

寨卡病毒感染早期促进*Nkx2-3*及*Tbx15*表达造成睾丸细胞细胞器功能紊乱

卞展展^{1,2}, 常嘉彤^{1,2}, 管宇恒¹, 刘林申阳¹, 范东瀛^{1,2}, 安静^{1,2}, 杨威^{3*}, 王培刚^{1,2*}

1. 首都医科大学基础医学院微生物学系, 北京 100069

2. 首都医科大学呼吸系统感染免疫学联合实验室, 北京 100069

3. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021

* 联系人, E-mail: 1751180423@qq.com; pgwang@ccmu.edu.cn

2024-04-23 收稿, 2025-06-17 修回, 2025-06-20 接受, 2025-06-27 网络版发表

国家自然科学基金(82372251, 81972979, U1902210, 82402618)和国家重点研发计划(2021YFC2300202)资助

摘要 寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)感染对雄性生殖系统, 特别是生精过程的调控机制, 仍是亟待深入研究的重要科学问题. 为克服传统干扰素受体敲除小鼠模型因睾丸病变严重而难以动态观察生精过程的局限, 本研究采用免疫功能相对完整的人*STAT2*敲入小鼠(human *STAT2* knock-in, h*STAT2* KI)构建感染模型, 系统解析ZIKV感染早期对睾丸组织的调控机制. 结果发现, 感染初期ZIKV主要靶向睾丸间质内的S100A4阳性单核/巨噬细胞, 其他易感细胞尚未感染; RNA测序(RNA sequencing, RNA Seq)结果显示感染组睾丸中多个与核糖体及线粒体功能相关的通路异常激活. 单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)进一步揭示ZIKV感染14天后多个核心差异基因广泛分布于生精细胞、Sertoli细胞和Leydig细胞等. 结合转录因子网络分析和实验验证, 发现*Nkx2-3*和*Tbx15*可能是驱动这些变化的关键调控因子; Cellchat分析提示免疫细胞可能通过PSAP信号通路参与生精细胞DNA损伤调控. 尽管病毒主要局限于睾丸间质, 未侵入曲精管, 但生精细胞及支持细胞已呈现显著转录变化, 提示间质微环境在ZIKV感染中具有重要调控作用. 本研究深化了对ZIKV感染早期睾丸损伤机制的理解, 为探索其引发雄性生殖功能障碍的干预策略提供了理论基础.

关键词 寨卡病毒, *Nkx2-3*, *Tbx15*, 睾丸, 细胞器紊乱

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是一种重要的新发虫媒病毒, 有多种传播途径, 包括蚊虫叮咬、胎盘垂直传播及精液介导的性传播^[1,2]. 临床研究表明, 部分男性感染者会出现包括前列腺炎、血精、精液白细胞检出、精液中带毒等生殖系统症状^[3], 提示睾丸是ZIKV的重要靶器官. 然而, ZIKV感染对雄性生殖系统, 尤其是生精过程的影响及分子机制仍未完全阐明.

在抗病毒免疫应答中, I型干扰素(type I interferons, IFN-I)信号通路发挥核心作用, 其抗病毒效应依赖于关键转录因子STAT2的介导^[4]. 然而, ZIKV编码的非结构

蛋白5(nonstructural protein 5, NS5)可以特异性靶向人的STAT2, 抑制IFN信号传导, 但对小鼠的STAT2无作用^[5]. 因此, 大多数成年野生型小鼠对ZIKV感染具有抵抗性. 为克服上述局限, 早期研究常采用I型干扰素受体缺失小鼠(如A6、A129小鼠等)构建ZIKV感染模型. 在该模型中, 病毒可以感染曲精小管内的生精细胞和Sertoli细胞, 以及睾丸间质中的巨噬细胞. 在感染2~3周后, 血-睾屏障的完整性被破坏, 导致生精细胞大量丢失^[6-8]. 尽管该模型在观察ZIKV所致的睾丸病理损伤方面具有重要价值, 但由于生精过程被严重破坏, 其在

引用格式: 卞展展, 常嘉彤, 管宇恒, 等. 寨卡病毒感染早期促进*Nkx2-3*及*Tbx15*表达造成睾丸细胞细胞器功能紊乱. 科学通报, 2025, 70: 4990–5008

Bian Z, Chang J, Guan Y, et al. *Nkx2-3* and *Tbx15* mediate organelle dysfunction in testicular cells during early Zika virus infection (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 4990–5008, doi: [10.1360/TB-2024-0448](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0448)

动态研究精子发生机制研究中的应用受限。

近年来, 研究者们利用人*STAT2*基因敲入(human *STAT2* knock-in, h*STAT2* KI)小鼠作为ZIKV感染模型。该模型具有完整的IFN-I信号通路, 其感染ZIKV后的病理特征更接近人类临床表现^[9]。研究表明, 感染2周时, h*STAT2* KI小鼠的曲精小管结构基本完整, 生精细胞受影响较小, 为研究ZIKV感染对生精过程的动态调控机制提供了更为理想的实验平台^[10]。

*Nkx2-3*和*Tbx15*是调控细胞分化和器官发育相关的重要转录因子。*Nkx2-3*已被证明在淋巴器官发育和炎症调控中具有重要作用^[11-13], *Tbx15*在成骨细胞分化和皮肤发育中发挥关键调控作用^[14-16]。然而, 它们在生殖系统, 尤其是ZIKV感染睾丸过程中的作用仍不明确。

本研究以具有相对完整免疫功能的h*STAT2* KI小鼠为动物模型, 解析了ZIKV感染早期对睾丸基因表达的影响, 揭示了转录因子*Nkx2-3*和*Tbx15*在生精过程中的调控作用。该发现不仅拓展了对病毒感染引发雄性生殖障碍机制的理解, 也为相关的治疗策略提供了新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 病毒

寨卡病毒(SMGC-1株, 亚洲系, GenBank序列号: KX266255)由本实验室保存。该病毒在C6/36细胞中增殖6天后收取, 通过病毒蚀斑实验在Vero细胞上检测病毒滴度, 所用甲基纤维素浓度为1.1%, 具体方法参照文献^[17]。病毒保存在-80℃备用。

1.2 细胞

C6/36细胞, 白纹伊蚊幼虫细胞。常规培养时使用含10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青霉素-链霉素双抗(penicillin-streptomycin, PS; Hyclone, 美国)的RPMI-1640培养基(Roswell Park Memorial Institute, RPMI; Gibco, 美国); 病毒增殖时使用含2% FBS和1% PS的RPMI-1640培养基。细胞在28℃的恒温培养箱中培养。

Vero细胞, 非洲绿猴肾细胞。常规培养时使用含5% FBS和1% PS的MEM(minimum essential medium, Gibco)培养基; 病毒感染时使用含2% FBS和1% PS的MEM培养基。该细胞在37℃, 5% CO₂湿润培养箱中培养。

1.3 动物及动物实验

h*STAT2* KI小鼠购自Jackson实验室, 并于无特定病原体的条件下饲养繁殖。小鼠基因型以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方式鉴定, 引物序列为: 5'-AGGAGGCTGAGGTAGAATCACT-3', 5'-TGGAGAGATGGCTCAGAGGT-3'。

6~8周龄的雄性h*STAT2* KI小鼠经腹腔注射1×10⁴ PFU ZIKV或等量PBS(phosphate-buffered saline), 分别记为感染组和对照组。每组6只小鼠, 其中3只用于测序分析, 3只用于实验观察。实验观察组每日记录小鼠的疾病症状、体重和存活率。于处理后第5天, 对小鼠实施安乐死, 收集睾丸。睾丸经4%多聚甲醛固定24 h后转移至75%乙醇中, 随后脱水进行石蜡包埋。

所有动物实验均按照《实验动物管理条例》进行, 并由首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会批准(伦理编号: AEEI-2020-189)。

1.4 苏木素-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, H&E)

为观察感染ZIKV后睾丸的病理变化, 厚度6 μm的睾丸切片依次浸泡在二甲苯和乙醇中, 苏木素染色8 min。伊红染色20 min后, 切片再依次浸泡在乙醇和二甲苯中脱水, 最后中性树胶封片。

1.5 免疫荧光染色

为探索ZIKV在睾丸中的靶细胞类型以及*Nkx2-3*和*Tbx15*的表达情况, 厚度6 μm的睾丸切片经常规脱蜡后, 与以下一抗4℃孵育过夜: 鼠抗: Anti-ZIKV抗体4G2(本实验室制备并保存)、Anti-DDX4抗体(Abcam, 货号ab27591, 英国); 兔抗: Anti-CD45抗体(Abcam, 货号ab10558)、Anti-ZO1抗体(Abcam, 货号ab221547)、Anti-OCCLUDIN抗体(Thermofisher, 货号RB232928, 美国)、Anti-F4/80抗体(Abcam, 货号ab100790)、Anti-S100A4抗体(Cell Signaling Technology, 货号13018S, 美国)、Anti-Vimentin抗体(Cell Signaling Technology, 货号5741)、Anti-NKX2.3抗体(Novus, 货号NBP2-13659, 美国)、Anti-TBX15抗体(Novus, 货号NBP2-49036)、Anti-ATM抗体(Abcam, 货号ab201022); 然后与Alexa Fluor 488驴抗小鼠IgG (二抗, Invitrogen, 货号A21202, 美国)或Alexa Fluor 594驴抗小鼠IgG (二抗, Abcam, 货号ab150108)或Alexa Fluor 594驴

抗兔IgG (二抗, Invitrogen, 货号A21207) 37°C下避光孵育1 h; 最后使用含DAPI的荧光封片剂(北京中杉金桥, 货号ZLI-9557, 中国)封片. 图像由OLYMPUS BX61拍摄.

