



精液检测技术与男性生育力评估的进展及未来发展趋势

吴思娴¹, 魏亚祯^{1,2}, 于抗抗³, 陈雨晞^{1,2}, 许文明^{1*}

1. 四川大学华西第二医院, 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室, 成都 610041;

2. 四川大学华西药学院, 成都 610041;

3. 四川大学生命科学学院, 成都 610064

* 联系人, E-mail: xuwenming@scu.edu.cn

收稿日期: 2023-08-09; 接受日期: 2023-08-29; 网络版发表日期: 2024-01-10

国家自然科学基金(批准号: 82171715)资助

摘要 近年来, 精液检测技术在评估男性生育力方面取得了显著进展, 为临床诊断和治疗提供了先进的工具. 这些技术包括临床常规的精液检测技术, 如精液常规分析、计算机辅助精子分析和DNA碎片检测等. 然而, 由于干扰因素的复杂性, 目前的方法尚无法全面评估生育力以及缺乏明确的病因学检测方案等问题, 需要进一步开发用于精子检测及男性生育力评估的技术. 目前, 现代检测技术中逐步使用电子显微镜、高速运动成像分析、流式细胞仪及激光共聚焦等仪器工程, 为精子的质量评估提供了更全面准确的信息. 未来, 随着技术的不断进步, 将会出现更加精准和高效的精液检测技术. 睾丸类器官技术将使男性生育力评估更为精确与全面; 荧光活体成像技术可以实现对精子内指标的活体无创观测, 使得临床病因学检测更加高效、便捷; 基于组学测序技术的精子分析方法, 可以实现对精子源性遗传突变的全面评估, 包括基因组学、表观遗传学和蛋白质组学等方面的信息; 人工智能和机器学习的应用也有望提高精子检测的准确性和效率, 为临床决策提供更可靠的依据. 这些先进的精液检测技术的发展将为不育症患者提供更准确的诊断和个体化的治疗方案. 同时, 它们也有助于深入了解男性生育力的机制和疾病发生的分子基础, 为生殖医学领域的研究和发展提供重要的支持.

关键词 精液检测, 男性生育力, 类器官, 人工智能, 先进技术

世界卫生组织将不孕不育定义为在至少12个月的定期、无保护的性生活之后无法怀孕^[1]. 据统计, 不孕不育影响了育龄夫妇中的8%~12%, 其中约50%的夫妇是由于男性因素导致的^[2]. 1990~2017年期间, 男性不育症患病率每年增加0.291%^[3]. 精液检测技术在评估男性生育能力、不育症的诊断、辅助生殖技术的优化

以及男性生殖健康研究等方面发挥着至关重要的作用. 精子的数量、活力、形态和DNA完整性等参数是评估男性生育能力的重要指标, 这些指标的测定离不开精液检测技术^[4].

精液检测技术作为诊断男性不育症的重要工具, 可以帮助医生准确了解精子的数量、活动力、形态和

引用格式: 吴思娴, 魏亚祯, 于抗抗, 等. 精液检测技术与男性生育力评估的进展及未来发展趋势. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 173–186
Wu S X, Wei Y Z, Yu K K, et al. Advancements and future trends in sperm detection techniques and male fertility assessment (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 173–186, doi: 10.1360/SSV-2023-0175

DNA完整性等参数, 从而为男性不育症诊断提供依据^[5]。尽管大量临床数据表明, 已确定的男性不育因素与精液分析发现的异常有关, 但是目前已经认识到的另一个主要挑战是, 有生育能力的男性和不育男性的精液分析结果的分布存在大量重叠。这意味着患者的精液参数并不足以确定患者是否可育或不育^[6]。因此, 需要不断开发更具临床诊断价值的病因学诊断指标, 如精子生理功能指标、出生缺陷、获得性不育症、感染、勃起或射精障碍、各种综合征以及代谢和内分泌紊乱等^[4]。同时, 为了更好地开发具有临床诊断意义的病因学指标, 急需不断迭代更敏感、更便捷、更有效的精液检测技术。

精液检测技术在辅助生殖技术中发挥着重要的作用。例如, 在体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)和胚胎移植等辅助生殖技术中, 通过精子检测可以筛选出活动力强、形态正常的精子, 从而提高受精和植入成功率^[7]。此外, 精液检测技术也是研究男性生殖健康的重要工具。例如, 通过精子检测可以研究环境污染、生活方式、疾病和药物等因素对精子质量的影响, 从而为预防和改善男性生育问题提供科学依据^[8,9]。总之, 精液检测技术在男性生育健康领域中的重要性不言而喻, 其发展和完善将在提高男性生育能力、降低不育症发病率、优化辅助生殖技术以及推动男性生殖健康研究等方面产生深远影响。近年来随着基因测序等技术的发展, 人工智能、二代测序等技术进一步应用到男性精子的检测与筛选, 为男性生育力评估提供了新的手段。

1 精液检测技术的发展历程

最早期的精子检测方法是直接观察法, 即用显微镜观察精液中的精子。17和18世纪的研究者首先发现了动物与人类精子, 并开始对其进行研究。其中最著名的研究者是荷兰人安东尼·范·李文虎克(Antonie van Leeuwenhoek), 他于1677年首次观察到了精子^[10]。安东尼·范·李文虎克使用自制的显微镜观察了大量样本, 包括自己的精液和其他动物的精液。他发现精液中存在许多微小的“动物”, 这些“动物”后来被认为是精子。在随后的几个世纪里, 科学家们逐步发展出一套基本的精子检测方法, 包括显微镜观察、精液分析和精子计数等。进入20世纪, 电子显微镜的发明推动了

精液检测技术的进一步发展。科学家首次通过电子显微镜观察精子内部结构, 揭示了精子的复杂性^[11]。随后, 科学家开始使用化学和生物学方法检测精子的功能和生理状态, 如精子染色体分析、精子活动度测定、精子形态分析等。1978年, 首个试管婴儿诞生, 其中就使用了精液检测技术, 进一步推动了精液检测技术的发展。20世纪90年代, 随着计算机技术的发展, 计算机辅助精子分析系统(computer-aided sperm analysis, CASA)被引入精子检测, 使得精子活动性和形态分析更为准确客观^[12]。进入21世纪, 精液检测技术进入全新的阶段。基因组学的发展使得科学家可以通过分析精子基因表达情况来评估其质量^[13]。流式细胞仪和激光共聚焦扫描显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)等新兴技术的应用, 使得精子检测更为精细全面^[14]。此外, 高通量测序技术和生物芯片技术的发展, 使得科学家们可以在全基因组水平上分析精子的基因和表观遗传特性, 为精液检测技术的发展开辟了新的方向^[15]。基因检测技术的出现使得人们能够更准确地评估男性生育能力。该技术可以检测精子中的基因突变和染色体异常, 从而更好地预测男性的生育能力。最早的基因检测技术是PCR技术, 它可以检测精子中的DNA序列。2003年, 国际人类基因组计划的完成使得基因检测技术的发展迈上了新的台阶^[16]。现在, 基因检测技术现已成为评估男性生育能力的重要手段之一。

