

# 广州医学院

## 硕士学位论文

FMR1 基因敲除对雄性小鼠生殖功能的影响

专业名称: 外科学

作者姓名: 祝亚桥

指导老师: 周兴

# 广州医学院

## 2009 级硕士研究生学位论文

**FMR1 基因敲除对雄性小鼠生殖功能的影响**

**The influence of FMR1 gene knockout on the male  
mouse reproduction**



专业名称：外科学（泌尿外科）

研究方向：男性生殖医学

学位类型：临床医学科学学位

广州医学院·广州

2012年3月

# 目 录

中英文对照 .....	1
中文摘要 .....	2
英文摘要 .....	5
前 言 .....	9
材料与amp;方法 .....	11
结 果 .....	21
讨 论 .....	28
结 论 .....	34
展 望 .....	34
参考文献 .....	35
综 述 .....	40
致 谢 .....	50
学位论文原创性声明 .....	51
学位论文知识产权权属声明 .....	51
关于学位论文使用授权的说明 .....	51

## 中英文对照

### Abbreviations

英文缩写	英文全称	中文全名
FXS	Fragile X syndrome	脆性 X 综合征
FMR1	Fragile-X mental retardation gene 1	脆性 X 智力低下 1 基因
FMRP	Fragile X mental retardation protein	脆性 X 智力低下蛋白
WT	Wild type	野生型
KO	Knockout	基因敲除型
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid	$\gamma$ -氨基丁酸
mGluR I	Metabotropic Glu receptor I	促代谢型谷氨酸受体 I
Glu	Glutamate	谷氨酸
FSH	Follicle-stimulating hormone	卵泡刺激素
LH	Luteinizing hormone	促黄体生成激素
T	Testosterone	睾酮
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
CASA	Computer-aided semen analysis	计算机辅助精液分析
Elisa	Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay	酶联免疫吸附试验
PDE5	Phosphodiesterase type5	5 型磷酸二酯酶
AsAb	Antisperm antibody	抗精子抗体
NOS	Nitric oxide synthase	一氧化氮合成酶
PGCs	primordialgerminalCells	原始生殖细胞
GAD	Glutamic acid decarboxylase	谷氨酸脱酸酶
LTD	long-term depression	长时程抑制

# FMR1 基因敲除对雄性小鼠生殖功能的影响

## 中文摘要

最近半个世纪,随着社会的发展,不育夫妇的发病率逐年升高。2004 年欧洲统计结果显示:育龄夫妇一年内不能怀孕者占 20%,其中为男方因素引起的不育占 50%<sup>[1]</sup>。据 WHO 的意见,目前已知的男性不育因素包括精索静脉曲张(12.3%),性功能障碍(1.7%),生殖道感染(6%),先天性发育异常(2.1%),后天获得性疾病(2.6%),内分泌紊乱(0.6%),免疫性因素(3.1%)及其他疾病(3%),其他大约 70%以上的男性不育发病机理不明<sup>[2]</sup>,使得男性不育的诊治变得复杂和特殊。近年来,对男性不育的遗传性病因不断有一些新的发现,对可导致男性不育的遗传缺陷,如 X 染色体上的遗传、Y 染色体无精症因子区的微缺失、及染色体异常和其他某些已知基因的突变等,但上述因素只能解释约 15%的病例。因此对男性不育的研究已显得非常重要。

在原发性男性不育病人中,精子发生障碍为主要的类型<sup>[3]</sup>,因此与精子发生密切相关的那些基因也成为研究男性不育的候选基因。人类的精子发生是一个极非常复杂的过程,涉及到原始生殖细胞增殖,减数分裂,细胞分化等,据估计至少有 4000 多个基因参与精子发生过程中。近年来已鉴定出众多与精子发生密切相关的基因,但这些基因是否都与男性不育相关,尚需进一步的实验研究。

脆性 X 综合征(fragile X syndrome, FXS)是最常见的遗传性智力低下性疾病之一,发病率仅次于 Down 综合征,占非特异性智力低下的 2%-6%,在 X 连锁智力低下中占 40%。FXS 患者存在有不同程度的智力低下、注意力障碍、癫痫易发作、性格改变、活动过度、自闭等社会行为的异常,特殊面容及男性青春期后大睾丸(单侧大于 25ml)、生育功能低下,女性成年后卵巢早衰<sup>[4-6]</sup>。其发病机制是由于 X 染色体上的脆性 X 智力低下基因(fragile X mental retardation gene 1, FMR1) 5'端

(CGG)三核苷酸重复序列的异常扩增及其邻近部位的 CpG 岛异常甲基化,导致 FMR1 基因沉默不表达,即其蛋白产物脆性 X 智力低下蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)减少或缺乏而发病。目前研究发现 FMRP 主要在脑和睾丸中表达,且起到重要的作用。为了发现 FXS 患者发病的复杂机制,更好的治疗这一类疾病,FXS 患者的生殖系统及智力行为等相关问题正成为研究热点。

FXS 的疾病研究中,FMR1 基因敲除鼠模型是目前公认的研究 FXS 最好的小鼠模型,其多方面的异常表现与 FXS 病人颇为相似,如过度活动,学习障碍,青春期后睾丸增大等<sup>[7,8]</sup>,因此我们通过对 FMR1 基因敲除鼠雄性生殖系统及其功能的研究,来进一步了解 FMR1 基因对雄性生殖及性行为的影响。

## 研究目的

我们的研究目的在于利用 FMR1 基因敲除鼠,研究 FMR1 基因敲除对雄性小鼠性功能、生殖功能的影响,为进一步研究 FMR1 基因对个体的生殖系统的影响、在精子生成中的调节机制和提供可能的治疗措施打下坚实的基础。

## 材料与方法

1. 实验动物: FMR1 基因敲除型(KO)纯合子(-/-)及其野生型(WT)纯合子(+/+)FVB 近交系小鼠,采用 PCR 法检测实验小鼠的 FMR1 基因片段,经基因鉴定后,由广州医学院实验动物中心饲养及繁育。

### 2. 动物分组:

2.1 生殖实验及观察方法:共 72 只。将雄性 FMR1 基因敲除鼠(KO)12 只和雄性野生型 FVB 小鼠(WT)12 只,每只分别与两只野生型 FVB 成年母鼠(共 48 只)合笼 5 天,观察雄性行为,记录自雌鼠放入至雄鼠发生第一次捕捉雌鼠的时间(捕捉潜伏期)、30min 内雄鼠捕捉雌鼠的次数;母鼠怀孕率,母鼠平均产仔数及雄鼠的生育指数;收集双侧睾丸、附睾组织,称重并计算脏器系数;对一侧附睾尾部精子进行计数、活率、形态等分析;测定雄鼠血清 T,FSH 及 LH 浓度。

2.2 组织学实验及观察方法:共 10 只。其中 KO 组和 WT 组成年雄鼠各五只,灌注固定收集右侧睾丸、附睾常规石蜡包埋、切片、HE 染色,高倍显微镜下分析。

3 统计方法:所有数据采用均数±标准差( $X \pm SD$ )表示,WT 与 KO 鼠两组数据间的比较用两独立样本 t 检验,采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析,P 值 < 0.05 为有统计学意义。

## 结果

1. 睪丸、附睪脏器系数比较结果: KO 组雄鼠睪丸、附睪重量均显著高于 WT 组, KO 鼠和 WT 鼠体重比较结果无明显差异, KO 鼠睪丸、附睪脏器系数高于 WT 鼠。

2. 生殖实验结果: KO 鼠捕捉潜伏期  $15.76 \pm 6.14 \text{min}$  较 WT 鼠  $9.24 \pm 5.32 \text{min}$  明显延长 ( $P < 0.05$ ), 30min 内捕捉次数也减少。KO 鼠雄性生殖率 41.7% 低于 WT 鼠 91.7% ( $P < 0.05$ ), 与 KO 组小鼠交配的母亲怀孕率 41.7% 低于 WT 组 87.5% ( $P < 0.05$ ), KO 组和 WT 组母鼠平均产仔数分别为  $6.50 \pm 2.27$  和  $8.22 \pm 3.03$  ( $P > 0.05$ ), 无显著差异。

3. 精子分析结果: 两组小鼠在精子计数、精子活率、精子各种畸形率比较均没有统计学差异。

4. 性激素测定结果: 比较两组小鼠血清游离 T、FSH、LH 无统计学差异。

5. 睪丸、附睪组织学观察结果: KO 组睪丸组织中曲细精管直径, 生精小管上皮的结构及厚度未见明显差异, 支持细胞, 精原细胞, 各级生精细胞形态及数量与 WT 组未见明显异常, 附睪形态、上皮厚度等未见明显异常。

## 结论

可以推测 FMR1 基因对雄性性行为、生殖系统发育有一定的影响, 睪丸、附睪的重量会增加, FMR1 基因的缺失降低了雄性小鼠生育率, 但对睪丸、附睪脏器的组织学及精子生成、精子畸形率等未见明显影响, 其对雄性生殖系统影响机制还有待进一步的实验研究。

## 关键词

脆性 X 智力低下 1 号基因; 基因敲除; 生殖; 精子发生

# **The influence of FMR1 gene knockout on the male mouse reproduction**

**Postgraduate:**

**Advisor:**

## **Abstract**

In last half century, with the development of society, the incidence of infertile couples increased year by year. In 2004, statistics from European Reproductive Association showed that: accounted for 25% of couples of childbearing age can not become pregnant within one year, accounts for 50% of infertility due to male factors. According to WHO, the male infertility factors include varicocele(12.3%), sexual dysfunction(1.7%), reproductive tract infections(6%), congenital abnormalities(2.1%), acquired diseases(2.6%), endocrine disorder(0.6%), immune factors(3.1%) and other diseases(3%). But pathogenesis in more than 70% of male infertility is still unknown, which makes the diagnosis and treatment of male infertility complex. In recent years, some new discovers about the genetic cause of male infertility have been proposed. Genetic defects also may lead to male infertility, such as X-chromosome genetic, Y chromosome microdeletions in the azoospermia factor district, autosomal abnormalities or other known gene mutations. However, only 15% cases can be explained by the above factors. So far, study of male infertility is becoming very important.

In patients with primary infertility, spermatogenesis disorder is the main type. So those genes related closely to spermatogenesis are research hotspots. Human spermatogenesis is a extremely complex process that involves proliferation of primordial germ cells, meiosis, cell differentiation, etc. It is estimated that more than 4000 genes are

involved in the process of spermatogenesis. In recent years, many genes closely related to spermatogenesis are identified, but whether those genes are associated with male infertility requires further experimental study.

Fragile X syndrome(FXS) is one of the most common inherited mental retardation disease, the incidence is second only to Down syndrome, accounting for 2%-6% of non-specific mental retardation, 40% of the X-linked mental retardation. FXS patients have varying degrees of mental retardation, attention disorders, easy to epilepsy seizures, personality changes, hyperactivity, autistic and other abnormal social behavior, a special face and giant testes(one side is more than 25ml) after puberty, low male fertility and premature ovarian failure in adult females. Fragile X syndrome results from a trinucleotide repeat (CGG)<sub>n</sub> expansion in the 5'-untranslated region of the fragile X mental retardation gene 1(FMR1) and subsequent hypermethylation which lead to transcriptional silencing of FMR1 and loss of its encoded protein FMRP (fragile X mental retardation protein).In order to find the complex mechanism of FXS, and give better treatment to FXS patients, reproductive systems and mental behavior-related issues are being studied.

In the study of FXS, the FMR1 gene knockout mice model is widely recongnized as the best research model of FXS, a variety of performance are quite similar to the abnormalities of patients with FXS, such as excessive activities, learning disabilities, testicle increases after puberty, so we try to learn the influence of FMR1 on male reproduction through studying the reproductive system and function of FMR1 gene knockout mouse.

### **Purpose**

To investigate the influence of fragile x mental retardation-1 gene on the reproduction of male mice. And put a foundation on further study of the influence of FMR1 gene on sexual function and reproduction system, spermatogenesis regulation and possible treatments.

### **Materials and Methods**

1.Experimental animals: FMR1 gene knockout(KO) and its wild type(WT) FVB

inbred strain mice, after genotype identification by PCR to detect the FMR1 gene segments, will be fed and bred by Experimental Animal Center of Guangzhou Medical University.

## 2. Animal grouping:

2.1 Reproductive experiments and methods: in total of 72 mice. 12 FMR1 knockout (KO) male mice and 12 wild type (WT) male mice will be separately put in one cage with 2 wt female mice (in total of 48 mice) for 5 days for mating, observe the sexual behavior of male mice, record the first time to capture the female after they are put in one cage (latent period of capture), frequency of male capture female within 30 min, the female pregnancy rate, number of litters are counted, and male mice having offsprings calculated. Collect the testes and epididymides of 12 mice in each group, weigh and calculate the organ coefficient. The density, motility and morphology of one cauda epididymis sperms are analysed. Serum T, FSH and LH concentrations are also measured.

2.2 Histology and methods: in total of 10 mice. Collect the right testis and epididymides of 5 adult mice in each group, perform with HE staining. Observe the histology with a high power optical microscope.

3. Statistical method: All the data results are presented in form of  $\bar{x} \pm s$ , comparing the KO and WT group with independently sample t-test by software SPSS15.0. There are statistical significance if  $P < 0.05$ .

## Results

1. Result of testes and epididymides organ coefficient comparison: The KO testes and epididymides weight are significantly higher than the WT group. No significant difference of the body weight between KO mice and WT mice. KO mice testes and epididymides coefficient are significantly higher than those of WT mice.

2. Reproductive experimental results: The capture latent time of KO mice were significantly prolonged compared with WT mice ( $15.76 \pm 6.14$  min vs.  $9.24 \pm 5.32$  min,  $P < 0.05$ ), the frequency of capture within 30 min of KO mice was significantly lower than WT mice. Male fertility showed that 41.7% of KO mice had

pups whereas in the WT group 91.7% of the mice had pups( $P<0.05$ ), The pregnant rate of WT female mice mated with KO males was significantly lower than the control group(41.7% vs. 87.5%,  $P<0.05$ ), the average litter size of KO and WT respectively were  $6.50\pm 2.27$  and  $8.22\pm 3.03$ ( $P>0.05$ ), no significant difference.

3. Sperm analysis: two groups of mice in sperm count, motility, and abnormal sperm ratio were not statistically different.

