

## 少弱精子症动物模型建立方法及模型评价

孙天松<sup>1</sup>, 李波男<sup>1</sup>, 何清湖<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学 中西医结合学院, 长沙 410208; 2. 湖南医药学院, 湖南 怀化 418002)

**[摘要]** 少、弱精子症是临床男性不育的主要类型,患者数量逐年升高且呈年轻化的趋势,其病因复杂发生机制尚未完全清楚,用药也多是经验性用药,因此构建合理的动物模型是研究少弱精子症发生机制和开发治疗药物不可或缺的重要途径,该文通过对比不同动物模型造模方法,以期构建更加规范化的少弱精子症动物模型提供思路。目前少弱精子症动物模型有多种造模方法,该文结合近年少弱精子症动物实验文章,选取腺嘌呤造模、奥硝唑造模、雷公藤多苷造模、氢化可的松造模、环磷酰胺造模、白消安造模、紫杉醇造模、热应激造模、电离辐射造模、高脂饮食造模、基因敲除造模等造模方法,从不同造模方法的时间、剂量、动物品系及模型评价标准等方面进行对比,分析当前少弱精子症动物模型的优缺点,发现现有的少弱精子症动物模型仍然存在诸多不足需要进一步改进,动物模型的选择、规范化、创新性等问题都亟待解决,且动物模型与临床患者中医证候的吻合度欠佳。针对目前存在问题,应进一步探索如何构建符合临床特点和证型的造模方法,选用中西医结合复合模型方法,复制更贴近疾病发展规律和符合中医证候的模型,为探索疾病发生机制、开发特色药物和指导临床用药提供动物实验支持。

**[关键词]** 少弱精子症; 男性不育; 造模方法; 动物模型; 模型评价

**[中图分类号]** R242;R2-0;R256.56;R697 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0179-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221496

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220321.1936.032.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-22 16:12

## Establishment and Evaluation of Animal Model of Oligoasthenospermia

SUN Tiansong<sup>1</sup>, LI Bonan<sup>1</sup>, HE Qinghu<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Hunan University of Medicine, Huaihua 418002, China)

**[Abstract]** Oligozoospermia and asthenospermia are common causes of clinical male infertility. The number of patients increases year by year and shows a younger trend. Its etiology is complex, the mechanism and unclear pathogenesis and rely on empirical therapy. Therefore, it is necessary for exploring the pathogenesis and developing corresponding drugs to establish reasonable animal models. By comparing different animal model making methods, this paper provides ideas for constructing a more standardized animal model of oligoasthenospermia. At the moment, a lot of molding methods for oligoasthenospermia are available. Combined with the animal experimental articles of oligoasthenospermia in recent years, this study described the modeling with adenine, ornidazole, tripterygium glycoside, hydrocortisone, cyclophosphamide, busulfan, paclitaxel, heat stress, ionizing radiation, high-fat diet, and gene knockout, respectively, and compared the modeling methods in terms of the time, indexes, animal line, and model evaluation. Thereby, the advantages and disadvantages of different models of oligoasthenospermia were summarized, and finds that the existing animal models of oligoasthenospermia still have many shortcomings that need to be further improved. The selection,

**[收稿日期]** 2022-01-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81973863)

**[第一作者]** 孙天松,在读硕士,从事中西医结合男性病防治研究,E-mail:sts9349@163.com

**[通信作者]** \*何清湖,教授,博士生导师,从事中西医结合男科疾病防治研究,E-mail:hqh19651111@163.com

standardization and innovation of animal models need to be solved urgently, and the coincidence between animal models and clinical patients' traditional Chinese medicine syndromes is not coincident. In view of the existing problems, we should further explore how to build a modeling method in line with clinical characteristics and syndrome types, select the compound model method of integrated traditional Chinese and Western medicine, copy the model closer to the law of disease development and in line with traditional Chinese medicine syndrome, and provide animal experimental support for exploring the mechanism of disease, developing characteristic drugs and guiding clinical medication.

