

## 淫羊藿多糖对弱精症精子冷冻保存效果的影响

周岳<sup>1,2#</sup>, 颜贝<sup>1,2#</sup>, 田稼<sup>1,2</sup>,  
贾邵彤<sup>3</sup>, 裴承斌<sup>1,2</sup>, 王红红<sup>1,2</sup>, 王红燕<sup>1,2\*</sup>, 马良宏<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>宁夏医科大学总医院 宁夏人类精子库; <sup>2</sup>宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室, 银川 750001;

<sup>3</sup>宁夏医科大学总医院生殖中心, 银川 750004

**摘要:**常用的冷冻保护剂对于弱精症精子冻融效果欠佳, 本实验通过在人精子冷冻保护液中添加淫羊藿多糖(EPS), 研究其对冻融过程中精子活力及精子功能的影响。选择弱精症精液 15 例, 液化后的精液样本分别与甘油-卵黄-柠檬酸盐(GEYC)冷冻保护液或含有 EPS 冷冻保护液混匀冷冻。检测其精子的活力、存活率以及精子形态、丙二醛(MDA)以及活性氧(ROS)的含量, 精子核碎裂指数(DFI), 精子顶体反应率(AR), 并通过透射电镜观察精子微观结构的变化。添加 EPS 后精子 MDA 和 ROS 水平明显降低, 含有 3 mg/mL EPS 的冷冻组抗氧化性明显优于其他组( $P < 0.05$ ); 含有 EPS 的冷冻组复苏后的存活率以及精子头部正常形态率都明显高于未添加组, 但是两组间的精子前向运动 PR 无显著差异; 此外, 添加 EPS 的冷冻组精子 DFI 下降显著, AR 明显升高; 电镜观察精子头部显微结构显示, 添加 EPS 组的精子在质膜以及顶体膜完整性上明显优于未添加组。结果提示, 在精液冷冻保护液中添加 EPS 可降低精子活性氧的水平, 保护精子顶体结构和功能, 从而改善解冻后精子顶体功能和精子核的完整性。

**关键词:**淫羊藿多糖; 精子冷冻; 氧化应激; 顶体结构; 顶体反应

中图分类号: R321.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)6-1013-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.6.016

## Effects of *Epimedium* polysaccharide on cryopreservation of asthenospermia sperm

ZHOU Yue<sup>1,2#</sup>, YAN Bei<sup>1,2#</sup>, TIAN Jia<sup>1,2</sup>, JIA Shao-tong<sup>3</sup>,  
PEI Cheng-bin<sup>1,2</sup>, WANG Hong-hong<sup>1,2</sup>, WANG Hong-yan<sup>1,2\*</sup>, MA Liang-hong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>General Hospital of Ningxia Medical University Human Sperm Bank of Ningxia;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China;

<sup>3</sup>Reproductive Center of General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

**Abstract:** The commonly used cryoprotectants have poor effect on sperm freezing and thawing of asthenospermia. In this experiment, the *Epimedium* polysaccharide (EPS) was added to the human sperm cryoprotection solution to study its effect on the sperm motility and sperm function influences. 15 cases of asthenospermia semen were selected. The liquefied semen samples were mixed with glycerin yolk citrate (GEYC) cryoprotectant or EPS cryoprotectant respectively. The sperm viability, survival rate, morphology, MDA, ROS, DFI and AR were measured, and the changes of sperm microstructure were observed by transmission electron microscopy. After adding EPS, the level of MDA and ROS in spermatozoa decreased significantly, and the antioxidant activity of frozen group containing 3 mg/mL EPS was better than that of other groups ( $P < 0.05$ ); The survival rate and normal morphology rate of sperm head in the frozen group with EPS were significantly higher than those in the control group, but there was no significant difference in the PR of sperm forward movement between the two groups. In addition, the DFI and AR of sperm in the frozen group added EPS decreased significantly, and the ultrastructure of sperm head showed that

收稿日期: 2020-05-13 接受日期: 2021-02-22

基金项目: 2017 年自治区科技创新领军人才培养经费(KJT2017008); 宁夏回族自治区重点研发一般项目(2019BEG03002); 宁夏回族自治区重点研发项目(2020BFH02002)

\* 通信作者 E-mail: 4083247@aliyun.com, mmm1770@163.com

# 共同第一作者

the integrity of plasma membrane and acrosome membrane of sperm in the EPS group was significantly better than that in the control group. The results showed that adding EPS to semen cryoprotectant could reduce the level of sperm ROS, protect the structure and function of sperm acrosome, and improve the acrosome function and the integrity of sperm nucleus after thawing.

