

卢宗林,赵海洋,王晖,等.两种造模方法建立弱精子症伴高 SDF 小鼠模型的比较研究 [J].中国比较医学杂志,2025,35(3):48-57.

Lu ZL, Zhao HY, Wang H, et al. Comparative experimental study of sodium benzoate and corticosterone in a mouse model of asthenozoospermia with high sperm DNA fragmentation [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(3): 48-57.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.03.005

两种造模方法建立弱精子症伴高 SDF 小鼠模型的比较研究

卢宗林^{1,2},赵海洋^{3,4},王晖³,王鑫³,孙自学^{5*}

(1.河南中医药大学第二临床医学院,郑州 450008;2.北京中医药大学东直门医院洛阳医院,河南 洛阳 471000;
3.南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室,基础医学院组织胚胎学系,南京 211166;
4.上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心,上海 201203;5.河南省中医院,郑州 450000)

【摘要】 目的 通过激素皮质酮(corticosterone, CORT)激素和化合物苯甲酸钠(sodium benzoate, NaB)诱导构建弱精子症(asthenozoospermia, AZS)伴高精子DNA碎片化(sperm DNA fragmentation, SDF)小鼠模型,探索AZS伴高SDF动物模型的制备方法。**方法** 将50只3周龄雄性ICR小鼠随机分为CORT处理组30只,NaB处理组20只。CORT处理组分为6组,分别为饮水高(500 μg/mL)、中(200 μg/mL)、低(10 μg/mL)剂量组、饮水对照组、注射造模组(40 mg/kg)和注射对照组(生理盐水),每组5只,连续造模50 d。NaB处理组分为4组,分别为灌胃高(500 mg/kg)、中(300 mg/kg)、低(100 mg/kg)剂量组和对照组(生理盐水),每组5只,连续造模50 d。造模中观察各组小鼠生理状态并持续记录体重变化,结束后取小鼠附睾尾部精子观察精子运动能力和精子DNA碎片化指数(DNA fragmentation index, DFI)。**结果** 注射造模组体重变化率出现下降趋势,与注射对照组相比无显著性差异($P>0.05$),灌胃高剂量组体重变化率下降,与对照组相比差异显著($P<0.05$);注射造模组前向运动精子百分率出现下降趋势,与注射对照组相比无显著性差异($P>0.05$),NaB灌胃高剂量组前向运动精子百分率下降,与对照组相比差异显著($P<0.05$);注射造模组DFI出现升高趋势,与注射对照组相比无显著性差异($P>0.05$),灌胃高剂量组DFI升高,与对照组相比差异显著($P<0.05$)。**结论** NaB 500 mg/(kg·d)剂量持续50 d灌胃造模是构建AZS伴高SDF动物模型较为理想的方法。

【关键词】 弱精子症伴高SDF;小鼠模型;苯甲酸钠;皮质酮

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 03-0048-10

Comparative experimental study of sodium benzoate and corticosterone in a mouse model of asthenozoospermia with high sperm DNA fragmentation

LU Zonglin^{1,2}, ZHAO Haiyang^{3,4}, WANG Hui³, WANG Xin³, SUN Zixue^{5*}

【基金项目】 国家自然科学基金(82274536),洛阳市科技发展计划项目(2022017Y)。

【作者简介】 卢宗林(1975—),男,在读博士研究生,主任医师,研究方向:中医药防治生殖和男科疾病。

E-mail: Luzoli1975@126.com

【通信作者】 孙自学(1965—),男,硕士,主任医师,博士生导师,研究方向:中西医结合防治生殖和男科疾病。

E-mail: sunhhzx@163.com

- (1. the Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China.
2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine Dongzhimen Hospital Luoyang Hospital, Luoyang 471000.
3. State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166.
4. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203.
5. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Objective To prepare a mouse model of asthenozoospermia (AZS) with high sperm DNA fragmentation (SDF) using corticosterone (CORT) and sodium benzoate (NaB). **Methods** Fifty 3-week-old male ICR mice were divided randomly into CORT-treated ($n=30$) and NaB-treated ($n=20$) groups. The CORT group was further divided into the following six groups ($n=5$ per group): high CORT (500 $\mu\text{g/mL}$), medium CORT (200 $\mu\text{g/mL}$), and low CORT (10 $\mu\text{g/mL}$) drinking water group, drinking water control group, CORT injection (40 mg/kg) group, and injection control group (normal saline). The animals were modeled continuously for 50 d. Mice in the NaB group were further divided into four groups ($n=5$ per group): high NaB (500 mg/kg), medium NaB (300 mg/kg), and low NaB (100 mg/kg) gavage groups, and control group (normal saline). The animals were modeled continuously for 50 d. The physiological state of the mice in each group was observed and mass changes were recorded continuously. The sperm motility capacity and DNA fragmentation index (DFI) of the sperm were observed from the tail of the epididymis after the end of the modeling. **Results** The rate of mass change in the CORT-injection modeling group showed a downward trend. There was no significant difference ($P>0.05$) in the high NaB gavage group, and the rate of body mass change in the high NaB gavage group was significantly decreased compared with the control group ($P<0.05$). The percentages of forward motility sperm were significantly decreased in the CORT injection group ($P>0.05$) and the percentage in the high NaB gavage group ($P<0.05$), compared with the control group. The DFI was increased in the CORT injection group compared with the control group, but the difference was not significant ($P>0.05$), and the DFI in the high NaB gavage group was significantly increased compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusions** Intragastric gavage with NaB 500 mg/(kg · d) for 50 d is an ideal method for constructing an animal model of AZS with high SDF.