**[Keywords]** oligoasthenospermia; male infertility; modeling method; animal model; model evaluation

少弱精子症是少精子症和弱精子症的合称,少弱精子症是临床男性不育的主要类型<sup>[1]</sup>。根据世界卫生组织(WHO)制定的标准,少精子症是指精液中所含精子密度 $<15 \times 10^6$ 个/mL、或精子总数 $<39 \times 10^6$ 个/次,弱精子症是指精液中向前运动的精子数 $<32\%$ <sup>[2]</sup>。随着社会节奏的不断加快,男性社会压力越来越大,男性不育症逐渐成为影响人类生殖健康的重要疾病,全球约有2亿人面临不育的难题<sup>[3]</sup>,且患者数量不断增加,在不育夫妇中,约有50%是因男方的精液存在异常<sup>[4]</sup>,并呈现年轻化的趋势<sup>[5-6]</sup>。男性不育是由多因素导致的,病因复杂,其发生机制尚未完全探查清楚,用药也多是经验性用药,作为其重要类型之一的少弱精子症发生机制也还需进一步研究。近年来,国内学者通过运用中西医结合治疗男性不育,在临床上取得了较为满意的疗效<sup>[7]</sup>。因此构建合理的动物模型是研究少弱精子症发病机制和开发治疗药物不可或缺的重要途径。本文通过分析目前少弱精子症动物模型的构建方法,为进一步研究奠定模型基础。

## 1 实验动物的选择

少弱精子症动物模型的建立主要是根据该病中西医临床的病证特点,建立相似的“病证结合”动物模型,以探索开发新的治疗药物或者对已知药物进行疗效评价。该疾病造模最常用的实验动物是大鼠和小鼠,其中以雄性SD大鼠居多<sup>[8-9]</sup>。因大鼠的抗病能力比小鼠强,且大鼠体型较大,取材及检测指标更容易,而且雄性SD大鼠生长发育较Wistar大鼠快、对性激素更敏感、抗病能力更强;相对而言,兔的生殖周期长,并且对饲养环境要求较高;灵长类动物虽更接近人体情况,但由于价格昂贵及伦理问题等,故较少作为本病动物模型使用<sup>[8,10]</sup>。进行实验研究时要根据不同需求选择更合适的动物。

## 2 动物模型的建立

少弱精子症的病因复杂,故其动物模型有多种造模方法,有一般药物造模、化疗药物造模、高脂饮

食造模、物理因素造模、基因敲除造模等。

### 2.1 一般药物

**2.1.1 腺嘌呤(adenine)** 腺嘌呤是制造大鼠少弱精子症模型最常用的药物之一,也是目前被普遍认可的大鼠肾阳虚模型造模药物。其作用机制主要是抑制大鼠下丘脑-垂体-甲状腺(HPT)轴的功能,使血清促甲状腺激素(TSH)、3,5,3'-三碘甲腺原氨酸( $T_3$ )和甲状腺素( $T_4$ )水平降低<sup>[11]</sup>。胡海林等<sup>[12]</sup>选用成年SD大鼠,以 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腺嘌呤灌胃,连续28 d后,发现给药大鼠精神萎靡不振,饮食明显减少,体质量较同龄正常SD大鼠增加减少,后期体质量减轻,毛发硬黄,四肢温感降低,小便增多,呈现临床肾阳虚表现,精子密度与活力显著降低,睾丸生精小管内上皮细胞萎缩,排列紊乱,管腔内少见成熟精子细胞,且囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)蛋白表达明显减低。萧闵等<sup>[13]</sup>选用成年雄性SD大鼠,给予腺嘌呤 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (阿拉伯胶助溶)灌胃14 d后发现大鼠精子密度、活力显著降低,睾丸组织中曲细精管萎缩、变形,管腔内生精细胞排列紊乱,数量明显减少,管中央仅可见少量脱落上皮细胞,未发现精子,相关蛋白电压依赖性阴离子通道蛋白2(VDAC2)的表达均显著降低,线粒体膜电位差显著降低,成功构建少弱精子症模型。腺嘌呤灌胃造模方法操作简单,易于重复,可控性强,且是普遍认可的肾阳虚模型造模方法,但造模周期较长,易因慢性肾衰竭导致动物死亡<sup>[14]</sup>。

**2.1.2 奥硝唑(ornidazole)** 抗菌药物奥硝唑是一种5-硝基咪唑衍生物,该药物通过抑制附睾精子中的磷酸甘油醛异构酶和甘油醛3-磷酸脱氢酶,导致精子能量剥夺,使附睾尾精子活力明显降低,导致精子不能穿卵,阻碍受精<sup>[15-16]</sup>,还可以通过分子中的硝基与细胞成分相互作用,从而导致精子细胞受损。相关研究发现,应用奥硝唑 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 对成年雄性大鼠灌胃14 d,大鼠表现出可逆性不育,精子活力降低,精子和附睾中DJ-1表达降低等<sup>[17]</sup>;张

