



谢淑武, 博士, 研究员。2007年6月毕业于复旦大学上海医学院药理学专业, 获博士学位。2007年7月—2022年9月在上海市计划生育科学研究所/上海市生物医药技术研究院从事男性调节生育新药研发工作。2022年10月至今任上海实验动物研究中心金山分中心主任, 主要从事动物模型构建和新药药理毒理研究。现为中国药学会生殖药理专业委员会秘书长, 中国药学会中药与天然药物药理专委会委员, 国家自然科学基金评审专家, 国家卫健委和财政部政府采购审评专家, *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine* 编委, 《实验动物与比较医学杂志》青年编委。已发表论文80余篇, 授权发明专利5项, 参编《药理实验方法学》第4版和《药理方法研究学》等著作。主持国家自然科学基金和上海市自然科学基金等各1项, 作为子课题负责人/课题骨干参与科技部“十二五”支撑项目2项和“十三五”重点研发计划1项; 参研二类新药“左炔诺酮雌二醇避孕贴”“复方孕二烯酮贴片”等已获临床批件; 获原国家计生委科技成果三等奖1项。

雄性不育药物研发相关实验动物模型建立和应用进展

谢淑武, 沈如凌, 林金杏, 范春

(上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 近年来男性不育发病率不断上升, 急需开展雄性不育发病机制和相应药物研发, 以应对我国人口出生率下降和老龄化等新问题。雄性不育动物模型的构建和应用是其中很重要的一环, 它对于准确评价不育治疗药物的药效及作用机制等都具有重要作用。合适的不育动物模型不仅可以减少药物药效的重复评价, 降低动物使用和新药研发成本, 而且对于后续临床试验也具有重要的参考价值。雄性不育动物模型可以通过化学、物理、内分泌、环境雌激素、基因修饰和免疫等方法构建。本文主要介绍了现有的雄性不育药物研发相关实验动物模型, 并对各模型应用现状进行了简要介绍, 以期对雄性不育药物研发人员提供有益的参考。

[关键词] 雄性不育; 药物研发; 实验动物模型

[中图分类号] R-339.2; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)05-0504-08



Progress in Establishment and Application of Laboratory Animal Models Related to Development of Male Infertility Drugs

XIE Shuwu, SHEN Ruling, LIN Jinxing, FAN Chun

(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

Correspondence to: XIE Shuwu (ORCID: 0000-0001-5753-6824), E-mail: xieshw@fudan.edu.cn

[ABSTRACT] As the incidence of male infertility has been increasing during recent years, it is urgent to reveal the pathogenesis of male infertility, as well as to develop the new drugs for treatment of male infertility, in order to solve the declining birth rate and aging problems. The construction and application of male infertile animal models is critical for drug development, which plays an important role in accurately evaluating the efficacy and mechanism of infertility treatment. A suitable infertility model not only can reduce the repeated drug efficacy evaluations, reduce animal usage and the cost of new drug development, but also has important reference value for subsequent clinical trial research. Male infertility

[基金项目] 国家自然科学基金项目“新型5 α -还原酶抑制剂干扰血-附睾屏障后附睾腔液蛋白的筛选鉴定研究”(81100463);上海市自然科学基金项目“基于雄激素调控附睾功能和基因表达探索淫羊藿苷干预度他雄胺所致附睾不育的机制研究”(17ZR1424300)

[第一作者] 谢淑武(1978—),男,博士,研究员,研究方向:生殖疾病模型构建与新药研发。E-mail: xieshw@fudan.edu.cn。ORCID: 0000-0001-5753-6824

laboratory animal models can be constructed through chemical, physical, endocrine, environmental estrogen, gene modification, and immune methods. This article mainly introduces the existing male infertility animal models available for drug development, and briefly introduces the application progress of each model to provide reference for the male infertility drug researchers.

[Key words] Male infertility; Drug development; Laboratory animal models

近年来, 男性生殖健康尤其是男性不育越来越受到人们的关注。由于环境污染、微量元素长期缺乏、不良生活习惯、精神高度紧张、过度吸烟、饮酒、滥用激素类药物和性传播疾病等因素的影响, 现代人类尤其是男性的生育力呈逐年下降的趋势^[1]。目前在全球范围内, 不孕不育的发病率已仅次于肿瘤和心血管疾病, 有15%~20%育龄期夫妇受到不孕不育的困扰, 其中约50%涉及男性因素^[2]。雄性不育实验动物模型作为研究其发病机制和新药研发的重要工具, 可通过化学、物理、内分泌、环境雌激素、免疫和遗传等因素的诱导来构建。虽然目前应用最多的是化学和内分泌诱导模型, 但随着发病机制研究的深入以及造模方法的不断发展, 基因修饰模型和复合因素模型或将代替化学诱导模型, 成为未来雄性不育药物药理研究的主要工具。下面就雄性不育药物研发相关实验动物模型和应用进展进行综述。

