

雄性不育大鼠近交系 MIJ 的建立 及其遗传特征观察

刘军须^① 蔡月花^① 张敬各^② 刘福英^{①*}

(^① 河北医科大学实验动物学部 河北省实验动物重点实验室 石家庄 050017;

^② 河北医科大学法医学系 石家庄 050017)

摘要: 以发现的雄性不育大鼠的正常表型同胞鼠为种鼠, 通过全同胞近亲交配方式, 采用选优法成功培育出自发性不育大鼠近交系 MIJ。同系异体皮肤移植验证其遗传纯合度, 观察其表型特征, 并通过遗传测交试验测定雄性不育性状的遗传方式。结果表明, MIJ 种群符合近交系标准; 雄性不育大鼠呈睾丸下降延迟、睾丸及附睾发育迟缓、精子数量少及精子生成障碍; 近交系内其他个体表型正常。不育性状呈隐性遗传方式, 由常染色体上单一隐性基因控制。该雄性不育大鼠可作为人类男性不育研究的动物模型。

关键词: 雄性不育; 近交系; 大鼠; 遗传特征; 小睾丸

中图分类号: Q321+.7, Q38 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2008)05-37-08

Establishment and Genetic Characteristics of Rat Inbred Strain MIJ with Spontaneous Male Infertility

LIU Jun Xu^① CAI Yue-Hua^① ZHANG Jing Ge^② LIU Fu Ying^{①*}

(^① Department of Laboratory Animal Science, Hebei Medical University, Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science, Shijiazhuang 050017;

^② Faculty of Forensic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: The normal sibling rats of the infertile male were selected for brother sister breeding. The stocks of every filial generation whose male siblings were infertile were inbred with their brothers or sisters by optimum seeking method. After 20 generations, a rat inbred strain of spontaneous male infertility was established, and was named MIJ. The genetic homozygosity was analyzed by skin grafting. The phenotypes of MIJ were observed, and the mode of infertility inheritance was studied by test cross experiments. The results demonstrated that MIJ rats had reached the norm of inbred strain, and the infertile male rats showed the phenotypes of delayed testicular descent, testicular and epididymis hypoevolutism, oligozoospermia and hypospermatogenesis. The phenotypes of the other rats in the inbred strain were normal. The infertility mutation was inherited in a recessive mode, and was controlled by a monogenic recessive gene in euchromosome. The infertile male rats could serve as a useful model for the study of human infertility.

Key words: Male infertility; Inbred strain; Rat; Genetic characteristic; Small testis

基金项目 河北省科技攻关计划项目(No. 07275503), 河北省科技条件建设项目(No. 2008090008);

* 通讯作者, E-mail: lfy@hebm. edu. cn;

第一作者介绍 刘军须, 男, 硕士, 副教授; 研究方向: 实验动物遗传学; E-mail: liujx6688@sina. com.

收稿日期: 2007-12-30, 修回日期: 2008-07-10

Giwercman 等人研究表明,人类近半个世纪以来先天性生殖系统畸形的发病率有着成倍增加的趋势^[1],其原因有染色体畸变和基因突变。利用动物模型研究可以寻找引起动物不育的遗传缺陷,进而确定人类与动物同源的类似基因,并阐明该基因的功能。因此,建立针对雄性不育这一性状的遗传模型,观察基因突变与表型的关系,对于研究男性不育的发病机理有非常重要的作用。

近交系动物是具有基因高度纯合性与一致性、实验结果重复性好的实验材料,现已被广泛应用于生命科学研究各方面。2003年在本实验室以 Wistar 大鼠为基代进行近交培育的大鼠群中发现一只睾丸发育迟缓的不育大鼠。利用此大鼠的表型正常同胞鼠,进行了雄性不育大鼠近交系的培育,至今已至 F20 代,并命名为 MIJ;同时对雄性不育大鼠的表型和遗传特征进行了观察,以期培育出更为适合生殖医学研究应用的动物模型。

1 材料与方法

1.1 雄性不育大鼠近交系 MIJ 的培育 本品系基代来源于本实验室保持的清洁 Wistar 大鼠封闭群。实验动物在屏障环境中饲养。相关环境指标按照国家《实验动物 环境及设施》标准(GB 14925-2001)执行,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2003-0026。饲料按照国家《实验动物配合饲料标准》(GB 14924-2001)执行,自由饮水。