**Key words:** *Epimedium* polysaccharide; sperm freezing; oxidative stress; acrosome structure; acrosome reaction

精子冷冻作为保存男性生育力的有效手段,是当今人类辅助生殖技术过程中不可或缺的一部分。超低温会导致精子运动能力受损,且冷冻和解冻过程冰晶的形成以及此过程中过度氧化应产生大量活性氧可对精子的结构和功能造成损伤<sup>[1]</sup>。实验人员将精子与冷冻保护剂混匀后一起冷冻,可降低其死亡率。目前常用的冷冻保护剂为甘油-卵黄-柠檬酸盐(GEYC)保护剂<sup>[2]</sup>,但是常规的冷冻保护剂对于弱精症精子冷冻效果较差。近几年,国内外学者将天然或人工合成物质加入冷冻保护剂以减轻精子的冷冻损伤;研究人员发现保护剂中添加左旋肉碱可有效地降低精子DNA碎片率、精子细胞凋亡率<sup>[3]</sup>;此外,研究人员在冷冻保护剂中加入Vit E, Zn<sup>2+</sup>以及抗氧化剂(MitoQ)发现,这些抗氧化物质的加入,可以缓解冻融过程对精子造成的伤害,在一定程度上提高冻融后精子活动力、存活率及精子DNA完整性<sup>[4-6]</sup>。越来越多的科研人员正在努力找到更有利于精子冻后活力的天然保护剂。

淫羊藿,一种中国的古老中药材,是我国应用最广,最具开发潜力的中草药之一,淫羊藿多糖(EPS)提炼于此种药材。近年来,越来越多研究发现,EPS具有抗病毒,抗衰老,抗氧化,清除氧自由基<sup>[7-9]</sup>等作用。本实验在人类精液冷冻过程中常用的GEYC冷冻保护剂基础上,加入EPS,探究优化的保护剂对于精子冻后活力和功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

选取2019年6~9月在宁夏医科大学总医院生殖医学中心就诊的15名弱精症患者,年龄 $31.9 \pm 7.5$ 岁,精液体积 $2.5 \pm 0.6$  mL,精子总活力 $28.7\% \pm 5.4\%$ 。其纳入判定标准:按照WHO(人类精液检查与处理实验室手册)(2011年第五版)标准,选择精液体积 $\geq 1.5$  mL,精子总数 $\geq 39 \times 10^6$ /mL,精子前向运动PR $< 32\%$ ,精子(PR+NP) $< 40\%$ 。本课题经过宁夏医科大学总医院伦理委员会伦理通过,并经患者知情同意后进行。

### 1.2 试剂及仪器

淫羊藿多糖(S24632,上海源叶生物科技有限

公司);精子计数板(SEFI medical instruments, Israel);Diff Quik快速染色试剂盒(G1541;Solarbio);丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);精子细胞氧化应激活性超氧阴离子检测试剂盒(GMS14034;GENMED);DFI流式细胞检测试剂盒(CP0101;Cellpro Biotechnology);精子顶体染色流式细胞检测试剂盒(CP01011;Cellpro Biotechnology);计算机辅助精液分析系统(CASA)(伟力);透射电镜(JEM1200-EX TEM, JEOL)。

### 1.3 分组与处理

所有研究对象均禁欲3~5天,手淫法留取标本于无菌取精杯中,每份患者精液样本首先置于37℃水浴摇床液化30 min,实验每份样本平均分为Fresh组,G0组(无EPS添加)、G1组(含1.0 mg/mL EPS)、G2组(含2.0 mg/mL EPS)、G3组(含3.0 mg/mL EPS)、G4组(含4.0 mg/mL EPS)、G5组(含5.0 mg/mL EPS)。精液液化后,用BWW(精子培养液)稀释精液样本,500 g离心10 min,弃掉上清,分别加入1 mL精子培养液(按照分组加入相应量的EPS)37℃孵育20 min;然后进入精子冷冻过程;冷冻保护剂基础液体按照WHO《人类精液检查与处理实验室手册》(2011年第五版)推荐的GEYC(甘油-卵黄-柠檬酸盐)保护剂,分别按分组加入相应的EPS。各组冷冻保护剂均需通过0.22 μm的滤器过滤,-20℃保存备用。

### 1.4 精子冷冻和复苏

#### 1.4.1 手工二步冷冻法

将精液和保护剂以2:1的比例添加到冷冻保存管中,并将冷冻保存管放置在距液氮表面约5 cm的高度10 min。随后,将其降低至液位以上0.1 cm不与液位接触)5 min;然后将其浸入液氮中保存。

