

哺乳动物精子质量的评价方法*

霍立军 杨增明**

(东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要: 精子的各种功能状态反应了精子的受精能力。检测精子质膜完整性的荧光探针有 SYBR-14、SYTO-17、CFDA、CDMFDA、CAM、PI、Hoechst 33258、Hoechst 33342, 其中以 SYBR-14 结合 PI 使用效果最好。检测线粒体活性的荧光探针有 JC-1、MITO、Rh123, JC-1 比 MITO 和 Rh123 更适用于检测精子线粒体功能。检测顶体状态的荧光探针有 PNA-FITC、PSA-FITC、LYSO-G 及 CTC 等。检测获能状态的荧光探针有 CTC。此外, 还可以通过检测精子与透明带的结合能力、精子穿入去透明带卵子的能力以及使卵子受精的能力和其后胚胎的发育能力等方面来评价精子的功能状态。

关键词: 精子; 获能; 线粒体; 顶体; 精子活力

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)02-89-05

Progresses on the Methods for Evaluating the Mammalian Sperm Quality

HUO Li-Jun YANG Zeng-Ming

(College of Life Science, Northeast Agricultural University Harbin 150030, China)

Abstract: All aspects of functions in spermatozoon reflect its fertility. The fluorescent probes for assessing the integrity of sperm plasma membrane include SYBR-14, SYTO-17, carboxyfluorescein diacetate (CFDA), carboxy dimethyl fluorescein diacetate (CDMFDA), calcein acetyl methyl ester (CAM), propidium iodide (PI), Hoechst 33258, and Hoechst 33342, of which SYBR-14/PI is the best method. The fluorescent probes for determining sperm mitochondria activity include JC-1, Mitotracker green FM(MITO), and rhodamine123 (Rh123), of which JC-1 is better than MITO and Rh123. Acrosome integrity of spermatozoa can be examined with PNA-FITC, PSA-FITC, LYSO-G and chlortetracycline (CTC). CTC is also used to identify whether sperm is capacitated. Moreover, sperm quality can also be predicted through binding oocyte, penetrating the zona-free oocyte, and fertilizing oocytes.

Key words: Spermatozoa; Capacitation; Mitochondria; Acrosome; Sperm viability

人工授精和体外受精技术对优良家畜如猪、马、牛和羊的繁殖, 挽救濒危动物以及解决人类的不孕症都有着极其重要的实践意义。在日常的生产实践以及实验室的研究工作中, 准确、客观地评价精子的功能状态可以节约雄性动物的遗传资源、减少精子用量和多精受精, 还可以最大限度地多生和优生。评价指标主要包括精子核状态、运动能力、形态特征、质膜完整性、顶体完整性、线粒体活性、获能以及与卵子的结合能力等。评价方法主要是利用光学显微镜、荧光显微镜以及流式细胞记数仪(flow cytometry)等仪器, 应用常规染色或荧光染色技术以及精卵受精能力分析来检测精子

的功能状态。在国外, 大多数方法都已用于日常的生产实践或实验室的科学研究。当然, 精液还有常规的检查方法和指标, 如精液量、精子密度、精子运动力和形态等方面, 这里就不详细叙述。下面就上述这些方面的最新方法在生产实践和实验研究工作中的优缺点、相关性以及最新的研究进展作一扼要叙述。

* 国家杰出青年科学基金资助项目(No. 39825120);

** 通讯作者, E-mail: zmyang@mail.neau.edu.cn;

第一作者介绍 霍立军, 男, 25岁, 硕士研究生; 研究方向: 生殖生物学。

收稿日期: 2001-06-23, 修回日期: 2001-11-12

1 质膜完整性

目前认为精子质膜完整性是其死活的一个间接指标。常规染色方法主要有伊红-苯胺黑、三重染色技术、吉姆萨等^[1]。死精子特异性荧光探针有碘化丙锭(PI)、溴化乙锭(EB)、溴乙非啶二聚体(ethidium homodimer, EH)和 Hoechst 33258 等,活精子特异性荧光探针有羧基荧光素双醋酸盐(carboxyfluorescein diacetate, CFDA)、羧基二甲基荧光素双醋酸盐(carboxy dimethyl fluorescein diacetate, CDMFDA)、钙黄绿素乙酰基甲基酯(calcein acetyl methyl ester, CAM)、Hoechst 33342、SYTO-17 和 SYBR-14^[2, 3]。这两种类型的荧光探针一般结合使用,从而使死精子和活精子能够同时得到鉴定。

