

我国男性避孕研究的发展前景*

刘以训

中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080

摘要 男性避孕研究长期未得到足够重视. 文中综述了国内外相关研究的最新进展. 重点评述了我国在用棉酚、长效睾酮和温浴睾丸作为抗精子发生所取得的成就和存在的问题, 提出了“睾丸局部温浴组合低剂量棉酚”, “长效睾酮组合低剂量棉酚”和“睾丸局部温浴组合缓释长效睾酮”3种不同组合的临床研究方案和理论依据. 对睾丸局部热压主要促进 I-IV 期和 IX-XII 精细胞凋亡, 长效睾酮主要促使 VII-VIII 期的精细胞凋亡, 而低剂量棉酚除对睾丸变态精子有作用外, 主要影响附睾精子. 这些组合各作用在精子发生的不同阶段, 通过不同的信息通路作用于精子发生和形成的不同位点, 优势互补, 可大大降低单独应用时的剂量、作用时间和强度, 避免各自使用时的副作用, 产生最大的组合效应, 符合安全、有效和可逆的理想结果.

关键词 男性避孕 精子发生 长效睾酮 睾丸局部温浴 棉酚 组合避孕药

环境恶化、人口增长和资源耗竭是困扰新世纪人类生存和经济发展的严峻问题. 人口多、底子薄和人均资源相对不足是制约中国社会和经济发展的关键问题. 有专家估计, 中国资源环境能支撑的最大人口容量为 15 亿~16 亿. 发展新的避孕方法, 合理调控我国人口的增长速度是我们面临的一项艰巨任务.

在我国, 多年来对男性生殖医学的研究没有引起足够重视. 在现有的避孕方法中, 女用约占 85%, 在男用的避孕措施中只有输精管结扎和避孕套. 但值得指出, 直视钳穿输精管绝育术是中国学者发明, 并受到世界卫生组织重视, 已推广到十几个发展中国家和地区, 在国际上是知名的技术; 输精管栓堵绝育术历经 20 多年努力, 不断完善, 在国内外得到较大规模的推广应用^[1,2]. 现有的避孕方法, 虽然在控制人口增长方面起到积极作用, 但都存在不同程度的副作用, 特别是不可逆的绝育手术约占现有避孕方法的一半以上^[2,3], 远远不能满

足人们对生殖健康和“知情选择”的需要. 21 世纪是科技高度发展和人类社会高度文明的世纪. 加强生殖医学基础研究, 利用现代生物技术, 发展安全有效和使用方便的新一代避孕方法, 以满足新世纪不同人群对生殖健康和“知情选择”的需求. 这是调控我国人口增长面临的一项重要任务.

1 发展新一代避孕方法的研究思路

避孕药的发展同生殖医学基础研究的突破密切相关^[4]. 20 世纪中期, 由于生殖内分泌学基础研究的重大突破, 美籍华人科学家张明觉教授与其同事首先发明了第一代女用口服甾体避孕药; 到 80 年代, 随着对激素受体研究的重大发现, 产生了第二代女用甾体避孕药. 随后, 由于多年来对生殖医学基础研究不够重视, 对人类自身生殖奥妙的认识滞后于现代生命科学的发展, 避孕科学的基础研究逐渐减弱^[4,5]. 现有的避孕方法基本上滞留在 20 世纪 80 年代的水平.

2003-08-07 收稿, 2003-09-02 收修改稿

* 国家自然科学基金重点项目(批准号: 30230190)、中国科学院知识创新方向性项目(KSCX-2-SW-202)和国家重点基础研究发展规划项目(G1999055901)资助

E-mail: liuyx@panda.ioz.ac.cn

避孕本身是科学地干扰人体的正常生理活动,要求既要有极高的成功率,又不能有明显副作用,它与疾病预防与治疗截然不同.此外,还要考虑到不同人群对避孕药物的反应存在着个体差异,不同的文化和经济背景又决定着不同人群对生育调节手段的不同要求.避孕不仅为了缓解人口增长,而且也是人们追求长久身心健康和某种完美生活方式的体现.生殖健康是头等大事,一定要有战略的思路和从发展的眼光去考虑问题.最近不少有远见的生物学家在 Science, Nature 上发表有关生育调控与生殖健康的专论^[4,5],强调指出,生殖医学基础研究是发展新避孕方法的关键;将现代生物学最新研究成果应用于生殖医学,多学科参与才有可能从研究思路和方法的创新上有所突破,发展新一代避孕手段.

发展新一代理想的避孕方法首先应精确了解某一生殖过程中容易被阻断而又不影响人体健康的关键薄弱环节,利用最新分子生物学手段和最新研究成就,确定控制这一生殖薄弱环节的关键基因或分子,以此为靶点,通过干扰此基因或分子的表达或阻断其功能,为发展新的避孕方法提供突破点.