【Keywords】 asthenozoospermia with high SDF; mouse model; sodium benzoate; corticosterone

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

精子 DNA 碎片化(sperm DNA fragmentation, SDF)是一项新的反应精子功能的检测指标^[1],是目前公认的导致男性不育的重要原因^[2]。精子 DNA 碎片化指数(DNA fragmentation index, DFI)是精子发生及成熟过程中,精子 DNA 完整性被破坏,发生单链或双链断裂而产生断裂碎片的程度^[3],表示精液中具有碎片化 DNA 的精子的百分比^[4],是男性不育一种新的风险分层生物标志物^[5]。弱精子症(asthenozoospermia, AZS)伴高 SDF 是男性不育症中最常见的类型,研究表明高 SDF 常伴发精子前向运动能力下降^[6],因此 AZS 伴高 SDF 也成为男性不育研究的热点之一,建立标准的动物模型是治疗此类男性不育临床前研究迫切需要解决的问题,为寻求更适合的诊疗方案,明确有效药物的作用靶点及机

理,需要探索契合临床发病机理的动物模型。

研究表明,环境污染物能够通过诱导氧化应激、改变生精细胞周期、诱导正常细胞凋亡等途径影响男性生育力^[7]。目前常用于精子 DFI 升高的造模化学诱导物如苯并(a)芘(Benzo(a)pyrene, Bap)^[8]、邻苯二甲酸二乙基己酯^[9]、环磷酸胺^[10]等,均为毒性较大的化学物;另外环境污染物微塑料也被用于大鼠精子 DNA 损伤模型的诱导^[11]。苯甲酸钠(sodium benzoate, NaB)属于苯甲酸衍生物,是一种普遍采用的化学合成的防腐剂,广泛应用于食品、饮料、药品、饲料和化妆品等行业,为日常生活接触的毒性较低化学物品。目前研究显示,NaB 会影响精子质量,可以导致雄性小鼠出现弱精及精子尾畸形等表现,并且随着浓度的增加会进一步损伤精子头部形态及

受精功能^[12-13]。

研究表明长期不良生活方式,如压力应激触发的级联反应会导致精子的发生过程失调,同时导致精子的质量参数下降或形态学的改变^[14],慢性压力应激激活下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)可使体内糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)分泌增加,GCs在哺乳类动物体内以皮质醇的形式存在,而在啮齿类动物体内则以皮质酮(corticosterone, CORT)的形式存在,故研究者常采用CORT饮水或注射CORT的方式模拟慢性或急性应激状态^[15-16],体内糖皮质激素即CORT的持续升高则标志着应激的发生。

环境毒素和压力应激是造成精子DNA损伤的常见诱因,故本实验选择环境低毒的化合物NaB和压力应激模拟物CORT来诱导建立AZS伴高SDF小鼠模型,探讨建模的最佳方案。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级3周龄雄性ICR小鼠50只,体质量17~23 g,购自杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2024-0004]。动物实验操作及饲养均在江苏省实验动物中心进行[SYXK(苏)2021-0023]。房间控制光照/黑暗为12 h/12 h,温度20~26℃,湿度50%~70%,自由摄食、水,使其适应所处实验环境,直至达到适合年龄。实验动物及实验步骤符合国家实验动物管理条例,实验动物处置严格遵循3R原则。该研究经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准实验(ICACUC-2402036)。

1.2 主要试剂与仪器

皮质酮CORT(阿拉丁,南京晚晴,500 mg);皮质醇CORT(阿拉丁,南京晚晴,1 g);吐温80(Tween 80)(Sinopham,南京晚晴,500 g CP);二甲亚砜(DMSO)(碧云天,500 mL);NaB(上海源叶生物科技有限公司,250 g);生理盐水(NS)(石家庄四药有限公司,500 mL);10×TEN缓冲液(森贝伽生物,100 mL);吖啶橙染色试剂盒(碧云天,100~1000次);TritonX-100(BioFroxx,100 mL);NaCl(阿拉丁);HCl(华天生物科技有限公司,0.1 mol/500 mL)。分析型流式细胞仪(BD

FACSVerse, Biosciences);精虫动力分析仪(IVOS, 深华生物);电子天平(320XB, Precisa);冰箱(BCD-520WPJD, TCL);离心机(D3024, DLAB)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组和造模

将50只3周龄ICR雄性小鼠随机分为CORT饮水组20只,其中分为4组,每组5只,饮水对照组(1% DMSO 饮水),饮水低剂量组(1% DMSO 加 CORT, 10 μg/mL),饮水中剂量组(1% DMSO 加 CORT, 200 μg/mL),饮水高剂量组(1% DMSO 加 CORT, 500 μg/mL),共造模50 d;CORT注射组10只,其中分为2组,注射对照组(1% DMSO 加 1% Tween 80 NS, 给药体积10 μL/g),注射造模组(1% DMSO 加 1% Tween 80 NS 加 CORT, 给药体积10 μL/g, 给药剂量40 mg/kg),共造模50 d;NaB灌胃组20只,其中分为4组,每组5只,对照组(NS, 给药体积10 μL/g),灌胃低剂量组(NaB 加 NS, 给药剂量100 mg/kg),灌胃中剂量组(NaB 加 NS, 给药剂量300 mg/kg),灌胃高剂量组(NaB 加 NS, 给药剂量500 mg/kg),共造模50 d(各分组及用药见表1)。

