



石一凡,李晓彤,锁云鹏,等. 维甲酸对热应激小鼠睾丸损伤的保护作用[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):183-192.

SHI Yifan, LI Xiaotong, SUO Yunpeng, et al. Protective effect of retinoic acid on testicular injury in heat stressed mice[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 183-192.

## 维甲酸对热应激小鼠睾丸损伤的保护作用

石一凡,李晓彤,锁云鹏,刘俊泽,李春梅,李延森\*

(南京农业大学动物科技学院家畜环境控制与智慧生产研究中心,江苏 南京 210095)

**摘要:**[目的]本试验旨在探讨维甲酸对热应激小鼠睾丸损伤的保护作用。[方法]试验选用40只7周龄雄性ICR小鼠,随机分为4组:对照组(CON)、热应激组(HTRA<sub>0</sub>)、5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>维甲酸处理组(HTRA<sub>5</sub>)和10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>维甲酸处理组(HTRA<sub>10</sub>)。小鼠灌胃相应剂量维甲酸或玉米油后,42℃全身热应激2h,处理7d,试验结束后屠宰采样。[结果]与CON组相比,HTRA<sub>0</sub>组小鼠睾丸重、最小直径以及生精小管的横截面积、直径和上皮厚度显著降低( $P<0.05$ ),附睾精子活力显著下降( $P<0.05$ ),丙二醛(MDA)含量显著升高( $P<0.05$ ),总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性显著降低( $P<0.05$ ),抗氧化相关基因(*nrf2*、*ho-1*、*nqo1*、*sod1*、*gpx1*)表达量显著增加( $P<0.05$ ),*bax*基因表达量显著升高( $P<0.05$ ),血睾屏障相关基因(*occludin*、*zo-1*、*n-cadherin*和*connexin 43*)表达显著增加( $P<0.05$ ),精子发生相关基因(*plzf*、*c-kit*)表达量显著增加( $P<0.05$ )。与HTRA<sub>0</sub>比,HTRA<sub>5</sub>组小鼠生精小管的横截面积、直径和上皮厚度显著升高( $P<0.05$ ),MDA含量显著降低( $P<0.05$ ),T-SOD活性显著升高( $P<0.05$ ),*plzf*和*c-kit* mRNA表达量显著降低( $P<0.05$ );HTRA<sub>10</sub>组小鼠生精小管的横截面积、直径和上皮厚度显著升高( $P<0.05$ ),精子的活力显著提高( $P<0.05$ ),MDA含量显著降低( $P<0.05$ ),T-SOD活性显著提高( $P<0.05$ ),*nqo1*、*bax*、*bcl-2*、*zo-1*、*n-cadherin*、*plzf*和*c-kit*基因表达量显著降低( $P<0.05$ )。[结论]维甲酸能够改善热应激小鼠的睾丸重、睾丸组织形态和附睾精子活力,使之更接近对照组水平;这种保护作用可能是通过增加小鼠睾丸抗氧化能力、减少生精细胞凋亡、增强血睾屏障、改善生精微环境实现的。

**关键词:**热应激;维甲酸;小鼠;睾丸;精子活力;氧化应激;血睾屏障

中图分类号:S857.29

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0183-10

## Protective effect of retinoic acid on testicular injury in heat stressed mice

SHI Yifan, LI Xiaotong, SUO Yunpeng, LIU Junze, LI Chunmei, LI Yansen\*

(Research Center for Livestock Environmental Control and Smart Production, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**[Objectives]The aim of this experiment was to investigate the protective effect of retinoic acid on testicular injury in heat stressed mice. [Methods]Forty 7-week-old male ICR mice were randomly divided into four groups:control group(CON),heat stressed group(HTRA<sub>0</sub>),5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>retinoic acid-treated group(HTRA<sub>5</sub>)and 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>retinoic acid-treated group(HTRA<sub>10</sub>). Mice were gavaged with appropriate doses of retinoic acid or corn oil and then subjected to systemic heat stress at 42℃ for 2 h. The mice were slaughtered and sampled at the end of the test. [Results]Compared with the CON group,the testicular weight,minimum diameter, cross-sectional area,diameter,and epithelial height of spermatogenic tubules in the HTRA<sub>0</sub> group were significantly reduced( $P<0.05$ ), the epididymal sperm motility significantly decreased( $P<0.05$ ), the malondialdehyde(MDA) content and the expression levels of antioxidant related genes(*nrf2*、*ho-1*、*nqo1*、*sod1*、*gpx1*) in testis tissue significantly increased( $P<0.05$ ),while total superoxide dismutase(T-SOD)activity significantly decreased( $P<0.05$ ),the mRNA expression level of *bax* significantly increased( $P<0.05$ ),the expression levels of blood-testis barrier related genes(*occludin*、*zo-1*、*n-cadherin* and *connexin 43*) significantly increased( $P<0.05$ ), and the expression levels of spermatogenesis related genes(*plzf*、*c-kit*)expression significantly increased( $P<0.05$ ). Compared with HTRA<sub>0</sub>,the cross-sectional area,diameter and epithelial height in the HTRA<sub>5</sub> group significantly increased( $P<0.05$ ),the MDA content significantly decreased( $P<0.05$ ) while T-SOD activity significantly increased( $P<0.05$ ), and the mRNA expression levels of *plzf* and *c-kit* significantly decreased( $P<0.05$ ). Compared with HTRA<sub>0</sub>,the cross-sectional area,diameter and epithelial height of spermatogenic tubules in the HTRA<sub>10</sub> group significantly increased( $P<0.05$ ), sperm motility significantly increased( $P<0.05$ ), MDA content significantly decreased( $P<0.05$ ), T-SOD activity significantly increased( $P<0.05$ ), and the mRNA expression levels of *nqo1*、*bax*、*bcl-2*、*zo-1*、*n-cadherin*、*plzf* and *c-kit* were significantly reduced( $P<0.05$ ). [Conclusions]Retinoic acid could improve testicular weight,

收稿日期:2022-11-22

基金项目:中国博士后科学基金(2020M681648);江苏省博士后科研资助计划(2021K435C);江苏现代农业(生猪)产业技术体系建设项目(JATS[2022]083)

\*通信作者:李延森,副教授,研究方向为动物生理与营养及家畜环境调控,E-mail:liyansen@njau.edu.cn。

testicular histomorphology, and epididymal sperm motility in heat-stressed mice. This protective effect may be achieved by increasing the antioxidant capacity of mouse testes, reducing germ cell apoptosis, enhancing the blood-testis barrier, and improving the spermatogenic microenvironment.

