

文章编号: 1001-6325(2024)07-0940-07

研究论文

丙二酸二钠通过抑制琥珀酸脱氢酶活性损伤人精子运动功能

彭真¹, 闻琴¹, 卢京², 涂泽梁², 程一民^{2,3*}

- 宜春市人民医院 药学部, 江西 宜春 336000; 2. 宜春学院 医学院 转化医学中心, 江西 宜春 336000
- 广州中医药大学 分子节律与代谢研究所, 广东 广州 510006

摘要:目的 揭示琥珀酸脱氢酶(SDH)在人精子功能调控中的作用。方法 将分离纯化后的人精子样本与不同浓度(10、20、40 mmol/L)SDH抑制剂丙二酸二钠共孵育不同时间(1、2 h)后,试剂盒检测对照组及丙二酸二钠处理组SDH酶活性,Western blot检测SDH催化亚基(SDHA)蛋白水平。精子功能研究实验:1)通过计算机辅助精液分析系统检测丙二酸二钠对未获能精子重要运动参数[前向运动率(PR)、总活力(TM)、平均路径速度(VAP)]以及获能精子穿透粘性介质能力的影响;2)伊红-苯胺黑法评估丙二酸二钠对精子存活率的作用;3)PSA-FITC染色法检测丙二酸二钠处理对获能精子顶体反应发生率的影响。结果 丙二酸二钠不改变人精子中琥珀酸脱氢酶A(SDHA)蛋白表达水平,但其能够抑制SDH酶催化活性、精子前向运动率、总活力以及获能精子穿透粘性介质的能力,且上述抑制效应同丙二酸二钠浓度正相关。此外,丙二酸二钠不影响获能精子自发顶体反应发生率。结论 丙二酸二钠通过抑制SDH活性损伤人精子运动功能。

关键词: 琥珀酸脱氢酶; 丙二酸二钠; 精子功能; 精子运动

中图分类号: R965.3 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.07.0940

Disodium malonate impairs human sperm motility by inhibiting succinate dehydrogenase activity

PENG Zhen¹, WEN Qin¹, LU Jing², TU Zeliang², CHENG Yimin^{2,3*}

- Department of Pharmacy, Yichun People's Hospital, Yichun 336000; 2. Center for Translational Medicine, Department of Medicine, Yichun University, Yichun 336000; 3. Institute of Molecular Rhythm and Metabolism, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the impact of succinate dehydrogenase (SDH) on the modulation of human sperm functions. **Methods** The isolated human sperm were co-incubated with different concentrations (10, 20, 40 mmol/L) of SDH inhibitor disodium malonate for one or two hours. The activity of the SDH was measured by commercially available reagent kit, while the protein level of the SDH catalytic subunit SDHA was determined through Western blot analysis. Sperm functions were analyzed: 1) The impact of disodium malonate on important motility parameters of un-capacitated sperm including progressive motility rate (PR), total motility (TM), average

收稿日期: 2023-12-29 修回日期: 2024-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(82101690); 江西省自然科学基金(20224BAB216029); 江西省教育厅科技项目(GJJ2201749); 宜春市指导性科技计划项目(2023ZDJH2699)

*通信作者(corresponding author): cym1169331029@outlook.com

pathvelocity (VAP) and the ability of capacitated sperm to penetrate viscous media were assessed using a computer aided semen analysis system. 2) Effect of disodium malonate on sperm survival rate was evaluated using the Eosin-Nigrosin microscopy. 3) The incidence of acrosome reaction in capacitated sperm was detected by PSA-FITC staining assay following disodium malonate treatment. **Results** Disodium malonate had no effect on expression of SDH catalytic subunit SHDA protein in human sperm. However, it inhibited the catalytic activity of the SDH, sperm forward motility, total motility, and the ability of sperm to penetrate viscous media. These inhibitory effects were positively correlated with the concentration of disodium malonate. Furthermore, disodium malonate had no any influence on the occurrence of spontaneous acrosome reaction in capacitated sperm. **Conclusions** Disodium malonate impairs human sperm motility by inhibiting succinate dehydrogenase activity.