2 男性避孕研究的发展

从生殖过程看(图1),主要生殖环节,如卵子发生和精卵运行,受精和受精卵运行,胚胎着床和

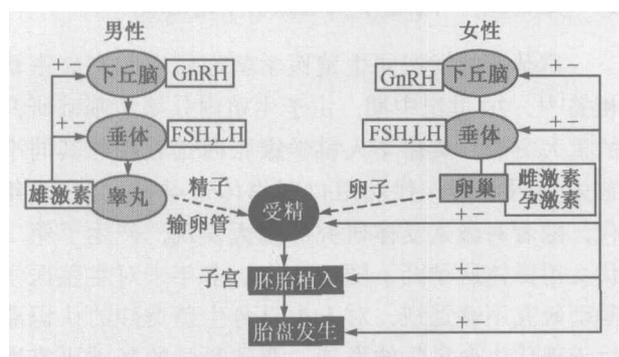


图1 人类主要生殖环节及其调节

下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH)调节垂体两种促性腺激素(FSH, LH)的分泌, FSH 和 LH 在女性调节卵巢甾体激素(雌激素和孕激素)合成和卵子发生;在男性调节睾丸雄激素分泌和精子发生. 睾丸和卵巢分泌的甾体激素又可反馈调节下丘脑和垂体的分泌功能. 卵子和精子在输卵管相遇并受精, 受精卵通过输卵管运行到子宫. 胚胎在子宫着床并发育到出生. 图中符号+表示正调节, -表示负调节

胚胎发育, 都是在女性生殖器官或生殖道内完成. 发展男性避孕方法只能着眼在睾丸和附睾水平上, 即如何有效地控制精子发生和精子成熟这两个环节. 应该说, 从精子发生和成熟过程中筛选和克隆到的关键相关基因或寻找到的特异抑制精子发生和成熟的外源分子为靶点, 通过抑制精子发生和它的成熟过程发展男性避孕药是安全和可行的. 干扰和阻断这些生殖薄弱环节的基因或分子不会影响人体健康, 是最安全有效的避孕途径和最佳突破口^[6-9].

精子发生从精原干细胞经有丝分裂增殖产生 2 倍体(44 + XY)的精原细胞, 它们发育分化为初级精母细胞, 后者通过 2 次减数分裂变为单倍体(22 + X 或 Y)的圆形生精细胞, 再经变态成为成熟精子, 完成大约 72 d 的生精周期. 在精子发生和成熟漫长的过程中涉及一系列特异基因有序的表达和表达产物的相互作用^[10,11]. 有证据表明, 遗传变异或不良环境因素可能会干扰这些基因的正常表达或其产物的相互作用, 造成精子发生障碍或畸形精子产生, 导致男性不育或出生缺陷. 在精子发生过程中是否有特异控制血睾屏障开放的基因? 是否在启动精原细胞减数分裂和控制减数分裂不同过程中存在特异基因? 是否有始动精细胞变态的特异因子? 从分子水平上弄清这些问题, 建立适当的动物模型, 筛选特异控制这些过程的功能基因, 就有可能设计最理想和最有效的男性避孕方法. 世界卫生组织、Rockefeller's 基金会、Mellow 和 Conrad 基金会以及美国 NIH 在 1995 和 1999 年曾两次组织召开国际专题讨论会, 研究 21 世纪男性生殖医学的发展和男性避孕的问题^[6]. 这两次讨论会对全球男性生殖生物学的研究起了很大的推动作用. 从 2000 年以来, 在国家重大基础研究发展规划基金支持下, 我国科学家从不同角度就控制精子发生和成熟的特异基因的筛选和克隆以及对其功能的研究取得重大进展, 许多研究成果已发表在包括 Science^[12]在内的国内外著名刊物上^[13-18]. 对其精子发生和成熟特异基因功能研究的进一步突破, 有望以其中的某些基因为靶分子为发展成为十分特异和理想的以阻断精子发生和成熟过程中某一关键环节为目的的男性避孕疫苗或药物提供理论基础. 应该指出, 这些研究工作, 虽然已取得重要进展, 但目前还没有借鉴可提