4. Sexual hormones results: No significant difference were found in serum T, FSH and LH between two groups.

5. Testes and epididymides histological observation: there were no significant difference in seminiferous tubule diameter, structure, thickness of the seminiferous tubule epithelium between KO and WT mice. The morphology and number of sertoli cells, spermatogonia, spermatocytes of KO group had no difference with WT. Epididymis morphology and its epithelial thickness of KO mice showed no obvious abnormality.

## **Conclusions**

We can conclude that FMR1 gene may play an important role in the development of male genital system. The absence of FMR1 would increase the weight of testes and epididymides, reduce the reproduction of male mice. But no obvious abnormal was found in morphology of testes and epididymides. The spermatogenesis of FMR1 mice also seemed not being affected. The exact mechanism through which FMR1 gene influences the male genital system needs further studies.

## **Key words**

Fragile X mental retardation-1 gene; Knockout; Reproduction; Spermatogenesis

## 前 言

现代社会，生殖健康已经越来越为人们所重视。目前，全球约有 15%的夫妇受到不育症的困扰<sup>[1]</sup>，其中男性因素占 50%左右。据报道 90%的男性不育是由于精子发生障碍引起的，但半数以上仍病因不明<sup>[2]</sup>。这些不育患者都会出现不同类型的精液异常，包括：无精、少精、弱精、精子畸形过多等。精子的发生是一个极其复杂的细胞分化过程，它包括了胚胎期卵黄囊内胚层的原始生殖细胞（primordialgerminalCells, PGCs）迁移至生殖脊后分裂增殖成为精原干细胞，精原干细胞经有丝分裂形成精原细胞，进而减数分裂形成精母细胞和圆形精子细胞，减数分裂后阶段圆形精子细胞经过变态过程形成成熟的精子。这个复杂过程由一系列特定基因程序性的表达、调控，按照特定的时空顺序表达和相互作用。迄今发现至少数百个基因与精子生成过程密切相关<sup>[3]</sup>，但对每个基因调控的具体机制仍不十分明确，许多基因表达在睾丸中具有时空特异性，参与精子发生过程中特异性的细胞活动，揭开这些基因的具体功能，对认识精子发生和调节的分子机制非常重要，为男性不育病因研究及治疗打下坚实的基础。

脆性 X 综合征(fragile X syndrome, FXS)是最常见的遗传性智力低下性疾病之一。为男性最常见的智力低下病因，也是自闭症病因当中最常见的单基因遗传病<sup>[4]</sup>。Verkerk<sup>[5]</sup>等成功地克隆出其致病基因为脆性 X 智力低下 1 号基因（fragile X mental retardation gene 1, FMR1），该基因 5'端（CGG）n 三核苷酸重复序列异常扩增及其相邻部位 CpG 岛异常甲基化，使 FMR1 基因转录或翻译终止，导致编码产物智力低下蛋白（fragile X mental retardation protein, FMRP）表达减少或缺失<sup>[6]</sup>，而出现各种临床症状。正常人群中 FMR1 基因上 CGG 重复序列在 7~50 之间，平均 30。当 CGG 重复序列在 55~200 时称为前突变，因有部分 FMRP 表达，患者一般不表现出严重的临床症状。当 CGG 重复序列大于 200 时，称为全突变，无 FMRP 表达。FXS 根据基因型的不同，临床分型也各异<sup>[7]</sup>，全突变患者临床表现最典型，有不同程度的智力低下、癫痫易发作、活动过度、自闭症等社会行为的异常，特殊面容及男性青春期后大睾丸（单侧大于 25ml）、生育功能低下，女性成年后卵巢早衰。

FMRP 主要表达在脑和睾丸，有研究表明<sup>[8]</sup>，FMR1 基因的表达期在睾丸发育的关键时期，表达量为其他组织的 20~30 倍，在小鼠青春期即第六周时表达达到高峰，至成年前期开始下降，说明 FMR1 基因在睾丸发育过程中起到重要调节作用，

而当 FMR1 基因不表达或者表达减低,可出现如睾丸增大、生殖力减退等表现。为了研究 FXS 患者缺乏 FMRP 发病的复杂机制,FXS 患者的生殖系统及智力行为等相关问题正成为研究热点。

目前关于 FXS 男性生殖系统的研究主要集中于 FMRP 在睾丸中的细胞定位及其功能,并探讨 FMRP 对睾丸的精子生成及其超微结构是否有调节作用及其可能的机制。果蝇中研究表明<sup>[9]</sup>,其脆性 X 基因相关蛋白在果蝇睾丸中高表达,特别是在生精早期阶段的一些生精细胞中(精原细胞和精母细胞),使精子缺乏中央微管,从而影响精子轴丝的稳定性和精子活动力降低。

Bakker<sup>[10]</sup>等在 FVB 野生型小鼠 FMR1 基因区插入新霉素片断,使 FMR1 基因不能表达蛋白 FMRP,成为脆性 X 综合征的经典模型,FMR1 基因敲除(knock out, KO)鼠的许多行为学表现与 FXS 患者非常相似,如过度活动,学习障碍,青春期后睾丸增大等<sup>[11]</sup>,是目前公认的研究 FXS 最好的小鼠模型。本研究对 FMR1 基因敲除鼠雄性生殖能力及性功能进行系统的研究,为这类疾病的预防和治疗提供理论基础,同时为 FMRP 在雄性生殖系统中的作用提供新的见解,为今后更加深入的研究打下基础。

# 材料与方法

## 1.材料

### 1.1 实验动物

实验动物 Fmr1 基因敲除型小鼠 (KO) 纯合子 (-/-) 是以正常野生型 (WT) 纯合子 (+/+) FVB 近交系小鼠为背景, 在其 FMRI 基因中插入新霉素片段, 使 FMR1 基因不表达, 从而实现 FMR1 基因定点灭活, 制备成人类脆性 X 综合征 (fragile X syndrome ,FXS) 的代表性实验动物模型, 由广州医学院神经科学研究所从荷兰 Erasmus 大学实验动物科学中心引进, 经广州医学院实验动物中心的繁育饲养建立了该品系的清洁级种群。饲养环境为 12h 光照与 12h 黑暗交替, 自由取食、水, 所有实验动物的饲养均符合广东省及广州医学院实验动物管理饲养条例, 遵循人道原则。Fmr1 基因敲除小鼠粤检证字 2004A053 号, FVB 小鼠粤检证字 2004A052 号。

### 1.2 分组及处理

实验小鼠共 82 只, 均通过 PCR 确定基因型后用于下一步实验。其中 KO 雄性组为 17 只 (8 周龄-10 周龄大小, 12 只用于生殖实验, 5 只用于组织学观察), WT 雄性组 17 只 (8 周龄~10 周龄大小, 12 只用于生殖实验, 5 只用于组织学观察), 雌性 WT 小鼠共 48 只 (大小为 8~10 周龄), 每只雄性小鼠都分别与两只雌性 WT 鼠合笼, 观察合笼后半小时内雄鼠捕捉雌鼠潜伏期及 30min 内捕捉雌鼠次数, 以后每天早上八点和下午两点观察雌鼠是否有阴道栓子形成, 连续观察五天后, 将雄鼠取出, 用于观察成年雄鼠的睾丸、附睾脏器重量、脏器系数及组织病理学分析, 精子分析及血清性激素水平的分析。雌鼠分笼饲养, 继续观察 19~23 天直至分娩, 计数胎仔数。

### 1.3 主要试剂

蛋白酶 K (PK)	北京鼎国生物科技有限公司
无水乙醇	广州化学试剂厂分析纯
引物序列 (S1, S2, M2, N2)	上海生工生物工程有限公司
TaqDNA 聚合酶	北京鼎国生物科技有限公司

10×扩增缓冲液 (10×TaqBuffer)	北京鼎国生物科技有限公司
三磷酸脱氧核糖酸 (dNTP)	北京鼎国生物科技有限公司
溴化乙锭 (EB)	美国 Sigma 公司
琼脂糖粉	德国 Boehringer Mannheim 公司
10×上样缓冲液 (10×Loading Buffer)	日本 TaKaRa Biotech 公司
DNA Marker DL2000	美国 Sigma 公司
Tris 平衡酚	广州化学试剂厂分析纯
PBS 平衡液	广州展晨生物科技有限公司
多聚甲醛	美国 Sigma 公司
氯仿异戊醇	广州化学试剂厂分析纯
十二烷基磺酸钠 (SDS)	广州化学试剂厂分析纯
STE 缓冲液	北京鼎国生物科技有限公司
TBE 缓冲液	广州展晨生物科技有限公司
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)	广州化学试剂厂分析纯
乙酸钠(NaAc)	广州化学试剂厂分析纯
75%乙醇	广州化学试剂厂分析纯
二甲苯	广州化学试剂厂分析纯
石蜡	上海化学试剂公司
水合氯醛	上海化学试剂公司
TE 缓冲液	北京鼎国生物科技有限公司
己烯雌酚注射液	广州白云山明兴制药有限公司
EDTA	北京鼎国生物科技有限公司
无酚红 HBSS 液	上海拜力生物科技有限公司
HE 染色剂	北京宣科思源科技有限公司
ELISA 试剂盒	美国 Rapidbio 公司

#### 1.4 主要仪器

PCR 仪 (UNO II 型)	德国 Biometra 公司
水平电泳仪	美国 Beckman 公司
Image-Pro Plus 6.0 分析系统	美国 Media Cybernetics 公司
计算机	中国海尔
NDA 蛋白核酸分析仪	美国 Beckman 公司
凝胶图像分析仪	英国 Uvitec 公司
倒置相差显微镜 (CK40-32PH)	日本 Olympus 公司
高速离心机	上海安亭科学仪器厂
低速离心机	中国飞鸽牌
震荡机	美国 Beckman 公司
酶联免疫测定仪	日本 Olympus 公司
电热恒温三用水箱	余姚市亚星仪器仪表有限公司
恒温磁力搅拌器: CU420 型	上海益恒实验仪器有限公司
电子秒表	深圳惠波工贸公司
Nickon 多功能显微镜	日本 Nickon 公司
CASA 精子分析仪	美国 Hamilton 公司
DT-2 00 型电子天平	美国双杰测试仪器公司
Olympus New Vanox 多功能显微镜	日本 Olympus 公司
捷达 JD801 图像分析仪	江苏省捷达科技发展有限公司
Canon 彩色数码照相机	日本 Canon 公司
PH 计	瑞士 Mettler-Tolede 公司
电热恒温鼓风干燥箱	上海申贤恒温设备厂
组织切片机 (820 型号)	美国 Reichert-Jung 公司
酶联免疫反应仪	日本 Olympus 公司
超低温冰箱	日本 SANYO 公司
微量加样器	德国 Eppendorf 公司
压力蒸汽灭菌器 (MLS-3020)	日本 SANYO 公司
立式冷藏柜	国产华凌公司
超纯水系统 (Direct-Q5)	法国 Millipore 公司

## 1.5 一般器械

组织剪，眼科剪、各式镊、钳等器械，50-1000ml 规格量筒，1000ml 容量瓶，1-50ml 规格一次性注射器，漏斗，滤纸，50ml、1000ml 烧杯，烧瓶，500ml 盐水瓶，各种吸管(刻度、尖、弯等吸管)，吸头，载玻片，盖玻片，酒精灯，锡纸，封口胶，pH 试纸，铝饭盒，脱脂棉，10 $\mu$ l/20 $\mu$ l/100 $\mu$ l/1ml 加样枪头，0.1ml / 1.5ml Eppendorf 离心管，三通输液器，输液管，12 号针头，薄膜、乳胶手套等。

## 1.6 主要溶液配方

### 1.6.1 PBS

称取 KCl 0.20g，NaCl 8.00g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.56g，加入到 800ml 左右的去离子三蒸水中，搅拌使其充分溶解，加水接近 1000ml，调 pH 值至 7.2~7.4，定容为 1000ml，过滤消毒或转入干净的盐水瓶中高压灭菌，4℃ 保存备用。

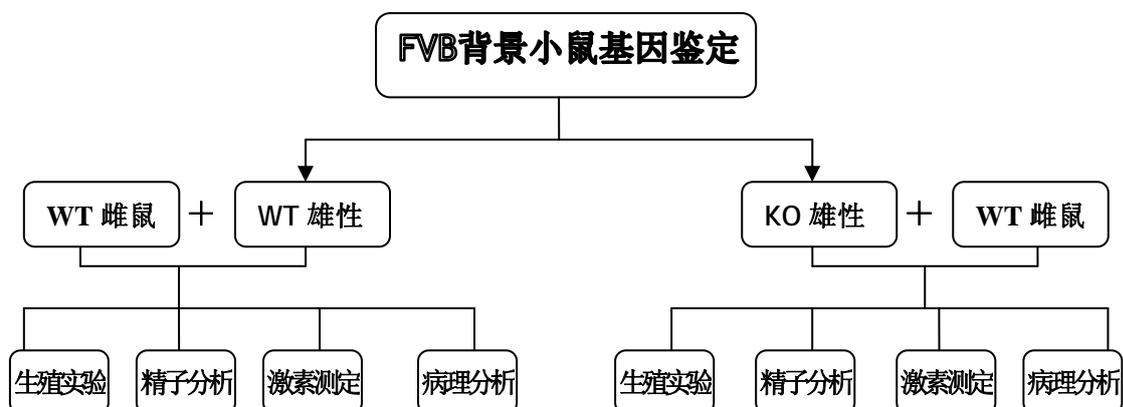
### 1.6.2 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液

称取 80g 多聚甲醛粉，溶解在 800ml 配好的 PH 值在 7.4 左右的 PBS 缓冲液中，用密封薄膜盖好烧杯口后，在烧杯中加热至 60℃ 左右，磁力搅拌器搅拌至完全溶解，双层滤纸过滤杂质，量筒中加 PBS 缓冲液至接近 2000ml，调 PH 值在 7.2~7.4 之间，定容至 2000ml，4℃ 保存备用。

### 1.6.3 1.5%琼脂糖凝胶

称取 1.2g 琼脂糖粉放入 250ml 烧瓶中，加入 80ml 0.5%TBE 缓冲液混匀后，放入微波炉中火煮 3min，取出加入 8 $\mu$ l EB 后，倒入制胶槽中，枪头吸尽胶中气泡，待冷却凝固后，取出备用。