1.6 逆转录定量PCR(reverse-transcription quantitative PCR, RT-qPCR)

使用TransZol常规RNA提取试剂盒(北京全式金, 货号ET101, 中国)提取睾丸组织中的总RNA, 然后采用FastKing一步法反转录荧光定量试剂盒(SYBR Green法, 天根生化科技, 货号FP313, 中国)检测组织中*Nkx2-3*和*Tbx15*的mRNA表达水平, 以*Gapdh*表达作为标准化参考. 所用引物序列如下: *Nkx2-3*: 5'-GCGGGAGAC-TGTAAGACGAG-3', 5'-TTATCCTGCCGCTGTCTCTT-3'; *Tbx15*: 5'-TTCCATGATATCGGAACAGAGA-3', 5'-ATGGCAGGAAACATCCTCCT-3'; *Gapdh*: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 5'-TGTAGAC-CATGTAGTTGAGGTCA-3'.

1.7 文库构建和RNA测序

RNA-seq分析: 感染后5天收集ZIKV感染组和PBS对照组的小鼠睾丸组织. RNA提取: TRIzol (Thermo fisher, 货号15596018, 美国); 测序平台: Illumina Nova-seq™ 6000, PE150模式. RNA文库构建和RNA测序均由杭州联川生物技术股份有限公司完成.

scRNA-seq二次分析: ZIKV感染14天单细胞测序分析基于团队已发表的数据集^[10](SRA: PRJNA102-8143), 预处理流程与原文一致.

1.8 蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction network, PPI network)和枢纽基因的鉴定

利用相互作用基因搜索工具(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, STRING, 版本12.0, <https://cn.string-db.org/>)构建网络, 得分 ≥ 0.4 的相互作用被认为是显著的. 使用Cytoscape软件对PPI网络进行可视化^[18], 并借助CytoHubba插件鉴定枢纽基因^[19].

1.9 统计分析

使用Graphpad Prism 8.0软件对数据进行统计学分析, 所有数据以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 ZIKV感染早期即可损害免疫功能健全小鼠模型睾丸组织

本研究选用6~8周龄hSTAT2 KI雄性小鼠作为实验动物模型. 经特异性引物PCR扩增及凝胶电泳分析, 确认所有实验小鼠均为hSTAT2 KI纯合子(图1(a)). 感染组小鼠经腹腔注射 1×10^4 PFU ZIKV, 对照组则注射等体积的PBS. 攻毒后每日记录小鼠体重变化、发病症状及生存情况. 部分感染组小鼠在感染后2~3天出现耸毛, 但在后续观察期内均逐渐恢复正常. 在实验观察期内, 感染组小鼠体重呈现持续增长趋势, 与对照组相比没有统计学差异(图1(b)). 此外, 感染组小鼠在观察期内均未死亡(图1(c)).

为评估ZIKV感染对雄性生殖系统的影响, 我们在感染第5天采集小鼠的睾丸组织进行形态学测量和组织病理学分析. 与对照组相比, 感染组小鼠睾丸质量和长度均略有增加(图1(d, e)), 提示ZIKV感染可能导致睾丸组织可能出现炎性肿胀. H&E结果显示, 感染组小鼠睾丸曲精小管内生精细胞排列出现轻度紊乱(图1(f)), 睾丸间质中可见少量炎性细胞浸润(图1(g)), 提示存在轻度炎症. 值得注意的是, 感染组小鼠睾丸组织结构基本保持完整, 血-睾屏障未见明显破坏, Sertoli细胞间的紧密连接保持完整(图1(h, i)). 这些结果表明, hSTAT2 KI雄鼠感染ZIKV后表现出与人类ZIKV感染者相似的睾丸病理特征, 包括睾丸肿胀和轻度炎症反应, 但未出现严重的组织结构破坏. 因此, 该动物模型适用于研究ZIKV感染早期对生精过程的影响及其分子机制.

2.2 间质巨噬细胞是ZIKV感染早期睾丸中的主要靶细胞

为阐明ZIKV感染早期在睾丸组织中的细胞嗜性, 我们利用抗ZIKV包膜蛋白(E蛋白)抗体与多种睾丸特异性细胞标志物进行共定位分析. 结果显示, ZIKV抗原阳性染色主要位于睾丸间质, 并与巨噬细胞标志物F4/80呈现部分共定位(图2(a)); 曲精小管内少有抗原阳性染色信号(图2(b, c)). 通过进一步表型分析发现, 间质内被感染的巨噬细胞主要来源于骨髓, 其特征性标志物S100A4呈阳性表达(图2(d)). 这与我们的前期研究结果相吻合^[6], 即S100A4阳性单核/巨噬细胞对ZIKV具有高度易感性, 可作为病毒载体促进ZIKV在睾丸组织中的感染和扩散. 基于以上结果可知, 在ZIKV感染早期

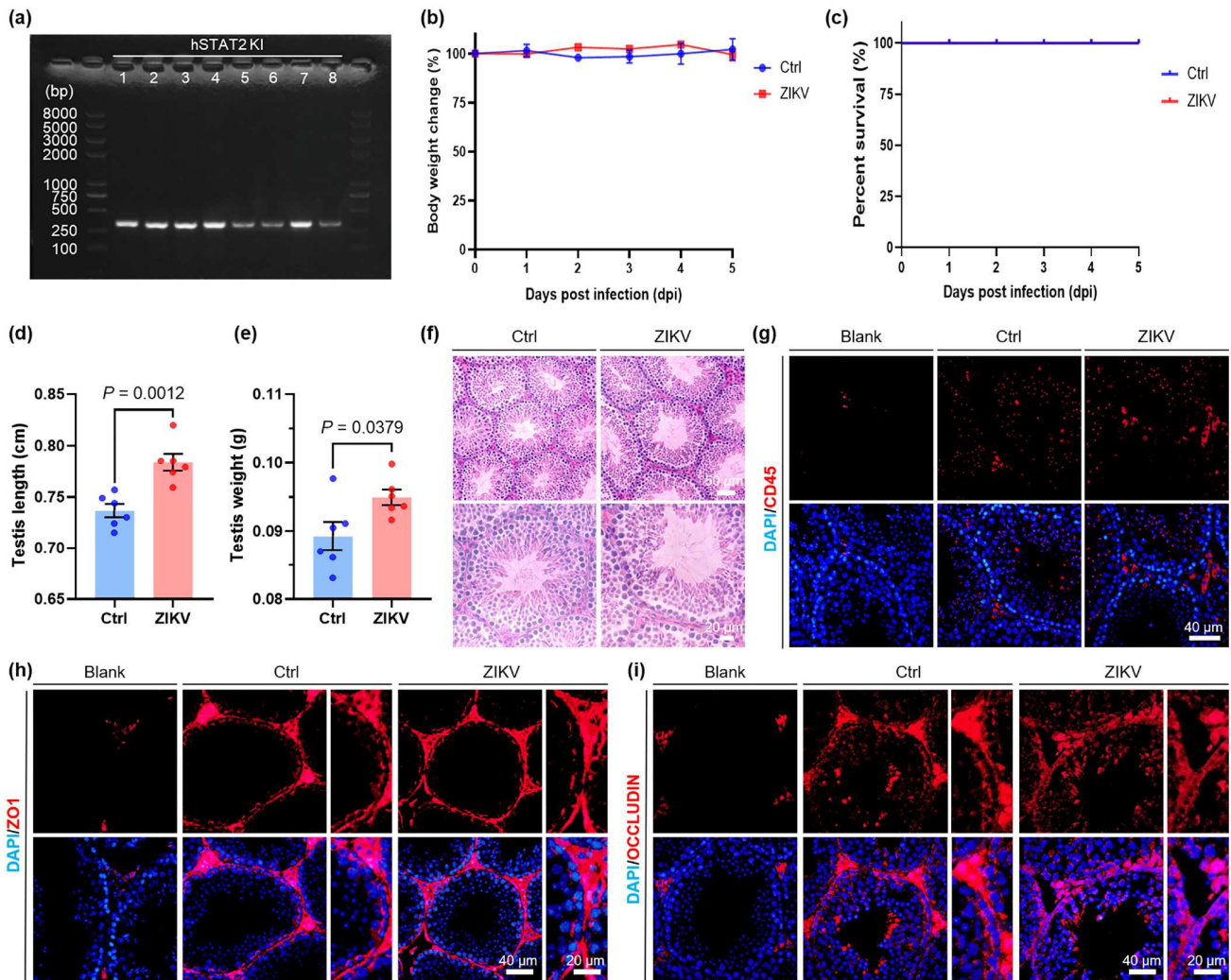


图 1 (网络版彩色)hSTAT2 KI小鼠模型构建及ZIKV感染表型分析. (a) hSTAT2 KI小鼠的基因型鉴定结果; (b, c) ZIKV感染对小鼠的体重(b)及存活率(c)的影响(对照组 $n=3$ 只小鼠, 感染组 $n=3$ 只小鼠); (d, e) ZIKV感染对睾丸形态学的影响: (d) 睾丸长度比较, (e) 睾丸质量变化(每个数据点代表单个睾丸样本; 数据以均值 $\pm$ 标准误差表示, 组间差异通过独立样本 t 检验进行分析); (f) 睾丸组织病理学分析. (g) 睾丸间质炎性细胞浸润情况. (h, i) 血-睾屏障完整性评估. ZIKV感染小鼠和对照小鼠睾丸中紧密连接蛋白ZO1(h)和OCCLUDIN(i)的表达情况

Figure 1 (Color online) Construction of the hSTAT2 KI Mouse Model and Phenotypic Analysis of ZIKV Infection. (a) Genotypic identification of hSTAT2 KI mice. (b, c) Impact of ZIKV infection on body weight (b) and survival rate (c) in mice (control group: $n=3$, infected group: $n=3$). (d, e) Effects of ZIKV infection on testicular morphology. (d) Comparison of testicular length, (e) Changes in testicular mass (each data point represents an individual testicular sample; data are presented as mean $\pm$ standard error, and intergroup differences were analyzed using an independent sample t -test). (f) Histopathological analysis of testicular tissue. (g) Inflammatory cell infiltration in the testicular interstitium. (h, i) Assessment of blood-testis barrier integrity. Expression of tight junction proteins ZO1 (h) and OCCLUDIN (i) in the testes of ZIKV-infected and control mice

阶段, S100A4阳性单核/巨噬细胞是睾丸组织中的主要靶细胞群.