稳等<sup>[18]</sup>通过使用不同剂量的奥硝唑对成年雄性SD大鼠连续灌胃20 d,发现奥硝唑 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的大鼠精子活力显著降低,精子密度无显著性改变,使用剂量达到 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的奥硝唑造模的大鼠精子活力和精子数量均显著降低,故考虑使用奥硝唑造模时,剂量需达到一定程度,否则只能建立弱精子症动物模型。

**2.1.3 雷公藤多苷(tripterygium glycosides)** 雷公藤多苷是由植物雷公藤中提取出的一种脂溶性混合物,具有抗炎、抗肿瘤、免疫抑制等临床作用,但有严重的生殖毒性等不良反应,主要是通过抑制性腺功能,使下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴受抑制,可导致男性性欲减退、影响生精功能和精子发育形态<sup>[19-20]</sup>。刘红娟等<sup>[21]</sup>的研究发现,成年雄性SD大鼠灌服雷公藤多苷 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连续8周后,大鼠的睾丸组织中生精细胞凋亡显著增加,环孢菌素A结合蛋白D(CypD),胱天蛋白酶-3(Caspase-3),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)等表达明显上调。JIAO等<sup>[22]</sup>使用 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的雷公藤多苷灌胃成年雄性SD大鼠28 d发现,大鼠的体质量、睾丸质量、睾丸脏器指数均明显下降,精子浓度和活力均显著降低,睾丸的病理病变包括生精细胞的脱落和丢失,间质细胞的减少,支持细胞的胞浆空泡化,血清生殖激素测定卵泡刺激素(FSH)、睾酮(T)、游离甲状腺激素(fT)、催乳素(PRL)、性激素结合球蛋白(SHBG)水平均明显升高,睾丸组织氧化应激活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)升高。但若给药剂量过小,产生的生殖损伤可逆,QIAN等<sup>[23]</sup>使用雷公藤多苷 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,对成年雄性Wistar大鼠灌胃8周,大鼠精子密度和活力均明显降低,但停药5周后发现大鼠精液参数恢复正常,若剂量过大,可能会导致后续干预难度增加或动物死亡率升高。

**2.1.4 氢化可的松(hydrocortisone)** 该药物主要是影响内分泌系统各激素水平,使机体内分泌紊乱,不同剂量和造模时间对大鼠HPG轴中的FSH、雌二醇( $E_2$ )、T水平、下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)中的促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(Cor)水平、HPT中TSH、 $T_3$ 、 $T_4$ 的水平造成不同程度的影响<sup>[24]</sup>,模拟出近似中医肾阳虚或肾阴虚的临床症状。陈昌波等<sup>[25]</sup>使用不同剂量的氢化可的松对6周龄雄性昆明小鼠造模,一组小鼠通过腹腔注射氢化可的松 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连续10 d后,小鼠出现近似肾阳虚的症状;另一组小鼠腹腔注射氢化可的松 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连续7 d后,构建出肾阴虚的模型,两

组小鼠分别出现近似临床的肾阳虚和肾阴虚的行为学特征,精子数量和活力均下降,小鼠睾丸组织切片均出现不同程度的改变,如生殖细胞排列杂乱,生精小管空心管状、管腔壁受损,腔内精子数量减少等,生殖相关蛋白的表达有一定差异;GUO等<sup>[26]</sup>对小鼠腹腔注射氢化可的松 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 连续8 d后,发现造模小鼠的睾丸、附睾指数、精子密度和活力均有显著降低。氢化可的松造模方法操作简单,造模周期短,易于重复,可根据不同造模剂量模拟肾阴虚或肾阳虚的症状,但注射药物的位置易发生溃烂,对动物损伤较大,且此模型与人类“肾虚”有一定差距,症状和指标亦不如腺嘌呤所致的肾阳虚模型明显<sup>[11]</sup>。

## 2.2 化疗药物

**2.2.1 环磷酰胺(cyclophosphamide)** 环磷酰胺是细胞毒性药物,会给繁殖期的细胞带来损伤,主要是因为氧化应激、脂质过氧化、DNA损伤和谷胱甘肽水平降低等,很可能导致男性不育以及生精障碍<sup>[27]</sup>。DONG等<sup>[28]</sup>对成年雄性SD大鼠腹腔注射环磷酰胺 $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连续5 d后,发现大鼠的A级精子、B级精子、精子总活率和精子密度显著降低,睾丸中凋亡细胞增多,成功诱导了少弱精子症大鼠模型。有研究表明成年雄性BALB/c小鼠腹腔注射环磷酰胺 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,7 d后,造模小鼠的睾丸重量、精子数量和活力均显著降低,睾丸内MDA水平升高,GSH水平降低,血清睾酮水平降低,小鼠睾丸的组织病理学表现为生发上皮层的组织学结构紊乱,生精小管上皮细胞厚度、生精小管直径显著减少等<sup>[29]</sup>。胡语杰等<sup>[30]</sup>选用成年雄性SD大鼠,连续5 d腹腔注射环磷酰胺 $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,大鼠毛色逐渐发黄、光泽暗淡,出现蜷缩少动,精神萎靡等情况,睾丸中生精小管内细胞脱落,管腔内精子减少,精子数量和活力均显著下降,成功构建模型。

