

异氟烷对体外精子超微结构的影响^{*}

郑立宏¹, 杨 丹^{2**}, 高晓勤³, 丁贤胜⁴, 孙 发⁵

(1. 贵阳护理职业学院, 贵州 贵阳 550081; 2. 贵州医科大学 外科学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563002; 4. 六盘水市人民医院, 贵州 六盘水 553001; 5. 贵州医科大学附院 泌尿外科, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨异氟烷在体外对人类精子超微结构的影响。方法: 收集 24 例精液常规正常的男性精子标本, 每例精液均分成 3 份, 分别给予 1.1% 异氟烷(A 组)、2.2% 异氟烷(B 组)和空气(C 组), 并放置于孵箱培养 5 h, 采用扫描电镜观察各组精子的超微结构改变, 计算异氟烷处理后顶体完整率、头部及尾部畸形率。结果: 用异氟烷孵育后, 头部及尾部畸形、顶体凹陷的精子数量增多; A、B 组精子顶体完整率低于 C 组、头部及尾部畸形率高于 C 组, 其中 B 组精子形态异常情况较 A 组更为严重, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 异氟烷可影响精子形态, 且随着异氟烷浓度增加, 精子形态改变越来越明显。

[关键词] 异氟烷; 生殖功能; 精子; 超微结构; 扫描电镜

[中图分类号] R699 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)07-0754-03

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.07.003

Effects of Isoflurane on Ultrastructure of Human Sperm *in Vitro*

ZHENG Lihong¹, YANG Dan², GAO Xiaoqin³, DING Xiansheng⁴, SUN Fa⁵

(1. Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550081, Guizhou, China; 2. Surgery Department of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563002, Guizhou, China; 4. People's Hospital of Liupanshui, Liupanshui 553001, Guizhou, China; 5. Urology Department of the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of isoflurane on ultrastructure of human sperm *in vitro*. **Methods:** 24 normal male sperm samples were collected. Each was divided into three groups and placed respectively in three tubes: 1.1% isoflurane (group A), 2.2% isoflurane (group B) and air (group C). All of the tubes were placed in the incubator for 5 hours. The ultrastructural changes of sperms were observed by electron microscopy scanning to calculate the acrosome integrity rate, head and tail deformity rate. **Results:** After incubation with isoflurane, the number of sperms with head and tail deformity, and the acrosomatic depression increased. The sperm acrosome integrity rate in group A and B was lower than that in group C, and the head and tail deformity rate was higher than that in group C. The abnormal morphology of sperms in group B was more serious than that in group A. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** As the isoflurane concentration increases, changes of sperm morphology have become increasingly obvious with the integrity of sperm acrosome decreased and sperm deformity rate increased.

[Key words] isoflurane; reproductive function; sperm; ultrastructure; scanning electron microscope

^{*}[基金项目] 国家自然科学基金(81360097); 贵州省科学技术厅研究项目[黔科合 LH 字(2014)7087]

^{**} 通信作者 E-mail: yangdan@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2018-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180718.1503.024.html>

近年来,生殖健康问题被广泛关注,研究者开始探讨影响生殖健康的医源性因素。目前,临床关于吸入性麻醉药对生殖功能影响的研究,主要集中在孕妇接触麻醉气体方面^[1],很少有关于吸入麻醉药对男性生殖功能影响的研究报道。异氟烷是临床常用的吸入性全身麻醉药,在临床广泛使用,但关于异氟烷是否会对男性生殖能力造成影响,目前少见报道,本研究通过观察两种异氟烷浓度环境下人类精子超微结构的变化,探讨吸入性麻醉药对男性生殖功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1% 饿酸、3% 戊二醛、Epon812 环氧树脂醋酸铀、精子培养 HTF 液及异氟烷,S3400N 扫描电镜、计算机精液分析系统、有机玻璃箱及孵箱。

1.2 精子悬液制备

24 份实验标本提供者年龄为 23 ~ 38 岁,平均 (30.28 ± 7.72) 岁,排除心、肾等系统严重疾病。取样本前禁欲 3 ~ 5 d,48 h 内未服用可能会对精子产生影响的药物或食物,采用手淫法取精。