1.3.2 观察指标及方法

(1)一般状况观察:在实验过程中每天记录小鼠的体质量变化,观察小鼠的精神状态、毛色、饮食等一般情况。于造模第51天处死小鼠并完成采样。

(2)精子常规检测:①小鼠处死,取附睾尾,并剪2~3个开口,放入200 μL 37℃预热的HTF中,使附睾尾中精子自由游动5~10 min。将附睾尾组织取出,用移液器轻柔吹打精子混悬液。②设定精虫动力分析仪参数,取10 μL精子悬液,滴于检测孔内,上机检测,每个样本随机选取至少5个视野进行分析,每个样本重复检测2次。

(3)DFI检测:DFI检测使用SCSA法,严格按照试剂盒说明进行操作:①小鼠安乐死后,取其附睾尾,并剪2~3个开口,置于200 μL 37℃预热的1×TNE缓冲液中,使附睾尾中精子自由游动5~10 min。将附睾尾组织取出,用移液器轻柔吹打精子混悬液。②室温2000 r/min离心5 min,弃去上清液,用200 μL 1×TNE缓冲液清洗2~3次后,吹打均匀得到小鼠精子混悬液。每100 μL混悬液中加入300 μL酸处理液,涡旋混匀30 s。

表 1 小鼠造模分组情况
Table 1 Mouse modeling grouping

组别 Groups		药物信息 Medication information	给药剂量 Administered dose	给药方式 Administration method
COTR 饮水组 CORT drink water group	饮水对照组 Drink water control group	1% DMSO	—	饮水 Drinking water
	饮水低剂量组 Low COTR drink water group		10 μg/mL	
	饮水中剂量组 medium COTR drink water group	CORT+1% DMSO	200 μg/mL	
	饮水高剂量组 High COTR drink water group		500 μg/mL	
CORT 注射组 CORT injection group	注射对照组 Injection control group	1% DMSO+1% Tween 80 NS	—	皮下注射 Hypodermic injection
	注射造模组 CORT injection group	CORT+1% DMSO+1% Tween 80 NS	40 mg/kg	
NaB 灌胃组 NaB gavage group	对照组 Control group	NS	—	灌胃 Gavage
	低剂量组 Low group		100 mg/kg	
	中剂量组 Medium group	NaB+NS	300 mg/kg	
	高剂量组 High group		500 mg/kg	

③避光环境下加入 800 μL AO 染色液,吹打均匀,室温避光静止 10 min。④使用分析型流式细胞仪对每个样本中 10 000 个精子进行流式分析。⑤通过 FlowJo_v 10.8.1 软件分析,统计 DFI。

1.4 统计学方法

所有统计分析均使用 SPSS v 25.0 统计软件进行。数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,若数据满足正态分布,同时符合方差齐性,则采用独立样本 *t* 检验进行两两比较;如若不满足正态分布,则采用的统计方法取决于方差。符合方差齐性,则采用单因素方差分析;否则使用非参数检验,以 $P<0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

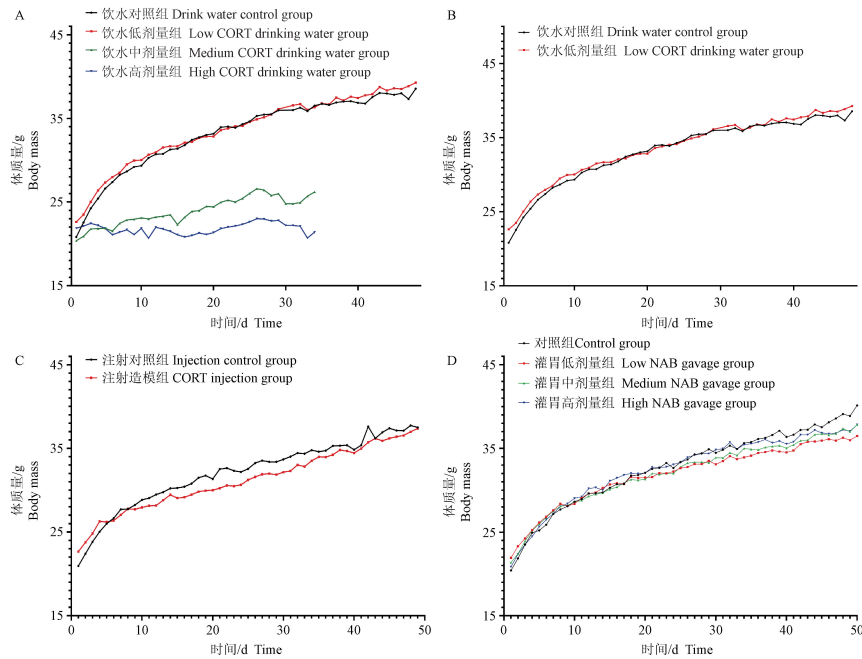
2.1 造模对小鼠体质量的影响

饮水低剂量组与饮水对照组相比,体质量及体质量变化率均无显著性差异($P>0.05$),其中饮水中剂量组和饮水高剂量组小鼠全部死亡,提示造模方法不合适,未进行评估;注射造模组与注

射对照组相比,体质量及体质量变化率出现下降趋势,但无显著性差异($P>0.05$);灌胃低、中、高剂量组与对照组相比,体质量曲线均无显著性差异($P>0.05$),灌胃低剂量组与对照组体质量变化率相比显著性降低($P<0.05$),灌胃中剂量组与对照组体质量变化率相比无显著性差异($P>0.05$),灌胃高剂量组与对照组体质量变化率相比显著降低($P<0.05$,图 1、图 2)。

2.2 造模对小鼠精子运动能力的影响

饮水低剂量组与饮水对照组精子浓度、活率、前向运动率相比均无显著性差异($P>0.05$);注射造模组与注射对照组出现精子运动能力下降趋势,但无显著性差异($P>0.05$);灌胃低、中、高剂量组与对照组精子浓度相比均无显著性差异($P>0.05$),灌胃低剂量组与对照组相比精子活率、前向运动率无显著性差异($P>0.05$),灌胃中剂量组与对照组相比精子活率、前向运动率显著降低($P<0.05$),灌胃高剂量组与对照组相比精子活率、前向运动率显著降低($P<0.05$,图 3)。