2.3 ZIKV感染早期睾丸细胞核糖体及线粒体基因表达谱紊乱

为在转录组水平阐明ZIKV感染早期对睾丸组织的影响机制, 我们采用RNA-Seq技术对感染后5天的

hSTAT2 KI小鼠睾丸组织进行转录组分析, 并以相同周龄的PBS注射组作为对照组. 分析结果显示, 与对照组相比, 感染组睾丸组织中共鉴定出77个差异表达基因, 其中56个基因显著上调, 21个基因显著下调(图3(a)). GO富集分析显示, 这些差异表达基因主要富集于以下功能类别: 在细胞组分(cellular component)方面, 显著富集于质膜组成成分(integral component of plasma

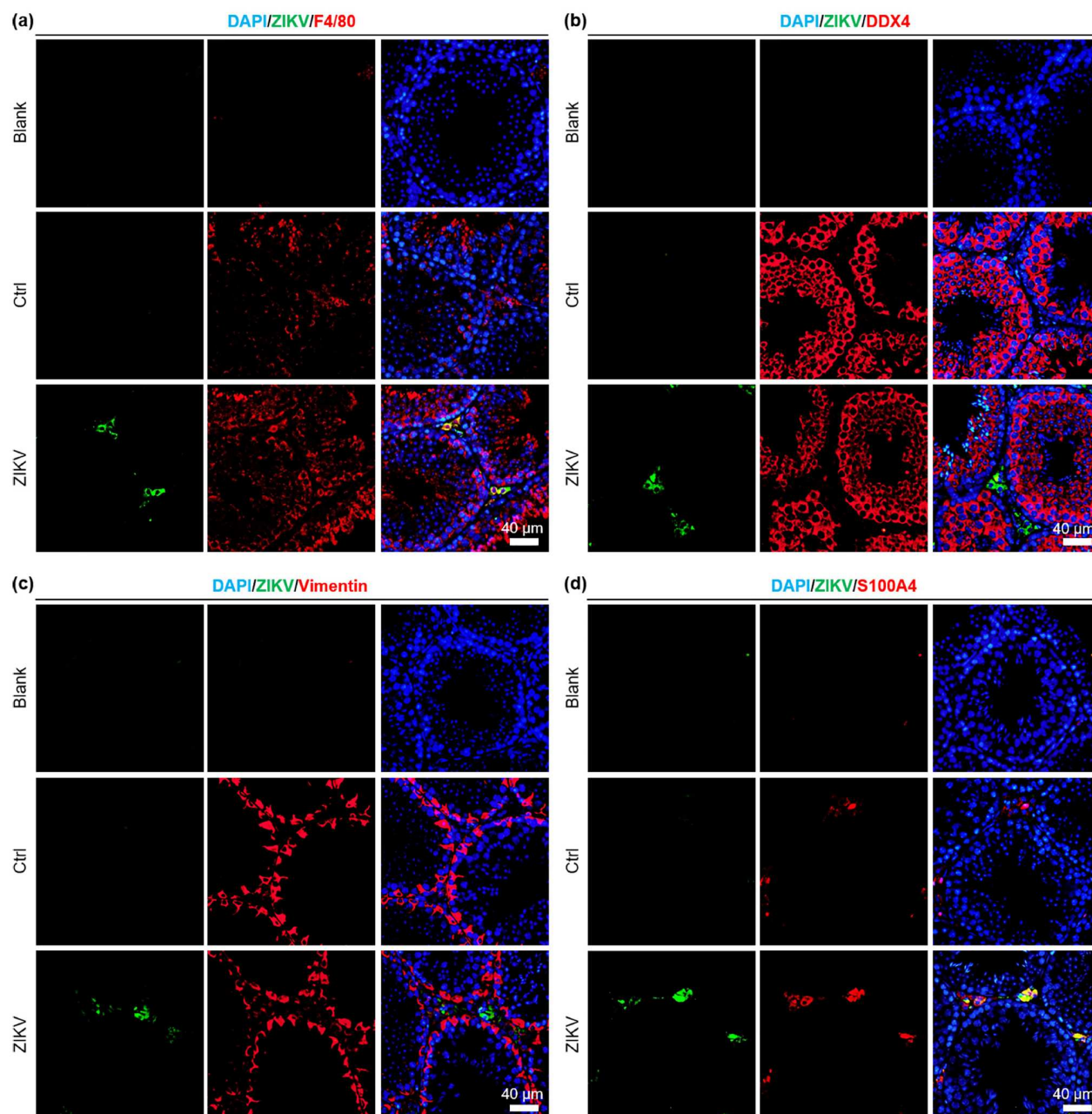


图 2 (网络版彩色)ZIKV感染hSTAT2 KI小鼠睾丸组织的细胞嗜性分析. (a~d) ZIKV睾丸组织中ZIKV抗原于不同细胞类型标志物的共定位分析. (a) ZIKV E蛋白(绿色)与巨噬细胞标志物F4/80(红色)的共定位分析; (b) ZIKV E蛋白(绿色)与生精细胞标志物DDX4(红色)的免疫荧光染色; (c) ZIKV E蛋白(绿色)与支持细胞标志物Vimentin (红色)的共定位分析; (d) ZIKV E蛋白(绿色)与骨髓来源巨噬细胞标志物S100A4(红色)的共定位分析

Figure 2 (Color online) Cellular tropism of ZIKV infection in testicular tissue of hSTAT2 KI mice. (a~d) Colocalization of ZIKV antigens with various cell type markers in testicular tissue. (a) Colocalization of ZIKV E protein (green) with the macrophage marker F4/80 (red). (b) Colocalization of ZIKV E protein (green) with the spermatogonia marker DDX4 (red). (c) Colocalization of ZIKV E protein (green) with the Sertoli cell marker Vimentin (red). (d) Colocalization of ZIKV E protein (green) with the bone marrow-derived macrophage marker S100A4 (red)

membrane)、膜系统(membrane)和细胞质(cytoplasm)等细胞结构相关条目; 在分子功能(molecular function)方面, 主要参与蛋白质结合(protein binding)等过程; 但在

生物过程(biological process)方面的功能富集程度相对较弱(图3(b~d)). 这一发现提示, 在ZIKV感染早期, 睾丸组织可能主要表现为细胞结构组分和分子功能的改变.

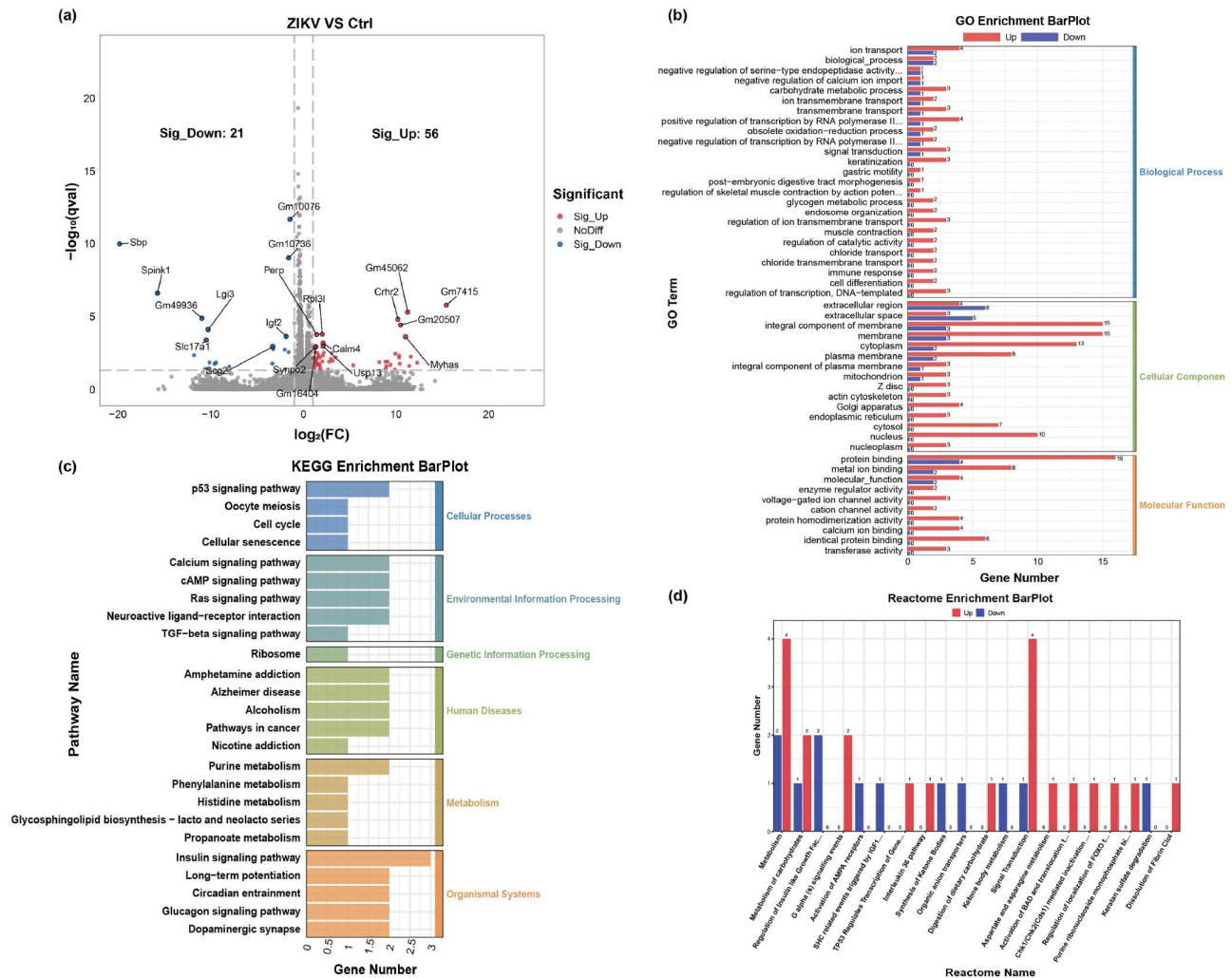


图 3 (网络版彩色)ZIKV感染hSTAT2 KI小鼠睾丸的bulk转录组特征. (a) ZIKV感染小鼠与对照小鼠睾丸中差异表达基因的火山图; (b~d) 条形图分别显示ZIKV感染小鼠与对照小鼠睾丸中差异基因的GO富集分析(b)、KEGG富集分析(c)和Reactome富集分析(d)结果