**2.2.2 白消安(busulfan)** 白消安属氮芥类烷化剂,是一种低剂量用于长期治疗慢性髓系白血病的化疗药物,有研究显示其造成少弱精子症的机制可能是防止DNA复制导致生精小管内的生发细胞凋亡,并且白消安会增强睾丸组织中的氧化应激,导致与精子发生相关基因的损伤,出现精子生成减少和精子活力的降低<sup>[31-33]</sup>。ZICKRI等<sup>[34]</sup>选用成年雄性大鼠,以2周为间隔,分2次腹腔注射白消安, $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 每次,睾丸切片显示出多个萎缩的生精小管和低精子情况,基底膜局灶性增厚,睾丸质量、精子浓度和精子活力均显著降低,MDA和肿瘤坏

死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )显著升高,睾丸酮明显受到抑制。有研究显示大鼠对白消安的不良作用更敏感,研究者通过将15~40 mg·kg<sup>-1</sup>的白消安,分为5次隔天注射入大鼠腹腔,发现均会导致大鼠在30 d内死亡,而使用0.1~0.4 mg·kg<sup>-1</sup>剂量的白消安在大鼠睾丸内注射,大鼠生精功能降低,但差异无统计学意义<sup>[35]</sup>。MOGHADAM等<sup>[36]</sup>选用4~6周龄、体质量25~30 g的雄性小鼠一次腹腔注射30 mg·kg<sup>-1</sup>的白消安,睾丸组织MDA水平明显高,超氧化物歧化酶(SOD)显著降低,精子计数、活力均明显下降,睾丸重量降低,生精小管直径明显减少,成功构建少弱精子症模型。目前白消安更多地用于制备小鼠生精功能障碍模型,未来可探寻对大鼠更合理的造模给药方法和剂量。

**2.2.3 紫杉醇(paclitaxel, taxol)** 紫杉醇是各种癌症化疗中最常用的药物,由于睾丸是对化疗药物敏感的器官,紫杉醇会降低精子染色质的质量,并对精子发生过程产生不良影响。ABD-ELRAZEK等<sup>[33]</sup>选用成年雄性SD大鼠每周1次,连续4周腹腔注射5 mg·kg<sup>-1</sup>的紫杉醇后发现,大鼠的精子活力和数量显著降低,并升高睾丸脂质过氧化,MDA急剧升高,睾丸GSH水平和DNA代谢物降低。MORADI等<sup>[37]</sup>发现,连续4 d对成年雄性Wistar大鼠腹腔注射4 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的紫杉醇后,大鼠的精子活力、活力和计数显著降低,精子DNA碎片指数显著升高,一氧化氮显著增加,总抗氧化能力和睾丸水平降低。现有少弱精子症动物模型药物造模对比分析见表1。

表1 现有少弱精子症动物模型药物造模对比分析

Table 1 Comparative analysis of existing oligoasthenospermia animal models made by drugs

药物分类	造模药物	给药途径	造模剂量/mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	造模时间/d	优点	缺点	参考文献
一般药物	腺嘌呤	灌胃	300 <sup>1)</sup>	28	造模方法操作简单,易于重复,可控性强,是普遍认可的肾虚模型造模方法	造模周期较长,易因肾衰导致动物死亡	[12,14]
	奥硝唑	灌胃	800 <sup>1)</sup>	20	造模方法简单,易于操作,且对抑制精子活力方面作用更加明显	造成的生殖损伤可逆,使用剂量需达到一定程度,否则只构成弱精子症模型	[18]
	雷公藤多苷	灌胃	40 <sup>1)</sup>	28	造模方法简单,适用范围更广,更具临床代表意义	造模剂量过小,产生的生殖损伤可逆,剂量过大,会导致后续干预难度增加	[22-23]
	氢化可的松	肌肉/腹腔注射	25(阳虚) <sup>1)</sup> ; 50(阴虚) <sup>1)</sup>	10(阳虚); 7(阴虚)	操作简单,造模周期短,易于重复,可根据不同造模剂量模拟肾阴虚或肾阳虚的症状	注射药物的位置易发生溃烂,对动物损伤较大,且此模型与人类“阳虚”有一定差距,症状和指标亦不如腺嘌呤所致的肾虚模型明显	[11,25]
化疗药物	环磷酰胺	腹腔注射	35 <sup>1)</sup>	5	操作简便,造模周期短,效果明显且稳定	若剂量过大,死亡率较高,对生殖的影响均为不可逆性,加大干预难度	[28,30]
	白消安	腹腔注射	30 <sup>2)</sup>	1			[36]
	紫杉醇	腹腔注射	4 <sup>1)</sup>	4			[37]