#### 1.4.2 精子复苏

冻存1个月后,取出冻存管在水浴箱内复温,10 min后进行检查;轻柔颠倒10次混匀,取样进行精子活力及其他分析。

### 1.5 精子相关参数检测

#### 1.5.1 CASA分析

相差显微镜下,采用CASA(计算机辅助精子分

析)检测 PR(精子活力)以及精子活动度的各项指标(VSL、VCL、VAP)。

### 1.5.2 精子存活率实验

使用 WHO 指南推荐的伊红-苯胺黑检测存活率。首先,用生理盐水将精子浓度调节至  $2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ ,并将 25  $\mu\text{L}$  精液和等体积的伊红-苯胺黑悬浮液添加到 1.5 mL 离心管中,混合并静置 30 s 用每种精子悬浮液进行精子涂片,在空气中干燥并在干燥后立即检查。在油镜下用明场显微镜(放大倍数,  $\times 1\ 000$ )检查每个载玻片。利用实验室计数器,对染色的和未染色的精子进行计数。每个样品进行两次评估,并评估 200 个精子,以达到可接受的低抽样误差。如果差异太大,则进行重新采样和重新评估。

### 1.5.3 精子形态学检测

使用 Diff Quik 快速染色试剂盒进行精子染色。首先,用生理盐水将精子浓度调节至  $(2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6)$ ,然后制备精子涂片,将其浸入染料 I 中 10 sec,然后将速溶染料 II 浸 5 s。然后将载玻片在流水下冲洗以除去过量的染料溶液。密封后评估总共 200 个精子。记录正常和异常精子的数量并计算百分比。

## 1.6 精子功能检测

### 1.6.1 精子核碎裂指数(DFI)

通过 SCSA(精子染色质结构测定法)评估精子 DFI。原理:染料吖啶橙与双链 DNA 结合发出绿色荧光,与单链 DNA 结合而发出红色荧光,通过流式细胞仪检测不同荧光的比例来判断 DNA 的完整性。选择 DFI 流式细胞检测试剂盒(CP0101; Cellpro Biotechnology),具体操作如下:将精子  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{mL}$  用液体 A 稀释至终体积 100  $\mu\text{L}$ 。随后,添加 200  $\mu\text{L}$  B 溶液,然后孵育 30 s(需要精确的时间)。加入 600  $\mu\text{L}$  溶液 C。然后使用 BD Accuri C6(美国 BD Biosciences)检测其荧光,调节 FL1 和 FL3 通道的电压以使主要细胞群出现在指定的门中。稳定运行两 min 后,将精子流速控制在 100 ~ 300/sec 开始收集信息。至少收集 5 000 个精子,每个样本至少检测两次。收集数据后,将流式细胞仪(FCS)文件复制到 DFI-View 软件(DFI-View, Cellpro Biotechnology)中进行分析。

### 1.6.2 精子顶体反应(AR)

通过凝集素免疫荧光染色法评估精子发生 AR 的能力。原理:利用 PSA(豌豆凝集素)可与精子顶

体中糖蛋白特异结合的特性,PSA 可作为探针检测顶体反应。钙离子载体 A23187 可诱导精子发生顶体反应。选用精子顶体染色流式细胞检测试剂盒(CP01011; Cellpro Biotechnology)。具体操作如下:用溶液 A 将精子浓度调整为  $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  个活精子。准备两个 1.5 mL 离心管,分别加入 10  $\mu\text{L}$  溶液 B 和 10  $\mu\text{L}$  溶液 C。混合并在 37  $^\circ\text{C}$  下孵育 15 min,然后将 100  $\mu\text{L}$  预冷的 70% 乙醇加入每个试管中,然后孵育 2 min。将该混合物以  $500 \times g$  离心 5 min,弃去上清液,加入 500  $\mu\text{L}$  染色工作溶液(溶液 D 和溶液 E 的混合物),然后摇动并混合。随后,将混合物在 37  $^\circ\text{C}$  下孵育 15 min。在 BD Accuri C6 上,调整 FL1 通道的电压,以使主要细胞群处于指定的门中。将精子流速控制在 100 ~ 300/sec,至少收集 5 000 个精子,每个样品至少分析两次。将流式细胞仪(FCS)文件复制到软件中进行分析。

### 1.7 丙二醛(MDA)的检测

通过硫代巴比妥酸(TBA)比色法检测 MDA。选择南京建城生物制剂有限公司的 MDA 检测试剂盒进行检测。严格按照根据试剂盒说明书进行操作,并通过分光光度计读取吸光度值。