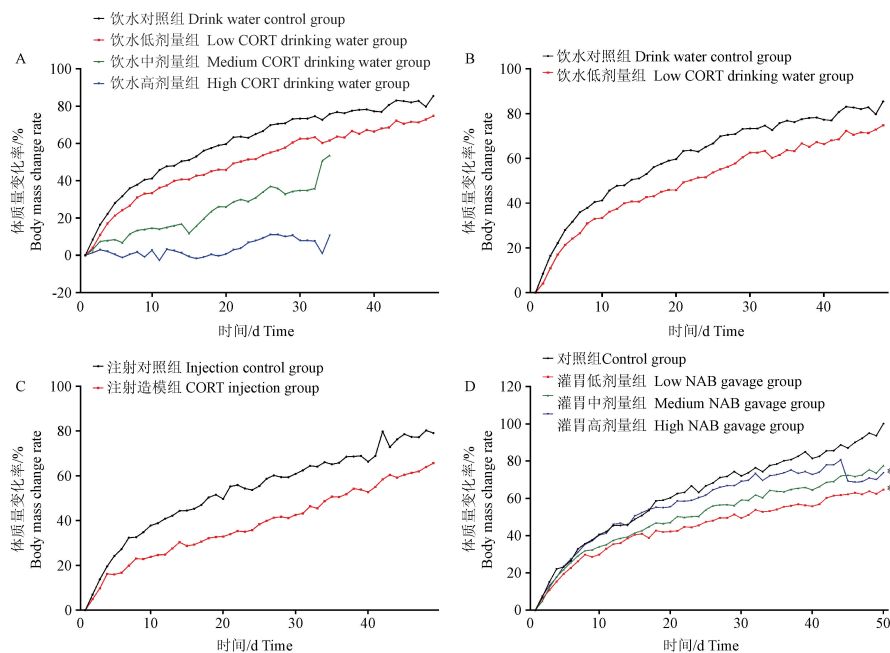


注:A:CORT 饮水组体质量曲线;B:CORT 饮水组体质量曲线(中、高剂量组中途死亡不做统计);C:CORT 注射组体质量曲线;D:NaB 灌胃组体质量曲线。

图 1 各组小鼠造模过程体质量曲线

Note. A, Body mass curve of CORT drink group. B, Body mass curve of CORT drink group (death in the middle and high dose groups was not statistically recorded). C, Body mass curve of group CORT injection group. D, Body mass curve of NaB gavage group.

Figure 1 Body mass curves of mice in each group during the modeling process



注:A:CORT 饮水组体质量变化率曲线;B:CORT 饮水组体质量变化率曲线(中高剂量组中途死亡不做统计);C:CORT 注射组体质量变化率曲线;D:NaB 组体质量变化率曲线。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠造模过程体质量变化率曲线

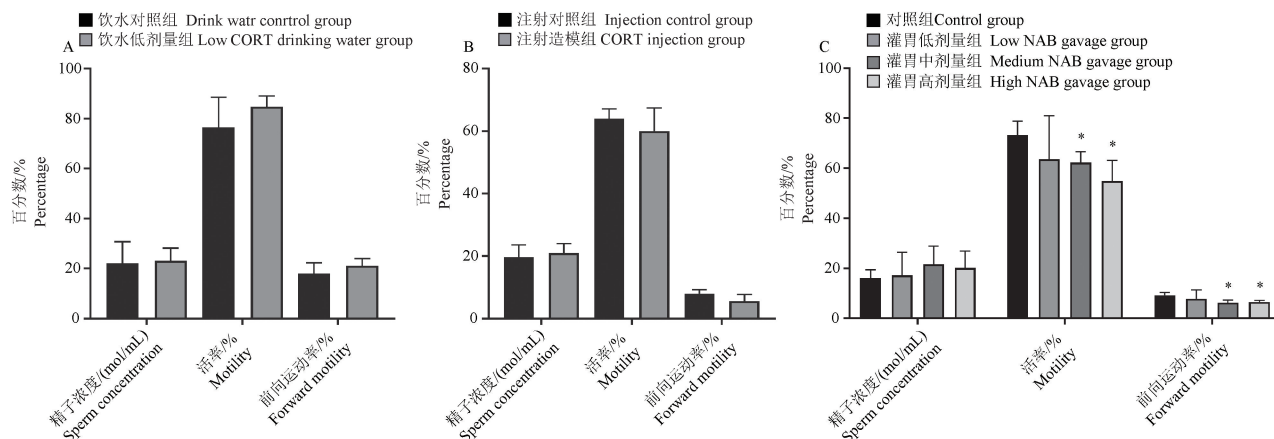
Note. A, Body mass change rate curve of CORT drink group. B, Body mass change rate curve of CORT drink group (death in the middle and high dose groups was not statistically recorded). C, Body mass change rate curve of CORT injection group. D, Body mass change rate curve of NaB gavage group. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Curve of body mass change in each group of mice during the modeling process

2.3 造模对小鼠精子 DFI 的影响

饮水低剂量组与饮水对照组相比,DFI 显著降低($P<0.01$);注射造模组与注射对照组表现出 DFI 升高表型趋势,但无显著性差异($P>0.05$);

灌胃低剂量组与对照组相比,DFI 无显著性差异($P>0.05$),灌胃中剂量组与对照组相比,DFI 无显著性差异($P>0.05$),灌胃高剂量组与对照组 DFI 相比显著升高($P<0.05$,图 4、图 5)。



