

第六节 回旋流变技术在精液系统中的应用； 切变率三角波作用下的精液滞后环与屈服应力的直接测定

1 最近对精液研究的状况

人类的繁衍依靠其精液的质量是否合格，根据近年来的报道，人类精液的质量有下降趋势【1】。其原因与两方面有关。从人类本身体内因素来说，精子及其精浆生成与运输过程中的生物化学、生物物理、细胞生物学等条件有关，如精子表面蛋白的修饰【2、3】，结构重排【4】、附睾中提供养分促使精子功能成熟的充分性【5、6】，精子表面电荷的密度与分布【7】，肝细胞生长因子的作用【8】，精液中锌含量的水平【9】，活性氧自由基水平【10】等有关，其中特别是染色体的缺损【11、12】，是正常还是异常的基因表达【13-15】等，与以上人类体内的种种因素有关。此外就是环境因素或体外因素如地理的区域与经纬度【16、17】、季节【18】、电磁场作用与工作职业因素等因素有关【19】。

常规检查精液的质量有射出精液的体积、精子的浓度、观察精子的形态与活动能力等。从生物物理与生物流变学角度，应该既观察其精子也要观察其液浆，即整个精液的整体。过去也有报道检查整个精液黏度的做法，认为精液的初步液化大约射精后 5 至 10 分钟左右，但完全液化需要的时间为 20 至 40 分钟。过去测定液化后的精液黏度颇为简单，用注射器或玻璃棒的动作拉出丝的长度约 2 至 3 厘米认为是合格。也有用特制的黏度计，用计时器计时，用 0.5 毫升精液流出时间为 120 秒以内为合格（其中数为 50 秒）【20】，以上做法颇为简单，不够精确与规范，本节拟从滞后环角度介绍对精液射出后的液化过程作研究。

2 精液滞后环的测定

做法是被测者将精液直接射在黏度计的测量杯中(校正体积为 2 毫升)，立即进行滞后环测定。所用的仪器是美国 BROOKFIELD 公司提供的程序型 DVII 流变仪，在 WINDOWS 下，用该公司提供的软件，编制自动采样程序，作各种数据采集、贮存、数据处理等。采用的三角波切变率为 $0-1-0\text{ s}^{-1}$ 由仪器和电脑软件控制下，由 0 s^{-1} 开始，逐个依次施加，上升至最大值 1 s^{-1} ，然后逐个依次退回至 0 s^{-1} 值：每个切变率下在 3s 的时间内自动采集切应力、切变率、温度、时间等数据。滞后环曲线制作是以切应力为纵坐标（单位为 mPa）；以切变率为横坐标（单位为 s^{-1} ）完成。同样一个精液样品射出后连续每分钟完成一个滞后环的测定，连续做 20 分钟，完成了 20 个滞后环的测定，结果如下文图 1 所示。由于其中一些曲线间互相重叠难以看清，故下文图 2 选其第 1、2、3、4、5、10、20 分钟时的 7 个曲线加以表达，就比较可以看清这 20 分钟内的各自滞后环曲线的变化情况。具体做法如文献【21】所述。

3 对 20 个滞后环曲线作总体分析

图 1 与图 2 并非一下子就做成，而是通过 5 个实验中，其中最完整的一个实验的记录。图 1 与图 2 的结果是与临床的观察基本上是一致的。如在 1~3 分钟的滞后环来看，曲线是逆时针滞后环，表明这时候的精液是粘弹性体、糊状体物质，而 4~20 分钟期间出现了“8”字型的滞后环，表明精液已经液化或水化样的液体，具有触变性的流体。这就把临床所见的经验作了滞后环的数字化分析而已。作为滞后环曲线，其曲线的走向（三角波上升线与下降线的走向）、所围面积的大小、下降线与纵坐标切应力坐标轴相交点的数字精确表达出。精液在刚刚射出的 3 分钟以内，是稠厚的粘弹性体、糊状体物质，而以后的 4~20 分钟时间内就逐步地变为水样的液体，而且是逐步地稀化或水样化。这就把临床的经验应用滞后环技术加以科学语言的阐明。相反地如果射出的精液不显示其在当初射出时的粘弹性体、糊状体状态，或在几分钟以后不能稀化或水化，这种精液的质量是具有明显的问题；或者是另一种状况，当初射出的精液太稀薄，没有呈现粘弹性体、糊状体物质状态，这种精液的质量也是有问题的。

