

- 剂的质量分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(11): 930-932.
- [15] 陈永婷. 室温静置对制备血小板方法的影响[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(9): 887-889.
- [16] Dijkstra-Tiekstra MJ, van der Meer PF, Cardigan R, et al. Platelet concentrates from fresh or overnight-stored blood, an international study [J]. *Transfusion*, 2011, 51(Suppl 1): 38S-44S.
- [17] van der Meer PF, Cancelas JA, Vassallo RR, et al. Evaluation of the overnight hold of whole blood at room temperature, before component processing: platelets (PLTs) from PLT-rich plasma[J]. *Transfusion*, 2011, 51(Suppl 1): 45S-49S.
- [18] Lu FQ, Kang W, Peng Y, et al. Characterization of blood components separated from donated whole blood after an overnight holding at room temperature with the buffy coat method [J]. *Transfusion*, 2011, 51(10): 2199-2207.
- [19] 安蓬蓬, 李浩泮, 刘春燕. 全自动血液成分分离机和传统手工法制备浓缩血小板的质量比较[J]. 吉林医学, 2018, 39(8): 1526-1527.
- [20] 张雅莉, 张良子, 景媛媛, 等. 分离机制混合浓缩血小板改良方法探讨[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(8): 814-815.
- [21] 邓莉, 余利华, 杨冬燕, 等. 白膜法手工制备血小板与机制血小板的质量分析[J]. 临床输血与检验, 2018, 20(1): 18-20.
- [收稿日期 2022-05-11][本文编辑 余军 吕文娟]

#### 本文引用格式

熊志高, 刘昕晨, 杨小罗, 等. 新改良白膜法制备浓缩血小板的应用效果探讨[J]. 中国临床新医学, 2022, 15(8): 717-721.

## 论著

# 短时二次取精对精液质量及精子动态指标的影响

陈良师, 黄悦悦, 张小慧, 施文, 韦婷嫔, 李政达, 毛献宝, 王世凯, 薛林涛

基金项目: 广西自然科学基金面上项目(编号:2019GXNSFAA185056); 广西卫生健康委科研课题(编号:Z20210112)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 陈良师, 大学本科, 学士学位, 检验技师, 研究方向: 精子异常发生的机制。E-mail: 1543517958@qq.com

通信作者: 薛林涛, 医学博士, 副主任技师, 研究方向: 人类配子及胚胎发育。E-mail: ltxgxh@163.com

**[摘要]** **目的** 探讨短时二次取精对精液质量及精子动态指标的影响。**方法** 选择2016年5月至2020年6月在广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心接受体外受精助孕的夫妇59对, 排除女方不孕因素, 男性均完成第一次取精和短时二次取精(第一次取精2 h内)。分析两次取精的精液质量及精子动态指标的差异。**结果** 短时二次取精的精液体积、不动精子浓度、不动精子百分率小于一次取精, 前向运动精子浓度、前向运动精子百分率、非前向运动精子百分率大于一次取精, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。两次取精的精液浓度、圆细胞浓度、非前向运动精子浓度水平比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。短时二次取精的曲线运动速率、直线运动速率、平均路径速率、鞭打频率和前向性占比均大于一次取精, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 短时二次取精可显著改善精液质量和精子动态指标, 在临床上具有一定应用价值。

**[关键词]** 短时二次取精; 精液质量; 运动参数

**[中图分类号]** R 446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)08-0721-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.08.10

**Effects of short-interval second ejaculation on semen quality and spermatozoon dynamic indicators** CHEN Liang-shi, HUANG Yue-yue, ZHANG Xiao-hui, et al. *Reproductive Medicine and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China*

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of short-interval second ejaculation on semen quality and spermatozoon dynamic indicators. **Methods** Fifty-nine couples who received in vitro fertilization at the Reproductive Medicine and Genetic Center of the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region from May 2016 to June 2020 were selected. The females' infertility factors were excluded, and the first ejaculation and the short-interval second ejaculation (within 2 hours of the first ejaculation) were completed in all the males. The differences in the semen quality and spermatozoon dynamic indicators of the two semen collections were analyzed. **Results** The semen volume, the immotile

sperm concentration, and the percentage of immotile sperms in the short-interval second ejaculation were less than those in the first ejaculation, while the concentration of forward motile sperms, the percentage of forward motile sperms, and the percentage of non-forward motile sperms in the short-interval second ejaculation were greater than those in the first ejaculation, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in semen concentration, round cell concentration and non-forward motile sperm concentration between the two ejaculations ( $P > 0.05$ ). The curvilinear motion rate, the linear motion rate, the average path velocity, the whiplash frequency and the forwardness proportion in the short-interval second ejaculation were all greater than those in the first ejaculation, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Short-interval second ejaculation can significantly improve semen quality and spermatozoon dynamic indicators, which has a certain clinical application value.