注:A:CORT 饮水组精子质量分析(精子浓度、精子活率、精子前向运动率);B:CORT 注射组精子质量分析(精子浓度、精子活率、精子前向运动率);C:NaB 灌胃组精子质量分析(精子浓度、精子活率、精子前向运动率)。与对照组相比,* $P<0.05$ 。

图 3 各组小鼠的精子质量分析

Note. A, CORT drink group sperm quality analysis (sperm concentration, sperm motility, sperm forward motility). B, CORT injection group sperm quality analysis (sperm concentration, sperm motility, sperm forward motility). C, NaB gavage group sperm quality analysis (sperm concentration, sperm motility, sperm forward motility). Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 3 Sperm quality analysis of mice in each group

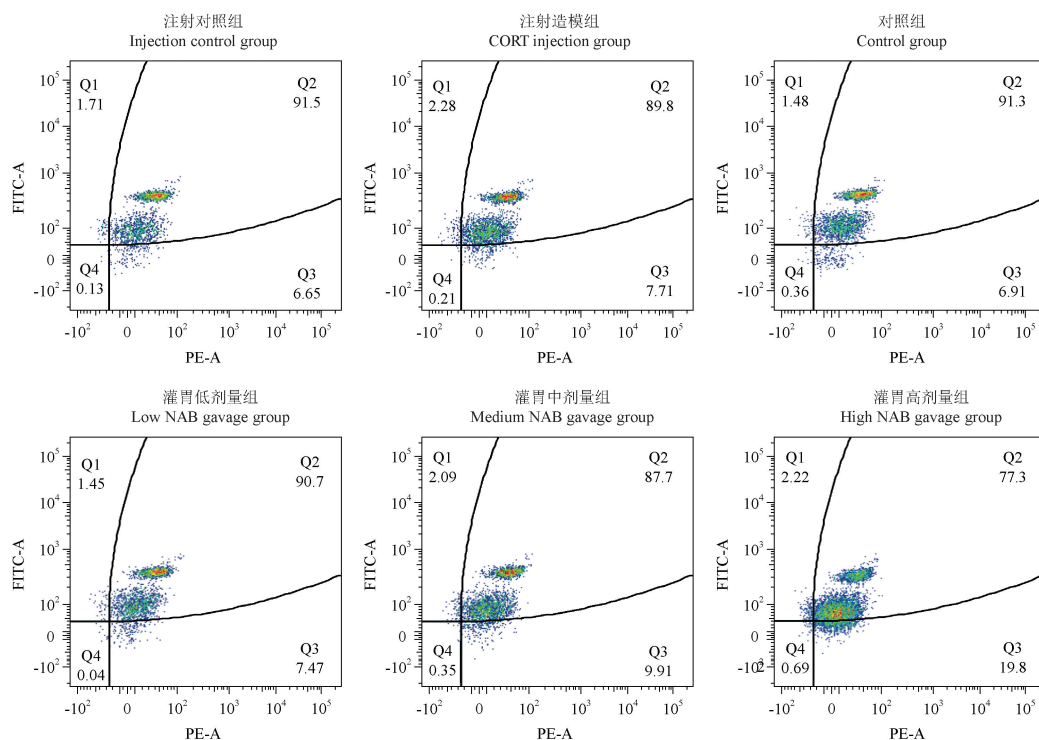
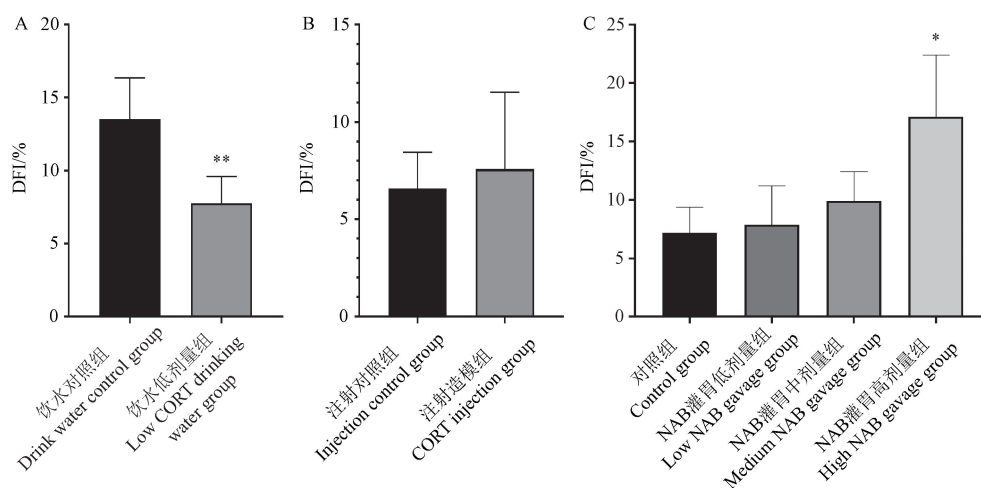


图 4 各组造模小鼠精子 AO 染色法流式细胞仪检测结果

Figure 4 Results of flow cytometry by flow cytometry in the AO staining method of sperm in each group of modeling mice



注:A;CORT 饮水组 DFI;B;CORT 注射组 DFI;C;NaB 灌胃组 DFI。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 各组小鼠的 DFI

Note. A, CORT drink group DFI. B, CORT injection group DFI. C, NaB gavage group DFI. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 DFI of mice in each group

