

维生素D摄取不足对大鼠睾丸生殖功能的影响的研究

李婧^{1*}, 胡鑫^{2*}, 田玫¹, 李健^{1#}

¹湖南师范大学医学院, 模式动物与干细胞生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙

²湖南师范大学医学院小分子靶向药物发现与创制湖南省重点实验室, 湖南 长沙

Email: #lijianxy@hunnu.edu.cn, #angela13656355@qq.com

收稿日期: 2021年7月28日; 录用日期: 2021年8月31日; 发布日期: 2021年9月7日

摘要

研究维生素D摄取不足对大鼠睾丸生殖功能的影响。方法: 建立低维生素D (VDI)和正常饮食(VD)动物模型, 观察大鼠身长、体重和左右睾丸重量, 检测大鼠血清指标, 附睾精子密度及睾丸组织切片。结果: 与VD组比较, VDI组体重, 身长和左右侧睾丸重量的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。血清25(OH)D水平明显降低($P < 0.01$), 血清碱性磷酸酶含量明显下降($P < 0.05$)。附睾精子密度下降但无统计学差异($P > 0.05$)。睾丸组织H & E染色和PCNA蛋白免疫组织化学染色的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 大鼠低维生素D饮食导致血清中25(OH)D水平明显降低, 但是对大鼠睾丸生殖功能没有显著影响。

关键词

维生素D, 男性生殖, 精子发生, 增殖

Research on the Effect of Insufficient Vitamin D Intake on the Reproductive Function of Rat Testis

Jing Li^{1*}, Xin Hu^{2*}, Mei Tian¹, Jian Li^{1#}

¹Key Laboratory of Study and Discovery of Small Targeted Molecules of Hunan Province, School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha Hunan

²Key Laboratory of Model Animals and Stem Cell Biology in Hunan Province, School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha Hunan

Email: #lijianxy@hunnu.edu.cn, #angela13656355@qq.com

*共同第一作者。

#通讯作者。

Abstract

Objective: To study the effect of insufficient vitamin D intake on rat testicular reproductive function. **Methods:** Establish low-vitamin D (VDI) and normal diet (VD) animal models; observe the rat's body length, weight, and left and right testicular weights, and detect rat serum indicators, epididymal sperm density and testicular tissue sections. **Results:** Compared with the VD group, there were no statistically significant differences in body weight, length, and left and right testicular weights in the VDI group ($P > 0.05$). The serum 25(OH)D level was significantly reduced ($P < 0.01$), and the serum alkaline phosphatase content was significantly reduced ($P < 0.05$). The sperm density of the epididymis decreased but there was no statistical difference ($P > 0.05$). There was no statistically significant difference in H & E staining and PCNA protein immunohistochemical staining of testis tissue ($P > 0.05$). **Conclusion:** Low vitamin D diet in rats caused a significant decrease in serum 25(OH)D level, but it had no significant effect on rat testicular reproductive function.

Keywords

Vitamin D, Male Reproduction, Spermatogenesis, Proliferation

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

维生素 D 是调节人体内钙磷稳态方面的脂溶性类固醇, 主要以维生素 D₂ 和维生素 D₃ 存在。经肝脏转化生成了主要形式 25(OH)D; 再进一步经肾脏转化为 25(OH)D₃。有文献证明, 维生素 D 对男性生殖功能有着非常重要的作用, 与男性生殖功能、睾丸功能和精子的发生有着紧密的联系[1]。目前生殖功能问题已经引起广泛关注, 越来越多的人来探究男性生殖功能的影响。已有研究表明维生素 D 对男性睾酮、性激素的合成有一定的影响, 对男性的生殖与生育能力有一定的作用[2]。同时, 研究进一步表明维生素 D 能提高精子前向运动和射精前向运动的百分率来治疗少精症和弱精症[3]。此外, 相关证据表示血清中维生素 D 的活性成分 25(OH)D₃ 浓度太高或太低也会降低精液质量[4]。但是, 高剂量的 1 α ,25-(OH)₂D₃ 会导致高磷血症、高胆固醇和高钙血[5] [6]。因此, 一定量的维生素 D 摄取可能会影响到男性生殖功能。

已有相关动物研究证明, 正常维生素 D 的雄性大鼠和体内缺乏维生素 D 的雄性大鼠相比, 维生素 D 缺乏组交配成功的概率明显低于正常维生素 D 组, 而且缺乏组的精子活力相较正常组明显降低[7]。此外对谷氨酰转氨酶活性进行研究发现, 相较正常维生素 D 雄性大鼠的精原干细胞, 在缺乏维生素 D 的雄性大鼠组织中, 精原干细胞的功能明显受损, 并且睾丸和附睾组织中的精子数量显著降低, 生发上皮退行性的改变[8]。进一步研究结果表明, 雄性小鼠睾丸组织中维生素 D 受体缺失导致体内维生素 D 降低, 与正常野生型小鼠相比, 小鼠的睾丸组织的异常率增加, 生殖细胞增殖减少, 凋亡增多, 生精过程异常, 精子数量与精子活力明显降低[9]。

虽然目前已有大量研究报道人体中维生素 D 影响男性生殖功能, 并且在动物实验中, 已经证实维生素 D 对雄性动物的精液质量和睾丸功能都有影响。但是饮食中维生素 D 摄取不足是否导致血清中