2 临床常规精液检测技术及其不足

2.1 常规精液分析

精液分析反映了睾丸功能、导管系统的通畅性和辅助腺体的分泌活动。精液分析提供了有关男性因素在不孕夫妇中的占比信息^[17]。同时, 传统的精液特征为体内受孕以及体外受精的成功提供了一定程度的预测价值^[18]。常规精液分析包括: 精液量、液化状态、精液气味、精液颜色、精子密度、精子数量、精子活力和液化时间等^[19]。根据世界卫生组织第六版精液分析指南, 本文对精常规分析指标及标准值进行了如下整理(表1)。值得注意的是, 世界卫生组织第六版精液分析指南中提到有生育力的男性和没有生育力的男性精液分析结果有很大的重叠, 表明男性不育生物学病因需要进一步探索^[20]。

表 1 世界卫生组织精液评估指标^{a)}
Table 1 World Health Organization's semen evaluation criteria^{a)}

评估指标	第一版 (1980)	第二版 (1987)	第三版 (1992)	第四版 (1999)	第五版 (2010)	第六版 (2021)
精液体积(mL)	无	≥2.0	≥2.0	≥2.0	≥1.5	≥1.4
精液浓度(/mL)	20×10 ⁶ ~200×10 ⁶	≥20×10 ⁶	≥20×10 ⁶	≥20×10 ⁶	≥15×10 ⁶	≥16×10 ⁶
精子总数(/mL)	≥40×10 ⁶	≥40×10 ⁶	≥40×10 ⁶	≥40×10 ⁶	≥39×10 ⁶	≥39×10 ⁶
精子活动性(前向运动)	≥60%	≥50%	≥50%	≥50%	≥32%	≥30%
精子活力	无	≥50%	≥75%	≥75%	≥58%	≥54%
精子正常形态	≥80.5%	≥50%	≥30%	≥15%	≥4%	≥4%

a) 数据摘自世界卫生组织精液分析手册

(1) 精液宏观评估. 标准精液分析包括对精液宏观特征进行评估, 其中包括精液液化时间、外观、颜色、黏度、体积及酸碱度等指标. 精液液化时间是指从采集样本到液化完成并开始进行精液分析的时间间隔. 为排除外部因素对精液质量的潜在影响, 液化时间应不超过60分钟. 正常液化精液呈现均匀的灰乳白色. 精液黏度反映其流动性. 通过将样品吸入移液管中并观察其通过重力下降的速度来评估精液黏度. 正常精液样本会形成小的离散液滴, 当精液形成的线状结构超过2 cm时, 表示精液具有较高黏度. 精液体积反映附属性腺整体功能. 测量精液体积是一个关键步骤, 直接影响精子总数和其他非生殖细胞计数计算. 据世界卫生组织第六版精液分析指南建议, 应该在同一容器中称量收集到的样品, 以避免在转移过程中的样品损失^[20]. 精液pH值是酸性前列腺分泌物和碱性精囊分泌物之间平衡的指标. 为评估精液pH值, 可以利用pH试纸检测少量精液样本, 并将所得颜色与校准条进行比较. 根据世界卫生组织第六版精液检测指南, 正常精液pH值下限阈值为7.2^[20].

(2) 精液显微镜评估. 精液显微镜评估涵盖凝集、圆形细胞、精子浓度、精子活力及精子形态等指标. 凝集是指精子相互黏附形成团块的现象. 凝集的存在会对精子活力和浓度的评估产生干扰, 因此需要根据凝集数量和凝集部位(头对头、尾对尾或混合)进行分级. 凝集的出现可能暗示存在抗精子抗体, 从而需要进行进一步免疫学测试来推断不育症病因^[21]. 除精子外, 还可以在射精样本中观察到圆形细胞, 包括白细胞和未成熟生殖细胞. 当圆形细胞浓度超过1×10⁶/mL, 应对精液涂片进行差异染色技术处理以区

分白细胞和未成熟生殖细胞. 精子浓度是指每单位体积精液中的精子数量, 它与排出精子数量和稀释液体量成正比. 精子活力检测是通过计算前向运动和非前向运动精子总数, 以及不动精子总数, 进一步计算出总运动精子的百分比. 精子活力是判定精子运动能力及受精能力的重要功能学指标. 精子形态是最具挑战性的精子参数之一, 对于不同射精个体以及同一个体的不同射精, 精子的形状存在显著差异^[22]. 然而, 评估精子形态是确定精子质量的关键组成部分. 精子形态评估包括在载玻片上涂抹一滴混合良好的样品, 风干、固定、染色和显微镜检查. 推荐的染色溶液包括Papanicolau, Shorr和Diff-Quick, 可引起精子头部、顶体区域、尾部和细胞质残基的差异染色^[23]. 世界卫生组织第五版及第六版精液检测指南均提出正常精子比例为4%以上. 这种方法可以帮助评估男性生育能力, 对不育症的诊断和治疗具有重要意义^[20]. 但是实际临床检测时, 实验室间变异率高, 结果仍然相互矛盾, 这使得在临床研究中精子形态正常率的使用受到极大的限制.

(3) 辅助检查. 目前应用于临床的精液辅助检查项目包括精浆生化、精子存活率、顶体酶活性、精浆内白细胞检测等. 精浆生化检测内容包括果糖、柠檬酸、酸性磷酸酶等. 果糖主要由精囊分泌, 因此被认为是腺体功能的标志物. 根据世界卫生组织第六版精液检测指南, 较低的参考值为每次射精13 μmol. 当怀疑梗阻时, 建议评估果糖^[20,24]. 柠檬酸是TCA循环的第一产物, 其合成和分泌对前列腺具有重要的生理作用^[25], 在精子活力、维持精液pH、影响精子代谢、受体反应、受精等方面发挥关键作用^[26]. 酸性磷酸酶主

要由前列腺合成和分泌^[27], 受到雄性激素的调节^[28], 精浆酸性磷酸酶可作为评估前列腺功能的重要指标^[29]。精子存活率最常用的方式是通过Eosin-Nigrosin染色来评估^[30]。该方法基于以下原理: 受损的质膜(如死亡精子中所观察到的)允许不透过膜的染料进入, 而健康的精子则排除染料并保持未染色状态。HOS测试是一种用于评估精子存活率的替代方法。该测试基于精子在低渗透溶液中孵育时鞭毛肿胀的现象, 用于区分活精子和死精子。HOS测试的原理是, 只有具有完整、半透膜的活细胞才能在低渗透条件下发生膨胀。通过观察精子细胞形状的变化, 如尾巴的盘绕, 可以识别出肿胀的精子(活体)。在自然受精过程中, 哺乳动物精子必须通过透明带才能到达卵母细胞质膜。顶体酶, 一种顶体丝氨酸蛋白酶, 在精子穿过透明带的过程中发挥着重要的作用^[31]。明胶法是测定精子顶体酶活性的一种常用方法, 其检测原理是顶体酶含有多种蛋白水解酶, 精子在明胶制成的薄膜上富余后引起顶体解聚, 释放顶体酶, 将明胶溶解形成量环, 酶活性的大小可以依据形成量环直径的大小进行判断。多形核白细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN, 中性粒细胞)是人类射精中主要存在的一种白细胞形式。为了鉴定精浆内白细胞, 一种简单且经济实惠的方法是使用Endtz测试, 该测试基于过氧化物酶的组织化学鉴定。该测试通过邻甲苯胺染色来区分过氧化物酶阳性细胞(即白细胞)和其他无过氧化物酶的圆形细胞。