也就是说，一个优秀质量的精液标本必需具有图 1 与图 2 这样的滞后环曲线的进程变化，就具有良好的生育能力。

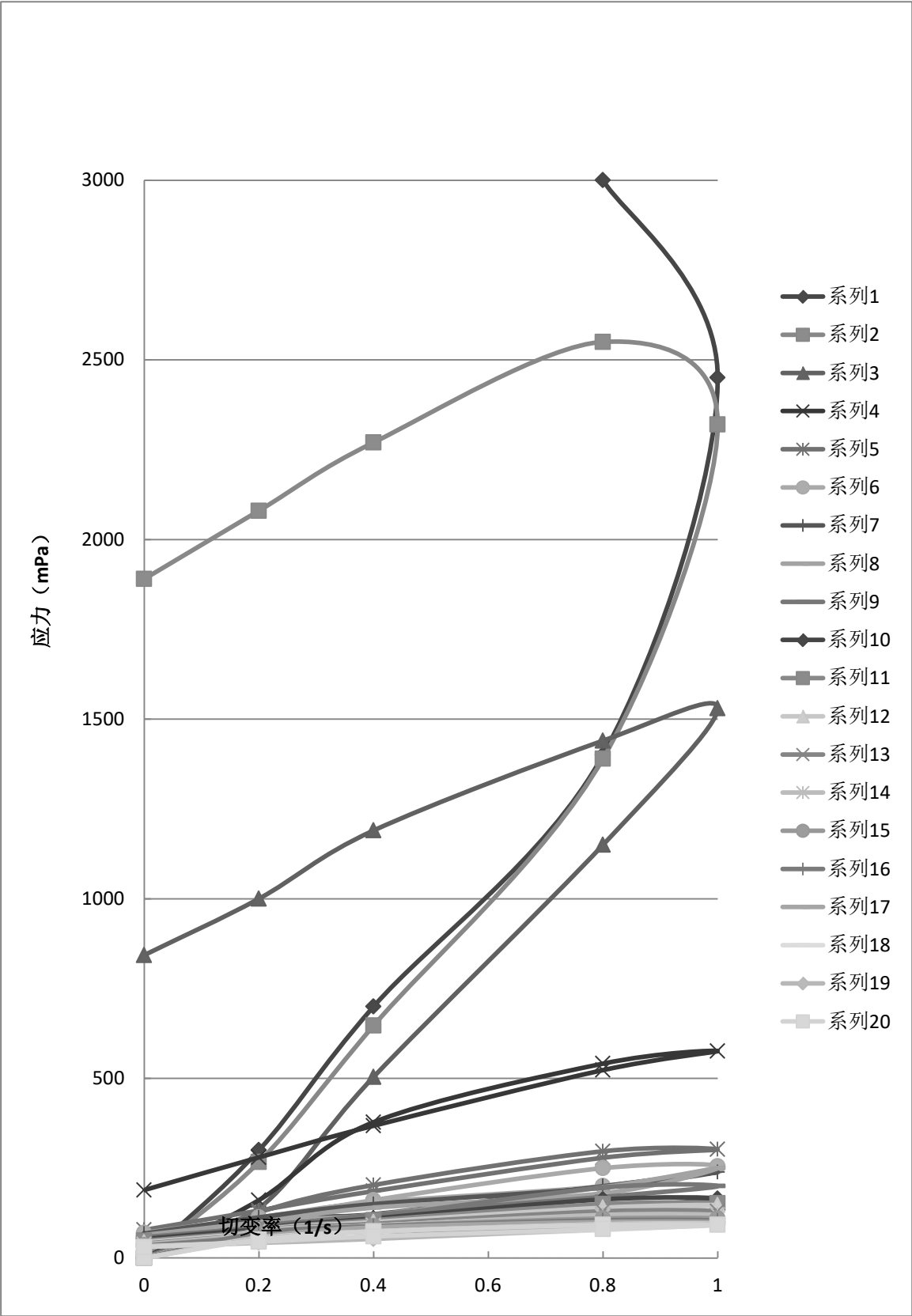


图 1 精液射出后 1~20 分钟内（系列 1 示第 1 分钟，其余类推）同一标本每分钟测定的滞后环曲线。由于曲线互叠，故下文图 2 选其第 1、2、3、4、5、10、29 等 7 曲线加以表达之。