注:<sup>1)</sup>表示大鼠造模剂量;<sup>2)</sup>表示小鼠造模剂量

## 2.3 物理方法

**2.3.1 热应激(heat stress)** 通过热应激使实验动物出现少弱精子症是经典的造模方法。精子对温度有一定的要求,一般在35~37 °C,热应激会导致睾丸间质细胞产生的血清睾丸酮水平显著降低,这可能导致精子发生过程受损,通过细胞周期阻滞和凋亡来抑制精原干细胞(SSC)的自我更新。KHOSRAVI等<sup>[38]</sup>将成年雄性NMRI小鼠随机分为3组,每组均每隔1 d使小鼠阴囊在43 °C的水中浸泡20 min,浸泡数分别为5、10、15次,发现小鼠的精子浓度和活力均显著降低,且随着浸泡次数的增加,降低的越多,精子DNA片段显著增加,血清睾丸酮、黄体生成素(LH)和FSH浓度降低,并且研究发现睾丸中含有生

精细胞的小管的存在与睾丸温度的升高之间存在很强的负相关关系。ILKHANI等<sup>[39]</sup>通过将成年雄性NMRI小鼠通过腹腔注射氯胺酮(100 mg·kg<sup>-1</sup>)和噶啉(5 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉,将下半身(由阴囊和后腿组成)浸泡在4 °C的水浴中30 min,连续35 d后发现,阴囊热疗诱导小鼠的精子活力和精子数量都有所降低,睾丸酮激素水平明显降低,精原细胞、原代精母细胞和精子细胞数量均显著减少。

**2.3.2 电离辐射(ionizing radiation)** 研究电磁辐射对雄性生殖功能的影响已有50多年,ROWLEY等<sup>[40]</sup>发现,人体接受X射线,>200 cGy会对精子造成不同程度的影响,SINGH等<sup>[41]</sup>研究表明,电磁辐射可能通过辐射可能会诱发氧化应激、炎症反应和

HPA轴失调来影响睾丸功能并改变精子参数。且X射线、 $\gamma$ 射线的穿透力强,常用来对实验动物进行造模。GAUTAM等<sup>[42]</sup>选用成年雄性Wistar大鼠置于2 115 MHz(3G)的辐射环境,每天2 h,连续45 d,每周6 d后发现,精子的畸形率明显升高,精子活力显著下降,精小管和空泡间隙的组织紊乱,SOD和GSH水平有显著下降,但精子数量无显著降低。SAID等<sup>[43]</sup>将雄性SD大鼠暴露于10 Gy的全身 $\gamma$ 辐射4 d后解剖发现,附睾尾的精子畸形率升高,数量和活力显著降低,生精小管生发上皮发生显著形态学改变,包括萎缩、精小管大小减小和空泡化等,管腔内的精子很少。

国内外研究均证明电离辐射对雄性生殖功能有不良影响,其中对精子活力和畸形率的影响比较明确,但对精子数量的影响还需进一步证明,不同的射线类型和波长对生殖功能的影响有差异,需要比较其中的差异和探索适当的照射剂量、照射时间,并且辐射会对睾丸生精功能造成永久性损伤,若评价药物疗效不宜采用此种造模方法。

**2.4 高脂饮食(high-fat diet)** 随着生活质量的提高,全球肥胖率以惊人的速度提升,并且肥胖男性的不育情况更为严重。CREAN等<sup>[44]</sup>通过系统回顾和meta分析发现高脂肪饮食对男性的生育能力有害。喂食高脂肪饮食的雄性实验动物的睾丸和性附属腺相对于体型更小,精液质量降低,交配成功率降低,受精成功率降低,有形态缺陷、DNA损伤和氧化应激迹象的精子比例较高。KHORRAMI等<sup>[45]</sup>选用成年雄性Wistar大鼠,通过喂养富含氧化的胆固醇饮食喂养14周,发现大鼠的睾丸、精囊和附睾的相对体质量显著下降、运动精子百分比和运动等级降低、精子活力和活力等级下降,精液中形态异常精子的百分比显著增高、血清中LH和FSH水平显著降低。研究显示,成年雄性C57BL/6小鼠经添加含1.5%胆固醇的高脂肪和高胆固醇饲料喂养24周后,睾丸、附睾和输精管的相对重量、精子活力、精子计数和雄性小鼠正常精子形态的百分比均明显降低,小鼠的睾丸形态分析显示精子发生不完全,生殖细胞排列无序,成熟精子数量减少,生发上皮变薄<sup>[46]</sup>。

