

· 综 述 ·

精子 DNA 损伤与保护

孙 洁 综述; 周安方 审校

(湖北中医学院中医基础理论教研室, 湖北 武汉 430061)

摘要: 精子 DNA 损伤是引起不育的重要原因, 携带 DNA 损伤的幸存精子可能逃避体内精子选择机制而成熟并将遗传缺陷传递于后代。因此对精子 DNA 损伤的研究已成为生殖医学的热点之一。损伤精子 DNA 的因素主要包括氧化应激、微量元素、精子毒性物质、放射线等, 而机体则凭借高度压缩精子 DNA、抗氧化系统等机制保护精子 DNA 的完整性。此外, 一些药物如抗氧化剂、黑茶提取物等也可以促使这种保护机制的健全与重建。

关键词: 精子; DNA; 损伤; 保护

中图分类号: R321.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3591 (2006) 07-0639-05^①

Damage to and Protection of Sperm DNA

SUN Jie, ZHOU An-fang

Department of Basic Theories of Traditional Chinese Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China

Correspondence to: ZHOU An-fang, E-mail: SJDE008@tom.com

Abstract: The damage to sperm DNA is one of the most important causes of male infertility. Some sperm with damaged DNA may escape from the sperm surveillance mechanism and transmit the damage to the offspring. So research on the damage to sperm DNA has become one of the hot spots in reproductive medicine. The factors that would damage sperm DNA include oxidative stress, microelements, reproductive toxic substances, radioactive rays, and so on, while the body depends on the compressed sperm DNA and anti-oxidation system for the protection of the integrity of sperm DNA. Some drugs such as anti-oxidant, black tea extract, etc, may help to improve and rebuild these protective mechanisms. Natl J Androl, 2006, 12 (7): 639-642, 646

Key words: sperm; DNA; damage; protect

哺乳动物的精子是一种高度分化的生殖细胞, 高度压缩的单倍染色体几乎是成熟精子头部的全部内容。替代组蛋白成为精核蛋白的鱼精蛋白 (HP) 和大量的二硫键使精子染色体高度压缩, 这种特化的结构可以保护精子 DNA 免受伤害, 因此成熟精子对各种致病因素有较强的抵抗力。但是在精子成熟过程中, 尤其是精原细胞开始减数分裂后对周围环境十分敏感, 其 DNA 很容易被各种致病因素损伤,

这些损伤对分裂中的精子细胞可以是致命的, 大量的精子细胞死亡是造成无精子症或少精子症的重要原因, 而一些携带 DNA 损伤的幸存精子可能逃避体内精子选择机制而成熟并将遗传缺陷传递于后代。鉴于精子 DNA 损伤可以增加不育和遗传缺陷风险, 精子 DNA 损伤的因素及其保护机制已成为当前研究的热点之一。

① 收稿日期: 2005-01-04; 修回日期: 2005-12-26

基金项目: 湖北省自然科学基金资助 (2004ABA184)

作者简介: 孙 洁 (1975-), 男, 湖北孝感市人, 医师, 博士研究生, 从事中医基础理论及中医男科学专业。E-mail: sunjiede@gmail.com

通讯作者: 周安方, E-mail: SJDE008@tom.com

1 损伤精子 DNA 的因素

1.1 氧化应激 所有需氧生物的生理过程均处于动态平衡状态之中,而当生物机体受到环境因素或营养条件制约,使其生成氧自由基的量增加或清除氧自由基的能力减弱时,机体即进入氧化应激状态(oxidative stress)^[11]。以 7-H-8-O-2 脱氧鸟苷酸(8-oxodG)作为氧化胁迫的指标对 225 例计划妊娠的志愿者进行精子氧化 DNA 损伤研究发现,在 1 个月经周期内妊娠的可能性与 8-oxodG 水平呈负相关^[2],用精子染色质结构分析方法评估精子 DNA 损伤发现,精子 DNA 断裂指数与氧化胁迫呈正相关而与胚胎质量和受精率呈负相关^[3]。这些研究表明人类精子的氧化胁迫和相关的 DNA 损伤可能是影响生育和妊娠结局的重要因素。