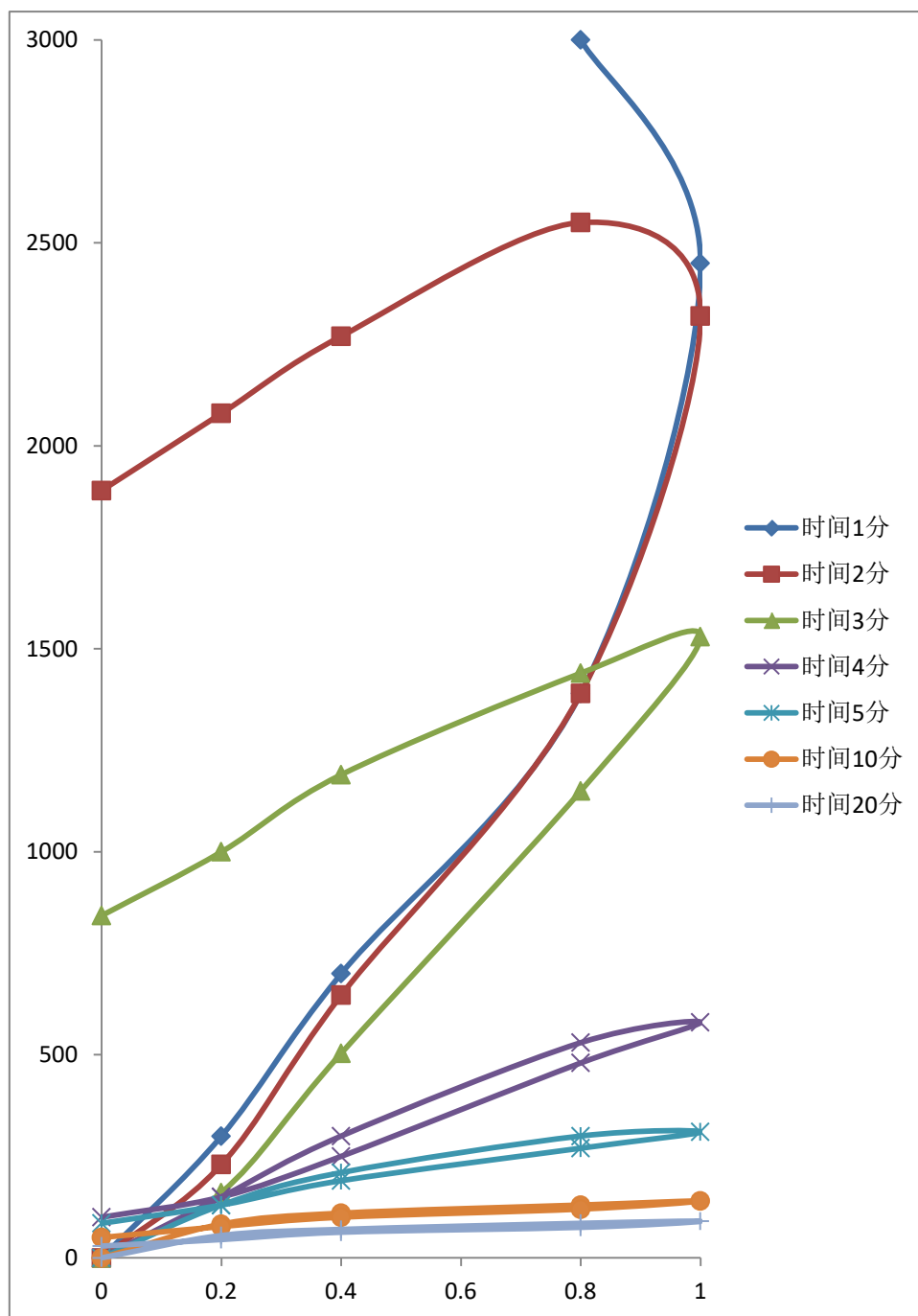


图 2 示精液射出后 1~20 分钟内同一精液标本每分钟测定的滞后环曲线。由于一些曲线间互相重叠难以看清，故本图选其中第 1、2、3、4、5、10、29 等 7 曲线加以表达即可看清。

4 精液如何由粘弹性的单环变为具有触变性的“8”字型的双环

图 3 示精液滞后环如何由粘弹性的单环，变成为具有触变性的 8 字型的双环的过程。本实验人类男性精液射出后在 20 分钟内所测的滞后环曲线的形态，大约具有三种类型，图 3 的第 3 分钟时呈逆时针的走向的单环，而第 4 分钟后即展示近原点 0 处保持着逆时针的走向的小小的粘弹性环，而远原点 0 处则出现顺时针的走向的触变性环，成为“8”字形的双环。如此在 3、4 分钟之间，从理论上应存在着有一段上升线与下降线合并的机会的曲线，图 3 中“3~4 分钟模拟”这是作者想像模拟曲线。图 3 则显示精液滞后环如何由逆时针的走向的单环，转

变为“8”字的双环的过程。

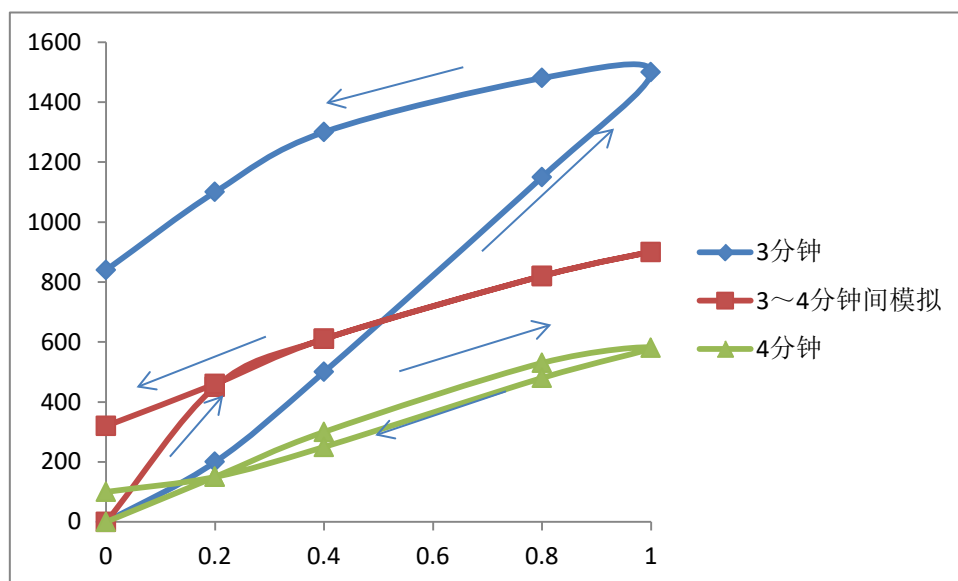


图3 精液射出后在20分钟内所测的滞后环曲线的形态具有三种类型，本图第3分钟时呈逆时针的走向的单环，而第4分钟后即示：近原点0处保持着逆时针的走向的小小的粘弹性环，而远原点0处则出现顺时针的走向的触变性环，即成为“8”字形的双环。如此在3、4分钟之间从理论上应存在着有一段上升线与下降线合并的机会，这类型曲线是作者模拟的。本图显示精液滞后环如何由逆时针的走向的单环，转变为“8”字的双环的过程。图中横坐标为切变率单位为： s^{-1} ，纵坐标为切应力，单位为： mpa 。