25(OH)D₃ 含量下降, 从而影响生殖功能还需要进一步探究。因此, 本研究将建立大鼠维生素 D 饮食不足(VDI)暴露模型, 研究其维生素 D 摄入不足是否对其精子发生产生不良影响, 为维生素 D 对男性生殖功能中的研究提供更多的证据。

2. 材料

Sprague-Dawley (SD)雄鼠购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 4 周龄, 110~140 克, 共 12 只。动物实验经过湖南师范大学伦理道德委员会的批准, 并且严格按照相关的操作指南进行。SD 雄鼠饲养在湖南师范大学医学院清洁级动物房中, 4 只一笼, 前 2 周予以普通环境进行适应, 后 12 周保持 12 h 光照, 12 h 黑暗, 温度范围: 20℃~25℃, 水和食物自由摄取。由深圳睿迪生物科技有限公司提供本实验所用地饲料, 维生素 D 缺乏饲料其中维生素 D 含量 5 IU/kg, 对照饲料含有 1000 IU/kg 的维生素 D。

3. 实验方法

3.1. 维生素 D 对 SD 雄性大鼠体重、身高和睾丸重量的影响

本研究分为两组, 低维生素 D 饮食喂养的低维生素 D 组(VDI 组)与正常饮食喂养的维生素 D 组(VD 组), 在喂养的第 0、2、4、6、8、10、12、14 周分别用电子天平测量体重, 在喂养 14 周后量取两组身高, 并处死后用分析天平称取两组大鼠睾丸、附睾重量, 并计算左右两侧睾丸重量。

3.2. 血清相关指标测定

SD 雄性大鼠在 18 周龄时, 禁食 12 h 后称体重, 用 3%的戊巴比妥钠溶液按 1 ml/kg 进行麻醉, 然后固定在泡沫板上, 进行腹主动脉采血, 常温 3000 r 离心 10 min 分离血清, 采用全自动生化检测仪测总 25(OH)D 水平, 以及血清碱性磷酸酶(AKP), 血清磷(P), 血清钙(Ca)水平。

3.3. 精子密度测定

解剖大鼠, 迅速剪取双侧附睾尾和输精管, 分为数段, 置于 5 ml 培养皿中, 加入 5 ml 已预热的 PBS, 于 37℃培养箱中孵育 30 min, 制备精子悬液。取 10 μL 精子悬液滴于干净的精子计数板上, 盖上盖玻片, 将计数板放在低倍镜下观察记录计数板上的精子数量, 计算精子悬液精子密度。

3.4. 睾丸切片的制作

将睾丸组织迅速取下来戳破放入 4%多聚甲醛溶液中固定过夜。将固定好的睾丸组织剪成适量大小, 并保证平整, 做好标记。再依次放入 95%酒精, 无水乙醇进行脱水; 待二甲苯溶液浸泡透明后置于石蜡溶液包埋, 迅速降温冷却; 载玻片无水乙醇过夜, 干燥后 APES 防脱片胶; 将包埋的蜡块在切片机上切片, 标记; 将切片放于 60℃烤箱里放置 24 h。

3.5. 苏木素 - 伊红(H & E)染色

将制作好的切片放入二甲苯中浸泡, 然后置于不同浓度的酒精中, 按照梯度依次浸泡; 清水冲洗干净切片后, 再用苏木素进行染色; 之后再流动水下冲洗干净染液, 用 1%盐酸酒精冲 20 s; 再用清水浸泡 5 min 后, 用伊红染色, 切片用清水冲洗干净; 再次置于不同浓度酒精中按梯度浸泡, 二甲苯中浸泡进行脱水; 最后用中性树胶固定。

3.6. 免疫组织化学染色

将脱完蜡的切片放在清水下冲洗; 放入 3%甲醇 - H₂O₂ 泡 10 min, 取出冲洗干净后用 PBS 洗 3 遍;

再放入枸橼酸缓冲液中加热至沸腾, 放于室温, 待冷却后用 PBS 冲洗 3 遍; 等切片干燥后滴加兔抗 PCNA (1:400) 一抗, 4℃ 冰箱孵育过夜; 第二天用 PBS 冲洗后滴加兔抗鼠 IgG 二抗, 37℃ 孵育 30 min 后 PBS 冲洗。滴加 100 μ L DAB 液进行显色后用清水反复冲洗多余的显色液; 再用苏木素复染, 清水冲洗干净再用 1% 盐酸酒精冲, 然后用清水进行返蓝。之后按照酒精梯度浸泡, 再泡入二甲苯中进行脱水。最后中性树胶封片。

3.7. 统计学方法

实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 以均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 两组之间的比较采用两独立样本 t 检验, 多组之间相比较采用单因素方差分析, 如若方差齐采用 LSD 法, 如若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 法检验。P < 0.05 则表示有差异, 具有统计学意义。

4. 结果

4.1. 维生素 D 不足对雄鼠体重、身长、睾丸重量的影响

研究维生素 D 对 SD 雄性大鼠体重与身高的影响, 并计算左侧睾丸和右侧睾丸重量。结果显示: 在 SD 雄性大鼠中, 两组大鼠第 1 周到第 14 周体重和体长均明显增加, 但与 VDI 组相比, VD 组大鼠体重与身高无明显统计学差异, 并且大鼠左侧睾丸和右侧睾丸重量比值之间均无显著差异 (见表 1, 表 2, 图 1)。