## 2.技术路线图



## 3. 实验方法

### 3.1 实验动物的基因型鉴定

#### 3.1.1 用于 PCR 扩增的引物的合成

针对 FMR1 KO 小鼠和 WT 小鼠的不同的 FMR1 基因型设计引物：引物 S<sub>1</sub>5'-GTGGTTAGCTAAAGTGAGGATGAT-3'/S<sub>2</sub>5'-CAGGTTTGTGGGATTAACAGATC-3'用于扩增 WT 小鼠的 FMR1 等位基因片段，扩增基因片段大小约 468bp。引物 M<sub>2</sub>5'-AGTCATGCTATGGATATCAG-3'/N<sub>2</sub>5'-TGGGCTCTATGGCTTCTGA-3'用于检测 KO 鼠插入新霉素片段的 FMR1 等位基因片段，扩增基因片段大小约为 800bp。

#### 3.1.2 DNA 提取和定量

DNA 的提取：剪取小鼠尾巴 1.5cm 装在 1.5ml EP 管中并编号，加 500μl STE 缓冲液、20%SDS25μl、10μl 蛋白酶 K 均匀混合后密封，56℃水浴锅中水浴 24 小时，以溶解小鼠尾巴，然后向溶解液中加 500μl Tris 平衡酚并震荡摇匀 30s，12000r/min 高速离心 10min，移液器洗取上层清液加入另一 EP 管，加 500μl 氯仿异戊醇，震荡摇匀 30s，12000r/min 离心 10min，吸取上层清液于另一 EP 管内，加入 40μl 3mol/L NaAC (Ph 值 5.2)，加入 1ml 4℃无水乙醇，充分摇匀，可见絮状物 DNA 析出，12000r/min 离心 10 分钟，弃上层清液，保留 EP 管底部灰白色沉淀物，加入 1ml 75% 乙醇，震荡摇匀 30s 后 12000r/min 离心 10 分钟，弃上层清液，室内晾干过夜，第二天加 380μl TE 缓冲液，4℃保存待测。

DNA 的定量：根据仪器测定步骤，每次吸取洗脱液 2.5 $\mu$ l 稀释至 1/20，放入比色杯中，测定其 A 值，并计算出核酸浓度。

### 3.1.3 PCR 扩增

鉴定 WT 基因型的 PCR 反应总体积为 30 $\mu$ l，含提取鼠尾的 DNA 100ng (2 $\mu$ l)、TaqDNA 聚合酶 1.0U (0.5 $\mu$ l)、引物 S<sub>1</sub> 和 S<sub>2</sub> 各 0.35 $\mu$ mol/L (1 $\mu$ l)、dNTP 200 $\mu$ mol/L (0.5 $\mu$ l)、10 $\times$ TaqBuffer 3 $\mu$ l 和双蒸水。PCR 扩增条件为：热启动，94 $^{\circ}$ C 预变性 5min，然后按照以下列温度和时间循环 35 次：94 $^{\circ}$ C 45s，59 $^{\circ}$ C 45s，72 $^{\circ}$ C 45s。末次循环后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min，4 $^{\circ}$ C 保存。

鉴定 KO 基因型的每个 PCR 反应总体积为 25 $\mu$ l，含提取的 DNA 样本 2 $\mu$ l、TaqDNA 聚合酶 0.3 $\mu$ l、引物 M<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 各 1 $\mu$ l、dNTP 0.5 $\mu$ l、10 $\times$ TaqBuffer 2.5 $\mu$ l 和双蒸水 19 $\mu$ l。PCR 扩增条件为：热启动，94 $^{\circ}$ C 预变性 5min，然后按照以下列温度和时间循环 32 次：94 $^{\circ}$ C 45s，61 $^{\circ}$ C 60s，72 $^{\circ}$ C 45s。末次循环后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min，4 $^{\circ}$ C 保存。

### 3.1.4 1.5%琼脂糖凝胶电泳

先配好含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶，分别取 PCR 扩增产物 8 $\mu$ l、10 $\times$ Loading Buffer 2 $\mu$ l 加在琼脂糖凝胶电泳槽中，并在其中一个加样孔中加入 DL2000 DNA Marker 6 $\mu$ l 作参照。以 100V 电泳约 15min，观察指示剂近胶边缘后，取出于凝胶成像仪中观察拍照。

### 3.1.5 鉴定一种基因型后，互换体系，再次确认。

## 3.2 生殖实验

KO 组和 WT 组各为 12 只，每只雄性小鼠与两只雌性成年 WT 母鼠放入同一笼中（雌鼠于实验的前两天每天给予皮下注射己烯雌酚 1mg/kg，使其进入发情期），开始计时并观察合笼后，雄鼠第一次捕捉雌鼠的时间（捕捉潜伏期），及合笼后 30min 内雄鼠捕捉雌鼠的次数。以后每天上午和下午观察雌鼠是否有阴道栓子形成，有阴道栓子产生的母鼠即为交配成功，可取出分笼，单独饲养直至分娩。未观察到阴栓的母鼠于合笼五天后，分笼饲养，取出雄鼠进行睾丸称重、精子分析、血清性激素测定等，母鼠继续观察饲养 19~23 天直至分娩，统计雄鼠生育率、母鼠怀孕率和产仔数。

### 3.3 雄鼠辜丸、附辜脏器系数比较

合笼五天后，取出 KO 鼠和 WT 鼠，天平称量小鼠体重，断头处死小鼠并留血备用，眼科剪快速解剖分离出小鼠双侧辜丸及附辜组织，吸水纸上吸干后，双侧辜丸和附辜分别放入已经称重的 EP 中，再次电子天平上称重，并取前后两次称量结果的差值即为辜丸、附辜组织的重量。辜丸脏器系数 (%) = 双侧辜丸重量 (g) / 小鼠体重 (g)，附辜脏器系数 (%) = 双侧附辜重量 (g) / 小鼠体重 (g)。

### 3.4 精子计数、形态及活率分析

#### 3.4.1 精子稀释液的制备

将已经称重完的小鼠的一侧附辜，用眼科剪取附辜尾部成放射状，然后放入 2ml 经 37°C 预热的无酚红 HBSS 平衡液中，轻微震荡 10s 后使精子能够充分游出，制成精子稀释液。在 37°C 含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养一小时，使精子获能。

#### 3.4.2 精子活率、形态分析

采用人工与 CASA 辅助精子分析系统相结合的方式，对精子数量，活率及形态进行分析。每个雄鼠分析 200 个精子，即每组分析 2400 个，精子活力等级记为直线向前运动，非前向运动和不活动，计数时先计直线前向运动的精子数，然后计非前向运动、不活动精子。精子活率 (%) = 活动精子数 / (活动精子数 + 不活动精子数)，直线向前运动比率 (%) = 直线前向运动数 / (活动精子数 + 不活动精子数)。精子形态分析应用 CASA 系统的电子显微放大镜放大至 2380 倍，观察并计数精子头部、颈部及尾部异常形态和脂质小体出现比率，头部呈三角形、锤头状、无钩、双头、无头等记为头部畸形，颈部、尾部弯曲成角、发夹样、卷曲、断裂、双尾等记为颈部、尾部畸形，精子中段近头部位置含有脂质小体的计数。

#### 3.4.3 精子计数

取精子稀释液 1ml 与等量多聚甲醛磷酸盐缓冲液充分混合后，固定精子，取少量精子稀释液于血细胞计数池一侧，光学显微镜放大 200 倍下计数，以精子头部位置计数为准，数上线不数下线，数左线不数右线，有头无尾的精子计，无头精子不计，计数四个角上四个大方格的数量。每侧附辜精子数  $n = \text{四个大方格精子总数} \times 14 \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \times 2 \times 2$ 。

### 3.5 血清性激素水平测定

#### 3.5.1 血清采集

将断头取出的约 1ml 小鼠血液置于 EP 管中，静置 10min 后，放入离心机中以 3000r/min 离心 10min，留取上层血清，分装后以 -20℃ 保存备用。

#### 3.5.2 血清 T 浓度测定

按照 ELISA 试剂盒中双抗体两步夹心酶联免疫吸附法测定步骤进行。

##### 3.5.2.1 标准品稀释液的配制

取出测定小鼠血清 T 的 ELISA 试剂盒，吸取浓度 2400pg/ml 的标准品 120 $\mu$ l，从中取出 60 $\mu$ l 加入等量 60 $\mu$ l 标准品稀释液混匀，配成 1200pg/ml 的标准品稀释液，再从 1200pg/ml 的标准品稀释液中取出 60 $\mu$ l 加入 60 $\mu$ l 标准品稀释液，混匀，配成 600pg/ml 的标准品稀释液，以此类推，直至配出 300pg/ml、150pg/ml、75pg/ml 的标准品稀释液各 60 $\mu$ l。

##### 3.5.2.2 加样本及标准品入酶标板

取出酶标包被板，设计好加样孔、标准品孔和空白对照孔，所有孔均有复孔。取出 20 倍浓缩洗涤液，用双蒸水将其稀释为原倍。加入标准品和待测样本：在标准品中加入 50 $\mu$ l，待测样本孔中加入待测样本 10 $\mu$ l 及样本稀释液 40 $\mu$ l（即样本被稀释为 1/5 倍），空白对照空不加。

##### 3.5.2.3 反应过程

将加好样本的酶标板放入 37℃ 水浴锅温育 30min 后，弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸拍干，如此反复洗板四次，除空白孔外每孔加酶标工作液 50 $\mu$ l，37℃ 水浴锅温育 30min，再次洗板四次，弃去洗涤液，每孔中加入显色剂 A 液 50 $\mu$ l，再加入显色剂 B 液 50 $\mu$ l，37℃ 避光显色 15min，取出酶标板，迅速在每孔中加入终止液 50 $\mu$ l，颜色由蓝色立转为黄色即表示反应终止。

##### 3.5.2.4 酶标仪测定 OD 值并计算浓度

在终止反应的 15min 内，以空白孔调零，酶标仪上测定各孔的 OD 值，由电脑根据标准品对照孔的浓度值设计好回归方程，并计算出对应的样本浓度。结果取两孔平均值，并乘以稀释倍数 5 得出实际样本浓度。

FSH、LH 浓度依次用相应的试剂盒，采取相同步骤，计算出样本实际浓度。

### 3.6 睪丸及附睪组织病理学分析

#### 3.6.1 组织固定

两组各五只雄性 8~10 周龄小鼠，小鼠称重后，以 10%水合氯醛以 250mg/Kg 剂量腹腔注射麻醉，固定于泡沫板上，剪开皮肤、胸腔、心包膜，暴露心脏，将钝头灌注针自左心室插入主动脉，止血钳固定，剪开右心房。先快速输以生理盐水冲洗，待右心回流液清亮后，以较前稍慢速度输入 4℃4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定，以肝脏颜色变白并见有明显肢体抽搐、肌肉颤动、僵硬者为固定成功。灌注固定成功后以眼科剪迅速取出左侧睪丸、附睪组织，置于 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 固定 24~48 小时。

#### 3.6.2 组织脱水

取出固定好的睪丸、附睪组织，用流动自来水漂洗 2~4h，按照以下步骤逐步操作：组织浸入 70%乙醇 4℃过夜，80%乙醇 1h，90%乙醇 1h，95%乙醇 (I) 1h，95%乙醇 (II) 2~3h，100%乙醇 (I) 20min，100%乙醇 (II) 20min，100%乙醇 (III) 20min，二甲苯 (I) 10min，二甲苯 (II) 20min，二甲苯 (III) 20min，至组织呈棕黄色或暗红色透明状，待石蜡包埋。

#### 3.6.3 石蜡包埋、组织切片

取块状石蜡置于烧杯，放入 60℃烤箱中融蜡，并用滤纸过滤两遍。再分成石蜡 I, 石蜡 II, 石蜡 III 放烤箱中。将已脱水组织分别浸入石蜡 I, 石蜡 II, 石蜡 III 各 20min 后，放入融蜡槽中，浇注已溶石蜡，调整好组织块位置，待冷却固定。修整石蜡块，固定在切片机上以 5 $\mu$ m 厚度切片，在 37℃水中进行捞片，置于载玻片上晾干。

#### 3.6.4 HE 染色、封片

将贴片后晾干的石蜡切片放入 60℃烤箱烘干中 1h 后，立即浸入二甲苯 (I) 10min，二甲苯 (II) 10min 脱蜡，后依下列步骤梯度复水：95%乙醇 (I) 2min, 95%乙醇 (II) 2min, 90%乙醇 1min, 80%乙醇 1min, 蒸馏水 1min，苏木精液染色 10min，流水洗去苏木精液 3s, 1%盐酸乙醇 2s, 水洗 10s, 促蓝液返蓝 10s, 流水冲洗 10min, 蒸馏水过洗 2s, 0.5%伊红液染色 3min, 蒸馏水 2s, 80%乙醇 2s, 95%乙醇 (I) 3min, 95%乙醇 (II) 3min, 100%乙醇 (I) 5min, 100%乙醇 (II) 5min, 二甲苯 (I) 5min, 二甲苯 (II) 5min, 二甲苯 (III) 5min, 中性树胶封片。

### 3.6.5 组织学观察

放大 600 倍光学显微镜下观察，每个睾丸组织切片中，选取 10 个圆形生精小管上皮，测量生精小管的直径及生精上皮的厚度，计数支持细胞，精原细胞，各级生精母细胞的个数。观察附睾头体尾形态、附睾管周膜的厚度及其中精子情况。

### 3.7 数据分析

所有的数据采用 SPSS15.0 软件进行分析，正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{X}\pm SD$ ) 表示，组间均数采用两独立样本 T 检验，计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验。P<0.05 视为差异具有统计学意义。

# 结 果

## 1.实验动物基因型鉴定结果

WT 鼠和 KO 鼠 FMR1 基因 PCR 扩增结果如图 1 (A) 所示。1 泳道为所加入 DNA marker。以 S1 和 S2 为引物, 在 WT 小鼠基因扩增出的 DNA 条带约为 500bp 附近,如图 1 (A) 中 5、6、7、8 泳道。以 M2 和 N2 为引物对 KO 小鼠基因扩增出的 DNA 条带约为 800bp 附近。且将引物体系互换后, WT 和 KO 小鼠均为阴性结果, 如图 1 (B) 所示, 显影条带为 marker。表明 KO 鼠的基因型为插入一个新霉素片段, 阻断了正常 500bpDNA 片段的扩增表达, 证实了 FMR1KO 鼠模型的基因缺陷。