1 化学诱导的雄性不育模型

1.1 雷公藤多苷诱导模型

雷公藤多苷是从中药雷公藤根茎中提取的一种脂溶性混合物, 因其具有雄性生殖毒性可诱导建立雄性不育症模型, 该模型可应用于睾丸生精功能障碍的机制及新药开发研究。Wang等^[3]使用雷公藤多苷40 mg/kg, 灌胃给药28 d, 成功构建了SD大鼠生精障碍模型; 与空白对照组相比, 模型组大鼠的睾丸和附睾质量显著降低, 精子数量明显下降, 前向运动精子所占百分率明显降低, 组织学检查表明睾丸曲细精管排列间隙增大, 管腔内精原细胞和精子细胞核固缩和坏死, 各级精子细胞排列紊乱, 睾丸组织中磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phospho-serine/threonine protein kinase, p-AKT)和B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的表达水平均显著降低, 提示雷公藤多苷可能通过调控PI3K/AKT信号通路发挥抗生育作用。Chen等^[4]以雷公藤多苷诱导不育大鼠模型为工具, 观察了五子衍宗丸对雄鼠生精障碍的治疗作用,

发现五子衍宗丸在该模型大鼠体内可有效提升精子数量和活力以及血清激素水平, 并减轻睾丸的病理损伤; 此外, 利用从该模型大鼠分离的原代生殖细胞进行的体外实验表明, 五子衍宗丸可促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡和自噬, 从而具有改善大鼠生精障碍的治疗作用。

1.2 醋酸棉酚诱导模型

棉酚是从草棉、树棉或陆地棉成熟种子、根皮中提取的一种多元酚类物质, 能够引起大鼠睾丸生精小管支持细胞(Sertoli细胞)损伤、曲细精管变性, 抑制精子生成而导致雄性不育。该模型可应用于睾丸氧化应激损伤所致精子生成障碍和精子功能紊乱的机制和新药开发研究。El-Sharakly等^[5]向成年雄性大鼠腹腔内注射20 mg/kg醋酸棉酚, 连续2周(5 d/周), 结果可显著降低大鼠精子数量、精子活力和血清睾酮、促黄体生成素及卵泡刺激素水平, 并增强睾丸组织中17 β -羟基类固醇脱氢酶和17-酮类固醇还原酶的活性。此外, 醋酸棉酚组大鼠血清转氨酶、碱性磷酸酶和肝谷胱甘肽过氧化物酶的活性以及谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽S-转移酶及肝谷胱甘肽水平升高, 而丙二醛、一氧化氮、脂质和肝细胞色素P450活性降低。肝脏和睾丸组织学分析显示, 肝细胞损伤严重, 睾丸出现生精抑制、支持细胞损伤和曲精小管变性。另有研究发现, 醋酸棉酚能激活大鼠睾丸氧化应激和减少ATP合成, 导致睾丸支持细胞膜损伤和精子生成减少, 最后引起生育力下降; 维生素E可以有效预防醋酸棉酚引起的氧化损伤和改善生育力^[6]。

1.3 环磷酰胺诱导模型

环磷酰胺是烷化剂类抗肿瘤药物, 具有显著的免疫抑制作用。环磷酰胺诱导的不育模型可应用于雄性生精功能障碍相关少弱精症的新药研发。Adana等^[7]给予Wistar大鼠环磷酰胺20 mg/kg, 连续灌胃给药21 d, 能影响大鼠睾丸的功能和结构完整性, 抑制睾丸组织中各级精子细胞生成, 破坏睾丸间质细胞(Leydig细胞)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)阳性细胞(增殖细胞), 降低睾丸精

子数量和活力, 导致雄鼠不育; 而使用胸腺酮干预可以缓解解磷酰胺对睾丸生理、再生和组织学完整性的损伤作用。

1.4 腺嘌呤诱导模型

腺嘌呤是一种含氮杂环嘌呤类化合物, 是合成维生素B (腺嘌呤磷酸盐) 的主要原料, 最终代谢产物为尿酸。腺嘌呤可通过黄嘌呤氧化酶反应产生的大量自由基来减少精子发生和睾酮合成, 最后导致雄性不育。该模型可应用于睾丸氧化应激损伤所致精子发生障碍的新药研究。Yu等^[8]给予SD雄性大鼠300 mg/kg腺嘌呤灌胃给药, 连续30 d, 给药结束后模型组血清睾酮和促黄体生成素水平显著下降, 卵泡刺激素明显高于正常对照组, 伴有精子活力下降和畸形率升高; 组织学检查表明, 睾丸精子发生在精母细胞阶段终止, 同时伴有生殖细胞丢失, 曲精管萎缩和壁层紊乱, 甚至曲精管塌陷, 支持细胞和精原细胞减少。选择微量营养素干预可以显著改善腺嘌呤引起的上述参数异常, 可能与微量营养素尤其是维生素A、维生素E、维生素C、锌和硒等促进雄激素合成和分泌、清除自由基及抗氧化有关。

