1.53
Y2A	1 : 1	53.93 ± 3.39	1.29 ± 0.28a	13.33 ± 1.53	24.00 ± 1.00
	1 : 2	53.93 ± 3.39	3.48 ± 0.62A	13.33 ± 1.53	23.00 ± 1.00
Y2B	1 : 1	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	25.67 ± 1.15
	1 : 2	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	27.33 ± 1.53
Y2C	1 : 1	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	29.33 ± 0.58
	1 : 2	53.93 ± 3.39	0	13.33 ± 1.53	32.33 ± 1.53

注:同列数据后相同字母不同大写、小写表示差异显著(*P* < 0.05)。

2.3 渗透压对大鼠精液冷冻保存的影响

试验Ⅰ、试验Ⅱ在设计过程中,为了验证中药水提液在大鼠精液冷冻保存中的应用效果,选择了 90%、95% 基础液作为对照,并添加了 PBS、中药水提液。表 2、表 3 表明,PBS、中药水提液的添加可能改变了冷冻保护剂的渗透压,不利于大鼠精液的冷冻保存。

2.4 不同混合比例对大鼠精液冷冻保存效果的影响

由表 2 可知,T1A 组体积比分别为 1 : 1、1 : 2 条件下,精子活率指数差异显著。由表 3 可知,Y2A 组体积比分别为

1 : 1、1 : 2 条件下,精子活率指数差异显著。大鼠精液与冷冻保护液按 1 : 2 的比例混合,解冻后精子活率指数明显优于 1 : 1 的混合比例,所以在添加 0.5 g/mL 菟丝子提取液、1 g/mL 淫羊藿提取液的冷冻保护剂中,大鼠精液与冷冻保护剂以 1 : 2 的比例混合冷冻效果更好。

2.5 不同冷冻介质对精液冷冻保存效果的影响

由表 4 可知,大鼠精液冷冻保存过程中,麦管冷冻效果明显优于冷冻管。

表 4 基础液Ⅱ配制的冷冻保护剂冷冻效果

分组	冷冻载体	精子活率指数 (%)		畸形率 (%)	
		冷冻前	解冻后	冷冻前	解冻后
C3	麦管	75.37 ± 2.20	15.40 ± 0.61b	15.33 ± 1.53	22.33 ± 1.15
	冷冻管	75.37 ± 2.20	13.50 ± 1.10	15.33 ± 1.53	23.33 ± 1.15
T3A	麦管	75.37 ± 2.20	11.17 ± 0.58d	15.33 ± 1.53	23.67 ± 1.53
	冷冻管	75.37 ± 2.20	9.37 ± 1.05	15.33 ± 1.53	23.33 ± 0.58
T3B	麦管	75.37 ± 2.20	19.90 ± 1.20a	15.33 ± 1.53	22.67 ± 0.58
	冷冻管	75.37 ± 2.20	16.97 ± 0.55 *	15.33 ± 1.53	22.00 ± 1.00
T3C	麦管	75.37 ± 2.20	14.2 ± 0.61b	15.33 ± 1.53	23.67 ± 1.53
	冷冻管	75.37 ± 2.20	12.1 ± 0.61 *	15.33 ± 1.53	24.33 ± 1.15
Y3A	麦管	75.37 ± 2.20	10.77 ± 0.55e	15.33 ± 1.53	25.67 ± 0.58
	冷冻管	75.37 ± 2.20	8.70 ± 0.61 *	15.33 ± 1.53	25.67 ± 1.53
Y3B	麦管	75.37 ± 2.20	13.13 ± 0.55c	15.33 ± 1.53	26.67 ± 0.58
	冷冻管	75.37 ± 2.20	11.03 ± 0.55 *	15.33 ± 1.53	27.33 ± 0.58
Y3C	麦管	75.37 ± 2.20	13.87 ± 0.55b	15.33 ± 1.53	29.00 ± 1.00
	冷冻管	75.37 ± 2.20	9.37 ± 1.00 *	15.33 ± 1.53	29.67 ± 0.58

注:同列数据后不同小写字母表示不同组麦管之间比较差异显著($P < 0.05$);“*”表示同组的麦管与冷冻管之间比较差异显著($P < 0.05$)。

2.6 菟丝子、淫羊藿水提液最佳添加浓度的确定

添加 1% 菟丝子提取液、2.5% 淫羊藿提取液的冷冻保护剂解冻后可以见到活动精子。添加 1% 菟丝子提取液(T3B)的冷冻保护剂解冻后精子活率指数最高,与其他组差异显著;添加 3.5% 淫羊藿提取液(Y3C)的冷冻保护剂解冻后精子活率指数最高,但与 2.5% 淫羊藿提取液(Y3B)组无显著差异。

3 结果与分析

比其他哺乳动物精子相比,大鼠精子尾巴更加细长,且头部呈狭小细长的镰刀状^[2-3]。这些结构上的特殊性决定其对一些环境变化极其敏感,如物理损伤、pH 值变化、渗透压变化、温度变化等^[4-5]。研究人员对大鼠精子进行不同程度离心,结果表明,700 r/min 离心 5 min 后精子活力明显低于未离心组,离心 3 次后精子质膜完整性近乎 0。因此,大鼠精子冷冻过程中应尽量避免外界损伤。大鼠精子冷冻难度较大,主要是由于精子质膜的脂质含量、成分不同造成的^[6]。陈荪红将大鼠、小鼠、人类精子在人类精子的低渗肿胀检测液中孵育 30 min 后,人类精子尾部出现尾间弯曲肿胀或完全肿胀,小鼠精子也出现类似人类精子现象,而大鼠精子与上述 2 种精子明显不同,其尾部未出现任何弯曲肿胀现象^[7]。Hammerstedt 等对不同动物精子质膜的磷脂成分进行比较,发现大鼠精子质膜与牛、羊等有明显区别,说明大鼠精子冻存难度较大与其成分特异的细胞膜有关^[8]。大鼠作为体型适中的试验动物被应用于很多研究领域,再加上人类疾病模型的增多,需要建立成熟的保种方法。然而,大鼠精子结构的特殊性导致其精子冷冻还处于探索阶段,如果了解了大鼠精子细

胞生物膜结构,然后针对该特性进行生物学机理研究,有可能取得突破性进展,开发出适合的冷冻程序、冷冻保护剂。在以后的工作中,应选择菟丝子、淫羊藿、丹参等单味中药的有效成分用于大鼠精液冷冻保存研究。

参考文献:

[1] 聂晓伟,钱云,刘承勇,等. 少弱精子冷冻保存在宫腔内人工授精中的应用[J]. 中华男科学杂志,2010,16(3):232-235.

[2] Parks J E, Graham J K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes[J]. Theriogenology, 1992,38(2):209-222.

[3] Niwa K, Chang M C. Various conditions for the fertilization of rat egg in vitro[J]. Biology of Reproduction, 1974,11:463-469.

[4] Chulavatnatol M. Motility initiation of quiescent spermatozoa from rat caudal epididymis: effects of pH, viscosity, osmolality and inhibitors [J]. International Journal of Andrology, 1982,5(4):425-436.

[5] Si W, Benson J D, Men H, et al. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm[J]. Cryobiology, 2006,53(3):336-348.

[6] Parks J E, Lynch D V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes[J]. Cryobiology, 1992,29(2):255-266.

[7] 陈荪红. 冻存对自发性高血压大鼠配子和着床前胚胎的影响[D]. 上海:上海第二医科大学,2002.

[8] Hammerstedt R H, Graham J K, Nolan J P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive[J]. Journal of Andrology, 1990,11(1):73-88.