### 1.8 活性氧的检测

选择精子细胞氧化应激活性超氧阴离子试剂盒(GMS14034; GENMED)进行检测。严格按照根据试剂盒说明书进行操作。本实验室中,二氢溴化乙啶(dihydroethidium bromide; hydroethidine; DHE),可穿过细胞膜。一旦被包括过氧化氢,过氧化物和过亚硝酸盐阴离子的分子氧化,它就会产生荧光。采用 BD Accuri C6 488 nm 的激发波长进行分析。精子流速控制在 100/sec,收集至少 10 000 个精子,每个样品至少检测两次。

### 1.9 精子电镜分析

精液标本液化以后 0.85% NaCl 洗涤 2 次并离心(3 500 rpm)10 min 后,弃上清,再沿离心管内壁缓慢滴加 2.5% 戊二醛固定液,置于 4  $^\circ\text{C}$  冰箱内固定 2 ~ 4 h,再用钨酸后固定,蒸馏水清洗, Epon812 环氧树脂包埋,半薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜下定位。取精子细胞区作超薄切片,日立 H-7000 透射电镜观察,重点观察精子头部质膜的变化。

### 1.10 统计方法

所有数据资料均采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。采用韦尔奇单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey 的 HSD 检验

分析多组间的差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EPS 最佳抗氧化浓度的筛选

冷冻复苏后发现 2.0 mg/mL 和 3.0 mg/mL 组的 MDA 含量较未添加组(0 mg/mL)明显降低( $P < 0.05$ ), 3.0 mg/mL 组 ROS 含量最低, 且明显低于其他干预 EPS 组(见图 1); 此后实验选用浓度为 3.0

mg/mL 作为 EPS 干预组进行后续研究。未冷冻组作为新鲜对照组(fresh), 0 mg/mL 组作为空白对照组(control)。

### 2.2 冻后精子精子活力以及正常形态等相关参数的比较

精子冷冻后, PR 显著降低, 且空白对照组和淫羊藿多糖组之间无显著差异; 冷冻后, 精子存活率降

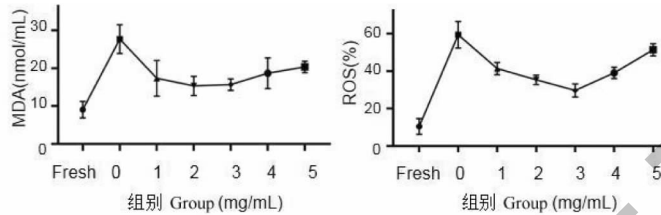


图 1 各组 MDA 含量以及 ROS 阳性细胞占比折线图

Fig. 1 The content of MDA and the percentage of ROS positive cells in each group  
注: Fresh: 新鲜对照组; 0: 空白对照组。Note: Fresh: Fresh control group; 0: Blank control group.

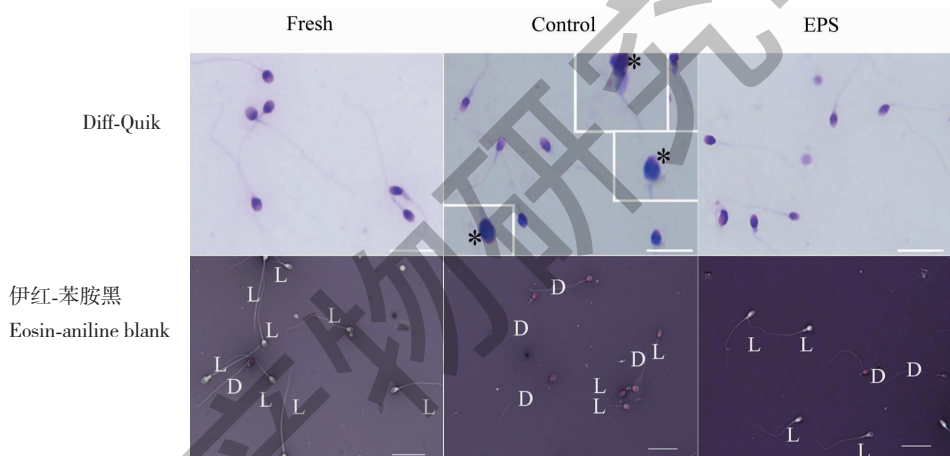


图 2 Diff-Quik 精子染色显示精子形态和伊红-苯胺黑染色检测精子存活率

Fig. 2 Diff-Quik sperm staining showed sperm morphology and eosin-aniline black staining to detect sperm survival rate

注: \* 表示精子顶体异常; 头部染成红色或暗粉色认为死精子(白色 D); 头部染成白色或浅粉色认为活精子(L); 标尺: 20  $\mu\text{m}$ 。Fresh: 新鲜对照组; Control: 空白对照组; EPS: 淫羊藿多糖组。Note: \* Abnormal acrosome structure of sperm; the head is dyed red or dark pink, which is considered dead sperm (white D); the head is dyed white or light pink, which is considered live sperm (L); Scale: 20  $\mu\text{m}$ . Fresh: Fresh control group; Control: Blank control group; EPS: *Epimedium polysaccharide* group.