1.5 白消安诱导模型

白消安是最常见的化疗药物之一, 具有诱导睾丸生殖细胞凋亡的能力, 从而导致不育。Moghadam等^[9]通过单次腹腔注射白消安30 mg/kg构建小鼠不育模型, 结果表明与空白对照组相比, 白消安显著降低了睾丸质量、精子参数、睾酮、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶水平和总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAC), 并增加了丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和曲精小管的破坏。进一步使用臭氧和褪黑素处理, 可以显著提高睾丸质量、精子参数、MDA和抗氧化状态, 但不影响TAC水平。Zhao等^[10]通过单次腹腔注射白消安40 mg/kg构建小鼠不育模型, 结果白消安可以显著抑制小鼠精子活力和数量, 单细胞转录组测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 提示它可以抑制精原细胞向精母细胞和精子细胞发育, 而使用海藻酸寡糖可以改善小鼠生殖细胞发育和睾丸微环境, 以恢复白消安抑制的精子发生。

1.6 奥硝唑诱导模型

奥硝唑属于第3代硝基咪唑类的抗感染用药, 具有良好的抗厌氧菌作用, 其硝基转化过程中会产生大量氨基和自由基, 可以氧化攻击精子, 使其结构和功能发生异常, 引起雄性不育。Li等^[11]选择奥硝唑

200 mg/kg灌胃给药, 连续21 d后, 大鼠精子活力和密度显著降低, 尤其是前向运动的精子数量明显减少。该模型大鼠的睾丸组织中, 曲精小管大小不一、间隙增大, 局部曲精小管萎缩坏死, 体积明显缩小, 形状不规则, 管内生精细胞坏死, 数量减少; 其精子尾部的大部分线粒体肿胀, 嵴溶解、破裂或已经消失; 线粒体形态差异明显, 提示其可能通过损伤精子的线粒体结构和功能诱导大鼠不育。

2 内分泌和环境雌激素诱导的雄性不育模型

2.1 雌激素诱导模型

己烯雌酚是人工合成的雌激素, 能产生与天然雌二醇相同的药理作用, 可通过干扰小鼠下丘脑-垂体-睾丸轴而影响精子发生过程, 最后导致小鼠雄性不育, 该模型能较好地模拟雄性生殖内分泌紊乱导致的不育, 适用于激素类不育治疗药物的研发。Liu等^[12]选择己烯雌酚小鼠灌胃给药1 mg/kg, 1次/d, 连续7 d后, 模型小鼠的血清睾酮水平显著下降, 睾丸和附睾质量也随之明显降低, 精子数量接近于零; 其睾丸曲精小管上皮细胞层较薄, 支持细胞数量显著减少, 各级精子细胞消失, 雄激素受体表达显著降低, 而停止给药后6周可基本恢复生育力。进一步研究发现, 己烯雌酚能够干扰小异源二聚体伙伴基因 (nuclear receptor subfamily 0 group B member 2, Nr0b2) 的表达, 而Nr0b2能通过调节生殖细胞进入减数分裂以及睾酮合成来调控睾丸功能。以上结果提示己烯雌酚可能通过抑制小鼠睾丸组织中的精子发生过程而导致雄性不育。

2.2 5 α -还原酶抑制剂诱导模型

附睾上皮组织结构和功能的维持高度依赖于雄激素的存在。已有研究证实, 双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 在附睾中起主要雄激素作用, 相反睾丸组织中的精子发生是一个睾酮依赖性过程。5 α -还原酶抑制剂主要作用是抑制睾酮向DHT的转化。度他雄胺作为一种双重5 α -还原酶抑制剂, 可通过抑制DHT水平来干扰附睾组织中精子的成熟过程, 从而导致雄性不育, 但又不影响睾酮依赖的精子生成, 所以该模型适用于附睾精子成熟异常相关的弱精症机制和新药研发。Xie等^[13]以度他雄胺40 mg/kg灌胃大鼠给药, 连续28 d后, 模型大鼠的附睾精子活力明显下降, 畸形率显著增加, 生育力相应下降; 其附睾上皮细胞核出现染色质聚集, 并有大量空泡形成, 同时周围的线粒体、高尔基体、内质网和核糖体等其

他细胞器形态正常,提示细胞有凋亡前兆;结合同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)、RNA测序GO富集、Genome array聚类分析和结果验证,附睾上皮细胞结构和功能异常可能与细胞凋亡、氧化应激和Nrf2和PI3K介导的信号通路调控有关。用具有雄激素样活性的淫羊藿苷对该模型进行干预治疗,可明显改善附睾不育指标。