以 Wistar 大鼠封闭群中选择出的 1 雄 1 雌表型正常鼠(3 月龄)作为 F0 代动物,进行交配繁殖。在其子代中挑选 5 对全同胞兄妹,作为 F1 代种鼠。在全同胞兄妹交配的原则下,建立 5 条繁殖线,连续进行近交培育。

2003 年,近交培育至 F7 代时,在其子代中发现 1 只雄性大鼠不育。对其进行观察发现,该不育大鼠睾丸发育明显比正常大鼠迟缓,呈小睾丸症状。因此,选择该不育大鼠的同胞鼠(雄性睾丸发育正常)进行繁殖,在后代中陆续发现表型相同的不育个体,且未发现微生物、营

养、环境等其他因素的不利影响,证明该不育性状可以遗传。

随后,选择不育个体的全同胞鼠作为 F8 代种鼠,多个繁殖对扩大繁殖数量。在全同胞兄妹交配的原则下,以后每代至少保留 5 条繁殖线,继续近交培育。后续繁殖线以雄性不育为选育指标,按选优法系统繁殖。即后续繁殖线的取舍以后代是否出现小睾丸不育个体为准,有意识保留出现不育个体较多的繁殖线。由于不育的影响,后代数量少时,完全留种以扩群。每对繁殖大鼠都设立繁殖卡,详细记录同胞对的编号、亲本编号、近交世代、配种日期、产仔日期、窝产仔数等。汇总繁殖卡,绘制谱系图,以记录各代各繁殖对之间的亲缘关系。

1.2 遗传纯合度检测 MIJ 近交系内随机抽取大鼠 12 只,3 月龄,其中小睾丸不育大鼠 3 只、正常表型雄性大鼠 3 只、雌性大鼠 6 只。按 GB/T 14927.2-2001 遗传检测方法,进行同性别同系异体皮肤移植试验,以检测 MIJ 近交系大鼠的组织相容性基因是否纯合。

1.3 生物学特征观察

1.3.1 生长发育状况 对比观察 Wistar 大鼠与 MIJ 大鼠的生长发育状况。

1.3.2 MIJ 大鼠睾丸系数、附睾系数测定 选择 3 月龄清洁 Wistar 雄性大鼠(正常组)6 只、MIJ 正常表型雄性大鼠(系内正常组)6 只、MIJ 雄性不育大鼠(不育组)8 只。大鼠称重,颈椎脱臼法处死,解剖并对比观察各组大鼠内部脏器发育状况。摘取双侧睾丸、附睾,迅速剥去周围脂肪组织及结缔组织,称重,计算睾丸系数、附睾系数。睾丸系数 = (双侧睾丸重量/体重) × 100%; 附睾系数 = (双侧附睾重量/体重) × 100%。

1.3.3 精子质量测定 取双侧附睾尾,称重。将附睾尾置入 37℃ 预热的 3 ml 生理盐水中洗去表面血液,静置 1 min。随后转移到另一个盛有 37℃ 预热的生理盐水的培养皿中,生理盐水的量按照 1 g 附睾尾给予 20 ml 生理盐水的方法量取。用眼科剪刀沿附睾尾纵向作 3~4 个深切口,置 37℃ 恒温培养箱中扩散 10 min,使精

子充分游出。去掉组织碎片, 收集精子悬液。

将精子悬液吹打混匀, 用计数板在光镜($\times 400$)下以精子头为准连续计数。观察精子活力, 计数各活动等级的精子数, 共记录 200 个精子。精子活动能力分级标准参照 WHO 推荐标准: A 级为精子活动良好, 快速直线向前运动; B 级为精子活动比较活泼, 呈曲线泳动, 慢或呆滞前向运动; C 级为精子活动迟缓, 非向前运动; D 级为精子不活动。A、B、C 级精子合计在总计数精子中所占比例为精子活率; A、B 级精子数在总计数精子中所占比例为前向运动精子百分率。