表 1 精液冷冻复苏前后精子活力以及存活率( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 1 Sperm motility and survival rate before and after semen cryotherapy ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别<br>Group   | 前向运动精子百分率<br>PR (%)           | 存活率<br>Viability rates (%)     | 曲线速率<br>VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) | 直线速率<br>VSL ( $\mu\text{m/s}$ ) | 平均路径速率<br>VAP ( $\mu\text{m/s}$ ) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 新鲜对照组 Fresh   | 17.71 $\pm$ 4.64              | 31.07 $\pm$ 8.07               | 32.16 $\pm$ 4.37                | 16.42 $\pm$ 2.46                | 12.42 $\pm$ 4.80                  |
| 空白对照组 Control | 10.27 $\pm$ 3.83 <sup>#</sup> | 21.13 $\pm$ 6.67 <sup>#</sup>  | 20.17 $\pm$ 6.88 <sup>#</sup>   | 9.13 $\pm$ 1.58 <sup>#</sup>    | 9.95 $\pm$ 2.21 <sup>#</sup>      |
| 淫羊藿多糖组 EPS    | 10.83 $\pm$ 4.59 <sup>#</sup> | 25.61 $\pm$ 6.73 <sup>**</sup> | 26.08 $\pm$ 4.65 <sup>**</sup>  | 9.75 $\pm$ 3.46 <sup>#</sup>    | 10.83 $\pm$ 3.43 <sup>**</sup>    |

注: 与新鲜对照组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与空白对照组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with fresh, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with control, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ .

表 2 精子畸形率( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )Table 2 Sperm deformity rate( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

| 组别<br>Group   | 正常形态率<br>Normal morphology rate(%) | 头部畸形率<br>Head defects rate(%) | 中段畸形率<br>Neck and midpiece defects rate(%) | 主段畸形率<br>Principal piece defects rate(%) |
|---------------|------------------------------------|-------------------------------|--|--|
| 新鲜对照组 Fresh   | 4.2 ± 1.1                          | 81.3 ± 11.1                   | 15.2 ± 3.0                                 | 6.2 ± 2.5                                |
| 空白对照组 Control | 2.3 ± 0.6 <sup>#</sup>             | 93.4 ± 6.5 <sup>#</sup>       | 17.7 ± 3.2 <sup>#</sup>                    | 7.8 ± 2.3 <sup>#</sup>                   |
| 淫羊藿多糖组 EPS    | 3.2 ± 0.8 <sup>#*</sup>            | 88.7 ± 6.1 <sup>#*</sup>      | 17.2 ± 3.8 <sup>#</sup>                    | 7.6 ± 2.1 <sup>#</sup>                   |

注:与新鲜对照组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与空白对照组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。  
Note:Compared with fresh,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;Compared with control,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

低明显,淫羊藿多糖组显著高于空白对照组。VCL、VSL、VAP降低,且淫羊藿多糖组的VCL、VAP较空白对照组明显升高,但两组间VSL差异不显著(见表1)。

精子正常形态率空白对照组(2.3% ± 0.6%)较新鲜对照组(4.2% ± 1.1%)降低,EPS组(3.2% ± 0.8%)较空白对照组升高。畸形率统计结果显示,空白对照组头部畸形率,中段畸形率,主段畸形率较新鲜对照组显著升高,淫羊藿多糖组头部畸形率较空白对照组显著降低( $P < 0.05$ )(见图2、表2)。

### 2.3 精液冷冻后精子 DFI 及 AR 水平比较

精子染色质结构测定(SCSA)法评估精子DFI,并通过数据分析软件对流式结果进行了分析。绿色荧光是吡啶橙染料与双链DNA结合而发出的,吡啶橙染料与单链DNA结合发出红色荧光。如图3所示,精子冷冻后,空白对照组DFI(29.69% ±