Key words: succinate dehydrogenase; disodium malonate; sperm function; sperm motility

不孕不育作为公共卫生健康问题,影响着全球约 10% 的夫妇^[1]。50% 不育症的发病同男性因素密切相关,其中又有约 30% 是完全由男方因素所致。全球男性精子质量下降已是不争事实^[2],而精子线粒体功能异常是导致男性不育的重要诱因之一^[3]。

琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)由 SDHA、SDHB、SDHC、SDHD、SDHAF1 以及 SDHAF2 编码的 6 种亚基组成,是唯一一种同时参与线粒体氧化磷酸化和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)的酶复合体^[4]。动物研究发现,将线虫中人 SDHA 同源基因 *sdha-2* 敲除后,线虫精子线粒体发生融合,氧化还原的动态平衡被打破,精子获能及运动功能受损最终导致雄性不育^[5]。更重要的是,临床研究发现琥珀酸脱氢酶亚基单核苷酸多态性与不育症患者精子发生障碍密切相关^[6]。此外,同健康人群相比,特发性弱精症患者精子中 SDH 蛋白表达水平显著下调,且其在精子中的定位发生改变^[7]。有报道 SDH 染色阳性率同人精子运动率及存活率间存在显著正相关性^[8]。然而,有关 SDH 在人精子功能调控中的作用目前尚未阐明。

丙二酸二钠(disodium malonate)广泛应用于医药、染料以及香料的生产过程中。既往动物研究发现高浓度丙二酸二钠(10~50 mmol/L)能够显著抑制 SDH 酶活性并防止心肌缺血/再灌注所导致的心肌梗死^[9]。更重要的是,2019 年剑桥大学有研究表明丙二酸可以通过内源性转运机制进入线粒体,从而使化合物及时到达目标部位。此外,丙二酸具有有限的毒性,是一种公认的代谢产物,已被用作药物开发的赋形剂。因此,该研究认为丙二酸及其钠盐具备治疗人类心肌缺血/再灌注的临床转化价

值^[10]。基于上述背景,本研究检测了不同浓度丙二酸二钠(10、20、40 mmol/L)对人精子 SDH 酶活性及精子功能的影响,以期深入了解丙二酸二钠对男性生育功能的作用及 SDH 酶在其中扮演的角色提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本来源:参与本研究的精液捐赠者均来自 2023 年 4 月至 2023 年 9 月于宜春市人民医院门诊就诊的健康可育个体。

1.1.2 试剂:丙二酸二钠(disodium malonate, 63409, Sigma-Aldrich 公司);钙霉素(calcimycin, A23187)(HY-N6687, MedchemExpress 公司);伊红-苯胺黑染色试剂盒(G2581, Solarbio Life Sciences 公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(P1020, 索莱宝科技公司);SDH 酶活性测定试剂盒(A022, 南京建成生物工程研究所);SDHA 抗体(DF7043, 亲科生物研究中心);GAPDH 抗体(60004-1-Ig, Proteintech 公司)。除特殊说明外,其他试剂均来自于 Sigma-Aldrich(Merck 公司)。

1.2 方法

1.2.1 精液样本获取及处理:本研究共纳入 20 例来源于不同健康可育个体的精液样本。用于本研究的人精液样本的获取已得到宜春市人民医院伦理委员会批准(批准号:2023 医伦审第 020 号),并取得所有涉及此项研究受试者的知情同意。入选标准:按照 WHO 标准从宜春市人民医院门诊就诊的男性中筛选活力正常(总活力 $\geq 40\%$,前向运动 a 级 $\geq 25\%$ 或 a+b 级 $\geq 32\%$ 的样本)的精液标本;