人类精子对氧化胁迫所致 DNA 损伤高度敏感。体外实验证实,过氧化氢浓度高于 1.25 mmol/L 时对精子有基因毒性,而在低浓度过氧化氢环境中的细胞检测不到 DNA 损伤;人类精子线粒体 DNA 基因组对过氧化氢诱导的 DNA 损伤比核 DNA 更为敏感。但人类精子中的核 DNA 和 mtDNA 都明显比生殖链中各种生殖细胞对损伤有更好的耐受性^[4]。

精液中的白细胞、雌激素、多种疾病和不良生活习惯均可能引起局部氧自由基增加导致氧化胁迫并最终损伤精子 DNA。精液中的白细胞聚集不仅直接与成熟和不成熟精子的染色质相关,还与不成熟生殖细胞浓度与异常精子比率直接相关^[5]。其原因可能与精液中异常增多的白细胞是活性氧(ROS)类物质的重要来源有关。精液中增多的白细胞可以刺激人类精子产生 ROS。这种刺激可以通过细胞-细胞接触或白细胞产生的可溶性产物等多种途径介导^[6],也可能是白细胞通过瀑布样机制增加精子的原发性 DNA 损伤,并诱发潜在 DNA 损伤,在形态差、活力低的精子中尤其如此^[7]。

在用 6 种雌激素混合物处理人类精子后,观察到所有类型生殖细胞均受到损伤。同时还观察到几乎所有使用过氧化物酶的病例损伤均有所减轻。这种损伤模式也同时见于过氧化氢对精子的损伤。这种相似性提示雌激素可能是通过产生过氧化氢损伤精子 DNA,不适当地暴露于雌激素下可以导致自由基介导的损害^[8]。

部分疾病在发病过程中也可以出现精子 DNA 的损伤。精索静脉曲张的不育患者表现出明显的精子 DNA 损伤,并且与精液中高水平的氧化胁迫有关^[9];对 41 例梗阻性无精子症或不射精患者和 10

例已生育志愿者的比较发现:梗阻性无精子症或不射精患者 DNA 断裂细胞的比例较高(均数分别为 18.9%、6.2%)^[10];少精子症不育患者与正常对照组相比不仅表现出更高的 XY 非整倍性和 XY 二倍性,还有更高水平的染色体异常和 DNA 断裂^[11]。这些研究说明 DNA 损伤可能存在于多种不育患者中,他们的不育可能不仅仅是精液异常的结果。除了不育以外,癌症及其化学治疗和放射疗法也会引起精子 DNA 的损伤。而氧化胁迫可能是损伤机制之一。对 12 例健康人和 37 例癌症患者(睾丸癌 20 例,霍奇金病 11 例,非霍奇金病 4 例,其他肿瘤 2 例)的精液冷藏标本进行比较,结果癌症患者比对照组精子 DNA 损伤明显增多,研究者因而认为在大多数癌症患者中精液 DNA 损伤是十分普遍的^[12]。癌症的化学疗法和放射疗法对精子 DNA 的损伤更是广为人知,需要指出的是一些研究不支持在癌症的细胞毒药物治疗和其子代遗传病之间有任何联系,因此对癌症细胞毒治疗还应给予更多、更有力的风险评估^[13]。

