

睾丸类器官的构建和应用研究进展

杨蕊^{1,2#} 马诗诗^{1#} 张博洋¹ 蒋道臻¹ 毛艺霏¹ 唐博^{1*} 张学明^{1*}

(¹吉林大学动物医学学院, 长春 130062; ²甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要 睾丸类器官(testicular organoids, TOs)作为一种新兴的三维(3D)体外培养模型,为模拟睾丸的细胞组成、空间结构和部分生理功能提供了创新平台。随着研究人员对精子发生机制及组织工程技术理解的不断深入,利用多种细胞来源(包括原代睾丸细胞、诱导多能干细胞等)在体外重建睾丸结构的研究已取得显著进展。TOs能够支持生精细胞的存活、增殖与分化,模拟体细胞与生精细胞间的相互作用,并具备一定的内分泌功能。该文主要评述了TOs的核心细胞构成、生物支架材料、当前应用领域及发展挑战。TOs技术不仅为基础研究解析睾丸发育和生精微环境调控提供了重要工具,也为雄性不育治疗、生殖毒性评估、珍稀物种保护及药物筛选等应用开辟了广阔前景。

关键词 睾丸; 类器官; 精子发生; 生物支架材料

Advances in Testicular Organoid Construction and Applications

YANG Rui^{1,2#}, MA Shishi^{1#}, ZHANG Boyang¹, JIANG Daozhen¹, MAO Yifei¹, TANG Bo^{1*}, ZHANG Xueming^{1*}

(¹College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

²College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract TOs (testicular organoids), as an emerging 3D (three-dimensional) *in vitro* culture model, provide an innovative platform for simulating the cellular composition, spatial structure, and partial physiological functions of the testis. With deepening understanding of spermatogenesis mechanisms and tissue engineering techniques, significant progress has been made in reconstructing testicular structure and function *in vitro* using various cell sources, including primary testicular cells and iPSCs (induced pluripotent stem cells). TOs are capable of supporting the survival, proliferation, and differentiation of spermatogenic cells, simulating the interactions between somatic cells and germ cells, and exhibiting certain endocrine functions. This review mainly discusses the core cell composition, biomaterial scaffolds, current applications, and developmental challenges of TOs. TOs technique not only serves as an essential tool for fundamental research of testicular development and the regulation of the spermatogenic microenvironment, but also opens up broad prospects for applications such as the treatment of male infertility, reproductive toxicity assessment, conservation of endangered species, and drug screening.

Keywords testis; organoids; spermatogenesis; biomaterial scaffolds

类器官(organoids)是由特定组织器官中的干细胞和其他细胞在体外培育而成的一种三维(three-dimensional, 3D)细胞培养物,其中包含多种类型细

胞的自组装。作为生命科学领域内的前沿技术之一,类器官可用于发育、内稳态、再生、疾病建模和药物研发等领域的相关研究。类器官技术可追溯

收稿日期: 2026-01-28 接受日期: 2026-03-12

吉林省科技发展计划(批准号: 20250205016GH)和国家自然科学基金(批准号: 32573319)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 0431-87835370, E-mail: tang_bo@jlu.edu.cn; Tel: 0431-87836187, E-mail: zhangxuем@jlu.edu.cn

Received: January 28, 2026 Accepted: March 12, 2026

This work was supported by the Science & Technology Development Project of Jilin Province (Grant No.20250205016GH) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32573319)