5 精液出现具有触变性的“8”字型的双环后的情景

精液在4~5分5钟以后，就出现8字型双滞后环，曲线互相拥挤在一起，互相之间，看不清其变化，在图4选择了5分、10分、20分钟时三个“8”字型滞后环的列出，可看出其趋势是：随着分钟数延长，双环间的相交点逐步向原点零处靠近，远零处的顺时针环所围面积也逐步减少，近原零处的逆时针环所围面积也逐步减少，意味着精液的触变性与黏弹性均随时间逐步下降，但不完全地消失。

6 男性射精的力促使精浆蛋白质网络的解体与弹性环消失

精浆中具有蛋白质的三维网络结构，男性射精以前，这个网络体系一则保护精子吸收营养保护精子的成熟，二则也限制精子的活动，安静地在积蓄能量，等待着射精的机会，离开蛋白质网络系统，具有充分的能力进行主动的游动，实现与卵细胞结合达到受精的目的。男性的射精行为付出力量的作用，是一种激动剂，激起精浆内一系列蛋白酶的激活，使某些网络蛋白质水解为小的肽片或单个氨基酸，如此就把蛋白质网络结构和很快解体，因此射精后很快致使滞后环的逆时针环的消失留下无几，这一复杂的生物化学与生物物理学导致蛋白质结构网络的解体是弹性环消失几乎无几的物质基础。

7 为什么4~5分钟后还会留有少量的弹性环与触变性环

因为整个精液中包括精子与液浆，精子具有对剪切力的反应性，液浆中也存在着某些保护精子的其他蛋白质，任何蛋白质的氨基酸链也对力反应性，因此具有一定量的粘弹性，所以留存少量的精液的逆时针滞后环的面积是必然的。此外由于所给三角波的切变率作用下，也有利于促使精子间的分散开，避免很多精子拥挤在一起，这也是触变性环少量存在的原因之一，

精液中还有其他蛋白质分子，也可在切变率作用下，促使蛋白质分子间的分散开，这也是触变性环少量存在的原因之一。为此在 4~5 分钟以后精液继续液化过程存在着少量的粘弹性环与触变性环是正常的与必然的。

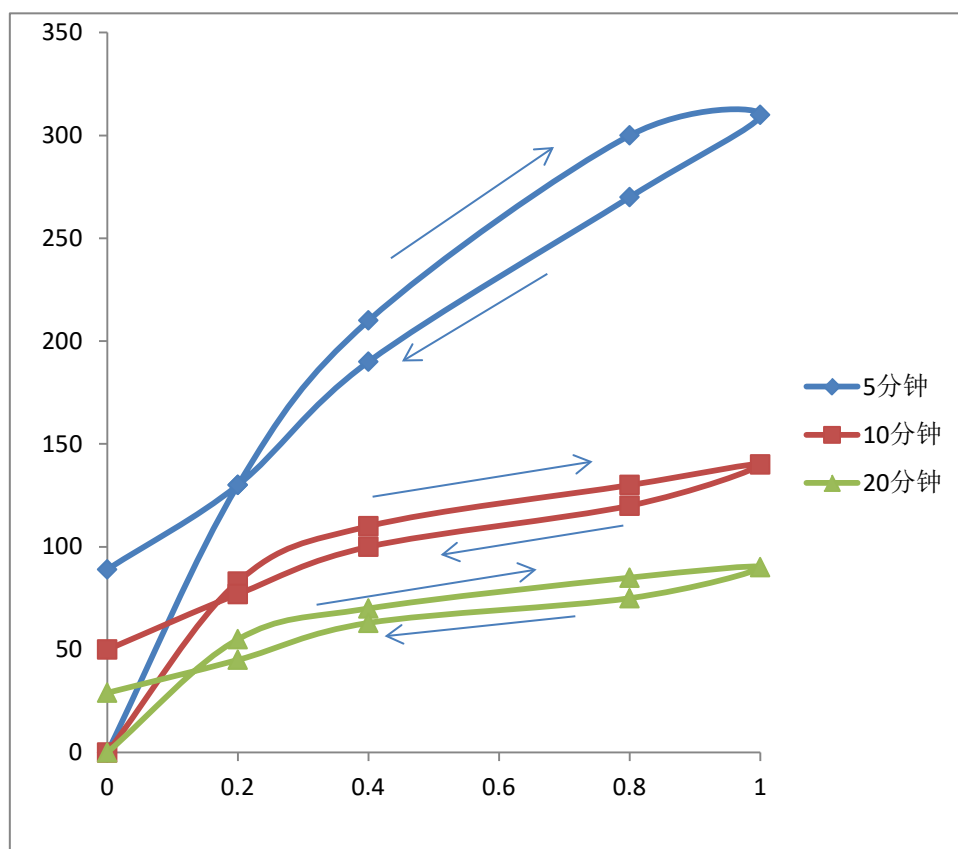


图 4 在 5 分钟以后出现 8 字型双滞后环，曲线互相拥挤看不清其变化趋势，在此图选择 5、10、20 分钟时的“8”字型环列出，可看出其趋势是：随着分钟数延长，双环间的相交点逐步向原点零处靠近，远零处的顺时针环所围面积也逐步减少，近原零处的逆时针环所围面积也逐步减少，意味着精液的触变性与黏弹性均随时间逐步下降，但不完全地消失，图中横坐标为切变率单位为： s^{-1} ，纵坐标为切应力，单位为：mpa.