[**Key words**] Short-interval second ejaculation; Semen quality; Motility parameters

近年来,由于受到饮食习惯、环境污染及工作压力等因素影响,男性不育的发病率呈逐年上升趋势,已成为临床上亟待解决的问题<sup>[1-3]</sup>。精液质量分析是男性生育力评估的最基本依据,是男性不育临床诊断及治疗评价的主要指标,但是精液质量受到多方面因素影响,而禁欲时间就是其中一个重要因素。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)建议精液质量分析前男性禁欲时间为2~7 d,但是近年有研究发现禁欲时间缩短对精液质量有显著影响<sup>[4]</sup>,同时精子及精浆蛋白表达谱呈现明显差异<sup>[5]</sup>,因此,短时二次取精对精液质量的具体影响有待进一步探讨。本研究选择接受体外受精助孕的夫妇,取卵当日男方一次取精后2 h内进行短时二次取精,通过比较不同分组精液质量及精子动态指标的差异,探讨禁欲时间对精液质量的影响。现报道如下。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选择2016年5月至2020年6月在我院接受体外受精助孕的夫妇65对。男方平均年龄( $37.14 \pm 6.41$ )岁,女方平均年龄( $35.10 \pm 4.90$ )岁,不孕不育年限( $3.59 \pm 2.80$ )年。65例男性患者均完成第一次取精,3例患者由于个人原因拒绝短时二次取精,3例短时二次取精失败,59例完成短时二次取精。最终纳入这59例男性作为研究对象。

**1.2 纳入与排除标准** 纳入标准:(1)不育年限1~7年;(2)男方染色体检查正常,排除了女方不孕因素;(3)男方无严重少弱精子症、无性功能障碍和生殖系统感染等疾病<sup>[1]</sup>;(4)取卵日第一次取精精液优化后前向运动精子总数 $< 1.0 \times 10^6$ <sup>[4]</sup>,在2 h内进行第二次取精。排除标准:(1)夫妻有遗传性疾病家族史;(2)逆行射精男性;(3)男方3个月内服用抗癫痫药或抗肿瘤药等影响精子活力药物。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** 所有取精者在标本采集前禁欲2~7 d,通过手淫法采集标本,将精液射入清洁广口

无菌塑料杯中,置于37℃孵育箱中液化,待精液完全液化后在30 min内进行精液分析。之后在2 h内进行第二次取精。

**1.3.2 精液分析** 初步通过肉眼观察精液外观和液化程度,测量精液标本体积。待精液完全液化后充分混匀,用加样器取2 μl精液置于37℃预热5 min以上的一次性精子计数板(GoldCyto, 西班牙),待精液样本停止漂移(60 s内),采用SCA精子动态图像自动检测系统(MicroPtic, 西班牙)在100倍负相差显微镜下随机选择至少6个视野,对至少200条精子进行分级分析。通过人工观察、核对,适当删除精液分析系统识别错误的精子并分类标记,每份标本均在2~3 min内完成检测,获得精子浓度、精子总数、前向运动精子百分率及直线性百分率等指标参数。