**Keywords:** heat stress; retinoic acid; mouse; testicle; sperm motility; oxidative stress; blood testosterone barrier

近年,高度集约化和规模化养殖方式迅速发展,畜禽饲养密度较高,夏季高温引起的热应激非常普遍,已成为畜牧业养殖中备受关注的问题之一<sup>[1]</sup>。雄性家畜,如猪、牛、羊睾丸悬浮在体腔外,环境高温可直接使其温度升高,与其他器官相比,睾丸更容易受到热应激的影响<sup>[2]</sup>。睾丸温度过高不利于精子生成,导致精子活力降低,附睾精子和睾丸生精细胞都容易受到热应激的影响<sup>[3]</sup>。此外,热应激还会降低精子的数量和活力<sup>[4]</sup>,以及存活精子的受精能力<sup>[5]</sup>。

维甲酸(retinoic acid, RA)又称为视黄酸,是维生素 A 进入动物体内后的活性代谢物,其异构形式有 9-顺式维甲酸、13-顺式维甲酸和全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA),其中 ATRA 是睾丸发育过程中的重要启动物质<sup>[6]</sup>,有抗炎<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>、抑癌<sup>[9]</sup>和抗纤维化<sup>[10]</sup>等多重生物学功能。研究表明,ATRA 在精原细胞分化、减数分裂起始,血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)形成,精子发生和精子形成过程中发挥重要作用<sup>[11-14]</sup>。另外,ATRA 能够重新调整精子代谢,使其接近获能状态,保护精子免受活性氧损伤,提高抗氧化酶活性<sup>[15]</sup>。然而,目前还没有关于维甲酸是否能干预环境高温影响睾丸功能的相关研究。

本试验以小鼠为研究对象,通过全身热暴露建立热应激模型,同时为小鼠灌胃维甲酸,旨在分析维甲酸是否能保护小鼠睾丸组织免受热应激带来的损伤,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与材料

本试验得到南京农业大学动物伦理委员会批准(审核编号:NJAU.No20220517106)。所有试验程序均严格按照中华人民共和国科技部《实验动物管理和治疗规范》以及《实验动物管理和治疗条例》进行。

试验共选取 40 只体重相近的 7 周龄 ICR 雄性小鼠(购自南京卡莱斯生物科技有限公司),随机分为 4 组,每组 10 只,分别为对照组(CON)、热应激组(HTRA<sub>0</sub>)、5 mg·kg<sup>-1</sup>维甲酸处理组(HTRA<sub>5</sub>)和 10 mg·kg<sup>-1</sup>维甲酸处理组(HTRA<sub>10</sub>)。试验期间各组均饲喂基础饲料,于清洁级动物房(温度 25 ℃,相对湿度 55%~60%)适应性饲养 1 周后开始正式试验。维甲酸处理组(HTRA<sub>5</sub>组和 HTRA<sub>10</sub>组)热应激前分别灌胃 ATRA(纯度≥99%,购自上海源叶有限公司,ATRA 溶于少量二甲基亚砷并用玉米油稀释)5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>和 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,CON 组和 HTRA<sub>0</sub>组灌胃等体积玉米油(购自上海源叶有限公司,加入相应体积的二甲基亚砷),连续灌胃 7 d。对照组置于 25 ℃环境中,其余 3 组每天灌胃后,置于 42 ℃环境中 2 h 给予全身热应激。在前期研究中对小鼠连续热暴露 12 d(每天 2 h),于第 1、2、4、8、12 天热暴露前后检测小鼠的直肠温度,均发现小鼠体温发生显著变化<sup>[16]</sup>,且不同检测时间结果一致。说明热应激第 7 天前小鼠的体温可以代表小鼠体温的变化情况,同时为了减少多次直肠温度测定给小鼠带来的应激,因此本试验选择第 7 天,即最后一次高温处理前后的温度作为小鼠体温变化的指标。

### 1.2 样品采集

研究表明,热应激对精子生成的影响会延续到热应激结束后的一段时间<sup>[16]</sup>,其中热应激结束时是组织细胞中基因表达等各项指标变异的关键时间节点,一旦在这个时间点发生变化将会直接影响睾丸生精微环境,进而引起后续精子生成改变。因此,在本试验中,在第 7 天热应激结束后称重并处死小鼠,采集小鼠睾丸和附睾,并将左侧睾丸和附睾置于 4%多聚甲醛中固定,右侧睾丸置于冻存管内,液氮迅速冷冻后置于-80 ℃低温冰柜储存备用,右侧附睾用于精子的采集。

### 1.3 测定指标与方法

**1.3.1 睾丸指数、附睾指数和睾丸直径** 分离睾丸和附睾组织,剔除多余脂肪,称重。用游标卡尺测定 2 个睾丸的长轴长度和短轴长度,2 个长轴中较大者设为最大直径,2 个短轴中较短者为最小直径。睾丸指数和附睾指数的计算公式如下:睾丸指数=睾丸重(g)/体重(g)×100%,附睾指数=附睾重(g)/体重(g)×100%。

**1.3.2 精子活力** 在 1.5 mL EP 管中加入 1 mL PBS 预热,将分离出的一侧附睾在含有预热的 PBS 玻璃培养皿中除去多余的脂肪,剪去附睾头,将附睾尾置于 EP 管中,用眼科剪充分剪碎,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 30 min,使精子充分游出,获得精子悬液。将载玻片和盖玻片置于 37 °C 载物台上预热,用微量移液枪取 10 μL 精子悬液,滴于载玻片上,加盖盖玻片,立即在显微镜下观察精子,利用计算机辅助精子分析 (computer-aided sperm analysis, CASA) (NatureGene, 美国) 检测精子密度,并分析精子活力。

**1.3.3 睾丸组织抗氧化性能** 称取 60 mg 左右睾丸组织,加入适量生理盐水制备组织匀浆,离心取上清液测定相关指标。丙二醛 (MDA) 含量采用 TBA 法测定,总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性采用羟胺法测定,过氧化氢酶 (CAT) 活性采用钼酸铵法测定,谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性采用比色法测定,总抗氧化能力 (T-AOC) 采用 FRAP 法测定,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

**1.3.4 睾丸和附睾组织形态学观察** 取固定于多聚甲醛中的睾丸和附睾组织,经脱水、透明、透蜡等处理后进行包埋,切取 5 μm 厚度切片,进行 HE 染色,中性树脂封片后用显微镜观察并拍照,根据 Shen 等<sup>[17]</sup> 方法使用 ImageJ 软件测定生精小管的横截面积、直径和上皮厚度。

**1.3.5 附睾精子形态学观察和精子畸形率统计** 取 1.3.2 节中获得的精子悬液 10 μL,在载玻片上涂片,自然风干,用甲醇固定 10 min,干燥后用伊红染液染色 30 s,用流水轻轻冲洗,风干后用中性树脂封片,显微镜下观察并拍照。畸形率的计算公式:精子畸形率=畸形精子数/精子总数×100%。

**1.3.6 睾丸组织 RNA 提取和 Real-time PCR** 采用 Trizol 试剂 (诺唯赞生物科技有限公司) 从睾丸组织匀浆中提取总 RNA,使用分光光度法 (NanoDrop 2000) 测定 RNA 浓度及纯度,将 RNA 浓度调至 500 ng·μL<sup>-1</sup> 后使用试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,采用荧光定量 PCR 试剂盒 (北京擎科新叶生物技术股份有限公司) 进行荧光定量 PCR。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