6.62%)和淫羊藿多糖组的DFI(22.34% ± 5.32%)较新鲜组(8.47% ± 2.83%)明显增高( $P < 0.05$ ),且淫羊藿多糖组的DFI显著低于空白对照组( $P < 0.05$ )。采用凝集素免疫荧光染色法检测精子AR反应。钙离子载体A23187诱导顶体反应后,相对荧光强度减弱,显示为荧光峰向左移动;精子冷冻后,空白对照组AR(7.35% ± 1.92%)和淫羊藿多糖组AR(10.13% ± 2.79%)较新鲜组(12.36% ± 1.53%)明显降低( $P < 0.05$ ),且EPS组的AR显著高于空白对照组( $P < 0.05$ )(见图4)。

### 2.4 精液冷冻后精子线粒体微观结构观察

空白对照组表现为质膜肿胀,顶体膜溶解破损,不完整(见图5A);此外,精子细胞核受损,空泡增多(见图5-a2)。EPS组精子头部结构变化:透射电镜下可见精子质膜水肿,精子顶体膜保存完整,且精子顶体结构异常数量明显减少,精子细胞核结构异常数量减少(见图5B)。

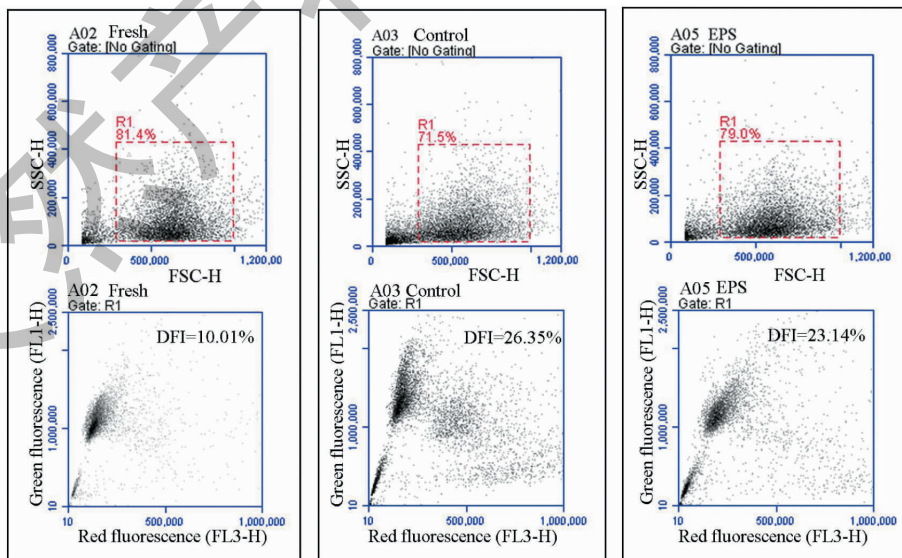


图3 流式细胞仪检测到的精子DFI

Fig. 3 Sperm DFI detected by flow cytometry

注:第一行:FSC/SSC点图(R1;目标细胞群);第二行:荧光散点图(FL1-H;绿色荧光;FL3-H;红色荧光)。Note:First row:FSC/SSC dot plot (R1;Target cell population);Second row:Fluorescence scatter plot(FL1-H;Green fluorescence;FL3-H;Red fluorescence)。

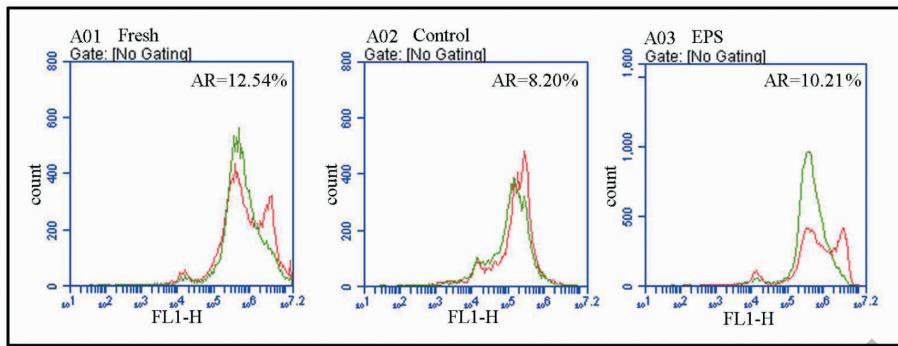


图4 精子顶体反应荧光直方图

Fig. 4 Sperm acrosome reaction histogram

注:红色:表示不存在钙离子载体(A23187)时精子中顶体的荧光分布直方图;绿色:表示存在钙离子载体(A23187)时精子中顶体的荧光分布直方图。Note:Red;the fluorescence distribution histogram of acrosome in sperm without calcium ion carrier (A23187);Green;fluorescence distribution histogram of acrosome in sperm with calcium ion carrier (A23187).