用计数板, 按红细胞计数法计数精子数量, 每个样本记数 2 块板共 4 个记数池, 取平均值, 计算每克附睾尾中的精子数为精子密度, 计算每只大鼠双侧附睾尾中的精子总数为附睾尾精子总数。高倍镜下于计数板中每个样本观察 500 个精子, 计数其中的畸形精子数量, 并计算精子畸形率。各参数指标检测由专人负责, 多次重复取平均值。

1.3.4 睾丸组织学观察 取睾丸、附睾, 10% 中性甲醛溶液固定, 常规石蜡切片, H. E 染色, 光镜观察组织学变化。

1.3.5 数据结果用 SPSS 12.0 统计软件进行方差分析。

1.4 缺陷基因遗传分析

1.4.1 染色体分析 Wistar 雄性大鼠(正常组)、MIJ 正常表型雄性大鼠(系内正常组)、MIJ 雄性不育大鼠(不育组)各 6 只, 3 月龄。

取大鼠, 腹腔内注射秋水仙素($2.0 \mu\text{g/g}$ 体重), 3 h 后取骨髓细胞, 常规方法制片, G 带染色, 选择 50 个分散良好、染色体形态规整的中期分裂相, 进行染色体分析, 计算染色体数目, 对比分析三组大鼠染色体核型, 观察有无染色体畸变。

1.4.2 遗传测交试验 自正常 Wistar 大鼠繁殖群中, 选择实验鼠, 条件是其同胞鼠及子代中未出现异常表型个体, 即为野生型雄鼠和野生型雌鼠。自近交系中选择实验鼠, 条件是其同胞鼠及子代中曾出现不育个体, 即为系内正常

雄鼠和系内雌鼠。同时, 选择 3 月龄小睾丸个体为实验鼠, 即为不育雄鼠。分别取上述大鼠按 1:1 的比例配对, 进行遗传测交试验, 观察统计后代的表型, 根据结果验证缺陷基因遗传方式。数据结果进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 培育结果 至今全同胞兄妹交配方式连续繁殖已至 F20 代, 成功培育出雄性不育大鼠近交系, 并命名为 MIJ, 其中 MI 指 male infertility (雄性不育), J 为河北“冀”汉语拼音首字母。

2.2 遗传纯合度检测 皮肤移植试验结果显示, 1 只正常表型雄性大鼠因包扎脱落, 皮片随之脱落, 导致试验失败; 其他大鼠经 100 d 观察, 未发现有急、慢性排斥反应, 自体移植、同系异体移植全部成活, 植皮为永久性接受。说明经 20 代近交培育, MIJ 大鼠品系内的组织相容性抗原一致, 基因具有高度纯合性, 种群符合近交系标准。且雄性不育个体与正常表型雄性个体之间无排斥反应, 植皮可以成活。

2.3 生物学特征观察

2.3.1 生长发育状况 MIJ 大鼠毛色与 Wistar 大鼠相同, 为白化。不育个体出生后发育基本正常, 与系内正常表型雄鼠尚难区分。至 28 日龄左右, 系内正常表型雄鼠可观察到阴囊皮肤松弛, 出现皱褶; 睾丸下降至阴囊内, 使之充盈, 此时可观察并触摸到睾丸。而不育个体 28 日龄时阴囊扁平, 无皱褶, 不能触摸到睾丸; 至 45 日龄左右, 阴囊发育始有皱褶, 睾丸开始下降; 至 60 日龄左右睾丸完全降入阴囊, 但明显比同龄系内正常表型雄鼠的睾丸小, 即不育大鼠呈睾丸下降延迟、小睾丸症状。系内正常组与正常组雄鼠和雌鼠外观及发育过程基本相同; 雌鼠发育正常, 成年体重 200~250 g 左右。三组大鼠行为为无异常, 未发现假两性畸形者。

上述缺陷表型在不育组大鼠表现一致, 在不育组与正常组之间未发现中间表型个体。

2.3.2 MIJ 大鼠睾丸系数、附睾系数测定 经解剖对比观察可见, 三组大鼠除生殖器官外, 其他器官未见明显差异。三组大鼠睾丸系数、附

辜系数的比较见表 1。不育组大鼠体重小于其他两正常组大鼠,不育组大鼠双侧辜丸重、双侧

附辜重、辜丸系数、附辜系数明显低于其他两正常组大鼠。即不育大鼠辜丸、附辜发育迟缓。

表 1 大鼠辜丸系数、附辜系数(Mean ± SD)
Table 1 The testicle index and epididymis index of male rats