基因 Gene	登录号 GenBank No.	引物对序列 Primer pairs sequence (5' → 3')	产物大小/bp Product size
<i>nrf2</i>	NM_010902.5	ACAGTGCTCCTATGCGTGAA/GAGCCTCTAAGCGGCTTGAA	120
<i>ho-1</i>	NM_010442.2	GCCACCAAGGAGGTACACAT/CTTCCAGGGCCGTGTAGATA	130
<i>nqo1</i>	NM_008706.5	AGCGTTCGGTATTACGATCC/AGTACAATCAGGGCTCTTCTCG	68
<i>gclc</i>	NM_010295.2	ACATCTACCACGCAGTCAAGGACC/CTCAAGAACATCGCCTCCATTAC	134
<i>sod1</i>	NM_011434.2	GGAACCACTCACTTCGAGCA/CTGCACTGGTACAGCCTTGT	136
<i>gpx1</i>	NM_001329528.1	AGGAGAATGGCAAGAATGAAGAGA/GGAAGGTAAGAGCGGGTGAG	135
<i>bax</i>	NM_007527.3	GAGCTGCAGAGGATGATTGCT/TGATCAGCTCGGGCACTTTA	178
<i>bcl-2</i>	NM_009741.5	ATGCCTTTGGAAGTATATGGC/GGTATGCACCCAGAGTGATGC	120
<i>stra8</i>	NM_009292.2	ACAACCTAAGGAAGGCAGTTTAC/GACCTCCTTAAGCTGTTGGG	173
<i>plzf</i>	XM_036154892.1	TCAATGCGGTGCCAGTTCTCA/AGTGCCTTTGTGCTGAAAGC	123
<i>syce3</i>	NM_011517.2	GGGGCCGACTGTATTTACT/AGGCTGATCAACCAAAGGTG	169
<i>c-kit</i>	NM_021099.3	CACTCACGGGCGATCACAAA/CCACTTCACGGGCAGTCTGTC	106
<i>occludin</i>	NM_001360538.1	CTATGGGACAGGGCTCTTTGGA/AGGAAGCGATGAAGCAGAAGCC	176
<i>zo-1</i>	XM_047432991.1	TGGGAACAGCACACAGTGAC/GCTGGCCCTCTTTTAAACAC	140
<i>n-cadherin</i>	NM_001792.5	TTGCTTCAGGGCTCTGTGGAG/TTGCTGCACATCCTTCGGTAA	102
<i>connexin 43</i>	NM_000165.5	GACTTCAGCCTCCAAGGAGTT/GTGTACAGCGAAAGGCAGAC	243
<i>β-actin</i>	NM_007393.5	CAGCCTTCCTCTGGGTAT/TGGCATAGAGGCTTTACGG	100

注:*nrf2*:核相关 E2 相关因子 2 基因 Nuclear factor erythroid-2 related factor 2 gene;*ho-1*:血红素加氧酶 1 基因 Heme oxygenase-1 gene;*nqo1*:NAD(P)H 醌脱氢酶 1 基因 NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 gene;*gclc*:谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基基因 Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene;*sod1*:超氧化物歧化酶 1 基因 Superoxide dismutase 1 gene;*gpx1*:谷胱甘肽过氧化物酶 1 基因 Glutathione peroxidase 1 gene;*bax*:Bcl2 相关 X 蛋白基因 Bcl-2-associated X protein gene;*bcl-2*:B 细胞淋巴瘤因子 2 基因 B-cell lymphoma 2 gene;*stra8*:视黄酸激活基因 8 Stimulated by retinoic acid gene 8;*plzf*:早幼粒细胞白血病锌指蛋白基因 Zinc finger and BTB domain containing 16 gene;*syce3*:联合复合体蛋白 3 基因 Synaptonemal complex protein 3 gene;*c-kit*:跨膜酪氨酸激酶受体蛋白基因 Kit proto-oncogene receptor tyrosine kinase gene;*occludin*:闭合蛋白基因 Occludin gene;*zo-1*:紧密连接蛋白 1 基因 Tight junction protein 1 gene;*n-cadherin*:钙黏蛋白 2 基因 Cadherin 2 gene;*connexin 43*:间隙连接蛋白 1 基因 Gap junction protein alpha 1 gene;*β-actin*:β-肌动蛋白基因 β-actin gene.

#### 1.4 数据处理与统计分析

试验数据使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 用 Duncan's 检验进行差异显著性分析。试验结果均以平均值±标准误表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 热应激前后小鼠直肠温度变化

如表 2 所示,热应激前 4 个组小鼠直肠温度之间没有显著差异,热应激后 3 个热应激组的直肠温度与 CON 组相比均显著升高 ( $P < 0.05$ );除 CON 组外的 3 个组热应激后的直肠温度与处理前相比也都显著升高 ( $P < 0.05$ ),说明本试验中热应激能使小鼠直肠温度显著升高。

表 2 最后一次热应激前后小鼠直肠温度

Table 2 Rectal temperature before and after the last heat stress

项目 Item	分组 Groups				P 值
	CON	HTRA <sub>0</sub>	HTRA <sub>5</sub>	HTRA <sub>10</sub>	P-value
热应激前直肠温度/℃ Rectal temperature before heat stress	34.86±0.19	35.26±0.19	35.46±0.27	34.87±0.11	0.073
热应激后直肠温度/℃ Rectal temperature after heat stress	35.00±0.14 <sup>a</sup>	36.54±0.34 <sup>b</sup>	36.45±0.31 <sup>b</sup>	36.91±0.24 <sup>b</sup>	<0.001
ΔT/℃	0.18±0.18 <sup>c</sup>	1.28±0.38 <sup>b</sup>	0.98±0.31 <sup>b</sup>	2.04±0.16 <sup>a</sup>	<0.001

注:1)CON:对照组 Control group;HTRA<sub>0</sub>:热应激组 Heat treatment group;HTRA<sub>5</sub>:5 mg·kg<sup>-1</sup> 维甲酸处理组 5 mg·kg<sup>-1</sup> retinoic acid treatment group;HTRA<sub>10</sub>:10 mg·kg<sup>-1</sup> 维甲酸处理组 10 mg·kg<sup>-1</sup> retinoic acid treatment group.下同 The same as follows.  
2)ΔT:热应激后直肠温度减去热应激前直肠温度。Rectal temperature after heat stress minus rectal temperature after heat stress.  
3)同行不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。The different lowercases in a row indicate significant differences ( $P < 0.05$ )。)

### 2.2 热应激前后睾丸重、睾丸指数和睾丸直径变化

如表 3 所示,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠的睾丸重与 CON 组相比显著降低 ( $P < 0.05$ ),维甲酸处理后得到提高,其中 HTRA<sub>10</sub> 组与 CON 组相比无显著差异。睾丸指数与睾丸重也是相同的趋势,但是组间差异不显著。不同组之间睾丸最大直径没有显著差异,但与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组睾丸最小直径显著降低 ( $P < 0.05$ );与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸最小直径增加,且与 CON 组相比没有显著差异。

表 3 维甲酸对热应激小鼠睾丸重、指数和直径的影响

Table 3 Effects of retinoic acid on testicular weight, index and diameter in heat-stressed mice

项目 Item	分组 Groups				P 值
	CON	HTRA <sub>0</sub>	HTRA <sub>5</sub>	HTRA <sub>10</sub>	P-value
睾丸重/g Testicular weight	0.24±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>b</sup>	0.20±0.02 <sup>b</sup>	0.21±0.01 <sup>ab</sup>	0.039
睾丸指数/% Testicular index	0.64±0.03	0.53±0.03	0.60±0.05	0.65±0.04	0.195
睾丸最大直径/mm Diameter maximum	7.82±0.15	7.38±0.14	7.61±0.20	7.37±0.10	0.117
睾丸最小直径/mm Diameter minimum	5.40±0.08 <sup>a</sup>	5.01±0.16 <sup>b</sup>	4.93±0.09 <sup>b</sup>	5.09±0.11 <sup>ab</sup>	0.023