2.2 计算机辅助精子分析

CASA仪器于20世纪80年代首次推向市场, 目的是减少与精液评估相关的主观性、劳动和时间, 并减少观察者之间和观察者内部的变异性(表2)。这些系统基于将微观场的图像捕获为帧(一系列图片), 图像被数字化并随后使用算法进行分析。一些制造商已经生产了具有不同算法的半自动或全自动CASA系统^[32]。

2.3 精子DNA碎片检测法

精子DNA碎片化指数与自然受孕和辅助生殖技术的结果密切相关。然而, 对于精子常规检测和DNA碎片化指数之间的相关性研究结果并不一致。有报道指出, 精液常规检测结果正常的男性群体中, 伴有DNA碎片化升高的占比超过10%^[33]。根据世界卫生组织第六版精液分析指南, 尽管存在精子DNA碎片的精

子仍然具备受孕能力, 但多项荟萃分析表明, DNA碎片指数会影响胚胎着床、胚胎发育和妊娠结局^[20]。已有研究表明, 在许多精液常规异常的男性中, 存在较高比例的精子DNA碎片化增加, 而这种情况也与精液常规正常但不育的男性有关^[20]。因此, DNA碎片化检测成为评估男性不育的重要补充, 且已成为男科学和生育科学中最受关注且具有前景的生物标志物。目前, 常用的DNA碎片化检测方法包括末端脱氧核苷酸转移酶缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)、单细胞凝胶电泳法(single cell gel electrophoresis, SCGE)、精子染色质结构分析法(sperm chromatin structure analysis, SCSA)和精子染色质扩散法(sperm chromatin diffusion, SCD)。前两种方法直接评估精子DNA是否存在单链或双链断裂, 而后两种方法通过测定染色质对酸处理的敏感性来间接评估DNA损伤程度。这些方法为研究人员提供了可靠的手段来评估精子DNA碎片化, 并为不育症的诊断和治疗提供了重要的指导^[34]。

除检测精子DNA损伤以外, 世界卫生组织第六版精液分析指南中新增项目包括检测精子非整倍体、检测精子染色质、应用CASA系统评估精子超活化运动、磁激活细胞分选术制备精子、检测精液白细胞介素、检测精子氧化应激、检测精子中离子通道等^[20]。总之, 以上几种精液检测技术都是临床上常用的检测方法, 但针对目前临床应用现状而言, 上述方法仍然存在许多不足。

2.4 临床常用精液检测技术的不足

(1) 检测结果受多种因素影响。精子计数法、精子活力检测、精子形态检测及精子DNA碎片检测法的结果受到多种因素的影响, 如采样方法、采样时间、精液保存方法等, 这些因素都可能导致结果出现误差, 从而影响诊断结果的准确性。为了提高诊断结果的准确性, 通常需要进行多次检测。这不仅增加了检测时间和成本, 还可能给患者带来心理压力。即使CASA可以快速分析大量样品, 但是多种生物因素(精液高黏滞、圆细胞的存在、碎片和精子凝集)仍然会干扰CASA分析。同时精子浓度测量精度以及精子形态学评估准确度会在最佳范围之外降低($2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6/\text{mL}$)。

表 2 CASA评估的精子运动学特征^[19]
Table 2 Sperm motility characteristics assessed by CASA^[19]

特征	运动参数	说明
精子速率比	曲线速度 (curvilinear velocity, VCL)	精子头在开始检测时的位置与最后所处位置之间的直线运动的时间平均速度
	直线速度 (straight-line velocity, VSL)	精子头在开始检测时的位置与最后所处位置之间的直线运动的时间平均速度
	平均路径速度 (average path velocity, VAP)	精子头沿其空间平均轨迹移动的时间平均速度
	直线性 (linarity, LIN)	曲线轨迹的直线性, 由VSL/VCL计算得出
	摆动性 (wobble, WOB)	精子头沿其实际轨迹的空间平均路径摆动的尺度, 由VAP/VCL计算得出
	前向性 (straightness, STR)	空间平均路径的直线性, 由VSL/VAP计算得出
精子摆动	精子头侧摆幅度 (amplitude of lateral head displacement, ALH)	精子头沿其空间平均轨迹侧摆的幅度
	鞭打频率 (beat-cross frequency, BCF)	精子曲线轨迹越过其平均路径轨迹的时间平均速率
	平均移动角度 (mean angular displacement, MAD)	精子头沿其曲线轨迹瞬间转折角度的时间平均绝对值

(2) 无法全面评估生育能力. 以上所有方法均无法全面评估生育能力, 例如, 精子计数法只能测量精子数量, 不能评估精子质量和活力等因素; 精子活力检测只能测量精子活力, 不能评估精子数量和其他因素. 因此, 即使单一结果正常, 也不能完全保证男性生育能力. 临床上往往需要通过多个指标的联合分析进行判断.

(3) 检测方法的标准化问题. 不同的精子形态检测方法可能存在差异, 如不同的显微镜放大倍数、不同的计数方法等, 可能导致结果的差异. 同理, 精子DNA碎片检测方法目前缺少统一的标准化方法, 不同实验室的检测方法可能存在差异, 导致结果的不确定性. 即使CASA会提高实验结果的重现性并降低操作人员主观因素干预, 但由于缺乏CASA系统的标准化, 不同仪器的结果没有可比性.

(4) 检测结果解释与检测成本问题. 目前还没有明确的标准来解释精子DNA碎片检测的结果, 不同实验室可能会有不同判定标准, 导致结果的不确定性. 精子DNA碎片检测方法需要使用高端设备和试剂, 成本较高, 可能会增加患者的经济负担. 同理, CASA仪器昂贵, 需要专业人员操作, 也会导致临床使用成本增加.

3 目前研究阶段使用的辅助精子形态与功能检测的仪器与方法

3.1 电子显微镜检测

电子显微镜检测是一种重要的现代精液检测技术, 它可以提供精子超微结构的详细信息, 包括精子头部、中部和尾部的形态和结构^[35]. 这项技术对于识别精子的形态异常、结构缺陷以及精子成熟度的评估具有重要的价值. 例如, 通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)的检测, 科学家们发现, 不育男性的精子往往存在着各种超微结构的异常, 如精子头部的形态异常、鞭毛的结构缺陷、精子线粒体异常等^[36,37]. 这些发现对于理解男性不育的原因, 以及开发新的治疗策略具有重要意义. 然而, 电子显微镜检测也存在一些局限性. 首先, 这种技术需要复杂的样本制备过程, 包括固定、脱水、包埋、切片等步骤, 不仅耗时, 而且可能会影响精子的原始结构^[35]. 其次, 电子显微镜检测无法提供精子的功能性信息, 如精子活动性、DNA完整性等. 因此其对于某些特殊类型的精子畸形的检测价值更大.