**1.4 观察指标** (1)精子活力指标。前向运动:精子主动地呈直线或沿一大圆周运动,无论其速度如何。非前向运动:其他非前向运动的形式,如以小圆周泳动,尾部动力几乎不能驱使头部移动,或者只能观察到尾部摆动。不动精子:没有运动。(2)精子运动速率指标。曲线运动速率:精子头沿其实际曲线,以二维方式运动轨迹的时均速率。直线运动速率:精子头在开始检测时的位置与最后所处位置之间的直线运动的时均速率。平均路径速率:精子头沿其平均路径移动的时均速率。(3)精子运动方式指标。直线性:曲线路径的直线性。前向性:平均路径的直线性。摆动性:实际的曲线路径中关于平均路径的摆动值。(4)精子空间位移指标。精子头侧摆幅度:精子头关于其平均路径的侧向位移幅度,以侧摆的最大值或平均值表示。鞭打频率:精子曲线路径跨越其平均路径的平均频率。正常参考值<sup>[6-7]</sup>:前向运动精子百分率 $\geq 32\%$ ,前向运动精子百分率+非前向运动精子百分率 $\geq 40\%$ ,精子浓度 $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$ ,圆细胞浓度 $\leq 1.0 \times 10^6/\text{ml}$ ,一次射精精子总数 $\geq 39 \times 10^6$ ,精液体积 $\geq 1.5 \text{ ml}$ 。

**1.5 统计学方法** 应用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,不符合正态分布的计量资料以中位数 (下四分位数,上四分位数) [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示,两次取精的参数结果比较采用配对 *t* 检验或配对秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 59 例取精者两次取精一般指标结果比较** 短时二次取精的精液体积、不动精子浓度、不动精子百分率小于一次取精,前向运动精子浓度、前向运动精子百分率、非前向运动精子百分率大于一次取精,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两次取精的精液浓度、圆细胞浓度、非前向运动精子浓度水平比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 59 例取精者两次取精一般指标结果比较

[ $(\bar{x} \pm s), M(P_{25}, P_{75})$ ]

指 标	一次取精	短时二次取精	<i>t</i> / <i>Z</i>	<i>P</i>
精液体积 (ml)	2.52 (2.10, 3.00)	1.51 (1.00, 2.20)	5.387	0.000
精液浓度 ( $10^6/ml$ )	23.10 (11.20, 45.60)	23.30 (12.60, 37.00)	0.196	0.844
圆细胞浓度 ( $10^6/ml$ )	0.30 (0.30, 1.10)	0.60 (0.30, 1.10)	0.539	0.590
前向运动精子浓度 ( $10^6/ml$ )	4.70 (2.10, 9.10)	5.00 (2.20, 12.50)	2.065	0.039
非前向运动精子浓度 ( $10^6/ml$ )	4.30 (1.80, 8.60)	4.30 (2.00, 11.80)	1.589	0.112
不动精子浓度 ( $10^6/ml$ )	9.40 (5.90, 16.40)	8.80 (5.40, 15.90)	2.288	0.022
前向运动精子百分率 (%)	21.20 (13.60, 29.80)	27.20 (15.90, 38.70)	3.468	0.001
非前向运动精子百分率 (%)	20.78 ± 11.32	24.68 ± 12.85	2.501	0.015
不动精子百分率 (%)	50.59 ± 17.65	44.03 ± 16.20	3.705	0.000

**2.2 59 例取精者两次取精的精子动态指标比较** 短时二次取精的曲线运动速率、直线运动速率、平均路径速率、鞭打频率和前向性占比均大于一次取精,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 59 例取精者两次取精的精子动态指标比较

[ $(\bar{x} \pm s), M(P_{25}, P_{75})$ ]

指 标	一次取精	短时二次取精	<i>t</i> / <i>Z</i>	<i>P</i>
曲线运动速率 ( $\mu m/s$ )	37.11 ± 9.84	40.63 ± 11.54	11.480	0.022
直线运动速率 ( $\mu m/s$ )	12.28 ± 4.54	14.21 ± 5.70	4.710	0.003
平均路径速率 ( $\mu m/s$ )	23.22 ± 7.63	25.59 ± 8.60	7.920	0.025
直线性占比 (%)	32.80 (26.90, 36.40)	33.80 (30.50, 38.70)	1.933	0.053
前向性占比 (%)	52.50 (48.70, 55.70)	53.80 (50.70, 58.50)	2.454	0.014
摆动性占比 (%)	63.20 (57.10, 68.00)	62.70 (58.70, 67.70)	0.565	0.572
侧摆幅度 ( $\mu m$ )	1.00 (0.80, 1.20)	1.20 (1.00, 1.30)	1.519	0.129
鞭打频率 (Hz)	3.90 (1.80, 6.60)	5.50 (3.80, 8.40)	3.373	0.000