对于吸烟、酗酒等不良生活习惯对精子 DNA 的影响仍存在争论。通常认为吸烟会通过氧化胁迫而降低精子质量,但吸烟的精子毒性是否与精子 DNA 有关则尚无定论。有研究表明吸烟者精液白细胞聚集比不吸烟者高 48%,ROS 水平高 107%,ROS-TAC 积分低 10 分,可见吸烟可以增加精液氧化胁迫。但是该实验还发现在吸烟和不吸烟的不育者之间精液常规、DNA 损伤参数没有统计学意义,因此研究者只是谨慎地提出精子氧化胁迫对生育有潜在的负面影响^[14]。另一项关注氧化胁迫与精子 DNA 损伤关系的研究则显示,氧化损伤对精子受精能力的影响及其程度在一特定个体内是恒定相关的,与吸烟无关^[3]。人类生殖细胞对香烟诱导的非整倍性存在不同的易感性^[15],有趣的是职业性暴露于多环芳烃下,不吸烟者生殖细胞的非整倍性明显与精液中较高水平多环芳烃-DNA 络合物水平相关,而每日乙醇消费量与精子多环芳烃-DNA 络合物水平呈明显负相关^[16],这与传统认为吸烟和酗酒会影响精子质量的结论正好相反,还需要进一步的研究加以证实。

1.2 微量元素与化学毒性物质 微量元素与化学毒性物质可以引起体细胞 DNA 损伤,但它们对生殖细胞的影响以及产生这种影响的机制尚无明确结论。研究表明精浆中的镉可以影响精子质量和氧化性 DNA 损伤,硒则能使人类精子细胞免受氧化性 DNA 损伤^[17],铁毒性也会增加精子 DNA 损伤^[18]。精浆中铅虽然可以引起精子 DNA 损伤,但是在其浓

度 $< 10 \text{ mg/L}$ 时与精子质量无关^[17]。铅对精子 DNA 的损伤可能与其和人类 HP 的亲合性有关, HP2 是一个锌蛋白, 而铅对锌蛋白有较好亲和性, 铅与 HP2 作用呈剂量依赖性地减少 HP2 与 DNA 的结合, 改变染色质的不稳定性并最终导致染色质损伤^[19]。

多种化学品可能损伤精子 DNA 并由此产生生殖毒性。美国马萨诸塞州的一项研究表明在环境水平下, 尿邻苯二甲酸盐代谢产物单乙基邻苯二甲酸盐与精子中 DNA 损伤增加有关^[20]。丙烯腈 (CAN) 或其代谢产物作为一种体内多效应遗传毒性物质可以通过诱导生精过程中的 DNA 断裂和性染色体不分离导致生殖缺陷^[21]。苯并芘 (BaP) 是在香烟烟雾和汽车废气中的一种天然烃受体 (AhR) 配基, 雄性小鼠皮下注射不同剂量 BaP 5 周后, 精子密度与 BaP 剂量呈负相关, 而精子凋亡则与之呈正相关^[22]。甲苯^[23]、2, 4, 6 三硝基甲苯及其代谢产物^[24]、天然石炭酸^[25]均可以诱发氧化性精子 DNA 损伤并导致生殖毒性。

1.3 放射因素 为了评价成熟精子的 DNA 改变是否源于不成熟生殖细胞的 DNA 损伤, 在体外 X 线照射睾丸, 并在第 14、45、100 d 时用慧星实验和精子染色质结构分析法检测睾丸细胞和精子, 结果在照射后 14 d 观察到剂量依赖性的睾丸细胞 DNA 损伤, 而成熟精子细胞不受影响。在第 45 d 后观察到精子 DNA 链断裂。第 100 d 后 DNA 损伤恢复到对照水平。显示分化中的精原细胞有较高的放射易敏感性, 而且减数分裂前生殖细胞诱导的 DNA 损伤在初级精母细胞阶段即可察觉并在其发育成熟的精子中仍然存在^[26]。在雄性 DBA2 小鼠与雌鼠交配前 18 或 84 d 心室内注射 Auger 电子发射器⁵⁵Fe。慧星实验显示 84 d 后, 精子 DNA 断裂增加, 而在 18 d 时还不能观察到这一现象, 说明射线对精原细胞的损害大于精子细胞的损害^[27]。用 $0.25 \sim 4 \text{ Gy}$ 的 X 线照射分化期精原细胞, 45 d 时即产生剂量依赖性的精子 DNA 损伤, 而且在分化期精原细胞可以见到最大的损伤^[28], 也说明精原细胞对射线的损伤更为敏感。