3 讨论

AZS 伴 SDF 升高是引起男性不育及女性反复流产,甚至辅助生殖过程中胚胎反复着床失败的常见男性因素^[17]。SDF 的发生机制复杂,SDF 升高与自然妊娠和辅助生殖技术结局存在负相关,改善不良生活方式及膳食添加抗氧化维生素类营养剂是中国共识指南推荐临床处理 SDF 的基础治疗^[1]。影响人类健康的最重要的生活方式因素之一就是营养,并被认为是正常生殖功能的关键决定因素^[18],有研究表明不正确的营养与精子质量下降之间存在直接关系^[19]。近年来,食品添加剂备受关注,尽管许多食品添加剂是在公认安全指定下使用的,但这些食品、药品、营养剂中的添加剂对机体健康的影响尚未阐明,因此本研究选择了常见的食品、药品添加剂中最常用的防腐剂 NaB 和生活方式中的压力应激来建立 AZS 伴 SDF 升高动物模型,建模诱导药物方法参考近年相关研究文献^[15-16,18,20-22]。建立类似表型的动物模型是探讨精子 DNA 损伤的发生、发展、病理生理过程、研究药物作用及机制的重要研究对象。另外长期摄入高剂量和低剂量的 NaB 是否会造成精子 DNA 损伤,目前尚无报道,本研究结果或可为临床高 DFI 人群的诊疗提供一定的可行思路。

NaB 作为一种经典的食品添加剂,由于其抑制细菌和真菌的特性以及在水中的高溶解度和稳定性,在全球范围内被广泛地作为防腐剂用于食品和饮料中(安全范围:0~5 mg/kg BW/d)^[23],还被用于化妆品及制药工业^[24],可以以高达 0.1% 的浓度存在于食品中^[25]。NaB 属于低毒性物质,当人体短期内摄入少量的 NaB 时,10~14 h 后即可完全排出,但大量研究显示 NaB 具有毒性蓄积作用,如果长期服用过量 NaB,将对人体各组织和器官产生危害^[26]。另外高浓度的 NaB 具有细胞毒性,能够破坏细胞膜的有序结构,引起染色体畸变、精子畸形等,所以 NaB 具有致畸性和生殖毒性^[26]。在 NaB 处理的实验动物中已报告了肾毒性、肝毒性、神经毒性和致畸性^[12,18,27-28]。针对 NaB 生殖毒性的研究逐渐增多,研究表明,NaB 会破坏小鼠睾丸生精小管的结构以及精子发生过程,并降低睾酮、卵泡刺激素和甲状腺激素的水平^[29]。NaB 还被证明可以抑制对睾丸中精子发生和类固醇生成至关重要的垂体促性腺激素释放所必需的神经刺激^[30-31]。但目前尚无系统研究各个剂量 NaB 刺激下精子 DNA 的损伤变化情况,因此本研究旨在研究不同剂量 NaB 连续长时间给药对小鼠精子质量的影响。

本实验分别采取两种不同的造模方法以建立 AZS 伴高精子 DFI 小鼠模型,并进行了关键表

型的评估。结果发现, CORT 皮下注射模型仅出现精子运动能力下降以及 DFI 升高趋势, 但差异均不显著; CORT 饮水模型推测是由于所选造模剂量过高导致小鼠出现严重的异常精神和生理状态, 如多饮、多尿、精神萎靡等情况, 最终导致小鼠在原定造模周期内全部死亡, 后续会对该造模方式进行更加细致地分析和优化; NaB 灌胃高剂量组精子前向运动能力下降、DFI 升高, 与对照组相比具有显著性差异。

综上所述, CORT 造模过程中口服中、高剂量容易造成模型死亡, 低剂量口服表型不明显, 皮下注射造模压力应激模型虽然出现了 AZS 伴高 SDF 模型趋势, 但成模效率低, 环境污染物 NaB 高剂量口服成功构建了 AZS 伴高 DFI 小鼠模型且表型明显。

目前, 大量精子 DNA 损伤(高 SDF)研究模型多采用强度性化学诱导法, 如 Bap, 以 100 mg/(kg · d) 灌胃 8 周复制小鼠精子 DNA 损伤模型^[8]; 邻苯二甲酸二乙基己酯(di-2-ethyl hexyl phthalate, DEHP), 以 10 mL/kg 灌胃 30 d 诱导小鼠精子 DNA 损伤模型^[9]; 环磷酰胺(cyclophosphamide, CP), 连续 14 d 腹腔注射 CP(20 mg/(kg · d)) 诱导少弱精子症伴 SDF 上升大鼠模型^[10]; 或采用辐射造模^[32]等强损伤性造模方法, 这些方法虽然观察到了 DFI 水平升高, 但是也出现了研究模型全身广泛的病理损伤, 并且也难以排除精子 DNA 损伤是否为其他病理损伤继发引起的, 同时这些方法也不是真实临床中常见的场景。本研究选择生活中常见食品添加剂, 属于低毒性化学剂, 同时本方法并不会对小鼠全身造成广泛损伤, 而是有限地损伤了生殖系统, 这无疑是一种更加科学、合理的模型。另外, 目前大量 NaB 雄性生殖损伤模型研究集中于评估精子数量、运动能力及畸形率^[12,18], 这些指标都是临床男性不育检测中常见的指标, 但是 DFI 这一项临床常见指标却鲜有研究。本研究充分评估了不同剂量 NaB 对雄性小鼠精子 DNA 损伤程度即 DFI 水平, 可以为临床高 DFI 患者的诊疗提供一定的理论与科研思路。

EL-SHENNAWY 等^[18]研究了 NaB 对雄性大鼠的生殖系统的毒性作用, 造模的剂量为 1、10、50、100、250、500 和 1000 mg/kg BW, 发现剂量