供发展男性避孕药的直接依据。

另一种发展男性避孕药的途径,是在了解精子发生和成熟分子机理的基础上寻找有效而无副作用的已知化合物,以达到特异阻断精子发生和成熟过程,达到男性避孕的目的。

3 庚酸睾酮和“热压”对精子发生的影响

男性激素类避孕药主要是通过抑制垂体促性腺激素释放而降低睾丸内源性激素的形成从而达到抑制精子发生^[7,8]。20世纪90年代初,在世界卫生组织和 Rockefeller's 基金资助下,我国科学家和国际合作研究组用高剂量庚酸睾酮(TU)或长效睾酮(T)作为男性避孕药以阻止精子发生获得成功,并在临床上试用^[19~21]。对其抗精子发生的分子机理也作了广泛深入研究。我们对恒河猴的实验证明,每周注射一次 TU,一周后精细胞开始发生凋亡,到第五周睾丸内精细胞凋亡达到高峰^[22],到7~8周精液中精子数下降为零^[23],并发现精细胞凋亡与 Fas/FasL^[22]和 Bcl-2 信息通路^[24]有关,而与热激蛋白和热激蛋白激活因子无关^[25]。

原认为高剂量外源 TU 通过抑制垂体促性腺激素(LH)释放,致使睾丸间质细胞分泌的内源睾酮下降,从而阻断精子发生^[19,20]。随后一系列实验结果表明,大剂量长效睾酮不是抑制垂体 LH 释放,而主要是抑制促卵泡刺激素(FSH)释放^[26~29]。最新研究发现,FSH 与睾丸 Sertoli 细胞分泌的抑制素(inhibin)相互作用对精子发生起重要调节作用,精子发生的抑制程度是同 FSH 水平直接有关,而与内源雄激素的产生和血中 LH 水平无直接关系^[26]。进一步研究证明,直接负反馈调节 FSH 分泌作用的是 inhibin β 。在精子发生中,FSH 的主要作用是调控精原 A 和 B 类细胞的增殖,并与雄激素协同调节精细胞的形成,促进圆型精细胞在 Sertoli 细胞的黏附,同时促进成熟精子从 Sertoli 细胞上释放出来,因而雄激素对精子发生也是必需的^[27~29]。我们在恒河猴睾丸 Sertoli 细胞中最早发现有 inhibin α 和 β 的表达,并且与精子发生密切相关^[30]。我们一系列在体和离体实验还证实,Sertoli 细胞还表达纤溶酶原激活因子(PA),其活性受 FSH 调节,并且与精子发生周期相关^[31~33]。在圆形精子的 VII~VIII 期和在排精(spermiation)的 IX~XII 期表达活性最

强,提示在 FSH 调控下,Sertoli 细胞产生的 PA 可能参与精子形成过程。

TU 虽然有很好的避孕效果,但高剂量和长期使用除引起注射部位局部疼痛外,在某些志愿受试者中出现乳房增大,高密度脂蛋白下降,甚至出现睾丸萎缩和性功能下降等副作用,影响了在临床上的推广应用。为了减少副作用,增加激素的有效性,一些特异性较强,副作用较小的雄激素衍生物已在临床上试用^[34]。

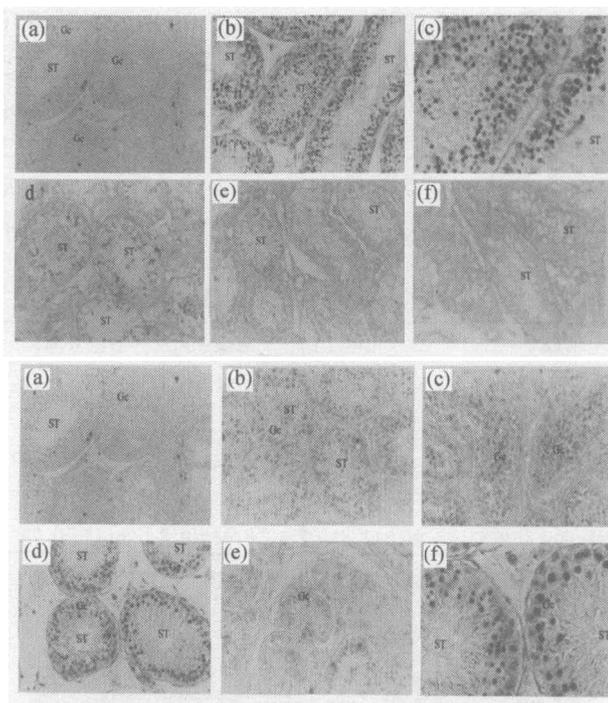


图2 温度和长效睾酮对恒河猴精子发生的影响

上图示 3'末端原位标记法显示恒河猴隐睾精细胞凋亡。将恒河猴一侧睾丸移于腹腔,另一侧睾丸仍留在阴囊作对照。在 37℃ 腹腔的睾丸,在手术后 5 d,绝大多数生精细胞凋亡。(a) 正常阴囊睾丸;(b)(d~f)分别表示手术后第 5, 10, 15, 20 d 的隐睾;(c)为(b)的放大(引自文献^[22])。下图示 3'末端原位标记法显示注射 11 酸睾酮对恒河猴睾丸精细胞凋亡的影响。每周给成年恒河猴注射一次 11 酸睾酮(20mg/kg),注射后 30 天精细胞凋亡达到高峰。(a)未经激素处理正常睾丸;(b~e)分别为药物处理后第 7, 14, 30 和 60 天的睾丸;(f)为(d)的放大。符号:GC 生精细胞,ST 曲细精管(引自文献^[35])