1.3 分组

将 24 例精液标本,每例精液均分成 3 份,放置于 3 个试管中,分别给予 1.1% 异氟烷(A 组)、2.2% 异氟烷(B 组)和空气(C 组)。将培养皿分别放在不同的有机密闭玻璃箱,把含 5% CO₂、95% 空气的混合气体作为载气,调节挥发罐的刻度,把所有的有机玻璃箱放置于 37 ℃ 的孵箱中,保

持恒定温度,培养 5 h。

1.4 方法及观察指标

将孵育后各组精子标本取出后,用 PBS 液洗涤 3 次并离心,2 000 r/min,每次 10 min;离心后用 3% 戊二醛固定 3 h,PBS 再洗涤 3 次并离心,2 000 r/min,每次 15 min;1% 饿酸再固定 0.5 h,PBS 再洗涤 3 次并离心,2 000 r/min,每次 15 min;乙醇梯度脱水、100% 的醋酸异戊酯置换乙醇 3 次,每次 10 min;用吸管吸取管底液 2 ~ 3 滴,滴到盖玻片上涂片;JEE - 5B 真空冷冻干燥机干燥、离子溅射仪喷金,用 S3400N 扫描电镜观察。扫描电镜观察各组精子的形态,计算各组精子的顶体完整率、头部及尾部畸形率。

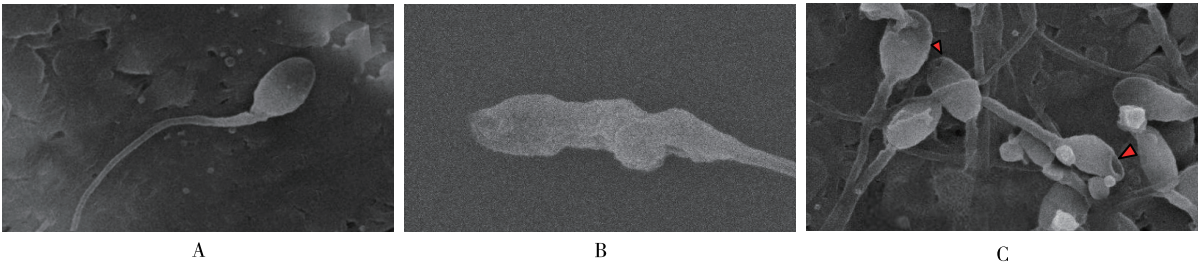
1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行方差分析和 *t* 检验。实验数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电镜下精子形态

正常精子头部形态:正面观呈卵圆形,侧面观呈梨形,边界清楚,边缘整齐,局部无隆起,无颗粒黏附,顶体饱满,不出现变扁和凹陷。正常精子尾部形态:自然弯曲、无断裂,无线粒体鞘肿胀或缺损。经过异氟烷孵育后头部及尾部畸形精子数量增多。头部畸形表现:形态异常,边界不清,局部隆起,顶体出现变扁和凹陷。尾部畸形表现卷曲、断裂,线粒体鞘肿胀或缺损。见图 1。



注:A 为正常精子,B、C 为异氟烷处理后精子,B 中可见精子头部形态明显异常,C 中可见精子顶体凹陷

图 1 电镜下正常精子及异氟烷处理后精子形态(6 000 ×)

Fig. 1 Morphology of normal sperm and isoflurane treated sperm

2.2 精子异常率

用异氟烷孵育后,A、B 组精子顶体完整率低

于 C 组、头部及尾部畸形率高于 C 组,其中 B 组精子形态异常情况较 A 组更为严重,组间比较,差异

有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同浓度异氟烷孵育后精子顶体完整率、
头部及尾部畸形率($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Different concentrations of isoflurane on
acrosome integrity rate, and head and
tail deformity rate

组别	n	顶体完整率	头部畸形率	尾部畸形率
A 组	24	85.42 ± 8.12 ⁽¹⁾	21.89 ± 6.14 ⁽¹⁾	25.43 ± 5.12 ⁽¹⁾
B 组	24	51.27 ± 6.86 ⁽²⁾	36.59 ± 6.96 ⁽²⁾	38.67 ± 5.96 ⁽²⁾
C 组	24	93.48 ± 5.97	12.68 ± 5.71	9.59 ± 3.53