[#]These authors contributed equally to this work

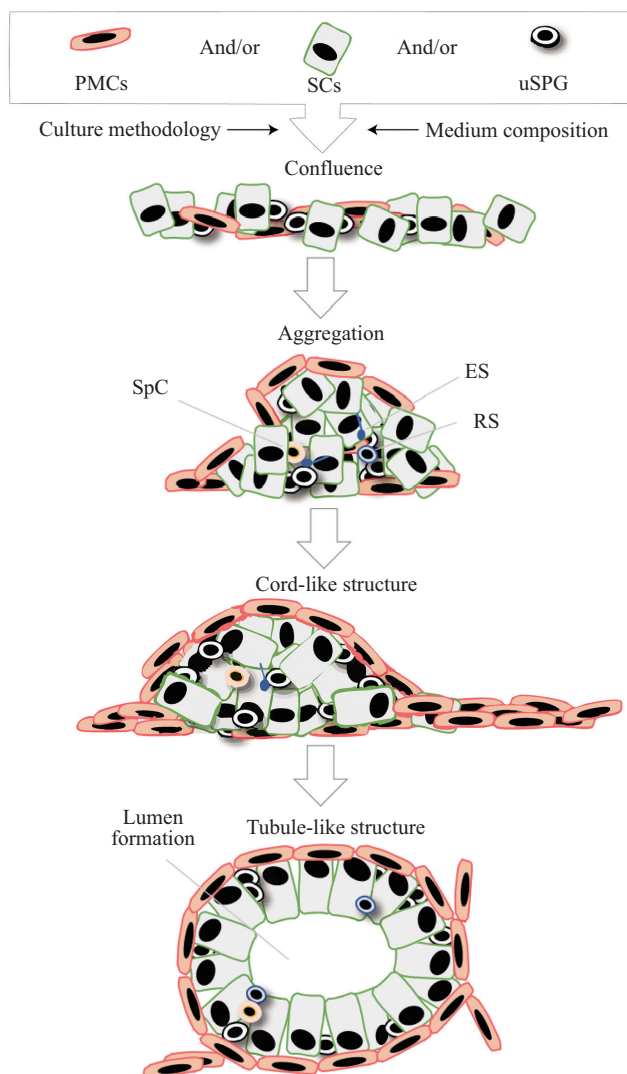
*Corresponding authors. Tel: +86-431-87835370, E-mail: tang_bo@jlu.edu.cn; Tel: +86-431-87836187, E-mail: zhangxuем@jlu.edu.cn

至20世纪初的3D组织培养, 而其作为明确技术范式的兴起则始于21世纪初, 得益于干细胞生物学与组织工程学的深度融合。2009年小肠类器官的成功构建标志着该领域进入新阶段, 随后多种器官类器官模型相继出现, 革新了相关研究范式。作为类器官技术演进的重要方向之一, 睾丸类器官(testicular organoids, TOs)是将睾丸曲细精管生精上皮中的精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)分离纯化, 再与支持细胞(Sertoli cells, SCs)、管周肌样细胞(peritubular myoid cells, PMCs)、间质细胞(Leydig cells, LCs)等睾丸体细胞以一定比例共培养, 体外自组装后形成的3D管状结构。

TOs能有效模拟睾丸的细胞组成、空间结构和

生理功能, 用于体外精子发生研究^[1](图1)。传统的二维(two-dimensional, 2D)细胞培养在模拟睾丸生理和病理过程方面存在局限性, 而通过构建包含不同发育阶段生精细胞的TOs模型, 研究人员可实时观察精子发生的动态过程, 这种新型模型不仅为研究睾丸发育和精子发生机制提供了重要工具, 还在雄性不育治疗、生殖毒性评估、珍稀濒危物种保存和药物筛选等领域展现出了广阔应用前景。

TOs的研究发展旨在克服传统2D培养和体内实验在研究生精微环境方面的局限。早期研究多集中于睾丸组织体外培养或移植, 但未能实现细胞的自组织与长期功能维持。直至2015年, 随着对睾丸细胞相互作用和细胞外基质作用的深入理解, 并结合



PMCs: 管周肌样细胞; SCs: 支持细胞; uSPG: 未分化精原细胞; ES: 延长的精子细胞; RS: 圆形精子细胞; SpC: 精母细胞。

PMCs: peritubular myoid cells; SCs: Sertoli cells; uSPG: undifferentiated spermatogonia; ES: elongated spermatids; RS: round spermatids; SpC: spermatocytes.

图1 睾丸类器官(testicular organoids, TOs)形成示意图(根据参考文献[3]修改)

Fig.1 Schematic diagram of TOs (testicular organoids) formation (modified from the reference [3])

水凝胶、基质胶、脱细胞基质等新型生物材料的应用, TOs的研究才得以系统开展。此后, 本领域的研究重点从基础模型构建, 逐步拓展至功能验证、生殖毒性评估、生育力保存等应用方向, 人们也开始探索利用诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)等新的细胞来源构建TOs。参考最新进展, 近年来我们构建了牛的TOs^[2]。本文从TOs内的核心细胞构成、常用生物支架材料以及TOs的应用和挑战等方面, 综述近年来的相关进展。