1.4 其他因素 随着年龄增长, 精液质量逐渐下降。36~57 岁的男性精子 DNA 高度损伤比率比 20~35 岁者明显升高, 说明随着年龄增长, 精子 DNA 双链断裂明显增加^[29]。低温保存也会损伤精子 DNA 完整性, 低温保存后的马精子 DNA 断裂比新鲜时和冷冻过程中多^[30]。曾经认为密度梯度离心可能会因为刺激精子产生过多 ROS 而损伤精子

DNA^[31]。但是欲行 MF 的患者其精子 DNA 染色体完整性 (原位切口平移法) 的研究显示, 密度梯度离心后精子形态正常率上升 138%, 而精子核完整性上升 450%^[32]。对包括和不包括离心步骤的两种不同精子方法的比较显示: 大多数样本中 DNA 损伤 $< 5\%$, 有离心步骤的上游技术与无离心步骤的技术相比并没有导致更多的 DNA 损伤^[31]。可见精子分离技术的安全性还需要更多、更有力的风险评估。

2 精子 DNA 的保护

精子 DNA 的高度压缩是保护精子 DNA 免受伤害的关键, 此外, 体内还存在一些 DNA 修复机制, 它们共同构成精子 DNA 的保护屏障。

生精过程的精子细胞单倍体基因组压缩要求先除去核小体结构并用过渡蛋白 TP1、TP2 将 DNA 保护起来。在生精完成一半时经常可以见到 DNA 单链断裂, 但是在生精接近完成时核内 TP1 水平上升, DNA 断裂概率明显下降。TP1 似乎可以将断端连在一起直到一种尚不清楚的连接酶将缺口连接起来以起到对精子 DNA 的保护作用^[32]。HP 在精子 DNA 稳定性上起着重要作用, 如果因为某种原因引起精子核内 HP 发生变性或减少, 失去保护的精子 DNA 被破坏的概率就会大大增加。铅引起的 DNA 损伤即与其能和 HP 形成络合物造成 HP 变性有关^[19]。虽然组蛋白不是精子的主要核蛋白, 在精子核内双链 DNA 断裂所诱导的组蛋白 H2AX 磷酸化与招募 DNA 损伤修复因子有关。H2AX 敲除大鼠表现为对放射敏感、生长迟缓、免疫缺陷以及雄性不育。这些多效性表型与染色体不稳定, 修复缺陷, 以及招募 Nbs1、53bp1 和 Brca1 到放射诱导病灶有关。可见 H2AX 对引导特异性 DNA 修复复合物到损伤的 DNA 有相当意义^[33]。

在减数分裂过程中, 一些酶参与染色体复制、联会过程中 DNA 断裂的修复。Ercc1 是核苷酸丢失修复 (NER) 中的重要组分, 雌、雄 Ercc1 缺失小鼠均不能生育。Ercc1 在睾丸中高表达, Ercc1 蛋白在减数分裂交联结束时达到最高浓度。Ercc1 缺失小鼠的睾丸中 DNA 断裂和氧化性 DNA 损伤水平升高, 雄性生殖细胞凋亡增加, 可见 Ercc1 的修复功能对雌、雄两性在减数分裂的各个阶段都很重要^[34]。

体内抗氧化系统和各种抗氧化剂是保护精子 DNA 的另一重要因素。附属性腺可以分泌超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx 或 GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT), 并保护精子不受氧化应激的损害^[35], 是精液中抗氧化系统的主要来源。