组别 Group	n	体重 Body weight (g)	双侧辜丸重 Weight of double testicle (g)	双侧附辜重 Weight of double epididymis (g)	辜丸系数 Testicle index (%)	附辜系数 Epididymis index (%)
不育组 Infertility group	8	239.61±22.92	1.46±0.13	0.82±0.13	0.61±0.07	0.35±0.06
系内正常组 Control group from the inbred	6	278.12±27.72*	2.65±0.21**	1.21±0.11**	0.95±0.03**	0.43±0.03**
正常组 Control group	6	274.78±13.12*	2.69±0.10*	1.10±0.07*	0.98±0.05**	0.40±0.01*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与不育组比较 Compared with infertility group of same age.

2.3.3 精子质量测定 三组大鼠精子质量测定结果见表 2。结果可见,正常组与系内正常组大鼠附辜尾重、精子密度、附辜尾精子总数均显著高于不育组($P < 0.01$);正常组与系内正

常组大鼠精子胞浆小滴贮留率显著低于不育组($P < 0.01$);正常组与系内正常组大鼠精子畸形率、精子活率、前向运动精子百分率与不育组大鼠比较,无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2 三组大鼠精子质量比较(Mean ± SD)
Table 2 Comparison of sperm quality parameters in the three groups

组别 Group	n	附辜尾重 Cauda epididymis weight (g)	精子密度 Sperm concentration ($\times 10^7/g$)	附辜尾 精子总数 Sperm count in cauda epididymis	精子畸形率 Sperm deformity rate (%)	精子活率 Sperm motility (%)	前向运动 精子百分率 Percentage of forward progressive sperm (%)	精子胞浆小滴 贮留率 Percentage of rat epididymal sperm droplet retention (%)
不育组 Infertility group	8	0.19±0.046	4.51±2.91	0.83±0.49	13.03±6.80	82.06±9.01	64.37±13.15	53.38±12.54
系内正常组 Control group from the inbred	6	0.33±0.053**	14.96±4.77**	5.03±0.49*	11.35±5.73	86.09±8.55	65.59±10.68	34.97±10.57*
正常组 Control group	6	0.34±0.054**	15.64±4.35**	5.27±1.42*	14.23±6.40	84.95±6.31	67.43±12.56	36.75±10.84*

** $P < 0.01$, 与不育组比较 Compared with infertility group.

光镜下观察,大鼠精子头部为镰刀状,由细胞核和顶体组成;尾部较长(图 1A)。有时可见精子胞浆小滴(图 1B),多位于尾部中段,此时活体精子尾部明显弯曲,呈“龙舟”状。精子畸形主要发生在头部,表现为不正常头形(图 1: C~G),如无钩、钩短(图 1C)、双头(图 1D)、圆头(图 1E)、不定形(图 1: F~G)、无尾(图 1H)等;颈部畸形表现有颈折叠;尾部畸形表现有无头(图 1I)、尾折叠(图 1J)等,其中无头、无尾可能为精子自颈部断开所致。精子的畸形表现在不育个体和正常个体之间无显著差异。

可见不育大鼠表现精子生成障碍,精子数量明显减少;但除精子胞浆小滴贮留率外,其他反映精子成熟度的指标与正常大鼠无明显差异。

2.3.4 辜丸组织学观察 正常组大鼠:曲细精管完整,生精上皮细胞排列规则,层次结构清晰,为 6~9 层。精子细胞体积小,核深染,位置近管腔。管腔内可见大量的精子细胞和精子。支持细胞发育良好。间质细胞丰富,基底膜整齐规则(图 2A)。附辜管腔扩大,管壁变薄,内可见极大量精子及少量脱落细胞。