3.2 精子的尾部鞭毛运动的高速成像分析

临床上精子运动性分析的黄金标准是由训练有素的专业人员进行手动分析,而现有的自动精子诊断(计算机辅助精子分析, CASA)依赖于跟踪精子头部并推断测量结果。目前,无论是手动分析还是CASA,都无法对大量细胞的鞭毛波形进行跟踪,以解锁其中潜在的丰富信息。Gallagher等人^[38]于2019年将高速成像分析应用于精子尾部鞭毛运动成像。Gallagher等人旨在探讨是否可以通过扩大鞭毛分析的规模,实现对活动精子的自动跟踪,并且通过了解鞭毛波形进一步提供常规头部跟踪所无法提供的新见解。研究结果表明,高通量的鞭毛波形跟踪和分析可以测量实验中难以测量的参数,如能量耗散、对周围介质的干扰和黏性应力,仅通过跟踪精子头部是无法实现的。Gallagher等人研究开发了一种软件工具(FAST),可以实现高通量、准确和可验证的精子鞭毛运动分析。通过对大量细胞的鞭毛运动进行全自动跟踪和分析, Gallagher等人发现,直接分析鞭毛运动可以揭示常规测量方法无法测量的信息。此外, Gallagher等人提供了一个强大且易于使用的研究工具,将精子的机械活动与其运动能力和对环境的影响联系起来。通过结合跟踪的鞭毛和数学建模,有望揭示新的鞭毛运动机制性见解。通过软件包,希望能够准确量化大量活动细胞的鞭毛波形,为诊断、毒理学和治疗等领域提供丰富的可能性,并为评估和治疗男性生育能力问题创造新机会。

3.3 流式细胞仪检测

流式细胞仪检测是一种高通量、多参数的细胞分析技术,其在精子检测中的应用已经得到广泛的认可。这种技术通过将单个精子暴露于一系列激光束中,然后通过测量精子散射和荧光信号的强度和时间,可以对精子的各种特性进行定量分析^[39]。流式细胞仪可以对精子进行多参数的分析,包括精子的大小、形状、DNA含量、活性等。例如,通过使用特定的荧光染料和流式细胞仪,科学家们可以准确地测量精子的DNA含量,从而评估精子的染色体完整性^[40]。流式细胞仪结合荧光探针是一种用于评估精子功能的强大工具。通过使用各种荧光探针,可以对精子的DNA状态、顶体状态、活化状态、膜磷脂分布和线粒体功能等多个

特征进行评估。例如,通过使用荧光标记凝集素和LysoTracker Green DND-26可以确定精子的顶体状态,而精子顶体形态/获能金霉素(chlortetracycline, CTC)荧光染色和Merocyanine 540则可以观察精子的活化状态和膜流动性的变化。荧光标记的annexin-V, C6NBD和Ro-09-0198可用于检测精子膜磷脂分布的变化。此外,通过使用丙碘胺(propylene iodamine, PI)、乙啶季铵-1(ethidium homodimer-I, EthD-1)或Yo-Pro-1等荧光探针,可以评估精子的细胞存活性。而使用罗丹明123(rhodamine 123, R123)、MitoTracker Green FM(MITO)和JC-1等荧光探针可以确定精子的线粒体功能。流式细胞仪结合这些荧光探针,为精子功能的监测提供了广阔的应用前景^[41]。但是,这种技术需要专业人员进行操作。其次,流式细胞仪的分析结果可能会受到精子样本质量的影响,如精子的浓度、活性等。此外,流式细胞仪的分析结果可能会受到设备的精度和稳定性的影响。尽管流式细胞仪检测存在一些局限性,但其快速、准确、高通量的特性使其在精子检测中具有广泛的应用前景。未来,随着流式细胞仪技术的进一步发展,流式细胞仪检测将在精子检测中发挥更大的作用。

3.4 激光共聚焦扫描显微镜检测

LSCM是一种先进的光学成像技术,它利用激光作为光源,通过空间滤波原理,只获取焦平面的信息,从而实现了对细胞内部结构的三维成像^[42]。在精子检测中,LSCM可以用于观察精子的形态、结构以及染色体的分布情况,为精子的质量评估提供了重要的信息^[43]。同时,LSCM作为一种先进的分析工具,无需进行组织切片即可跟踪精子发生过程。为此,分离的曲精小管被固定在0.5%的多聚甲醛中,用碘化丙啶染色DNA,并通过LSCM进行分析。通过在精原细胞、精母细胞和精子层中产生纵向光学切片,可以通过LSCM跟踪曲精小管的结构阶段性变化。此外,可以通过将固定的精索管与适当的抗体孵育,以阶段特异性的方式在曲精小管内跟踪不同蛋白质在精子发生过程中的表达^[44]。然而,LSCM的分析结果可能会受到设备的精度和稳定性的影响,且LSCM的价格昂贵,会增加医院检测成本。在精子检测中,LSCM可以用于观察精子的形态、结构以及染色体的分布情况,为精子的质量评估提供了重要的信息。

3.5 临床实践与挑战

在辅助生殖技术,特别是IVF和ICSI中,精子的健康状况和功能性起到了至关重要的作用.为此,以上提到的适用于精子检测的仪器技术,可以用于更为详细地评估精子的形态和功能性.这些技术不仅提供了关于精子的宝贵信息,同样与IVF和ICSI的受精成功率相关.例如,常规透射电子显微镜通过识别畸形精子症有助于预测男性生育能力^[45],而流式细胞仪则能够评估精子的DNA碎片化程度进一步评估辅助生殖的成功率^[46].

然而,以上技术在临床实践中并不普及,目前仍然面临着样本制备复杂、操作人员专业、精子样本异质性较大、不同品牌的设备精度和稳定性不一致以及设备价格昂贵等挑战.为了更广泛地应用这些技术,可能需要进一步的技术改进、操作培训以及经济考虑.

4 未来精子检测及评估男性生育力的高级技术

目前在临床上应用的精液检测技术主要集中于评估精子的功能和表型特征,它们为男性不育问题提供了基本的诊断参考.然而,对于不育结局的深入预测、探讨男性不育的详细病因,以及为男性不育提供精准医疗方案,现有技术仍显不足.鉴于此,我们急切期盼未来能够涌现更为先进的精液检测技术和评估男性生育能力的方法,如睾丸类器官技术、精子活体荧光标记技术、先进组学研究,以及机器学习和深度学习算法的广泛应用.通过这些技术并结合“模型+人群+成像+AI”的综合策略,有望更加精确地预测生育结局、深入分析不育原因,并为男性不育的精准治疗策略提供更为明确的指导.