通过高脂饮食造模是一种比较安全的少弱精子症造模方法,且与现代的肥胖人群增加、不育率升高等临床问题密切相关。但该造模方法对精子影响的稳定性还需要进一步提高,可能需要适当改进造模方法,提高造模成功率。

**2.5 基因敲除(gene knockout)** 基因敲除技术主要是应用DNA同源重组原理,使机体特定的基因失活或缺失的技术。通过敲除相关基因构造少弱精子症的动物模型,如通过敲除Tpp2基因<sup>[47]</sup>、Fam170a基因<sup>[48]</sup>、CUL4B基因<sup>[49]</sup>均可使造模小鼠精子数量减少、活力降低。使用基因敲除技术构建动物模型有助于发现与动物生育能力相关的蛋白质,从而确定新的基因来改善少弱精子症,但其对设备和环境要求较高,技术难度较大,且成本高昂,故影响其应用范围。

### 3 问题与展望

随着社会的不断发展,造成男性少弱精子症的因素越来越多,相关少弱精子症动物模型的造模方法应运而生,但不同造模方法的机理存在差异,并且存在诸多局限性:①不同造模方法各有利弊,比如部分造模药物除了对睾丸等生殖器官和生精功能有损伤外,还会对其他系统功能造成不良影响,容易影响实验结果的准确性,但对设备要求较低,简便易行;某些造模方法时间较长或对设备的要求较高,但效果更好,因此实验设计时应根据需求和实际情况,选择不同的造模方法;②缺乏统一的造模方法和评价标准。造模药物的多样性和同一种造模方法的具体操作不同(造模动物、造模时间、药物剂量等),会导致造模结果的差异,影响后续的药物干预效果等实验结果及其可行性,所以未来研究应向造模方法规范化、评价标准统一化的方向努力,制定能被广泛认可的造模方法和评价标准,构建稳定、可靠、规范的少弱精子症动物模型;③某些动物模型只能模拟部分少弱精子症的病理表现。少弱精子症的病理变化涉及多个器官、系统,因此单纯模拟部分病理表现并观察相关药物的作用,存在一定的局限性;④临床少弱精子症的发病机制尚未完全清楚。不同方式构建的动物模型的机制也尚未完全探讨明白,其中涉及多个内分泌轴的改变,未来应继续向发病机制方面进行深入研究;⑤动物模型与临床患者证候的吻合度欠佳,目前仅由腺嘌呤构建的肾阳虚模型得到广泛认可,但“少弱精子症”的中医辨证中湿、热、瘀等致病因素缺乏相关动物模型,研究中药对少弱精子症的治疗效果大多通过观察精子数量、活性、睾酮水平、相关激素等指标,造模方法和观察指标均缺少中医方面的干预和指标,缺少中医“辨证”的精髓,一定程度上影响的实验结果的临床作用。