在普通染色技术中,伊红染色、伊红-苯胺黑(eosin-nigrosin stain)和台盼兰(typan blue stain)染色是最常用的活体常规染色技术。这些方法已经广泛应用于人、猪、牛和兔等动物精子检测中。最近,吉姆萨和台盼兰的结合染色已经应用于牛、猪和兔的精子检测中;俾斯麦棕和玫瑰红双重染色已经应用于人精子的检测;俾斯麦棕、玫瑰红和台盼兰的结合染色技术已经应用于人和小鼠、马、羊、猪等动物的精子检测。这些方法比较繁琐,而且高估了死精子的比例。在不同的实验室中,利用这些方法的检测结果有很大差异。伊红-苯胺黑-吉姆萨结合使用可信度比较高且简单易行,目前已经广泛应用于日常工作中^[1]。

EB、EH、PI 和 Hoechst 33258 都是死精子特异性的荧光探针。Pintado 等对猪和牛精子的研究结果说明,PI 阳性染色的精子比例要明显高于 Hoechst 33258 阳性染色的精子比例,也高于伊红染色阳性的精子比例,而 Hoechst 33258 和伊红阳性染色的精子比例没有什么差别。这说明 PI 鉴定死精子比例的能力与 Hoechst 33258 和伊红有所差异,一般认为 PI 阳性精子的比例要高于死亡精子的比例。在用这些方法鉴定精子死活或活率等功能指标时,或者与其它指标结合分析时都应该考虑这些因素。Hoechst 33258 结合金霉素(CTC)技术可以同时鉴定精子的死活、获能和顶体完整性(Hoechst 33258 阳性染色即为死精子,再根据 CTC 的染色类型可以分为未获能、获能和获能后的顶体反应三种类型),因此值得推广使用^[1]。

CAM、CFDA 和 CDMFDA 都是各种非特异性酯酶的底物,它们是非荧光物质,能够进入细胞内,容易被活精子细胞内的非特异性酯酶水解,其产物则具有荧光性,发绿色荧光,不能进入细胞外。因此具有完整细胞膜的精子发绿色荧光。利用 CFDA 和 CDMFDA 估计精

子质膜完整性都需要严格的时间限制,因为细胞内荧光随着时间的增长而不断增强。SYBR-14 则能够在不到 15 min 内与核酸达到平衡,所以很稳定。活精子被 CDMFDA 染色而线粒体被 Rh123 染色的精子样品往往由于细胞外酯酶的存在有严重的背景颜色。总之,应用 SYBR-14 鉴定精子死活比应用酯酶水解基础上的染色有两大优点:不受染色时间影响,背景染色也不存在^[2]。Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 也能区分死精子和活精子,但需要配备紫外光源才能激发蓝色荧光,一般认为紫外光源对精子细胞的功能和 DNA 完整性有损伤,SYBR-14 却完全解决了这些问题。

SYBR-14 和 CFDA 可用于精子活体染色,而且不影响精子的受精能力和胚胎的发育能力^[2]。目前已经应用于牛、猪、羊、马、兔、小鼠、猫、虎、南美栗鼠、火鸡以及鱼类等动物的精子活率鉴定。但它只能鉴定活精子,因此一般结合 PI 等死精子特异性荧光探针使用^[2]。Garner 等报道应用 PI 和 CFDA 技术染色冷冻-复苏的牛精子,其流式细胞记数仪分析结果与传统精子评价指标高度相关。Nationaux 等报道利用 SYBR-14/PI 双重染色检测冷冻后复苏的马精子,其 PI 阳性精子比例和 SYBR-14 阳性精子比例高度负相关。

这些鉴定精子死活的染色技术最后产生三个不同的精子类型:1)活精子核激发绿荧光,为 CFDA 或 SYBR-14 阳性染色;2)死精子核激发红色荧光,为 PI 阳性染色,CFDA 或 SYBR-14 阴性染色;3)精子头前端激发绿色荧光而后端激发红色荧光,这是 PI 阳性染色而 CFDA 或 SYBR-14 也是阳性染色的精子类型,此时正是精子从活向死过渡的状态,以后随着精子死亡的不定期进行(即质膜完整性的不断破坏),PI 则逐步占据绿色荧光,最后都变成红色荧光^[3]。SYTO-17 染色阳性的活精子激发红色荧光,它和 PI 的结合使用已经应用到牛精子的死活鉴定,但容易产生背景着色,也不容易区分这两种类型的红色荧光^[3]。总之,这些结果说明,这两种荧光染料的使用是评价各种动物精子活率的一个有效方法,和传统的精子质量评价方法一样都具有很高的相关性^[2]。目前认为 SYBR-14/PI 是最适合于各种动物精子死活鉴定的荧光探针。