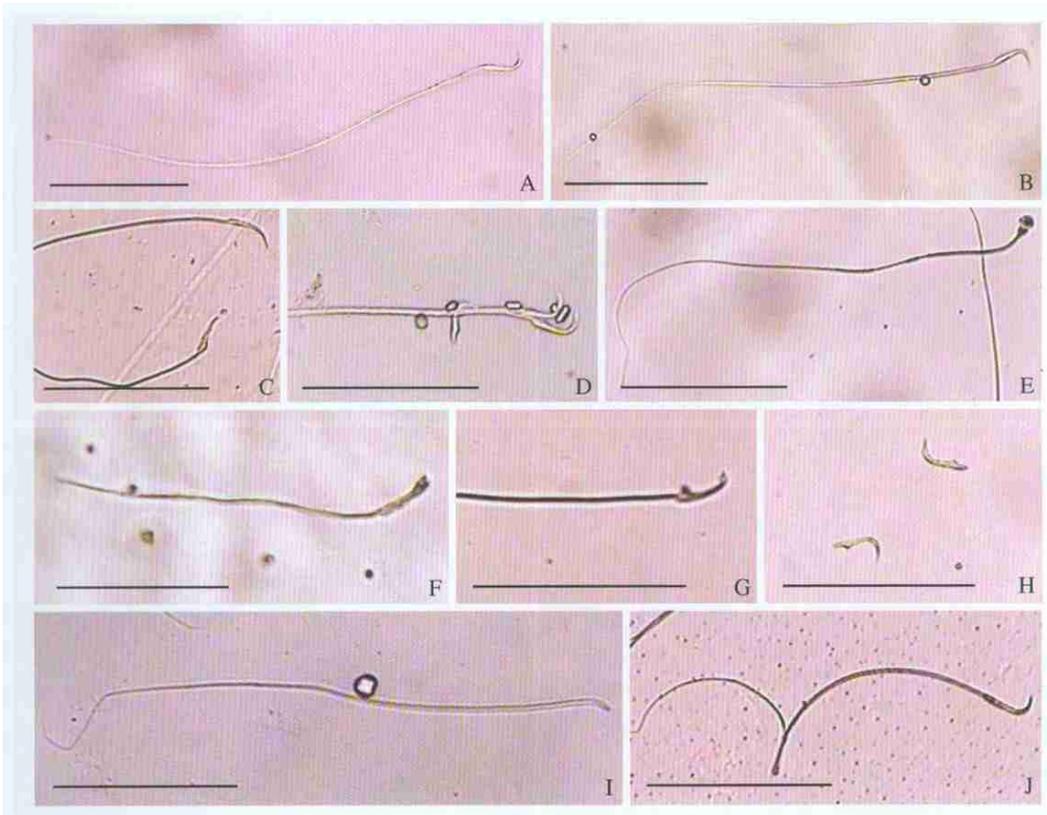


图 1 大鼠精子

Fig. 1 Sperm of the rats

A. 正常精子; B. 正常精子(示胞浆小滴); C~ J. 畸形精子。标尺= 50 μm

A. Normal sperm; B. Normal sperm (sperm droplet was showed); C~ J. Teratosperm. Bar= 50 μm

系内正常组大鼠: 睾丸、附睾结构与正常组大鼠基本相同。

不育组大鼠: 生精上皮细胞排列松散紊乱, 层次明显减少, 为 3~ 5 层。大量细胞空泡样变, 腔内可见少量精子细胞、精子; 间质细胞数量少(图 2B)。与其他两正常组相比, 附睾管腔相对细小, 管内精子数量明显较少, 多黏液、脱落细胞。

2.4 缺陷基因遗传分析

2.4.1 染色体分析 经染色体 G 带分析, 各组大鼠染色体核型均为 $2n=42$ 条, 不育组大鼠染色体未发现数目和结构异常。

2.4.2 单基因遗传 由 MIJ 近交系中不育个体的睾丸重、睾丸系数等生物学特性可知, 缺陷表型稳定, 缺陷大鼠与正常大鼠之间未发现中

间症状个体, 这与多基因遗传的变异连续分布特性不符合, 表明缺陷基因为单基因遗传。

2.4.3 小睾丸个体生殖能力 不育雄性大鼠 30 只与野生型雌性大鼠、系内雌性大鼠配对 6 个月, 未观察到仔鼠出生(表 3)。说明表型为小睾丸的大鼠无生育能力, 为不育个体。