综上所述,现有的少弱精子症模型仍然存在诸

多不足需要进一步改进,动物模型的选择、规范化、创新性等问题都亟待解决,探索与临床证型相符合的动物模型尤为重要。男性的精液质量关系到人类繁衍与全球人口素质的优劣,少弱精子症已成为当今男性不育方面研究的热点,中西医结合治疗此病较单纯中医、西医治疗存在一定的优势,应充分认识到中医药及中西医结合在此领域的前景。合理构建符合中西医临床特点的动物模型,是研究这一难题必要的实验条件,对少弱精子症的发生机制和治疗的研究尤为重要。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 何清湖,秦国政. 中西医结合男科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:269-274.
- [2] 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[M]. 5版. 谷翊群,陈振文,卢文红,等,译. 北京:人民卫生出版社,2011:120.
- [3] INHORN M C, PATRIZIO P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21<sup>st</sup> century [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(4): 411-426.
- [4] VOCKEL M, RIERA-ESCAMILLA A, TÜTTELMANN F, et al. The X chromosome and male infertility[J]. Hum Genet, 2021, 140(1): 203-215.
- [5] 秦素,陈俊,涂定英,等. 2018年我院男科门诊病人构成分析[C]//中国中西医结合学会男科专业委员会. 首届男性大健康中西医协同创新论坛暨第三届全国中西医结合男科青年学术论坛论文集:2019年卷. 南昌:出版者不详. 2019:357-358.
- [6] 宋春生,赵家有.《EAU男性不育症指南(2012年版)》解读[J]. 中国性科学,2012,21(10):13-16,23.
- [7] 张志杰,陈小均,贾玉森,等. 中医对少弱精子症的临床治疗研究进展[J]. 中国性科学,2015,24(9):71-74.
- [8] 陈央娣,孙自学. 中医药治疗男性不育症的实验研究述评[J]. 中华中医药学刊,2022,40(4):28-33.
- [9] 陈小均,王思师,贾玉森,等. 男性不育症实验动物模型在中医药领域的应用概况[J]. 北京中医药,2018,37(3):282-287.
- [10] 孔琪,夏霞宇,秦川. 实验动物品系数据库的建立[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(4):78-83.
- [11] 鞠成国,李媛媛,王巍,等. 仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(16):101-107.
- [12] 胡海林,刘子毓,何清湖,等. 龟鹿二仙膏对阳虚型少弱精子症大鼠的改善作用及CFTR蛋白表达的影响[J]. 中医药信息,2021,38(6):15-20.
- [13] 萧闵,王威,曹继刚,等. 疏肝补肾毓麟汤调节VDAC2基因甲基化影响弱精症大鼠精子线粒体功能改善精子质量[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(23):72-79.
- [14] 徐珂,黄学宽,沈清,等. 复肾功方对慢性肾衰竭大鼠ACE-Ang II -AT1R及ACE2-Ang(1-7)-MASR轴“调控-拮抗”作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(5):62-69.
- [15] BONE W, YEUNG C H, SKUPIN R, et al. Toxicity of ornidazole and its analogues to rat spermatozoa as reflected in motility parameters[J]. Int J Androl, 1997, 20(6):347-355.
- [16] OBERLÄNDER G, YEUNG C H, COOPER T G. Influence of oral administration of ornidazole on capacitation and the activity of some glycolytic enzymes of rat spermatozoa[J]. J Reprod Fertil, 1996, 106(2):231-239.
- [17] SUN Y, SUN X, ZHAO L, et al. DJ-1 deficiency causes metabolic abnormality in ornidazole-induced asthenozoospermia [J]. Reproduction, 2020, 160(6): 931-941.
- [18] 张稳,刘清珍,商学军,等. L-肉碱对奥硝唑所致弱精子症大鼠的治疗作用[J]. 中华男科学杂志,2009,15(7):604-607.
- [19] 何康婧,高增平,尹丽梅,等. 雷公藤多苷的药理毒理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(1):196-204.
- [20] 徐颖,樊媛芳,赵元,等. 近40年雷公藤生殖毒性研究概述[J]. 中国中药杂志,2019,44(16):3406-3414.
- [21] 刘红娟,吴德玲,童小慧,等. 五子衍宗丸干预线粒体通透性转换孔抑制精子凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(21):34-39.
- [22] JIAO W, SUN J, ZHANG X, et al. Improvement of Qilin pills on male reproductive function in tripterygium glycoside-induced oligoasthenospermia in rats[J]. Andrologia, 2021, 53(4): e13923.
- [23] QIAN S Z, ZHONG C Q, XU Y. Effect of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. on the fertility of rats [J]. Contraception, 1986, 33(2):105-110.
- [24] 戴冰,张嘉妮,杨梦琳,等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J]. 中国实验动物学报,2017,25(1):70-73.
- [25] 陈昌波,马静,贾斌,等. 肾阳虚与肾阴虚模型小鼠睾丸生殖相关差异蛋白的比较研究[J]. 中华男科学杂志,2019,25(3):248-256.
- [26] GUO Y, WANG L, LI Q, et al. Enhancement of kidney invigorating function in mouse model by cistanches herba dried rapidly at a medium high temperature[J]. J Med Food, 2019, 22(12): 1246-1253.
- [27] BROWN J S, SUNDAR R, LOPEZ J. Combining