2.3 双酚A诱导模型

双酚A的化学名称为2,2-二(4-羟基苯基)丙烷,具有抗雄激素活性,能够诱导雄性大鼠、小鼠不育。Kaur等^[14]对雄性BALB/c小鼠灌胃给予双酚A 1 mg/kg,连续4周,构建不育小鼠模型;结果显示模型小鼠的精子数量较空白对照组显著下降,睾丸曲细精管基底膜不规则,管腔内精子数量极少,各级精子细胞出现高度空泡化;精子的谷胱甘肽过氧化物酶活性显著降低,活性氧(reactive oxygen species, ROS)和脂质过氧化水平显著上升;TUNEL测定显示,模型组小鼠精母细胞和圆形精子细胞凋亡指数明显增加。Qiu等^[15]研究发现,双酚A作用可引起受试动物精子氧化应激和DNA损伤增加,与上述研究结果相一致。

3 物理因素诱导的雄性不育模型

3.1 热应激损伤诱导模型

精子发生是在低于体温4~5℃的阴囊睾丸内完成的,睾丸温度异常升高使代谢加快,破坏平衡的氧化稳态,致使精子损伤而导致不育。热应激损伤不育模型适用于高温作业引起的睾丸生精功能障碍机制和新药研发。Rizzoto等^[16]发现,急性热应激可通过影响抗氧化系统以及Trp53依赖的内源性和外源性凋亡信号通路活性,对精子、精母细胞和精子细胞产生有害影响,从而严重降低小鼠精子质量。Liu等^[17]从60日龄雄鼠中提取睾丸支持细胞,培养24 h后将其暴露于43℃下热应激15 min,构建离体热应激模型;结果发现菟丝子黄酮能上调热应激后支持细胞中AKT、雄激素受体、闭合蛋白和Ki67的表达,提示其可能通过调节支持细胞的增殖和分化活性来治疗男性不育。Gan等^[18]用43℃水浴25 min构建小鼠睾丸热应激模型,并分析了热应激对精液质量和精子发生相关调节因子的影响;结果显示,热应激后第7天,睾丸质量下降至68.45%,精子密度下降至33.20%。高通量测序分析显示,热应激后98个miRNA和369个mRNA下调,77

个miRNA和1424个mRNA上调。这些差异表达基因可能通过影响细胞减数分裂过程和细胞周期,参与调节睾丸萎缩和精子发生障碍;其中,miR-143-3p可能是热应激下影响精子发生的一个具有代表性的潜在关键调控因子。

3.2 辐射损伤诱导模型

辐射特别是电离辐射会损伤人体细胞、组织和器官。同时,辐射作为医疗技术手段也被广泛应用于临床。辐射诱导的组织损伤主要是通过自由基/活性氧形成,同时抗氧化系统不能完全激活,导致男性生育力下降。精原细胞是睾丸中对辐射最敏感的细胞。对睾丸的辐射可能导致生精细胞减少,精子数量严重减少,甚至没有精子,从而导致不育^[19]。为探讨辐射致睾丸损伤的潜在机制和减轻辐射致睾丸损害的干预方法,Yang等^[20]对C57BL/6小鼠进行了8.0 Gy的X射线照射,在辐射暴露后第1、3和7天采集睾丸和附睾,分析精原细胞和精子功能;结果表明,辐射显著破坏了睾丸结构,减少了精原细胞的数量。这与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号激活、受照射睾丸中细胞增殖减少和凋亡细胞增加有关。选择雷帕霉素干预可以通过抑制mTORC1信号通路,促进睾丸在辐射条件下的恢复。

3.3 精索静脉曲张诱导模型

精索静脉曲张是男性不育的常见原因,与睾丸温度升高有关。睾丸温度升高会诱导细胞凋亡、精子发生功能障碍,并导致不育。该模型可以模拟精索静脉曲张引起睾丸氧化应激损伤,对于阐明其诱导少弱精症的机制和相关新药研发都至关重要。Baazm等^[21]选择左肾静脉不完全闭合方法建立大鼠精索静脉曲张模型,诱导60 d后雄鼠精子活力出现明显下降,部分精子DNA断裂,睾丸生精小管上皮细胞出现凋亡,精子染色质成熟度显著降低。Babaei等^[22]选择左肾静脉结扎的方法建立精索静脉曲张不育大鼠模型,术后2个月雄鼠出现精索静脉曲张伴睾丸静脉曲张,睾丸体积和质量明显减小,精子活力和数量明显降低或减少;进一步测定表明,模型鼠的精子ROS、MDA、DNA损伤、超氧化物歧化酶水平显著升高,而对模型鼠给予番茄红素,特别是10 mg/kg剂量,则可以通过提高抗氧化活性和减少ROS来保护精子免受氧化应激(oxidative stress, OS)和精子DNA损伤。