8 射精后精液的屈服应力变化

表 1 记录了本实验精液射出后通过滞后环测定的 20 分钟内的屈服应力数值，是随着每一分钟时间的延长而逐步在减弱的数字，并将这些数据作图（即图 5）。

表 1 人类精液射出后通过滞后环测定屈服应力数值随着每一分钟时间的延长的变化

时间（分）	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
屈服应力（mPa）	6500	3909	1960	843	150	89	78	64	58	55	50
时间（分）	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
屈服应力（mPa）	47	44	44	44	35	34	32	31	30	29	

表 1 精液射出后屈服应力随时间的变化（2、3、4 分钟的直线回归方程为： $y=-1154.2x+5063.5$ ，而 4 至 20 分的直线回归方程为： $y=-3.22647x+87.58088$ 。表中 0 分与 1 分的屈服应力值是通过直线回归方程计算估计的，其他的数值是用滞后环直接测定的）。

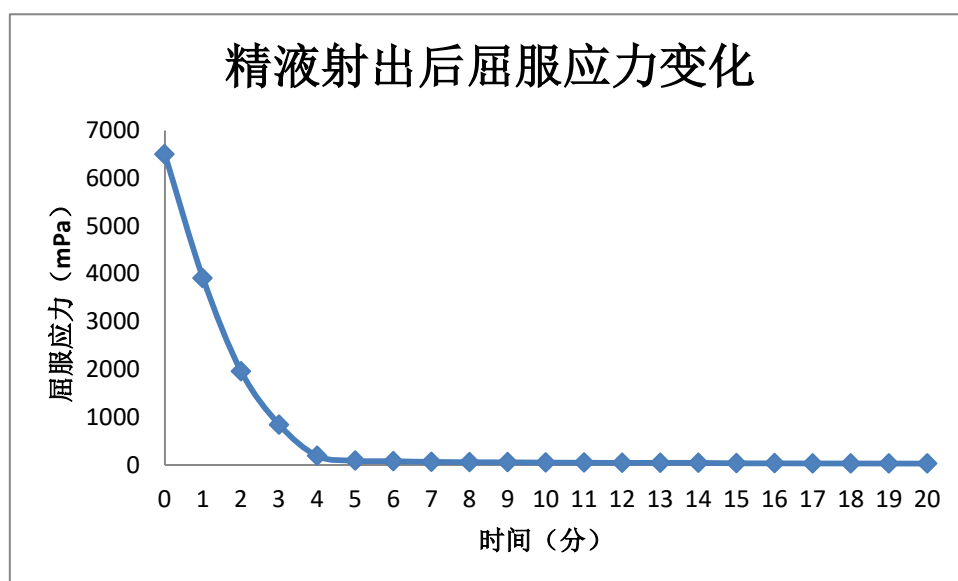


图 5 精液射出后同一样品通过滞后环测定屈服应力随每一分钟时间延长的变化（2、3、4 分钟的直线回归方程为： $y=-1154.2x+5063.5$ ，而 4 至 20 分的直线回归方程为： $y=-3.22647x+87.58088$ 。表中 0 分与 1 分的屈服应力值是通过直线回归方程计算估计的，其他的数值是用滞后环测定的）。

所谓屈服应力对于液体而言定义为，推动液体流动至少的力。从表 1 与图 5 中可以清楚看出，这是标志着精液液化过程中及其明朗的指标，在精液液化过程中的头 3 分钟，由 6500 mPa 下跌至 150 mPa 接下去的 5~20 就继续由 89 mPa 跌至 29mPa. 充分地显示了这一指标的客观性与科学性。但是需知男人射出精液不是这个数字，而是它的 10 倍、20 倍、50 倍，100 倍，可用通过泊肃叶定律计算，本文在此不给予论及。

8 射精后精液的表观黏度变化

表 2 记录了本实验精液射出后通过表观黏度测定的 20 分钟内的表观黏度数值，是随着每一分钟时间的延长测定一个数值，可以看出而逐步地表观黏度数值在下降，本文也并将这些数据作图（即图 6）。

表 2 人类精液射出后同一样品表观黏度数值随着每一分钟的时间延长的数

时间（分）	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
表观黏度（mPas）	3000	2400	2032	1530	576	302	255	239	230	200	165
时间（分）		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
表观黏度（mPas）		152	147	130	120	110	104	99	94	93	92