### 2.3 热应激前后睾丸组织形态变化

如图 1 所示,CON 组小鼠睾丸组织生精小管形态正常,各级生精细胞排列整齐,管腔内可见成熟精

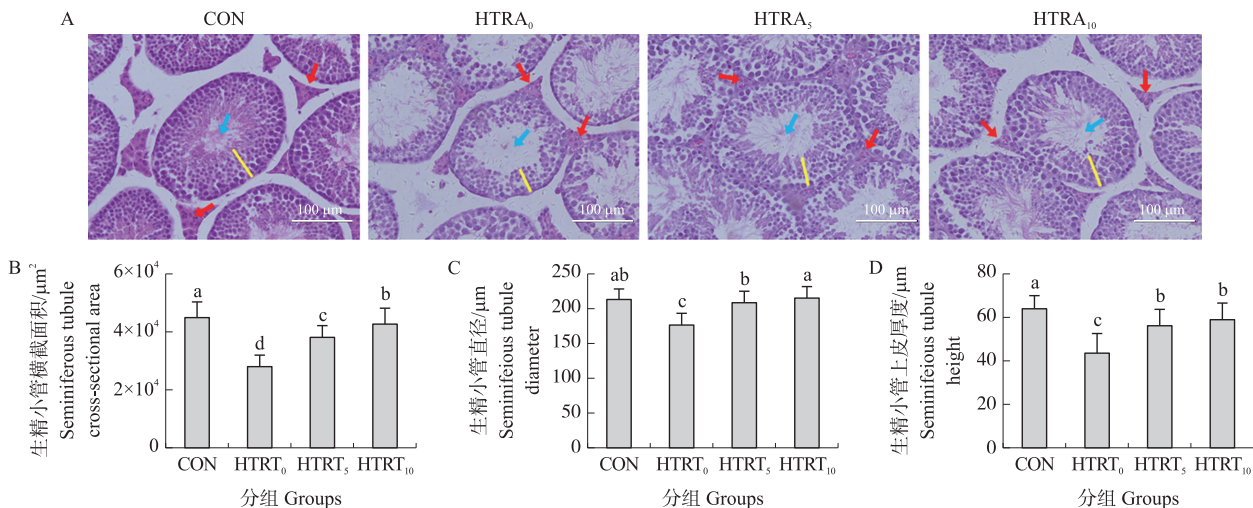


图 1 维甲酸对热应激小鼠睾丸组织形态的影响

Fig. 1 Effect of retinoic acid on testicular morphology in heat-stressed mice

A. 小鼠睾丸组织 HE 染色(红色箭头指示睾丸间质细胞,蓝色箭头指示生精小管管腔,黄色线段指示生精上皮);B、C、D. 生精小管横截面积、直径和上皮厚度。

A. HE stained of mouse testicular tissue (red arrows indicate testicular interstitial cells, blue arrows indicate the lumen of spermatogenic tubules, and yellow lines indicate spermatogenic epithelium); B, C, D. Cross sectional area, diameter, and height of mouse seminiferous tubule.

子。HTRA<sub>0</sub> 组小鼠睾丸生精小管各级生精细胞数量减少,排列紊乱,管腔变大,管腔内成熟精子数量明显减少。维甲酸处理组有所改善,形态更接近 CON 组小鼠。

对睾丸组织变化进一步量化发现,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠睾丸生精小管的横截面积、直径和生精小管上皮厚度都显著降低( $P<0.05$ );与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>5</sub> 组和 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸生精小管横截面积、直径和生精小管上皮厚度显著增加( $P<0.05$ ),更接近 CON 组,其中生精小管直径和 CON 组相比无显著差异。

#### 2.4 热应激前后附睾组织形态、附睾精子密度和畸形率变化

由图 2 可知,与 CON 组相比,HTRA<sub>5</sub> 组和 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠附睾重显著降低( $P<0.05$ ),但是不同组之间附睾指数无显著差异。CON 组小鼠附睾管腔内可见大量成熟精子,HTRA<sub>0</sub> 组管腔内精子减少,维甲酸处理后有所改善,更接近 CON 组。对附睾精子密度统计发现,维甲酸和热应激对小鼠附睾精子密度没有产生显著影响,但与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组密度略低,维甲酸处理后有升高的趋势。对小鼠附睾精子进一步分析发现,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠附睾精子畸形率显著升高( $P<0.05$ );与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>5</sub> 组和 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠附睾精子畸形率显著降低( $P<0.05$ )。

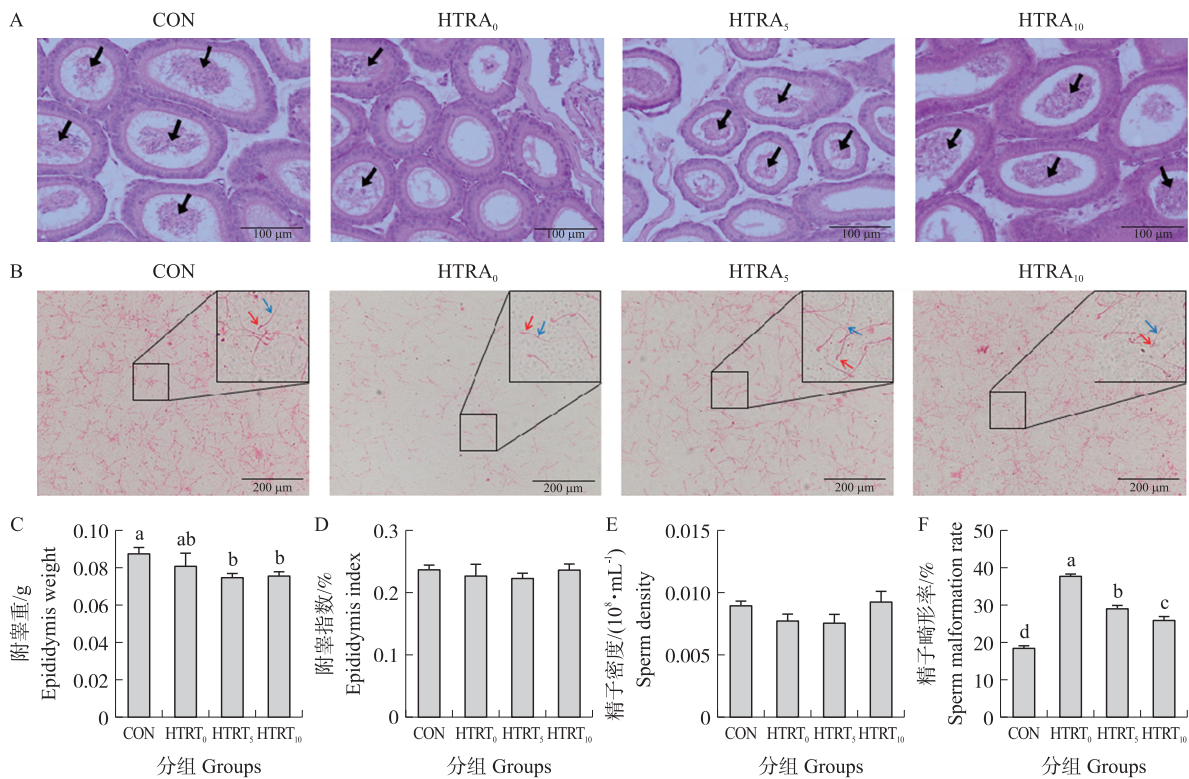


图 2 维甲酸对热应激小鼠附睾、附睾精子密度和畸形率的影响

Fig. 2 Effects of retinoic acid on epididymal, epididymal sperm density and malformation rate in heat-stressed mice