4 免疫诱导的雄性不育模型

男性免疫性不育是一种自身抗精子抗体 (anti-sperm antibody, AsAb) 免疫反应性不育。实验研究是以主动免疫法生成血清或生殖道局部 AsAb, 导致雄性不育的动物模型, 该模型适用于自身免疫导致的雄性不育机制和相关药物研发。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 是革兰阴性菌的主要致病因子。LPS 已被广泛用于建立动物炎症模型, 以促进促炎细胞因子的释放, 诱导强烈的免疫反应。体内注射 LPS 可产生类似于感染的炎症反应, 并抑制动物体内睾酮类固醇激素的产生, 导致精子功能障碍。LPS 诱导的炎症可破坏血-睾丸屏障, 启动 AsAb 的产生, 并诱导精子和生精细胞凋亡。Sun 等^[23] 使用 LPS 7 mg/kg 腹腔内单次注射可成功构建免疫性不育大鼠模型, 与对照组相比, LPS 模型组的睾丸组织中 AsAb 水平显著升高; 同时 TUNEL 染色显示, LPS 组睾丸组织细胞凋亡也明显增加; HE 染色可见睾丸生精细胞数量减少, 细胞稀疏, 细胞间隙增加, 生精细胞脱落; 此外, 血清睾酮、促黄体生成素和卵泡刺激素水平明显下降, 睾丸组织中 IL-1 β 、TNF- α 、AsAb 和 MDA 等炎性和氧化应激因子水平显著升高; 使用六味地黄汤干预 5 d, 可以调节性激素、活性氧、促凋亡因子和免疫因子水平, 从而改善 LPS 诱导的雄性大鼠免疫性不育, 并且有剂量依赖性。

5 精子发生相关基因修饰不育模型

已有大量研究表明基因突变与雄性生殖发育异常密切相关。在哺乳动物中, 雄性生殖细胞经历减数分裂后单倍体发育的核凝聚和染色质重塑, 这一过程被称为精子发生。随着测序成本的不断下降和 CRISPR/Cas9 技术的最新进展, 不断有研究揭示哺乳动物精子缺陷相关的致病基因突变, 并通过基因修饰模型加以验证^[24]。通过研究这些基因修饰动物所涉及基因的功能, 可以精准了解精子发生的各种调节机制。这些研究将为新发现人类男性不育相关特异基因和遗传疾病治疗提供参考和依据。基因修饰模型的建立和研究也将有助于男性不育诊治, 并基于上述靶点开展一系列男性不育的新药研发。

基因突变通常会导致精子发生异常, 从而导致精子数量及活力减少, 或精子形态及功能缺陷。基于这些不同的异常表型, 基因修饰模型可分为 3 种类型,

分述如下。

5.1 少精子症基因修饰模型

少精子症是一种常见的男性不育症。目前已知减数分裂后, 精子发育紊乱可能会导致精子细胞异常凋亡或精子过早成熟, 进而从生精上皮脱落, 使精子数量减少, 从而导致男性生育能力下降。Cotton 等^[25] 通过在雄性单倍体生殖细胞中特异性表达成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1), 创建 FGFR1 阴性转基因小鼠模型; 交配实验显示, 与野生型组相比, FGFR1 阴性仔鼠数量显著减少; 结合计算机辅助精液分析 (computer-aided sperm analysis, CASA) 等分析推测, 这种低生育力是由精子生成数量明显减少和精子获能严重受损共同导致的。进一步对关键信号转导蛋白进行分析, 结果表明 FGFR1 可能通过 PI3K 途径转导信号在野生型精子上发挥功能。上述研究提示, FGFR1 是精子发生所必需的, 并在调节精子获能中发挥关键作用。其他的研究还发现, *M1AP*、*RPL10L* 和 *ZMND15* 等基因缺失可能引起男性少精子症^[26-28]。相关基因修饰动物模型和机制研究正在开展中。

5.2 弱精子症基因修饰模型

精子具有高度特化的结构, 尤其是精子运动所需的长尾。精子鞭毛微管组装缺陷或功能抑制直接抑制精子活力, 从而导致男性生育能力下降, 称为弱精子症。鞭毛的结构完整性对正常精子运动极为重要, 轴丝组装的缺陷导致精子运动能力差^[29]。*DNAH2* 基因可以编码 DNAH2 蛋白, 主要表达于睾丸, 可参与精子鞭毛的组成。Hwang 等^[30] 通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *DNAH2* 突变的雄性小鼠不育模型, 进一步表型分析显示, *DNAH2* 缺失的小鼠精子出现短、弯曲、卷曲或不规则鞭毛; 扫描和透射电镜分析显示, *DNAH2* 缺失的小鼠精子的鞭毛超微结构严重紊乱。该结果表明 DNAH2 对精子鞭毛形成的多个步骤至关重要, 可以为精子鞭毛多形态异常和弱精子症发病机制研究提供参考和帮助。其他如 *ADCY10*、*EIF4G1*、*GALNTL5*、*SPAG17* 和 *TRPC5* 等基因缺失主要引起雄性精子活力下降, 导致弱精子症发生^[31-35]。相关基因修饰模型和表型研究将有助于阐明男性精子活力和功能异常的分子机制, 对于临床男性不育弱精症的诊断和特异性治疗具有重要意义。