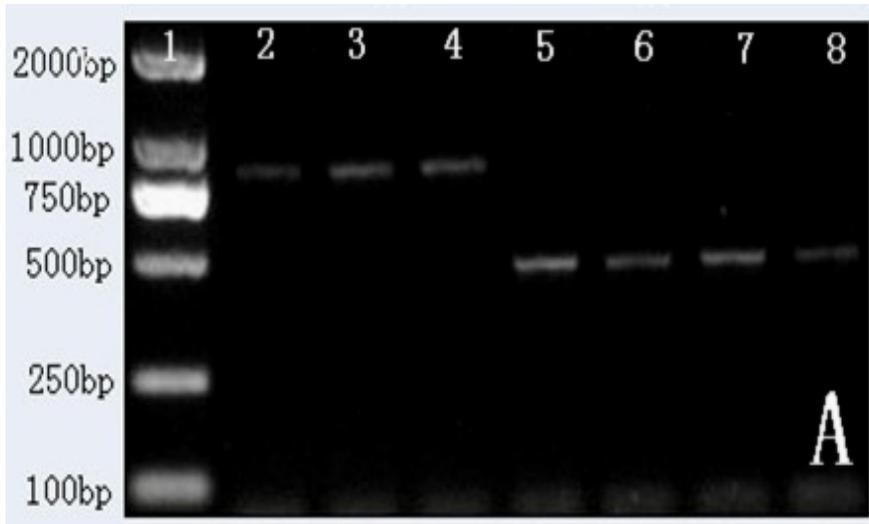


图1 A图为PCR 扩增后WT和KO小鼠FMR1基因电泳条带  
B图为互换引物体系后, PCR 扩增后电泳条带为阴性

## 2. 生殖试验结果

### 2.1 雄性小鼠性行为观察结果

雄鼠与雌鼠合笼后, KO 小鼠捕捉雌鼠的潜伏期为  $15.76\pm 6.14\text{min}$  较 WT 鼠  $9.24\pm 5.32\text{min}$  明显延长( $P<0.05$ ), 捕捉雌鼠的次数为  $2.64\pm 5.52$  少于 WT 鼠  $5.81\pm 4.05$  ( $P<0.05$ ), 与 WT 鼠相比, KO 小鼠表现出性欲较低、功能较差。数据结果见表 1。

表 1 雄性小鼠捕捉潜伏期及捕捉次数的比较

项目	$\bar{X}\pm S$		
	KO(n=12)	WT(n=12)	P 值
捕捉潜伏期 (min)	$15.76\pm 6.14$	$9.24\pm 5.32$	0.00
30min 内捕捉次数	$2.64\pm 5.52$	$5.81\pm 4.05$	0.01

### 2.2 雌鼠阴道栓子产生率、怀孕率、雄鼠生育率、雌鼠平均产仔数等结果

与 KO 鼠交配的雌鼠阴栓出现率 25.0% 较与 WT 鼠合笼的雌鼠阴栓出现率低 54.2% 低 ( $P<0.05$ ), 见图 2。KO 组雌鼠受孕率 41.7% 低于 WT 组 87.5% ( $P<0.01$ ), KO 鼠的雄性生育率 41.7% 较 WT 组 91.7% 明显降低 ( $P<0.05$ ), 而 KO 和 WT 两组小鼠合笼的雌鼠平均产仔数分别为  $6.5\pm 2.27$  只和  $8.2\pm 3.03$  只, 无明显差异 ( $P>0.05$ )。数据结果见表 2。

表 2 两组小鼠生育系数的比较

项目	$\bar{X}\pm S$		
	KO	WT	P 值
母鼠受孕率 (%)	41.7(n=24)	87.5(n=24)	0.00
平均产仔数 (个)	$6.5\pm 2.27$ (n=24)	$8.2\pm 3.03$ (n=24)	0.23
雄性生育率 (%)	41.7(n=12)	91.7(n=12)	0.03
母鼠阴栓率 (%)	25.0(n=24)	54.2(n=24)	0.02



图 2 雌鼠合笼后产生的阴道栓子

### 3. 睾丸、附睾重量及脏器系数比较

KO 鼠体重  $27.558 \pm 1.030\text{g}$  与 WT 鼠体重  $27.713 \pm 1.394\text{g}$  无明显差异( $P > 0.05$ ), 但 KO 鼠睾丸为  $0.200 \pm 0.010\text{g}$  明显高于 WT 鼠睾丸  $0.149 \pm 0.015\text{g}$  ( $P < 0.01$ ), 附睾重量  $0.057 \pm 0.007\text{g}$  明显高于 WT 组附睾  $0.050 \pm 0.008$  ( $P < 0.05$ ), KO 组睾丸脏器系数 ( $0.727 \pm 0.041$ ) % 显著高于 WT 组睾丸系数 ( $0.536 \pm 0.054$ ) % ( $P < 0.01$ ), 附睾系数 ( $0.206 \pm 0.025$ ) % 也明显高于 WT 小鼠 ( $0.176 \pm 0.028$ ) % ( $P < 0.01$ ), 数据结果见表 3。肉眼观, 睾丸大体未见任何差异, 见图 3。

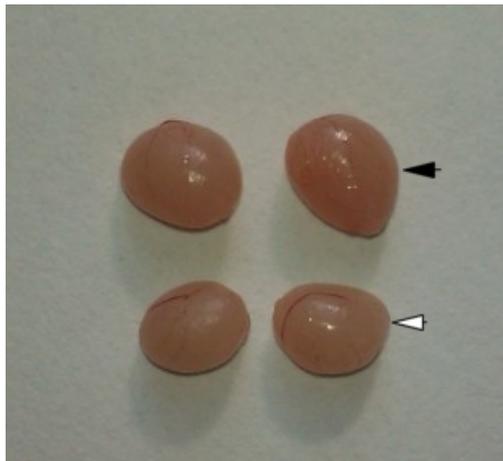


图 3 黑色箭头示 10 周龄 KO 鼠双侧睾丸, 白色箭头示 10 周龄 WT 鼠睾丸

表3 两组小鼠脏器重量及体重系数的比较(g)

项目	KO(n=12)	WT(n=12)	$\bar{X} \pm S$ P 值
体重 (g)	27.558±1.030	27.713±1.394	0.73
睾丸 (g)	0.200±0.010	0.149±0.015	0.00
附睾 (g)	0.057±0.007	0.050±0.008	0.01
睾丸系数 (%)	0.727±0.041	0.536±0.054	0.00
附睾系数 (%)	0.206±0.025	0.176±0.028	0.00

#### 4.精子计数、活率和形态观察结果

显微镜下精子计数，KO 鼠附睾尾精子计数为  $(16.9 \pm 5.31) \times 10^6$ ，与 WT 组小鼠  $(17.6 \pm 3.42) \times 10^6$  相比无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。KO 组精子活率、直线向前运动比率、畸形精子比率、头部畸形、颈部畸形、尾部畸形、脂质小体出现比率分别为  $(56.1 \pm 5.08) \%$ 、 $(24.9 \pm 6.05) \%$ 、 $(27.8 \pm 4.91) \%$ 、 $(5.1 \pm 1.43) \%$ 、 $(4.6 \pm 2.14) \%$ 、 $(18.1 \pm 4.19) \%$ 、 $(20.6 \pm 6.83) \%$ ，与 WT 组精子活率、直线向前运动比率、畸形精子比率、头部畸形、颈部畸形、尾部畸形、脂质小体出现比率结果  $(59.4 \pm 7.01) \%$ 、 $(27.7 \pm 4.91) \%$ 、 $(21.8 \pm 4.14) \%$ 、 $(4.9 \pm 1.27) \%$ 、 $(6.2 \pm 2.50) \%$ 、 $(10.8 \pm 2.45) \%$ 、 $(18.78 \pm 9.86) \%$  相比，均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。正常精子形态及各种畸形精子包括头部畸形、双头畸形、无头畸形、颈部成角畸形、尾部卷曲、双尾畸形及脂质小体等见图 4，各项精子指标比较结果见表 4。

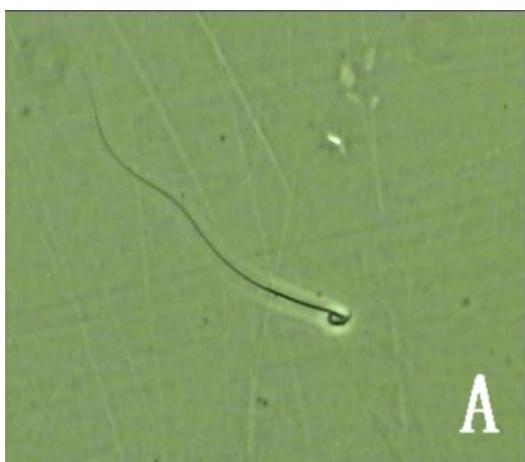
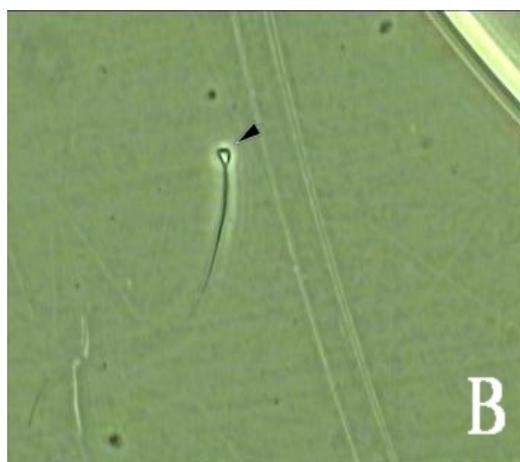
图 4 (A) 正常形态精子 ( $\times 2380$ )图 4 (B) 头部畸形 ( $\times 2380$ )



图 4 (C) 双头畸形 ( $\times 2380$ )

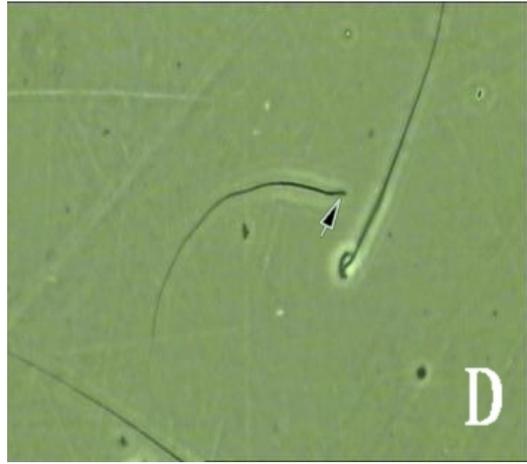


图 4 (D) 无头畸形 ( $\times 2380$ )

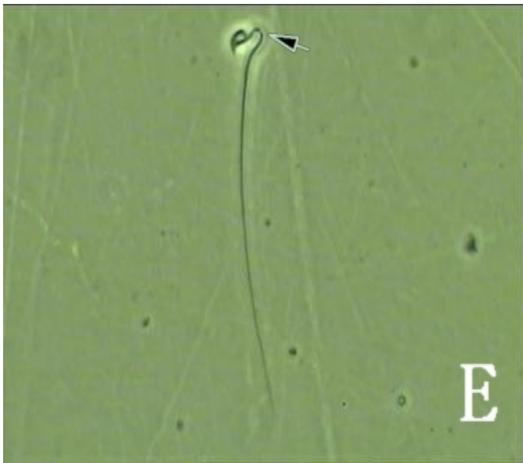


图 4 (E) 颈部成角畸形 ( $\times 2380$ )



图 4 (F) 尾部卷曲畸形 ( $\times 2380$ )



图 4 (G) 双尾畸形 ( $\times 2380$ )



图 4 (H) 包含脂质小体 ( $\times 2380$ )

图 4 各种不同精子形态照片 ( $\times 2380$ )

表 4 两组小鼠精子指标的比较

项目	$\bar{X}\pm S$		
	KO(n=12)	WT(n=12)	P 值
精子计数( $\times 10^6$ )	16.9 $\pm$ 5.31	17.6 $\pm$ 3.42	0.15
活率(%)	56.1 $\pm$ 5.08	59.4 $\pm$ 7.01	0.43
直线前向运动(%)	24.9 $\pm$ 6.05	27.7 $\pm$ 4.91	0.70
畸形精子(%)	27.8 $\pm$ 4.91	21.8 $\pm$ 4.14	0.53
头部畸形(%)	5.1 $\pm$ 1.43	4.9 $\pm$ 1.27	0.55
劲部畸形(%)	4.6 $\pm$ 2.14	6.2 $\pm$ 2.50	0.84
尾部畸形(%)	18.1 $\pm$ 4.19	10.8 $\pm$ 2.45	0.40
脂质小体(%)	20.6 $\pm$ 6.83	18.78 $\pm$ 9.86	0.59

### 5.血清 T、FSH、LH 浓度测定结果

ELISA 法测定 FMR1 KO 鼠血清中睾酮 T 为 56.815 $\pm$ 3.232 ng/ml, 与 WT 鼠 T 的 56.928 $\pm$ 4.208 ng/ml 比较结果无显著差异(P>0.05); 卵泡刺激素 FSH15.765 $\pm$ 1.366 mIU/ml 与 WT 鼠的 16.444 $\pm$ 1.455mIU/ml 无显著差异(P>0.05); KO 鼠黄体生成素 LH 测定值为 3283.823 $\pm$ 92.980, 较 WT 组 3209.779 $\pm$ 99.282(P>0.05), 无差异。比较结果见表 5。

表 5 两组小鼠血清性激素水平的比较

项目	$\bar{X}\pm S$		
	KO(n=12)	WT(n=12)	P 值
T(ng/ml)	56.815 $\pm$ 3.232	56.928 $\pm$ 4.208	0.94
FSH(mIU/ml)	15.765 $\pm$ 1.366	16.444 $\pm$ 1.455	0.25
LH(pg/ml)	3283.823 $\pm$ 92.980	3209.779 $\pm$ 99.282	0.07

### 6.睾丸附睾组织病理学

睾丸附睾组织病理切片在光学显微镜下观察, 与 WT 小鼠相比, KO 组小鼠睾丸、附睾组织结构及生精无明显差异, 病理对照无显著改变(图 5)。曲细精管直径, 生精小管上皮的结构及厚度亦未见明显差异, 支持细胞, 精原细胞, 各级生精细胞形态及数量未见明显异常(见表 6)。