隐睾症患者不育,长期穿牛仔裤或在高温下工作的青年男子生育力下降,提示温度影响精子发生。为了深入探讨“热压”影响精子发生的分子机理,我们建立了两种“热压”动物模型。通过隐睾手术将一侧睾丸移于腹腔,对侧睾丸留在阴囊作为

对照；另一种模型就是将睾丸浸入 43℃ 温水中局部温浴 30 min. 对大鼠和恒河猴的隐睾手术研究结果发现，移入腹腔的睾丸 1~5 周内可见生精细胞(圆形精子和变态精子)几乎全部凋亡^[35]，但精原细胞的正常分裂并未受到明显影响(图 2). 实验证实，精细胞凋亡除通过 Fas/FasL 信号通路外，还与 Bcl-2 基因协同表达有关¹⁾. 有趣的是它与热激蛋白激活因子 HSP70-2 没有直接关系^[35,36]. 同时发现，37℃ 腹腔温度可诱发 Sertoli 细胞两种蛋白激酶 ERK1 和 ERK2 的磷酸化和导致 Sertoli 细胞微循环的改变，这可能也是诱发精细胞凋亡的重要原因之一^[36,37]. 最近我们同美国加州大学 Christina Wang 教授对食蟹猴的合作研究进一步证实，每天在 43℃ 温水中对其睾丸局部温浴 30 min(图 3)，连续两天共 60min 后，在终止温浴的一个月内，精液中精子

表 1 每 100 个 Sertoli 细胞中生精细胞凋亡数^{a)}

生精期	对照组	睾酮 1 周	睾酮 3 周	睾酮 6 周
I-IV	8.32 ± 1.87	5.69 ± 1.33	4.91 ± 0.31	5.98 ± 2.11
V-VI	0	0	0	0
VII-VIII	0	21.43 ± 3.33	37.29 ± 4.62	56.30 ± 7.47
IX-XI	1.59 ± 0.36	1.92 ± 0.22	1.88 ± 0.49	5.99 ± 1.59
XII-XIV	9.52 ± 2.51	12.86 ± 2.47	8.01 ± 0.84	6.55 ± 0.78

a) 睾酮主要通过诱发 VII-VIII 期生精细胞凋亡引起无精或少精(引自文献 39)

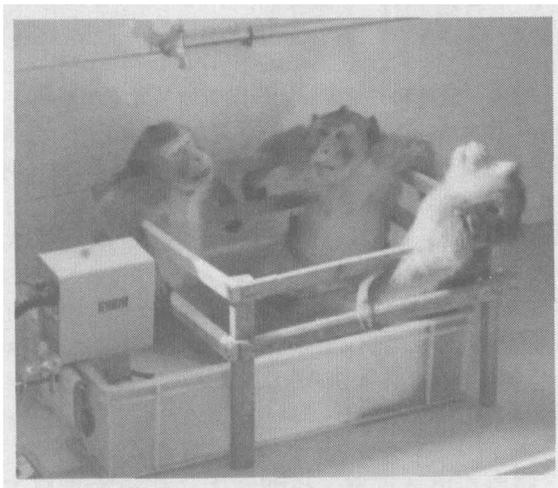


图 3 食蟹猴在 43℃ 温水中温浴 (由张学森先生提供)

