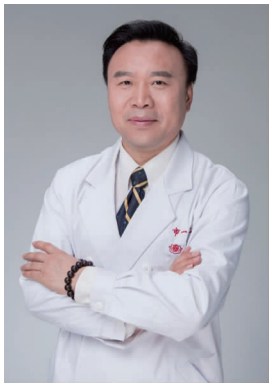
DOI:10.16016/j.2097-0927.202301076

“阻滞型”精子发生障碍的遗传学及其诊疗研究进展



李 铮[1,2],许俊伟[1] 200080 上海,上海交通大学医学院附属第一人民医院泌尿外科中心男科,男性健康评估中心,上海市生殖医学重点实验室[1];211166 南京,南京医科大学国家生殖医学重点实验室[2]

[摘要] 精子发生障碍(生精障碍)是男性不育中的疑难重症,临床发病率高,已成为严重影响我国人口生殖健康和人口安全的重大疾病。但由于生精障碍存在显著临床异质性和遗传异质性,目前尚无统一规范的临床诊疗策略与体系。本团队创新性地将生精障碍分为3种亚型:“局灶型”“阻滞型”以及“衰竭型”。其中“阻滞型”生精障碍主要由染色体异常、拷贝数变异、单核苷酸突变等遗传因素导致。本文着重评述“阻滞型”生精障碍的临床分型及遗传病因学研究现状,并结合全外显子测序等技术筛选“阻滞型”生精障碍患者,对“阻滞型”生精障碍的内分泌新辅助治疗、靶向治疗等前沿治疗方案以及结合人工智能的多元精准诊疗体系的建立进行探讨。

[关键词] 精子发生障碍;阻滞型;临床表型;遗传病因学;诊疗体系
[中图法分类号] R321.1;R698.2 [文献标志码] A

Genetic etiology and treatment of “arrested type” spermatogenic failure

LI Zheng[1,2], XU Junwei[1] [1]Department of Andrology, Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Center for Men's Health, Urologic Medical Center, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080; [2]State Key Laboratory of Reproductive Medicine, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu Province, 211166, China

[Abstract] Spermatogenic failure is a severe disease in male infertility, with high clinical incidence, and seriously affects the reproductive health and population security. However, due to its significant clinical heterogeneity and genetic heterogeneity, there is still no unified and standardized clinical treatment strategy

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFC2702701)

[通信作者] 李 铮,主任医师,教授,博士生导师。中国医师协会男科与性医学医师分会常务委员兼总干事长,中国医师协会生殖医学会专业委员会常委兼男科学副组长,上海医师协会男科医师分会副会长,上海市医师协会生殖医学医师分会副会长,亚洲男科学协会秘书长,中国人口与发展研究中心“适龄人群生育力评估及健康干预研究”项目专家委员会主任委员,国家卫健委辅助生殖技术评审专家,全国科学技术名词审定委员会生殖医学名词编写委员会委员,国家司法部司法鉴定标准制定(男性不育与男性性功能评估检测)专家,上海市科技专家库评审成员、美国生殖医学学会(ASRM/SMRU)会员,“十四五”国家科技部重点研发计划首席科学家。美国康奈尔大学、香港中文大学、加拿大渥太华大学访问学者。担任多种国内外男性生殖领域重要期刊如 *Asian Journal of Andrology* 等编委或特邀编辑。聚焦精子发生障碍机制与干细胞向精子诱导分化,国际上首次实现从患者睾丸中获取精原干细胞,体外诱导分化为精子细胞,并具有受精潜能;首次证明单精子冻融可安全用于临床,并出生健康子代。牵头主持“十四五”国家科技部重点研发计划1项,参与1项;主持国家自然科学基金面上项目2项、上海市科委项目2项、局级课题7项。累计主持参与国家级/省部级基金项目28项,以通信作者或第一作者在 *Nature Communications*、*The American Journal of Human Genetics*、*Stem Cell Report*、*Human Reproduction* 等SCI收录期刊发表论文56篇,在中文核心期刊发表论文46篇,主编主译教材共识等著作14部,申请授权发明专利9项,实用新型专利24项。作为第一完成人,荣获国家高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)科学技术进步奖二等奖、上海医学科技奖一等奖、上海科技进步奖二等奖、华夏医学科技奖三等奖各1项。学会任职期间荣获亚洲男科学协会杰出学术贡献奖、中华医学会泌尿外科分会男科专项奖伏羲奖。主要从事精子发生障碍机制与干细胞向精子诱导分化方面的研究。E-mail:lizhengboshi@sjtu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