过氧化物酶可以阻止雌激素引起的人类精子 DNA 损伤^[8],而对一些天然抗氧化物的研究也证明抗氧化剂对保护精子 DNA 免受氧自由基攻击有效。异黄酮是一种植物复合物,实验证明 0.01 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 的木黄酮和牛尿酚可以明显保护精子不受氧化伤害,其作用比牛尿酚、维生素 C 酸和 α 维生素 E 更强,而且木黄酮和牛尿酚合用比单一使用产生更好的抗氧化作用^[36]。

此外,一些天然药物还可以通过阻止多环 DNA 络合物的形成而保护精子 DNA。在一些红酒中发现的天然 AhR 竞争性抑制剂——白藜芦醇减少 BaP 所致的生精小管中多环 DNA 络合物形成和凋亡^[22],而对以 BaP 为诱导剂的瑞士小白鼠进行优势致死性实验则证明黑茶水溶液对 BaP 诱导的瑞士小白鼠的生殖细胞基因损伤有保护作用^[37]。

3 小结

长期的进化使人类精子处于严密的保护之下,而且一旦精子 DNA 受到损伤,体内的精子选择机制就会发生作用以保护遗传的安全性。但是在精子成熟过程中,各阶段的生殖细胞却可能是敏感而脆弱的,射线、氧化胁迫、化学毒性物质、衰老等都可能损伤其 DNA 而引起生殖毒性。生殖细胞 DNA 受损是直接引起成熟精子密度和质量下降的原因之一。另一方面,这些缺陷精子的受精能力可能并没有受到影响,因此有可能将 DNA 损伤传递于后代而增加各种遗传风险。

目前的研究集中在损伤精子 DNA 的各种因素,但对于如何预防和治疗这种损伤却缺乏研究,除了改善体内的各种精子 DNA 保护机制,外源性的抗氧化剂是较为有效的策略之一。研究表明一些天然药物对精子 DNA 有保护,提示我们可以加强中医药“天然疗法”对精子 DNA 损伤的保护和修复作用,这可能是拓展 DNA 损伤应对策略的一个全新而充满希望的新领域。

参考文献

- [1] 秦达念,黄天华. 氧化胁迫与精子功能损伤[J]. 中华男科学, 2001, 7(1): 40-43.
- [2] Loft S, Kold-Jensen T, Højlund NH, *et al* Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy[J]. Hum Reprod, 2003, 18(6): 1265-1272.
- [3] Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, *et al* Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility[J]. Fertil Steril, 2003, 79(Suppl 3): 1597-1605.
- [4] Sawyer DE, Mercer BG, Wiklund AM, *et al* Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa[J]. Mutat Res, 2003, 529(1-2): 21-34.
- [5] Alvarez JG, Shama RK, Ollero M, *et al* Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay[J]. Fertil Steril, 2002, 78(2): 319-329.
- [6] Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, *et al* Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa[J]. Fertil Steril, 2002, 78(6): 1215-1224.
- [7] Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, *et al* Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples[J]. J Androl, 2002, 23(5): 717-723.
- [8] Anderson D, Schmid TE, Baumgartner A, *et al* Oestrogenic compounds and oxidative stress in human sperm and lymphocytes in the Comet assay[J]. Mutat Res, 2003, 544(2-3): 173-178.
- [9] Saleh RA, Agarwal A, Shama RK, *et al* Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele[J]. Fertil Steril, 2003, 80(6): 1431-1436.
- [10] Ramos L, Kleingeld P, Meuleman E, *et al* Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia[J]. Fertil Steril, 2002, 77(2): 233-237.
- [11] Schmid TE, Kamischke A, Bollwein H, *et al* Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay[J]. Hum Reprod, 2003, 18(7): 1474-1480.
- [12] Kobayashi H, Larson K, Shama RK, *et al* DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay[J]. Fertil Steril, 2001, 75(3): 469-475.
- [13] Morris D. Sperm DNA damage and cancer treatment[J]. Int J Androl, 2002, 25(5): 255-261.
- [14] Saleh RA, Agarwal A, Shama RK, *et al* Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study[J]. Fertil Steril, 2002, 78(3): 491-499.
- [15] Shi Q, Ko E, Barclay L, *et al* Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm[J]. Mol Reprod Dev, 2001, 59(4): 417-421.
- [16] Xu DX, Shen HM, Zhu QX, *et al* The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma[J]. Mutat Res, 2003, 534(1-2): 155-163.
- [17] Gaspari L, Chang SS, Santella RM, *et al* Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility[J]. Mutat Res, 2003, 535(2): 155-160.
- [18] Wellejus A, Poulsen HE, Loft S. Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells *in vivo* and *in vitro*[J]. Free Radic Res, 2000, 32(1): 75-83.
- [19] Quintanilla-Vega B, Hoover D, Bal W, *et al* Lead effects on rotamine-DNA binding[J]. Am J Ind Med, 2000, 38(3): 324-329.
- [20] Duty SM, Singh NP, Silva MJ, *et al* The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral Comet assay[J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(9): 1164-1169.
- [21] Xu DX, Zhu QX, Zheng LK, *et al* Exposure to acrylonitrile induced DNA strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa[J]. Mutat Res, 2003, 537(1): 93-100.
- [22] Revel A, Raanani H, Younglai E, *et al* Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene[J]. Reprod Toxicol, 2001, 15(5): 479-486.
- [23] Nakai N, Murata M, Nagahama M, *et al* Oxidative DNA damage induced by toluene is involved in its male reproductive toxicity[J]. Free Radic Res, 2003, 37(1): 69-76.
- [24] Homma-Takeda S, Hiraku Y. 2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite[J]. Free Radic Res, 2002, 36(5): 555-566.
- [25] Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M, *et al* Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*[J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39(12): 1205-1210.