1 TOs的核心细胞构成

1.1 SSCs

精子发生依赖于睾丸体细胞与生精细胞间的相互作用, 而SSCs是生精细胞的前体细胞, 因此在构建TOs时, 必须充分考虑SSCs微环境的模拟。研究表明, 睾丸体细胞在TOs形成过程中起着主导作用, 在一定范围内调整SSCs的比例并不会影响TOs的形成^[4]。因此在TOs构建初期可适当提高SSCs比例。TOs培养体系能支持不同物种SSCs的存活、增殖和分化^[5], 即使在缺乏睾丸特异性结构的TOs中, SSCs仍能维持活性并具有增殖、分化和减数分裂的能力^[6]。另外, 相较于2D培养, 在猪TOs中SSCs等生精细胞的自噬水平显著降低, 表明3D培养体系中的SSCs等生精细胞可能更接近体内睾丸的生理状态^[4]。我们以1日龄犊牛睾丸组织为来源, 分离纯化了SSCs、SCs及LCs, 通过将三种细胞按8:1:1的比例混合共培养, 构建了荧光标记的牛TOs^[2]。

1.2 SCs

SCs是位于曲细精管生精上皮内高度特化的唯一体细胞, 对生精细胞的发育有支持、营养、保护等功能。SCs的高度增殖阶段在性成熟前, 这一阶段从胎儿期持续到出生后数周直至青春期, 具体时间长短因物种而异^[7]。相邻SCs成熟后通过跨膜蛋白形成紧密连接, 为生精细胞和精子发生提供物理保护屏障。未成熟的SCs具有较强的发育潜力, 因此常用于TOs模型的构建^[8-9]。但未成熟的SCs无法维持完整的精子发生, 还需补充特定细胞因子并延长培养时间, 使之达到成熟状态。

在目前已开发的TOs模型中, SCs通常处于部分分化状态, 尽管在TOs的SCs中已检测到紧密连接相关蛋白的表达, 但其还不能形成与体内类似的功能性紧密连接复合体及超微结构^[9-10]。在使用成熟的

SCs构建的TOs模型中, 也未发现典型的睾丸细胞结构, 这可能与成熟SCs的分化能力低有关^[10]。此外, 成熟的SCs能够通过调节视黄酸和雄激素信号通路来调控减数分裂进程^[11], 尽管TOs中的生精细胞能对视黄酸产生反应, 且TOs具备睾酮分泌能力, 但其内的SCs尚未达到成熟状态^[8-10]。对于TOs中SCs成熟状态的研究还可应用于睾丸退化造成的疾病中, 这些睾丸在生理上已经成熟, 但其SCs仍表现出未成熟特征, 如增殖能力增强、蛋白表达谱改变等^[12], 后续可通过优化培养条件在TOs培养体系中诱导这些SCs成熟。

1.3 LCs

LCs可通过旁分泌睾酮信号直接调控精子发生, 对推进减数分裂进程和生精细胞存活具有重要作用^[13]。目前, 大多数研究通过检测类固醇生成相关标记物[3 β -羟基类固醇脱氢酶(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -HSD)、细胞色素P450家族11亚家族A成员1(cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1, Cyp11a1)等]的表达证明TOs中LCs的存在。LCs在TOs中的分布存在差异, 可能位于TOs的外围、中心或随机分布^[14]。YANG等^[14]和CORTEZ等^[15]研究发现, TOs中的LCs能够产生睾酮, 感染病毒后其睾酮生成水平下降, 表明睾酮生成能力可作为评估TOs中LCs功能的重要参数。SHIMA等^[16]研究表明, 胎鼠LCs因缺乏17 β -羟基类固醇脱氢酶而无法直接生成睾酮, 需将其产物雄烯二酮转运至SCs, 由SCs完成睾酮的最终合成。因此, 若在TOs中不能维持细胞间的协作关系, 则可能会导致睾酮合成不足, 从而影响精子发生的正常进展。

LCs在不同发育阶段生成类固醇的能力不同, 其产生的多种雄激素可能会干扰TOs中激素的功能^[17]。因此在构建TOs时可能需要包含不同发育阶段的LCs, 才能更好地模拟体内微环境。另外, 在初始细胞群中加入内皮细胞来实现类器官的血管化也将成为新的研究方向, 这一策略已在脑和肾类器官中得到应用^[18-19], 但在TOs中还需进一步探究。