2.4.4 缺陷基因的显隐性关系 系内正常雄性大鼠 15 只与野生型雌鼠配对 2 个月, 全部观察到仔鼠出生, 仔鼠中无不育雄鼠出现。系内正常雄性大鼠 25 只与系内雌性大鼠配对 2 个月, 全部观察到仔鼠出生, 其中正常表型雄性仔鼠 116 只, 不育雄性仔鼠 72 只(表 3)。以上结果联系 MIJ 近交系的培育过程, 表明近交系内正常表型的雄性大鼠有生育能力, 且缺陷基因为隐性遗传。

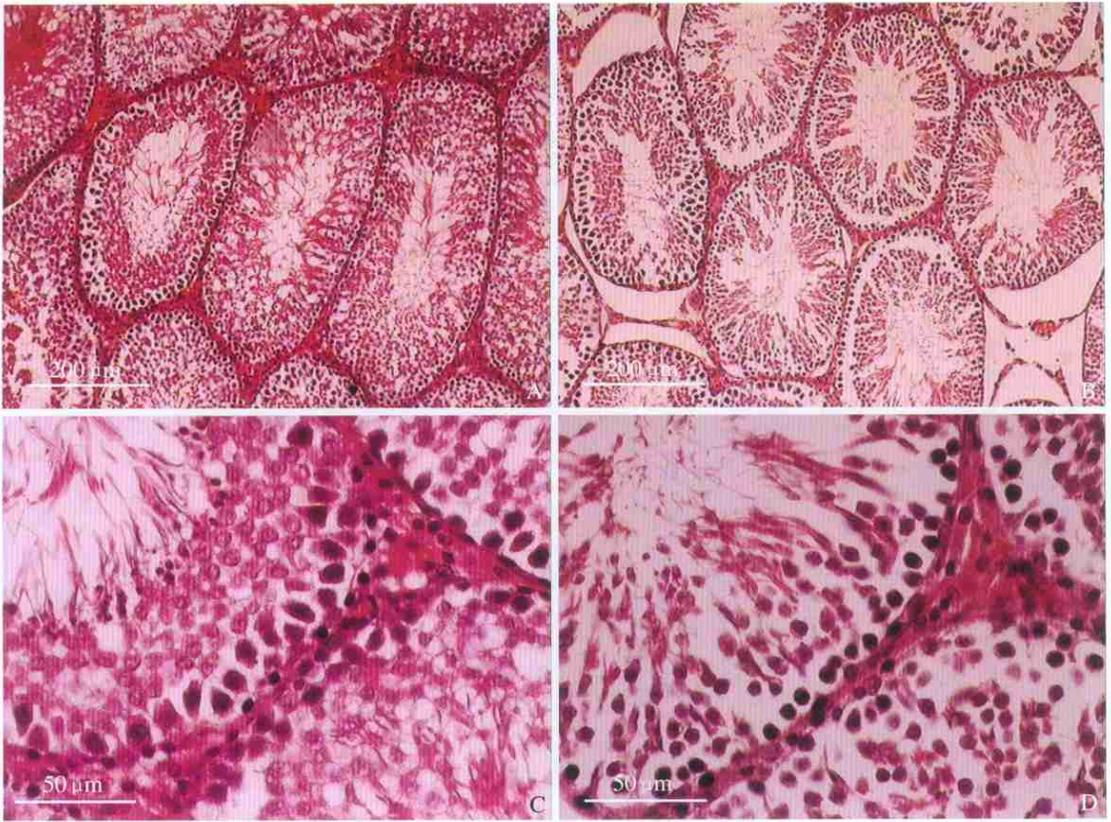


图 2 大鼠睾丸组织

Fig. 2 Testis of the rats

A: 正常组, H. E × 100; B: 不育组, H. E × 100; C: 正常组, H. E × 400; D: 不育组, H. E × 400.

A: Control group, H. E × 100; B: Infertility group, H. E × 100; C: Control group, H. E × 400; D: Infertility group, H. E × 400.