(下转 646页)

- rectile dysfunction in three cities of China: a community-based study[J]. *Asian J Androl*, 2004, 6(4):343-348.
- [3] 饶可,杜广辉,杨为民. 血脂异常与男性勃起功能的相关性研究[J]. *中华男科学杂志*, 2005, 11(2):112-115.
- [4] Seftel AD, Sun P, Swindle R. The prevalence of hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus and depression in men with erectile dysfunction[J]. *J Urol*, 2004, 171(6 Pt 1): 2341-2345.
- [5] Wei M, Macera CA, Davis DR, *et al* Total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol as important predictors of erectile dysfunction[J]. *Am J Epidemiol*, 1994, 140(10): 930-937.
- [6] Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, *et al* Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts male aging study[J]. *J Urol*, 1994, 151(1): 54-61.
- [7] Roumeguere T, Wespes E, Carpentier Y, *et al* Erectile dysfunction is associated with a high prevalence of hyperlipidemia and coronary heart disease risk[J]. *Eur Urol*, 2003, 44(3): 355-359.
- [8] Sullivan ME, Keoghane SR, Miller MA. Vascular risk factors and erectile dysfunction[J]. *BJU Int*, 2001, 87(9): 838-845.
- [9] Azadzi KM, Goldstein I. Erectile dysfunction due to atherosclerotic vascular disease: the development of an animal model[J]. *J Urol*, 1992, 147(6): 1675-1681.
- [10] Yesilli C, Yaman O, Anafarta K. Effect of experimental hypercholesterolemia on cavernosal structures[J]. *Urology*, 2001, 57(6): 1184-1188.
- [11] Wespes E, Goes RM, Schiffmann S, *et al* Computerized analysis of smooth muscle fibers in potent and impotent patients[J]. *J Urol*, 1991, 146(4): 1015-1017.
- [12] Gholami SS, Rogers R, Chang J, *et al* The effect of vascular endothelial growth factor and adeno-associated virus mediated brain derived neurotrophic factor on neurogenic and vaculogenic erectile dysfunction induced by hyperlipidemia[J]. *J Urol*, 2003, 169(4): 1577-1581.
- [13] Bakircioglu ME, Hsu K, El-Sakka A, *et al* Effect of a Chinese herbal medicine mixture on a rat model of hypercholesterolemic erectile dysfunction[J]. *J Urol*, 2000, 164(5): 1798-1801.
- [14] Azadzi KM, Saenz de Tejada I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle[J]. *J Urol*, 1991, 146(1): 238-240.
- [15] Sullivan ME, Dashwood MR, Thompson CS, *et al* Down-regulation of endothelin-B receptor sites in cavernosal tissue of hypercholesterolemic rabbits[J]. *Br J Urol*, 1998, 81(1): 128-134.
- [16] Papadoukakis S, A lamani C, Mitropoulos D, *et al* Morphologic findings and blood flow parameters of penile vasculature in patients with erectile dysfunction[J]. *World J Urol*, 2004, 22(4): 285-288.
- [17] Ryu JK, Han JY, Chu YC, *et al* Expression of cavernous transforming growth factor-beta1 and its type II receptor in patients with erectile dysfunction[J]. *Int J Androl*, 2004, 27(1): 42-49.
- [18] 陈敏章,邵丙扬主编. *中华内科学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 1999. 3272-3277.