4.2. 维生素 D 不足对雄鼠血清学指标的影响

研究维生素 D 不足对雄鼠血清学指标的影响, 大鼠处死前用腹主动脉采血用全自动生化检测仪检测, 结果显示: 与 VD 组相比, VDI 组的 25(OH)D 水平明显降低 (36.63 ± 2.31 vs. 28.41 ± 3.26 , $P < 0.01$), 血清中 AKP 含量与 VD 组比较 VDI 明显下降 (95.43 ± 24.41 vs. 58.20 ± 11.82 , $P < 0.05$), 差异具有统计学意义。两组之间 P、Ca 离子含量无明显差异 (见图 2)。

Table 1. The effect of vitamin D on the body weight of SD male rats

表 1. 维生素 D 对 SD 雄性大鼠体重的影响

体重(g)	VD (n = 7)	VDI (n = 5)
0W	177.05 \pm 12.27	173.88 \pm 8.19
2W	288.29 \pm 15.78	294.58 \pm 34.87
4W	398.64 \pm 18.59	375.54 \pm 24.12
6W	425.17 \pm 20.64	440.90 \pm 23.47
8W	502.17 \pm 26.80	491.60 \pm 35.54
10W	563.54 \pm 34.93	535.70 \pm 30.90
12W	578.01 \pm 34.12	576.93 \pm 31.57
14W	563.60 \pm 32.20	571.00 \pm 34.22

Table 2. The effect of vitamin D on the left and right testes of SD male rats

表 2. 维生素 D 对 SD 雄性大鼠左右睾丸的影响

睾丸重量(g)	VD (n = 7)	VDI (n = 5)
左侧睾丸	1.97 \pm 0.17	1.89 \pm 0.19
右侧睾丸	2.00 \pm 0.19	1.90 \pm 0.18

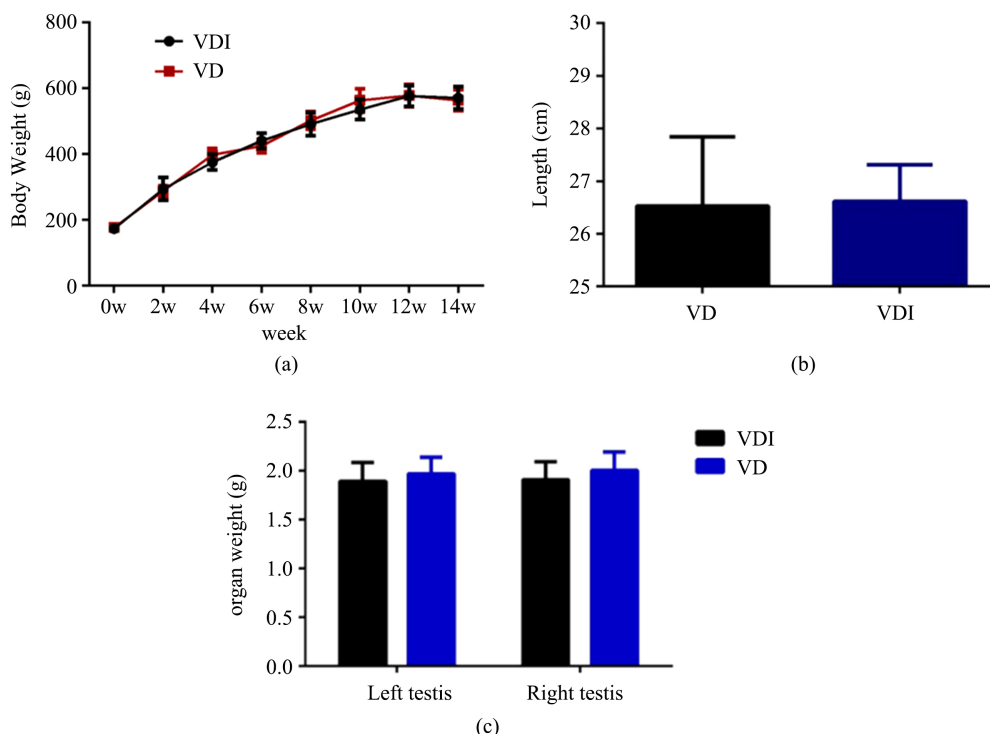


Figure 1. (a): The weight change of two groups of SD male rats; (b): The effect of vitamin D on the body length of SD male rats; (c): The effect of vitamin D on the left and right testes of SD male rats. VD: Control Group, VDI: Processing Group
图 1. (a): 两组 SD 雄性大鼠的体重变化; (b): 维生素 D 对 SD 雄性大鼠身长的影响; (c): 维生素 D 对 SD 雄性大鼠左右睾丸的影响。VD: 对照组, VDI: 处理组