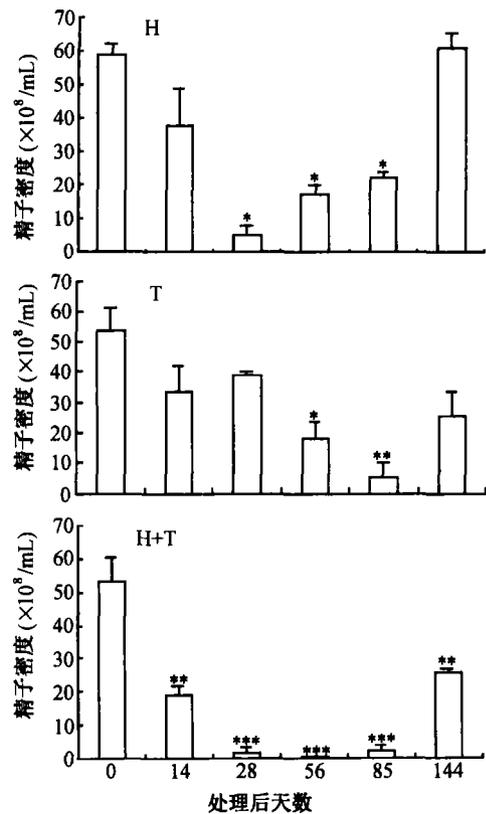


图 4 睾丸局部温浴(H)，长效睾酮缓释胶囊(T)和两者组合(H+T)对食蟹猴精液精子密度的影响

H: 食蟹猴睾丸在第 1 天和第 2 天在 43℃ 温水中各温浴 30min; T: 第一天埋植长效睾酮缓释胶囊, 到第 85 天取出胶囊; H+T: 第一天埋植长效睾酮缓释胶囊, 同时在 1~2 d 进行两次 43℃ 温水温浴, 到第 85 天取出胶囊. O: 未处理对照组; 14, 28, 56, 85, 144 代表处理后天数. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (由张学森先生提供)

数比温浴前下降了 80% (图 4). 施加两天共 60 min 睾丸温浴, 再埋植长效睾酮缓释胶囊, 在两个月内精液中精子数下降到零(图 4), 达到了理想的避孕效果. 停止处理两个月后, 精液中精子数恢复到正常水平. 初步实验证实, 长效睾酮和“热压”是通过不同的信息通路引发精细胞凋亡^[38], 前者主要引发 VII-VIII 期生精细胞凋亡, 而后者主要影响 I-IV 期和 IX-XIII 期精细胞凋亡, 两者合并使用有叠加效应(表 1, 图 5). 这些发现为设计简单方便的睾丸热压避孕, 或复合男性避孕措施提供了重要的可行理论基础和科学依据.

1) Zhang Z H, et al, Expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey during heat-stress induced azoospermia or oligozoospermia (in press)

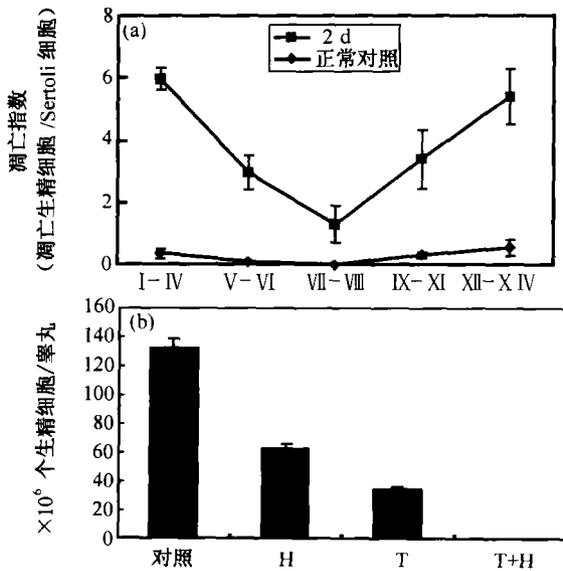


图5 “热压”和长效睾酮对大鼠精子发生的影响 (a)“热压”主要诱发I-IV期和XII-XIV生精细胞凋亡；(b)热压和睾酮诱导生精细胞凋亡的叠加效应对照组；H：热压组；T：睾酮处理组；H+T：两组组合处理组(引自文献[38]，作了某些修改)

4 男性避孕药棉酚的发展前景

20世纪70年代，我国科学工作者发现，食用粗制棉籽油的青年男子发生不育。实验证明，棉酚能直接作用于睾丸，抑制精子发生和精子运功^[39-44]，进一步研究发现，棉酚能选择性地破坏生精细胞线粒体功能，从而中断精子发生、变态和成熟过程^[41,43]。棉酚与线粒体蛋白结合，其作用位点不限于一种酶系^[44]，并有趣地发现，它对线粒体的损伤作用是从靠近管腔的变态精子开始，随剂量和服药时间的延长进而向基膜方向扩展。当时，这些发现在国内外引起轰动，棉酚被认为是一种有希望的特异抗精子发生和女用阴道杀精的避孕药物^[45,46]。在世界卫生组织和Rockefeller's基金支持下，进行了全国性多学科的协作和系统研究。有14省市科学工作者参加，超过万例志愿者的临床实验。对8806例志愿服药者统计表明，每日口服20mg棉酚片剂，一般在75d内起效，达到不育指标(精子计数在 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 以下)，总有效率为99.9%。起效后改服7mg/d(150~220mg/月)可维持避孕效果，并且确认，棉酚是一种既能抑制精子发生和精子运功，又能在抗生育剂量下不影响正常睾酮水平和性功能的一种