2 TOs常用的生物支架材料

在TOs构建中, 生物支架材料的选择至关重要, 它不仅为细胞提供3D生长空间, 还通过其物理化学特性调控细胞行为, 影响TOs的结构和功能。近年来,

多种生物材料包括天然材料(如胶原蛋白、脱细胞基质等)和合成材料(如聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚乙二醇等)被广泛应用于TOs的构建。

水凝胶的主要成分是水,由天然或合成的聚合物构成。水凝胶支架不仅为细胞黏附、生长、分化及营养交换提供了3D微环境,还为细胞提供了机械支撑并增强了细胞张力,这对细胞功能至关重要^[20]。水凝胶分为天然和合成两类,天然水凝胶含有生物成分,如胶原蛋白、琼脂糖和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等,这些成分具有生物相容性及可降解性^[21]。而合成水凝胶(例如聚乙烯)是人工构建的聚合物,具有更好的机械性能。

2.1 基质胶

基质胶(matrigel)最先是从小鼠Englebreth-Holm-Swarm肿瘤中提取的基质材料,主要成分包括层粘连蛋白(laminin, LN)、IV型胶原、巢蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白多糖等^[22]。基质胶在低温下保持液态,在37℃时发生交联形成3D支架结构^[23]。在基质胶包被的培养体系内,SCs呈现出规则的柱状排列形态,精原细胞则特异性定位于基底区域,该空间分布模式与体内睾丸生精上皮的天然结构高度相似。此外,基质胶能进一步诱导睾丸细胞自组装形成索状结构,并可支持生精细胞在体外分化至减数分裂关键阶段——粗线期精母细胞。

ALVES-LOPES等^[24]开发了一种基于三层基质胶的新型培养体系,并利用20日龄大鼠睾丸细胞成功构建了TOs。在该体系中,SCs和生精细胞形成了管状结构,并被PMCs包围,但这些PMCs似乎没有积极参与自组装的过程。这些管状结构还产生了功能性的血睾屏障(blood-testis barrier, BTB),可维持未分化生精细胞存活长达3周。另外,用视黄酸处理该体系,可介导肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)参与的炎症反应,从而导致TOs形成受损、生精细胞数量减少和BTB通透性降低,这些表征与睾丸体内实验结果相似^[25]。EDMONDS等^[8]报道了另一种小鼠睾丸细胞在基质胶中实现类器官自我组装的方法,发现了TOs体系的内分泌功能具有年龄相关性。

此外,DE MICHELE等^[26]强调了基质胶中的LN是驱动SCs重组成曲细精索的关键,其中LN-111是发挥这一作用的核心亚型。LN通过整合素依赖性信号转导,参与调节SCs和生精细胞的存活与分

化^[27]。与仅使用胶原蛋白凝胶相比,在基质胶和胶原蛋白凝胶混合培养的大鼠TOs中,能观察到更多减数分裂后的生精细胞^[28]。虽然现在基于基质胶的TOs模型仅能支持精原细胞向精母细胞或精母细胞向精子细胞的部分分化过程,但其在体外重建睾丸组织结构方面的优势已得到广泛证实。然而,鉴于基质胶来源于肿瘤组织的特性,对在该培养体系中所产生的生精细胞进行遗传分析就显得尤为重要。

2.2 软琼脂培养体系(soft agar culture system, SACS)

琼脂糖是一种从海藻中提取的天然多糖,其独特的热可逆特性使其在较高温度下呈现液态,便于与细胞充分混合,在低温条件下其则形成稳定的凝胶态,为细胞提供3D支撑结构,这一特性使琼脂糖成为构建TOs的优选材料^[29]。目前广泛应用的SACS多采用双层琼脂糖结构,即将睾丸组织或睾丸细胞与液态琼脂糖混合后,铺设在预先凝固的不同密度的底层琼脂糖上。整块琼脂糖半浸没于培养液中,形成独特的气-液交换界面。这种设计不仅确保了组织或细胞的气体交换需求,还能通过下层琼脂糖从培养液中持续获取营养^[30]。科学家们首次的气-液界面的琼脂糖上培养的小鼠睾丸组织中实现了精子发生^[31],并陆续在恒河猴^[32]等动物中开展了类似的实验。GHOLAMI等^[33]不仅在小鼠SACS中通过组织切片观察到了形态成熟的精子,还开发了改良版单层软琼脂培养体系;其研究结果表明包埋的小鼠睾丸细胞可形成细胞簇状结构,并最终可以发育为形态正常的精子。