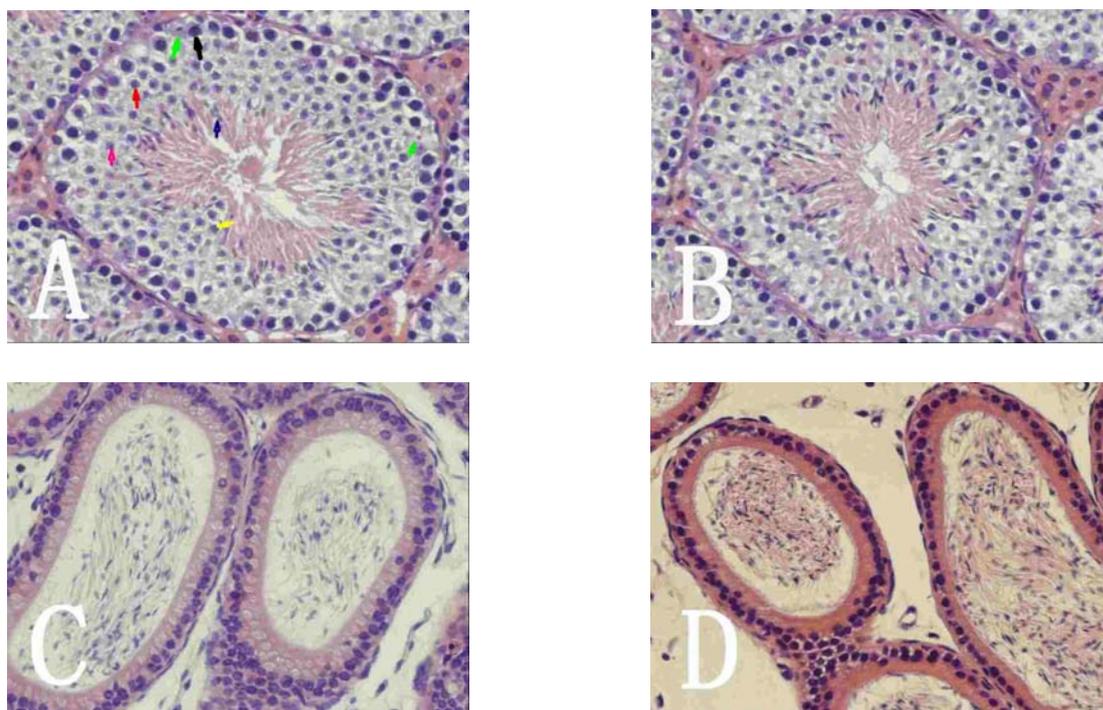


图 5 A、B 为 10 周龄小鼠睾丸组织切片 HE 染色 ( $\times 600$ , A 图为 KO 组, 图中黑色箭头示精原细胞, 绿色箭头示支持细胞, 红色箭头示初级精母细胞, 粉红色箭头示次级精母细胞, 黄色示精子细胞, 紫色箭头示发育成形的精子, B 图为 WT 组); C、D 为附睾组织切片 HE 染色 (C 为 KO 组, D 为 WT 组)。

表 6 两组小鼠睾丸曲细精管的生精上皮及单个生精小管横截面上各种细胞数量的比较  $\bar{X} \pm S$

项目	KO(n=8)	WT(n=8)	P 值
生精小管直径 ( $\mu\text{m}$ )	191.5 $\pm$ 12.9	193.8 $\pm$ 9.5	0.68
生精上皮厚度 ( $\mu\text{m}$ )	61.9 $\pm$ 3.8	64.7 $\pm$ 3.9	0.16
支持细胞 (个)	10.0 $\pm$ 2.7	9.3 $\pm$ 1.7	0.51
精原细胞 (个)	28.0 $\pm$ 8.6	33.5 $\pm$ 6.9	0.18
初级精母细胞 (个)	50.0 $\pm$ 10.1	41.4 $\pm$ 9.8	0.10
次级精母细胞 (个)	2.7 $\pm$ 2.3	2.4 $\pm$ 1.7	0.71
精子细胞 (个)	120.4 $\pm$ 12.3	126.0 $\pm$ 9.9	0.33
精子 (个)	35.8 $\pm$ 6.9	40.6 $\pm$ 8.6	0.23

## 讨 论

FXS 患者的生殖系统病变一直被人们关注关于, Patricia 等对多个 FXS 患者家族进行分析时, 发现绝大部分男性睾丸增大, 左右分别为  $55.1\pm 28.9\text{ml}$  和  $58.3\pm 26.3\text{ml}$ , 且伴有生育率降低<sup>[12]</sup>, 提示 FMR1 基因可能造成男性睾丸增大及生育力降低。关于其致病机制, 以前的研究主要集中在神经系统, 现已证实 FMRP 主要定位于细胞质中, 亚细胞结构位于与内质网相连的多聚核糖体和游离核糖体, 是一种 mRNA 结合蛋白, 其氨基酸分为三个部分: N 末端 (1~204, 为一高度保守的氨基酸序列)、两个 KH 结构域 (205~422, 核酸蛋白 K 同源结构) 和 C 末端 (516~632, 含有一个 RGG 框即精氨酸甘氨酸簇), 这些结构域均与结合 RNA 的功能有关, 可与细胞内约 4% 的 mRNA 结合, 从而对蛋白起到负性调控的作用<sup>[13]</sup>, 当 FMRP 缺失时, 这些蛋白会过度表达, 导致学习和记忆相关的长时程抑制 (LTD) 的增强, 从而产生神经系统方面的症状。在神经元突触内, FMRP 可在受到谷氨酸盐的刺激后, 迅速在树突棘翻译合成, 含量增加, 使一些相关的蛋白的 mRNA 翻译受到抑制, 影响神经元突触的发育<sup>[4,5,9]</sup>, 导致神经元树突棘形态发育异常和神经递质系统失调, 包括 FXS 患者体内代谢型谷氨酸受体 (mGluR) 信号通路上调<sup>[14,15]</sup>和  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 受体信号通路下调<sup>[16]</sup>, 最终产生智力、学习障碍及其他行为问题。

睾丸的发育不仅承担生精的作用, 而且分泌雄性激素维持第二性征。Serena 等对 5398 名男性智力低下者进行筛查统计<sup>[17]</sup>, 发现 90% 以上 FXS 成年男性会出现睾丸增大 (单侧  $>25\text{ml}$ ), 而在青春期前的男性儿童中, 则出现睾丸增大的比例很少。目前很多研究结果均为双侧睾丸青春期后增大, 但无病理结构改变<sup>[18]</sup>。Reyniers 对患有 FXS 同时并发巨睾的两兄弟进行尸检, 除外睾丸体积增大, 并没有看到睾丸生精小管及睾丸间质结构的明显改变<sup>[19]</sup>, 在 FMR1 基因敲除鼠的研究中, 得出的结论是睾丸组织并未发现明显异常<sup>[20]</sup>, 这与本研究所得出的结论一致 (结果见图 3、表 3)。一般认为, 支持细胞的数量决定了睾丸的大小<sup>[21]</sup>, 支持细胞在青春期末进行分裂增殖使睾丸体积增大, 并辅助睾丸开始产生精子。而 FSH 是推动青春期支持细胞分裂增殖、睾丸发育的主要因素, 其他一些睾丸内外的激素、细胞因子也起重要作用, 如睾丸外的调控因素包括: LH、FSH、甲状腺激素、雌激素、胸腺素、维生素等, 睾丸内的调控因素包括 IGF-1、TGF- $\beta$ 、activin、inhibin AMH、T、白介素、维甲酸、TNF- $\alpha$  等<sup>[22]</sup>。研究结果显示在 FMR1 基因敲除鼠中<sup>[23]</sup>, 支持细胞在胚胎期

12天和生后15天增殖显著加快，但增殖期的起点和维持时间跟对照组相比并无改变，这段时期血清FSH水平，FSH受体mRNA表达，及FSH对支持细胞功能的短期影响（通过FSH受体mRNA的减低调节），均无显著改变。推断FXS巨睾的发生是由支持细胞增殖加快引起的，这种增快看起来并不是由于FSH信号转导的变化引起的，且排除了甲状腺激素的影响。在本研究中也未观察到FMR1基因敲除鼠的睾丸组织病理学改变（KO组小鼠睾丸、附睾组织结构及生精无明显差异，病理对照无显著改变（见图5）。曲细精管直径，生精小管上皮的厚度亦未见明显差异，支持细胞，精原细胞，各级生精细胞形态及数量未见明显异常（见表6），这与其他研究者得出的结论相一致。

据统计在所有病例的FMR1基因的分子研究表明为典型男性脆性X综合征患者几乎均为全突变，且内分泌研究均没有差异<sup>[24]</sup>。本研究测定小鼠血清T、FSH、LH等性激素，结果与WT鼠均无明显差异，这一结果与既往的研究（包括在FXS男性患者在内）结果是一致的，因此我们考虑在FXS患者睾丸增大并非由于性腺相关激素改变引起的。

有研究表明，在雄鼠睾丸组织中，FMR1基因的表达期在睾丸发育的关键时期<sup>[7]</sup>，表达为其他组织的20-30倍，在6周青春期时表达增加达到高峰，至成年前期并开始下降，说明FMR1基因在睾丸的发育过程中可能到重要作用，且缺乏FMRP可使睾丸在青春期生长过快，有人利用YAC转基因技术，增加小鼠组织FMRP的表达，可使小鼠睾丸缩小和其他一些行为学症状改善<sup>[25]</sup>，且当FMRP过量表达时，小鼠睾丸体积会比正常小鼠的睾丸缩小<sup>[26]</sup>。这些发现均可能是FXS患者睾丸增大的原因，并且可能通过这些途径对精子细微结构及授精能力产生一定的影响。

IGF-1是目前公认的成人睾丸间质细胞功能的自分泌/旁分泌调节因子，它也是胎儿性腺发育和睾丸间质细胞功能的重要调节因素<sup>[27]</sup>。研究表明IGF-1基因无义突变可导致性腺组织生长迟缓。在对妊娠后期大鼠胎儿睾丸组织外植培养时，IGF-1可增加睾丸间质细胞的数量，刺激间质细胞有丝分裂及其分化。而IGF-1R的缺失减少了支持细胞的增殖和增加了支持细胞的死亡，从而使有活性的支持细胞的数量减少，缩小睾丸的体积<sup>[28]</sup>。另外，IGF-1R的缺失改变了培养的支持细胞的形态，减少了乳酸和转铁蛋白的分泌。而当IGF-1过度表达时，可以使性腺体积增加<sup>[29]</sup>。目前的研究表明自分泌的IGF-1对支持细胞的动态平衡起重要作用，对睾丸功能和

生精的过程也可能起着重要的调节作用。Bert 等曾经对 FXS 患儿检测 IGF-1, 发现这些患儿中只有一例表现出明显的 IGF-1 高表达<sup>[30]</sup>。表明 IGF-1 也并非 FXS 患者睾丸增大的因素。

睾丸精原细胞分化为精子过程主要分为三个阶段：①有丝分裂期：精原细胞通过有丝分裂产生 A、B 两类精原细胞，A 型精原细胞不进入分化途径，继续保持有丝分裂成为精原细胞的能力；B 型精原细胞则分裂、分化产生初级精母细胞，最终形成精子。②减数分裂期：初级精母细胞经过 1 次染色体的复制和 2 次分裂，形成单倍体精子细胞。③精子形成：这是精子的细胞形态明显变化过程，包括顶体生成、细胞核发生聚缩、塑形，尾部鞭毛、轴丝的发生,最终发育成具有头、颈、尾结构的精子。在人类，精子发生还表现出另外一个特征：即因支持细胞数量相对较少，而每个支持细胞能够对应的生精细胞也较固定，一般认为人类支持细胞与精子的数目比为 1:5，在 FXS 的研究中表明，睾丸增大，可能与青春期睾丸支持细胞的数量增多有关，但本研究在 FMR1KO 鼠没有观察到其精子数量的增多，FMR1KO 反而表现出较低的生育能力。在果蝇中研究表明<sup>[8]</sup>，其脆性 X 基因相关蛋白在果蝇睾丸中高表达，特别是在生精早期阶段的一些生精细胞中（精原细胞和精母细胞），且脆性 X 相关蛋白缺乏时可使生精细胞增殖加快，使精子缺乏中央微管，从而影响精子轴丝稳定性，使精子的活力降低而影响其雄性的生育能力，提示 FMRP 可能对精子的微观结构产生影响。

后来 Zhang 等发现 FMRP 的同源蛋白 FXR1P、FXR2P，结构与功能均非常相似，共同表达于细胞质中<sup>[31,32]</sup>。Filippo 等研究了正常人和 FXS 患者睾丸中这些蛋白的特异性表达<sup>[33]</sup>，发现正常成人睾丸生精小管靠近基底膜的精原细胞质中 FMRP 表达很强，FXR1P 则在靠近生精小管中央的成熟精母细胞表达较强，FX2P 则在生精小管内所有细胞中均有中等量表达，在体细胞为全突变的 FXS 成年男性患者中的研究表明，睾丸中精子细胞均为前突变类型，且均有 FXR1P 和 FXR2P 表达，与正常人表达一致。但在胎儿体内，这些蛋白的表达又不同，正常胎儿中 FMRP 和 FXR1P 在睾丸生精细胞和非生精细胞均有很强的表达，而 FXR2P 则只在睾丸间质细胞中高表达。在确诊 FXS 的患儿睾丸组织研究表明，FMRP 只表达于部分精原细胞，睾丸内大部分细胞没有 FMRP 的表达，少数表达 FMRP 的精原细胞被研究者认为是全突变回缩至前突变、部分 FMRP 蛋白表达所致。FXR1P 和 FXR2P 在胎儿的睾丸表

达与正常胎儿相似。这些蛋白表达的差异，可能提示我们这些蛋白在细胞中起到特异性的功能，且 Verheij 研究表明，FMRP 及其 mRNA 在人和小鼠各个部位表达水平都非常相似<sup>[34]</sup>，因此我们可以利用 FMR1KO 鼠继续研究 FMRP 在睾丸中的分子机制，并为这一疾病提供理论基础。

FXS 全突变的男性患者体内只能检测到基因型为前突变的精子，Dietmar 认为，目前有两种假说可以解释这一现象：1.全突变的精原细胞因缺乏 FMRP 蛋白，而不能发生减数分裂形成精子细胞，从而不能形成精子，而只有前突变的精原细胞才可以生成精子；2.体细胞为全突变的患者，是由个体受精卵形成以后，前突变等位基因过渡到全突变，且这种过渡只能发生在体细胞中，从而使生殖细胞仍然保留全突变<sup>[7]</sup>。这一发现，可能也为研究 FMRP 在细胞分裂增殖方面的功能提供重要的线索。

