



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114885940 A

(43) 申请公布日 2022.08.12

(21) 申请号 202210620964.0

(22) 申请日 2022.06.01

(71) 申请人 重庆医科大学附属第一医院

地址 400016 重庆市渝中区袁家岗友谊路1号

(72) 发明人 孟江萍 郝小玲 刘西茹 辛贵邦

陈莹 王虹 黄润 叶柳

(74) 专利代理机构 重庆渝之知识产权代理有限公司

公司 50249

专利代理师 彭周

(51) Int.Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

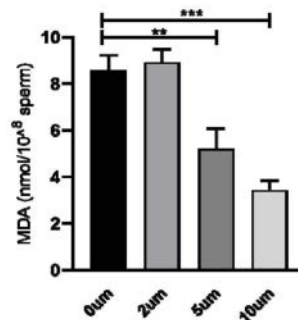
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

Fer-1在制备精液冷冻保护剂中的应用

(57) 摘要

本发明属于辅助生殖技术领域,具体公开了Fer-1在制备精液冷冻保护剂中的应用。本发现在常规精液冷冻保护剂中添加Fer-1,可以在保护细胞存活率的同时,降低该过程中的氧化应激损伤,改善冻融后精子功能;基于此,本发明提供了一种性能优异的新型精液冷冻保护剂,配合快速冷冻和快速解冻的方法,可以在维持冻融精子内外渗透压的同时,减少精子氧化损伤,降低精子线粒体损伤,有效改善冻融精子复苏后的前向运动能力和存活率。



1. Fer-1在精液冷冻保护中和/或在作为精液冻存保护添加剂和/或在制备精液冷冻保护剂中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于: Fer-1在精液冷冻保护剂中的浓度为2~10 $\mu\text{mol/L}$;

和/或,所述精液冷冻保护剂为卵黄、甘油复合型冷冻保护剂。

3. 一种精液冷冻保护剂,其特征在于:包括Fer-1。

4. 根据权利要求3所述的精液冷冻保护剂,其特征在于:所述精液冷冻保护剂包括2~10 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1;

和/或,所述精液冷冻保护剂为卵黄、甘油复合型冷冻保护剂。

5. 根据权利要求4所述的精液冷冻保护剂,其特征在于:所述精液冷冻保护剂还包括卵黄、甘油、葡萄糖、柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物;

和/或,所述精液冷冻保护剂的pH值为6.8-7.2。

6. 根据权利要求5所述的精液冷冻保护剂,其特征在于:所述精液冷冻保护剂包括以下浓度的成分:15~25%卵黄、15~25%甘油、15 \pm 0.5g/L葡萄糖、15 \pm 0.5g/L柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物。

7. 根据权利要求3~6任一项所述的精液冷冻保护剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将Fer-1溶于二甲基亚砷中,制成Fer-1溶液,将Fer-1溶液加入卵黄、甘油复合型冷冻保护剂中,制得精液冷冻保护剂。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述卵黄、甘油复合型冷冻保护剂的制备方法包括如下步骤:将葡萄糖、柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物加入水中,混匀;然后加入甘油,混匀后过滤;再加入卵黄,制成悬浮液;接着进行加热搅拌;最后检测pH值使之在6.8-7.2之间。

9. 根据权利要求3~6任一项所述的精液冷冻保护剂和/或根据权利要求7~8任一项所述的方法制备得到的精液冷冻保护剂在精液冷冻保护中的应用。

10. 一种精液冷冻保护方法,其特征在于:采用含Fer-1的精液冷冻保护剂。

Fer-1在制备精液冷冻保护剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及辅助生殖技术领域,特别是涉及Fer-1在制备精液冷冻保护剂中的应用。

背景技术

[0002] 精液冻存既是临床上用于辅助生殖的常规技术手段,也是人类精子库的日常任务,对于广大不育的男性患者,如无精子症或者少弱精症患者以及有生育需求的癌症患者来说意义重大,然而在精液冻存过程中可造成精子质量降低的不可逆损伤,其中最重要的因素就是活性氧。目前研究结果显示,冷冻保存可以导致ROS过度产生。在精液中,ROS的来源很多,一般认为主要来源于白细胞、不成熟精子及异常精子等三类物质。大量的活性氧的产生,打破了氧化-抗氧化系统,引起精子氧化应激损伤,使精子发生结构和功能损伤。精子质膜富含PUFAs,而精子在成熟过程中,大量细胞质和线粒体的丢失导致成熟精子胞质中清除ROS的酶系统有限,使得精子易受ROS攻击。而过量的ROS也可以氧化DNA,引起碱基对,脱氧核糖核苷酸链骨架发生改变,影响来自父方的遗传物质,使得胚胎在发育和妊娠过程中均可发生不同程度的改变,如形成单倍体或破碎的染色体等,最终导致异常卵裂或流产。冻融后的精子中,异常形态率也显著增加,研究发现冻融后精子头尾部膜完整性改变的同时伴随着精子顶体酶活性的下降,最终导致了精子运动能力的降低。