currently. Our team has innovatively classified spermatogenic failure into 3 subtypes: "focal type", "arrested type" and "exhausted type". The "arrested type" spermatogenic failure is mainly caused by genetic factors such as chromosomal abnormalities, copy number variations, and single nucleotide mutations. In this paper, we review the phenotype and genetic etiology of "arrested type" spermatogenic failure, then screen the type of patients with the aid of whole-exome sequencing and other technologies, and provide frontier treatment options such as endocrine neoadjuvant therapy and targeted therapy for endocrine neoadjuvant therapy. What's more, we discuss the establishment of a multifaceted and precise diagnosis and treatment system combined with artificial intelligence.

[**Key words**] spermatogenic failure; arrested type; clinical phenotype; genetic etiology; treatment system

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2702701). Corresponding author: LI Zheng, E-mail: lizhengboshi@sjtu.edu.cn

我国生精障碍(spermatogenic failure)患者高达500万,其无法自然生育。即使依托辅助生殖技术,多数患者往往助孕失败,只有借助捐献者的精子生育子代。1985年,英国布里斯托大学HULL等[1]提出,生精障碍是一种严重的生育障碍临床疾病。1993年,WHO男性不育标准化检查与诊疗手册指出,生精障碍存在显著异质性[2],为了进行诊断分类,睾丸组织学类型可分为:①在生精小管(或部分)内可见到精子:在大部分(或部分)生精小管内可见各级生精细胞。②在生精小管内没有精子:无论是精子细胞水平、精母细胞水平,还是精原细胞水平发生的成熟阻滞,都称之为生精阻滞,在任何生精小管中均未见完整生精过程。一些血清FSH值增高的患者,病理示有唯支持细胞综合征或生精小管透明样变等,此时患者睾丸的部分生精小管中,仍有可能找到精子。在生精障碍的诊断和分型中,目前睾丸病理仍然是"金标准"[3],然而这个"金标准"并不能完全反映内在生精状态,主要是因为精子发生是一个动态变化的过程,且不同区域生精小管生精障碍呈显著异质性,目前尚无统一规范的临床诊疗策略与体系。

2018年,上海交通大学李铮团队[4]依托中国医师协会牵头制定生精障碍诊疗相关专家共识,提出生精障碍是生精细胞定向分化与增殖障碍导致的临床综合征,其发病由于生精细胞与生精微环境异常,其特征为睾丸生精小管精子发生障碍的异质性,临床表现为非梗阻性无精子症或严重少弱畸精子症(精子浓度小于500万/mL)。李铮团队基于9 615例生精障碍患者临床样本库及504例家系样本库,综合考虑患者的生精情况,从临床表型、发病原因、发病过程、治疗及预后5个维度创新性提出将生精障碍分为3种亚型(图1):①生精小管形态各异,多数小管无精子仅孤立小管有精子的"局灶型";②生精小管形态相近,生精细胞分化阻滞于精母细胞与精子细胞的"阻滞型";③生精小管破坏或萎缩,仅存支持细胞或偶见精原细胞的"衰竭型"。然而,针对这3种亚型,目前仍然缺乏翔实的分型标准与遗传病因学研究。本文旨在探讨"阻滞型"生精障碍分型标准的建立、遗传病因学以及诊疗研究进展。