男用避孕药物^[45,46]。然而，随志愿者服药时间延长(最长达6年)，体内棉酚积累量的增加和个体体质差异以及对药物代谢反应不同，有少数服药者出现了两种毒副作用，即低血钾(占0.75%)和不可逆性不育(9.9%)^[47]，由于上述两种毒副作用^[48]，在1986年武汉国际棉酚会议上作出了终止棉酚的临床实验。大部分国内外资助经费来源切断，从20世纪80年代中期，棉酚的研究走向低谷。

发现问题是解决问题的开端，也是走向成功的关键。我国科学家针对所出现的低血钾症采用有节育效应的低剂量棉酚，针对不可逆性不育合并使用甾体激素(孕酮，如DSG或LNG，雄激素如TU或T)，其中睾酮以保护精原细胞和雄激素依赖器官，孕激素用以反馈抑制血流中促性腺激素，中断内源睾酮的产生而迅速抑制精子发生。对大鼠的反复实验表明，低剂量棉酚组合甾体激素方案，抗生育效果快，6~8周起有效率达到100%，停药后6~8周，可完全恢复生育力。对垂体性腺轴系内分泌功能无明显影响，对睾丸组织无损伤，对脏器无副作用^[49,50]，但有待于临床试用结果的验证。近年，包括中国在内的国际合作组对151例青年男性志愿者临床研究表明，每天服用15mg棉酚，服用12~16周后，改为7.5或10mg/d维持量，所有受试者精子发生都受到抑制，但不影响性交和性交次数，没有低血钾和激素分泌异常。停药后，每天服用7.5mg棉酚的志愿者中，有63%受试者在12周内精液中精子数恢复到 $20 \times 10^6/\text{mL}$ ，达到生育水平。但在服用10mg/d棉酚组志愿者中，有18%的受试者在停药1年后，精液中仍处于少精状态^[51]。我国科学工作者用改进的低剂量棉酚组合对77例男性青年志愿者作了类似的临床研究，每日口服15mg棉酚减至10mg，2个月内精液中精子数仍可降至 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 以下，达到不育水平；随后改为每2天服用10mg，在整个实验过程中，受试者保持不育，血中 K^+ ，FSH，LH和睾酮水平与对照组相比没有明显变化，作者建议，每天服用10~12.5mg棉酚，8周后改为每周35~43.75mg作为维持剂量就可达到男性不育，而不出现低血钾和不可逆性不育的效果^[52]。

离体和在体实验证明，棉酚能直接抑制精子运动，它可能是通过抑制精子cAMP的产生引起的，因为在离体下，加cAMP可逆转棉酚对精子活力的

抑制作用, 作者建议, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 棉酚通过阴道用药可作为抗精子运动避孕药^[53].

5 我国男性避孕的曙光

从上述一系列研究成果中, 已看到在我国有可能成功开发抗精子男性避孕药的可能性. 薛社普院士曾在中国医学科学院学报上发表综述论文, 对低剂量棉酚组合甾体激素用药作为男性抗精子避孕药作出了乐观预见^[50]. 根据现有研究成果和丰富的临床资料, 我认为对下述几种组合方案应该作进一步的临床前实验研究: (1) 睾丸局部温浴组合低剂量棉酚. 我们对食蟹猴的实验证实, 睾丸在 43 $^{\circ}\text{C}$ 温水中连续两天两次温浴, 每次仅 30 min, 到第 28 天即可使精液中精子数下降 80%. 可以乐观地设想, 如果每月连续进行 2 次睾丸温浴(每次 30 min), 组合每天口服 2~5 mg 棉酚(可与茶同饮), 即可有效地达到不育少精标准($<4 \times 10^6$ 精子/mL). 如果女方配合, 还可采用另外一种男方睾丸温浴, 女方使用棉酚组合方案, 即仅在女方大约排卵前后, 即在月经中期, 性交前可在阴道中局部使用棉酚(如 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 棉酚可使阴道中已大大减少的精子其运动能力下降, 从而使受精机率降低到零; (2) 长效睾酮组合低剂量棉酚; (3) 睾丸局部温浴组合缓释长效睾酮. 在组合设计中, 可将药量和作用强度降低到最小限度, 即可达到避孕目的, 但不产生副作用. 可以设想, 每月连续两次在 43 $^{\circ}\text{C}$ 温水或特定设计的 43 $^{\circ}\text{C}$ 恒温“内裤”中(如像女用卫生带式样), 每月连续进行两次共 60 min 睾丸局部温浴, 再加每天口服低剂量棉酚(2~5 mg), 这样的组合无疑会有效地阻断精子发生, 达到避孕目的. 一种由低剂量棉酚和长效睾酮组合的药物也是完全可行的. 局部热压可促使 I-IV 期和 IX-X 期精细胞凋亡, 长效睾酮主要促使 VII-VIII 期的精细胞凋亡, 而低剂量棉酚除对睾丸变态精子有作用外, 主要影响附睾精子. 3 种组合各作用在精子发生的不同阶段, 它们通过不同的信息通路作用于精子发生和形成的不同位点, 发挥优势互补的最大的组合效应. 这完全符合避孕所要求的安全、有效和可逆的理想结果, 可大大降低单独应用时的剂量、作用时间和强度, 避免它们的副作用. 期望在不久的将来, 一种或几种安全有效无明显副作用的男用组合避孕药或措施将会在中国诞生.