检测精子质膜功能完整性的另一种方法是低渗膨胀实验(hypoosmotic swelling test, HOST)。精子细胞膜的一个重要特性是允许分子选择性通过。当精子存在于低渗溶液中时,精子质膜外的水分子将进入精子以达到细胞内外渗透压的平衡,水分子的进入将增大精子的体积。在低渗溶液中精子尾巴发生膨胀弯曲,说明精子质膜功能是完整的^[4]。这种方法具有廉价、快速

和简单的优点,目前已经用于人和牛、猪、羊、狗、小鼠等动物的精子质膜功能完整性的检测^[5,6]。

2 线粒体活性

精子的运动能力与其线粒体活性密切相关,线粒体能够不断产生精子运动所需要的 ATP 来提供能量。所以线粒体的功能状态是精子功能质量的一个关键指标。检测线粒体活性最常用的特异性探针是若丹明(Rh123)、Mitotracker green FM(MITO)和 JC-1^[7]。前两种探针染色阳性精子的线粒体部位发绿色荧光,JC-1 染色为绿色或红-桔红色荧光,这是精子线粒体因功能状态不同而使线粒体膜具有不同的电位,即线粒体的低电位和高电位不同而造成 JC-1 在线粒体上形成单体,从而发射绿色荧光,或者形成聚合体而发射红-桔红色荧光。JC-1 聚集体的形成依赖于染料浓度、离子强度、温度和 pH 值等化学环境^[7]。JC-1 似乎比另外两种荧光更能准确区分线粒体的活性状态。这些探针通常和上面所提到的精子活力探针结合使用。目前,这些荧光探针已经应用在大鼠、马、牛、羊和猪等动物精子的线粒体功能检测中,其线粒体染色阳性精子的比例和活精子染色阳性的精子比例正相关,或者和死精子阳性比例负相关,或者和运动精子比例正相关,这三种染料染色结果本身也正相关^[8-10]。

Rh123 是一种阳离子成分,精子中 Rh123 染色阳性部位并不只是特异性分布在精子的线粒体鞘上,在头部质膜,以及尾部非线粒体鞘上也有稍弱的阳性染色。其染色是否激发绿色荧光依赖于线粒体跨膜电位、精子数目和 Rh123 浓度,而不依赖于时间和温度^[7]。过去和 EB 结合使用检测精子质量。具有线粒体膜电位的精子被 Rh123 染色成绿色,而膜被破坏,已经死亡的精子则吸收 EB,因此可以鉴定精子质量。同样地,Rh123 也与 PI 结合来鉴定活精子和死精子。JC-1 在精子线粒体上的染色特异性很好,在牛和猪的精子中,其染色阳性部位只分布在精子的尾部线粒体鞘上。MITO 在水溶液中是非荧光性的,在线粒体上聚集发绿色荧光,不依赖于线粒体的膜电位。据报道,MITO 染色后的精子可以用于体外受精^[7]。

3 精子获能和 Ca^{2+} 内流

精子获能过程中一个主要的事件是 Ca^{2+} 内流到精子细胞内。这种内流通常伴随精子质膜成份改变和细胞内 pH 值升高,最终导致顶体反应发生。Harrison 等利用荧光探针 fluo3-AM 检测 Ca^{2+} 内流,同时用 PI 估计精子的活率,从而验证了各种体外受精所用的获能培

养液都有 Ca^{2+} 内流。CTC 能够进入细胞内包含高水平 Ca^{2+} 的区间,能与 Ca^{2+} 结合。CTC- Ca^{2+} 复合物容易与细胞膜内的疏水区结合,荧光显微镜下激发黄绿色荧光,能够说明获能过程中精子各时期 Ca^{2+} 短暂的变化和分布规律。获能精子和不获能精子的染色类型有所不同,精子 CTC 染色类型主要有三种:1)F 型,整个精子头部有均一荧光,为未获能,顶体完整的精子;2)B 型,精子头部顶体后区,在靠近尾部的部分无荧光或非常弱的荧光,而头前部为均一荧光,为获能且顶体完整的精子;3)整个精子头部无荧光或非常弱的荧光,为顶体反应的精子。三种染色类型的精子尾部中段都有均一荧光。所以,CTC 不但可以检测精子获能的比例,还可以检测精子顶体反应的比例。虽然 Ca^{2+} 在顶体反应过程中似乎起重要作用, Ca^{2+} 内流可能发生于精子获能过程后期阶段的变化中,随着精子细胞膜的去稳定和 Ca^{2+} 内流的不断进行,精子细胞应该不断增加 B 型比例。目前 CTC 已经用于人和猴、小鼠、山羊、马、猪、牛等许多动物中检测精子的获能比例^[11,12]。此外,CTC 还可以用于检测一种物质是否对精子获能有作用及研究获能的分子机制,如 CTC 已经用于说明受精促进肽和腺苷能够在体外促进小鼠和猪精子获能,却抑制顶体反应^[13],血小板激活因子能够在体外促进小鼠精子获能^[14]。