与 C 组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

3 讨论

目前,关于全身性麻醉药物对生殖毒性的研究仍处于起始阶段,对吸入性麻醉药的研究结果存在争议,病理机制也未能完全阐释;尤其是吸入性麻醉药对男性生殖的影响国内外鲜有报道。精子形态结构与精子的功能活动密切相关,电镜是目前精子形态学检测最客观可信的依据^[2],应用扫描电镜对精子形态进行观察,可以了解精子表面的结构细节,阐明光镜未能观察到的精子超微病理缺陷,有助于某些男性不育患者的病因学分析^[3-5]。

有研究报道雄性小鼠反复地吸入异氟烷能够导致精子的畸形率明显增多,而形态正常的精子其顶体完整率较高,精子畸形往往伴有顶体不完整性^[6-8]。郑立宏等^[9]研究发现精子畸形率增加,精子顶体的完整率下降,从而影响男性生育力;高松城等报道^[10]精子畸形会降低顶体反应,影响受精,导致男性生育力降低;刘锦宏等^[11]报道畸形精子增多会伴有顶体不完整,进而影响顶体酶释放,可能是影响男性不育的原因之一。王瑞雪等^[12]认为精子顶体形态分析可作为男性不育症的诊断指标之一。因此顶体完整与否与男性生殖功能有密切的关系。本课题运用不同浓度异氟烷体外作用于正常精液标本,通过扫描电镜观察其对人精子形态结构的影响,结果显示随着异氟烷浓度增加,异氟烷对精子形态结构改变越来越明显,精子顶体完整率越来越降低,精子畸形率越来越增高,说明异氟烷可降低男性生殖功能。

综上所述,异氟烷导致精子顶体完整率降低,精子畸形率增加,从而影响男性生育力。本研究结果对有生育要求的男性患者临床应用麻醉药物有一定的指导意义。

4 参考文献

- [1] SM OLFERT. Reproductive outcomes among dental personnel a review of selected exposures [J]. J Can Dent Assoc, 2006, 72(9): 821-825.
- [2] 高晓勤,刘鲜林,杨文庆. 不育男性精液中精子头部及尾部超微结构的研究[J]. 贵阳医学院学报, 2003, 28(4): 286-289.
- [3] LIAKATAS J, WILLIAMS A E, HARGREAVE T B. Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope [J]. Fertil Steril, 1982, 38(2): 227-232.
- [4] ZAMBONI L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility; the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality [J]. Fertil Steril, 1987, 48(5): 711-734.
- [5] BACCETTI B, CAPITANI S, COLLODEL B, et al. Recent advances in human sperm pathology [J]. Contraception, 2002, 65(4): 283-287.
- [6] 王兰兰. 吸入麻醉药急性暴露对人精子运动、体外获能和顶体反应的影响[D]. 温州: 温州医学院, 2011.
- [7] 蔡放. 全身麻醉药对人精子运动功能和顶体反应的影响[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [8] 李大文, 孟繁华, 韩伟. 精子顶体完整率对男性生育功能的影响. 山东医药, 2010, 50(15): 71-72.
- [9] 郑立宏, 杨丹, 高晓勤. 有机磷农药对精子顶体内透明质酸酶的影响[J]. 解剖学杂志, 2014, 37(5): 636-638.
- [10] 高松城, 谢春雨, 陈艳, 等. 精子形态、精子 DNA 碎片指数和精浆锌对体外受精-胚胎移植妊娠结局的影响[J]. 超期刊, 2017, 6: 369-371.
- [11] 刘锦宏, 李小珍. 男性不育症患者精液质量与精子顶体酶活性关系分析[J]. 长治医学院学报, 2013, 27(2): 125-127.
- [12] 王瑞雪, 刘睿智, 许宗革, 等. 顶体形态与精子活力、活率关系分析[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(8): 1210-1212.

(2018-04-02 收稿, 2018-07-03 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张文龙