Figure 3 (Color online) Bulk transcriptomic features of ZIKV-infected testes in hSTAT2 KI mice. (a) Volcano plot showing differentially expressed genes in the testes of ZIKV-infected and control mice. (b~d) Bar charts showing the enrichment analysis of differentially expressed genes between ZIKV-infected and control mouse testes: (b) GO enrichment, (c) KEGG pathway enrichment, and (d) Reactome pathway enrichment

为深入解析ZIKV感染对睾丸细胞组分的特异性影响,并探究相关功能基因集的协同调控模式,我们采用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)方法,系统分析了来自Gene Ontology(GO)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)和Reactome数据库的功能基因集表达谱变化。GSEA分析结果显示,与对照组相比,感染组小鼠睾丸组织中多个与线粒体功能(mitochondrial function)和核糖体功能(ribosomal function)相关的基因集呈现显著激活状态(图4(a~l))。这一发现提示,在ZIKV感染早期,睾丸细胞中可能存在线粒体及核糖体功能异常。

2.4 *Nkx2-3*和*Tbx15*是造成睾丸基因表达谱紊乱的关键基因

上述转录组学分析结果表明, ZIKV感染早期可导致睾丸细胞出现以线粒体和核糖体功能障碍为特征的基因表达谱紊乱。为鉴定这一病理过程的核心调控基因,我们采用生物信息学分析方法展开研究。

首先,将77个差异表达基因导入STRING数据库,构建蛋白-蛋白相互作用网络,并设置中等可信度阈值(confidence score ≥ 0.4)。随后使用Cytoscape软件进行网络可视化,并应用CytoHubba插件筛选核心基因(hub

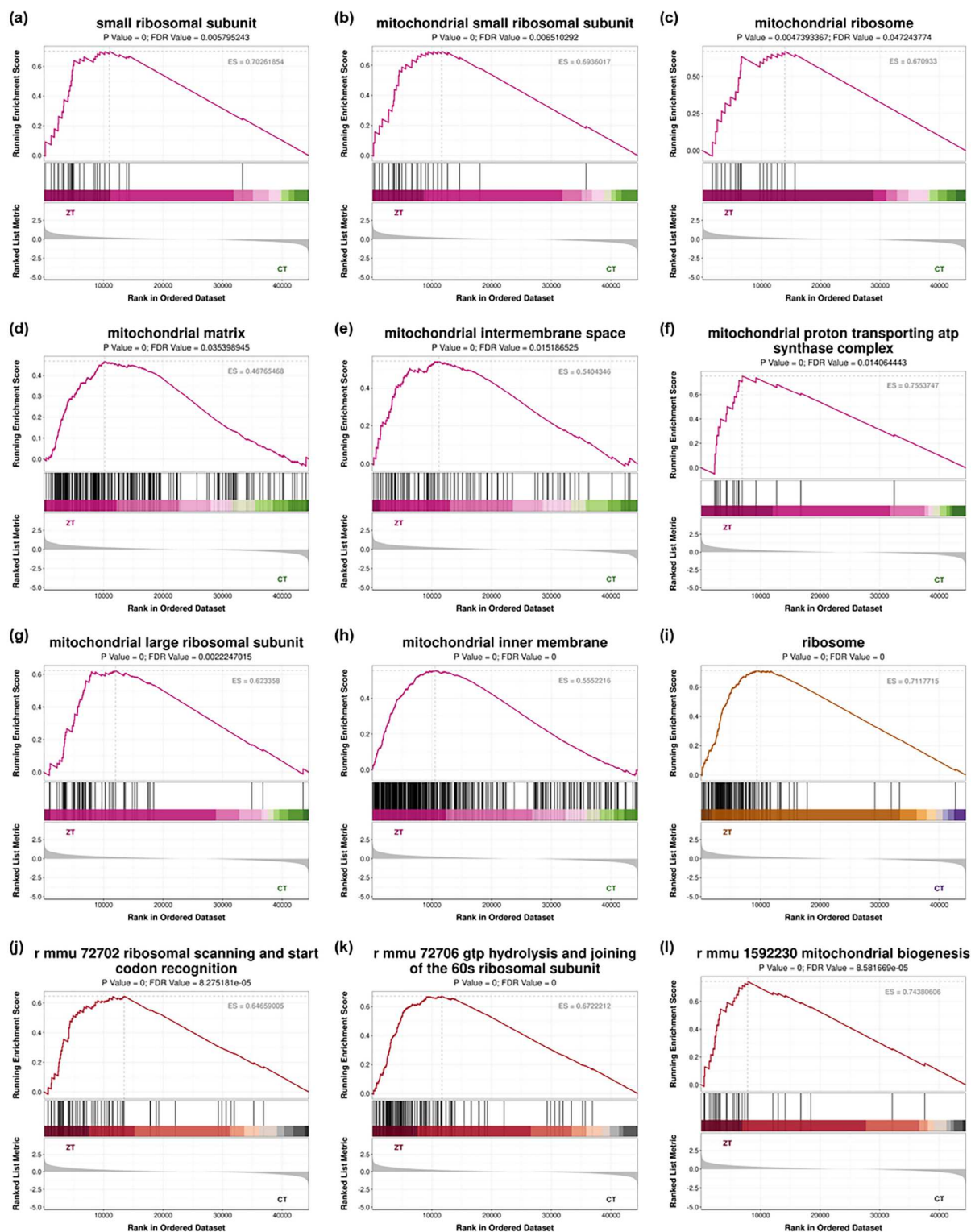


图 4 (网络版彩色)ZIKV感染hSTAT2 KI小鼠睾丸组织的基因集富集分析. (a~h) GSEA-GO富集分析中核糖体及线粒体相关的富集术语; (i) GSEA-KEGG富集分析中核糖体相关的富集术语; (j~l) GSEA-Reactome富集分析中核糖体及线粒体相关的富集术语
 Figure 4 (Color online) Gene set enrichment analysis of ZIKV-infected testicular tissue in hSTAT2 KI mice. (a~h) Enriched ribosome- and mitochondria-related terms from GSEA-GO enrichment analysis. (i) Ribosome-related enriched terms from GSEA-KEGG enrichment analysis. (j~l) Enriched ribosome- and mitochondria-related terms from GSEA-Reactome enrichment analysis

进一步使用BinGo插件进行功能注释,结果显示核心基因显著富集于线粒体相关通路(图5(b)).这一分析结果进一步证实了ZIKV感染早期主要通过干扰线粒体功能来影响睾丸细胞的正常生理活动,而鉴定出的核心基因为后续深入研究ZIKV感染导致睾丸功能障碍的分子机制提供了重要线索.

转录因子是一类对基因的转录有激活或抑制作用的DNA结合蛋白,在基因表达调控网络中发挥重要作用^[20].为阐明ZIKV感染早期睾丸组织差异基因表达的关键转录因子,我们对RNA-Seq数据进行了转录因子预测分析,并构建了转录因子-基因调控网络.分析结果显示,与对照组相比,感染组睾丸组织中转录因子*Nkx2-3*及*Tbx15*的表达量显著增加(图6(a, b)).进一步通过转录因子-基因互作网络分析发现,*Nkx2-3*及*Tbx15*与多个核心基因的表达存在潜在的调控关系(图6(c~e)),表明这两种转录因子可能是ZIKV感染早期调控睾丸细胞基因表达情况的关键转录因子,其异常表达可能通过干扰线粒体功能和核糖体功能,导致睾丸细胞的代谢紊乱和功能障碍.

2.5 ZIKV感染导致睾丸细胞中转录因子*Nkx2-3*及*Tbx15*与核心基因的上调表达

为明确ZIKV感染后睾丸组织中关键转录因子及核心基因的细胞类型特异性表达模式,我们对ZIKV感染14天的hSTAT2 KI小鼠睾丸scRNA-seq数据进行了深入分析.

scRNA-seq分析结果显示,转录因子*Nkx2-3*和*Tbx15*的表达具有显著的细胞类型特异性.其中,*Nkx2-3*主要在精原细胞中表达,且在ZIKV感染后表达量上调;*Tbx15*则主要在精母细胞和精子细胞中表达,感染后总表达量增加(图7(a~f)).核心基因在睾丸组织中呈现广泛的细胞类型分布,且在ZIKV感染后表达水平普遍上调.在生精细胞中,*Calm4*、*Scn4a*、*Cnfn*和*Rpl3l*表达上调(图7(g~j)).支持细胞中,*Rpl3l*、*Cox6a2*和*Itgblp2*表达增加(图7(j~l)).此外,*Perp*在免疫细胞/Leydig细胞中表达上调(图7(m)),*Ppplr3a*在管周肌样细胞中表达增加(图7(n)),而*Tmem38a*的表达则未见明显变化(图7(o)).

为系统验证转录因子*Nkx2-3*和*Tbx15*在ZIKV感染过程中的表达特征,我们采用免疫荧光染色技术检测蛋白定位,结合RT-qPCR定量分析mRNA表达水平,并与前期scRNA-seq数据进行交叉验证.