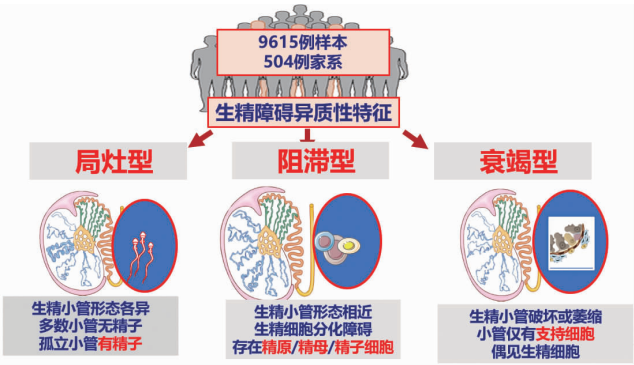


图1 生精障碍分型情况

1 "阻滞型"精子发生障碍分型的建立

1.1 临床分型现状与难点

临床表型是指疾病在患者身上所呈现出的症状、体征和其他临床特征,可以帮助医师判断疾病的种类、严重程度、预后以及治疗方案等。因此,临床表型是医师最直观的观察对象,也是诊断和治疗的基础。实验室检查如精液分析及性激素水平检查,包括FSH、LH、睾酮、抑制素B、AMH、雌二醇、催乳素等,帮助判断患者精子发生障碍的类型。体格检查重点关注睾丸的位置、体积、质地以及输精管有无异常。影像学检查用于排除梗阻性无精子症患者以及再次确认睾丸的位置及体积。目前临床上病理检查仍是"阻滞型"生精障碍

比较重要的诊断依据,通过观察睾丸活检或显微取精获得的睾丸组织,常用 Johnsen 评分评价其生精小管的精子发生情况[3]。Johnsen 评分对于预测取精结局有一定的帮助,但由于生精障碍的异质性,单一结果无法准确预测患者局部生精小管的精子发生情况。并且,"阻滞型"生精障碍患者体格检查及性激素检查均基本正常,常规精液检查及影像学检查也无法提供有力证据协助诊断。因此在初诊时,"阻滞型"患者常被误诊为梗阻性无精子症或特发性非梗阻性无精子症,直至术后取得病理标本才能得出明确诊断。这对于"阻滞型"患者的诊断以及治疗造成了很大困难。目前针对"阻滞型"患者的临床分型研究相对较少,缺乏规律总结以及有效的预测模型,诊断仍很大程度上依赖于医师个人。基于该重要临床问题,结合 9 615 例生精障碍患者临床样本库,本团队从临床表型、发病原因、发病过程、治疗及预后等维度明晰"阻滞型"生精障碍的分型标准。

1.2 "阻滞型"精子发生障碍的分型依据和标准

对于"阻滞型"生精障碍的患者,应从发病原因及发病过程角度思考其临床表型的形成原因,"阻滞型"生精障碍主要由于遗传变异导致生精细胞减数分裂停滞,无法形成正常精子。这些调控生精细胞的基因通常不会影响支持细胞、间质细胞及管周细胞等维持生精小管结构及微环境的关键组分。因此"阻滞型"生精障碍患者性激素由于受支持细胞、间质细胞调控基本正常,生精小管管腔结构稳定,粗细均一从而不会导致患者睾丸体积发生明显变化。

因此,从临床表型角度将"阻滞型"生精障碍患者分型标准定义为:"阻滞型"生精障碍患者病史排除腮腺炎睾丸炎、疝气手术史等既往能够导致无精子症的病因、体格检查睾丸体积 12~15 mL、性激素检查结果均处于参考值范围内、术中可见粗细均一的生精小管,术中镜检所获睾丸组织未见精子,可见较多生精细胞。术后病理学检查睾丸组织染色后未见精子,可见较多生精细胞,术后病理 Johnsen 评分 4~7 分。

1.3 "阻滞型"精子发生障碍临床数据库的建立

由此建立基于大样本"阻滞型"生精障碍患者临床数据库(集成门诊病史、电子病历、体格检查、实验室检查、影像学资料、病理图像和全外显子测序数据)的需求迫在眉睫。完成建立大样本数据库后可以借助人工智能技术进行机器学习,将自然语言处理转换为结构化数据,实现病理特征分析、语义特征提取以及深度学习结构,建立一套针对"阻滞型"生精障碍的诊断原型系统,建立"阻滞型"逻辑分析诊疗路径,实现"阻滞型"生精障碍精准分型的诊断,从而进一步指导临床诊疗工作。

2 "阻滞型"精子发生障碍的遗传病因学

2.1 "阻滞型"精子发生障碍遗传病因学研究现状

遗传病因学研究对于"阻滞型"生精障碍患者的诊断及治疗有着不可或缺的作用。生精障碍的病因学研究长时期受限于研究技术与病例规模的局限,一直停滞不前。而近些年随着全外显子测序技术应用普及,国内外许多科研机构也对生精障碍的遗传学病因进行了家系研究,发现了许多新的致病基因(表1)。