**3 讨论**

**3.1 精液是附睾内储存高度浓缩的精子悬液与附性腺分泌液的混合物。**其中 90% 的精液体积由前列腺和精囊腺的分泌液组成,其分泌量决定了精液体积的大小<sup>[7]</sup>。而精囊腺和前列腺的分泌液存贮在其特有组织学皱襞中,容量与禁欲持续时间呈正相关。本研究结果显示短时二次取精所得精液体积小于一次取精,这与 Keihani 等<sup>[8]</sup>的报道结果相似。但是,本研究结果显示短时二次取精的精子运动能力较一次取精显著改善。附性腺分泌液内含高浓度的果糖和前列腺素,其中果糖为精子提供营养物质和能量,前列腺素可促进射精时尿道平滑肌收缩,刺激精子活动。在射精过程中,精液会分成数段按照顺序射出,一次射精不能完全排空在附睾中存储的精子,有些精子会继续留存。若禁欲时间较长,留存精子发生氧化应激和自然老化程度加深,从而导致毒性物质累积,附睾内的 pH 值发生改变,精子活动力随之下降<sup>[9]</sup>。另外,随着新精子发生,附睾中存储的精子进一步增多,分泌液中的果糖不能为新生成的精子提供足够的营养物质,加上长时间禁欲使精子生存环境恶化,前列腺素不能有效刺激平滑肌的收缩,导致射出的精子获能不足<sup>[10]</sup>。既往也有研究结果证实,通过缩短禁欲时间,减少精子从生成到离体时间,能够提高精子活力<sup>[11-12]</sup>。

**3.2 精子运动指标可反映精子离体以后获得自主运动的能力,**精子特征性自主运动有利于穿过卵子复合物和透明带,是体外受精成功的重要前提。精子指标参数中的曲线运动速率、直线运动速率、平均路径速率可反映精子自主运动速度<sup>[13]</sup>。前向性、直线性、摆动性、侧摆幅度和鞭打频率等指标则反映精子运动频率。本研究结果显示,短时二次取精的精子运动速度、前向性占比和鞭打频率均显著提高,精子运动状态较一次取精改善。有文献报道,微量元素是影响人类生殖健康的重要因素<sup>[14-15]</sup>。其中,锌是一种必需的微量元素,不仅能抑制 DNA 酶活性以维持精子活力,还参与了二硫键的形成,是男性生殖系统正常功能和精子发生过程所必需的。Osadchuk 等<sup>[16]</sup>也报道了延长禁欲会导致前列腺分泌锌水平减少,锌缺乏可能是精液质量下降的一个重要风险因素。杨雪梅等<sup>[17]</sup>从精子核组成结构方面给出另一个解释,认为人类成熟精子核由组蛋白和鱼精蛋白结合形成。鱼精蛋白是一种小分子碱性蛋白,可通过中和 DNA 的负电荷并与二硫键交联形成鱼精蛋白-DNA 复合体。鱼精蛋白-DNA 复合体结构使精子核极度压缩致密,起到保护

精子抵御外界氧化应激反应的作用。但随禁欲时间的延长,精子核老化程度增加,精子核氧化磷酸化运转速度变快,磷酸酶活性升高。吴文静等<sup>[18]</sup>研究表明,磷酸酶被催化或活性升高会抑制小鼠附睾内精子获能,导致精子不运动或运动度降低。也有研究显示,禁欲时间会影响精子蛋白的表达,尤其影响人精子过氧化还原蛋白 2(peroxiredoxin 2, Prdx2)表达。Prdx2 主要定位于精子中段线粒体区域以及精子头部核区域,它参与精子线粒体的形成,且有清除细胞内高浓度活性氧的能力,可防止过多的活性氧进入精子核区域造成精子损伤,影响精子的运动能力<sup>[19-22]</sup>。线粒体作为精子的动力装置,Prdx2 低表达会使合成的线粒体数量减少,加剧了精子质量的下降,这可能是延长禁欲导致精子活力水平下降的一个主要因素。