4.1 睾丸类器官技术

类器官技术,特别是睾丸类器官的构建和培养,为精子检测和男性生育力评估提供了新的研究平台.睾丸类器官的构建主要包括细胞选择、细胞培养和类器官形成三个步骤^[47].在细胞选择阶段,通常选择睾丸组织中的生殖干细胞和支持细胞.在细胞培养阶段,需要提供适合细胞生长和分化的营养物质和生长因子.在类器官形成阶段,细胞会自我组织成为类似于生

物体内器官的结构^[48].睾丸类器官已经被成功应用于精子的生成和发育研究.例如,日本科学家利用类器官技术,成功地使体外的干细胞发育成为具有生育能力的精子^[49].这一研究不仅为理解精子的生成和发育过程提供了新的实验平台,也为治疗男性不育症提供了新的可能.在男性生育力评估方面,睾丸类器官可以用于模拟精子的生成和发育过程,以此来评估男性的生育能力.例如,通过观察类器官中精子的生成和发育情况和对类器官中精子的基因表达和表型特性的研究,可以评估男性的生育能力^[50,51].2022年,本课题组^[52]首次将睾丸类器官用于评估抗抑郁药物对男性生育力的影响,由此证明未来睾丸类器官技术可应用生殖毒理学的评估.本团队在类器官的观察与目前抗抑郁药生殖毒性的观察一致,进一步证明对于个性化的评估精神类药物的生殖毒性具有较大的价值^[52].未来,随着类器官技术的发展,类器官技术有望提供一个更加接近生物体内环境的实验平台,使得研究更加真实可靠.同时,类器官技术的临床化应用,将使得精子检测和男性生育力评估更加便捷和准确.

4.2 精子活体荧光探针用于精子受孕能力的相关参数的评估

荧光活体成像技术是一种基于荧光探针的无创性成像技术,它能够实时、动态地观察生物体内的生理和病理过程^[53].在男性生育领域,荧光活体成像技术已经被用于精子检测和男性生育力评估.这种方法可以帮助医生和研究人员更加准确地诊断精子功能异常相关疾病,并为治疗提供更加有效和可靠的手段.荧光活体成像技术的关键指标主要包括荧光探针选择、荧光信号检测和图像分析.荧光探针选择是荧光活体成像技术的第一步,也是最关键的一步.理想的荧光探针应具有高的荧光亮度、长的荧光寿命和高的荧光稳定性.此外,荧光探针还应具有良好的生物相容性和高选择性,以便在生物体内精确标记目标细胞或分子^[54].荧光信号检测主要依赖于荧光显微镜或荧光成像系统.图像分析则需要利用图像处理软件,通过对荧光信号定量分析,来获取生物体内的生理和病理信息^[55].荧光活体成像技术的实现主要依赖于荧光探针构建和活体成像技术.荧光探针构建主要包括荧光分子的设计和合成、荧光分子的标记和荧光探针的验证.活体成像技术则需要结合荧光显微镜或荧光成像系统,以

及图像处理软件, 来实现对生物体内的实时、动态观察^[56].

活体荧光成像技术已经在精子检测和男性生育力评估中显示出了巨大的潜力. 例如, 通过使用特异性标记精子的荧光探针, 研究者能够实时、动态观察精子的运动和功能状态, 从而评估男性生育能力^[57]. 早期研究者通过使用标记精子DNA的荧光探针检测精子的DNA损伤, 从而评估男性的生育能力^[40], 但这些检测方法是固定后的精子进行检测分析, 尚缺乏活体状态下对精子活性状态与代谢状态进行实时监测的分子探针, 同时由于精子在体外具有较高的能量代谢水平, 其活化过程包括获能、超激活、顶体反应等过程, 因此对精子体外运动、获能等过程中的相关离子流动, 线粒体功能变化的监测具有重要的生理学意义.

精子内pH的变化对精子的超激活、获能、顶体反应等十分重要, 而目前的pH探针BCECF是针对细胞pH监测设定, 其反映的pH范围较广, 但监测精度不够, 对细胞毒性较大, 且单色荧光成像不利于观测精子内局部pH的变化. 因此本课题组^[58]开发了可实时反映精子内pH变化的双荧光探针, 该荧光探针是一种由罗丹明和荧光素衍生物修饰的金纳米颗粒构建的纳米“潜艇”. 这些“黄金纳米潜艇”具有适用于酸性和碱性环境的双灵敏单元, 不仅能够辅助绘制活细胞内的“pH地图”, 而且可以定量检测不同刺激下活细胞内的pH变化. 随后, 本课题组将该探针用于精子成像, 发现其可以实时检测精子活体状态下pH的变化, 并为运动不良的精子提供一个新的病因学指征^[59], 同时也发现该探针可用于类器官, 如呼吸道上皮类器官的特殊类型细胞比例的监测^[60].

精子的线粒体是精子活化的重要亚细胞结构, 也是精子获能、受精等生理过程的能量工厂, 对于受精不良的精子, 其内部可能存在线粒体功能损伤. 本课题组借助新开发的新型线粒体DNA G-四聚体荧光探针, 发现反复受精失败的精子与精子内线粒体DNA G-四聚体的含量具有正相关性, 并为反复受精失败的精子提供了新的检测技术. 本课题组^[61]受到聚集诱导发光机制的启发, 设计并合成了噻唑橙衍生物TPE-mTO. 探针分子可以通过氢键和离子键结合在DNA G-四聚体的口袋中, 与DNA G-四聚体的结合限制了探针TPE基团的振动与旋转, 使得其非辐射能量耗散

显著降低, 进而探针可以发射较强荧光. 本团队^[62]利用该探针, 进一步发现精子线粒体的自噬缺陷可能是导致精子受精失败的重要原因.

未来, 随着荧光活体成像技术的发展, 这种技术将在精子检测和男性生育力评估中发挥更加重要的作用. 荧光活体成像技术将提供一个实时、动态的观察平台, 使得研究更加真实可靠. 同时, 荧光活体成像技术的临床化应用, 将使得精子检测和男性生育力评估更加便捷和准确.

4.3 组学技术-精子全基因组与全外显子组测序用于不育症相关疾病诊断

组学技术是一种全面研究生物系统的方法, 包括基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学等. 这些技术在精子诊断、病因学评估和临床应用中的发展具有巨大的潜力. 基因组学是研究生物体所有基因的结构、功能和演化的学科. 在精子诊断中, 基因组学技术可以用于检测男性生育力的遗传因素. 例如, Y染色体微缺失是导致男性不育的常见原因, 通过基因组学技术可以精确地检测这些微缺失^[63]. 此外, 基因组学还可以用于病因学评估, 通过比较不同个体的基因组, 可以发现与男性生育力相关的遗传变异^[64]. 传统的单基因遗传病的评估一直依赖于外周血的基因组DNA提取, 并通过一代测序进行突变位点的鉴定. 近年来随着高通量测序技术的发展, 全外显子测序技术越来越多地应用到遗传病的筛查与诊断领域. 精子作为单倍性细胞, 其DNA分析主要用于法医与性别鉴定等领域. 近年来, 随着测序技术的发展, 针对精子的直接全基因组与全外显子测序的医学价值逐渐得到重视, 因为目前的遗传学分析发现针对外周血的传统遗传分析, 会漏掉源自配子细胞或胚胎发育过程中产生的突变, 这一类突变称为新生突变, 杨晓旭等人通过对自闭症儿童的父亲精子样本的监测, 在12例自闭症儿童的父亲精子的全基因组筛查中, 鉴定到5例源自精子的嵌合变异, 而这一信息可望用于自闭症儿童父亲再生育的复发风险评估^[65], 此后杨晓旭等人对精子的突变向胚胎的传递进行了进一步的研究^[66]. 然而, 全基因组测序存在成本太高、应用场景受限等缺陷. 因此, 进一步精子的高通量测序是否能应用于不孕症的遗传突变的筛选是一个值得探索的方向. 最近的一项研究针对受精失败病人的精子样本进行全外显子测序, 进一步