A. 小鼠附睾组织 HE 染色(黑色箭头指示附睾管腔内的精子);B. 附睾精子伊红染色(红色箭头指示精子头部,蓝色箭头指示精子尾部,方框表示局部放大);C—F. 附睾重、附睾指数、精子密度和精子畸形率。

A. HE stained of mouse epididymal tissue(black arrows indicate sperm in the epididymal lumen);B. Eosin stained of mouse epididymal sperm(red arrows indicate the head of the sperm,blue arrows indicate the tail of the sperm,box represents local magnification);C—F. Weight, index of epididymis,density and malformation rate of sperm.

#### 2.5 热应激前后附睾精子活力变化

如图 3 所示,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠精子的总活力显著降低( $P<0.05$ ),前进运动、快速运动精子比例显著下降( $P<0.05$ ),不运动比例显著增加( $P<0.05$ )。维甲酸处理后得到改善,其中 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠精子的总活力、前进运动、快速运动及不运动精子的比例与 CON 组相比都没有显著差异。

#### 2.6 热应激前后睾丸抗氧化性能变化

如表 4 所示,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠睾丸 MDA 含量显著升高( $P<0.05$ ),T-SOD 活性显著降低( $P<0.05$ );与 HTRA<sub>0</sub> 组小鼠相比,HTRA<sub>5</sub> 组和 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 MDA 含量显著降低( $P<0.05$ ),T-SOD 活性显著升高( $P<0.05$ ),与 CON 相比无显著差异。不同组间 T-AOC 和 CAT 活性、GSH-PX 活性无显著差异。

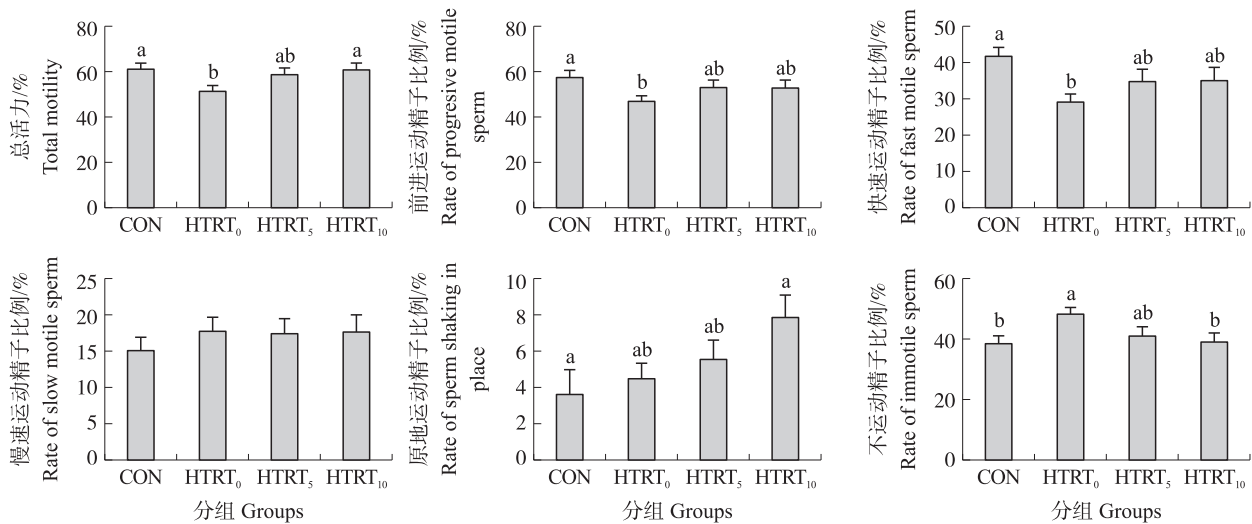


图 3 维甲酸对热应激小鼠附睾精子活力的影响

Fig. 3 Effect of retinoic acid on epididymal sperm motility in heat-stressed mice

表 4 维甲酸对热应激小鼠睾丸抗氧化性能指标的影响

Table 4 Effect of retinoic acid on the antioxidant activity in the testes of heat-stressed mice

项目 Item	分组 Groups				P 值 P-value
	CON	HTRA <sub>0</sub>	HTRA <sub>5</sub>	HTRA <sub>10</sub>	
MDA content/(nmol·mg <sup>-1</sup> )	0.72±0.05 <sup>b</sup>	1.20±0.14 <sup>a</sup>	0.85±0.10 <sup>b</sup>	0.87±0.04 <sup>b</sup>	0.002
T-SOD activity/(U·mg <sup>-1</sup> )	981.06±16.80 <sup>a</sup>	811.14±24.67 <sup>b</sup>	931.24±64.22 <sup>a</sup>	930.88±14.97 <sup>a</sup>	0.000
T-AOC/(nmol·mg <sup>-1</sup> )	172.15±10.58	164.84±11.99	176.55±4.96	172.87±10.54	0.925
CAT activity/(U·mg <sup>-1</sup> )	7.75±1.18	5.76±0.72	6.44±0.38	7.03±0.77	0.372
GSH-PX activity/(U·mg <sup>-1</sup> )	612.16±21.21	658.61±38.05	621.81±52.56	612.74±36.22	0.802

注:MDA;丙二醛 Malondialdehyde;T-SOD;总超氧化物歧化酶 Total superoxide dismutase;T-AOC;总抗氧化能力 Total antioxidant capacity;CAT;过氧化氢酶 Catalase;GSH-PX;谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase.

2.7 热应激前后睾丸抗氧化相关基因表达差异

如图 4 所示,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠睾丸 *nrf2*、*ho-1*、*nqo1*、*sod1* 和 *gpx1* mRNA 相对表达量都显著升高( $P < 0.05$ )。与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>5</sub> 组和 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 *nrf2*、*ho-1*、*gclc*、*sod1* 和 *gpx1* 表达量均无显著差异,但 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 *ho-1*、*gclc* 和 *sod1* 表达量有降低趋势,且 *gclc* 和 *sod1* 与 CON 组相比均无显著差异。HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 *nqo1* 基因表达量显著低于 HTRA<sub>0</sub> 组( $P < 0.05$ ),且与 CON 组无显著差异。

2.8 热应激前后睾丸增殖和凋亡相关基因表达差异

如图 5 所示,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组 *bax* 基因相对表达量显著升高( $P < 0.05$ ),*bcl-2* 表达量升高,但