5.3 畸形精子症基因修饰模型

畸形精子症的特征是精子头部或尾部存在异常形

态,通常与精子活力低密切相关。畸形精子症可分为多态性和单态性。多形态畸形精子症表现为大量精子的异质性异常;而单形态畸形精子症表现为特定的同质形态缺陷,包括大精子症、球精子症和无头精子综合征。大精子症主要是由于精子细胞核凝聚失败而导致精子头部增大,极光激酶C(aurora kinase C, *AURKC*)是目前唯一表现出这种表型的已知基因。*AURKC*基因缺陷小鼠表现为精子染色质不均匀凝结和顶体疏松的钝头^[36]。球精子症是一种常见的生殖障碍,可导致男性不育,主要特征为顶体畸形或缺失。*GM130*是一种顺式侧定位的高尔基体基质蛋白。Han等^[37]通过*GM130*基因敲除构建了雄性小鼠不育模型,该模型小鼠的精子缺乏顶体、圆形精子头和线粒体鞘的异常组装,但不影响前顶体小泡的分泌。无头精子综合征表现为精液中通常含没有头部的精子鞭毛,多由精子头尾耦合装置的缺陷形成引起,与*SUN5*、*PMFBP1*、*SPATA6*和*SPATC1*等基因的突变相关。其中最常见的是*SUN5*突变。Zhang等^[38]利用TALEN技术构建*SUN5*基因敲除小鼠模型,发现*SUN5*^{-/-}小鼠的精子头尾连接被破坏,与人类无头精子综合征相似,并证实*SUN5*可能通过与*Nesprin3*相互作用,参与调控精子头部和尾部连接的核骨架和细胞骨架复合物的形成;此外,*SUN5*^{-/-}小鼠睾丸中有47种蛋白上调,56种蛋白下调,其中,精子发生相关蛋白ODF1和ODF2的下调也可能导致精子头尾连接损伤。这一研究表明,*SUN5*对*Nesprin3*在后核膜的定位至关重要,而后核膜在精子头尾连接中起着重要作用。

6 总结与展望

男性不育病因十分复杂,如以人作为实验对象深入探讨其发病机制,推动药物研发的进展缓慢,也不符合伦理要求,临床研究在时间和空间上都存在局限性。雄性不育实验动物模型的应用,规避了在人体上进行实验可能带来的风险,推动了临床前不育治疗新药的研发进程,值得更多关注和探讨。

本文系统介绍了雄性不育药物研发相关实验动物模型。目前应用最广的是化学诱导模型,其优点是前期有较多文献支持,造模成本低,周期短,质控和重复性好,同行认可度高;缺点是模型还没有市场化和统一评价标准,造模药物的来源、剂量和给药时间等在不同文献中都有差异,模型制备的成功还需要多次摸索才能成功,同时造模药物对于全身其他器官如肝、

肾等都可能产生影响,进一步会对受试药物的吸收、分布、代谢等产生影响,降低了雄性不育新药评价的准确性和可靠性。内分泌/激素诱导模型的特点是通过干扰下丘脑-垂体-睾丸性腺轴来制备不育模型,靶器官聚焦睾丸,主要影响精子发生,可以较好地模拟人体生殖内分泌紊乱导致的男性不育,是激素类治疗药物的理想模型。物理诱导如热应激和辐射损伤等以局部生殖损伤为特征,造模所需损伤强度和时间等条件较难确定,相应受试药物的药效评价标准很难量化,同时生殖功能受到损害后极易恢复,适用于较短时间给药的药效学评价。精索静脉曲张和隐睾等手术动物模型病因和靶器官明确,适用于手术为主、药物为辅的评价模型。免疫学不育模型以AsAb水平作为主要评价指标,炎症氧化因子为辅助指标,适用于自身免疫导致的雄性不育模型药物研发。随着睾丸和附睾精子发生和成熟特异基因的不断发现,小鼠基因修饰模型得到快速发展,基于靶点特异的单基因或多基因敲除小鼠不育模型,对于研究男性不育的分子机制是很有帮助的,以这些特异基因为靶点的药物研究也在不断进行中,为今后男性不育的个性化精准治疗提供了可能。

目前,男性不育发病率呈逐年上升的趋势,而在国家生育鼓励政策的大背景下,临床对于男性不育的研究热度不断增强。相应地,基础研究对于不育模型的需求亦显著增加,模型研发方式从传统经典的药物诱导为主向基因修饰等方向发展,使不育模型更具靶向性和特异性。基于这些模型的发病机制研究和治疗也更有针对性,可以进一步提高男性不育预防和药物治疗效果。结合生物信息学和大数据分析技术,未来基于化学、物理、内分泌和基因修饰等方法的复合型不育实验动物模型研发或将成为可能。上述不育动物模型的研发和应用,将为男性不育的综合治疗带来希望和可能,值得不断关注和期待。

[作者贡献 Author Contribution]

谢淑武确定文章框架,检索文献,撰写初稿并修改;沈如凌、林金杏和范春参与文稿修订,给予修改意见。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] CHOY J T, EISENBERG M L. Male infertility as a window to health[J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(5): 810-814. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015.