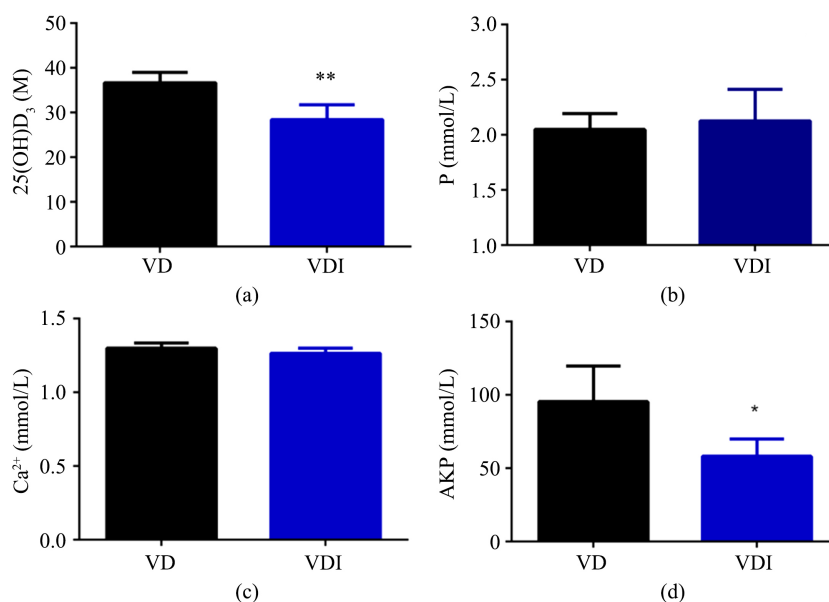


Figure 2. (a): Histogram of the effect of vitamin D on serum 25(OH)D; (b): Histogram of the effect of vitamin D on serum phosphorus ions; (c): Histogram of the effect of vitamin D on serum calcium ions; (d): Vitamin Histogram of the effect of D on the content of alkaline phosphatase in the serum. VD: Control Group, VDI: Processing Group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. VD
图 2. (a): 维生素 D 对血清 25(OH)D 的影响结果柱状图; (b): 维生素 D 对血清磷离子的影响结果柱状图; (c): 维生素 D 对血清钙离子的影响结果柱状图; (d): 维生素 D 对血清里碱性磷酸酶含量的影响结果柱状图。VD: 对照组, VDI: 处理组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. VD

4.3. 维生素 D 不足对雄鼠精子密度的影响

测定维生素 D 不足对雄鼠精子密度的影响。结果显示：VD 组和 VDI 组的大鼠精子密度相比较，VDI 组的精子数量有降低但与 VD 组相比无统计学差异($1.98 \times 10^7 \pm 8.78 \times 10^6$ vs. $1.65 \times 10^7 \pm 7.04 \times 10^6$, $P > 0.05$)。见图 3。

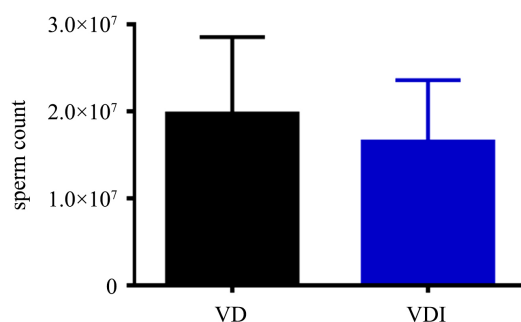
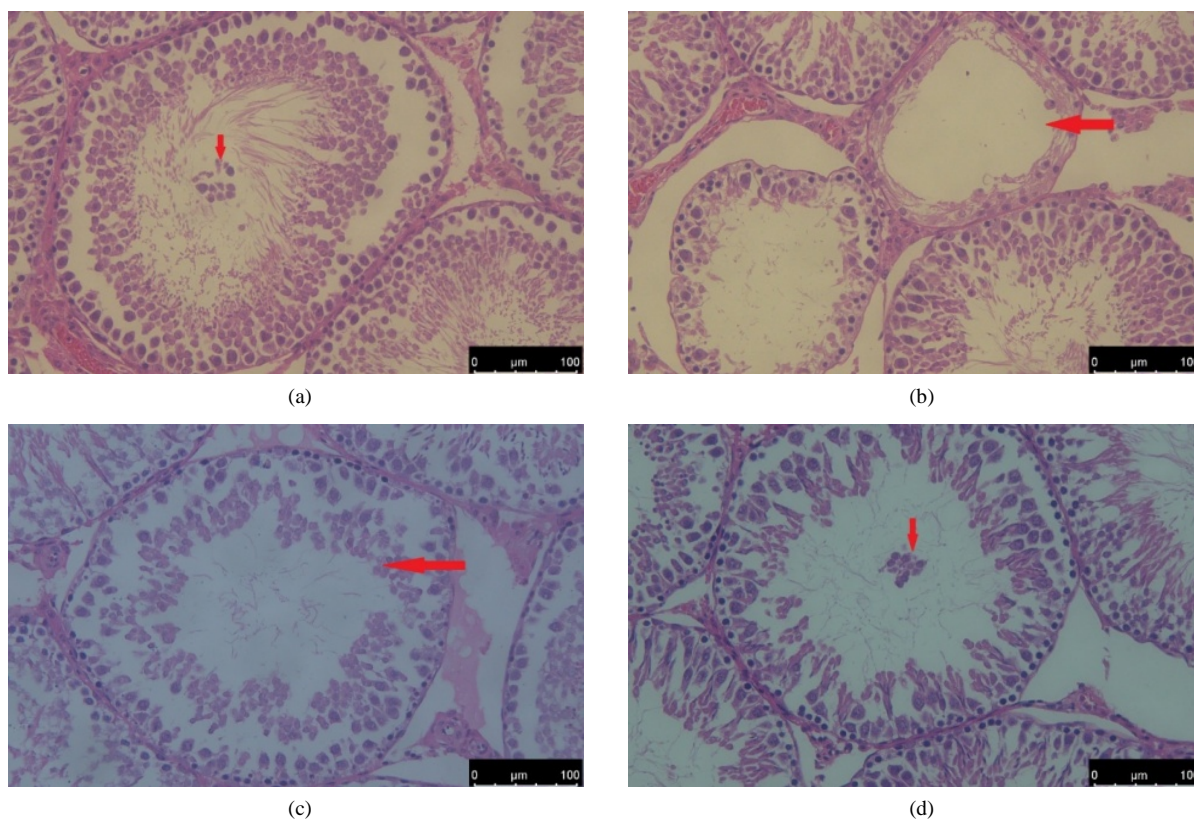