- [19] Saltzman EA, Guay AT, Jacobson J. Improvement in erectile function in men with organic erectile dysfunction by correction of elevated cholesterol levels: a clinical observation[J]. *J Urol*, 2004, 172(1): 255-258.
- [20] Mcfarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, *et al* Clinical review145: pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(4): 1451-1458.
- [21] Hattori Y, Nakanishi N, Kasai K. Statin enhances cytokine-mediated induction of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovas Res*, 2002, 54(3): 649-658.
- [22] Puddu P, Puddu GM, Muscari A. HMG-CoA reductase inhibitors: Is the endothelium the main target[J]? *Cardiology*, 2001, 95(1): 9-13.
- [23] Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, *et al* Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans[J]. *Biol Reprod*, 1999, 60(2): 398-404.
- [24] Byrne RR, Henry CD, Rao DS, *et al* Vascular endothelial growth factor restores corporeal smooth muscle function *in vitro* [J]. *J Urol*, 2001, 165(4): 1310-1315.
- [25] Dai Q, Silverstein AD, Davies MG, *et al* Systemic basic fibroblast growth factor induces favorable histological changes in the corpus cavernosum of hypercholesterolemic rabbits[J]. *J Urol*, 2003, 170(2 Pt 1): 664-668.

(徐建平 编发)

(上接 642页)

- [26] Cordelli E, Fresegha AM, Leter G, *et al* Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation[J]. *Radiat Res*, 2003, 160(4): 443-451.
- [27] Hoyes KP, Lord BI, McCann C, *et al* Transgenerational effects of preconception paternal contamination with (55) Fe[J]. *Radiat Res*, 2001, 156(5 Pt 1): 488-494.
- [28] Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, *et al* Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the Comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(3): 854-861.
- [29] Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(6): 1420-1430.
- [30] Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(4): 357-358.
- [31] Younglai EV, Holt D, Brown P, *et al* Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(9): 1950-1953.
- [32] Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, *et al* Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(10): 2160-2165.
- [33] Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, *et al* Genomic instability in mice lacking histone H2AX [J]. *Science*, 2002, 296(5569): 922-927.
- [34] Hsia KT, Millar MR, King S, *et al* DNA repair gene Ercc1 is essential for normal spermatogenesis and oogenesis and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse [J]. *Development*, 2003, 130(2): 369-378.
- [35] Chen H, Chow PH, Cheng SK, *et al* Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster[J]. *J Androl*, 2003, 24(5): 704-711.
- [36] Sierens J, Hartley JA, Campbell MJ, *et al* *In vitro* isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm [J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2002, 22(3): 227-234.
- [37] Shukla Y, Taneja P. Antimutagenic effect of black tea extract using 'rodent dominant lethal mutation assay' [J]. *Toxicology*, 2001, 168(3): 269-274.

(程童大 编发)