GABA 是中枢神经系统主要的抑制性神经递质，在调节神经元的活性方面起重要作用，目前研究发现很多 FXS 病人癫痫发作及睡眠障碍等均与 GABA 受体信号通路有关，Hulst 等研究发现，在 FXS 病人体内  $\gamma$  氨基丁酸 (GABA) 受体信号通路是下调的<sup>[35]</sup>。这项成果也使得 GABA 受体激动剂成为临床治疗 FXS 各种症状的靶点之一，且研究表明 GABA 受体激动剂可以缩小患者睾丸体积<sup>[36,37]</sup>。 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 作为一种抑制性神经递质，目前关于这种递质受体在生殖系统中的功能受到人们的关注，研究表明可以 GABA 通过下丘脑-垂体-性腺轴系影响性腺生理机能，GABA 可通过多巴胺抑制系统抑制垂体激素 LH 和 PRL 的分泌，从而参与激素的内分泌调节。GABA 递质形成的关键酶 GAD65 和 GAD67<sup>[38]</sup>，及几种 GABA-A 和 GABA-B 受体亚型在人类和哺乳动物睾丸中都有表达。Kanbara 等研究表明在大鼠睾丸中<sup>[39]</sup>，GABA 可能通过 GABA(A)受体对间质细胞类固醇合成的进行调节，但睾丸来源的 GABA 和睾丸 GABA 受体的确切性质都没有完全弄清楚。另外，GABA 在精子生成的调节方面也起到重要作用，Calogero 等研究表明 GABA 与孕酮协同作用，可刺激人类精子的顶体反应，能明显促进精子的获能，提高精子的体外授精能力<sup>[40]</sup>。因此，GABA 可能是精子功能的重要调节因素。总之，这些研究结果说明了人类和哺乳动物的睾丸与神经内分泌相关的部分，睾丸 GABA 能的研究不仅为 FXS 患者提供一些可能的药物治疗靶点支持，揭开 GABA 在睾丸发育及其生精等过程中的潜在功能，同时也可为其他一些相关男性生殖系疾病的治疗提供有力的基础研究

究。

在生殖系统中，氧离子、自由基及过氧化物统称为活性氧（ROS），ROS 生成增多或者抗氧化减少，都会通过以下机制引发精子的氧化应激损伤：1.过量的 ROS 会引发精子脂质膜的过氧化反应，精子质膜遭到破坏而导致精子微结构缺失和活动度下降；2.ROS 可影响精子膜的流动性，造成精子轴丝蛋白磷酸化程度降低，使精子不能运动；3.高表达的 ROS 可诱导精子 DNA 双链断裂形成单链，影响精子的遗传物质，从而影响生殖<sup>[41]</sup>。Hessl 等在对 FXS 患者行为学进行研究时发现，FXS 患者体内，尤其是男性患者，肾上腺皮质功能增强，与氧化应激相关的激素水平显著升高，提示下丘脑-垂体-肾上腺轴可能发生改变<sup>[42]</sup>。Yolanda de 等发现 FXS 小鼠也存在氧化应激状态，且应用抗氧化剂 VitE 对 FXS 的小鼠进行治疗，发现长期给药可以有效的逆转小鼠氧化自由基的过度表达、改善氧化应激、过度活动及睾丸增大等，治疗对其有效<sup>[43]</sup>。这些研究表明 FXS 体内氧化应激增高，且睾丸生精也可能因此而受到影响。因此，氧化应激也可能成为 FXS 患者生殖功能受损的一个重要原因。此外，有研究表明应激状态也可以使雄性小鼠性功能表现低下<sup>[44]</sup>。

本研究过程中，我们发现 FMR1KO 雄性鼠与雌鼠合笼后的 30 分钟内捕捉雌鼠的潜伏期延长，且半小时内捕捉雌鼠的次数明显减少，性行为欲望表现不强（结果见表 1）。我们也不能排除 FMR1KO 雄鼠的生育力降低的原因也可能是其性能力的降低或性行为的改变引起的，Feng 等报道曾欲对五名不同家系背景的 FXS 成年男性患者行精液检查，意外的发现他们都同时具有勃起功能障碍的表现，而致取精失败<sup>[45]</sup>。性反射是由复杂的神经和内分泌系统调控的，大脑皮质有性中枢，间脑和视丘下部有性功能中枢，腰骶部脊髓内有勃起中枢和射精中枢。脑垂体、肾上腺、睾丸等产生的内分泌激素均对性功能发挥有着重要的调节作用。性的兴奋和性欲的激起常是由于外界环境引起各种感官刺激，通过阴茎背神经、阴部神经，经由骶神经从经脊髓传入大脑性中枢，或直接通过其他感受器直接传入大脑性中枢，大脑对这些信息综合分析之后作出判断，再由传出神经传出刺激冲动经由脊髓的交感神经干、下腹神经丛阴部神经到达阴茎神经末梢，促进阴茎神经末梢和血管内皮细胞中的 NOS 催化底物左旋精氨酸合成 NO，NO 进一步激活鸟苷酸环化酶，活化的鸟苷酸环化酶使三磷酸鸟苷转化为环磷酸鸟苷，进而激活依赖环磷酸鸟苷的蛋白激酶，导致阴茎平滑肌细胞钙离子外流，平滑肌细胞松弛、阴茎血管扩张充血而产生阴茎

勃起。5-磷酸二酯酶（PDE5）可降解环磷酸鸟苷，使阴茎回复疲软状态。目前研究发现导致勃起功能障碍的因素是多样的，研究证明勃起反射弧传导通路的任何部位中断都有可能导致勃起障碍<sup>[46]</sup>，此外，血管病变、心里因素及多种神经递质 NO、VIP、5-HT 等，都可能是 ED 形成的病理机制<sup>[47,48]</sup>。Chen 等研究认为，FXS 患者存在有广泛的大脑皮层感觉、运动整合功能障碍，主要表现为感觉传入的高敏性及相应感觉信息处理困难<sup>[49]</sup>，此外 FXS 可能还存在一些潜在的尚未被发现的中枢神经系统和外周神经病变，是勃起反射弧发生改变，导致了 FXS 患者勃起功能障碍，这些机制有待进一步研究。

FMR1 的发病机制就是由于 FMR1 基因 5'端的 CpG 岛甲基化使 FMR1 基因沉默，不能表达 FMRP 而发病。Abdelkrim 在研究基因甲基化而表达沉默的机制时，发现 FMR1 基因的沉默是由 IL-1 $\beta$  通过 NO 信号转导通路介导的<sup>[50]</sup>，研究表明 NOS 在这种机制中起到了重要的作用。因此 FMR1 KO 鼠体内 NOS 的变化，可能是导致小鼠阴茎勃起障碍以致不能顺利完成交配的原因，其具体机制还有待进一步的实验研究。

由于 FXS 患者到不育门诊求医的较少，对这类患者直接研究可以取得的材料并不充足，FMR1 基因敲除鼠的出现，为我们研究 FMR1 基因对男性生殖系统的影响提供了很好的模型。本研究重点关注雄性 FMR1 基因敲除小鼠的生殖功能和性功能的改变，为进一步深入研究 FXS 可能存在的性功能改变和精子微观结构的改变打下基础。

## 结 论

1.通过我们的实验证实，通过在 FMR1 基因片段插入新霉素而达到阻止 FMR1 基因表达的方法是可行的，FMR1 KO 模型小鼠表现出了与 FXS 患者十分相似的症状，如青春期后睾丸增大这一重要的身体特征，行为学方面也表现非常相似，可以作为研究 FXS 的很好的动物模型。

2.通过实验我们得知，FMR1 基因对雄性生殖系统有重要的影响，FMR1 基因的缺失使雄性小鼠生育率降低，性功能减退，其对雄性生殖系统影响机制还有待进一步的实验研究。

3.FMR1 基因敲除鼠的睾丸组织学并无改变，且对精子生成、各种畸形率等未见明显影响，FMR1 基因对精子微观结构可能发生影响，其对雄性生殖系统发育的影响还有待进一步的实验研究。

## 展 望

多方面的研究证实FMR1不仅在神经系统中起着重要的作用，FMRP的缺失可能导致智力、行为学等多方面的疾病，而且其在生殖系统中同样发挥了很大的作用。FMRP的缺失可能导致雄性性功能的降低及生育率的减少，精子微观结构的改变，本实验系统的研究了FMR1雄性小鼠的生殖能力、睾丸附睾组织形态、性激素水平等，初步证实FMR1基因对雄性生殖系统的影响，为以后进一步研究FMRP在生殖系统中的作用机制及为这类疾病提供可能的治疗打下基础。

## 参考文献

- [1] European Association of Urology. Urological Guidelines [Z] .Guidelines on Male Infertility, 2004.
- [2] 王益鑫.男性不育诊治新进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2010,15(2):84-88.
- [3] Povey AC, Stocks SJ.Epidemiology and trends in male subfertility[J],Hum Fertil,2010,13(4):182-188.
- [4] Manga Sabaratnam. Fragile-X syndrome[J]. Psychiatry,2006,5(9):325-330.
- [5] Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS et al.Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome[J].Cell,1991,65(5):905-14.
- [6] O'Donnell WT, Warren ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome[J]. Annu. Rev. Neurosci, 2002, 25:315–338.
- [7] Charles R S, William S S, Barton Childs et al. The fragile X syndrome In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease[M].2000:1257-1290.
- [8] Dletmar Bachner, Antonella Manca, Peter Stelnbach et al.Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and the female gonad [J]. Human Molecular Genetics, 1993, (2)12: 2043-2050.
- [9] Yong Q Zhang, Heinrich JG Matthies, Joel Mancuso et al. The Drosophila fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis[J].Developmental Biology,2004,270(2):290-307.
- [10] Bakker C E, Oostra B A, Understanding fragile X syndrome: insights from animal models[J]. Cytogenet. Genome Res. 2003,100, 111–123.
- [11] Cathy E. Bakker, Coleta Verheij, Edwin Reyniers et al. Fmrl knockout mice: a model to study fragile x mental retardation [J].Cell, 1994,78(1):23-33.
- [12] Patricia A Jacobs, Thomas W Glover, Martha Mayer et al. X-Linked Mental Retardation: A Study of 7 families[J]. American Journal of Medical Genetics, 1980,7(4):471-489.
- [13] Mclennan Y, Polussa J, Tassone F et al.Fragile X syndrome[J]. Curr Genomics,

2011,12(3):216-224.

- [14] Mines MA, Yuskaitis CJ, King MK et al .GSK3 Influences Social Preference and Anxiety-Related Behaviors during Social Interaction in a Mouse Model of Fragile X Syndrome and Autism [J].PLoS ONE ,2010,5(3): e9706.
- [15] Bear MF, Huber KM, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation[J]. Trends Neurosci. 2004,27, 370–377.
- [16] Olmos-Serrano JL, Paluszkiwicz SM, Martin BS et al.Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdale in a mouse model of fragile X syndrome[J].J Neurosci, 2010, 30(29):9929-9938.
- [17] Serena Vatta, LLeana Cigui, Eliana Demori et al. Fragile X syndrome, mental retardation and macroorchidism [J].Clinical Genetics, 1998,54(4):366-367.
- [18] Johannisson R, Rehder H, Wendt V et al. Spermatogenesis in two patients with the fragile X syndrome I.Histology:light and electron microscopy[J]. Hum Genet,1987,76(2):141-147.
- [19] Reyniers E, Martin JJ, Cras P et al. Postmortem examination of two fragile X brothers with an FMR1 full mutation[J]. Am J Med Genet,1999,84(3):245-249.
- [20] R.Frank Kooy. Of mice and the fragile x syndrome[J].TRENDS in Genetics, 2003,19(3):148-154.
- [21] Soder O. Macroorchidism—marker of disease or normal variant?[J].Horm Res,2005,64(1):1-2.
- [22] Douiller-Fabre V, Levacher C, Pairault C et al.Development of the foetal and neonatal testis[J].Andrologia,2003,35(1):79-83.
- [23] Karin E. Slegtenhorst-eegdeman, Dirk G. De Rooij, Miriam Verhoef-post et al. Macroorchidism in FMR1 Knockout Mice Is Caused by Increased Sertoli Cell Proliferation during Testicular Development [J]. Endocrinology, 1998, 139(1): 156-162.
- [24] Ben A Oostra, Rob Willemsen. FMR1: a gene with three faces [J]. Biochim Biophys Acta. 2009,1790(6): 467–477.

- [25] Andrea M Peier, Kellie L McIlwain, Aileen Kenneson et al. (Over) correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features [J]. *Human molecular genetics*, 2000, 9(8): 1145-1159.
- [26] Gantois I, Bakker C E, Reyniers, E et al. Restoring the phenotype of fragile x syndrome: insight from the mouse model [J]. *Current Molecular Medicine* 2001, 1(4):447-455.
- [27] Hu GX, Lin H, Chen GR et al. Deletion of the IGF-1 gene: suppressive effects on adult Leydig cell development [J]. *J Androl*, 2010, 31(4):379-387.
- [28] Berensztein EB, Baquedano MS, Pepe CM et al. Role of IGFs and insulin in the human testis during postnatal activation: differentiation of steroidogenic cells [J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(6):662-666.
- [29] Villalpando I, Lira E, Medina G et al. Insulin-like growth factor 1 is expressed in mouse developing testis and regulates somatic cell proliferation [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008, 233(4):419-426.
- [30] Bert BA de Vries, Hazel Robinson, Irene Stolte-Dijkstra et al. General overgrowth in the fragile X syndrome: variability in the phenotypic expression of FMR1 gene mutation [J]. *J Med Genet*, 1995, 32(10):764-769.
- [31] Zhang Y, Oconnor JP, Siomi MC et al. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2 [J]. *EMBO J*, 1995, 14(21), 5358-5366.
- [32] Siomi M C, Siomi H, Sauer W H et al. FXR1, an autosomal homologue of the fragile X mental retardation gene [J]. *EMBO J*, 1995, 14(11), 2401-2408.
- [33] Filippo Tamanini, Rob Willemsen, Leontine van Unen et al. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis [J]. *Human Molecular Genetics*, 1997, 6(8):1315-1322.
- [34] Verheij C, Bakker CE, de Graaff E et al. Characterization and localization of the FMR1-gene product associated with fragile x syndrome [J]. *Nature*, 1993, 363 (6431):722-724.
- [35] D'Hulst C, Kooy R.F. The GABA(A) receptor: a novel target for treatment of

- fragile X?[J]. Trends Neurosci,2007,30(8), 425-431.
- [36] Chang S, Steven M Bray, Zigang Li et al. Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in Drosophila[J]. Nature Chemical Biology,2008,4(4):256-263.
- [37] Heulens I, D Hulst C, Braat S, Rooms L et al. Involvement and therapeutic potential of the GABAergic system in fragile X syndrome[J]. ScientificWorldJournal,2010,10:2198-2206.
- [38] Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A et al. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors[J]. Neuroendocrinology,2003,77(5):314-323.
- [39] Kanbara K, Okamoto K, Nomura S et al. Cellular localization of GABA and GABAB receptor subunit proteins during spermiogenesis in rat testis[J]. J Androl,2005,26(4):485-493.
- [40] Calogero AE, Burrello N, Ferrara E et al. Gamma-aminobutyric acid(GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone[J]. Fertil Steril,1999, 71(5): 930-936.
- [41] Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan moncol et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(1):44-84.
- [42] Hessel D, Glaser B, Dyer-Friedman J et al. Cortisol and behavior in fragile X syndrome[J]. Psychoneuroendocrinology,2002,27(7):855-872.
- [43] de Diego-Otero Y, Romero-Zerbo Y, el Bekay R et al. Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency[J]. Neuropsychopharmacology,2009,34(4):1011-26.
- [44] Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK et al. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction[J]. J Androl, 2006, 27 (3):335-347.