标本提供者年龄 25~45 岁;无心、肝、肾疾病;在过去的两年内有生育史且无泌尿生殖系统基础疾病。排除标准:总活力<40%,前向运动 a 级<25%或 a+b 级<32%的样本,患有泌尿生殖系统基础疾病。将精子样本在 37℃培养箱中持续液化 30~60 min,并根据世界卫生组织出版的实验室精液处理及分析手册(2010 年第五版)对人精子进行处理及分析。精子样本通过 percoll 梯度密度离心后,将细胞沉淀重悬于含不同浓度丙二酸二钠(disodium malonate)的 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)溶液(135 mmol/L 氯化钠、5 mmol/L 氯化钾、1 mmol/L 硫酸镁、2 mmol/L 氯化钙、5 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L 丙酮酸钠、10 mmol/L 乳酸和 20 mmol/L HEPES,20%氢氧化钠调 pH 至 7.4)或人输卵管液(human tubal fluid,HTF)溶液(93.8 mmol/L 氯化钠、4.69 mmol/L 氯化钾、0.2 mmol/L 硫酸镁、0.37 mmol/L 磷酸二氢钾、2.04 mmol/L 氯化钙、0.33 mmol/L 丙酮酸钠、21.4 mmol/L 乳酸、2.78 mmol/L 葡萄糖、21 mmol/L HEPES 和 25 mmol/L 碳酸氢钠,20%氢氧化钠调 pH 至 7.35)中。

1.2.2 评估精子穿透粘性介质能力:为检测丙二酸二钠对获能人精子穿透粘性介质功能的影响,需将人精子重悬于 HTF 溶液并在 37℃,5% CO₂ 培养条件下共孵育 3 h,之后再与不同浓度(10、20、40 mmol/L)丙二酸二钠(control 组:加入等体积 HTF 溶液)以及 10 μmol/L 孕酮(阳性对照)在 37℃ 下继续孵育 2 h。接下来,将填充有 1%甲基纤维素溶液(溶剂:HTF)的玻璃毛细管(7.5 cm 长,1 mm 内径)的开口端(另一端用橡皮泥密封)插入对照组以及丙二酸二钠处理组,于 37℃ 继续孵育 1 h。最后,通过 CASA 计算毛细管开口端 1,2 cm 处 3 个随机视野中的精子总数,并将实验组细胞数量同平行对照组(control)进行标准化处理。

1.2.3 获能精子顶体反应发生率的检测:根据之前文献[11]的报道,采用 PSA-FITC 法检测不同浓度丙二酸二钠以及 A23187(阳性对照)孵育后(control 组:加入等体积 HTF 溶液),精子顶体反应(acrosome reaction, AR)发生率变化情况。操作流程如下:首先利用 95%乙醇固定精子样本,然后精子悬液均匀涂抹于载玻片上,并于空气中自然干燥。将 40 μg/L PSA-FITC 均匀覆盖于精子涂片上,避光

4℃孵育过夜。第 2 天用磷酸盐缓冲液洗去多余未装载荧光探针,并于荧光显微镜(激发光波长 450~490 nm,发射光波长 520~540 nm)400×放大倍数下拍照观察精子顶体部位荧光分布,每组需分析至少 200 条精子。

1.2.4 检测精子运动功能及存活率:用不同浓度(10、20、40 mmol/L)丙二酸二钠(control 组:加入同等体积 HEPES 溶液)同人精子共孵育处理 1、2 h 后,每组吸取 10 μL 精子悬液转移至精子分析板上,借助计算机辅助精液分析系统(computer aided sperm analysis, CASA)进行运动功能参数分析其前向运动率(progressive motility, PR),总活力(total motility, TM),平均路径速度(average path velocity, VAP)。各组精液样本需检测至少 200 条精子。同时,本研究利用获得伊红-苯胺黑染色试剂盒检测不同浓度丙二酸二钠(control 组:加入同等体积 HEPES 溶液)同人精子共孵育处理 2 小时后精子存活率(viability)的变化。依照试剂盒检测步骤对精子进行染色处理后,利用荧光显微镜明场观察精子头部染色情况,凋亡精子头部染为红色,而活精子头部未染色。各组别需至少分析 200 条以上精子。