100~1000 mg/kg, 造模 90 d, 大鼠精子活力及数量下降, 精子畸形率上升, 其损伤精子的机制为氧化应激 ROS 的激活导致炎症因子及细胞凋亡的出现而致少弱畸形精子症的出现, 但对精子 DFI 水平的影响未予研究, 而本研究发现 NaB 灌胃剂量至 500 mg/kg 可诱导雄性小鼠精子 DFI 水平的上升。KEHINDE 等^[22]研究了抗坏血酸和 NaB 对雄性大鼠睾丸功能的影响, 造模剂量为 100 mg/kg, 造模 28 d, 结果发现用药后大鼠睾丸生精小管发育异常, 精子数量及运动能力下降, 导致大鼠出现少弱精子症表型, 但未研究其对精子 DFI 的影响, 其造模剂量换算为小鼠诱导剂量为 150 mg/kg, 低于本研究的 NaB 灌胃高剂量组, 推测可能是小鼠品系以及造模时长不同所导致的。

研究表明 NaB 诱导大鼠睾丸毒性是通过氧化应激、细胞凋亡、炎症机制发生, NaB 染毒大鼠可以出现下丘脑-垂体-性腺轴的抑制, 导致促性腺激素水平降低, 睾酮水平下降, 雄激素受体下调, 血清抗氧化酶超氧化物歧化酶水平降低, 谷胱甘肽还原酶、Nrf2 和 HMOX 1 基因表达下调, IL-1 β 、TNF- α 和 Caspase 3 表达上调, 从而出现精子活力下降、精子畸形率升高表型, 也印证了本实验造模的机制可能是 NaB 通过氧化应激的机制造成弱精子症伴 DFI 升高模型的出现, 符合精子 DNA 损伤的发病机理^[33]。

综上所述, 本研究所用的环境污染化学物质 NaB 高剂量灌胃造模小鼠诱导的 AZS 伴高 SDF 模型稳定, 可以用以研究精子 DNA 损伤的机制及药物作用靶点, 其造模较 CORT 造模具有成模效率更高、表型更加明显的优势。

参考文献:

- [1] 倪吴花, AGARWAL A, 孙莹璞, 等. 精子 DNA 碎片检测的临床专家共识 [J]. 生殖医学杂志, 2023, 32(2): 170-180.
NI W H, AGARWAL A, SUN Y P, et al. Clinical expert consensus on sperm DNA fragmentation detection [J]. J Reprod Med, 2023, 32(2): 170-180.
- [2] ZEQRIRAJ A, BEADINI S, BEADINI N, et al. Male infertility and sperm DNA fragmentation [J]. Open Access Maced J Med Sci, 2018, 6(8): 1342-1345.
- [3] MINHAS S, BETTOCCHI C, BOERI L, et al. European

- association of urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility [J]. *Eur Urol*, 2021, 80(5): 603–620.
- [4] PANDIYAN N, PANDIYAN R, RAMESH RAJA D. A perspective on sperm DNA fragmentation [J]. *Transl Androl Urol*, 2017, 6(Suppl 4): S661–S664.
- [5] THARAKAN T, BETTOCCHI C, CARVALHO J, et al. European association of urology guidelines panel on male sexual and reproductive health: a clinical consultation guide on the indications for performing sperm DNA fragmentation testing in men with infertility and testicular sperm extraction in nonazoospermic men [J]. *Eur Urol Focus*, 2022, 8(1): 339–350.
- [6] ZHANG F, LI J, LIANG Z, et al. Sperm DNA fragmentation and male fertility: a retrospective study of 5114 men attending a reproductive center [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(5): 1133–1141.
- [7] 荆晶, 于森, 汝少国. 环境污染物对精子损伤机制的研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(6): 11–22.
JING J, YU M, RU S G. Research progress on the mechanisms of sperm damage caused by environmental pollutants [J]. *Asian J Ecotoxicol*, 2019, 14(6): 11–22.
- [8] 赵莉娜, 张宸铭, 马思成, 等. 益肾通络方对苯并(a)芘致精子 DNA 损伤模型小鼠睾丸靶基因影响的多组学研究 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(8): 827–834.
ZHAO L N, ZHANG C M, MA S C, et al. Multi-omic study on effect of yishen Tongluo formula on testicular target gene in benzo(a)Pyrene-induced sperm DNA damage model mice [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 64(8): 827–834.
- [9] 华众, 张宸铭, 王祖龙, 等. 五味扶正益精汤对邻苯二甲酸二乙基己酯染毒小鼠精子 DNA 损伤、性激素及氧化因子的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 5633–5637.
HUA Z, ZHANG C M, WANG Z L, et al. Effects of Wuwei Fuzheng Yijing Decoction on DNA damage, sex hormones and oxidative factors of sperm in mice infected with DEHP [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(10): 5633–5637.
- [10] 杨绘, 冉添福, 黄伟聪, 等. 石草汤对环磷酰胺干预后大鼠精子 DNA 碎片率及性激素的影响 [J]. *中国男科学杂志*, 2023, 37(3): 34–38.
YANG H, RAN T F, HUANG W C, et al. Effects of Shibi decoction on sperm DNA fragmentation rate and sex hormones of rats after cyclophosphamide intervention [J]. *Chin J Androl*, 2023, 37(3): 34–38.
- [11] 张宸铭, 陈建设, 赵莉娜, 等. 益肾通络方修复聚苯乙烯微塑料致大鼠精子 DNA 损伤的机制 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(10): 2309–2312.
ZHANG C M, CHEN J S, ZHAO L N, et al. Mechanism of yishen Tongluo formula repairing polystyrene microplastic-induced sperm DNA damage in rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(10): 2309–2312.
- [12] 吕娜, 沈明浩. 食品防腐剂苯甲酸钠的蓄积毒性及精子毒性研究 [J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(3): 241–242.
LYU N, SHEN M H. Study on cumulative toxicity and sperm toxicity of food preservative sodium benzoate [J]. *J Toxicol*, 2011, 25(3): 241–242.
- [13] 常炯炯, 李善雅文, 雍凌, 等. 我国食品添加剂联合使用情况及其累积风险评估 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(2): 206–214.
CHANG J J, LI S Y W, YONG L, et al. Combined use of food additives in China and its cumulative risk assessment [J]. *Chin J Food Hyg*, 2021, 33(2): 206–214.
- [14] VALCARCE D G, RIESCO M F, CUESTA-MARTÍN L, et al. Stress decreases spermatozoa quality and induces molecular alterations in zebrafish progeny [J]. *BMC Biol*, 2023, 21(1): 70.
- [15] REN L, ZHANG Y, XIN Y, et al. Dysfunction in Sertoli cells participates in glucocorticoid-induced impairment of spermatogenesis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2021, 88(6): 405–415.
- [16] YU Z, LIU H, LI D, et al. N-(3-Methoxybenzyl)-(9 Z, 12 Z, 15 Z)-octadecatrienamide from maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ameliorates corticosterone-induced testicular toxicity in rats [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 7762–7774.
- [17] 卢宗林, 杨雁鸿, 范曾, 等. 男性精子 DNA 损伤不育从“浊”论治探赜 [J]. *上海中医药杂志*, 2022, 56(11): 33–37.
LU Z L, YANG Y H, FAN Z, et al. Treatment of male infertility with sperm DNA damage based on turbid pathogen pathogenesis [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2022, 56(11): 33–37.
- [18] EL-SHENNAWY L, KAMEL M A E, KHALAF A H Y, et al. Dose-dependent reproductive toxicity of sodium benzoate in male rats: Inflammation, oxidative stress and apoptosis [J]. *Reprod Toxicol*, 2020, 98: 92–98.
- [19] PALOMBA S, DAOLIO J, ROMEO S, et al. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on female fertility [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 113.
- [20] GASPARINI S J, WEBER M C, HENNEICKE H, et al. Continuous corticosterone delivery via the drinking water or pellet implantation: a comparative study in mice [J]. *Steroids*, 2016, 116: 76–82.
- [21] GREGUS A, WINTINK A J, DAVIS A C, et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 156(1): 105–114.
- [22] KEHINDE O S, CHRISTIANAH O I, OYETUNJI O A.