- [45] Feng Gu, Hai-Yin Zhang, Shao-Yi Hu et al. Erectile dysfunction in Fragile X patients [J]. *Asian J Androl*, 2006, 8(4):483-487.
- [46] Zhang X, Hu L, Yin J et al. Rat model of erectile dysfunction caused by cavernous nerve ablation [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2002, 115(8):1179-1182.
- [47] Buvat J, Maggi M, Gooren L et al. Endocrine aspects of male sexual dysfunctions [J]. *J Sex Med*, 2010, 7(4):1627-1656.
- [48] Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Corona G et al. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction [J]. *J Sex Med*, 2010, 7(4):1598-1607.
- [49] Chen L, Toth M. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli [J]. *Neuroscience*. 2001; 103(4):1043-50.
- [50] Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrino F et al. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(11):1595-1604.

# 综 述

## 男性不育的研究新进展

**摘要：**现代社会男性不育越来越受到人们的重视，据统计全球约有 15%的夫妇受到不育症的困扰，其中男性因素占 50%左右。据报道 90%的男性不育是由于精子发生障碍引起的，但半数以上仍病因不明。这些不育患者都会出现不同类型和程度的精子异常，包括：无精、少精、弱精、精子畸形过多等。即使对于已经确定病因的不育疾病中，其发病机理尚未完全阐明。由于辅助生殖技术的开展，使得男性不育的治疗选择增加,但仍应继续努力找出男性不育的病因，为达到治疗男性不育的目的打下基础。本文根据对男性不育的病因研究及一些相关热点问题最新进展做一综述。

**关键词：**不育，精子发生，生殖

## Male Infertility Update

**Abstract:** Nowadays people are paying more attention to male infertility than before, according to statistics, there are about 15% of couples troubled by infertility in the world, male factors accounts for about 50%. It is reported that 90% of male infertility due to spermatogenesis disorders, but more than half of which are still of unknown etiology. These infertility patients appeared in different types and levels of abnormal sperm, including azoospermia, oligozoospermia, asthenozoospermia, excessive sperm abnormalities. Although in those male infertility who have been identified causes, the pathogenesis maybe not completely expounded. Because of assistant reproductive technology, more resolution can be chosen in male infertility. But we still should try to find out the real causes of male infertility for the foundation of treatment of male infertility. The recent progress in causes research of male infertility and some hot issues are reviewed.

**Key words:** male infertility; spermatogenesis; reproduction

近半个世纪以来，由于各种因素的影响，全球范围内男性生育力呈现下降趋势。依据 WHO 的推荐认为，育龄夫妇同居一年以上，有正常的性生活而未采取任何避孕措施，由男方原因造成女方不孕者，称为男性不育<sup>[1]</sup>。据统计，目前不孕的发生

率约为 15%，男性因素造成的不育约占 50%<sup>[2]</sup>，给社会造成很大影响，也不利于人类的可持续发展。由于多数男性不育的发病原因、发病机理和病理过程仍不十分清楚，使得男性不育的治疗以辅助生殖技术为主。本文对近年有关男性不育的相关病因研究综述如下。

## 1. 性功能障碍与不育

性功能障碍在目前男性中占有相当比例，其导致的不育约占总的男性不育的 1.7%，与不育相关的男性性功能障碍包括：勃起功能障碍、性交不射精和逆行射精。正常的性交和射精是生育的必备步骤，但勃起功能障碍有相当一部分原因是由心理和精神因素引起，研究表明当抑郁症发生时，交感神经和下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进，致使夜间自发性勃起明显减少或消失，并且患者对性丧失欲望<sup>[3]</sup>。在抑郁症状解除后，患者的性功能也会有一定程度的恢复<sup>[4]</sup>。另外前列腺炎、膀胱尿道炎、膀胱颈部肌肉异常、尿道下裂、阴茎血管疾病、阴茎硬结症、手术或外伤后神经损伤等都可以成为性功能障碍的诱因。最新欧洲泌尿外科会议一致认为，勃起功能障碍(ED)发生是血管内皮功能障碍的早期信号，作为全身血管疾病的一种早期表现，与预测冠状动脉疾病发生相关<sup>[5]</sup>。虽然 ED 和许多心血管疾病的危险因素相关，他能否作为一种与年龄无关、独立的预测指标心血管事件发生的指标而引起人们的关注。有研究表明吸烟可导致男性 ED 发生率增加<sup>[6]</sup>，且目前吸烟引起的 ED 具体机制不详，有人通过大鼠吸烟模型研究表明，烟雾作用 24h 后的大鼠，发现阴茎海绵体平滑肌/平均动脉压、Masson 染色检测阴茎平滑肌和阴茎纤维组织比例、末端转移酶标记技术(TUNEL)检测凋亡指数等，均有不同程度的改变，吸烟大鼠阴茎重量明显小于正常大鼠<sup>[7]</sup>。5-羟色胺和多巴胺都是参与射精密切相关的神经递质，有研究表明对于那些射精障碍或早泄的患者，通过选择性的多巴胺受体拮抗剂，可能会起到一定的疗效，但其具体作用机制仍不清楚<sup>[8]</sup>。

## 2. 免疫因素与不育

免疫因素约占男性不育的 3.1%，如外伤等原因导致血睾屏障破坏时，精子溢出被巨噬细胞等免疫细胞吞噬而产生免疫应答，进而产生抗体。输精管结扎术后也会有相当部分病人出现 AsAb，术后结扎部位会出血、肿胀，而组织中的淋巴细胞、浆细胞及管腔中的精子与巨噬细胞相遇，都会导致精子蛋白与人体免疫系统相遇而产生相互作用，由于精子头部、尾部的不同区域含有许多相关特异蛋白，因此机体

会产生许多不同类型的 AsAb。目前研究认为 AsAb 造成的不育机制主要通过：1. 使精子凝集，使精子丧失前进动力，不能够穿过输卵管而授精；2. 阻碍精子释放透明质酸酶，抑制顶体反应。Kaplan 等曾报道 FA-1 抗体能够阻碍人精子获能及顶体反应<sup>[9]</sup>，但对已结合透明带的精子，并不能起到抑制作用。3. 影响精子穿过透明带，从而使精卵融合受影响。4. 对受精卵上的精子特异性抗原起反应而造成早期胚胎死亡。可见，AsAb 对精子会产生多方面的影响，目前的研究重点仍在发生机制探讨上，只有弄清楚其发病机理，对下一步的治疗才有更好的指导作用。

免疫系统中的补体成分也可能在不育中发挥了重要的影响。在精子顶体膜表面表达的 CD55 是一种隐匿性自身抗原，极易与外源性病原体结合，当局部免疫失衡或受到感染时，CD55 可能成为免疫系统攻击对象，产生抗 CD55 抗体。Mizuno 等研究发现<sup>[10]</sup>，若敲除 CD55 蛋白，生殖道内补体 C3 成分将明显增加，免疫活性升高而产生自身抗体，导致不育。

### 3. 特发性不育，即原因不明的不育

此类不育约占男性不育患者的 70%，也是不育症的复杂性和特殊性所在，是目前研究男性不育的热点之一。他包括原因不明少精子症、弱精子症、畸形精子症、无精子症等四类。此类不育至今病因、病机未明。但随着检测手段的不断更新发展及基因定位敲除技术的发展，不断发现很多基因和染色体的病变可能与男性不育相关，这些相关基因的发现，可能对后续研究和治疗起到重要的作用。

#### 3.1 无精子症因子（AZF）内的候选基因

近年来研究表明与精子发生关系最密切的基因叫做 AZF，定位于 Y 染色体 q11 区，他的异常和很多原发性无精子症的发生密切相关。这一区域分为 1996 年 Vogt 等发现的 AZFa、AZFb、AZFc 和后来发现的 AZFd 四个区域。AZFa 主导精母细胞的分裂增殖，它包含 3 个候选基因，USP9Y、DBY 和 UTY。Foresta 研究表明 DBY 基因在精子发生中起着重要的调控作用<sup>[11]</sup>，DBY 基因的缺失，患者表现为唯支持细胞综合症（SCOS）和生精障碍，USP9Y 的作用是对 DBY 的表达起下调作用<sup>[12]</sup>，而 UTY 基因的作用有待进一步研究发现。AZFb 缺失的患者表现为生精细胞停滞于减数分裂时期，而发生这种情况可能是由于缺失的延伸或在 X 和 Y 染色体配对过程中相关基因的缺失，造成减数分裂时染色体不能匹配而发生生精障碍<sup>[13]</sup>。AZFc 区最主要的候选基因是 DAZ 基因家族，Ferlin 等对不育男性相关基因序列检测研究

表明, DAZ 家族中 DAZ1/DAZ2 与生精障碍密切相关, 而 DAZ3/DAZ4 与生精关系不大<sup>[14]</sup>。Kent-First 等通过对不育患者基因序列比对, 发现除了以上 3 个 AZF 区外, 还有一个 AZFd 区, 这个区域的微缺失患者表现为轻度少精或者仅表现为精子形态的轻度异常<sup>[15]</sup>。另外还有一些其他定位于 Y 染色体的基因, 包括 CDY1、BPY2 等, 这些基因与不育的关系有待进一步研究。

### 3.2 位于 X 染色体染色体与不育相关的基因

X 染色体上的雄激素受体 (AR) 基因突变和泛素蛋白酶 26 基因的缺失等均被研究发现与男性不育密切相关。AR 突变可导致雄性激素不敏感综合征, 并引起不育<sup>[16]</sup>。AR 基因位于 Xq11-12 区, 包含 8 个外显子。但有研究认为 AR 基因与男性不育的关系是建立在不同遗传背景上的, 因此对其确切的功能仍待进一步探讨。

### 3.3 位于常染色体染色体与不育相关的基因

目前研究发现常染色体上与男性不育密切相关的基因包括: DAZL 基因<sup>[17]</sup>、SYCP3 基因<sup>[18]</sup>、tsMCAK<sup>[19]</sup>基因、Cstf2t 基因<sup>[20]</sup>、MTHFR 基因<sup>[21]</sup>、ER 基因<sup>[22]</sup>、CFTR 基因<sup>[23]</sup>及其他一些性激素受体相关基因 FSHR 基因、LHR 基因等, 他们均可以在男性精子有丝分裂、减数分裂或精子形态方面影响生育, 常染色体上还有许多其他与生殖相关基因的功能有待研究和发现, 因此遗传性的检查对于解决男性不育问题非常重要。

## 4. 单纯精浆异常导致的不育

精子形态及功能正常, 但精浆理化性质异常至液化时间延长或不液化, 炎症导致白细胞数量增多等, 可能会影响精子授精作用。有研究表明, 大约 90% 的精液不液化患者同时伴有前列腺炎, 而前列腺炎患者中有接近 12% 精液不液化者<sup>[24]</sup>, 因此精液不液化最常见的原因可能是生殖系统炎症所致。精浆中含有蛋白质、脂类、各类碳水化合物、离子、各种微量元素、有机酸等, 有研究表明精液中微量元素的缺乏如锌离子等, 会使性腺分泌减少, 精子形成过程受阻及导致不育<sup>[25]</sup>。因为锌参与精子细胞发育、成熟、激活、获能和凋亡, 正常量的锌可以维持精子较好的活力, 延缓细胞脂质氧化。Sawane 等研究指出, 精浆中存在的特殊的乳酸脱氢酶同工酶 LDH-X, 在精原细胞和精子内以特异分子形式存在, 在精子能量代谢起重要作用, 对精子的发生和成熟具有重要意义, 可以作为评价精液质量的一种指标<sup>[26]</sup>, 但同时检测精浆 LHD-X 活性也具有其局限性, 例如因梗阻等原因导致的不育, 患者 LHD-X

活性反而较高，而一些少精或无精者这一指标是偏低，这一因子产生的原因及其与不育的因果关系还有待进一步明确，总的来说，LDH-X 对不育的患者有一定的检测指导意义<sup>[27]</sup>。精浆中转铁蛋白作为  $\beta_1$  球蛋白与铁结合的一种复合物，主要是由睾丸支持细胞分泌，他的功能是铁的转运载体，将血液中的铁转运至曲细精管上皮处于不同发育时期的生精细胞，促进精子细胞的发育。当精浆中转铁蛋白含量减少时，将直接影响精子的形成和释放，也提示支持细胞或曲细精管生精功能障碍<sup>[28]</sup>。

#### 5. 医源性不育

主要由于医疗过程中，出现的手术的意外损伤，如误扎输精管、血管、神经等，盆底手术中损伤勃起相关的神经，长期的放疗或化疗等这些医源性因素，影响精子生成、储存、转运和排泄，从而导致不育。

#### 6. 全身性疾病与不育

人体正常生精功能、性功能的维持需要全身循环、神经、内分泌等多个系统共同参与，当机体出现疾病时，如心血管疾病、糖尿病、肝脏疾病等，生殖能力可能也会受到影响。有研究指出肝脏疾病也可诱发男性不育患者的精液及精细胞核异常<sup>[29]</sup>。维生素 A 对血睾屏障维护及精子生成具有重要的作用，Morales 等研究大鼠在长时间缺乏维生素 A 的情况下，大鼠发生唯支持细胞综合症，睾丸体积缩小，曲细精管生精上皮细胞数量明显减少，造成大鼠不育<sup>[30]</sup>。