1.2.5 SDH 酶活性测定及 SDHA 蛋白水平检测:依照现有研究检测人精子中 SDH 酶活性改变^[12]。具体过程如下:将人精子与不同浓度(10、20、40 mmol/L,溶剂:HEPES 溶液)丙二酸二钠(control 组:加入等体积 HEPES 溶液)共孵育处理 1,2 h 后,利用商品化 SDH 酶活性测定试剂盒并依照说明书步骤检测对照及实验组中人精子 SDH 酶活性。此外,本研究通过免疫印迹法检测了不同浓度丙二酸二钠对人精子中 SDH 催化亚基 SDHA 蛋白水平的影响。具体步骤如下:将精子与不同浓度丙二酸二钠(10、20、40 mmol/L,溶剂:HEPES 溶液)共孵育处理 2 h 后,4 000×g 离心获取精子沉淀。将各组精子沉淀重悬于细胞裂解液中并于 4℃裂解 5 h,此后 8 000×g 离心,收集上清即得精子总蛋白裂解液。在蛋白免疫印迹实验中通过使用 SDHA 抗体检测精子中 SDHA 蛋白水平。与此同时,需利用 GAPDH 抗体检测对照及实验组中精子蛋白质裂解液中 GAPDH(内参蛋白)含量,以排除蛋白质浓度差异对免疫印迹结果的影响。

1.3 统计学分析

应用 GraphPad Prism (version 9) 对实验数据进行统计分析, 计量资料以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析对照组及丙二酸二钠处理组, $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丙二酸二钠对人精子 SDH 酶活性及其催化亚基 SDHA 蛋白表达的影响

本研究中, 首先检测了不同浓度丙二酸二钠 (10、20、40 mmol/L) 对人精子 SDH 酶活性的影响。结果表明将丙二酸二钠同人精子在体外共孵育处理 1 h 后, 10 mmol/L 丙二酸二钠对人精子 SDH 酶活性影响不显著, 而 20、40 mmol/L 丙二酸二钠则能显著下调 SDH 活性。将共孵育时间延长至 2 h 后, 10 mmol/L 丙二酸二钠便能够显著抑制 SDH 酶活性, 且上述抑制效应具有时间-浓度依赖性。另外, 本研究检测了不同浓度丙二酸二钠处理后人精子中 SDH 蛋白表达水平的改变。考虑到 SDHA 是 SDH 复合体的催化亚基, 且 SDHA 多态性同男性不育症发病密切相关^[8], 故重点检测了丙二酸二钠对人精子中 SDHA 蛋白表达水平的影响。结果表明丙二酸二钠处理不会改变人精子中 SDHA 蛋白水平。

2.2 丙二酸二钠对精子运动及存活率的作用

将丙二酸二钠 (10、20、40 mmol/L) 与精子共

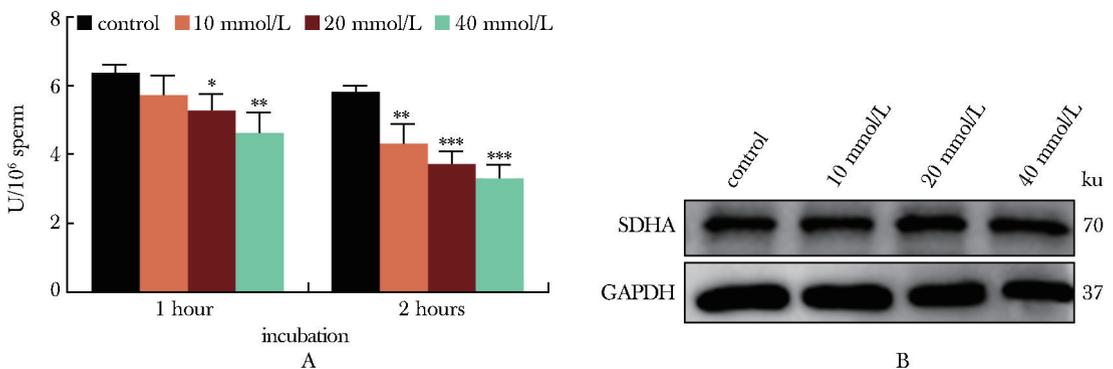
孵育 1 h 后, 精子的前向运动率以及总活力均下降, 且降幅同丙二酸二钠浓度呈现正相关性 (图 2A, B)。将处理时间延长至 2 h 后, 丙二酸二钠对精子 TM 和 PR 的抑制作用进一步增加。值得关注的是, 丙二酸二钠可将精子 PR、TM 降低至弱精症水平 (PR < 32%、TM < 40%, WHO 人类精液实验室检验手册第五版) 以下 (图 2A, B)。与此同时, 丙二酸二钠也能抑制精子平均路径速度 (average path velocity) (图 2C)。最后, 丙二酸二钠不影响精子存活率 (viability) (图 2D)。