Figure 3. Histogram of the effect of vitamin D on the sperm count of SD male rats. VD: Control Group, VDI: Processing Group

图 3. 维生素 D 对 SD 雄性大鼠精子数量的影响结果柱状图。VD: 对照组, VDI: 处理组

4.4. 维生素 D 不足对雄鼠睾丸形态的影响

为了进一步验证维生素 D 饮食对大鼠生殖功能是否有影响，取出两组大鼠睾丸，进行切片染色，随机观察镜下 100 个睾丸细胞横截面情况。结果显示：睾丸细胞切片中有少许空泡、细胞脱落和无精子的现象，但 VD 组与 VDI 组相比结构无明显统计学差异(见图 4)。



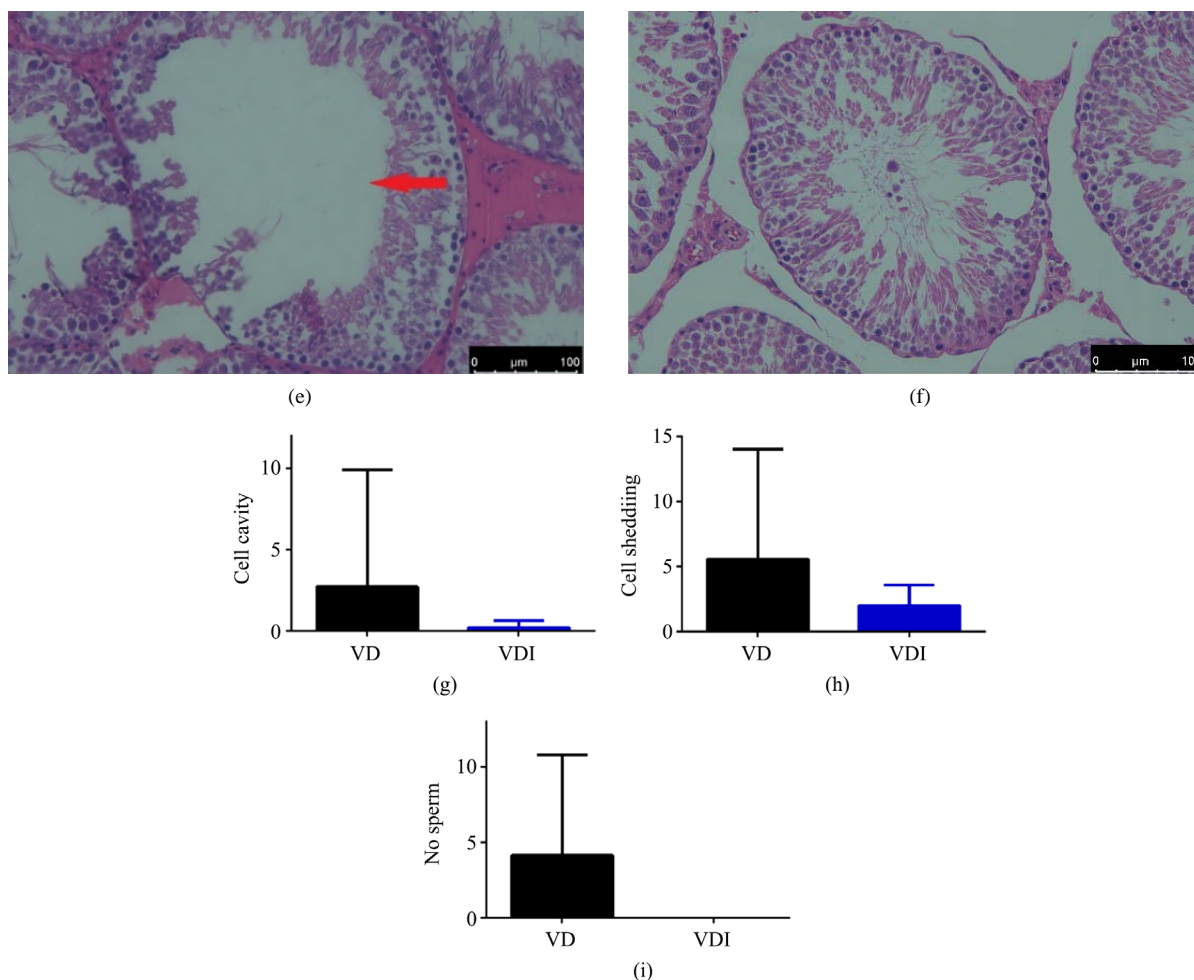


Figure 4. (a)~(c): There were shedding, vacuoles and azoospermia in the testicular slices of the VD group; (d)~(f): shedding, vacuolating and azoospermia in the testicular slices of the VDI group; (g)~(i): vacuoles and shedding on the testicular sections of the two groups of rats Histogram of comparison results with azoospermia. VD: Control Group, VDI: Processing Group. Microscope multiple: $\times 200$ (Red Marker: cell cavity: (a), (d); cell shedding: (b), (e); No sperm: (c), (f))