发现其可用于受精失败的遗传学诊断^[67], 这些研究为后期进一步利用精子的高通量测序进行与生殖细胞突变相关的遗传病的分析与评估奠定了基础。

在男性不育的精子功能评估中, 转录组学、蛋白组学及代谢组学技术可以用于检测精子总RNA, 蛋白质表达和修饰以及精子的代谢活动, 从而进一步评估精子的功能。例如, 本课题组^[62]在探究线粒体DNA G-四聚体对精子内mRNA及蛋白的影响时, 通过比较正常精子和异常精子的转录组及蛋白组, 可以发现氧化磷酸化水平与精子线粒体DNA G-四聚体数量升高密切相关, 并涉及COX5B, ATP5F1E, PPA2, NDUFS8等线粒体代谢相关的mRNA和蛋白。尽管精子携带的RNA功能尚不清楚, 但研究发现畸形精子患者的转录谱存在紊乱, 可能与细胞重塑通路有关。这种诊断策略有助于了解男性因素不孕症^[13]。此外, 相关组学还可以用于病因学评估, 通过比较不同疾病状态下的转录组、蛋白组及代谢组, 可以发现与男性生育力相关的病理过程^[68~72]。未来全外显组学与转录组学的联合分析可能是发现与精子遗传变异导致的相关功能异常的重要发展方向。

4.4 机器学习与深度算法应用于精子分析与精子优选

随着科技的进步, 机器学习与深度算法在医学领域的应用越来越广泛。在男性生育领域, 这些高级技术已经开始被用于精子检测和男性生育力评估。机器学习和深度算法可以提高精子检测的准确性和效率。传统的精子检测方法主要依赖于人工显微镜观察, 这种方法不仅耗时, 而且受到观察者主观因素的影响, 结果可能存在一定的误差。而机器学习和深度算法可以通过对大量精子样本的学习, 自动识别并分析精子形态、活动性等特征, 从而提高检测的准确性和效率。例如, 一些研究已经使用深度学习算法成功地识别出正常精子和异常精子, 这对于精子质量的评估和男性不育症的诊断具有重要的意义^[73]。其次, 机器学习和深度算法可以帮助评估男性生育力。男性生育力受到许多因素的影响, 包括年龄、健康状况、生活习惯等。通过对大量临床数据进行学习, 机器学习和深度算法可以找出影响男性生育力的关键因素, 并预测男性生育力。例如, 一些研究已经使用机器学习算法成功地预测了男性精子质量和生育能力^[74]。

在精子图像智能处理与分析以及精子筛选方向, 机器学习与深度算法也展现出了巨大潜力。在精子图像智能处理与分析方面, 深度学习算法, 特别是卷积神经网络(convolutional neural network, CNN)已经被广泛应用于图像识别和分析。通过对大量精子图像的学习, CNN可以自动提取精子图像特征, 并进行分类和识别。例如, 一些研究已经使用CNN成功地识别出正常精子和异常精子的图像, 这对于精子质量评估具有重要的意义^[75]。在精子筛选方面, 机器学习和深度算法可以帮助实现精子的自动筛选。传统的精子筛选方法主要依赖于人工操作, 这种方法不仅耗时, 而且可能存在一定的误差。而机器学习和深度算法可以通过对精子的形态、活动性等特征进行学习, 自动筛选出优质的精子, 从而提高精子筛选效率和准确性。

然而, 机器学习和深度算法在男性生育领域的应用还面临一些挑战。这项任务需要大量高质量数据进行训练, 而这些数据的获取和整理需要大量的人力和物力。其次, 机器学习和深度算法的结果需要通过临床试验进行验证, 这需要时间和经费。最后, 如何保护患者隐私和数据安全也是一个需要解决的问题。

总的来说, 机器学习和深度算法为男性生育领域的研究和临床应用提供了新的可能性。未来, 随着技术的进步和数据的积累, 有理由相信, 机器学习和深度算法将在精子检测和男性生育力评估方面发挥更大的作用。

5 结论

精液检测技术的发展在男性生育力评估中起着至关重要的作用。传统的精子检测方法, 如精液分析, 虽然能够提供精子数量和活动性等基本信息, 但无法全面评估精子功能和质量。而新型精液检测技术, 如电镜检测、流式细胞仪检测和精子DNA碎片检测等, 能够更深入地评估精子形态和功能水平的特性, 从而更准确地评估男性生育力。未来, 精液检测技术的发展将更加注重精子功能和质量评估。随着睾丸类器官技术、精子内病因学指标的活体荧光检测技术、精子多组学测序技术等的发展, 人们将能够更全面地了解精子的生物学特性, 从而更加准确地识别导致男性不育的病因, 进一步地为制定个性化精准治疗方案提供了可能(图1)。然而, 这些高级技术的应用也面临着—