2.3 丙二酸二钠对获能精子穿透粘性介质能力的影响

体外实验中利用 1% 甲基纤维素 (溶剂: HTF) 模拟女性生殖道黏液环境, 以进一步评估丙二酸二钠对精子运动功能的影响。同对照组相比, 丙二酸二钠处理组毛细管开口端 1 cm 和 2 cm 处的精子平均数量显著降低, 且下降幅度同丙二酸二钠浓度呈正相关性。阳性对照组中, 天然激素黄体酮 (progesterone, P4) 能够显著增强精子穿透黏性介质能力 (图 3A, B)。

2.4 丙二酸二钠对获能精子顶体反应发生率的作用

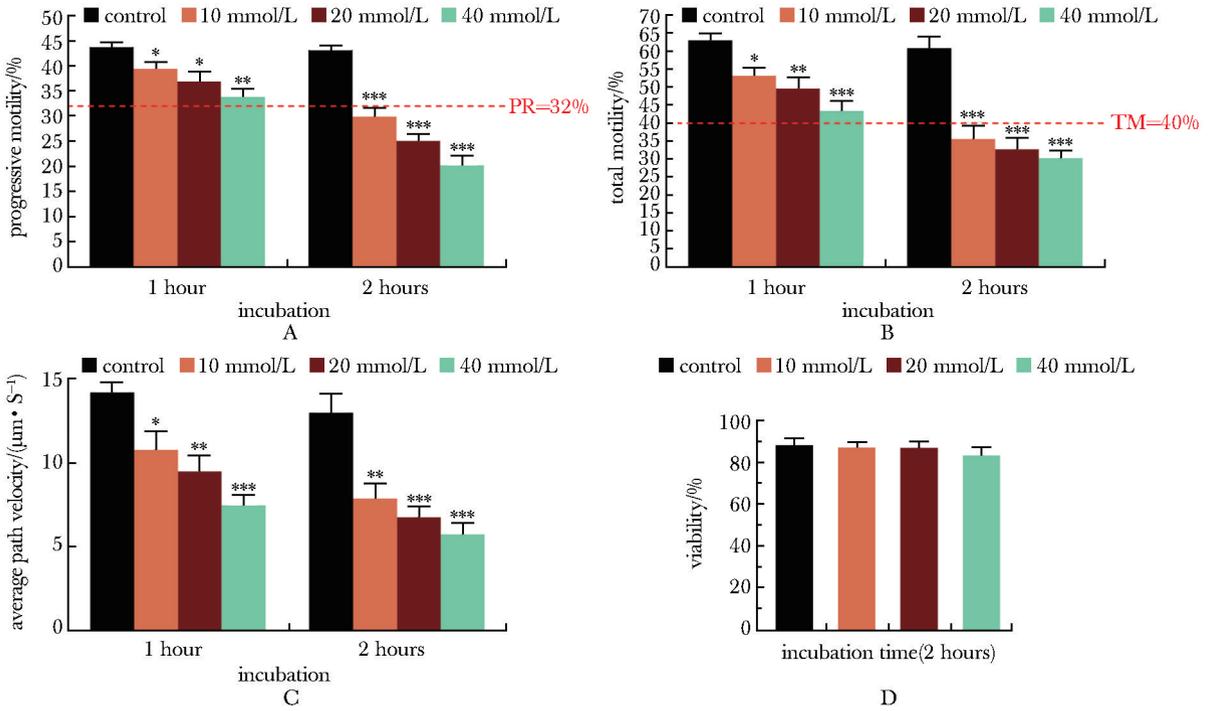
精子顶体反应通过 PSA-FITC 染色法进行评估, 根据精子顶体部位染色情况计算各组别中发生顶体反应的精子所占百分比 (图 4A)。在对照组中, 获能精子自发性顶体反应的发生率为 $19\% \pm 1.23\%$