综上所述,短时二次取精可以显著改善精液质量和精子动态指标,同时具有无创简便的优势,因此在临床上具有一定应用价值。

#### 参考文献

- [1] 赵银银,邱嫻嫻,肖跃海,等. PM2.5 对男性生殖系统的影响研究进展[J]. 实用医学杂志,2021,37(9):1222-1226.
- [2] 王笑臣,田晓佳,叶波,等. 武汉市大气 PM10 暴露对精液质量的影响[J]. 中华预防医学杂志,2018,52(1):73-78.
- [3] 刘佩意,朱嘉辉,袁冠湘,等. 男性夜间睡眠时长和精液质量的关联研究[J]. 中华生殖与避孕杂志,2020,40(9):741-749.
- [4] Barbagallo F, Calogero AE, Condorelli RA, et al. Does a very short length of abstinence improve assisted reproductive technique outcomes in infertile patients with severe oligo-asthenozoospermia? [J]. J Clin Med, 2021,10(19):4399.
- [5] Yang X, Breuss MW, Xu X, et al. Developmental and temporal characteristics of clonal sperm mosaicism[J]. Cell, 2021,184(18):4772-4783.
- [6] 毛献宝,黄悦悦,薛林涛,等. 精液圆细胞与精子运动参数的相关性分析[J]. 中国临床新医学,2017,10(1):18-20.
- [7] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[Z]. 古翊群,陈振文,卢文红,等,译. 北京:人民卫生出版社,2011:5-232.
- [8] Keihani S, Craig JR, Zhang C, et al. Impacts of abstinence time on semen parameters in a large population-based cohort of subfertile men[J]. Urology, 2017,108:90-95.
- [9] Lissabet J, Figueiras-Fierro D, Zamorano M, et al. Role of three plasma

membrane Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the sperm motility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture, 2021,538:736537.

- [10] Alipour H, Van Der Horst G, Christiansen OB, et al. Improved sperm kinematics in semen samples collected after 2 h versus 4-7 days of ejaculation abstinence[J]. Hum Reprod,2017,32(7):1364-1372.
- [11] Borges E Jr, Braga DPAF, Zanetti BF, et al. Revisiting the impact of ejaculatory abstinence on semen quality and intracytoplasmic sperm injection outcomes[J]. Andrology, 2019,7(2):213-219.
- [12] Comar VA, Petersen CG, Mauri AL, et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples[J]. JBRA Assist Reprod, 2017,21(4):306-312.
- [13] 岳焕勋. 精液检查的基本要求及其结果解释[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(1):14-16.
- [14] Mirmammiha M, Faroughi F, Tahmasbpoor E, et al. An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process[J]. Rev Environ Health, 2019,34(4):339-348.
- [15] Chyra-Jach D, Kaletka Z, Dobrakowski M, et al. Levels of macro- and trace elements and select cytokines in the semen of infertile men [J]. Biol Trace Elem Res, 2020,197(2):431-439.
- [16] Osadchuk L, Kleshchev M, Danilenko A, et al. Impact of seminal and serum zinc on semen quality and hormonal status: a population-based cohort study of Russian young men[J]. J Trace Elem Med Biol, 2021,68:126855.
- [17] 杨雪梅,李俊,谭宇哲,等. 精子核蛋白成熟度与精液常规参数的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(15):75-79.
- [18] 吴文静,张昕,谭霞,等. SRC 激酶和磷酸酶 PPI-γ2/PP2A 的相互作用对小鼠附睾精子成熟及运动的调控[J]. 中国实验动物学报,2021,29(2):183-189.
- [19] 姚亮宇,靖俊. 人精子过氧化氧化还原蛋白 2 表达与精子 DNA 损伤的相关性[J]. 医学研究生学报,2018,31(9):948-951.
- [20] 黄悦悦,薛林涛,何冰. 精子 DNA 损伤在辅助生殖中的研究进展[J]. 中国临床新医学,2016,9(3):261-265.
- [21] de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects [J]. Hum Reprod, 1995,10(Suppl 1):15-21.
- [22] Zhu Z, Kawai T, Umehara T, et al. Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria[J]. Free Radic Biol Med, 2019,141:159-171.

[ 收稿日期 2021-11-22 ] [ 本文编辑 余军 吕文娟 ]

#### 本文引用格式

陈良师,黄悦悦,张小慧,等. 短时二次取精对精液质量及精子动态指标的影响[J]. 中国临床新医学,2022,15(8):721-724.