致谢 作者对李因传和张学森先生帮助制图, 胡召元高级工程师帮助论文整理表示感谢.

参 考 文 献

- 1 常平主编. 20世纪我国重大工程技术成就. 广州: 暨南大学出版社, 2002. 127~133
- 2 中国计划生育年鉴编委会. 中国计划生育年鉴. 北京: 中国计划生育年鉴编辑部, 2002. 256~272
- 3 中国人口信息研究中心. 1997年全国人口与生殖健康调查论文集. 北京: 中国人口出版社, 1999
- 4 Holden C. Research on contraception still in the doldrums. *Science*, 2002, 296: 2172
- 5 Greaves S, et al. Fertility. *Nature Medicine and Nature Cell Biology*, 2002, supplement issue
- 6 Depaolo L V, et al. Male contraception: Views to the 21 century. *Trend Endocrinol Metab*, 2000, 11 (2): 66
- 7 Wang C, et al. Male contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2002, 16(2): 193
- 8 Hair W M, et al. Male contraception: Prospects for the new millennium. *Asian J Andrology*, 2000, 2 (1): 3
- 9 Jensen J T, et al. Male contraception. *Curr Womens Health Rep*, 2002, 2 (5): 338
- 10 Grootegoed J A, et al. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2000, 14(3): 331
- 11 Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: An overview with introduction to this issue. *Microsc Res Tech*, 2003, 61(1): 1
- 12 Li P, et al. An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science*, 2001 291(5509): 1783
- 13 Mu X M, et al. The P53/Rb-mediated repression of testicular orphan receptor-2 in the Rhesus monkey with cryptorchidism. *J Biol Chem*, 2000, 275 (31): 23877
- 14 Cheng L J, et al. NYD-SP16, a novel gene associated with spermatogenesis of human testis. *Biol Reprod*, 2003, 68(1): 190
- 15 Tian X Y, et al. Extracellular domain of YWK-II, a human sperm transmembrane protein, interacts with rat Mullerian-inhibiting substance. *Reproduction*, 2001, 121(6): 873
- 16 Ang L F, et al. Calpastatin gene in human testis. *Biochem Mol Biol Int*, 1994; 33(2): 245
- 17 Guo C X, et al. Cloning of novel temperature-related expressed sequence tag in rat testis during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Comm*, 1999, 258(2): 401
- 18 Han X B, et al. Cloning and characterization of temperature-related gene TRS1. *Arch Androl*, 2002, 48(4): 273
- 19 World Health Organization. Task force on methods for the research on male fertility: Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia in normal men *Lancet*, 1990, 336: 955
- 20 Zhang G Y, et al. Studies on testosterone enanthate-induced oligo-