表 2 为精液射出后表观黏度随时间的变化（表中 0 分的表观黏度值是通过直线外推方法估计的，其他的数值是用仪器直接读出的）

所谓表观黏度就是将测定到的剪切应力（单位：mPa），与其相应的切变率(单位： s^{-1})相除的商值（单位：mPa s）。从表 2 与图 6 可以清楚看出，这也是标志着精液液化过程中及其明朗的指标，在精液液化过程中的头 4 分钟，由 3000 mPa s^{-1} 下跌至 576 mPa s^{-1} 接下去的 5~20 就继续由 302 mPa s^{-1} 跌至 92 mPa s^{-1} 。也充分地显示了这一指标的客观性与科学性。

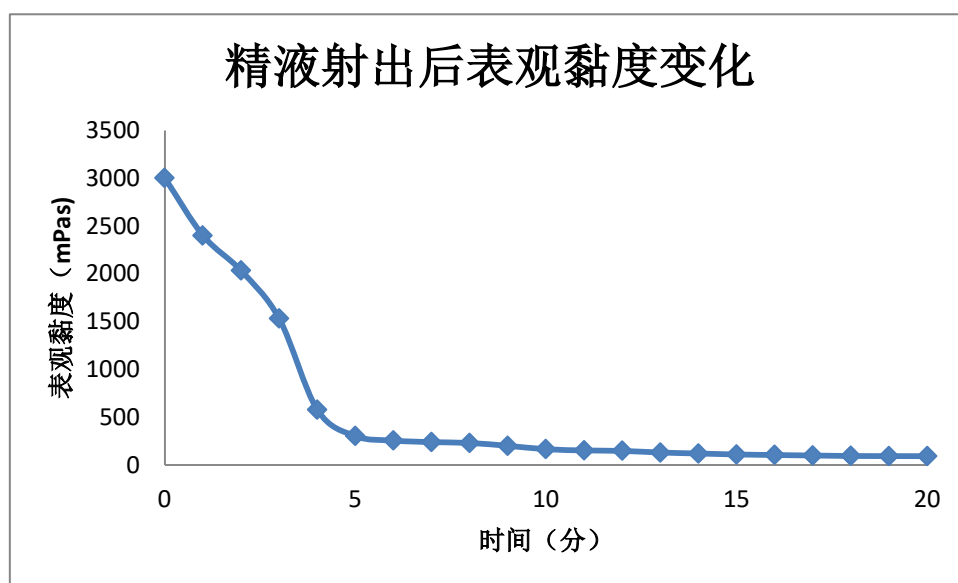


图 6 精液射出后同一标本表观黏度随着每一分钟时间延长的变化（表中 0 分的表观黏度值是通过直线外推方法估计的，其他的数值是用仪器直接读出的，此图表观黏度值是在切变率为 $1s^{-1}$ 的条件下测定的，进行射精后的不同分钟期间的比较）。

9 射精后精液的逆时针滞后环所围面积的变化

表 3 记录了本实验精液射出后通过滞后环测定的 20 分钟内的逆时针滞后环所围的数值，是随着每一分钟时间的延长测定一个数值，可以看出而逐步地逆时针滞后环所围的数值在下降，本文也并将这些数据作图（即图 7）。

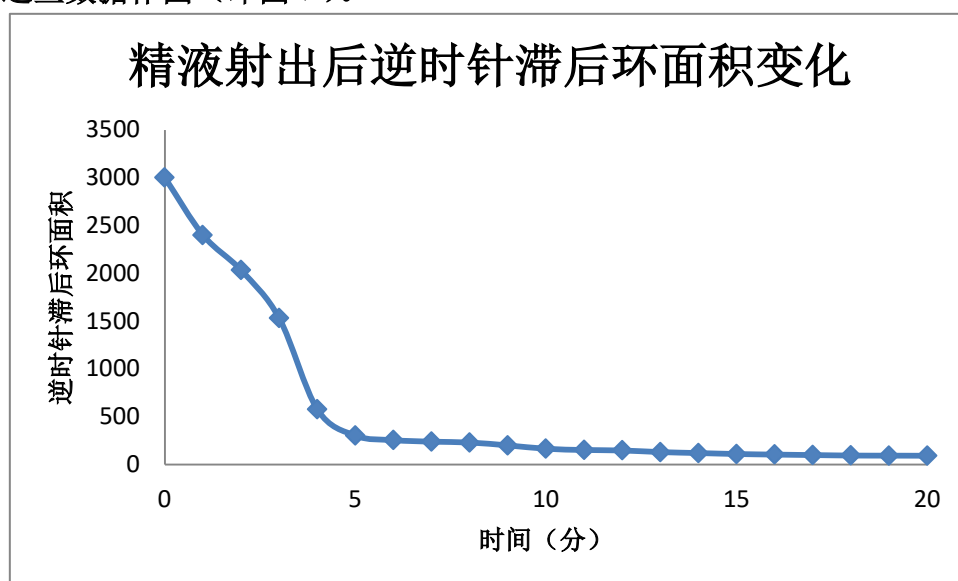


图 7 男性精液射出后，同一标本样品的逆时针环所围的面积（单位：尔格/立方厘米/秒）。随着每一分钟时间延长的变化（表中 0 分的数值是通过直线外推法估计的，其他的数值是用根据滞后环图像直接读出的），环内的面积的单位为尔格/立方厘米/秒，物理意义是功率密度，意思是单位体积、单位时间内的能量变化。逆时针环属于粘弹性环，是属于在系统内储存能量的标志；而顺时针环，则表示在系统内耗竭能量的标志。上图展示逆时针弹性环面积随着时间的延长而消失或缩小标志着精液在液化与稀化，说明从流变学的角度精液的质量是优秀并具有生育能力的。如果没有这种现象，精液的质量与生育能力上是存在问题的。