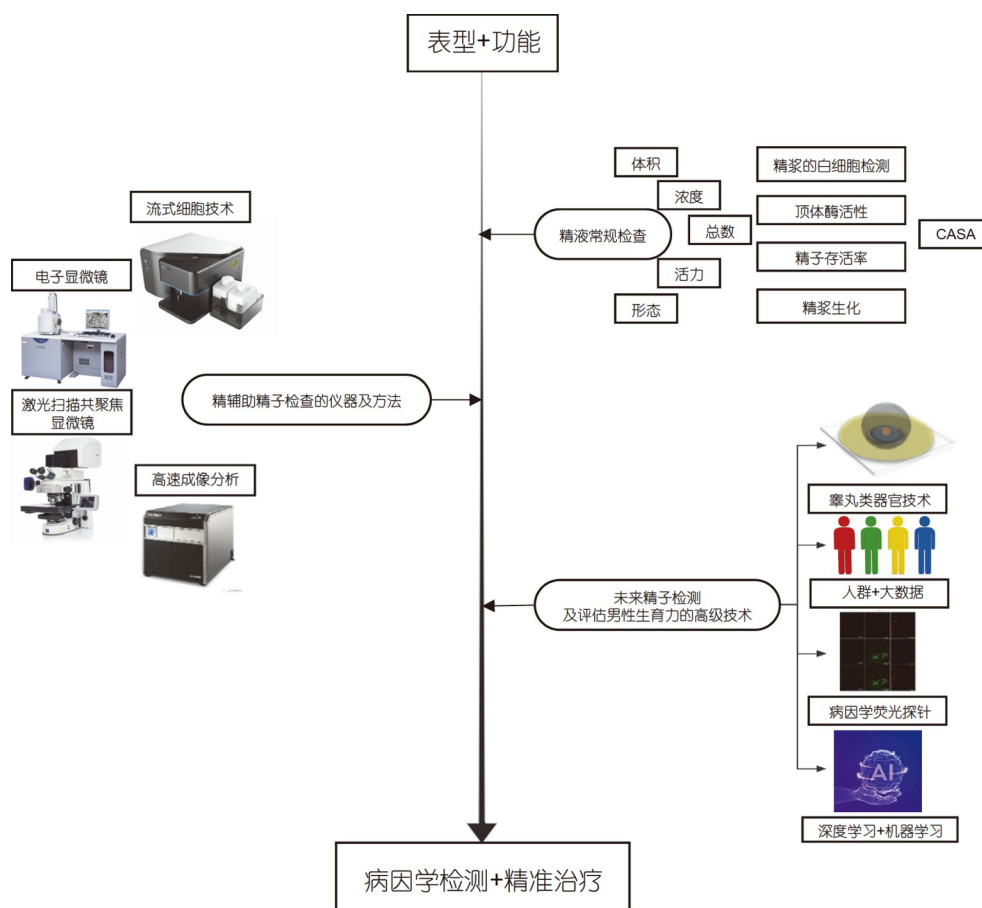


图 1 精液检测技术与男性生育力评估的进展及与未来发展趋势的总结模式图

Figure 1 The summary chart of the advancements and future trends in sperm detection techniques and male fertility assessment

些挑战, 如数据解析的复杂性、技术的高成本以及临床应用的限制等。因此, 如何将这些高级技术转化为临床应用, 将是未来精液检测技术发展的重要任务。

展望未来, 期待通过研究开发出更多基于病因学的精液检测技术, 以更准确地评估男性的生育力。这不仅需要开发出更高效、更准确的精子功能和质量的

检测方法, 更需要进一步研究精子的生物学特性, 以揭示导致男性不育的机制。最后, 我们需要将这些研究成果转化为临床应用, 以帮助更多的男性解决生育问题。总的来说, 精液检测技术的发展将为男性生育力的评估提供更多的可能性, 也将为男性不育的治疗提供更多的选择。

参考文献

- 1 Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, et al. Male infertility. *Lancet*, 2021, 397: 319–333
- 2 Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*, 2018, 62: 2–10
- 3 Sun H, Gong T T, Jiang Y T, et al. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging*, 2019, 11: 10952–10991
- 4 Barratt C L R, Björndahl L, De Jonge C J, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*, 2017, 23: 660–680
- 5 Cooper T G, Noonan E, von Eckardstein S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod*

[Update](#), 2010, 16: 231–245

- 6 Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. [Hum Fertil](#), 2011, 14: 179–186
- 7 Esteves S C, Roque M, Bradley C K, et al. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. [Fertil Steril](#), 2017, 108: 456–467.e1
- 8 Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, et al. Environmental factors and semen quality. [Int J Occup Med Environ Health](#), 2009, 22: 305–329
- 9 Pacey A A. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. [Hum Fertil](#), 2010, 13: 189–193
- 10 Fisher H S, Roldan E R S, Avidor-Reiss T, et al. On the origin and evolution of sperm cells. [Cells](#), 2023, 12: 159
- 11 Liakatas J, Williams A E, Hargreave T B. Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope. [Fertil Steril](#), 1982, 38: 227–232
- 12 Rimmer M P, Howie R A, Anderson R A, et al. Protocol for developing a core outcome set for male infertility research: an international consensus development study. [Hum Reprod Open](#), 2022, 2022(2): hoac014
- 13 Platts A E, Dix D J, Chemes H E, et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. [Hum Mol Genet](#), 2007, 16: 763–773
- 14 Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. [Fertil Steril](#), 2013, 99: 1023–1029
- 15 Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, et al. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. [Hum Reprod Update](#), 2013, 19: 604–624
- 16 Collins F S, Morgan M, Patrinos A. The human genome project: lessons from large-scale biology. [Science](#), 2003, 300: 286–290
- 17 Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. [Fertil Steril](#), 2015, 103: e18–e25
- 18 Buck Louis G M, Sundaram R, Schisterman E F, et al. Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study. [Fertil Steril](#), 2014, 101: 453–462
- 19 Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, et al. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. [Andrologia](#), 2021, 53: e13614
- 20 World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 6th ed. Geneva: WHO Press, 2021
- 21 Rosecrans R R, Jeyendran R S, Perez-pelaez M, et al. Comparison of biochemical parameters of human blood serum and seminal plasma. [Andrologia](#), 1987, 19: 625–628
- 22 Ombelet W. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. [Hum Reprod Update](#), 1995, 1: 543–557
- 23 Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A, et al. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. [Fertil Steril](#), 2008, 89: 449–455
- 24 Dias T R, Alves M G, Silva B M, et al. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. [Mol Cell Endocrinol](#), 2014, 396: 37–45
- 25 Das S, Parveen S, Kundra C P, et al. Reproduction in male rats is vulnerable to treatment with the flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. [Phytother Res](#), 2004, 18: 8–13
- 26 Hou Y, He Y, Wang J, et al. Comprehensive metabolomics profiling of seminal plasma in asthenozoospermia caused by different etiologies. [Clinica Chim Acta](#), 2023, 548: 117530
- 27 Ostrowski W S, Kuciel R. Human prostatic acid phosphatase: selected properties and practical applications. [Clin Chim Acta](#), 1994, 226: 121–129
- 28 Bolton N J, Lahtonen R, Vihko P, et al. Androgens and prostate-specific acid phosphatase in whole tissue and in separated epithelium from human benign prostatic hypertrophic glands. [Prostate](#), 1981, 2: 409–416
- 29 Guerin J F, Czyba J C. Relationships between seminal enzymes and fertility (author's transl). [Ann Endocrinol \(Paris\)](#), 1981, 42: 423–428
- 30 Björndahl L. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. [Hum Reprod](#), 2003, 18: 813–816
- 31 Hirose M, Honda A, Fulka H, et al. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2020, 117: 2513–2518
- 32 Hu Y A, Lu J C, Shao Y, et al. Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer-aided sperm analysis systems. [Andrologia](#), 2013, 45: 315–318
- 33 Khalafalla K, Majzoub A, Elbardisi H, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on intracytoplasmic sperm injection outcome. [Andrologia](#), 2021, 53: e14180
- 34 Li Q, Guo J, Wu S, et al. State-of-art technologies to detect the DNA damage and repair in sperm and future outlook. [Transl Androl Urol](#), 2023,