共定位分析结果显示,*NKX2-3*和*TBX15*的表达与生精细胞标志物(如DDX4)存在显著共定位,进一步证实其在生精细胞中的特异性表达.进一步观察发现,两种蛋白在感染过程中呈现时间依赖的动态表达特征:ZIKV感染第5天,染色信号强度明显增强;至第14天强度明显减弱(图8(a, b)).在转录水平上,RT-qPCR结果与scRNA-seq的结果部分一致.*Nkx2-3* mRNA在感染第5天呈上调趋势,但第14天与对照组相比无显著差异(图8(c, d));*Tbx15* mRNA在感染第5天显著上调,且在第14天仍维持较高水平,整体趋势与scRNA-seq数据一致(图8(e, f)).然而,两种转录因子的mRNA水平在感染第14天与蛋白表达结果出现不一致,提示其表达可能受到转录后调控机制的影响.

这些结果表明,尽管scRNA-seq可有效揭示转录因子的细胞类型特异性表达模式,但其蛋白水平的动态变化反映出更加复杂的时空调控机制.*Nkx2-3*和*Tbx15*在感染早期的显著上调提示其可能参与ZIKV感染初期的生精调控过程,而其表达水平的时序性变化可能与病毒感染引发的核糖体功能异常等深层分子机制密切相关.

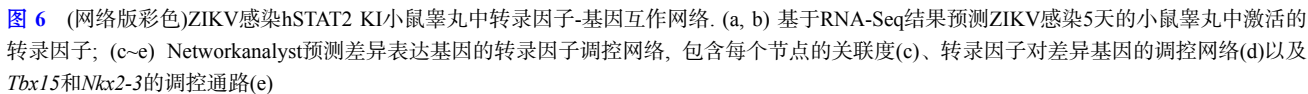
2.6 ZIKV感染后单核/巨噬细胞高表达PSAP影响部分睾丸细胞

值得注意的是,在感染早期阶段,ZIKV主要定位于睾丸间质中的单核/巨噬细胞群.这一独特的病毒分布模式提示,病毒可能通过间接的细胞间通讯调控曲精小管内各类细胞的功能状态.

为探究这一调控机制,我们采用Cellchat对ZIKV感染前后睾丸微环境中的细胞间通讯网络进行了系统性分析.结果表明,ZIKV感染后,睾丸间质内的免疫细胞/Leydig细胞与曲精小管内的Sertoli细胞及管周肌样细胞之间的通讯联系显著增强(图9(a)).其中,PSAP信号通路出现上调(图9(b)).

受体-配体对分析显示,ZIKV感染特异性地激活了免疫细胞/Leydig细胞与Sertoli细胞之间的*Psap-Gpr37*互作(图10).

进一步研究发现,*Psap-Gpr37*配体对在感染后的互作程度增加(图11(a)).表达谱分析表明,*Psap*和*Gpr37*主要表达于Sertoli细胞和间质内的免疫细胞/Leydig细胞中(图11(b)).对免疫细胞/Leydig cells进行进一步分群后,我们证实巨噬细胞群高表达PSAP信号通路分子(图11(c)).这些结果共同表明,在感染早期阶



段, 当ZIKV主要局限于间质中的巨噬细胞时, 可通过激活PSAP信号通路, 尤其是*Psap-Gpr37*介导的细胞间交流, 调控曲精小管内多种细胞的基因表达和功能状态。

4999

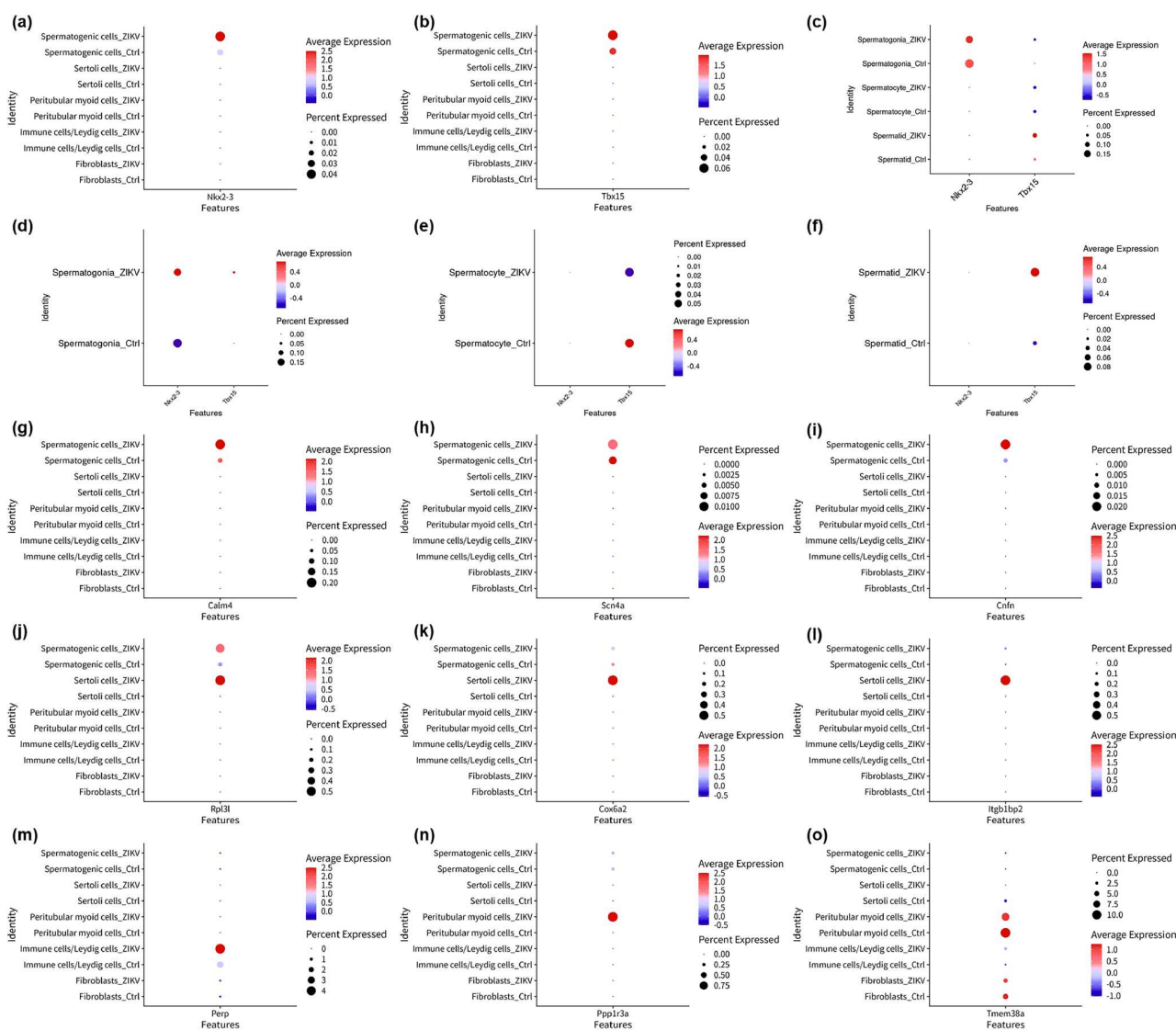


图 7 (网络版彩色)转录因子和核心基因在感染 ZIKV 14 天的 hSTAT2 KI 小鼠睾丸细胞中的表达情况. (a, b) 气泡图显示转录因子 *Nkx2-3* (a) 和 *Tbx15* (b) 在睾丸细胞中的表达情况; (c~f) 气泡图显示转录因子 *Nkx2-3* 和 *Tbx15* 在生精细胞 (c)、精原细胞 (d)、精母细胞 (e) 和精子细胞 (f) 中的表达情况; (g~o) 气泡图显示核心基因在睾丸细胞中的表达情况

Figure 7 (Color online) Expression of transcription factors and hub genes in testicular cells of hSTAT2 KI mice at 14 days post-ZIKV infection. (a, b) Bubble plots showing the expression of transcription factors *Nkx2-3* (a) and *Tbx15* (b) in testicular cells. (c–f) Bubble plots showing the expression of transcription factors *Nkx2-3* and *Tbx15* in spermatogenic cells (c), spermatogonia (d), spermatocytes (e), and spermatozoa (f). (g–o) Bubble plots showing the expression of hub genes in testicular cells

尚不明确. 为探讨这一问题, 我们利用 DNA 损伤标志物 ATM (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 对 ZIKV 感染后睾丸细胞的 DNA 损伤情况进行评估. 染色结果显示, 仅在 ZIKV 感染 7 天时, 部分曲精小管内可检测到少量 ATM 阳性细胞, 而在感染 5 和 14 天均未观察到明显的 ATM 阳性信号 (图 11(d)). 该结果提示, ZIKV 感染早期可能会诱导部分睾丸细胞发生 DNA 损伤, 而 PSAP 信号

通路的激活可能在细胞 DNA 损伤修复及功能恢复中发挥重要作用.