#### 7. 先天性疾病与不育

指先天性睾丸发育异常或生精障碍等导致的男性不育，包括先天性无睾丸症、隐睾、先天性睾丸发育不全综合征，Klinefelter 综合征、XYY 综合征、XX 男性综合征、单纯支持细胞综合征等。

#### 8. 后天获得性睾丸损伤与不育

由于睾丸外伤、放射线、超声波辐射、电磁波等造成睾丸萎缩、生精功能损害，或睾丸长期处于高温条件下，影响睾丸生精，导致不育。近年来有研究资料表明，手机辐射<sup>[31,32]</sup>电脑辐射<sup>[33]</sup>等也可能对男性精子质量产生重要影响。

#### 9. 精索静脉曲张与男性不育

精索静脉曲张已成为导致男性不育的一个十分常见的因素，也是临床研究不育的热点之一。据统计，不育症患者中精索静脉曲张的发生率高达 30%-40%，说明其与不育关系密切。它所造成的不育的机制至今仍未完全阐明，目前研究表明主要与以

下几种机制有关：1.毒素反流机制：5-HT 是一种重要的神经递质，并通过受体作用于血管，研究发现精索静脉曲张患者精索静脉血中 5-HT 浓度明显高于外周血，Devoto 等认为由于睾丸静脉血反流，造成 5-HT 在睾丸异常蓄积，作用于睾丸微血管使之过度收缩，从而减少睾丸血供，使睾丸向间质纤维化、间质细胞肿胀变性，雄激素合成障碍，未成熟精子过早脱落，导致精子数量及活力降低致不育<sup>[34]</sup>。2.活性氧机制：活性氧是一类具有高度反应活性的含氧基团，包括过氧化氢、过氧离子、氢氧基等，其含量超标会使氧化/还原动态失衡，过度激活促凋亡基因 P53 的核酸内切酶、脂质过氧化损伤细胞膜等机制，诱发精子细胞凋亡。Allamaneni 等研究发现精索静脉曲张致男性不育患者睾丸中活性氧含量明显高于正常人，且其升高程度与精索静脉曲张的程度正相关<sup>[35]</sup>，表明活性氧的升高可能是精索静脉曲张导致男性不育的原因之一。3.NO 机制：NO 作为一种细胞介质，是由 NO 合酶（NOS）以 L-精氨酸为底物催化生成，且在男性生殖系统各细胞中广泛存在，有研究表明 NO 可通过鸟氨酸环化酶调节精子获能及顶体反应的过程，当 NO 浓度过高时可抑制精子获能和降低顶体反应率。Ozbek 等研究发现，精索曲张者精索静脉血中 NO 含量明显升高，与精子密度、形态异常率及活性异常成相关性<sup>[36]</sup>。另有研究表明 NO 过高，能够抑制三羧酸循环中的 NADPH 脱氢酶和琥珀酸脱氢酶系，降低细胞内能量 ATP 生成水平，减少精子活动所需能量。NO 还可通过抑制睾丸间质细胞内细胞色素氧化酶 P450 的活性，影响睾酮的生成，从而影响睾丸生精。4.免疫机制：正常机体由于血睾屏障的存在和免疫抑制功能，不会产生自身抗体，Golomb 等发现精索曲张不育大部分患者外周血及精液中可检测到 AsAb 的存在，AsAb 干扰精子的活力或黏附在精子膜上，引起精子形态和功能异常，导致不育<sup>[37]</sup>。但产生这一结果的原因仍有待进一步研究。5.细胞凋亡机制：精索静脉曲张时，淤血至睾丸局部温度升高，血液中的代谢废物蓄积、氧化应激及免疫作用等多种因素，使生殖细胞凋亡增加，导致生育力下降或不育。因此，综上所述精索静脉曲张致睾丸生精异常是一个十分复杂的病理过程，还有待进一步的实验及临床研究，为精索静脉曲张男性不育的治疗提供支持。

#### 10.男性附性腺感染导致的不育

近年关于前列腺炎、附睾炎、精囊炎等生殖系统的感染研究很多，慢些前列腺炎由于炎症因素存在，细菌致使精子凝集、精子活动力差、精液的理化性质发生改

变，导致不育。另有研究表明感染也可通过影响睾丸内 NO、丙二醛 MDA 和超氧化物歧化酶 SOD 等的含量，介导对生精小管内产生脂质过氧化损伤，从而降低精子运动能力等导致不育<sup>[38]</sup>。支原体和衣原体的感染引起精子膜和顶体的破坏，并产生神经氨酸样物质干扰精子与卵子结合，造成不育。另外研究发现，支原体、衣原体和精子具有交叉抗原，可以诱发免疫反应而产生自身抗体，诱发免疫性不育<sup>[39]</sup>。

#### 11. 内分泌疾病造成的不育

男性精子生成的需要下丘脑-垂体-睾丸轴激素的正常分泌调节，下丘脑间隔 90~120min 从视前核和弓状核脉冲式释放促性腺激素释放激素，到达垂体门脉系统后刺激腺垂体分泌 FSH 和 LH，FSH 进一步作用于睾丸间质细胞促进睾酮分泌，LH 则作用于支持细胞促进分泌睾酮及其他精子生成过程需要的营养物质。当性腺轴出现疾病，如垂体瘤等致神经内分泌失调，影响睾丸发育及精子生成，导致不育。另外肾上腺皮质醇增多症、甲状腺功能亢进、甲状腺功能低下、糖尿病等内分泌疾病等内分泌疾病也可通过下丘脑-垂体-睾丸轴或者全身因素影响生育。有研究者指出对于一些特发性不育病因未明者，对其治疗采用一些激素类的药物进行经验性的治疗，对男性不育也可能会收到一定效果，这也说明一部分特发性不育可能和内分泌疾病相关联<sup>[40]</sup>。

总结上述各种病因可见，男性不育往往不是一个独立的疾病，而可能是由多种因素交互作用所致的结果，对某些特发性不育症的诊断目前仍然较困难。随着分子生物学技术、细胞生物学技术及基因功能的进一步深入研究，不育的病因和病理机制的初步阐明，相信男性不育的问题将会得到满意的解决。

#### 参 考 文 献:

- [1] 郭应禄,胡礼泉.男科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:934.
- [2] 王益鑫.男性不育诊治新进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2010,15(2):84-88.
- [3] Hartman U. Depression and sexual dysfunction: aspects of a multi-faceted relationship[J]. Psychiatr Prax,2007,34(3):314-317.
- [4] Roose SP. Depression: links with ischemic heart disease and erectile dysfunction [J]. J Clin Psychiatry, 2003 ,64 (10) :26-30.

- [5] 李路,王涛,刘继红等.第 24 届欧洲泌尿外科年会性功能障碍专题介绍[J].中华男科学杂志,2010,16(1):93-95.
- [6] Lam TH, Abdullah AS, HoLM et al. Smoking and sexual dysfunction in Chinese males: findings from men's health survey[J]. *Int J Impot Res*,2006,18(4):364-369.
- [7] 李珉,周杏林,余达经等. 吸烟对雄性大鼠性功能影响的实验研究[J].中华男科学,2001,7(5):229-231.
- [8] Rosen RC, Marin H. Prevalence of antidepressant-associated erectile dysfunction[J]. *J Clin Psychiatry*,2003,64(Sup):5-10.
- [9] Kaplan P, Naz RK. The fertilization antigen-1 does not have proteolytic/acrosin activity, but its monoclonal antibody inhibits sperm capacitation and acrosome reaction[J]. *Fertil steril*,1992,58(2):396-402.
- [10] Mizuno M, Donev RM, Harris CL et al. CD55 in rat male reproduction tissue: differential expression in testis and expression of a unique truncated isoform on spermatozoa[J].*Mol Immunol*, 2007,44(7):1613-1622.
- [11] Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility[J]. *Hum Mol Genet*, 2000,9(8):1161-1169.
- [12] Ferlin A, Moro E, Rossi A et al. The human Y chromosome's azoospermia factor b(AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men[J]. *J Med Genet*, 2003,40(1):18-24.
- [13] Yogev L, Segal S, Zeharia E et al. Sex chromosome alignment at meiosis of azoospermic men with azoospermia factor microdeletion[J]. *J Androl*, 2004, 25 (1): 110-116.
- [14] Ferlin A, Tessari A, Ganz F et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility[J]. *J Med Genet*, 2005, 42(3):209-213.
- [15] 刘刚,辛钟成. 男性不育症相关基因研究进展 [J]. 中国男科学杂志,2006,20(9):43-46.
- [16] Erlin A, Bartoloni L, Rizzo G et al. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat

- lengths in idiopathic male infertility[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004,10(6):417-426.
- [17]Becherini L, Guarducci E, Degl'Innocenti S et al. DAZL polymorphisms and susceptibility to spermatogenic failure: an example of remarkable ethnic differences[J]. *Int J Androl*, 2004,27(6): 375-381.
- [18]Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3[J]. *Lancet*, 2003,362(9397):1714-1719.
- [19]Cheng LJ, Zhou ZM, Li JM et al. Expression of a novel HsMCAK mRNA splice variant, tsMCAK gene, in human testis[J]. *Life Sci*,2002,71(23):2741-2757.
- [20]Dass B, McDaniel L, Schulz RA et al. The gene CSTF2T, encoding the human variant CstF-64 poly-adenylation Protein tauCstF-64, lacks introns and may be associated with male sterility[J]. *Genomics*, 2002, 80(5):509-514.
- [21]Singh K, Singh SK, Sah R et al. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population[J]. *Int J Androl*,2005,28(2):115-119.
- [22]Aquila S, Sisci D, Gentile M et al. Estrogen Receptor(ER) $\alpha$  and ER $\beta$  are both expressed in Human Ejaculated Spermatozoa: Evidence of Their Direct Interaction with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/Akt Pathway[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004,89(3):1443-1451.
- [23]Grangeia A, Carvalho F, Fernandes S et al. A novel missense mutation P1290S at exon-20 of the CFTR gene in a Portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens[J]. *Fertil Steril*, 2005,83(2):448-451.
- [24]商学军,王修来,黄宇烽.肉碱与男性生殖[J].*中华男科学杂志*,2006,12(8):726-729.
- [25]Fuse H, Kazama T, Ohta S et al. Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters[J]. *Int Urol Nephrol*, 1999, 31(31):401.
- [26]Sawane MV, Kaore SB, Gaikwad RD et al. Seminal LDH-C4 isoenzyme and sperm mitochondrial activity: a study in male partners of infertile couples[J]. *Indian J Med Sci*,2002,56(11): 560-566.
- [27]刘雅峰,欧建平,周灿权等.精浆/精子乳酸脱氢酶活性与男性不育的相关性[J].中

- 国优生与遗传杂志,2010,18(2):121-122.
- [28]郭应禄,李宏军主编.男性不育症[M].第一版,北京:人民军医出版社,2003: 37-38.
- [29]王安莲,王炳青,王秋萍.乙肝病毒诱发男性不育患者精液精细胞异常分析[J].安徽预防医学杂志,2005,11(6):336-337.
- [30]Morales A, Cavicchia JC. Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term vitamin A deprivation[J]. Tissue Cell, 2002,34(5):349-355.
- [31]Fejes I, Zavaczki Z, Szollosi J et al. Is there a relationship between cell phone use and semen quality[J]. Archives Androl,2005,51(5):385-393.
- [32]Erogul O, Oztas E, Yildirim I et al. Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on huma sperm motility: an in vitro study[J]. Arch Meeical Res, 2006,37(7): 840-843.
- [33]王尚洪,吴娣,袁宜如等.电脑辐射对雄性大鼠生殖毒性的影响[J].南昌大学学报,2009,33(1):61-63.
- [34]Devoto E, Madariaga M, Lioi X. Causes of male infertility:The contribution of the endocrine factor[J]. Rev Med Chil,2000,128(2):184-192.
- [35]Allamaneni S S, Naughton C K, Sharma R K et al. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size[J]. Fertil Steril,2004,82(6):1684-1686.
- [36]Ozbek E, Yurekli M, Soylu A et al. The role of adrenomedullin in varicocele and impotence[J]. BJU Int,2000,86(6):694-698.
- [37]Golomb J, Vardinon N, Homonnai ZT. Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)[J]. Fertility and sterility,1986,45(3):397-402.
- [38]庄东明,王凡,王芳等. 泌尿生殖道大肠埃希菌感染男性不育患者精浆 NO、MDA 和 SOD 含量的变化[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(2):96-99.
- [39]Wang Y, Liang CL, Wu JQ et al. Do ureaplasma urelyticum infections in the genital tract affect semen quality [J]. Asian J Androl, 2006,8(5):562.
- [40]孙航,张晓霞,简百录.特发性男性不育内分泌治疗研究进展[J]. 医药论坛杂志,2010,31(9):123-127.

## 致 谢

首先衷心感谢三年来，我的导师\*\*教授在学习及生活上给予我的指导、关心和帮助，感谢老师对我工作能力的培养及科研设计、实验技术、论文撰写的训练，感谢老师以其专业知识、治学态度、工作作风对我的言传身教，使我受益终身。在周老师的严格要求及悉心教导下，本论文才得以顺利完成。

衷心感谢\*\*\*老师一直以来对本课题所给予的指导及帮助。

衷心感谢荷兰鹿特丹 Erasmus 大学临床遗传学系 BA.Oostra 教授无偿赠送 FMR1 基因敲除小鼠模型。衷心感谢广州医学院动物中心的黄月玲老师。

衷心感谢泌尿外科陈志光、曾格瓦、谢文琪、何兆伟、邓振农、伍信阳、王东辉、苏宇、潘建刚、秦轶等老师及刘杰、郑煜师兄在临床实践期间给予我的指导和关怀。感谢陈朝江、方元龙师弟给予的帮助。

衷心感谢广医二院泌尿外科全体医护人员给予我的关心和帮助。

衷心感谢广州医学院研究生处及广医二院科教科各位老师在我学习和生活上给予的指导和帮助。

衷心感谢广医二院神经科学研究所的各位老师及各位同学在实验过程中提供的技术指导和帮助。

最后，感谢我的家人多年来对我的支持、鼓舞和无私的奉献。

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1. 交回学校授予的学位证书；
2. 学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；
3. 本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。
4. 本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医学院及附属单位。广州医学院及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医学院及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

导师签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 关于学位论文使用授权的说明

- 1、学校可以保留本论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；
- 2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。

论文作者签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

导师签名：\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日