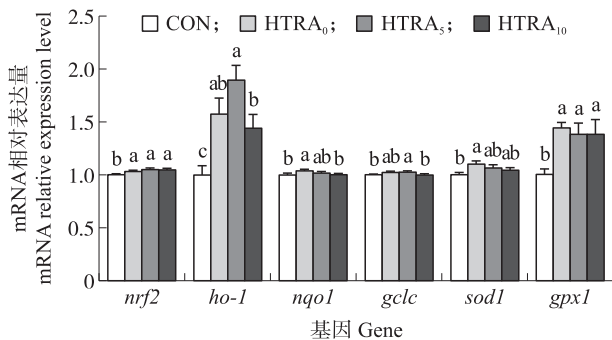


图 4 维甲酸对热应激小鼠睾丸抗氧化相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of retinoic acid on the expression of antioxidant-related genes in the testes of heat-stressed mice

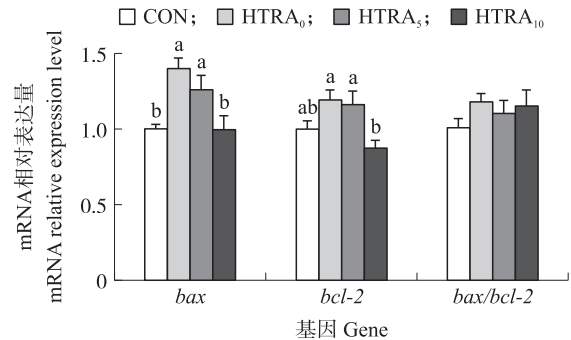


图 5 维甲酸对热应激小鼠睾丸增殖凋亡相关基因表达的影响

Fig. 5 Effect of retinoic acid on the expression of genes related to proliferation and apoptosis in the testes of heat-stressed mice

差异不显著;与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>10</sub> 组 *bax* 基因相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ),与 CON 组差异不显著,HTRA<sub>10</sub> 组 *bcl-2* 与 HTRA<sub>0</sub> 组相比显著降低 ( $P < 0.05$ ) 且与 CON 组差异不显著。不同组别之间 *bax* 与 *bcl-2* 基因表达量比值差异不显著。

## 2.9 热应激前后睾丸血睾屏障相关基因表达差异

如图 6 所示,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠睾丸 *occludin*、*zo-1*、*n-cadherin* 和 *connexin 43* mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>5</sub> 组小鼠睾丸 *occludin*、*zo-1*、*n-cadherin* 和 *connexin 43* mRNA 表达量无显著差异,HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 *zo-1*、*n-cadherin* mRNA 表达量显著降低 ( $P < 0.05$ )。HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 *zo-1*、*n-cadherin* 和 *connexin 43* mRNA 表达量与 CON 组相比无显著差异。

## 2.10 热应激前后睾丸精子发生相关基因表达差异

如图 7 所示,与 CON 组相比,HTRA<sub>0</sub> 组小鼠睾丸 *plzf* 和 *c-kit* mRNA 表达量都显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 HTRA<sub>0</sub> 组相比,HTRA<sub>5</sub> 组和 HTRA<sub>10</sub> 组小鼠睾丸 *plzf* 和 *c-kit* mRNA 表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ),且 *c-kit* 与对照组相比无显著差异。不同组间 *stra8* 和 *sycp3* 基因的表达量无显著差异。

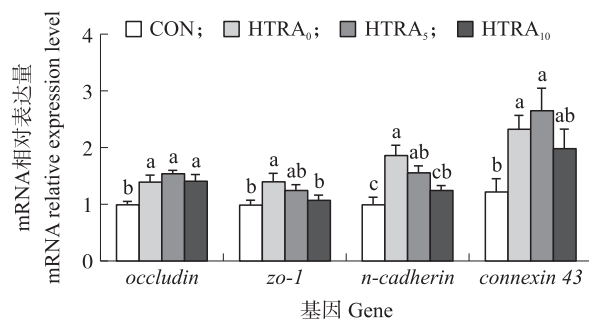


图 6 维甲酸对热应激小鼠睾丸血睾屏障相关基因表达的影响

Fig. 6 Effect of retinoic acid on the expression of genes related to the blood-testis barrier in the testes of heat-stressed mice

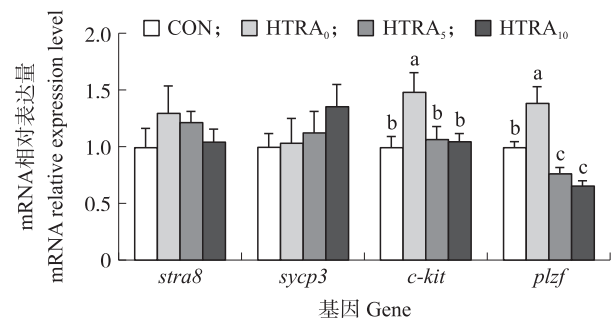


图 7 维甲酸对热应激小鼠睾丸精子发生相关基因表达的影响

Fig. 7 Effect of retinoic acid on the expression of genes related to spermatogenesis in the testes of heat-stressed mice

## 3 讨论

### 3.1 维甲酸对热应激小鼠睾丸重、直径及组织形态的影响

当动物所处的温度超过其生理范围和调节能力时,就会发生热应激;尽管热应激通常会影机体的各种功能,但生殖是最容易受到热应激损害的过程<sup>[16]</sup>。Lin 等<sup>[18]</sup>研究表明,将雄性小鼠身体的后三分之一给予 43 °C 水浴热处理 15 min 后,小鼠睾丸指数显著降低,生精小管损伤严重,变性、空泡化严重,管腔变大,生精细胞脱落萎缩,睾丸形态异常。刘慧娟等<sup>[19]</sup>给予小鼠全身热应激后,小鼠睾丸生精小管的横截面积和生精小管直径显著降低。本试验结果也表明热应激使小鼠睾丸组织受到损伤。Zhou 等<sup>[20]</sup>试验中腹腔注射维甲酸能显著提高隐睾小鼠的睾丸重和睾丸体积,改善隐睾小鼠睾丸组织形态,提高小鼠附睾精子密度、降低精子畸形率。本试验结果提示维甲酸能改善热应激小鼠睾丸形态,这可能与维甲酸能缓解氧化应激,改善生精微环境有关<sup>[15,18,21]</sup>。

### 3.2 维甲酸对热应激小鼠附睾和附睾精子的影响

生精细胞对温度变化极为敏感,对温度有严格的要求,其中睾丸温度调节发挥着非常重要的作用。尽管是在小范围内的阴囊温度升高,也可能对精子质量产生负面影响<sup>[22]</sup>。Yaeram 等<sup>[5]</sup>试验结果表明,将雌性小鼠连续 2 d 全身暴露在 36 °C 的温度下 12 h 后,精子数量减少,睾丸重降低,精子在体内的受精能力较差,附睾精子与透明带的结合能力和卵细胞穿透能力降低。在另一项研究中,将小鼠连续 3 d 全身暴露于高温 8 h 后其附睾尾部精子数量无显著变化,但活力较低,此外这些附睾精子还表现出膜性变化,使其更容易发生凋亡<sup>[23]</sup>。与之相似,本试验发现,连续 7 d 给予小鼠全身 42 °C 热处理 2 h 后精子密度没有显著变化,但是精子活力显著下降,运动性能显著降低。彭金普<sup>[24]</sup>通过给隐睾大鼠注射维甲酸发现,维甲酸显著提高了隐睾大鼠的附睾精子数量,降低附睾精子畸形率,提高隐睾大鼠的生殖功能,可能是因为维甲酸与精子的形成与释放有关。本试验结果也表明维甲酸可改善热应激小鼠精子活力。