- Ascorbic acid and sodium benzoate synergistically aggravates testicular dysfunction in adult Wistar rats [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2018, 10(1): 39-46.
- [23] 王思文, 巩江, 高昂, 等. 防腐剂苯甲酸钠的药理及毒理学研究 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(30): 16724, 16846.
- WANG S W, GONG J, GAO A, et al. Pharmacotoxicological study of preservative: sodium benzoate [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(30): 16724, 16846.
- [24] BARANOWSKA I, WOJCIECHOWSKA I, SOLARZ N, et al. Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using fast liquid chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(1): 88-94.
- [25] LENNERZ B S, VAFAI S B, DELANEY N F, et al. Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans [J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 114(1): 73-79.
- [26] 孔令英, 赵振军, 李岩, 等. 苯甲酸钠对青春期小鼠肝脏的影响 [J]. *滨州医学院学报*, 2023, 46(3): 166-170.
- KONG L Y, ZHAO Z J, LI Y, et al. Effect of sodium benzoate on livers of adolescent mice [J]. *J Binzhou Med Univ*, 2023, 46(3): 166-170.
- [27] 李江, 李晓明, 雷健, 等. 苯甲酸钠对小鼠精子畸形率的影响 [J]. *当代畜牧*, 2013, 42(7): 32-33.
- LI J, LI X M, LEI J, et al. Effect of sodium benzoate on sperm abnormality rate in mice [J]. *Contemp Anim Husbandry*, 2013, 42(7): 32-33.
- [28] KHOSHNOUD M J, SIAVASHPOUR A, BAKHSHIZADEH M, et al. Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice [EB/OL]. (2017-12-15) [2024-07-23]. <https://doi.org/10.1002/jbt.22022>.
- [29] SOHRABI D, ALIPOUR M, GHOLAMI M. The effect of sodium benzoate on testicular tissue, gonadotropins and thyroid hormones level in adult (BALB/c) mice [J]. *KAUMS J*, 2008, 12: 7-11.
- [30] REDDY A, SOOD A, RUST P F, et al. The effect of nicotine on *in vitro* sperm motion characteristics [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12(3): 217-223.
- [31] AYDOS K, GÜVEN M C, CAN B, et al. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats [J]. *BJU Int*, 2001, 88(6): 622-626.
- [32] 张芸怡, 贾泽涵, 宇文斌, 等. 射频电磁辐射及其物理参数对雄性生殖系统影响的研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2023, 40(8): 972-980.
- ZHANG Y Y, JIA Z H, YUWEN B, et al. Research progress on effects of radio frequency radiation and its physical parameters on male reproductive system [J]. *J Environ Occup Med*, 2023, 40(8): 972-980.
- [33] AJIBARE A J, AKINTOYE O O, FOLAWIYO M A, et al. Therapeutic potential of virgin coconut oil in mitigating sodium benzoate-model of male infertility: Role of Nrf2/Hmox-1/NF-kB signaling pathway [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2024, 27(5): 543-551.

[收稿日期] 2024-07-23