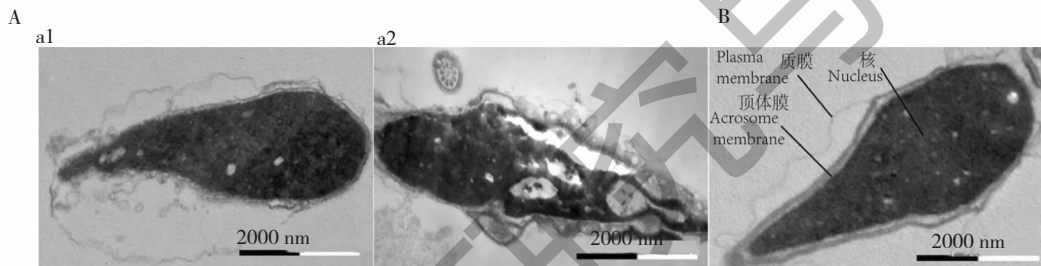


图5 精子头部显微结构图

Fig. 5 Detection of microstructure of sperm head

注:A:冷冻对照组;B:EPS组(比例尺:2 000 nm)。Note:A:The frozen control group;B:the EPS group(Scale bar:2 000 nm).

### 3 讨论

随着辅助生殖技术的发展,越来越多的研究表明,过量的氧化应激可诱导精子功能损伤,引起男性不育<sup>[10]</sup>。精液冷冻作为一种生育力保存的有效手段,在其冻融过程中,产生大量的活性氧,对精子的活力和功能产生不良影响<sup>[11-13]</sup>,进而影响辅助生殖技术的妊娠率。精子质膜因为富含多聚不饱和脂肪酸,易受氧化应激损伤。而且,氧化损伤能够导致精子质膜损伤、呼吸抑制、细胞内酶的缺失、轴丝蛋白损伤和线粒体膜损伤等<sup>[14]</sup>。冻融复苏后的精子结构明显受损,精子质膜完整性被破坏,核DNA受损,精子运动参数明显下降,精子功能受损,从而引起复苏后精子生育能力下降<sup>[15]</sup>。

随着细胞冷冻技术的发展,针对生殖细胞的冷冻保护剂也在不断优化中。研究人员通过添加抗氧化剂,来降低冻融产生的过量活性氧对精子的损害,取得了较为满意的效果<sup>[4-6,16,17]</sup>。一些来源于植物的天然抗氧化剂以其来源广泛、高效、低毒等特性受到研究者的重视。淫羊藿多糖,提炼自中国古老

药材淫羊藿,研究人员在山羊精液冷冻保护剂中加入3 mg/mL的淫羊藿多糖时,可有效降低冻融过程中活性氧的水平,提高冻融后的精子质量<sup>[18]</sup>,本课题研究也发现,3 mg/mL的EPS在人弱精精子冻融过程中,抗氧化性最佳,可有效降低活性氧的水平。但是随着EPS浓度超过3 mg/mL后,随着浓度的增高,其抗氧化性减弱。其原因可能是淫羊藿多糖的抗氧化能力并不是剂量越大越好,第一可能是当抗氧化剂清除或抑制自由基时,转换为另一种自由基,破坏了精液中ROS和防御体系的平衡,并打破了整个体系的抗氧化能力;第二可能是高浓度的抗氧化剂起到促氧化的作用,但目前其确切机制还不清楚,其机理有待于进一步深入研究<sup>[19]</sup>。在各组精子各项参数检测中,EPS组的精子PR值较空白对照组无明显差异,但是EPS组的精子活动参数(VCL、VAP)以及精子存活率较空白对照组升高显著。1 000倍光镜下,检查精子的正常形态,EPS组的正常形态较空白对照组明显好转,尤其是精子头部顶体区的畸形率明显减少。在透射电镜下,发现

冷冻可导致精子头部质膜明显肿胀,顶体膜溶解破损,正常膜结构消失,精子核区遭受损失,且空泡增多,这与LI研究结果相一致<sup>[18]</sup>。EPS组精子头部质膜超微结构明显改善,精子核区保存完整。我们通过检测精子DFI以及AR反应,发现EPS组的DFI较未添加EPS的空白对照组明显降低,AR值显著升高。通过上述研究,我们推测在精子冻融过程中加入EPS,减少了冻融过程中活性氧的产生,降低了其对精子质膜的影响,从而保证了精子质膜的完整,同时对精子头部顶体区和核DNA区起到了保护作用。