3 讨论与结论

自 2015 年巴西疫情暴发以来, ZIKV 与其他已知黄病毒不同的致病特征引起了广泛关注, 特别是对雄性生殖系统的嗜性^[23]. 临床研究表明, ZIKV 感染不仅可

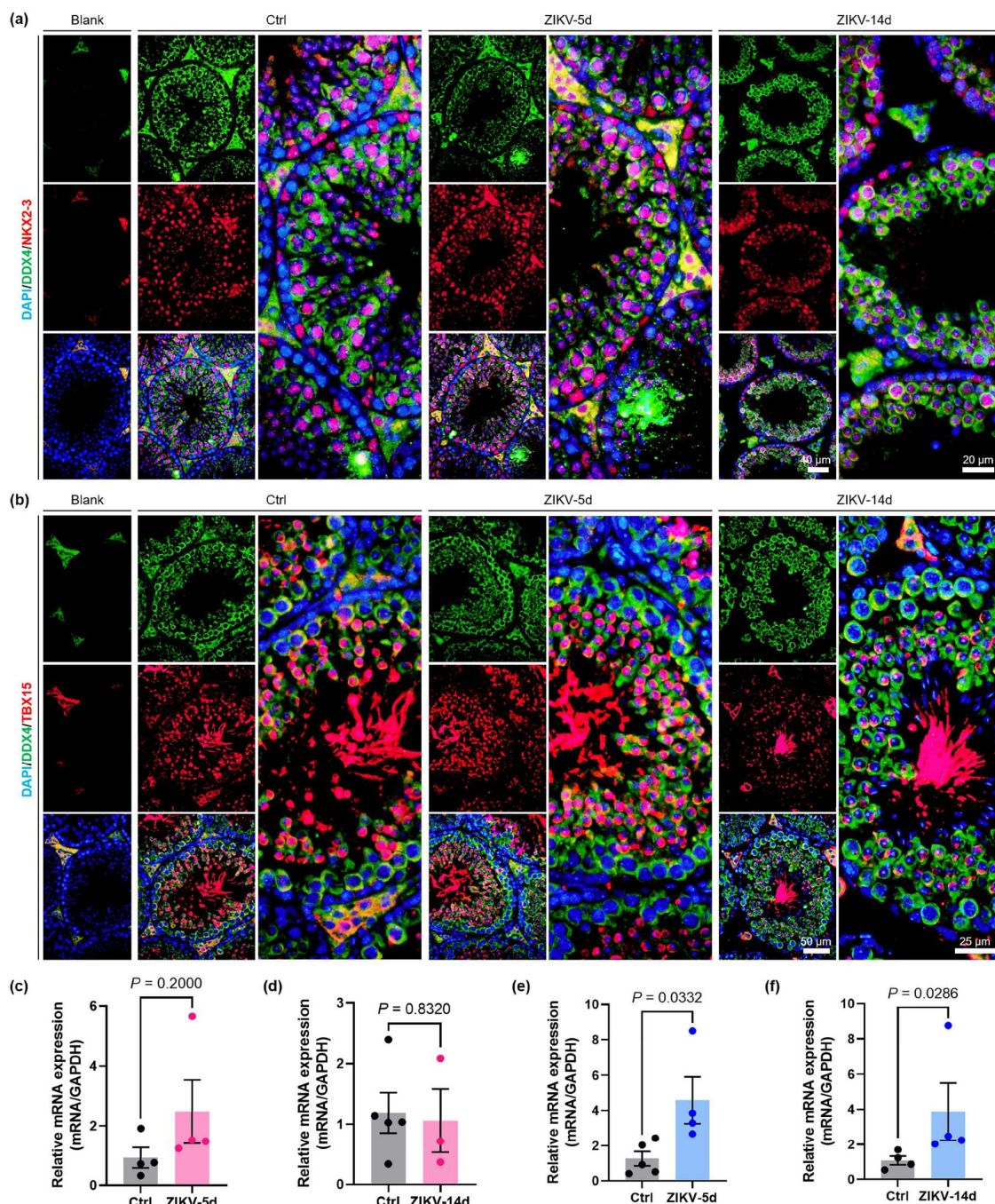


图 8 (网络版彩色)ZIKV感染hSTAT2 KI小鼠睾丸中转录因子的时空表达特征. (a) ZIKV感染小鼠和对照小鼠睾丸中NKX2-3和DDX4(生精细胞)的免疫荧光共定位分析. (b) ZIKV感染小鼠和对照小鼠睾丸中TBX15和DDX4(生精细胞)的免疫荧光共定位分析. (c, d) ZIKV感染5天(c)与14天(d)时hSTAT2 KI小鼠睾丸中*Nkx2-3* mRNA的表达变化; (e, f) ZIKV感染5天(e)与14天(f)时hSTAT2 KI小鼠睾丸中*Tbx15* mRNA的表达变化. 数据以均值 $\pm$ 标准误差表示. (c)和(f)中的数据不符合正态分布, 采用Mann-Whitney检验进行组间差异分析; (d)和(e)中的数据符合正态分布, 组间差异通过独立样本*t*检验进行分析

Figure 8 (Color online) Spatiotemporal expression patterns of transcription factors in the testes of ZIKV-infected hSTAT2 KI mice. (a) Immunofluorescence colocalization analysis of NKX2-3 and DDX4 (spermatogenic cells) in the testes of ZIKV-infected and control mice. (b) Immunofluorescence colocalization analysis of TBX15 and DDX4 (spermatogenic cells) in the testes of ZIKV-infected and control mice. (c, d) Temporal changes in *Nkx2-3* mRNA expression in the testes of hSTAT2 KI mice at 5 days (c) and 14 days (d) post-ZIKV infection. (e, f) Temporal changes in *Tbx15* mRNA expression in the testes of hSTAT2 KI mice at 5 days (e) and 14 days (f) post-ZIKV infection. Data are presented as mean $\pm$ standard error. For (c) and (f), non-normally distributed data were analyzed using the Mann-Whitney test; for (d) and (e), normally distributed data were analyzed using an independent samples *t*-test

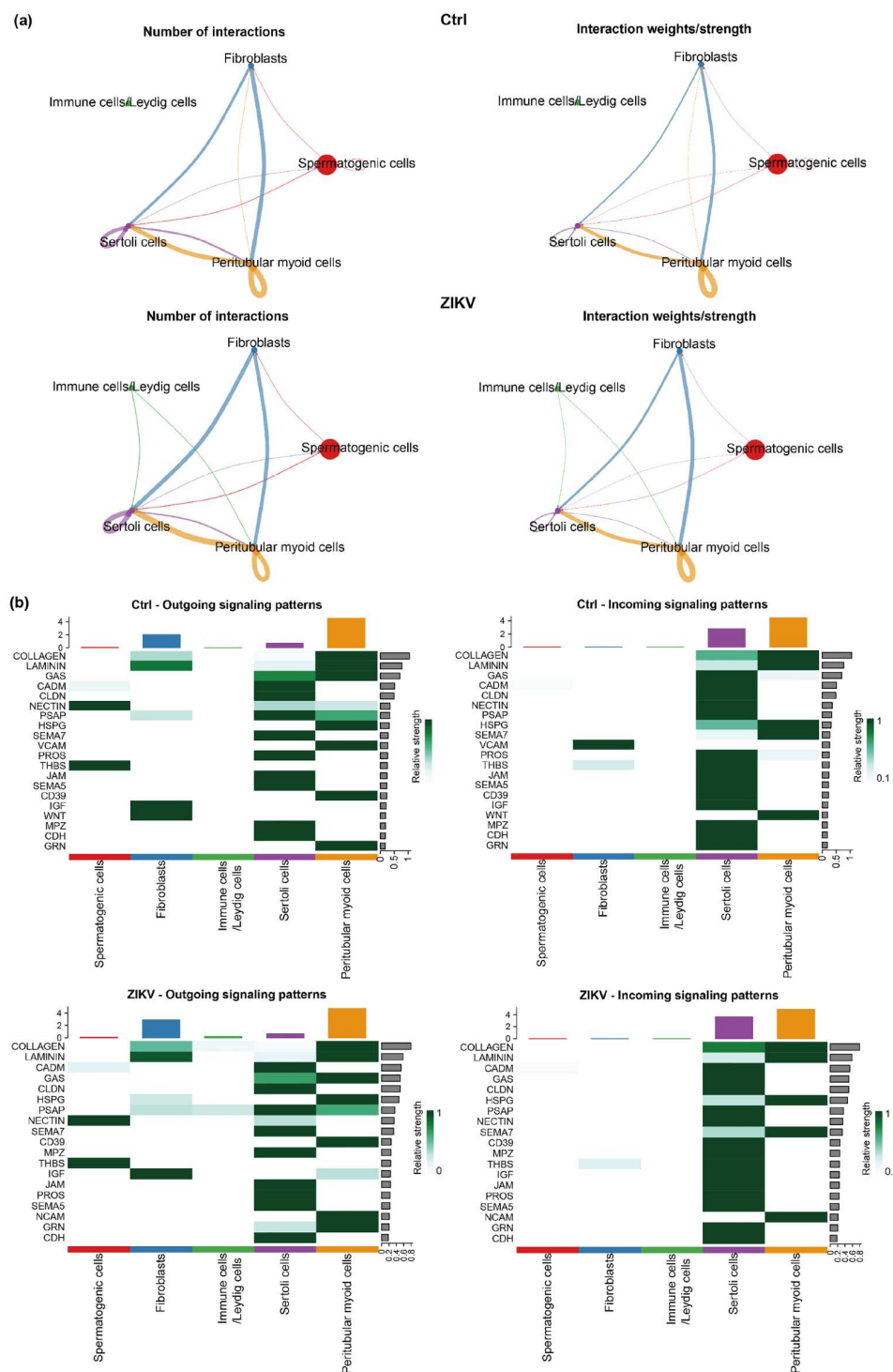


图 9 (网络版彩色)ZIKV感染hSTAT2 KI小鼠睾丸细胞间通讯特征分析。(a) Cellchat分析睾丸细胞间通讯网络, 节点大小代表细胞群比例, 连线粗细反映互动强度; (b) ZIKV感染小鼠和对照小鼠睾丸细胞群在各激活通路的Outgoing端及Incoming端的贡献值热图。ZIKV感染后免疫细胞/Leydig细胞在PSAP通路中的信号输出显著增强

Figure 9 (Color online) Analysis of intercellular communication characteristics in testicular cells of ZIKV-Infected hSTAT2 KI mice. (a) CellChat analysis of intercellular communication networks in testicular cells. Node size represents the proportion of cell populations, and line thickness indicates interaction strength. (b) Heatmap Showing the contribution values of testicular cell populations in the Outgoing and Incoming signaling pathways of ZIKV-infected and control mice/Significant enhancement of signaling output in immune cells and Leydig cells through the PSAP pathway after ZIKV infection