- DNA damaging therapeutics with immunotherapy: More haste, less speed[J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(3): 312-324.
- [28] DONG P, XIA L, HU L, et al. Runjing decoction alleviated cyclophosphamide-induced oligoasthenospermia rats by inhibiting cell apoptosis via RXFP1/AKT/FOXO1 pathway[J]. *Andrologia*, 2021, 53(11): e14216.
- [29] REZAEI S, HOSSEINIMEHR S J, ZARGARI M, et al. Protective effects of sinapic acid against cyclophosphamide-induced testicular toxicity via inhibiting oxidative stress, Caspase-3 and NF- $\kappa$ B activity in BALB/c mice[J]. *Andrologia*, 2021, 53(10): e14196.
- [30] 胡语杰, 徐砚通, 高健, 等. 益肾生精方治疗少弱精子症的药效评价及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 93-101.
- [31] DEGHANI F, SOTOUDE N, BORDBAR H, et al. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan [J]. *Platelets*, 2019, 30(4): 513-520.
- [32] ZHANG K, FU L, AN Q, et al. Effects of Qilin pills on spermatogenesis, reproductive hormones, oxidative stress, and the TSSK2 gene in a rat model of oligoasthenospermia [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 42.
- [33] ABD-ELRAZEK A M, EL-DASH H A, SAID N I. The role of propolis against paclitaxel-induced oligospermia, sperm abnormality, oxidative stress and DNA damage in testes of male rats [J]. *Andrologia*, 2020, 52(1): e13394.
- [34] ZICKRI M B, MOUSTAFA M H, FASSEH A E, et al. Antioxidant and antiapoptotic paracrine effects of mesenchymal stem cells on spermatogenic arrest in oligospermia rat model[J]. *Ann Anat*, 2021, 237: 151750.
- [35] 李学银, 张卫星, 张天标, 等. 两种方式注射白消安对SD大鼠生精功能的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2015, 50(5): 665-668.
- [36] 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.
- [37] MORADI MARYAMNEGHARI S, SHOKRI-ASL V, ABDOLMALEKI A, et al. Genetic, biochemical and histopathological evaluations of thymoquinone on male reproduction system damaged by paclitaxel in Wistar rats[J]. *Andrologia*, 2021, 53(10): e14192.
- [38] KHOSRAVI A, HASANI A, BEHNAM P, et al. An effective method for establishing animal models of azoospermia and oligospermia [J]. *Andrologia*, 2021, 53(7): e14095.
- [39] ILKHANI S, MORADI A, ALIAGHAEI A, et al. Spatial arrangement of testicular cells disrupted by transient scrotal hyperthermia and subsequent impairment of spermatogenesis [J]. *Andrologia*, 2020, 52(9): e13664.
- [40] ROWLEY M J, LEACH D R, WARNER G A, et al. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis [J]. *Radiat Res*, 1974, 59(3): 665-678.
- [41] SINGH K V, GAUTAM R, MEENA R, et al. Effect of mobile phone radiation on oxidative stress, inflammatory response, and contextual fear memory in Wistar rat [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(16): 19340-19351.
- [42] GAUTAM R, PRIYADARSHINI E, NIRALA J P, et al. Modulatory effects of Punica granatum L juice against 2 115 MHz (3G) radiation-induced reproductive toxicity in male Wistar rat [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(39): 54756-54765.
- [43] SAID R S, MOHAMED H A, KASSEM D H. Alpha-lipoic acid effectively attenuates ionizing radiation-mediated testicular dysfunction in rats: Crosstalk of NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , and PPAR- $\gamma$  pathways [J]. *Toxicology*, 2020, 442: 152536.
- [44] CREAN A J, SENIOR A M. High-fat diets reduce male reproductive success in animal models: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Obes Rev*, 2019, 20(6): 921-933.
- [45] KHORRAMI A, GHANBARZADEH S, ZIAEE M, et al. Dietary cholesterol and oxidised cholesterol: effects on sperm characteristics, antioxidant status and hormonal profile in rats [J]. *Andrologia*, 2015, 47(3): 310-317.
- [46] LIU C Y, CHANG T C, LIN S H, et al. Metformin ameliorates testicular function and spermatogenesis in male mice with high-fat and high-cholesterol diet-induced obesity [J]. *Nutrients*, 2020, 12(7): 1932.
- [47] ZHU F, YAN P, ZHANG J, et al. Deficiency of TPPP2, a factor linked to oligoasthenozoospermia, causes subfertility in male mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2583-2594.
- [48] DEVLIN D J, NOZAWA K, IKAWA M, et al. Knockout of family with sequence similarity 170 member A (Fam170a) causes male subfertility, while Fam170b is dispensable in mice  $\dagger$  [J]. *Biol Reprod*, 2020, 103(2): 205-222.
- [49] LIN C Y, CHEN C Y, YU C H, et al. Human X-linked intellectual disability factor CUL4B is required for post-meiotic sperm development and male fertility [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20227.

[责任编辑 王鑫]