### 3.3 维甲酸对热应激小鼠睾丸抗氧化功能的影响

一般来说,热应激导致的生精细胞凋亡和精子活力下降是由氧化应激和细胞凋亡引起的<sup>[25-26]</sup>。Lin等<sup>[18]</sup>研究表明,给予小鼠睾丸43℃热应激15 min后,睾丸MDA含量显著升高,睾丸中SOD活性显著降低。本研究结果与之一致,表明热应激组小鼠睾丸组织的抗氧化系统已经受到损害。睾丸组织中过多的氧自由基导致了睾丸生精细胞的发育改变和精子生长迟缓。维甲酸具有很强的抗氧化活性和抗氧化作用<sup>[15,27]</sup>。本试验中两种剂量的维甲酸都能显著提高小鼠睾丸组织的SOD活性,降低热应激所造成的MDA水平升高。这表明维甲酸能有效地清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应,减轻热处理对生精细胞的损伤。且在2个剂量的处理中,10 mg·kg<sup>-1</sup>的处理效果更好。

Nrf2作为主要的内源性抗氧化防御系统,在防止睾丸氧化损伤方面起着至关重要的作用。在亲电或氧化应激时,Nrf2被激活并转录诱导一系列抗氧化防御酶,例如CAT、NQO1、HO-1和谷胱甘肽S-转移酶等<sup>[28]</sup>。这些依赖Nrf2的抗氧化剂的上调能促进机体的抗氧化、解毒和抗炎反应。本研究结果表明热应激激活了小鼠睾丸组织的Nrf2通路,启动下游基因的转录,增加睾丸抗氧化能力,减少氧化损伤。与Li等<sup>[16]</sup>研究中给予小鼠全身热应激(42℃,2 h,12 d)后小鼠睾丸*nrf2*、*gclc*、*ho-1*和*nqo1* mRNA表达上调结果一致。灌胃维甲酸后,这些基因表达下调,更接近对照组水平,推测维甲酸能够缓解睾丸组织的氧化应激水平,增强睾丸组织的抗氧化能力,保护睾丸组织免受热应激带来的氧化应激损伤。

### 3.4 维甲酸对热应激小鼠睾丸增殖凋亡基因表达的影响

细胞凋亡的过程需要许多不同的细胞蛋白,例如Bcl-2家族成员。Bcl-2蛋白家族包含促凋亡Bax和抗凋亡Bcl-2成员。Xi等<sup>[29]</sup>结果表明,给予成年公猪局部睾丸加热(42℃,1 h)后*bax*和*bcl-2*的mRNA和蛋白水平升高,导致生精细胞凋亡增加。与之相似,本试验中给予小鼠全身热处理7 d后小鼠睾丸组织中*bax*基因表达量显著升高,灌胃10 mg·kg<sup>-1</sup>维甲酸能显著降低热应激小鼠*bax*和*bcl-2* mRNA表达量,说明维甲酸对热应激导致的小鼠睾丸组织细胞凋亡有改善作用。

### 3.5 维甲酸对热应激小鼠睾丸血睾屏障基因表达的影响

由几种类型的细胞连接形成的BTB可以维持精子生成<sup>[30]</sup>。BTB通过在生精小管的支持细胞之间形成选择性屏障,将睾丸与循环系统隔离,并维持适宜的生精微环境,能够使精子持续产生<sup>[31]</sup>。维持紧密连接功能所必需的蛋白质包括Occludin、Zonula occludens(ZO-1)和N-cadherin。Connexin 43是一种缝隙连接标志物,是正常睾丸发育和精子形成所必需的,并具有调节BTB形成的功能。胡素琴等<sup>[32]</sup>研究表明,给予大鼠43℃恒温水浴20 min后,大鼠睾丸中ZO-1、Occludin蛋白表达显著降低,睾丸屏障受损。因此在本研究中对编码这些关键蛋白质的基因表达进行了评估。本试验结果显示,热处理后小鼠睾丸组织中*occludin*、*zo-1*、*n-cadherin*和*connexin 43* mRNA的表达量显著升高。这种结果产生的原因可能是长时间的热处理导致血睾屏障受到损伤,所以需要更多地表达来对这种损伤进行紧急补救。而添加维甲酸后这些基因表达量较热应激组相比降低,其中10 mg·kg<sup>-1</sup>维甲酸组显著降低且与对照组相比没有显著差异,提示维甲酸可能通过维持紧密连接和缝隙连接蛋白的功能来调节BTB的完整性,改善生精微环境,进而改善精子活力。

### 3.6 维甲酸对热应激小鼠睾丸精子发生基因表达的影响

精子发生是一个复杂的动态变化过程,包括精原细胞增殖分化、减数分裂和精子形成三个阶段。在这个过程中,不同时间段受到不同因子的调控<sup>[4]</sup>。其中C-kit、PLZF对生精细胞的增殖分化不可或缺,Stras8、Sycp3与减数分裂密切相关,是减数分裂标志。C-kit表达于分化的精原细胞,可以作为精原细胞分化的标志物,表明了精原细胞分化程度<sup>[33]</sup>;PLZF作为一种精原细胞特异性转录因子,可能在调节干细胞的自我更新和维持分化过程中发挥核心作用<sup>[34]</sup>,是精原细胞和精母细胞增殖相关的重要生物标志物。彭金普<sup>[24]</sup>研究表明,维甲酸能上调隐睾大鼠生精细胞增殖分化及减数分裂相关蛋白和基因的表达,提示维甲酸能促进隐睾大鼠的生精细胞增殖分化和减数分裂。在本试验中,热应激后小鼠睾丸内*c-kit* mRNA表达上调,而维甲酸处理后其表达下调接近对照组小鼠睾丸,可能是热应激导致精母细胞分化受阻,而维甲酸维持了精原细胞分化。热应激组小鼠睾丸*plzf*基因表达水平的增加也表明热应激组小鼠睾丸精原细胞和精母细胞的增殖出现异常,维甲酸处理后表达下调,说明维甲酸可能对热应激小鼠精原细胞的分化和增殖产生积极影响,以维持正常精子发生过程。

综上所述,本试验采用小鼠全身热应激模型测定了维甲酸对热应激小鼠睾丸组织损伤的影响,结果表

明:维甲酸能够改善热应激小鼠的睾丸重、睾丸组织形态和附睾精子活力,使之更接近对照组水平;这种保护作用可能是通过增加小鼠睾丸抗氧化能力,减少生精细胞凋亡,增强血睾屏障,改善生精微环境,维持精子发生实现的。在本试验中,10 mg·kg<sup>-1</sup>的维甲酸处理效果更好。