[0003] 精子冷冻保护剂是精子冷冻技术中的最重要物质。目前最常用的精子冷冻保护剂都是含甘油和卵黄的复合型冷冻液,由甘油、卵黄、葡萄糖、枸橼酸钠等组成。其中最重要的低温保护剂是甘油。甘油可以渗入细胞内,浓缩或结合胞内水分,而且甘油也有稀释作用,能降低溶液中盐的浓度和冷冻液的渗透压,从而发挥其低温下对精子的保护作用,但甘油对精子有毒害作用。优化改良精液冷冻保护液是解决这一问题的有效途径,其中添加抗氧化剂是目前研究热点。近年来,学者们发现在精液冷冻保护液中添加酶类抗氧化剂(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等)或非酶类抗氧化剂(如牛磺酸、L-肉碱、茶多酚、维生素C、E等)等成分能够抑制精子氧化损伤,提高复苏后精子质量。

发明内容

[0004] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供Fer-1在制备精液冷冻保护剂中的应用,用于解决冻融精子过程中的氧化应激损伤等问题,提供一种能有效延长精子超低温冷冻保存存活效以及维持精子功能的精液冷冻保护剂。

[0005] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供Fer-1在精液冷冻保护中和/或在作为精液冻存保护添加剂和/或在制备精液冷冻保护剂中的应用。

[0006] 进一步,Fer-1在精液冷冻保护剂中的浓度为2~10 μ mol/L。

[0007] 进一步,所述精液冷冻保护剂为卵黄、甘油复合型冷冻保护剂。

[0008] 本发明第二方面提供一种精液冷冻保护剂,包括Fer-1。

[0009] 进一步,所述精液冷冻保护剂包括2~10 μ mol/L Fer-1。

- [0010] 进一步,所述精液冷冻保护剂为卵黄、甘油复合型冷冻保护剂。
- [0011] 进一步,所述精液冷冻保护剂还包括卵黄、甘油、葡萄糖、柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物。
- [0012] 进一步,所述精液冷冻保护剂包括以下浓度的成分:15~25%卵黄、15~25%甘油、15±0.5g/L葡萄糖、15±0.5g/L柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物;优选地,所述精液冷冻保护剂包括以下浓度的成分:20%卵黄、20%甘油、15g/L葡萄糖、15g/L柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物。
- [0013] 进一步,所述精液冷冻保护剂的pH值为6.8-7.2。
- [0014] 本发明第三方面提供一种根据第二方面所述的精液冷冻保护剂的制备方法,包括如下步骤:
- [0015] 将Fer-1溶于二甲基亚砷中,制成Fer-1溶液,将Fer-1溶液加入卵黄、甘油复合型冷冻保护剂中,制得精液冷冻保护剂。
- [0016] 由于Fer-1的性质,最好用DMSO进行溶解,同时DMSO也是一种常用的渗透性保护剂,能够降低细胞冰点,减少冰晶的形成,减轻自由基对细胞损害,改变生物膜对电解质、药物、毒物和代谢产物的通透性。
- [0017] 进一步,所述卵黄、甘油复合型冷冻保护剂的制备方法包括如下步骤:将葡萄糖、柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物加入水中,混匀;然后加入甘油,混匀后过滤;再加入卵黄,制成悬浮液;接着进行加热搅拌;最后检测pH值使之在6.8-7.2之间。
- [0018] 需要注意的是,本发明的实验用水采用无菌且无离子干扰的水,如超纯水、去离子水、RO水、蒸馏水、双蒸水等。
- [0019] 进一步,过滤时采用0.45μm的微孔过滤器或过滤膜。
- [0020] 进一步,卵黄从新鲜鸡蛋中抽取得到。
- [0021] 进一步,采用水浴方式进行加热,加热温度为50~60℃,优选为56℃,加热搅拌时间为20~40min,优选为30min。
- [0022] 本发明第四方面提供根据第二方面所述的精液冷冻保护剂和/或根据第三方面所述的方法制备得到的精液冷冻保护剂在精液冷冻保护中的应用。
- [0023] 本发明第五方面提供一种精液冷冻保护方法,采用含Fer-1的精液冷冻保护剂。
- [0024] 如上所述,本发明的Fer-1在制备精液冷冻保护剂中的应用,具有以下有益效果:
- [0025] 本发明发现在常规精液冷冻保护剂中添加Fer-1,可以在保护细胞存活率的同时,降低该过程中的氧化应激损伤,改善冻融后精子功能;基于此,本发明制备出了一种性能优异的新型精液冷冻保护剂,配合快速冷冻和快速解冻的方法,可以在维持冻融精子内外渗透压的同时,减少精子氧化损伤,降低精子线粒体损伤,有效改善冻融精子复苏后的前向运动能力和存活率。