图 4. (a)~(c): VD 组睾丸切片中有脱落、空泡和无精子现象, (d)~(f): VDI 组睾丸切片里脱落、空泡和无精子现象; (g)~(i): 两组大鼠睾丸切片空泡、脱落和无精子现象的比较结果柱状图。VD: 对照组, VDI: 处理组, 显微镜倍数: $\times 200$ (红色箭头: (a), (d) 为脱落; (b), (e) 表示空泡现象; (c) 为无精子)

4.5. 维生素 D 不足对雄鼠睾丸 PCNA 表达的影响

为了研究维生素 D 睾丸中的表达,对睾丸 PCNA 蛋白检测。我们发现两组雄鼠睾丸细胞中都有 PCNA 阳性细胞表达,对两组雄鼠的睾丸切片随机选取 20 个横切面进行观察并计数,结果证明两组之间无明显差异(见表 3, 图 5)。

Table 3. The number of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positive cells in testis tissue

表 3. 睾丸组织 PCNA (增殖细胞核抗原)阳性细胞的数目

组别	例数	PCNA 阳性细胞数
VD	7	801.43 \pm 31.32
VDI	5	813.80 \pm 31.48

VD: 对照组, VDI: 处理组。

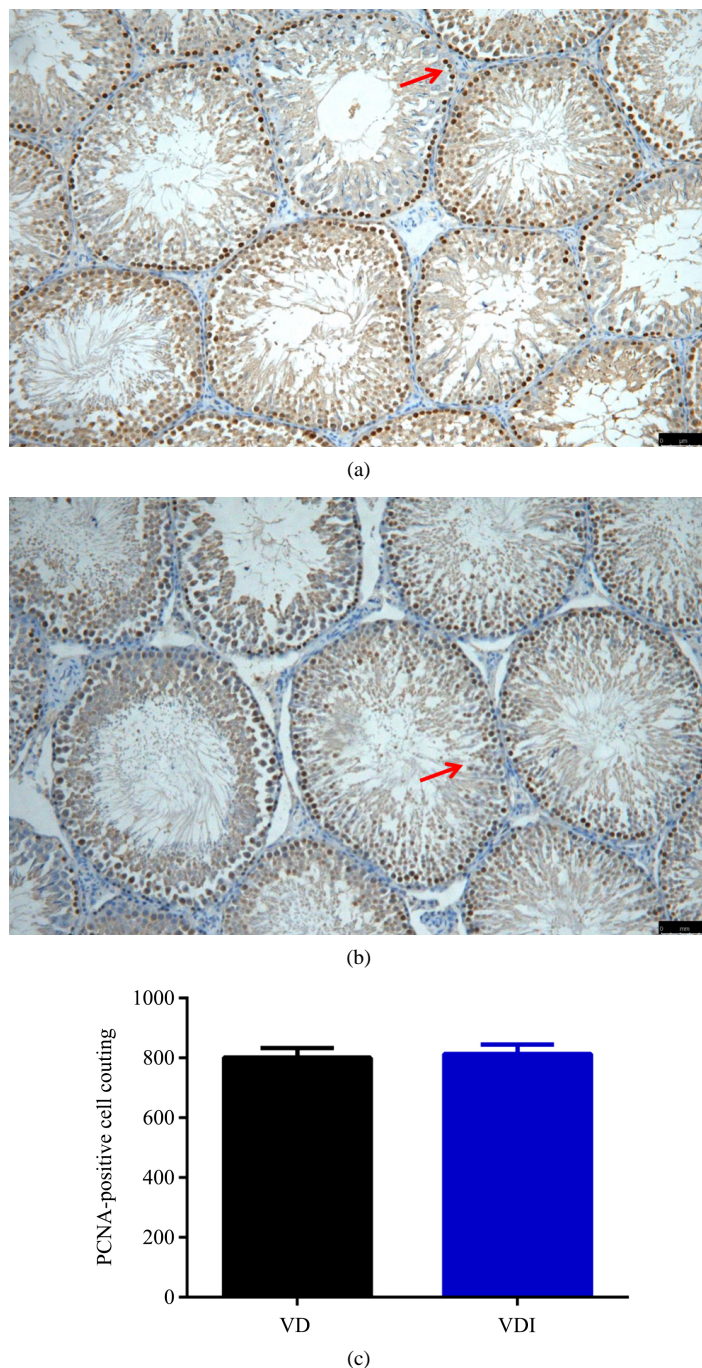


Figure 5. (a): Cross-section of testis in VD group; (b): Cross-section of testis in VDI group; (c): Bar graph of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positive cell count results of testicular cells in the two groups. VD: Control Group, VDI: Processing Group. Microscope multiple: $\times 200$ (Red Marker: proliferating cell nuclear antigen) positive cell

图 5. (a): VD 组睾丸切片横截面; (B): VDI 组睾丸切片横截面; (c): 两组睾丸细胞 PCNA (增殖细胞核抗原) 阳性细胞计数结果柱状图。VD: 对照组, VDI: 处理组, 显微镜倍数: $\times 200$ (红色箭头: PCNA 阳性细胞)