表 1 "阻滞型"生精障碍相关的致病基因

基因	定位	OMIM 编号	首次发现时间	参考文献(PMID 或 DOI)
DMC1	22q13.1	602721	2018	29331980
STAG3	7q22.1	608489	2019	31125047
TEX11	Xq13.1	300311	2015	26136358
SHOC1	9q31.3	618038	2021	32900840
SYCE1	10q26.3	611486	2015	25899990
MEIOB	16p13.3	617670	2017	28206990
CCDC155	19q13.33	618125	2018	29790874
TEX14	17q22	605792	2017	28206990
TEX15	8p12	605795	2015	26199321
XRCC2	7q36.1	600375	2018	30042186
HSF2	6q22.31	140581	2013	23064888
MEI1	22q13.2	608797	2018	29659827
SPO11	20q13.31	605114	2018	29790874
ADAD2	16q24.1	619532	2020	32741963
MSH4	1p31.1	602105	2020	32741963
RAD21L1	20p13	619533	2020	32741963
M1AP	2p13.1	619098	2020	32673564
RNF212	4p16.3	612041	2019	31125047
SPINK2	4q12	605753	2017	28554943
MSH5	6p21.33	603382	2021	34755185
PNLDC1	6q25.3	619529	2021	34347949
FBXO43	8q22.2	609110	2022	34595750
C14ORF39	14q23.1	617307	2021	33508233
TDRD9	14q32.33	617963	2017	28536242
TERB2	15q21.1	617131	2021	33211200
TERB1	16q22.1	617332	2020	32741963
ZMYND15	17p13.2	614312	2014	24431330
ZSWIM7	17p12	614535	2021	33713115
FKBP6	7q11.23	604839	2022	36150389
HFM1	1p22.2	615684	2022	35526155
MAJIN	11q13.1	617130	2021	33211200
SIX6OS1	14q23.1	617307	2021	33508233
SPATA22	17p13.2	617673	2021	34392356
TOP6BL	11q13.2	616109	2020	10.1016/j.scib.2020.08.026

划线基因新致病突变为本团队既往报道

尤其是“阻滞型”生精障碍的患者,其致病基因检出率相对较高,已有大量减数分裂致病基因单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)与“阻滞型”生精障碍息息相关[5-32],包括 DSB 重组修复相关基因(*DMC*1、*SHOC*1、*TEX*11、*MEIOB*、*TEX*14、*TEX*15、*XRCC*2、*MEI*1、*SPO*11、*MSH*4、*RAD*21*L*1 等[7-8,10-11,14,20,28-30,32]);联会复合体相关基因(*SYCE*1、*SIX*6*OS*1、*SYCP*2 等[9,17,33]);染色体动态变化相关基因(*STAG*3、*CCDC*155、*TERB*1、*TERB*2 等[8,21-22])。除减数分裂相关基因外,本团队前期还在 4 个生精障碍家系中鉴定出 *TEX*44 纯合变异,发现该类患者精子细胞中线粒体组装异常,并且基于已构建生精障碍动物模型,观察其线粒体超微结构改变;通过体内外实验阐明 *TEX*44 关键相互作用分子,进而揭示 *TEX*44 变异影响线粒体组装进而导致“阻滞型”生精障碍发病机制。目前,基于本团队 504 例全外显子测序家系数据结合单细胞时空转录组测序技术,已将“阻滞型”生精障碍遗传学病因诊断率由 15%提升至 60%[30]。由此可见,遗传学病因的分析鉴定在“阻滞型”生精障碍患者中起到极大作用。

2.2 “阻滞型”精子发生障碍相关基因的变异类型

“阻滞型”生精障碍其遗传学病因主要包括单核苷酸变异、拷贝数变异和染色体异常 3 个方面。目前的研究还主要集中在单核苷酸变异方面,试图发现更多导致男性“阻滞型”生精障碍的新致病基因。此外,研究还发现拷贝数变异同样与“阻滞型”生精障碍有关。拷贝数变异是指基因组中的亚微观染色体缺失、插入或重复,其范围从 50 bp 到 Mb 级[34]。研究表明,*MAST*2、*MYRIP*、*LRRC*4*C* 和长非编码 RNA *LOC*100507205 的杂合拷贝数变异和 *SYCE*1 的纯合拷贝数变异[35-37],均会导致对生殖系统发育和精子生成起着重要作用的关键基因的拷贝数发生改变,从而引起基因表达水平的变化,进而影响生殖细胞的发育和精子生成,与“阻滞型”生精障碍相关。此外,染色体异常也是“阻滞型”生精障碍的一个遗传因素。研究表明,常染色体和性染色体之间的平衡易位也会引起“阻滞型”生精障碍,其易位断点处基因或其调节元件的直接破坏,或是在断点附近同源染色体配对和联会失败最终导致基因沉默[38-40]。