2.3 ECM和脱细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)

ECM主要由胶原蛋白、LN、纤连蛋白和蛋白多糖等组成,其3D结构和生物活性成分对细胞黏附、增殖和分化具有重要调控作用^[34]。dECM通过脱细胞技术保留了ECM的主要成分和结构,同时降低了ECM的免疫原性,这使其成为了3D培养和生物打印的理想材料^[35]。dECM可被进一步研磨成粉末或消化处理,从而制成可溶解的dECM水凝胶,用于细胞包封或被添加到培养基中^[36]。

BAERT等^[37]用成年及青春期前人睾丸细胞构建TOs,并将其置于从成年人睾丸细胞中获取的ECM上培养,发现使用ECM和未使用ECM培养出的TOs在形态上并无差异;TOs中的SCs可产生紧密连

接蛋白,并能维持生精细胞存活长达4周;这些TOs还能分泌抑制素B、睾酮和细胞因子。由于ECM具有组织特异性,因此常用dECM替代ECM。REZAEI TOPRAGGALEH等^[38]将3~5日龄小鼠睾丸细胞接种到公羊源dECM支架上,培养15 d后,在dECM支架中形成了由LCs、SCs和SSCs组成的多细胞TOs样结构。该团队还证实,基于dECM构建的TOs具有分泌激素的功能,并能诱导SSCs分化形成精子细胞。VERMEULEN等^[15]从猪睾丸组织中提取dECM水凝胶,用于包封从4~7日龄仔猪中分离的睾丸细胞,以此构建猪TOs体系。结果显示,该TOs包含由SCs和生精细胞构成的曲细精管样结构,小管周围包围着PMCs和LCs。与基于胶原蛋白构建的TOs相比,基于dECM构建的TOs中LCs存活数更多。另外,这类器官还能分泌睾酮和干细胞因子,并含有联合复合体蛋白3(synaptonemal complex protein 3, SYCP3)阳性细胞,但随着培养时间的延长,SYCP3阳性细胞数逐渐减少。

2.4 胶原蛋白

胶原蛋白是ECM的核心结构蛋白,因此常被用于细胞的3D培养。在37 °C条件下将pH值从酸性调节至中性,可触发I型胶原蛋白的交联反应^[39]。LEE等^[28]将18日龄大鼠睾丸细胞包埋在添加/不添加基质胶的胶原蛋白凝胶中,发现无论是否添加基质胶,在培养22 d后均可观察到呈多突起的SCs,并伴有生精细胞和LCs。与2D培养体系相比,胶原蛋白凝胶支架中生精细胞的减数分裂后标记分子表达水平升高,单倍体细胞数量显著增加,表明SSCs在体外分化形成了减数分裂后的精子细胞。LEE等^[40]在此研究基础上,通过已建立的胶原蛋白凝胶体系进一步包埋了非梗阻性无精子症患者的精母细胞,结果发现鱼精蛋白2(protamine 2)阳性单倍体细胞数量显著增加,表明此培养体系可在体外成功诱导停滞期精母细胞向单倍体精子细胞分化。KULIBIN等^[41]对上述胶原蛋白培养体系进行了改良,分别包埋了4~6日龄幼鼠和8~12周龄成年小鼠的SCs,结果显示幼鼠SCs及成年小鼠SCs在胶原蛋白支架中仍具备重建睾丸管状结构的能力。

虽然胶原蛋白凝胶机械性能较弱且交联速率较慢,可能导致支架结构变形,但研究者已开发了温控条件下的化学交联和辐射交联技术^[42]来解决这一问题,而基于胶原蛋白凝胶支架能否支持完整精子