在本研究的精子处理过程中,精液液化后通过离心将精子从精液中分离出来,避免精液中非精子成分对精子结构和功能的负面影响。在冷冻前,用含LBP的BWV培养基中培养精子20 min,使LBP能够更好地与精子相互作用,以期获得更好的冻融效果。

淫羊藿是我国传统的药用植物,对于其活性提取物的研究也在不断进行中,研究发现淫羊藿黄酮体外具有良好的抗氧化效果<sup>[20]</sup>。本项研究致力于研究淫羊藿活性提取物的另外一种-淫羊藿多糖,发现在精子冷冻保护液中添加EPS可以降低精子冷冻损伤,改善冷冻后精子质量和功能,其作用可能与其降低精子内ROS水平从而减弱了其对精子膜结构的损害有关。

#### 参考文献

- Nie ZY, Wu HF, Zhang N, et al. Effects of male age on sperm oxidative stress level and nuclear DNA damage [J]. Chin J Fam Plann(中国计划生育学杂志), 2012, 20(1): 30-32.
- Trevor GC. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition [M]. Switzerland: WHO Press, 2010: 144-145.
- Zou YJ, Yang J, Chang S, et al. Acetyl-L-carnitine: An effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia [J]. J Huazhong Univ Sci Technol: Med Sci(华中科技大学学报:医学英德文版), 2017, 37: 915-921.
- Liu L, Wang MJ, Yu TH, et al. Protective effect of mitoquinone, a mitochondrial targeted antioxidant, on oxidative stress injury of human sperm during freezing thawing [J]. Natl J Androl(中华男科学杂志), 2016, 22: 205-211.
- Berkovitz A, Allouche-Fitoussi D, Izhakov D, et al. Cryopreservation of human sperm in the presence of Zn<sup>2+</sup> increases the motility rate [J]. J Obstet Gynecol Investig, 2018, 1(1): 6-12.
- Zheng JJ, Chen X, Zhang LY, et al. Protective effects of vitamin E and B12 on viability and DNA of frozen sperm [J]. J Reprod Med(生殖医学杂志), 2018, 27: 264-268.
- Zhao J, Chen W, Wei J, et al. Protective effect of icariin on renal function in diabetic nephropathy rats and related mechanisms [J]. J Immunol(免疫学杂志), 2020, 36(1): 74-79.
- Li QY, Chen SZ, Li B, et al. Antioxidant activity of *Epimedium* polysaccharide [J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2016, 12(18): 24-26.
- Xiang Y, Zhang J, Li H, et al. *Epimedium* polysaccharide alleviates polyglutamine-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* by reducing oxidative stress [J]. Rejuv Res, 2016, 20(1): 32-41.
- Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management [J]. Arab J Urol, 2019, 17(2): 87-97.
- Nekoonam S, Khodarahmian M, Amidi F, et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review [J]. Cell Tissue Bank, 2016, 17: 745-756.
- Igbokwe AA, Iyasere OS, Sobayo RA, et al. Comparative effect of slow and rapid freezing on sperm functional attributes and oxidative stress parameters of goat spermatozoa cryopreserved with tiger nut milk extender [J]. Reprod Domest Anim, 2019, 54: 551-559.
- Abdillah DA, Setyawan EMN, Oh HJ, et al. Iodixanol supplementation during sperm cryopreservation improves protamine level and reduces reactive oxygen species of canine sperm [J]. J Vet Sci, 2019, 20(1): 79-86.
- Gürler H, Malama E, Heppelmann M, et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm [J]. Theriogenology, 2016, 86: 562-571.
- Bui AD, Sharma R, Henkel R, et al. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility [J]. Andrologia, 2018, 50(8): e13012.
- Li SJ, Su WD, Qiu LJ, Wang Xiong, et al. Protective effect of resveratrol on human sperm freezing injury [J]. Natl J Androl(中华男科学杂志), 2018, 24: 499-503.
- Wang YH. Effect of four antioxidants on cryopreservation of goat semen [D]. Yangling: Northwest A & F University(西北农林科技大学), 2016.
- Li Y. Study on the cryopreservation effect of epimedium polysaccharide on goat semen [D]. Yangling: Northwest A & F University(西北农林科技大学), 2019.
- Fan XY, Zhang QQ, Li C, et al. Transformation of antioxidant activity to pro oxidation [J]. Food Drug(食品与药品), 2016, 18: 364-369.
- Zhang JL, Ding H, Song XB. Research progress on anti-aging effect of total flavonoids of *Herba Epimedium* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 339-343.