- [2] PASTUSZAK A W, HERATI A S, EISENBERG M L, et al. The risk of birth defects is not associated with semen parameters or mode of conception in offspring of men visiting a reproductive health clinic[J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(4): 733-739. DOI: 10.1093/humrep/dez005.
- [3] WANG J S, BAO B H, MENG F C, et al. The mechanism analysis using PI3K/AKT pathway for the effects of levocarnitine in the treatment of spermatogenic dysfunction [J]. *Andrologia*, 2022, 54(1): e14290. DOI: 10.1111/and.14290.
- [4] CHEN W Q, WANG B, DING C F, et al. *In vivo* and *in vitro* protective effects of the Wuzi Yanzong pill against experimental spermatogenesis disorder by promoting germ cell proliferation and suppressing apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114443. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114443.
- [5] EL-SHARAKY A S, NEWAIRY A A, ELGUINDY N M, et al. Spermatotoxicity, biochemical changes and histological alteration induced by gossypol in testicular and hepatic tissues of male rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(12):3354-3361. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.004.
- [6] SANTANA A T, GUELFY M, MEDEIROS H C D, et al. Mechanisms involved in reproductive damage caused by gossypol in rats and protective effects of vitamin E[J]. *Biol Res*, 2015, 48(1):43. DOI: 10.1186/s40659-015-0026-7.
- [7] ADANA M Y, IMAM A, BELLO A A, et al. Oral thymoquinone modulates cyclophosphamide-induced testicular toxicity in adolescent Wistar rats[J]. *Andrologia*, 2022, 54(4): e14368. DOI: 10.1111/and.14368.
- [8] YU Z Z, CHEN J, SHOU P Q, et al. Effects of micronutrients on the reproduction of infertility rat model induced by adenine [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9):2754-2762.
- [9] MOGHADAM M T, DADFAR R, KHORSANDI L. The effects of ozone and melatonin on busulfan-induced testicular damage in mice[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2021, 25(2): 176-184. DOI: 10.5935/1518-0557.20200081.
- [10] ZHAO Y, ZHANG P F, GE W, et al. Alginate oligosaccharides improve germ cell development and testicular microenvironment to rescue busulfan disrupted spermatogenesis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(7):3308-3324. DOI: 10.7150/thno.43189.
- [11] LI G S, XU Y J, LI Y X, et al. Qiangjing Tablets ameliorate asthenozoospermia via mitochondrial ubiquitination and mitophagy mediated by LKB1/AMPK/ULK1 signaling[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 271-280. DOI: 10.1080/13880209.2023.2168021.
- [12] LIU M, LUO R C, WANG H, et al. Recovery of fertility in quinnestrol-treated or diethylstilbestrol-treated mice: implications for rodent management[J]. *Integr Zool*, 2017, 12(3):250-259. DOI: 10.1111/1749-4877.12236.
- [13] XIE S W, LI G T, QU L J, et al. Identification of new epididymal luminal fluid proteins involved in sperm maturation in infertile rats treated by dutasteride using iTRAQ[J]. *Molecules*, 2016, 21(5):602. DOI: 10.3390/molecules21050602.
- [14] KAUR S, SALUJA M, BANSAL M P. Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: modulation by selenium[J]. *Andrologia*, 2018, 50(3). DOI: 10.1111/and.12834. DOI: 10.1111/and.12834.
- [15] QIU W H, CHEN J S, LI Y J, et al. Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2016, 130: 93-102. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.014.
- [16] RIZZOTO G, BOE-HANSEN G, KLEIN C, et al. Acute mild heat stress alters gene expression in testes and reduces sperm quality in mice[J]. *Theriogenology*, 2020, 158: 375-381. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.002.
- [17] LIU C X, HU S Q, LIU D L, et al. The effect of semen cuscuteae flavonoid on Sertoli cells and blood-testis barrier in male infertility: integrating network pharmacology and experimental verification[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1):986-999. DOI: 10.1080/13880209.2023.2229380.
- [18] GAN M L, JING Y H, XIE Z W, et al. Potential function of testicular microRNAs in heat-stress-induced spermatogenesis disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10):8809. DOI: 10.3390/ijms24108809.
- [19] FUKUNAGA H, KAMINAGA K, SATO T, et al. Application of an *ex vivo* tissue model to investigate radiobiological effects on spermatogenesis[J]. *Radiat Res*, 2018, 189(6): 661-667. DOI: 10.1667/RR14957.1.
- [20] YANG J, XU R, LUAN Y Y, et al. Rapamycin ameliorates radiation-induced testis damage in mice[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:783884. DOI: 10.3389/fcell.2022.783884.
- [21] BAAZM M, BABAEI R, FATHI A N, et al. Resveratrol ameliorates spermatogenesis by increasing protamine 1, 2 and HSPA2 expression in experimental varicocele rat model [J]. *Rev Int Androl*, 2023, 21(4):100370. DOI: 10.1016/j.androl.2023.100370.
- [22] BABAEI A, ASADPOUR R, MANSOURI K, et al. Lycopene protects sperm from oxidative stress in the experimental varicocele model[J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(12):6806-6817. DOI: 10.1002/fsn3.2632.
- [23] SUN X Y, WU B, GENG L G, et al. Xiaokang Liuwei Dihuang Decoction ameliorates the immune infertility of male rats induced by lipopolysaccharide through regulating the levels of sex hormones, reactive oxygen species, pro-apoptotic and immune factors[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111514. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111514.
- [24] AZHAR M, ALTAF S, UDDIN I, et al. Towards post-meiotic sperm production: genetic insight into human infertility from mouse models[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(10):2487-2503. DOI: 10.7150/ijbs.60384.
- [25] COTTON L, GIBBS G M, SANCHEZ-PARTIDA L G, et al. FGFR-1 [corrected] signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 1):75-84. DOI: 10.1242/jcs.02704.
- [26] TU C F, WANG Y, NIE H C, et al. An M1AP homozygous splice-site mutation associated with severe oligozoospermia in a consanguineous family[J]. *Clin Genet*, 2020, 97(5): 741-746.