After co-incubation with different concentrations of disodium malonate for 1-2 hours, the activity of SDH enzyme (A) and the level of SDH catalytic subunit SDHA protein in human sperm (B) were detected; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图 1 丙二酸二钠对人精子中 SDH 酶活性及 SDHA 表达水平的影响

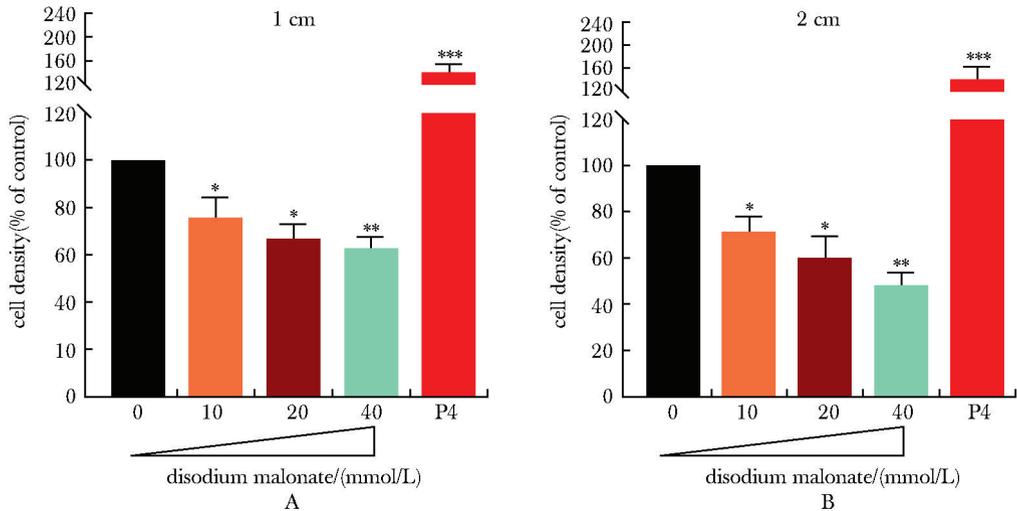
Fig 1 Effects of disodium malonate on SDH enzyme activity and SDHA expression level in human sperm ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



Alterations in the progressive motility (A), total motility (B), average path velocity (C), and survival rate (D) (incubation time: 2 hours) were observed subsequent to the co-incubation of human sperm with varying concentrations of disodium malonate for a duration of 1–2 hours *in vitro*; Differences between the control and experimental groups were determined by One-way analysis of variance; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图2 丙二酸二钠对人精子前向运动率、总活力、平均路径速度及存活率的影响

Fig 2 Assessment of sperm progressive motility (PR), total motility (TM), average path velocity (VAP) and viability in untreated and disodium malonate-treated groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



The ability of sperm to penetrate artificial mucus was assessed as described in Materials and methods; the number of sperm at (A) 1 cm and (B) 2 cm from the base of capillary was calculated in each group; the number of cells in each experimental group was normalized to values from parallel, untreated controls (cell density, % of control), which indicates the sperm penetration ability into the viscous medium; differences between the control and experimental groups were determined by One-way analysis of variance; * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ versus the parallel control group; P4, progesterone.

图3 丙二酸二钠孵育对获能人精子穿透粘性介质能力的作用

Fig 3 Effect of disodium malonate on the ability of capacitated sperm to penetrate the viscous medium ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

(图 4B 的“0”组),本研究发现丙二酸二钠对获能精子顶体反应率的影响并不显著(图 4B)。钙离子载体 A23187 是一种已被证实能够激活精子细胞内钙信号的载体,在此被用作阳性对照以诱导顶体反应。A23187 诱导条件下精子顶体反应(AR)发生率达到 $46.75\% \pm 2.46\%$ (“A”组,图 4B)。