- 12: 148–151
- 35 Perreault S D, Barbee R R, Slott V L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*, 1988, 125: 181–186
- 36 Piasecka M, Kawiak J. Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003, 41: 125–139
- 37 Courtade M, Lagorce C, Bujan L, et al. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril*, 1998, 70: 297–304
- 38 Gallagher M T, Cupples G, Ooi E H, et al. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Hum Reprod*, 2019, 34: 1173–1185
- 39 Seli E, Botros L, Sakkas D, et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, 2008, 90: 2183–2189
- 40 Evenson D P, Larson K L, Jost L K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*, 2002, 23: 25–43
- 41 Gillan L, Evans G, Maxwell W M C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 2005, 63: 445–457
- 42 Amann R P, Katz D F. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, 2004, 25: 317–325
- 43 Sakkas D, Umer F, Bizzaro D, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, 1998, 13: 11–19
- 44 Vigodner M, Lewin L M, Glaser T, et al. Use of confocal microscopy for the study of spermatogenesis. *Methods Cell Sci*, 2002, 24: 169–180
- 45 Ravi R T, Leung M R, Zeev-Ben-Mordehai T. Looking back and looking forward: contributions of electron microscopy to the structural cell biology of gametes and fertilization. *Open Biol*, 2020, 10: 200186
- 46 Evenson D P, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 2006, 65: 979–991
- 47 Sato T, Katagiri K, Gohbara A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 2011, 471: 504–507
- 48 Yokonishi T, Sato T, Komeya M, et al. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*, 2014, 5: 4320
- 49 Takebe T, Zhang B, Radisic M. Synergistic engineering: organoids meet organs-on-a-chip. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 297–300
- 50 Baert Y, Van Saen D, Haentjens P, et al. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod*, 2013, 28: 1816–1826
- 51 Yuan Y, Li L, Cheng Q, et al. In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Res*, 2020, 30: 244–255
- 52 Wu S, Li X, Li P, et al. Developing rat testicular organoid models for assessing the reproductive toxicity of antidepressant drugs *in vitro*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54: 1748–1752
- 53 Peterson J D. Paradigms in fluorescence molecular imaging: maximizing measurement of biological changes in disease, therapeutic efficacy, and toxicology/safety. *Mol Imag Biol*, 2019, 21: 599–611
- 54 Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*, 2008, 5: 763–775
- 55 Zhang R R, Schroeder A B, Grudzinski J J, et al. Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14: 347–364
- 56 Weissleder R, Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 2008, 452: 580–589
- 57 Paoli D, Gallo M, Rizzo F, et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril*, 2011, 95: 2315–2319
- 58 Yu K K, Li K, Qin H H, et al. Construction of pH-sensitive “submarine” based on gold nanoparticles with double insurance for intracellular pH mapping, quantifying of whole cells and *in vivo* applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 22839–22848
- 59 Li X, Wu S, Yu K, et al. A dual-site controlled pH probe revealing the pH of sperm cytoplasm and screening for healthy spermatozoa. *J Mater Chem B*, 2021, 9: 3662–3665
- 60 Zheng R, Yang W, Wen Y, et al. Dnah9 mutant mice and organoid models recapitulate the clinical features of patients with PCD and provide an excellent platform for drug screening. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 559
- 61 Yu K K, Li K, He H Z, et al. A label-free fluorescent probe for accurate mitochondrial G-quadruplex structures tracking via assembly hindered

- rotation induced emission. *Sens Actuat B Chem*, 2020, 321: 128479
- 62 Wu S, Li X, Huang G, et al. Dissecting sperm mitochondrial G-quadruplex structures using a fluorescent probe biomarker to monitor and regulate fertilization capability. *ACS Sens*, 2023, 8: 2186–2196
- 63 Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2014, 2: 5–19
- 64 Aston K I, Carrell D T. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *J Androl*, 2009, 30: 711–725
- 65 Breuss M W, Antaki D, George R D, et al. Autism risk in offspring can be assessed through quantification of male sperm mosaicism. *Nat Med*, 2020, 26: 143–150
- 66 Breuss M W, Yang X, Stanley V, et al. Unbiased mosaic variant assessment in sperm: a cohort study to test predictability of transmission. *eLife*, 2022, 11: e78459
- 67 Cheung S, Xie P, Rosenwaks Z, et al. Profiling the male germline genome to unravel its reproductive potential. *Fertil Steril*, 2023, 119: 196–206
- 68 Ostermeier G C, Miller D, Huntriss J D, et al. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 2004, 429: 154
- 69 Baker M A, Aitken R J. Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6: 691–705
- 70 Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J, et al. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Hum Reprod Update*, 2014, 20: 40–62
- 71 Amaral A, Paiva C, Attardo Parrinello C, et al. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. *J Proteome Res*, 2014, 13: 5670–5684
- 72 Deepinder F, Chowdary H T, Agarwal A. Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. *Expert Rev Mol Diagn*, 2007, 7: 351–358
- 73 Goodson S G, Zhang Z, Tsuruta J K, et al. Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biol Reprod*, 2011, 84: 1207–1215
- 74 Wang R, Pan W, Jin L, et al. Artificial intelligence in reproductive medicine. *Reproduction*, 2019, 158: R139–R154
- 75 Yüzkat M, İlhan H O, Aydın N. Multi-model CNN fusion for sperm morphology analysis. *Comput Biol Med*, 2021, 137: 104790

Advancements and future trends in sperm detection techniques and male fertility assessment

WU SiXian¹, WEI YaZhen^{1,2}, YU KangKang³, CHEN YuXi^{1,2} & XU WenMing¹

1 Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2 West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

3 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

In recent years, significant advancements have been made in sperm detection techniques for assessing male fertility, providing advanced tools for clinical diagnosis and treatment. These techniques include conventional methods such as semen analysis, computer-assisted sperm analysis, and DNA fragmentation detection. However, further development of technologies for sperm detection and male fertility assessment is needed due to the complexity of interfering factors, the inability of current methods to comprehensively evaluate fertility, and the lack of clear etiological testing protocols. Modern detection technologies, such as electron microscopy, high-speed motion imaging analysis, flow cytometry, and laser confocal microscopy, have gradually been employed to provide more comprehensive and accurate information for assessing sperm quality. In the future, with continuous technological advancements, more precise and efficient sperm detection techniques are expected to emerge. Testicular organ engineering will enable more accurate and comprehensive assessment of male fertility. Fluorescence live imaging techniques can achieve non-invasive observation of intracellular sperm indicators, making clinical etiological testing more efficient and convenient. Sperm analysis methods based on genomic sequencing technologies can comprehensively evaluate sperm-originated genetic mutations, including information from genomics, epigenetics, and proteomics. The application of artificial intelligence and machine learning is also expected to improve the accuracy and efficiency of sperm detection, providing more reliable evidence for clinical decision-making. The development of these advanced sperm detection techniques will provide more accurate diagnoses and personalized treatment plans for infertility patients. Moreover, they will contribute to a deeper understanding of the mechanisms underlying male fertility and the molecular basis of reproductive disorders, providing crucial support for research and development in the field of reproductive medicine.

sperm detection, male fertility, organoid, artificial intelligence, advanced technology

doi: [10.1360/SSV-2023-0175](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0175)