由此,需要进一步结合临床案例,发现更多“阻滞型”生精障碍家系,深入寻找“阻滞型”生精障碍的新遗传病因学因素,力争在病因学研究中取得更大的突破,为“阻滞型”患者早期筛查诊断以及基于病因学的治疗提供新的分子靶标。

3 精子发生障碍“阻滞型”治疗方案

目前,对大多数生精障碍患者仍缺乏有效治疗手段,即使依托睾丸取精和辅助生殖技术,多数患者往往助孕失败,只能借助捐献者的精子生育子代。究其根本原因,是由于当前仍缺少持续高效恢复精子发生的治疗方法。

3.1 RNA 体内外复合靶向递送

针对以上挑战,结合“阻滞型”生精障碍遗传病因学诊断率高的特点,本团队在阐明“阻滞型”生精障碍新致病机理的基础上,正在探究体内外复合靶向递送生精障碍治疗新技术,通过优化既有 mRNA 序列和元件的设计方法,开发新型靶向递送模块,实现脂质纳米颗粒(LNP)及外泌体为载体的 RNA 体内外复合靶向递送[41],结合本团队所特有的单根生精小管体外培养以及输出小管显微注射技术实现体外生精小管靶向治疗,力求利用新型治疗技术恢复生精功能。

3.2 芳香化酶抑制剂

本团队前期还发现芳香化酶抑制剂可以抑制雄激素向雌激素的转化,解除雌激素对下丘脑和垂体的过度抑制,增加卵泡刺激素和黄体生成素分泌,进而促进生精障碍患者精子发生[42]。针对“阻滞型”生精障碍患者,本中心目前已有 1 例患者接受芳香化酶抑制剂治疗后成功出现精子。因此,运用包括芳香化酶抑制剂在内的新辅助内分泌序贯疗法进行多中心有效性及安全性研究有望实现“阻滞型”生精障碍的治疗,突破治疗瓶颈。

3.3 基因编辑技术

WU 等[43]在 2013 年首次为使用 CRISPR/Cas9 来纠正遗传缺陷提供了理论依据。2 年后,他们再次利用 CRISPR/Cas9 对小鼠精原干细胞(spermatogonial stem cells,SSCs)进行有效编辑,并成功完成了对小鼠遗传缺陷的修复和纠正[44]。通过 CRISPR/Cas9 介导的定向同源修复对 SSCs 的校正,为基因遗传缺陷引起的男性不育症带来了新的治疗方向。LI 等[45]通过 CRISPR/Cas9 在体外纠正了 Kit^{w}/Kit^{wv} 小鼠 SSCs 的点突变。在移植回睾丸后,修复后的 SSCs 成功地恢复了小鼠的自然生育能力。ZHANG 等[46]也尝试建立 SSC 移植受体小鼠模型,以实现更有效的 SSC 移植。本团队也在 *MSH*5 点突变小鼠模型上证实了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术能够修复基因突变,使非梗阻性无精子症小鼠产生成熟精子[47]。目前生殖细胞基因编辑技术仅仅可以用于模式动物科学研究,不准用于临床治

疗研究。

3.4 早期遗传筛查

完整的“阻滞型”生精障碍诊疗体系还应包括早期遗传筛查预防。建立完善的早期遗传筛查组套可以检测出携带相关致病基因变异的人群,从而采取针对性的预防措施,如避免近亲婚姻等。对于已经确诊为生精障碍的男性,遗传筛查也可以指导医师选择合适的治疗方案,尽量减少手术损伤。本团队前期也申请了相关发明专利:*TEX*11 基因致病性突变在制备检测非梗阻性无精子症诊断试剂盒中的应用。随着致病基因的研究不断深入,本团队也将逐渐完善遗传筛查组套,以此实现早期诊断、早期预防干预。