4 顶体状态

哺乳动物精子的顶体反应是受精过程中很重要的一个过程。在受精之前,具有完整顶体的精子是受精成功与否的关键。考马斯亮蓝染色是用于评价精子顶体完整性的一种简单方法,直接染色后就可以在光学显微镜下观察。目前已用于评价人和小鼠、仓鼠、兔、牛以及猪等动物精子的顶体状态^[15]。

目前,利用异硫氰荧光素(FITC)标记的外源植物凝集素可以检测精子的顶体状态,如 FITC-植物血凝素(RCA)-II、FITC-豌豆凝集素(PSA)、FITC-花生凝集素(PNA)和 FITC-伴刀豆素(ConA),它们都能检测精子顶体的破坏程度。RCA-II 有剧毒,且不能鉴定死精子和活精子,所以没有应用前景。FITC-PSA 已经用于人和马、牛等动物精子的顶体检测。在牛中,有人认为 FITC-PSA 结合于已经发生顶体反应的精子上,也有人认为它结合在顶体完整的精子上,所以它很难用于准确评价牛精子的顶体状态。FITC-ConA 可以用于评价人精子的顶体状态,顶体完整的牛精子不着色,顶体反应后,FITC-ConA 在顶体区有特异着色。在牛和猪精子中,FITC-PNA 检测顶体状态的结果与精子直线运动精子

数、LYSO-G 染色阳性精子数、精子头粒蛋白/IgG、以及 HOST 等方法都高度相关,现在已经用电子显微镜证实了这种方法的可靠性^[3]。Meyers 等对孕酮处理过的精子样品用 FITC-PSA 染色来检测顶体反应精子的百分率,可以区分具有受精能力的精液和弱受精能力的精液。FITC 与植物凝集素结合染色的方法比一般方法更能准确地区分精子的顶体状态。

Amin 等对利用 CTC、荧光素标记的甘露糖化的 BSA、奎纳克林三种方法检测人精子的顶体反应的结果进行了比较。发现奎纳克林检测的是顶体反应的起始阶段,而 CTC 和甘露糖化的 BSA 检测的是精子顶体帽失去的后期阶段^[6]。LYSO-G 也是一种检测精子顶体状态的荧光探针,是一种嗜酸性探针,激发荧光为绿色,通常和 PI 结合使用^[5]。

5 受精能力检测

精子质膜完整性的重要性也反映在其它与受精相关的体外功能检测中,如结合并穿入同源透明带的能力、使卵子受精并发育成胚胎的能力。这些检测更能准确地评价精子进行获能、顶体反应和核去致密化以及受精后胚胎的发育能力^[17]。

由于卵子周围一般被透明带包围,所以透明带是体内受精的第一个屏障。在精子与卵子质膜融合并进入卵细胞前,精子必需贴附、结合并穿入同源的透明带内,这种结合是由透明带和精子上的亲合素-受体介导的,这也是透明带结合分析的理论基础。可以利用溶解的透明带或半透明带结合来分析(HZA)。后一种方法需要把透明带等分切割,然后估计透明带外表面上结合的精子数目,因此有一定的难度,目前已经应用于人、马和猪精子能力分析^[18]。而应用完整的卵子则会因为有些动物不容易获得大量卵子,可能因为卵子数目较小而影响最后结果的可靠性。此外,由于卵子是圆形的,结合的精子则不是均一分布的,但只能在一个平面对卵子周围结合的精子进行计数,所以这种方法也有一定的局限性。因为大多数与透明带结合的精子形态正常,所以精子与透明带结合分析能够准确评价精子的受精能力。只要能获得足够的卵子且方法适用,透明带结合分析是一种检测精子受精能力的非常有应用前景的功能性方法。利用溶解的透明带分析则可以克服另外两种方法的缺点,如可以研究结合透明带的单个精子,从而可以克服整个透明带结合位点的变化带来的结合精子数目不准确问题,最后可以通过流式细胞计数仪定量估计结合于透明带上的大量精子,从而是最有应用前景的方法^[19]。