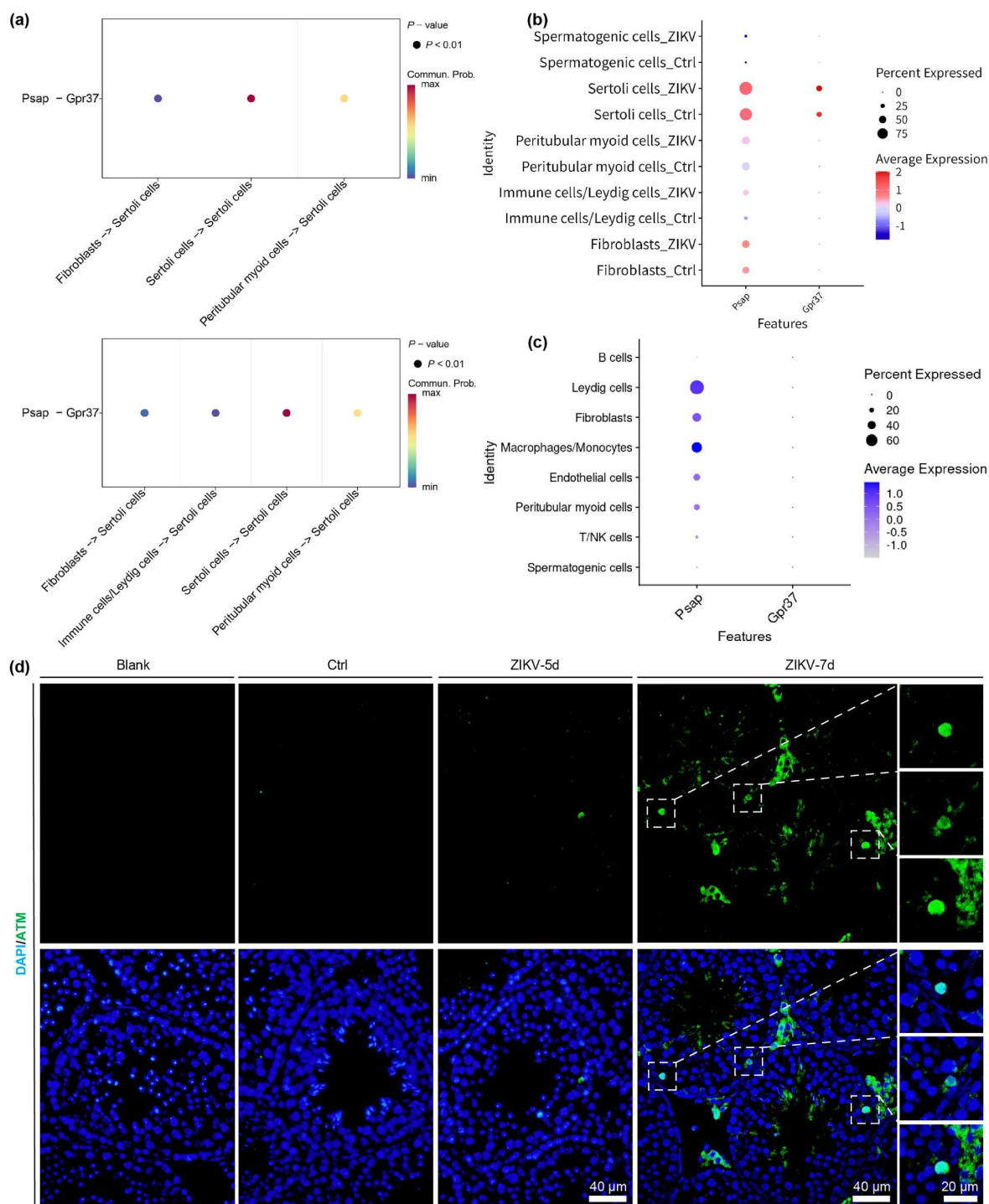


图 11 (网络版彩色)PSAP信号通路细胞交互特征及ZIKV感染致DNA损伤时序分析。(a) 参与PASP信号通路激活的受体配体对在各群细胞间交互情况的点图; (b) PSAP信号通路受体配体在对照组及感染组各群细胞中的表达情况; (c) 对Immune cells/Leydig cells进行进一步分群后, 各细胞群中PSAP信号通路受体配体的表达情况; (d) DNA功能损伤分析。免疫荧光染色显示ATM (DNA损伤标志物)在睾丸组织中的表达情况

Figure 11 (Color online) Cellular interaction features of the PSAP signaling pathway and temporal analysis of DNA damage induced by ZIKV infection. (a) Dot plot depicting the interactions of receptor-ligand pairs involved in the activation of the PSAP signaling pathway between various cell populations. (b) Expression of receptor-ligand pairs of the PSAP signaling pathway in different cell populations of both control and infected groups. (c) Following the further subgrouping of immune cells and Leydig cells, the expression of PSAP signaling pathway receptor-ligand pairs in each respective cell population. (d) DNA functional damage analysis. Immunofluorescence staining showing the expression of ATM (DNA damage marker) in testicular tissue

研究发现, ZIKV感染早期主要局限于睾丸间质, 并以S100A4阳性单核/巨噬细胞作为主要靶细胞, 而其他易感细胞在此阶段尚未被感染. 这一发现提示, 单核/巨噬细胞可能在ZIKV进入睾丸后的早期复制和传播过程中发挥重要作用. 值得注意的是, 尽管发生病毒感染, 睾丸组织内的免疫相关信号通路未能被显著激活, 这可能反映了睾丸独特的免疫豁免特性, 使得病毒得以在免疫应答启动前建立感染^[26].

与此同时, 线粒体及核糖体相关基因通路表现出异常的表达模式, 提示ZIKV可能通过直接影响这些关键细胞器的功能来干扰睾丸的正常生理活动.

线粒体是真核细胞能量代谢的关键细胞器, 在精子生发过程中扮演了重要角色. 已有研究表明, 线粒体基因突变会导致精子数量减少、精子活力下降以及雄性不育^[27-29]. 本研究发现ZIKV感染可导致线粒体相关通路异常激活, 这可能是病毒感染早期即影响精子发生的重要机制之一. 此外, 适宜水平的线粒体活性氧浓度是维持精子运动能力及致孕能力的关键^[30], 而病毒感染可能通过破坏这一平衡进一步损害精子功能.

在蛋白质合成方面, 核糖体功能异常同样值得关注. 雄性生殖细胞具有独特的功能性核糖体, 其结构与常规核糖体存在差异, 适应了生精过程中独特的翻译需求^[31]. 精原干细胞中的核糖体蛋白不仅参与细胞蛋白翻译, 还调控核糖体组装和新生蛋白质量控制^[32]. 在本研究中, 我们观察到转录因子mRNA水平与蛋白表达不完全一致, 这一现象提示ZIKV可能通过核糖体功能, 影响生精细胞中的蛋白合成, 从而扰乱其正常的生理活动.

在分子调控层面, 本研究揭示了NKX家族成员*Nkx2-3*及T-box家族成员*Tbx15*在ZIKV感染早期睾丸组织中的关键调控作用. 通过转录组分析和实验验证, 我们发现这两种转录因子在感染5天时表达显著上调, 而在14天时部分恢复至基线水平, 呈现出明显的动态变化特征. 值得注意的是, 转录因子-基因互作网络分析表明, *Nkx2-3*和*Tbx15*可能通过调控线粒体功能相关基因和核糖体功能相关基因, 进一步影响睾丸细胞的能量代谢和蛋白质合成过程.

从分子功能角度来看, *Nkx2-3*作为重要的发育调

控因子, 已被证实具有抑制细胞过度增殖的作用. 研究表明, *Nkx2-3*失活会导致小鼠小肠隐窝细胞异常增殖和肠道形态严重紊乱^[33]. 在牙齿发育过程中, *Nkx2-3*可通过上调*P21*基因抑制上皮细胞的过度增殖^[34]. 而*Tbx15*则在多种组织器官发育过程中发挥关键调控作用. 近年研究发现, *Tbx15*在甲状腺癌细胞中具有抗凋亡功能^[35], 且在肺癌和乳腺癌等多种肿瘤中呈现异常表达模式^[36,37], 提示其可能参与细胞命运决定的调控网络.

基于本研究实验结果, 我们提出以下科学假设: 在ZIKV感染早期, 病毒可能通过诱导转录因子*Nkx2-3*和*Tbx15*的表达上调, 进而改变其下游靶基因, 尤其是线粒体和核糖体相关基因的表达模式. 这种转录重编程可能导致: (1) 线粒体氧化磷酸化过程紊乱, 影响精子发生所需的能量供应; (2) 核糖体功能异常, 干扰生精细胞特异性蛋白的合成; (3) 细胞周期调控失衡, 可能影响精原干细胞的自我更新和分化. 尽管这两种转录因子在感染14天时表达逐渐恢复正常, 但其早期激活可能已对睾丸组织造成持续性损伤, 这可能是ZIKV导致生精功能障碍的重要机制之一. 当然, 上述假设有待进一步实验验证.

此外, 本研究还发现PSAP信号通路在ZIKV感染后的睾丸细胞中可能发挥重要作用. 既往研究表明, 该信号通路在保护神经元免受氧化应激损伤方面具有重要作用^[21]. 本研究观察到的ATM阳性信号在感染早期的部分曲精小管的短暂出现, 提示PSAP信号通路可能参与ZIKV感染导致的DNA损伤修复过程, 这一发现为理解病毒感染对生殖细胞基因组稳定性的影响提供了新的研究方向.

总而言之, 本研究系统揭示了ZIKV感染早期睾丸组织的分子特征, 发现ZIKV可能通过靶向睾丸间质单核/巨噬细胞, 并借助*Nkx2-3*和*Tbx15*介导的转录调控网络, 扰乱线粒体和核糖体功能, 进而影响生精过程. 这些发现不仅深化了对ZIKV感染导致雄性生殖损害的理解, 也为开发针对性策略提供了重要理论依据. 此外, 本研究强调, 在关注曲精小管内变化的同时, 还应重视睾丸间质微环境(如免疫细胞浸润、细胞因子分泌及代谢物变化等)在ZIKV感染过程中的作用, 以期进一步解析ZIKV感染对男性生殖健康的影响.