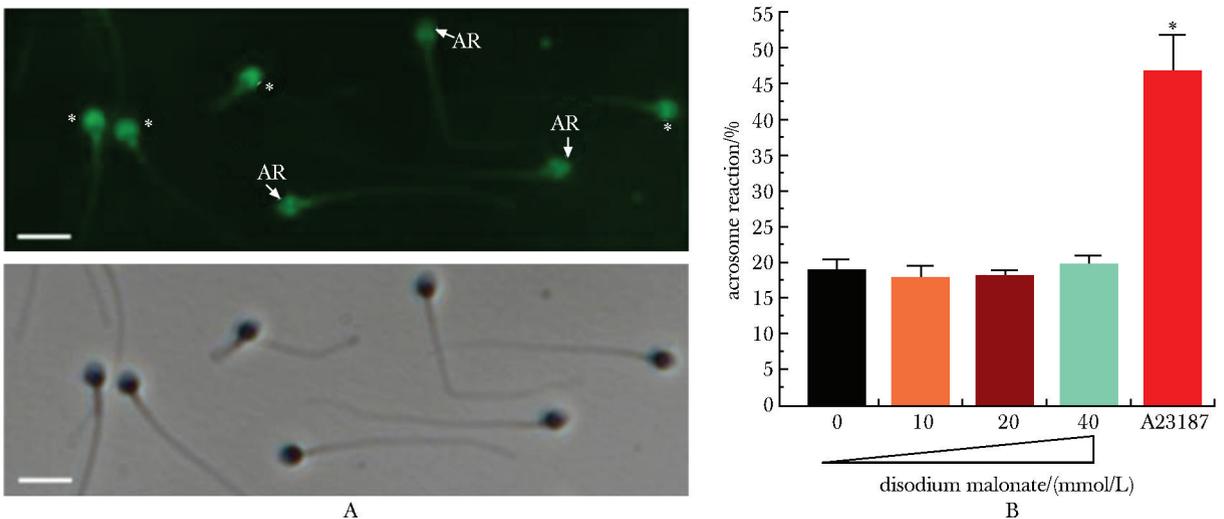
3 讨论

线粒体中能量代谢信号通路在精子生理功能调控过程中发挥至关重要作用^[13]。精子鞭毛的运动有赖于由轴丝微管在肌动蛋白的作用下的相对滑动,而肌动蛋白的 ATP 酶活性表明 ATP 在维持精子鞭毛运动过程中发挥至关重要的作用^[14]。此外 ATP 也参与精子成熟、获能、超活化、顶体反应及精卵结合等重要生理过程^[15]。值得注意的是,SDH 作为唯一一种同时参与线粒体氧化磷酸化和三羧酸循环的酶复合体,其在线粒体 ATP 代谢调节以及相关疾病发病过程中的功能受到广泛关注。动物研究发现,心肌缺血/再灌注时利用丙二酸二钠抑制 SDH 酶活性能显著减少小鼠及猪心

肌梗死面积^[9]。相似地,本研究发现丙二酸二钠能够在体外抑制人精子 SDH 酶活,进一步功能研究表明丙二酸二钠能够抑制人精子运动及获能后穿透粘性介质的能力。上述发现提示 SDH 可能在人精子运动功能调控过程中发挥至关重要的作用,有望为临床特发性男性不育症精准诊疗提供新型分子靶标。

需要指出的是,本研究仍存在以下不足之处:

1) 本研究主要依赖 SDH 药理学抑制剂丙二酸二钠探究 SDH 同人精子功能调控间的联系。然而,丙二酸二钠对人精子 SDH 酶活性抑制作用是否具有特异性,目前尚未见相关研究报道。因此,为进一步明确 SDH 在精子功能调控中的作用,后续研究需构建 *Sdh* 敲除小鼠精原(GC-1)及精母(GC-2)细胞株,同时检测基因突变细胞系同野生型之间的功能差异;2) 本研究发现丙二酸二钠能够抑制人精子 SDH 酶活性以及精子运动功能。考虑到 SDH 为连接线粒体氧化磷酸化及糖酵解过程的关键调控酶,同时线粒体能量代谢过程产生的 ATP 是维持人精子运动的重要能源物质,故未来需进一



The integrity of the sperm acrosome was evaluated by fluorescein isothiocyanate-conjugated pisum sativum agglutinin (PSA-FITC) staining; A. a typical example of PSA-FITC staining was shown, the asterisks showed acrosome-intact sperm and the arrows showed acrosome-reacted sperm; B. the percentages of acrosome-reacted sperm in each group were analysed and at least 200 sperm were assessed, the data were presented as the mean \pm standard error of mean; Differences between the control and experimental groups were determined by One-way analysis of variance; * $P < 0.05$ versus the parallel control group (scale bar: 10 μm); AR. acrosome reaction.