#### 参考文献 References:

- [1] Bozaykut P, Karademir B, Yazgan B, et al. Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014, 70: 174–181.
- [2] Hansen P J. Effects of heat stress on mammalian reproduction[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2009, 364(1534): 3341–3350.
- [3] Zhu B, Walker S K, Oakey H, et al. Effect of paternal heat stress on the development *in vitro* of preimplantation embryos in the mouse[J]. *Andrologia*, 2004, 36(6): 384–394.
- [4] du Plessis S S, Agarwal A, Sabanegh E S, Jr. *Male Infertility*[M]. New York: Springer Press, 2014: 105–125.
- [5] Yaeram J, Setchell B P, Maddocks S. Effect of heat stress on the fertility of male mice *in vivo* and *in vitro*[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2006, 18(6): 647–653.
- [6] Cunningham T J, Duester G. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(2): 110–123.
- [7] 陈图锋, 华赟鹏, 黄婵燕, 等. 全反式维甲酸在小肠缺血再灌注中的炎症抑制效应及机制[J]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2013, 7(4): 278–283.  
Chen T F, Hua Y P, Huang C Y, et al. All trans Retinoic Acid contributes to the reduction of inflammation in intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. *Chinese Archives of General Surgery(Electronic Edition)*, 2013, 7(4): 278–283 (in Chinese with English abstract).
- [8] 陈图锋, 黄婵燕, 戴珍桦, 等. 全反式维甲酸在肠道缺血再灌注中的抗氧化作用[J]. *中华消化外科杂志*, 2013, 12(11): 867–872.  
Chen T F, Huang C Y, Dai Z H, et al. Antioxidative effects of all-trans retinoic acid on the intestinal ischemia reperfusion[J]. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, 2013, 12(11): 867–872 (in Chinese with English abstract).
- [9] 胡艺. 硫链丝菌素协同全反式维甲酸抑制 HepG2 肝癌细胞增殖和转移[D]. 长沙: 湖南大学, 2019.  
Hu Y. Thioestrepton enhances the inhibitory effects of atra in Hepg2 hepatocellular carcinoma cells [D]. Changsha: Hunan University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [10] 周添标, 钟红珍, 钟志青, 等. 全反式维甲酸对大鼠肾间质纤维化的延缓作用及其可能分子机制[J]. *广西医学*, 2020, 42(7): 830–834.  
Zhou T B, Zhong H Z, Zhong Z Q, et al. Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on progression of renal interstitial fibrosis in rats and its possible molecular mechanism[J]. *Guangxi Medical Journal*, 2020, 42(7): 830–834 (in Chinese with English abstract).
- [11] Chung S S W, Wolgemuth D J. Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2004, 105(2/3/4): 189–202.
- [12] Wolgemuth D J, Chung S S W. Retinoid signaling during spermatogenesis as revealed by genetic and metabolic manipulations of retinoic acid receptor alpha[J]. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 2007, 63: 11–23.
- [13] Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development[J]. *Nutrients*, 2011, 3(4): 385–428.
- [14] Raverdeau M, Gely-Pernet A, F eret B, et al. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(41): 16582–16587.
- [15] Malivindi R, Rago V, De Rose D, et al. Influence of all-trans retinoic acid on sperm metabolism and oxidative stress: its involvement in the physiopathology of varicocele-associated male infertility[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(12): 9526–9537.
- [16] Li Y S, Huang Y, Piao Y G, et al. Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, 11: 23.
- [17] Shen J K, Perveen A, Kaka N, et al. Maternal exposure to T-2 toxin induces changes in antioxidant system and testosterone synthesis in the testes of mice offspring[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2019, 10(1): 74.
- [18] Lin C M, Choi Y S, Park S G, et al. Enhanced protective effects of combined treatment with  $\beta$ -carotene and curcumin against hyperthermic spermatogenic disorders in mice[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 2572073.
- [19] 刘慧娟, 庄苏, 张佳琦, 等. 日粮添加不同水平芦丁对热应激小鼠睾丸组织的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(8): 2586–2597.  
Liu H J, Zhuang S, Zhang J Q, et al. Effects of dietary supplementation of different levels of rutin on testicular tissue in mice under heat stress[J]. *Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*, 2022, 53(8): 2586–2597 (in Chinese with English abstract).
- [20] Zhou Y, Zhang D Y, Hu D, et al. Retinoic acid: a potential therapeutic agent for cryptorchidism infertility based on investigation of flutamide-induced cryptorchid rats *in vivo* and *in vitro*[J]. *Reproductive Toxicology*, 2019, 87: 108–117.
- [21] Perrotta I, Perri M, Santoro M, et al. Expression and subcellular localization of retinoic acid receptor- $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) in healthy and varicocele human spermatozoa: its possible regulatory role in capacitation and survival[J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 2015, 23(5): 374–381.
- [22] Hjollund N H, Bonde J P, Jensen T K, et al. Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The danish first pregnancy planner study team[J]. *International Journal of Andrology*, 2000, 23(5): 309–318.

- [23] Wechalekar H, Setchell B P, Peiree E J, et al. Whole-body heat exposure induces membrane changes in spermatozoa from the cauda epididymidis of laboratory mice[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2010, 12(4): 591-598.
- [24] 彭金普. 视黄酸促隐睾大鼠生精功能修复的作用及机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2016.  
Peng J P. Retinoic acid enhances recovery of spermatogenesis in cryptorchidism rats model[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [25] Setchell B P. The effects of heat on the testes of mammals[J]. *Animal Reproduction*, 2018, 3(2): 81-91.
- [26] Mahfouz R Z, du Plessis S S, Aziz N, et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress[J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(3): 814-821.
- [27] 钟久昌, 黄东阳, 金海燕, 等. 全反式维甲酸对高血压大鼠心脏氧化应激水平的影响[J]. *心血管康复医学杂志*, 2007, 16(2): 111-114.  
Zhong J C, Huang D Y, Jin H Y, et al. Effects of all-trans retinoic acid on cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Rehabilitation Medicine*, 2007, 16(2): 111-114 (in Chinese with English abstract).
- [28] Niture S K, Kaspar J W, Shen J, et al. Nrf2 signaling and cell survival[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 244(1): 37-42.
- [29] Xi H, Fan X, Zhang Z, et al. Bax and *Bcl-2* are involved in the apoptosis induced by local testicular heating in the boar testis[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2017, 52(3): 359-365.
- [30] Kopera I A, Bilinska B, Cheng C Y, et al. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2010, 365(1546): 1593-1605.
- [31] Xu Y, Wu W X, Fan Y X, et al. miR-142-3p inhibits TGF- $\beta$ 3-induced blood-testis barrier impairment by targeting lethal giant larvae homolog 2[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 46(1): 253-268.
- [32] 胡素芹, 胡珂, 刘殿龙, 等. 急性热应激对睾丸免疫微环境相关蛋白的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(5): 521-524, 530.  
Hu S Q, Hu K, Liu D L, et al. Effects of acute heat stress on related proteins of testicular immune microenvironment[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2022, 38(5): 521-524, 530 (in Chinese with English abstract).
- [33] 范睿, 张昱, 许家玉, 等. 小鼠脊髓挫伤型损伤后 *caspase-3*、*bax*、*bcl-2* 和 *c-kit* 基因的表达[J]. *南京农业大学学报*, 2010, 33(1): 87-93.  
DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2010.01.017.  
Fan R, Zhang Y, Xu J Y, et al. The expression of *caspase-3*, *bax*, *bcl-2* and *c-kit* after spinal cord injury in mouse[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33(1): 87-93 (in Chinese with English abstract).
- [34] Qin Q, Liu J R, Ma Y H, et al. Aberrant expressions of stem cell factor/c-KIT in rat testis with varicocele[J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2017, 116(7): 542-548.

责任编辑:周广礼 沈波