4 精子发生障碍“阻滞型”诊疗展望

“阻滞型”生精障碍分型标准的建立和遗传病因学分析是目前建立生精障碍亚型分类和新诊疗体系所必不可少的。因此,本团队提出了创新性的观点:“阻滞型”生精障碍是由于遗传变异导致精子发生过程停滞,性激素检查和体格检查基本正常,遗传病因学诊断率较高。针对“阻滞型”生精障碍,RNA 靶向递送和芳香化酶抑制剂具有治疗潜力,是目前研究的热点,有望建立靶向治疗方案从而改善患者的预后。

为了完善“阻滞型”生精障碍的分型标准和治疗方案,本团队希望通过收集病史、进行专科体检、辅助检查、手术资料、病理图片等数据,结合人工智能进行综合分析,建立一个精准的多元诊断技术体系。根据此诊断筛查“阻滞型”生精障碍患者,同时结合全外显子测序、染色体微阵列、染色体核型分析等技术从染色体异常、拷贝数变异和单核苷酸突变多个角度筛选和分析“阻滞型”生精障碍的遗传病因学因素,并建立遗传筛查组套,力争尽早进行明确的诊断,同时为临床治疗提供靶标,从而提出有效安全的治疗策略,制定完整的诊疗路径,最大限度地挽救“阻滞型”生精障碍患者的生育能力。

参考文献:

[1] HULL M G, GLAZENER C M, KELLY N J, *et al*. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility[J]. Br Med J (Clin Res Ed), 1985, 291(6510): 1693-1697. DOI: 10.1136/bmj.291.6510.1693.

[2] ROWE P, COMHAIRE F, HARGREAVE T, *et al*. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple[M]. New York: Cambridge University Press, 1993.

[3] JOHNSEN S G. Testicular biopsy score count—A method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males [J]. Horm Res Paediatr, 1970, 1(1): 2-25. DOI: 10.1159/000178170.

[4] 李铮, 何祖平, 张锋, 等. 精子发生障碍导致男性不育的基础研究及其临床应用[J]. 上海医学, 2019, 42(7): 429-430.
LI Z, HE Z P, ZHANG F, *et al*. Basic research and clinical application of male infertility caused by spermatogenesis disorder[J]. Shanghai Med J, 2019, 42(7): 429-430.

[5] ARAFAT M, HAR-VARDI I, HARLEV A, *et al*. Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men [J]. J Med Genet, 2017, 54(9): 633-639. DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-104514.

[6] AYHAN Ö, BALKAN M, GUVEN A, *et al*. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia[J]. J Med Genet, 2014, 51(4): 239-244. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-102102.

[7] BEN KHELIFA M, GHIEH F, BOUDJENAH R, *et al*. A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family[J]. Hum Reprod, 2018, 33(6): 1034-1037. DOI: 10.1093/humrep/dey073.

[8] FAKHRO K A, ELBARDISI H, ARAFA M, *et al*. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility [J]. Genet Med, 2018, 20(11): 1365-1373. DOI: 10.1038/gim.2018.10.

[9] FAN S X, JIAO Y Y, KHAN R, *et al*. Homozygous mutations in C14orf39/SIX6OS1 cause non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency in humans [J]. Am J Hum Genet, 2022, 109(7): 1343. DOI: 10.1016/j.ajhg.2022.06.006.

[10] GERSHONI M, HAUSER R, YOGEV L, *et al*. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes[J]. Genet Med, 2017, 19(9): 998-1006. DOI: 10.1038/gim.2016.225.

[11] HE W B, TU C F, LIU Q, *et al*. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing [J]. J Med Genet, 2018, 55(3): 198-204. DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-104992.

[12] JIAO Y Y, FAN S X, JABEEN N, *et al*. A TOP6BL mutation abolishes meiotic DNA double-strand break formation and causes human infertility [J]. Sci Bull (Beijing), 2020, 65(24): 2120-2129. DOI: 10.1016/j.scib.2020.08.026.

[13] KHERRAF Z E, CHRISTOU-KENT M, KARAOUZENE T,

et al. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia inhomozygotes[J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(8): 1132-1149. DOI: 10.15252/emmm.201607461.