形成过程,仍需进一步深入研究。

2.5 其他生物支架材料

TOs中循环系统的缺乏可能是阻碍生精细胞在小管结构中完全分化的原因之一,而器官芯片(organ-on-a-chip, OOC)可通过微流控系统解决这个问题。在含有微流控系统的小鼠TOs中发现,精子发生的效率有所提高且持续时间有所延长^[43]。使用悬滴共培养系统构建成年男性TOs体系,将悬滴形成的细胞球接种在超低吸附培养板中继续培养,尽管使用了含有ECM成分的培养基,但体细胞(LCs和SCs)和生精细胞仍无法正确重排^[6]。静电纺丝是一种3D打印技术,其原理为在电压差的作用下,合成的聚合物溶液从喷头(纺丝头)挤出形成细小的纳米级纤维,这些纤维被收集到接地的旋转收集器上,从而形成纳米纤维静电纺丝支架。在小鼠中,已经建立了SSCs在纳米纤维静电纺丝支架上的3D培养模型。研究表明,在聚左旋乳酸或聚酰胺静电纺丝支架上,SSCs的增殖和集落形成能力显著增强。与2D培养相比,在聚左旋乳酸支架上培养的SSCs中一些干性相关基因的表达显著下调,表明聚左旋乳酸纳米纤维支架可以诱导冻存复苏后的小鼠SSCs发生分化^[44]。

3 TOs的应用

目前,TOs的应用主要体现在以下三方面(表1)。

3.1 精子发生体外模型

TOs能够整合多种细胞类型,并重现细胞间的相互作用,因此常被用作精子发生的研究模型。SADRI-ARDEKANI团队^[6]的研究结果表明,TOs能够支持SSCs向减数分裂后的生精细胞分化,从而模拟体内精子发生过程。尽管目前该团队构建的TOs中生精细胞的分化效率较低(约为0.2%),但这一发现仍具有重要意义。PRYZHKOVA等^[10]通过CRISPR-Cas9技术将荧光标记基因导入人多能干细胞和睾丸细胞中,在微型旋转生物反应器中实现了人多能干细胞来源的细胞球与人类睾丸细胞的共培养。另外,DOBRINSKI团队^[45]通过基因编辑和基因沉默技术,系统研究了SCs和Hedgehog信号通路在睾丸形态发生中的作用。其结果表明,通过基因编辑技术构建的TOs,是研究睾丸发育和精子发生机制的良好模型。

3.2 生殖毒性评估及药物筛选模型

在生殖毒性评估方面,TOs表现出显著优势。传统的生殖毒性测试主要依赖动物实验,存在种属差

异大、周期长、成本高等问题,而TOs能够避免上述问题,成为生殖毒性评估及药物筛选的理想工具。SADRI-ARDEKANI等^[6]评估了人类TOs作为潜在生殖毒性评估模型的可行性。他们将TOs暴露于四种临床相关抗有丝分裂化疗药物(白消安、顺铂、多柔比星和依托泊苷)中,结果无论在未分化还是已分化的TOs中,细胞活性均呈剂量依赖性下降,且IC₅₀值均显著高于2D培养体系。ALVES-LOPES等^[24]和OVERGAARD等^[46]开发的TOs模型则具有BTB的生理效应,能在生殖毒性评估和药物筛选实验中发挥作用。另外,NAKAMURA等^[47]在构建的TOs中用剂量递增的炔雌醇(具有睾丸毒性)处理睾丸组织,结果显示炔雌醇处理可显著降低TOs中生精细胞的数量,显现出TOs作为生殖毒性评估模型的潜力。LARA等^[4]的研究表明,在TOs模型中,环境毒物邻苯二甲酸单酯可剂量依赖性地增加猪生精细胞中自噬体的数量。ALVES-LOPES等^[24]的研究发现, TNF- α 和IL-1 α

可导致啮齿动物TOs中生精细胞存活率降低,并破坏其结构完整性,这与动物体内的观察结果高度一致。基于微流体的多器官芯片系统也为生殖细胞毒性研究提供了新的方向,该系统通过微流电路连接微型人类睾丸和肝类器官,证实了环磷酰胺的加入可激活肝类器官对毒物的代谢活性,进而导致TOs中生精细胞丢失,而这种现象在单独培养的TOs中并未观察到^[48],这表明多类器官平台能更好地模拟体内代谢特征,在药物筛选和生殖毒性评估中可能具有更高的生理相关性。

3.3 生育力体外保存模型

TOs作为恢复生育能力的工具,理想的治疗方案是以从青春期前癌症患者的睾丸组织中分离出的睾丸细胞构建TOs,以期创建一个无癌症细胞的“人工睾丸”,并在患者治愈后将其移植回体内。目前,在治疗性腺疾病前冷冻保存未成熟的睾丸组织,已在多个医学中心获得伦理认可^[49]。治疗完成后将组