5. 讨论

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 是维生素 D3 的类固醇激素, 影响细胞周期, 激活 PKC、MAPK、PLA、PKA、PI-3K 分子, 从而使体内的钙离子变化, 最终影响细胞的增殖与凋亡[10]。大量的研究表明维生素 D 缺乏的雄

性大鼠交配成功的概率比没有缺乏的雄性大鼠明显要低,而且这类雄性大鼠的精子活力和成功受孕的概率也比正常维生素 D 的雄性大鼠也要低[11]。进一步研究发现,对维生素 D 缺乏的雄鼠补充维生素 D 和雌二醇激素时,发现小鼠的生育能力得到了明显提升,证明了维生素 D 与鼠的生殖能力相关[12]。

但是,也有研究表明,动物体内中维生素 D₃ 和 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 水平与总睾酮和游离睾酮之间没有明显的相关性[7] [13] [14] [15] [16] [17],维生素 D 并未导致生殖能力出现明显降低,所以现阶段关于维生素 D 影响男性生殖能力的结论并不一致。同时,最新研究表明维生素 D₃ 与精子总睾酮也没有明显的相关性[18] [19] [20] [21]。因此,目前关于维生素 D 对男性生殖功能的影响结果各异且还具有争议,这值得我们进一步探究。

本研究探究了维生素 D 摄取不足时大鼠睾丸生殖的影响。证实了正常雄性大鼠在维生素 D 摄取不足时对其生殖的影响。在本实验中,我们首先建立了动物模型,将 SD 雄性大鼠随机分为两组:1) VDI 组给予低维生素 D 饮食喂养 14 周;2) VD 组给予正常含量维生素 D 饮食喂养 14 周。平均两周记录一次大鼠体重,喂养第 14 周后集体处死,并记录身长、体重和左右睾丸重量。结果表明,VDI 组与 VD 组比较,两组的体重,身长,左右侧睾丸重量的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。VD 摄取不足并不会影响大鼠的生长。我们进一步对饲养 14 周后的大鼠进行血清指标的检测,测定维生素 D($25\text{(OH)}\text{D}$)、血清钙、血清碱性磷酸酶和血清磷。测定结果表明与 VD 组比较,VDI 组血清 $25\text{(OH)}\text{D}$ 水平明显降低($P < 0.01$),血清碱性磷酸酶含量明显下降($P < 0.05$)。证明维生素 D 摄取不足确实会导致体内维生素 D 的降低,但是,低维生素 D 饮食只是导致体内维生素 D 不足的状态,而非缺乏的状态。在取血后对大鼠进行处死,取出大鼠附睾制作精子悬液,并用精子计数器计算精子数量,与 VD 组比较,VDI 组附睾精子密度下降但无统计学差异($P > 0.05$);这证明维生素 D 摄取不足导致的维生素 D 降低并未影响到精子密度。最后取大鼠两侧睾丸组织石蜡包埋后制作切片,HE 染色观察睾丸形态发现:与 VD 组相比较,VDI 组睾丸细胞切片中有少许空泡、细胞脱落和无精子的现象,但两组差异无统计学意义($P > 0.05$),这证明维生素 D 摄取不足导致的维生素 D 降低并未对睾丸细胞造成显著影响。同时,PCNA 调节细胞周期,参与细胞增殖,阳性细胞的多少可以作为生精过程中判断增殖的指标[22]。PCNA 免疫组织化学染色证明,两组模型大鼠间 PCNA 蛋白表达的差异无统计学意义($P > 0.05$),进一步证明维生素 D 摄取不足也并未引起睾丸细胞的增殖变化。

本研究存在一定局限性。本研究中只是在一定周期内,对正常雄性大鼠在维生素 D 摄取不足进行探究,并未探究更长周期的维生素 D 摄取不足,会不会导致雄性大鼠体内维生素 D 进一步降低。同时,维生素 D 只是一定程度的降低,没有进一步降低体内维生素 D 水平来检测对睾丸生殖细胞的影响,尚不能确定大鼠体内维生素 D 进一步降低到一定程度是否也不影响睾丸生殖功能。这些将是笔者今后研究中探讨的问题。

6. 结论

综上,我们的研究表明大鼠维生素 D 饮食不足时,只导致血清 $25\text{(OH)}\text{D}$ 下降和大鼠附睾中精子密度有下降趋势,但其下降量并未导致度睾丸明显的形态学变化和 PCNA 蛋白表达差异,因此,正常雄性大鼠仅仅维生素 D 摄取不足对大鼠的睾丸生殖功能并未有显著影响。

参考文献

- [1] Pilz, S., Frisch, S., Koertke, H., *et al.* (2010) Effect of Vitamin D Supplementation on Testosterone Levels in Men. *Hormone and Metabolic Research*, **43**, 223-225. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1269854>
- [2] Jensen, M.B. (2012) Vitamin D Metabolism, Sex Hormones, and Male Reproductive Function. *Reproduction*, **144**, 135-152. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0064>