- zoospermia and azoospermia in normal fertile men. *J Chinese Reprod Med*, 1992, 1: 7
- 21 曹坚, 等. 庚酸睾酮用于男性抗生育的临床研究. *中华医学杂志*, 1996, 76(5): 355
- 22 Zhou X C, et al. Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta Pharmacol Sin*, 2001; 22(11): 1028
- 23 Liu K, et al. Preliminary studies on the role of plasminogen activator in seminal plasma of human and rhesus monkey. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2: 99
- 24 Zhang Z H, et al. Expression of Bcl-2 and Bax in rhesus monkey testis during germ cell apoptosis induced by testosterone undecanoate. *Archives of Andrology*, 2003, 49(6): 435
- 25 Zhou X C, et al. Expression of Hsp70-2 in rhesus monkey testis during germ cell apoptosis induced by testosterone undecanoate. *Contraception*, 2002; 66: 251
- 26 Narula A, et al. Variability in sperm suppression during testosterone administration to adult monkeys is related to follicle stimulating hormone suppression and not to intratesticular androgens. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 3399
- 27 Weinbauer G F, et al. Testosterone-induced inhibition of spermatogenesis is more closely related to suppression of FSH than to testicular androgen levels in the cynomolgus monkey model. *J Endocrinol*, 2001, 168: 25
- 28 McLachlan R I, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. *Recent Prog Horm Res*, 2002, 57: 149
- 29 Plant T M, et al. The functional significance of FSH in spermatogenesis is the control of its secretion in male primates *Endocr Rev*, 2001, 22 (6): 764
- 30 Zhang T, et al. Expression of plasminogen activator and inhibitor, urokinase receptor and inhibin subunits in rhesus monkey testis. *Mol Human Reprod*, 1997, 3: 223
- 31 Liu Y X, et al. Hormonal regulation of tissue type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured monkey Sertoli cells. *Hum Reprod*, 1995, 10(3): 719
- 32 Liu Y X, et al. Regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured rat Sertoli and Leydig cells. *Science in China (C)*, 1996, 39: 37
- 33 Liu Y X, et al. Hormonal regulation of plasminogen activator in rat and mouse seminiferous epithelium. *Biol Signal*, 1995 4: 232
- 34 Ramachandra S G, et al. Effect of chronic administration of 7-alpha-methyl-19 nortestosterone on serum testosterone, number of spermatozoa and fertility in adult male bonnet monkeys. *Reproduction*, 2002, 124: (2): 301
- 35 Zhou X C, et al. Expression of Hsp70-2 in unilateral cryptorchid testis of rhesus monkey during germ cell apoptosis. *Endocrine*, 2002, 16: 89
- 36 Guo C X, et al. Expression of hSP 70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testis. *Archives of Andrology*, 2000, 46: 109
- 37 Zhang Z H, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in Sertoli cells of the cryptorchidism of rhesus monkey. *Contraception*, 2003, 68(4): 297 (in press)
- 38 Lue Y, et al. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rat: The two hit approach to male contraceptive development. *Endocrinology*, 2000, 141(4): 1414
- 39 Dai R X, et al. A study of antifertility of cottonseed. *Acta Biol Exp Sin*, 1978, 11: 1
- 40 Dai R X, et al. Study on the antifertility effect of gossypol II: A morphological analysis of the antifertility effect of gossypol. *Acta Biol Exp Sin*, 1978, 11: 27
- 41 Xue S P. Studies on the antifertility effect of gossypol, a new contraceptive for males. In: Chang CF, et al. eds. *Recent Advances in Fertility Regulation*. Geneva: ATAR SA, 1980. 122~146
- 42 Ke Y B, et al. Variations of gossypol susceptibility in rat spermatozoa during spermatogenesis. *Int J Fertil*, 1982, 21: 42
- 43 Liang D C, et al. Studies on distribution of ¹⁴C-gossypol in subcellular fractions of rat testes and site of gossypol action. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1981, 3(3): 153
- 44 Fei R R, et al. Effect of gossypol on rat testicular mitochondrial. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1983, 5(4): 219
- 45 Xue S P. Gossypol contraception and mechanism of action. In: Lobl T, et al. eds. *Male Fertility and Its Regulation*. Boston: Mtp Press Limites, 1985. 155
- 46 Xue S P, et al. Subcellular site of antispermatogenic effect of gossypol and its possible molecular mechanism of action. *Science in China, ser B*, 1983, 26(6): 614
- 47 Qian S Z. Gossypol—hypokalemia interrelationship. *Int J Androl*, 1985, 8: 313
- 48 Waites G M, et al. Gossypol: Reasons for its failure to be accepted as safe, reversible male antifertility drug. *Int J Androl*, 1998, 21 (1): 8
- 49 Ye W S. The antifertility effect of gossypol plus testosterone and estrogen. *Acta pharmacol Sinica*, 1996 31(4): 313
- 50 薛社普. 棉酚作为安全有效和可逆男用节育药的一线新曙光. 低剂量棉酚组合甾体激素用药抗生育作用. *中国医学科学院学报*, 2000, 22 (3): 211
- 51 Coutinho E M, et al. Gossypol blood levels and inhibition of spermatogenesis in men taking gossypol as a contraceptive. A multicenter international, dose-finding study. *Contraception*, 2000, 61 (1): 61
- 52 Gu Z P, et al. Low dose gossypol for male contraception. *Asian J Androl*, 2000, 2(4): 283
- 53 Zavos P M, et al. The inhibitory effect of gossypol on human sperm motility characteristics: possible modes of reversibility of those effects. *Tohoku J Exp Med*, 1996, 179: 167