[14] KRAUSZ C, RIERA-ESCAMILLA A, MORENO-MENDOZA D, *et al*. Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men[J]. Genet Med, 2020, 22(12): 1956-1966. DOI: 10.1038/s41436-020-0907-1.

[15] LI L J, TAN Y Q, LU L Y. Defective PiRNA processing and azoospermia[J]. N Engl J Med, 2022, 386(17): 1675-1676. DOI: 10.1056/NEJMc2116008.

[16] LI Y, WU Y F, ZHOU J T, *et al*. A recurrent ZSWIM7 mutation causes male infertility resulting from decreased meiotic recombination[J]. Hum Reprod, 2021, 36(5): 1436-1445. DOI: 10.1093/humrep/deab046.

[17] MAOR-SAGIE E, CINNAMON Y, YAACOV B, *et al*. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(6): 887-891. DOI: 10.1007/s10815-015-0445-y.

[18] MOU L S, WANG Y D, LI H G, *et al*. A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia[J]. Hum Genet, 2013, 132(2): 159-165. DOI: 10.1007/s00439-012-1234-7.

[19] NAGIRNAJA L, MØRUP N, NIELSEN J E, *et al*. Variant PNLDC1, defective PiRNA processing, and azoospermia[J]. N Engl J Med, 2021, 385(8): 707-719. DOI: 10.1056/NEJMoa2028973.

[20] OKUTMAN O, MULLER J, BAERT Y, *et al*. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(19): 5581-5588. DOI: 10.1093/hmg/ddv290.

[21] RIERA-ESCAMILLA A, ENGUITA-MARRUEDO A, MORENO-MENDOZA D, *et al*. Sequencing of a 'mouse azoospermia' gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest[J]. Hum Reprod, 2019, 34(6): 978-988. DOI: 10.1093/humrep/dez042.

[22] SALAS-HUETOS A, TÜTTELMANN F, WYRWOLL M J, *et al*. Disruption of human meiotic telomere complex genes TERB1, TERB2 and MAJIN in men with non-obstructive azoospermia[J]. Hum Genet, 2021, 140(1): 217-227. DOI: 10.1007/s00439-020-02236-1.

[23] WU H, ZHANG X, SHEN Q S, *et al*. A homozygous loss-of-function mutation in FBXO43 causes human non-obstructive azoospermia[J]. Clin Genet, 2022, 101(1): 55-64. DOI: 10.1111/cge.14069.

[24] WYRWOLL M J, GAASBEEK C M, GOLUBICKAITE I, *et al*. The piRNA-pathway factor FKBP6 is essential for spermatogenesis but dispensable for control of meiotic LINE-1 expression in humans[J]. Am J Hum Genet, 2022, 109(10): 1850-1866. DOI: 10.1016/j.ajhg.2022.09.002.

[25] WYRWOLL M J, TEMEL Ş G, NAGIRNAJA L, *et al*. Bi-allelic mutations in M1AP are a frequent cause of meiotic arrest and severely impaired spermatogenesis leading to male infertility[J]. Am J Hum Genet, 2020, 107(2): 342-351. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.06.010.

[26] WYRWOLL M J, VAN WALREE E S, HAMER G, *et al*. Bi-allelic variants in DNA mismatch repair proteins MutS Homolog MSH4 and MSH5 cause infertility in both sexes[J]. Hum Reprod, 2021, 37(1): 178-189. DOI: 10.1093/humrep/deab230.

[27] XIE X F, MURTAZA G, LI Y, *et al*. Biallelic HFM1 variants cause non-obstructive azoospermia with meiotic arrest in humans by impairing crossover formation to varying degrees[J]. Hum Reprod, 2022, 37(7): 1664-1677. DOI: 10.1093/humrep/deac092.

[28] YANG F, SILBER S, LEU N A, *et al*. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(9): 1198-1210. DOI: 10.15252/emmm.201404967.

[29] YANG Y J, GUO J H, DAI L, *et al*. XRCC2 mutation causes meiotic arrest, azoospermia and infertility[J]. J Med Genet, 2018, 55(9): 628-636. DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-105145.

[30] YAO C C, YANG C, ZHAO L Y, *et al*. Bi-allelic SHOC1 loss-of-function mutations cause meiotic arrest and non-obstructive azoospermia[J]. J Med Genet, 2021, 58(10): 679-686. DOI: 10.1136/jmedgenet-2020-107042.