附图说明

- [0026] 图1显示为本发明实施例1用于精液冻存后各组精液冻融后ROS水平的比较(A:流式检测各组ROS水平;B:ROS定量分析,*:p<0.05;** :p<0.01;***:p<0.001)。
- [0027] 图2显示为本发明实施例1用于精液冻存后各组精液冻融后MDA水平的比较(**:p<0.01;***:p<0.001)。

[0028] 图3显示为本发明实施例1用于精液冻存后各组精液冻融后MMP水平的比较 (**:p<0.01;***:p<0.001)。

具体实施方式

[0029] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0030] Ferrostatin-1 (Fer-1) 作为一种特异性铁死亡抑制剂,同时也是一种人工合成的抗氧化剂,可以高效抑制脂质过氧化进程,发挥降低细胞中脂质过氧化水平,保护细胞免受铁死亡损伤的作用。本发明发现在精液冷冻保护剂中添加Fer-1,可以在保护细胞存活率的同时,降低该过程中的氧化应激损伤,改善冻融后精子功能,其可能是一种潜在的、高效的精液冷冻保护添加剂。

[0031] 基于此,本发明在常规精液冷冻保护剂中添加一定浓度的Fer-1,制备出了一种性能优异的新型精液冷冻保护剂,配合快速冷冻和快速解冻的方法,可以在维持冻融精子内外渗透压的同时,减少精子氧化损伤,降低精子线粒体损伤,有效改善冻融精子复苏后的前向运动能力和存活率。

[0032] 本发明中采用的常规精液冷冻保护剂为卵黄、甘油复合型冷冻保护剂,其包括以下浓度的成分:15~25%卵黄、15~25%甘油、15±0.5g/L葡萄糖、15±0.5g/L柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物。以下实施例中采用的常规精液冷冻保护剂包括以下浓度的成分:20%卵黄、20%甘油、15g/L葡萄糖、15g/L柠檬酸钠或柠檬酸钠水合物,pH值为6.8-7.2。

[0033] 以下实施例中,采用人精液进行冻存实验,但本发明的精液冷冻保护剂也适用于其他动物的精液冻存,如猪、马和鸡等。

[0034] 本发明的具体实施过程如下:

[0035] 实施例1

[0036] 一、制备卵黄、甘油复合型冷冻保护剂

[0037] (1) 称取1.5g葡萄糖和1.3g柠檬酸三钠二水,加入60mL双蒸水,混匀。再加入20mL甘油,混匀后用0.45μm微孔过滤器过滤。再加入20mL卵黄(从新鲜鸡蛋中抽取得到),制成悬浮液;56℃水浴中30min,边加热边搅拌;检测pH值,使之在6.8-7.2之间。无菌分装后,-80℃保存,3个月内使用。

[0038] 二、添加Fer-1,Fer-1购于MCE公司,纯度大于99%;

[0039] (1) 将卵黄、甘油复合型冷冻保护剂37℃水浴解冻;

[0040] (2) Fer-1从-80℃冰箱中取出,取 26.235×10^{-3} g溶于10ml二甲基亚砜,制成Fer-1含量为10mmol/L的溶液;

[0041] (3) 取0.1mL上述溶液加入99.9mL的卵黄、甘油复合型冷冻保护剂中,其中Fer-1浓度为10μmol/L,-80℃保存。

[0042] 三、采用含Fer-1的精液冷冻保护剂的精液冷冻方法,包括下列步骤:

[0043] 选择2021年8月至2022年1月至重庆医科大学附属第一医院生殖中心门诊的20份精液样本,精液参数符合世界卫生组织(WHO,2010)所规定的正常精液标准,年龄在28岁至

35周岁,近期无致畸因素接触史。

[0044] (1) 37℃水浴解冻含Fer-1的精液冷冻保护剂,配制含不同浓度Fer-1的精液冷冻保护剂;

[0045] 对照组(F0):卵黄、甘油复合型冷冻保护剂组;

[0046] 实验组(F1):1份体积的含10 μ mol/L Fer-1的精液冷冻保护剂溶于5份卵黄、甘油复合型冷冻保护剂,获得2 μ mol/L Fer-1的精液冷冻保护剂组;

[0047] 实验组(F2):1份体积的含10 μ mol/L Fer-1的精液冷冻保护剂溶于1份卵黄、甘油复合型冷冻保护剂,获得5 μ mol/L Fer-1的精液冷冻保护剂组;

[0048] 实验组(F3):含10 μ mol/L Fer-1的精液冷冻保护剂。

[0049] (2)取1份体积的含不同浓度Fer-1的精液冷冻保护剂加入到1份体积精液中,逐滴加入,并缓慢摇晃精子冷冻管,最后璇紧帽盖;

[0050] (3)冷冻过程如下:先在25℃平衡5分钟,再置于4℃冰箱30min,再将其悬于液氮表面15cm处(-80℃~-100℃)15min,然后投入液氮中。冷冻保存2星期。

[0051] (4)冷冻复苏后:采用北京伟力计算机辅助精液分析系统分析冻融后各组精子前向运动能力;采用伊红染色法分析冻融后各组精液存活率;利用DCFH-DA检测分析冻融后各组精液的ROS水平;利用南京建成MDA试剂盒检测各组MDA;利用JC-1探针检测线粒体膜电位。

[0052] 四、实验检测及结果:

[0053] (1)前向运动能力和存活率检测:

[0054] 采用北京伟力计算机辅助精液分析系统分析冻融后各组精子前向运动能力,同时采用伊红染色法分析冻融后各组精液存活率,结果见表1。如表1所示,精液冷冻前(新鲜组)精子前向运动百分比为52.11 \pm 8.42,精子存活率为68.82 \pm 5.51,冻存复苏后各组精子前向运动百分比和存活率均比新鲜未冻存组低($p < 0.001$);添加不同浓度Fer-1的精液冷冻复苏后,与F0组相比,F1(2 μ mol/L)中精子前向运动和精子存活率均无显著改变,而F2(5 μ mol/L)和F3(10 μ mol/L)组中均高于F0组。

[0055] 表1.精液冻存前后各组精液前向运动能力和存活率比较

	前向运动(%)	存活率(%)
新鲜精子组	52.11 \pm 8.42	68.82 \pm 5.51
[0056] F0(0 μ mol/L)	5.43 \pm 2.07 ^a	29.81 \pm 6.13 ^a
F1(2 μ mol/L)	6.18 \pm 3.44 ^a	29.80 \pm 10.63 ^a
F2(5 μ mol/L)	7.15 \pm 3.91 ^{a#}	32.40 \pm 6.87 ^{a#}
F3(10 μ mol/L)	7.21 \pm 1.96 ^{a#}	36.70 \pm 9.20 ^{a#}

[0057] 注:a:与新鲜组相比有统计学意义($p < 0.001$);#:与F0组相比有统计学意义($p < 0.05$)。

[0058] (2)精子ROS检测:

[0059] 本实验应用荧光探针DCFH-DA测定精子ROS水平。DCFH-DA是一种可以自由通过细胞膜的染料,进入细胞内后被细胞内的酯酶水解生成DCFH,而DCFH不能通过细胞膜,而DCFH被细胞内ROS氧化,生成带荧光的DCF。因此通过流式细胞术间接反映细胞内活性氧的水平。

具体操作如下：

[0060] 取200 μ L冷冻复苏后精液，3000rpm/min离心5分钟去除上清液。加入1mL稀释好的DCFH-DA (10 μ mol/L)液重悬精子。然后将处理好的精子细胞置于37 $^{\circ}$ C，避光孵育30min，每隔5min颠倒混匀一次。孵育完成后，3000rpm/min离心5min，去除上清，加入PBS洗涤精子细胞沉淀，重复三次，以去除多余的、未结合探针。最后加入300 μ LPBS重悬细胞沉淀，送检流式细胞仪，检测精子活性氧水平。