图 4 丙二酸二钠处理对获能人精子自发顶体反应发生率的影响

Fig 4 Impact of disodium malonate on spontaneous acrosome reaction in capacitated human sperm ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

步探究丙二酸二钠是否通过抑制 SDH 酶活性,进而干扰人精子线粒体能量代谢过程并最终损伤人精子运动。上述问题的阐明将为本团队深入理解

SDH 对人精子运动功能的作用及其机制提供重要线索,同时有望突破当下精子运动调控机制的研究瓶颈。

参考文献:

- [1] Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, *et al.* A unique view on male infertility around the globe[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1.
- [2] Skakkebaek NE, Lindahl-Jacobsen R, Levine H, *et al.* Environmental factors in declining human fertility[J]. *Nat Rev Endocrinol*. 2022, 18: 139-157. doi: 10.1038/s41574-021-00598-8.
- [3] Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility [J]. *Mitochondrion*, 2010, 10: 419-428. doi: 10.1016/j.mito.2010.05.015.
- [4] Rasheed MRHA, Tarjan G. Succinate dehydrogenase complex: an updated review[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018, 142: 1564-1570. doi: 10.5858/arpa.2017-0285-RS.
- [5] Woodhouse RM, Frolows N, Wang G, *et al.* Mitochondrial succinate dehydrogenase function is essential for sperm motility and male fertility[J]. *iScience*, 2022, 25: 105573. doi: 10.1016/j.isci.2022.105573.
- [6] Bonache S, Martínez J, Fernández M, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in succinate dehydrogenase subunits and citrate synthase genes: association results for impaired spermatogenesis[J]. *Int J Androl*, 2007, 30: 144-152. doi: 10.1111/j.1365-2605.2006.00730.x.
- [7] Tomar R, Mishra AK, Mohanty NK, *et al.* Altered expression of succinic dehydrogenase in asthenozoospermia infertile male [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 68: 486-490. doi: 10.1111/aji.12023.
- [8] 孙中明,丁彩飞,颜志中,等. 特发性弱精子症线粒体功能和超微结构研究[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87: 3. doi:10.3760/j.issn:0376-2491.2007.18.012.
- [9] Consegal M, Núñez N, Barba I, *et al.* Citric acid cycle metabolites predict infarct size in pigs submitted to transient coronary artery occlusion and treated with succinate dehydrogenase inhibitors or remote ischemic preconditioning[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4151. doi: 10.3390/ijms22084151.
- [10] Kula-Alwar D, Prag HA, Krieg T. Targeting succinate metabolism in ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2019, 140: 1968-1970. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042791.
- [11] Yang L, Mei G, Yang Y, *et al.* Hexachlorocyclohexane impairs human sperm motility by affecting lysine glutarylation and mitochondrial functions[J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 179: 113991. doi: 10.1016/j.fct.2023.113991.
- [12] Guo L, Jing J, Feng YM, *et al.* Tamoxifen is a potent antioxidant modulator for sperm quality in patients with idiopathic oligoasthenospermia[J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47: 1463-1469. doi: 10.1007/s11255-015-1065-2.
- [13] Ramalho Santos J, Varum S, Amaral S, *et al.* Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells[J]. *Hum Reprod Update*, 2009, 15: 553-572. doi: 10.1093/humupd/dmp016.
- [14] Ford WC. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12: 269-274. doi: 10.1093/humupd/dmi053.
- [15] Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, *et al.* The role of mitochondria in energy production for human sperm motility[J]. *Int J Androl*, 2012, 35: 109-124. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x.