[31] YILDIRIM Y, OURIACHI T, WOEHLBIER U, *et al*. Linked homozygous BMPR1B and PDHA2 variants in a consanguineous family with complex digit malformation and male infertility[J]. Eur J Hum Genet, 2018, 26(6): 876-885. DOI: 10.1038/s41431-018-0121-7.

[32] WU Y F, LI Y, MURTAZA G, *et al*. Whole-exome sequencing of consanguineous families with infertile men and women identifies homologous mutations in SPATA22 and MEIOB[J]. Hum Reprod, 2021, 36(10): 2793-2804. DOI: 10.1093/humrep/deab185.

[33] SCHILIT S L P, MENON S, FRIEDRICH C, *et al*. SYCP2 translocation-mediated dysregulation and frameshift variants cause human male infertility[J]. Am J Hum Genet, 2020, 106(1): 41-57. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.11.013.

[34] MACDONALD J R, ZIMAN R, YUEN R K C, *et al*. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D986-D992. DOI: 10.1093/nar/gkt958.

[35] HUANG N, WEN Y, GUO X J, *et al*. A screen for genomic disorders of infertility identifies MAST2 duplications associated with nonobstructive azoospermia in humans[J]. Biol Reprod, 2015, 93(3): 61. DOI: 10.1095/biolreprod.115.131185.

[36] EGGERS S, DEBOER K D, VAN DEN BERGEN J, *et al*. Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility[J]. Fertil Steril, 2015, 103(1): 214-219. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.030.

[37] HUANG Y H, TIAN R H, XU J W, *et al*. Novel copy number variations within SYCE1 caused meiotic arrest and non-obstructive azoospermia[J]. BMC Med Genomics, 2022, 15(1): 137. DOI: 10.1186/s12920-022-01288-8.

[38] ISHIKAWA T, KONDO Y, YAMAGUCHI K, *et al*. An unusual reciprocal X-autosome translocation in an infertile azoospermic man[J]. Fertil Steril, 2007, 88(3): 705.e15-705.e17. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.067.

[39] LAURENT C, CHANDLEY A C, DUTRILLAUX B, *et al*. The use of surface spreading in the pachytene analysis of a human t(Y;17) reciprocal translocation[J]. Cytogenet Cell Genet, 1982, 33(4): 312-318. DOI: 10.1159/000131777.

[40] QUACK B, SPEED R M, LUCIANI J M, *et al*. Meiotic analysis of two human reciprocal X-autosome translocations[J]. Cytogenet Cell Genet, 1988, 48(1): 43-47. DOI: 10.1159/000132583.

[41] DU S, LI W Q, ZHANG Y B, *et al*. Cholesterol-amino-phosphate (CAP) derived lipid nanoparticles for delivery of self-amplifying RNA and restoration of spermatogenesis in infertile mice[J]. Adv Sci (Weinh), 2023: e2300188. DOI: 10.1002/advs.202300188.

[42] YANG C, LI P, LI Z. Clinical application of aromatase inhibitors to treat male infertility[J]. Hum Reprod Update, 2021, 28(1): 30-50. DOI: 10.1093/humupd/dmab036.

[43] WU Y, LIANG D, WANG Y, *et al*. Correction of a genetic disease in mouse *via* use of CRISPR-Cas9[J]. Cell Stem Cell, 2013, 13(6): 659-662.

[44] WU Y, ZHOU H, FAN X, *et al*. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. Cell Res, 2015, 25(1): 67-79.

[45] LI X, SUN T, WANG X, *et al*. Restore natural fertility of Kit(w)/Kit(wv) mouse with nonobstructive azoospermia through gene editing on SSCs mediated by CRISPR-Cas9[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 271.

[46] ZHANG X Y, ZHAO X, LI G L, *et al*. Establishment of *Etv*5 gene knockout mice as a recipient model for spermatogonial stem cell transplantation[J]. Biol Open, 2021, 10(1): bio056804. DOI: 10.1242/bio.056804.

[47] CHEN M, YAO C C, QIN Y Y, *et al*. Mutations of MSH5 in nonobstructive azoospermia (NOA) and rescued *via in vivo* gene editing[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 1. DOI: 10.1038/s41392-021-00710-4.

(**收稿**:2023-01-14;**修回**:2023-03-01)

(编辑 张 维)