表 3 遗传测交试验结果

Table 3 The results of test cross experiments

交配方式 Mating mode	交配对数 Pair number	产仔窝数 Number of litters	仔数(只) Number of young rats	雌仔鼠数(只) Number of female young rats	不育雄鼠数(只) Number of infertility male young rats	表型正常雄鼠数(只) Number of normal phenotype male young rats
○□ 互交 Intercross	12	22	217	108	0	109
○◇ 回交 Backcross	15	26	286	135	0	151
○■ 杂交 Outcross	15	0	0	0	0	0
◎□ 回交 Backcross	20	31	291	139	0	152
◎◇ 互交 Intercross	25	41	352	164	72	116
◎■ 回交 Backcross	15	0	0	0	0	0

□ 野生型大鼠 ♂; ○ 野生型大鼠 ♀; ◇ 系内正常大鼠 ♂; ◎ 系内大鼠 ♀; ■ 不育大鼠 ♂。

□ Wild type male rat; ○ Wild type female rat; ◇ Male rat from the inbred; ◎ Female rat from the inbred; ■ Infertility male rat.

2.4.5 缺陷基因的位置 由遗传测交试验结果可知,系内雌性大鼠 20 只与野生型雄鼠配对 2 个月,全部观察到仔鼠出生,仔鼠中无不育雄鼠出现。系内雌性大鼠 25 只与系内正常

雄性大鼠配对 2 个月,全部观察到仔鼠出生,仔鼠中出现 72 只不育雄鼠(表 3)。

根据 X 染色体基因遗传特点,假如该缺陷基因位于 X 染色体上,则当雄鼠携带缺陷

基因时, 表现为小睾丸表型; 不携带缺陷基因时, 表现为正常表型。本实验中选择出的雌鼠如为缺陷基因携带者, 这时该种雌鼠与野生型雄鼠的后代中雄性不育个体出现的比率应该为雄性个体数量的 50% 左右。而本实验结果

表明, 这样的交配并无不育个体出现(表 4)。可见, 本缺陷基因的遗传方式不符合 X 染色体上的伴性遗传规律, 因而缺陷基因不位于 X 染色体上。

表 4 不育性状遗传方式的 χ^2 检验(假设缺陷基因位于 X 染色体上)

Table 4 χ^2 test for the inheritance of infertility (on the assumption that the gene is on the X chromosome)

交配方式 Mating mode	仔数(只) Number of young rats	雌仔鼠数(只) Number of female young rats	不育雄鼠数(只) Number of infertility male young rats	表型正常雄鼠数(只) Number of normal phenotype male young rats	χ^2	P
○□回交 Backcross	291	139	0	152	682.84	< 0.01
期望值 Expected value	291	145.5	72.75	72.75		

同时, 由于缺陷基因导致雄性不育, 因而缺陷基因也不可能位于 Y 染色体上, 否则缺陷基因将不能遗传。上述结果排除了缺陷基因位于性染色体上的可能性, 表明缺陷基因位于常染色体上。

综上所述, 不育性状受常染色体上单一隐性基因控制。

3 讨论

近亲繁殖过程中, 随着纯合基因位点的增多, 有害的隐性基因暴露增多, 当隐性基因纯合时, 常表现出遗传缺陷。本 MIJ 近交系雄性不育性状的出现机理就可能基于 Wistar 群体中携带的可引起雄性不育表型的隐性基因在高度近交下的纯合暴露。另一方面, 新发生的突变被固定下来, 从而出现呈小睾丸特征的雄性不育个体, 也是可能的原因。

遗传测交试验证实不育性状的遗传方式为常染色体上单一隐性基因遗传。以不育个体的同胞鼠, 即携带缺陷基因的正常表型鼠为种鼠进行近交培育, 在雌雄个体均携带缺陷基因的情况下, 可产生缺陷基因纯合的个体。以上述方式, 通过近交与定向选育, 进行反复留种与淘汰, 缺陷基因及其等位基因被保留下来, 而除缺陷基因外的其他基因纯合, 最终建立了自发雄性不育大鼠近交系 MIJ。经同系异体皮肤移植试验证实, MIJ 近交系内的组织相容性抗原一

致, 基因具有高度纯合性, 种群符合近交系标准。经查大鼠基因组数据库(Rat Genome Database), 国内外未发现类似近交系大鼠培育成功的报道。

生殖系统的发育是一个极其复杂的过程, 受到很多基因的调控。目前已发现多个基因突变可导致雄性动物不育表型^[2-6]。如小睾丸(microrchidia)鼠^[7], 由于插入突变, 导致雄性纯合小鼠不育, 表现为睾丸明显缩小, 精子发生障碍主要出现在细线期或偶线期, 同时有大量生殖细胞凋亡。控制 MIJ 大鼠不育性状基因分子遗传学机制有待进一步的研究探讨。