表1 TOs的应用

Table 1 Application summary of TOs

应用领域 Area of application	具体应用方向 Specific application	参考文献 References
<i>In vitro</i> models of spermatogenesis	Supporting spermatogenesis: TOs supported SSC differentiation towards post-meiotic spermatogenic cells	[6]
	Combined with stem cell techniques: CRISPR-Cas9 gene editing were utilized to label cells, enabling co-culture of human pluripotent stem cells and testicular cells in bioreactors for developmental studies	[10]
	Signaling pathways and testicular morphogenesis: the roles of pathways like SCs and Hedgehog in testicular morphogenesis were investigated	[45]
Reproductive toxicity and drug screening models	Evaluating chemotherapeutic toxicity: treatments with busulfan, cisplatin, etc., led to dose-dependent decreases of TOs cell viability, with higher IC ₅₀ values than those in 2D culture systems, indicating greater physiological relevance	[6]
	Simulating BTB: specific TOs exhibited physiological BTB functions, which is applicable for toxicology and drug screening	[24,46]
	Testing environmental toxins and endocrine disruptors: phthalates increased spermatogenic autophagy in a dose-dependent manner; ethinylestradiol treatment significantly reduced spermatogenic cell numbers in TOs	[4,47]
	Application of multi-organ chip systems: liver organoids were connected with TOs via microfluidic circuits to study the testicular toxicity of cyclophosphamide after hepatic metabolic activation	[48]
<i>In vitro</i> models of fertility preservation	Testicular tissue cryopreservation: immature testicular tissue was cryopreserved before cancer chemotherapy to preserve male fertility	[49]
	Autologous transplantation: in primate models, sperms derived from autologous transplantation of cryopreserved testicular tissues resulted in healthy offspring via intracytoplasmic sperm injection	[50]
	Construction of “cancer-free TOs”: healthy cells were isolated from cancer patients to construct “cancer-free TOs” for transplantation, mitigating the risks of cancer recurrence	[51]

TOs: 睾丸类器官; SSCs: 精原干细胞; SCs: 支持细胞; BTB: 血睾屏障。

TOs: testicular organoids; SSCs: spermatogonial stem cells; SCs: Sertoli cells; BTB: blood-testis barrier.

织自体移植回患者体内是恢复其生育能力的有效方法。FAYOMI等^[50]使用自体移植来源的精子进行单精子显微注射,成功培育出了健康小猴,该结果验证了这一概念的可行性。但在患有白血病的青春期前男性中,高达21%的病例可能出现睾丸细胞恶性浸润^[51]。因此,在类器官构建之前,可通过细胞分选技术或特定培养方案消除癌细胞,从而降低癌细胞重新引入的风险。一旦这些方案的安全性和有效性得到验证,利用无癌细胞构建的类器官进行移植治疗,将成为新的临床应用方向。

4 TOs研究的局限性

4.1 细胞来源受限

大多数TOs建立都采用从新鲜或冷冻保存组织中提取原代细胞的方法。但人和濒危野生动物新鲜睾丸组织的获取面临诸多限制,如伦理问题、样本获取困难、供体年龄和健康状况等。此外,这些原代细胞的体外扩增能力有限,难以满足大规模实验需求,这些限制严重阻碍了相关物种TOs的开发与应用。针对这些问题,iPSCs表现出了巨大潜力。iPSCs具有多向分化潜能,可在体外分化为生殖细胞、SCs和LCs等多种睾丸细胞类型,这一特性已在小鼠和人类模型中得以验证。然而,iPSCs的全面应用面临安全性问题,如基因改造过程中存在致癌风险和多能性重编程的不稳定。为降低这些风险,目前已研究出非整合病毒载体和质粒载体等方法减少病毒或质粒带来的潜在危险。尽管目前尚未报道直接利用iPSCs构建TOs的研究,但其自我更新和分化潜能为其作为细胞来源的TOs构建提供了理论依据。另外,PENDERGRAFT等^[6]将人类原代生精细胞和永生化处理后的SCs、LCs混合构建TOs培养体系,但由于这些细胞来源于成年患者且经过永生化处理,因此难以确定模型中睾丸细胞结构缺失的具体原因,所以选择永生细胞还是原代细胞进行TOs构建也是需要考虑的问题之一。

4.2 缺乏血管结构

血管系统在胚胎睾丸发育形成曲细精索的过程中也扮演着重要角色,SSCs微环境功能的发挥也依赖于邻近血管的支持^[52]。有理论提出,迁移的血管内皮细胞是通过信号转导引导曲细精索的形成^[53],即曲细精索的分布可能是遵循着血管的分布模式。然而,目前报道的类器官培养体系均缺乏血管结构,