参考文献

- 1 D'ortenzio E, Matheron S, de Lamballerie X, et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N Engl J Med*, 2016, 374: 2195-2198

- 2 Pletnev A G, Maximova O A, Liu G, et al. Epididymal epithelium propels early sexual transmission of Zika virus in the absence of interferon signaling. *Nat Commun*, 2021, 12: 2469
- 3 Kurscheidt F A, Mesquita C S S, Damke G M Z F, et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nat Rev Urol*, 2019, 16: 211–230
- 4 MacMicking J D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12: 367–382
- 5 Grant A, Ponia S S, Tripathi S, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 882–890
- 6 Yang W, Wu Y H, Liu S Q, et al. S100A4⁺ macrophages facilitate Zika virus invasion and persistence in the seminiferous tubules via interferon-gamma mediation. *PLoS Pathog*, 2020, 16: e1009019
- 7 McDonald E M, Duggal N K, Ritter J M, et al. Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12: e0006691
- 8 Sheng Z Y, Gao N, Wang Z Y, et al. Sertoli cells are susceptible to Zikv infection in mouse testis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 272
- 9 Gorman M J, Caine E A, Zaitsev K, et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. *Cell Host Microbe*, 2018, 23: 672–685.e6
- 10 Yang W, Zhang C, Liu L B, et al. Immunocompetent mouse models revealed that S100A4⁺ monocytes/macrophages facilitate long-term Zika virus infection in the testes. *Emerg Microbes Infects*, 2024, 13: 2300466
- 11 Vojkovic D, Kellermayer Z, Gábris F, et al. Differential effects of the absence of Nkx2-3 and MAdCAM-1 on the distribution of intestinal Type 3 innate lymphoid cells and postnatal SILT formation in mice. *Front Immunol*, 2019, 10: 366
- 12 Nagel S, Drexler H G. Deregulated NKL homeobox genes in B-cell lymphoma. *Cancers*, 2019, 11: 1874
- 13 Van Limbergen J, Wilson D C, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2009, 10: 89–116
- 14 Lausch E, Hermanns P, Farin H F, et al. TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in cousin syndrome. *Am J Hum Genet*, 2008, 83: 649–655
- 15 Candille S I, Raamsdonk C D V, Chen C, et al. Dorsoventral Patterning of the mouse coat by Tbx15. *PLoS Biol*, 2004, 2: e3
- 16 Lee K Y, Singh M K, Ussar S, et al. Tbx15 controls skeletal muscle fibre-type determination and muscle metabolism. *Nat Commun*, 2015, 6: 8054
- 17 Sheng Z Y, Wang J, Wu J M, et al. The improvements of plaque assay using methylcellulose (in Chinese). *Immunol J*, 2012, 28: 363–365, 368 [盛子洋, 王娟, 吴江漫, 等. 利用甲基纤维素改良的病毒噬斑技术. *免疫学杂志*, 2012, 28: 363–365, 368]
- 18 Otasek D, Morris J H, Bouças J, et al. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis. *Genome Biol*, 2019, 20: 185
- 19 Chin C H, Chen S H, Wu H H, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol*, 2014, 8: S11
- 20 Papuchova H, Latos P A. Transcription factor networks in trophoblast development. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79: 337
- 21 Yu J, Li J, Matei N, et al. Intranasal administration of recombinant prosaposin attenuates neuronal apoptosis through GPR37/PI3K/Akt/ASK1 pathway in MCAO rats. *Exp Neurol*, 2024, 373: 114656
- 22 Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, et al. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*, 2017, 14: 470–485
- 23 Guo Z, Jing W, Liu J, et al. The global trends and regional differences in incidence of Zika virus infection and implications for Zika virus infection prevention. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16: e0010812
- 24 Musso D, Roche C, Robin E, et al. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 359–361
- 25 Joguet G, Mansuy J M, Matusali G, et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17: 1200–1208
- 26 Li S Y, Kumar S, Gu X, et al. Testicular immunity. *Mol Aspects Med*, 2024, 100: 101323
- 27 Ding N, Zhang X, Zhang X D, et al. Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. *Gut*, 2020, 69: 1608–1619
- 28 Zhang S, Wang C, Wang Y, et al. A novel protein encoded by circRsrcl regulates mitochondrial ribosome assembly and translation during spermatogenesis. *BMC Biol*, 2023, 21: 94
- 29 Kuang W, Zhang J, Lan Z, et al. SLC22A14 is a mitochondrial riboflavin transporter required for sperm oxidative phosphorylation and male fertility. *Cell Rep*, 2021, 35: 109025
- 30 Costa J, Braga P C, Rebelo I, et al. Mitochondria quality control and male fertility. *Biology*, 2023, 12: 827
- 31 Li H, Huo Y, He X, et al. A male germ-cell-specific ribosome controls male fertility. *Nature*, 2022, 612: 725–731
- 32 Zou Q, Yang L, Shi R, et al. Proteostasis regulated by testis-specific ribosomal protein RPL39L maintains mouse spermatogenesis. *iScience*, 2021, 24: 103396
- 33 Pabst O, Zweigerdt R, Arnold H H. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development*, 1999, 126: 2215–2225
- 34 Han X, Yoshizaki K, Miyazaki K, et al. The transcription factor NKX2-3 mediates p21 expression and ectodysplasin-A signaling in the enamel

- knot for cusp formation in tooth development. [J Biol Chem](#), 2018, 293: 14572–14584
- 35 Arribas J, Giménez E, Marcos R, et al. Novel antiapoptotic effect of TBX15: overexpression of TBX15 reduces apoptosis in cancer cells. [Apoptosis](#), 2015, 20: 1338–1346
- 36 Zheng Y, Huang Q, Ding Z, et al. Genome-wide DNA methylation analysis identifies candidate epigenetic markers and drivers of hepatocellular carcinoma. [Brief Bioinform](#), 2016, 19: bbw094
- 37 Jiang C F, Xie Y X, Qian Y C, et al. TBX15/miR-152/KIF2C pathway regulates breast cancer doxorubicin resistance via promoting PKM2 ubiquitination. [Cancer Cell Int](#), 2021, 21: 542

Summary for “寨卡病毒感染早期促进 *Nkx2-3* 及 *Tbx15* 表达造成睾丸细胞细胞器功能紊乱”

Nkx2-3 and *Tbx15* mediate organelle dysfunction in testicular cells during early Zika virus infection

Zhazhan Bian^{1,2}, Jiatong Chang^{1,2}, Yuheng Guan¹, Linshenyang Liu¹, Dongying Fan^{1,2}, Jing An^{1,2}, Wei Yang^{3*} & Peigang Wang^{1,2*}

¹ Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

² Laboratory for Clinical Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

³ Institute of Laboratory Animal Science, CAMS & PUMC, Beijing 100021, China

* Corresponding authors, E-mail: 1751180423@qq.com; pgwang@ccmu.edu.cn

Zika virus (ZIKV) infection is associated with various reproductive and neurological disorders; however, the precise molecular mechanisms by which it affects the male reproductive system, particularly spermatogenesis, remain poorly understood. A key challenge in this research is the heavy reliance on interferon receptor knockout (*Ifnar*^{-/-}) mouse models. Although these models are widely used due to their heightened susceptibility to ZIKV, their severe testicular pathology significantly limits the ability to examine early-stage and temporally dynamic molecular alterations. To address this, we used human *STAT2* knock-in (hSTAT2 KI) mice with intact immune function as a more physiologically relevant model to systematically examine early molecular and cellular responses in testicular tissue following ZIKV infection.

We found that during the early phase of infection, ZIKV selectively targets S100A4-positive monocytes and macrophages within the testicular interstitium, while other known susceptible cell types, such as Sertoli cells and germ cells remain uninfected at this stage. Despite this restricted viral tropism, bulk RNA sequencing revealed widespread transcriptional reprogramming in the testes, characterized by aberrant activation of pathways related to ribosome biogenesis, mitochondrial function, and cellular stress. These results indicate that even localized infection can elicit broad molecular disturbances within the testicular microenvironment.

To obtain higher-resolution insights into cell type-specific responses, we performed single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) at 14 days post-infection. The results revealed widespread dysregulation of gene expression across multiple testicular cell populations, including spermatogonia, Sertoli cells, and Leydig cells, regardless of whether they were directly infected by the virus. A core set of differentially expressed genes showed consistent alterations across these cell types. Through transcriptional network analysis and *in vivo* validation, we identified *Nkx2-3* and *Tbx15* as candidate transcription factors that may drive these transcriptomic changes, particularly within spermatogenic cells. These regulators are likely to function downstream of immune or stress-related signals originating from infected interstitial immune cells.

Furthermore, CellChat analysis of intercellular communication indicated that immune cells may influence germ cell function through paracrine mechanisms, particularly via the PSAP signaling pathway. This interaction was associated with transcriptional signatures indicative of DNA damage and cellular stress in spermatogenic cells, suggesting that immune-mediated signaling rather than direct viral invasion plays a pivotal role in early-stage testicular injury.

Although ZIKV remains largely restricted to the interstitial compartment and does not invade the seminiferous tubules, we observed significant transcriptomic changes in both germ cells and supporting somatic cells. These findings underscore the critical role of the testicular interstitial microenvironment in mediating the wider impact of localized viral infection.

In summary, our study offers a comprehensive molecular and cellular characterization of the early testicular response to ZIKV infection in a physiologically relevant immunocompetent mouse model. These findings highlight the critical role of non-cell-autonomous mechanisms, particularly the interactions between immune and germ cells, in mediating ZIKV-induced testicular dysfunction and provide novel insights into potential therapeutic targets for preserving male fertility.

Zika virus, *Nkx2-3*, *Tbx15*, testis, organelle dysfunction

doi: [10.1360/TB-2024-0448](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0448)