通过动物模型研究人类生育缺陷是不育机制研究的主要手段, 并起到关键的作用。自发生殖缺陷动物模型来源于自然发生的具生殖缺陷的动物, 其优点在于自然发病、病程更接近于人类, 以此为基础进行研究, 可以多方面研究缺陷发生的机理及遗传基础, 甚至发现新的生殖调控机制。观察 MIJ 大鼠生物学特征发现, MIJ 缺陷大鼠表现睾丸下降延迟、睾丸及附睾发育迟缓、精子数量少、精子生成障碍等特征, 表明不育大鼠因缺陷基因纯合, 导致睾丸、附睾发育受阻, 使成熟精子数量大量减少, 造成不育^[8]。这与人类某些男性生殖障碍的小睾丸、少精、生精障碍等症状类似。同时, 由于雄性不育近交系培育成功, 雄性不育个体有稳定的来源和质量, 即可以提供遗传背景一致的不育个体及正

常对照个体参与相关研究, 因此, MIJ 大鼠有望成为研究人类男性不育机理与治疗的一个理想材料。

参 考 文 献

[1] Givercman A, Carlsen E, Keiding N, *et al.* Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: A review. *Environ Health Perspect*, 1993, **101**(Suppl 2): 65~ 71.

[2] Li X, Nokkala E, Yan W, *et al.* Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase. *Endocrinology*, 2001, **142**(6): 2 435~ 2 442.

[3] Kotaja N, De Cesare D, Macho B, *et al.* Abnormal sperm in mice with targeted deletion of the act (activator of cAMP-responsive element modulator in testis) gene. *PNAS*, 2004, **101** (29): 10 620~ 10 625.

[4] Nakamura T, Yao R, Ogawa T, *et al.* Oligo asthenot

teratozoospermia in mice lacking Cnot17, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat Genet*, 2004, **36**(5): 528~ 533.

[5] Kress C, Gautier Courtaille C, Osborne H B, *et al.* Inactivation of CUG-BP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(3): 1 146~ 1 157.

[6] Hrabovszky Z, Farmer P J, Hutson J M. Undescended testis is accompanied by calcitonin gene related peptide accumulation within the sensory nucleus of the genitofemoral nerve in trans scrotal rats. *J Urol*, 2001, **165**(3): 1 015~ 1 018.

[7] Watson M L, Zinn A R, Inous N, *et al.* Identification of *morc* (*microarchidia*), a mutation that results in arrest of spermatogenesis at an early meiotic stage in the mouse. *PNAS*, 1998, **95**(24): 14 361~ 14 366.

[8] Sairam M R, Krishnamurthy H. The role of follicle stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. *Arch Med Res*, 2001, **32**(6): 601~ 608.

(上接第 30 页)

②图表: 力求精选, 反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码, 在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制, 激光打印机打印; 照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片, 应注明长度标尺和放大倍数。

参考文献 应列出与本文直接有关的中外文主要文献, 未公开发表的文献可作脚注处理。本刊文献的著录格式采用顺序编码制, 即以文献在文中出现的先后顺序连续编码, 加方括号标注在文中引用处, 文后文献表的文献要与文中一致, 并按文中的顺序排列, 多名作者须在列出前三名作者后加“等”。具体格式要求为:

①期刊: 作者. 题名. 刊名(外文刊用斜体), 出版年, 卷(期) 号: 起止页码. 示例:

[1] 郑光美. 黄腹角雉. *动物学杂志*, 1987, **22**(5): 40~ 43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Testudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, **33**(6): 38~ 45.

②专著: 作者. 书名. 版本(第一版不标注). 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[3] 孙儒泳编著. *动物生态学原理*(第二版). 北京: 北京师范大学出版社, 1992, 329~ 330.

[4] Jiang Zh G ed. *Conservation Biology*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997, 160~ 164.

③论文集: 作者. 题名. 见(英文用 In): 编者. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[5] 陈大元. 动物显微受精与克隆研究. 见: 中国动物学会主编. *中国动物科学研究*. 北京: 中国林业出版社, 1999, 59~ 64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China. In: Song D X ed. *Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China*. Beijing: Science Press, 1997, 395~ 399.