- [3] Hammoud, A.O., Meikle, A.W., Peterson, C.M., Stanford, J., Gibson, M. and Carrell, D.T. (2012) 25-Hydroxy-Vitamin D Levels with Semen and Hormonal Parameters. *Asian Journal of Andrology*, **14**, 855-859. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.77>
- [4] 邓小林, 黎衍敏, 杨小燕, 黄建荣, 郭树林, 宋乐明. 维生素 D 治疗特发性少弱精子症的有效性与安全性研究[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(12): 1082-1085.
- [5] Idelevich, A., Michael, K., et al. (2011) 1,25(OH)₂D₃ Alters Growth Plate Maturation and Bone Architecture in Young Rats with Normal Renal Function. *PLoS ONE*, **6**, e20772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020772>
- [6] Muindi, J.R., Modzelewski, R.A., Peng, Y., Trump, D.L. and Johnson, C.S. (2004) Pharmacokinetics of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Normal Mice after Systemic Exposure to Effective and Safe Antitumor Doses. *Oncology*, **66**, 62-66. <https://doi.org/10.1159/000076336>
- [7] Ramlau-Hansen, C.H., Moeller, U.K., Bonde, J.P., Olsen, J. and Thulstrup, A.M. (2011) Are serum Levels of Vitamin D Associated with Semen Quality? Results from a Cross-Sectional Study in Young Healthy Men. *Fertility and Sterility*, **95**, 1000-1004. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.002>
- [8] Sood, S., Marya, R.K., Reghunandan, R., et al. (1992) Effect of Vitamin D Deficiency on Testicular Function in the rat. *Annals of Nutrition & Metabolism*, **36**, 203-208. <https://doi.org/10.1159/000177719>
- [9] Sun, W., Chen, L., Wei, Z., Rong, W., Goltzman, D. and Miao, D.S. (2015) Active Vitamin D Deficiency Mediated by Extracellular Calcium and Phosphorus Results in male infertility in young mice. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, **308**, E51-E62. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00076.2014>
- [10] Holick, M.F. (2008) Vitamin D and Sunlight: Strategies for Cancer Prevention and Other Health Benefits. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **3**, 1548-1554. <https://doi.org/10.2215/CJN.01350308>
- [11] Hu, Z., Tao, S.S., Liu, H., Pan, G. and Zhang, Z.J.J. (2019) The Association between Polymorphisms of Vitamin D Metabolic-Related Genes and Vitamin D3 Supplementation in Type 2 Diabetic Patients. 1-8.
- [12] Norman, A.W., Mizwicki, M.T. and Norman, D.P.G. (2004) Steroid-Hormone Rapid Actions, Membrane Receptors and a Conformational Ensemble Model. *Nature Reviews: Drug Discovery*, **3**, 27-41. <https://doi.org/10.1038/nrd1283>
- [13] Jensen, M.B., Lawaetz, J.G., Andersson, A.-M., et al. (2016) Vitamin D Deficiency and Low Ionized Calcium Are Linked with Semen Quality and Sex Steroid Levels in Infertile Men. *Human Reproduction*, **31**, 1875-1885. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew152>
- [14] Anic, G.M., Albanes, D., Rohrmann, S., et al. (2016) Association between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Serum Sex Steroid Hormones among Men in NHANES. *Clinical Endocrinology*, **85**, 258-266. <https://doi.org/10.1111/cen.13062>
- [15] Wulaningsih, W., Van Hemelrijck, M., Michaelsson, K., et al. (2014) Association of Serum Inorganic Phosphate with Sex Steroid Hormones and Vitamin D in a Nationally Representative Sample of Men. *Andrology*, **2**, 967-976. <https://doi.org/10.1111/andr.285>
- [16] Valimaki, V.-V., Alfthan, H., Ivaska, K.K., et al. (2004) Serum Estradiol, Testosterone, and Sex Hormone-Binding Globulin as Regulators of Peak Bone Mass and Bone Turnover Rate in Young Finnish Men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 3785-3789. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032187>
- [17] Chin, K.-Y., Ima-Nirwana, S. and Ngah, W.Z.W. (2015) Vitamin D Is Significantly Associated with Total Testosterone and Sex Hormone-Binding Globulin in Malaysian Men. *Aging Male*, **18**, 175-179. <https://doi.org/10.3109/13685538.2015.1034686>
- [18] Zanatta, L., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., Silva, F.R.M.B. and Carreau, S. (2011) Development. Regulation of aromatase expression by 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃ in Rat Testicular Cells. *Reproduction Fertility & Development*, **23**, 725-735. <https://doi.org/10.1071/RD10163>
- [19] Tak, Y.J., Lee, J.G., Kim, Y.J., et al. (2015) Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Testosterone Deficiency in Middle-Aged Korean Men: A Cross-Sectional Study. *Asian Journal of Andrology*, **17**, 324-328. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.142137>
- [20] Mortimer, D., Barratt, C.L.R., Bjoerndahl, L., de Jager, C., Jequier, A.M. and Muller, C.H. (2013) What Should It Take to Describe a Substance or Product as Sperm-Safe. *Human Reproduction Update*, **19**, I1-I45. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt008>
- [21] Nimptsch, K., Platz, E.A., Willett, W.C. and Giovannucci, E. (2012) Association between Plasma 25-OH Vitamin D and Testosterone Levels in Men. *Clinical Endocrinology*, **77**, 106-112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04332.x>
- [22] 岳凤鸣, 杜心欣, 高福祿, 庞晓静. 糖尿病对小鼠睾丸组织中 PCNA 表达的影响[J]. 中国男科学杂志, 2001, 15(3): 154-156.