表 3 精液射出后逆时针滞后环所围面积的变化

时间（分）	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
逆时针环*	无记	2090	1380	411.8	36.75	8.5	8.95	14	11	4.9	5.3
时间（分）	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
逆时针环*		7.1	2.2	2	1.775	1.25	1.7	1.65	1.6	1.55	1.5

*示逆时针环的面积单位为：尔格/立方厘米/秒，物理意义是功率密度，是单位体积、单位时间内的能量变化，逆时针环属于粘弹性环，是属于在系统内储存能量或增加能量；而顺时针环则表示在系统内耗竭外界所供给能量，如黏度计的转动马达。。

图 7 和表 3 示精液被射出后，同一标本样品的逆时针环所围的面积（单位：尔格/立方厘米/秒），随着每一分钟时间延长的变化（表中 0 分的数值是通过直线外推法估计的，其他的数值是用根据滞后环图像直接读出的），环内的面积的单位为尔格/立方厘米/秒，物理意义是功率密度，意思是单位体积、单位时间内的能量变化。逆时针环属于粘弹性环，是属于在系统内储存或增加能量的标志；而顺时针环，则相反表示在系统内耗竭能量的标志。图 7 展示逆时针弹性环面积随着精液射出后时间的延长而消失或缩小，标志着精液在液化与稀化，说明从流变学的角度精液的质量是优秀的并具有生育能力的。如果没有这种现象，精液的质量与生育能力上是存在问题的。

10 射精后精液的顺时针滞后环所围面积的变化

表 4 精液射出后顺时针滞后环所围面积的变化

时间（分）	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
顺时针环	0	0	0	0	7.7	9.5	16.5	8	3.4	5.4	8.4
时间（分）	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
顺时针环		8.25	4.55	6	3	4.7	7.2	12.45	12.15	11.5225	8.7

表 4 和图 8 示精液被射出后，同一标本样品的顺时针环所围的面积（单位：尔格/立方厘米/秒），随着每一分钟时间延长的变化。而顺时针环表示在系统内耗竭能量。在第 4 分钟开始展示顺时针环的面积，并且延长到最终。说明液体内的物质在切变率的作用下，精子与蛋白质分子具有分散作用，标志着精液在继续液化与稀化（表 4 和图 8 中的数据虽然有些上下波动，但是始终存在于平均值为 23 的左右），说明从流变学的角度精液的质量是优的并具有生育能力的。如果没有这种现象，精液的质量与生育能力上是存在问题的。

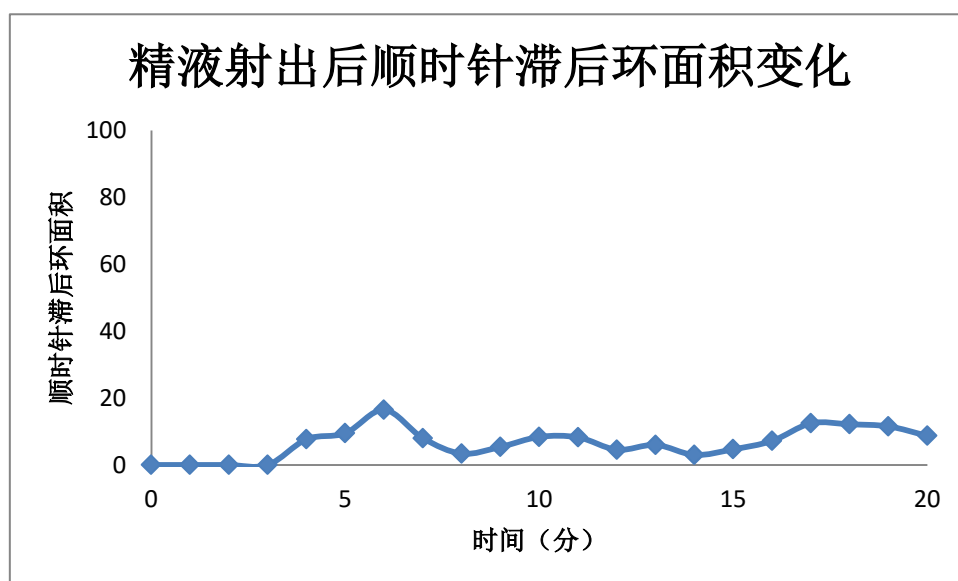


图 8 示精液被射出后，同一标本样品的顺时针环所围的面积（单位：尔格/立方厘米/秒），随着每一分钟时间延长的变化。而顺时针环表示在系统内耗竭能量。在第 4 分钟开始展示顺时针环的面积，并且延长到最终。说明液体内的物质在切变率的作用下，精子与蛋白质分子具有分散作用，标志着精液在继续液化与稀化（表 4 和图 8 中的数据虽然有些上下波动，但是始终存在于平均值为 23 的左右），说明从流变学的角度精液的质量是优的并具有生育能力的。如果没有这种现象，精液的质量与生育能力上是存在问题的。