体外精子穿入去透明带卵子的能力检测也是一种估计精子受精能力的分析方法。该方法主要利用去透明带仓鼠卵或者同源动物的卵子来分析。目前已经用于估计人和牛、猪、大鼠、小鼠等动物精子的受精能力,且与其受精能力显著相关^[20,21]。因为有一些动物的卵子在排出时是未成熟的、裸露的,因而没有生理活性。因此在某些动物物种中,这种方法的结果可能会过高估计精子的受精能力。此外,这种方法也可以与精子-透明带穿入分析结合使用,只有那些经长时间孵育后穿入透明带的精子才被计数。

6 结语与展望

以上所提到的检测质膜完整性、顶体完整性、线粒体活性以及获能的荧光探针染色技术具有简单、易行和可靠等特点。在研究精子获能、顶体反应、精子处理以及精液品质评价中具有很高的应用价值。如果能够结合流式细胞记数仪来分析和计数则能更为准确客观地评价精子的功能状态,因为可以在很短时间内对大批精子进行检查,而且增加了分析的客观性。但这种仪器昂贵,限制了它在实际生产中的应用。如果利用荧光显微镜,可以进行人工检测和计数,但只有非常小的一部分精子能够被分析,而且由于人工观察的主观性,故其准确性不高。

利用体外方法准确评价精子的受精能力和功能状态是体外受精和人工输精技术成功的关键,还可以减少每次输精的精子量,不但可以减少多精入卵的数目,还能达到最优利用优良遗传资源的目的。随着家畜动物精子体外保存技术的进步,必然伴随着体外评价精子功能状态方法的进步。但是直到目前为止,还没有单独一种体外分析方法能够准确评价精子的功能状态,必须几种方法结合使用才能比较准确地评价精子的功能状态。如检测精子质膜完整性、顶体完整性和线粒体功能等方面的结合,特别是检测受精过程相关的膜区的完整性。此外,利用透明带结合分析、穿卵实验和体外受精技术一般都能够更为准确地评价精子的功能状态,因此很有应用前景,但这些方法依赖于实验室技术条件的可重复性。

参 考 文 献

- [1] Pintado B, Fuente J de la, Roldan E R. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil*, 2000, 118(1): 145 ~ 152.
- [2] Garner D L, Johnson L A. Viability assessment of mammalian

- sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, 1995, **53**(2): 276 ~ 284.
- [3] Thomas C A, Garner D L, DeJarnette J M *et al*. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 1997, **56**(4): 991 ~ 998.
- [4] Malmgren L. Assessing the quality of raw semen. *Theriogenology*, 1997, **48**: 322 ~ 328.
- [5] Nie G J, Wenzel J G. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 2001, **55**(4): 1 005 ~ 1 018.
- [6] Zou C X, Yang Z M. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. *Theriogenology*, 2000, **53**: 1 477 ~ 1 488.
- [7] Garner D L, Thomas C A, Joerg H W *et al*. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 1997, **57**(6): 1 401 ~ 1 406.
- [8] Garner D L, Thomas C A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev*, 1999, **53**(2): 222 ~ 229.
- [9] Gravance C G, Garner D L, Baumber J *et al*. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 2000, **53**(9): 1 691 ~ 1 703.
- [10] Gravance C G, Garner D L, Miller M G *et al*. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol*, 2001, **15**(1): 5 ~ 10.
- [11] Collin S, Sirard M A, Dufour M *et al*. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the *in vivo* fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl*, 2000, **21**(6): 938 ~ 943.
- [12] Dinkins M B, Brackett B G. Chlortetracycline staining patterns of frozen-thawed bull spermatozoa treated with beta-cyclodextrin, dibutyl cAMP and progesterone. *Zygote*, 2000, **8**(3): 245 ~ 256.
- [13] Funahashi H, Asano A, Fujiwara T *et al*. Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**(1): 117 ~ 124.
- [14] Huo L J, Yang Z M. Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 2000, **56**(3): 436 ~ 440.
- [15] Larson J L, Miller D J. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev*, 1999, **52**: 445 ~ 449.
- [16] Amin A H, Bailey J L, Storey B T *et al*. A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1996, **11**(4): 741 ~ 745.
- [17] Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Zhang B R *et al*. *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J Reprod Dev*, 1997, **43**(1): 1 ~ 11.
- [18] Fazeli A R, Holt C, Steenweg C *et al*. Development of sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology*, 1995, **44**(1): 17 ~ 27.
- [19] Strom Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C *et al*. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil*, 2000, **119**(2): 201 ~ 206.
- [20] Maleszewski M, Kline D, Yanagimachi R. Activation of hamster zona-free oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1995, **105**: 99 ~ 107.
- [21] 石其贤,袁玉英.精子获能及其发展.生理科学进展, 1998, **50**(3): 326 ~ 332.