- DOI: 10.1111/cge.13712.
- [27] TU C F, MENG L L, NIE H C, et al. A homozygous RPL10L missense mutation associated with male factor infertility and severe oligozoospermia[J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(3): 561-568. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.10.029.
- [28] HU T Y, ZHANG H, MENG L L, et al. Novel homozygous truncating variants in ZMYND15 causing severe oligozoospermia and their implications for male infertility[J]. *Hum Mutat*, 2021, 42(1):31-36. DOI: 10.1002/humu.24138.
- [29] COUTTON C, ESCOFFIER J, MARTINEZ G, et al. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human[J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(4):455-485. DOI: 10.1093/humupd/dmv020.
- [30] HWANG J Y, NAWAZ S, CHOI J, et al. Genetic defects in *DNAH2* underlie male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella in humans and mice[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 662903. DOI: 10.3389/fcell.2021.662903.
- [31] AKBARI A, PIPITONE G B, ANVAR Z, et al. ADCY10 frameshift variant leading to severe recessive asthenozoospermia and segregating with absorptive hypercalciuria[J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(6):1155-1164. DOI: 10.1093/humrep/dez048.
- [32] SHA Y W, LIU W S, HUANG X J, et al. EIF4G1 is a novel candidate gene associated with severe asthenozoospermia [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(8): e807. DOI: 10.1002/mgg3.807.
- [33] HAGIUDA J, TAKASAKI N, OYA M, et al. Mutation of *GALNTL5* gene identified in patients diagnosed with asthenozoospermia[J]. *Hum Fertil*, 2020, 23(4):226-233. DOI: 10.1080/14647273.2018.1562239.
- [34] XU X, SHA Y W, MEI L B, et al. A familial study of twins with severe asthenozoospermia identified a homozygous SPAG17 mutation by whole-exome sequencing[J]. *Clin Genet*, 2018, 93(2):345-349. DOI: 10.1111/cge.13059.
- [35] ZHU G B, XIE C Y, YANG Z H, et al. Expression of TRPC5 is decreased in the sperm of patients with varicocele-associated asthenozoospermia[J]. *Biomed Rep*, 2018, 8(6): 529-534. DOI: 10.3892/br.2018.1089.
- [36] DIETERICH K, RIFO R S, FAURE A K, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5):661-665. DOI: 10.1038/ng2027.
- [37] HAN F, LIU C Y, ZHANG L J, et al. Globozoospermia and lack of acrosome formation in GM130-deficient mice[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2532. DOI: 10.1038/cddis.2016.414.
- [38] ZHANG Y F, YANG L F, HUANG L H, et al. SUN₅ interacting with Nesprin3 plays an essential role in sperm head-to-tail linkage: research on Sun5 gene knockout mice[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:684826. DOI: 10.3389/fcell.2021.684826.

(收稿日期:2023-08-21 修回日期:2023-10-14)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁)

【引用本文】

谢淑武, 沈如凌, 林金杏, 等. 雄性不育药物研发相关实验动物模型建立和应用进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(5): 504-511. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.120.

XIE S W, SHEN R L, LIN J X, et al. Progress in establishment and application of laboratory animal models related to development of male infertility drugs[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(5): 504-511. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.120.

《实验动物与比较医学》2024年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管,上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办,是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被瑞典DOAJ、美国Chemical Abstracts和Ulrichsweb、英国CAB Abstracts和Global Health、波兰ICI World of Journals和ICI Master List、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)和美国EBSCO数据库,以及中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录,并入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究,以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理,以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊,大16开,铜版纸,彩色印刷;全年出版6期,每期定价30元/本,全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅,邮发代号为4-789;也可以联系本刊编辑部购买,联系电话:021-50793657。E-mail:bjb50793657@163.com。编辑部地址:上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部