11 本节总结

本节用回旋流变技术对男性的精液射出后的液化、稀化过程中的 20 分钟以内，每一分钟进行了滞后环曲线走向，是否属于逆时针粘弹性滞后环或顺时针触变性滞后环及其所围面积的大小数值，所求的屈服应力数值，表观黏度数值等指标进行了研究，展示凡是在精液射出后头 3 ~ 4 分钟时具有明显的逆时针滞后环曲线，并所围面积充分可以达 1000(单位尔格/立方厘米/秒)或以上；所获得的屈服应力数值为 2000(单位 mPa)左右或以上，所测定切变率为 1 s^{-1} 情况所测的表观黏度值 1000(单位 mPa s)左右或以上者，并且在 5~20 分钟期间以上指标开始下跌，达至逆时针滞后环所围面积仅仅为 10(单位尔格/立方厘米/秒)左右；所获得的屈服应力数值仅仅为 30(单位 mPa)左右，所测定切变率为 1 s^{-1} 表观黏度值为 90(单位 mPa s)左右，可以确定其精液质量从生物物理与流变学角度是优的，反之则示有问题。这种检查对于夫妇婚后多年双方希望生育，但没有怀孕的夫妇的男方，可做以上检查，这是一项可以推广的工作。但不建议普遍地对男性进行如此的体检。

感谢

The work was supported by grants from DLR, Germany. The rheological instrument and computer software were provided by Brookfield Engineering Laboratory, Inc., USA. The authors should thank to Academician Zhang Yong-Lian, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy; Prof. Artmann Gerhard, University of Applied Sciences Aachen, Germany; Prof. Cokelet Giles, University of Montana, USA; Prof. Rampling Michael W., Imperial College School of Medicine, London, UK; and Prof. Xu. Shi-Xiong, Fudan University, Shanghai, for reviewing the manuscripts and giving advice.

参考文献 References

- 1 Multigner L, Oliva A. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad SaudePublica* 2002; 18: 403-12.
- 2 Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M. Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *BiolReprod* 1989; 40: 635-51.
- 3 Cooper NJ, Holland MK, Breed WG. Extratesticular sperm maturation in the brush-tail possum, *Trichosurus vulpecula*. *J ReprodFertilSuppl* 1998; 53: 221-6.
- 4 Snell WJ, White JM. The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 1996; 85: 629-37.
- 5 Hunnicutt GR, Koppel DE, Myles DG. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in epididymis. *Dev Biol* 1997; 191: 146-59.
- 6 Blobel CP. Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev Reprod* 2000; 5: 75-83.
- 7 Stoffel MH, Busato A, Ftess AE. Density and distribution of anionic site on boar ejaculated and epididymal spermatozoa. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 441-5.
- 8 Catizone A, Ricci G, Galdieri M. Functional role of hepatocyte growth factor receptor during sperm maturation. *J Androl* 2002; 23: 911-8.
- 9 Frenette G, Lessard C, Sullivan R. Selected proteins of "Prostasome-Like Particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *BiolReprod* 2002; 67: 308-13.
- 10 Koksali IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 2003; 5: 95-9.
- 11 Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavy K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000; 15: 1431-4.
- 12 Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod* 2002; 17: 2813-24.
- 13 Casella R, Maduro MR, Misfud A, Lipshutz LL, Yong EL, Lamb DJ. Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J Urol* 2003; 169: 224-7.
- 14 Sutton KA. Molecular mechanisms involved in differentiation of spermatogenic stem cells. *Rev Reprod* 2000; 5: 93-8.
- 15 Sha JH, Zhou ZM, Li JM, Lin M, Zhu H, Zhu H, *et al.* Expression of a novel bHLH-Zip gene in human testis. *Asian J Androl* 2003; 5: 83-8.
- 16 Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. *Federation Francaise des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Spermehumains*. *Hum Reprod* 1997; 12: 740-5.
- 17 Gyllenberg J, Skakkebaek NE, Nielsen NC, Keiding G, Wiersema A. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men; a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *Int J Androl* 1999; 22: 28-36.
- 18 Krause A, Krause W. Seasonal variation in human seminal parameter. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 101: 175-8.
- 19 Kenkel S, Rolf C, Nieschlag E. Occupational risk for male fertility: an analysis of patients attending a tertiary referral centre. *Int J Androl* 2001; 24: 318-26.
- 20 Sun RW, Wang HL. *Clinical Experimental Diagnosis*. China Shanghai Scientific and Technological Press; 2001. p366.
- 21 Shi YD, Pan LF, Yang FK, Artmann GM. Stress-shear hysteresis loops of homogenate suspension from leaves and petioles of *Mimosa pudica*. *J Plant Physiol Mol Biol* 2003; 29: 275-80.
- 22 Shi YD, Pan LF, Yang FK, Wang SQ. A preliminary study on the rheological properties of human ejaculate and changes during liquefaction. *Asian Journal of Andrology*, 2004, 6(4): 299-304.