[0061] 结果如图1所示，与未添加Fer-1 (F0)组相比，添加不同浓度Fer-1之后，均可以显著降低冻融精子中ROS水平 ($p < 0.05$)，并且呈浓度依赖性降低。

[0062] (3) 精子MDA检测：

[0063] 取400 μ L冷冻复苏后精液，3000rpm/min离心5分钟去除上清液，按照MDA试剂盒步骤，在细胞中加入200 μ L RIPA裂解液，冰上超声破碎细胞，5s每次，重复6次，4 $^{\circ}$ C，3000rpm/min离心10min后取上清用于MDA检测。其原理是过氧化脂质降解产物中的丙二醛 (MDA) 可与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合形成红色产物，在532nm处有最大吸收峰。

[0064] 结果如图2所示，与未添加Fer-1 (F0)组相比，当浓度为2 μ mol/L时，冻融精子中MDA水平无显著性改变，而当浓度为5 μ mol/L和10 μ mol/L时，冻融精子中MDA水平呈显著性降低。

[0065] (4) 精子线粒体膜电位检测：

[0066] JC-1是检测线粒体膜电位 $\Delta \Psi_m$ 的理想荧光探针。在线粒体膜电位较高时，JC-1以聚合物形式存在线粒体基质中，并发产生红色荧光；在线粒体膜电位较低时，JC-1以单体形式存在，发出绿色荧光。因此可通过荧光颜色的转变来反映细胞线粒体膜电位的变化。具体操作如下：

[0067] 取200 μ L冷冻复苏后精液，3000rpm/min离心5分钟去除上清液，加入500 μ L JC-1缓冲液，充分混匀后，在37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱中孵育20min后，600g 4 $^{\circ}$ C离心3min，弃上清；加入JC-1染色缓冲液1000 μ L，轻轻吹散并重悬细胞，600g 4 $^{\circ}$ C离心2-5min，重复3次，以洗去多余未结合探针；最后加入JC-1染色缓冲液400 μ L重悬细胞，送检流式细胞仪，检测线粒体膜电位变化。

[0068] 结果如图3所示，添加Fer-1可以改善冻融精子中线粒体膜电位水平。与未添加Fer-1相比 (F0)组相比，当浓度为2 μ mol/L时，冻融精子中MMP水平无显著性改变，而当浓度增加到5 μ mol/L至10 μ mol/L时，冻融精子中MMP水平呈显著性改善 ($p < 0.05$)，并且呈一定程度的浓度依赖性改变。综上可知，添加一定浓度的Fer-1，对精子冷冻效果有明显改善，复苏后的精子功能学参数：前向运动能力、存活率显著高于对照组 (未添加Fer-1)，且ROS、MDA和线粒体膜电位也明显高于对照组，提示对精子质量保护具有良好的安全性。

[0069] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效，而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下，对上述实施例进行修饰或改变。因此，举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变，仍应由本发明的权利要求所涵盖。

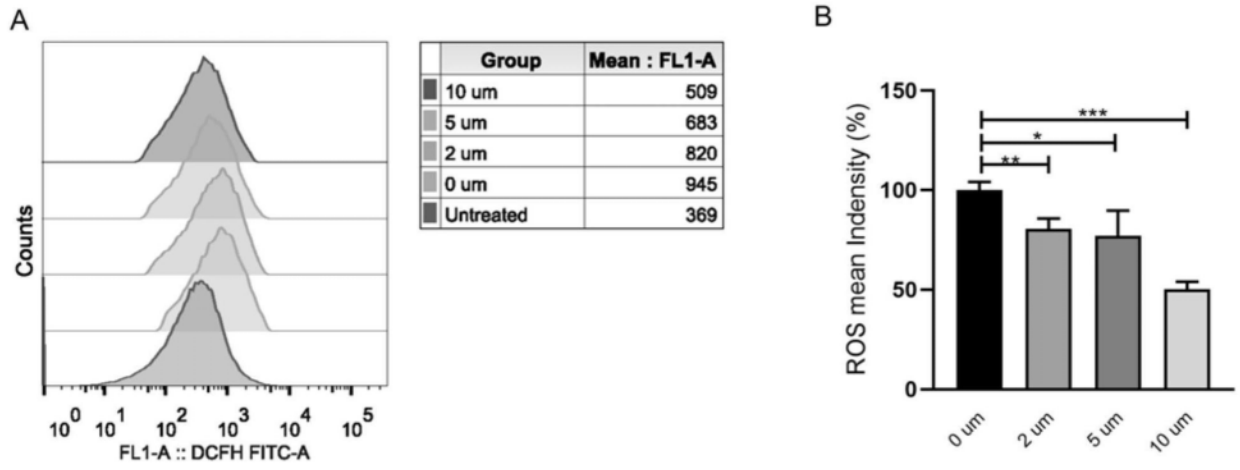


图1

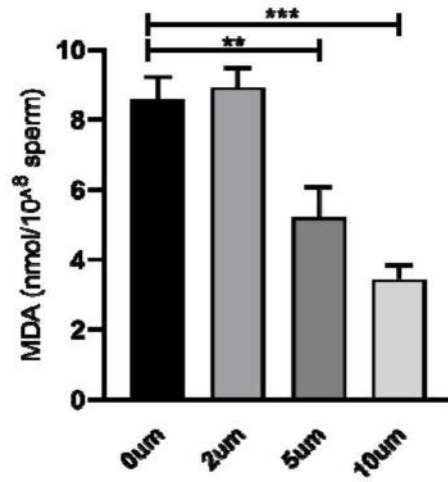


图2

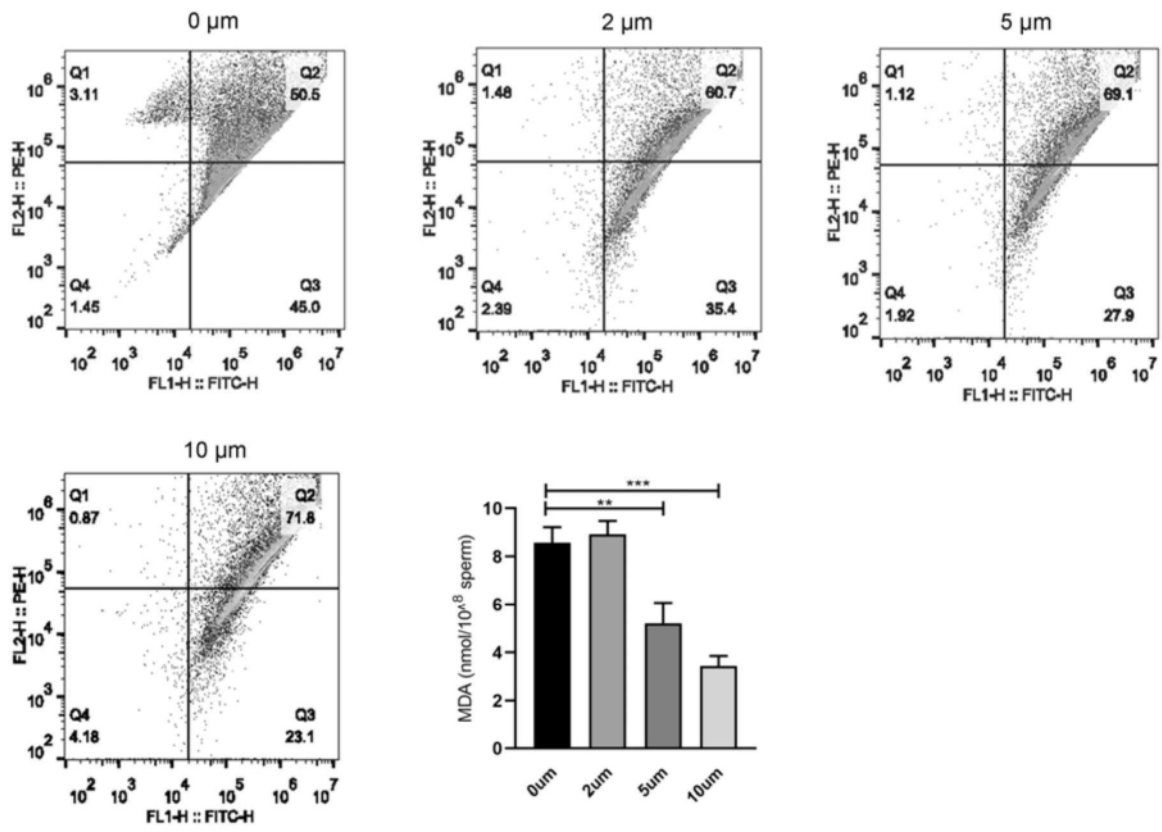


图3