使得这一理论难以得到验证。在肝脏类器官中,科学家们已在胶原支架和基质胶支架^[54]中成功构建了血管网络。科学家们还可进一步优化支架的多孔结构以促进类器官血管化,160~270 μm的孔径能够有效促进内皮细胞在支架中分布和迁移^[55]。因此,若能将体外血管形成技术应用到TOs的培养体系中,则有望实现血管化TOs的开发,为TOs的功能完善提供新的解决方案。

5 结语

TOs是一种新兴的3D培养模型,目前,在人和啮齿动物中已能构建出具有睾丸特征和功能的TOs模型,其在揭示精子发生机制、研究雄性不育、保存濒危物种和评估生殖毒性等方面展现出巨大潜力。然而,在人、濒危动物及大动物(如牛等)TOs的构建和应用中,国内外尚处于起步阶段,仍面临很多挑战,主要体现在细胞来源受限、缺乏血管结构、模型的生理功能不完整等方面。特别是在大动物中,TOs模型构建技术、培养条件优化及相关机制阐明等仍存在大量空白。我们认为,为解决以上问题,可在细胞来源上,通过建立各物种的iPSCs并将其定向分化为睾丸细胞,或采用原代细胞条件性永生策略,从而打破细胞获取限制;在结构功能上,引入内皮细胞共培养与微流控器官芯片技术,构建血管化结构以提升物质交换与功能维持水平;在模型优化上,通过完善细胞组成、精细调控激素与生长因子时序,并利用睾丸脱细胞外基质技术构建仿生支架以支持完整的生精过程;同时应建立TOs的标准化构建与表征体系,开展生精调控机制解析、繁殖障碍疾病建模及生殖安全评价等应用研究,从而系统推进TOs领域的发展。TOs模型技术的运用有望突破啮齿动物模型的生理限制,建立适用于大型哺乳动物的生殖生物学新理论框架,推动跨物种生殖机制的共性研究,推动动物育种与濒危物种保护技术的创新,并为人类男性不育诊疗提供新的研究路径。

参考文献 (References)

- [1] 陈澜歆,杨蕊,张博洋,等.哺乳动物体外配子发生研究进展[J].中国细胞生物学学报(CHEN L X, YANG R, ZHANG B Y, et al. Research progress on *in vitro* gametogenesis in mammals [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2022, 44(12): 2386-93.
- [2] 杨蕊.基于睾丸类器官研究LAMA1对牛生精微环境的影响[D].长春:吉林大学,2025.
- [3] RICHER G, BAERT Y, GOOSSENS E. *In-vitro* spermatogenesis

- through testis modelling: toward the generation of testicular organoids [J]. *Andrology*, 2020, 8(4): 879-91.
- [4] LARA N L E M, SAKIB S, DOBRINSKI I. Regulation of cell types within testicular organoids [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(4): bqab033.
- [5] STUKENBORG J B. The use of testicular organoids in advancing future treatments for male factor infertility [J]. *Fertil Steril*, 2025, 124(3): 406-16.
- [6] PENDERGRAFT S S, SADRI-ARDEKANI H, ATALA A, et al. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2017, 96(3): 720-32.
- [7] ELDESOKY S M M, HUSSEIN M M, ABDEL-MAKSOU D F M. Dynamics of the posthatching testicular development in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*): histological and ultrastructural study [J]. *Microsc Microanal*, 2025, 31(2): ozaf012.
- [8] EDMONDS M E, WOODRUFF T K. Testicular organoid formation is a property of immature somatic cells, which self-assemble and exhibit long-term hormone-responsive endocrine function [J]. *Biofabrication*, 2020, 12(4): 45002.
- [9] RICHER G, GOYVAERTS C, MARCHANDISE L, et al. Spermatogenesis in mouse testicular organoids with testis-specific architecture, improved germ cell survival and testosterone production [J]. *Biofabrication*, 2024, doi: 10.1088/1758-5090/ad618f.
- [10] PRYZHKOVA M V, JORDAN P W. Adaptation of human testicular niche cells for pluripotent stem cell and testis development research [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2020, 17(2): 223-35.
- [11] MAROTO M A, TORVISCO S N, GARCÍA-MERINO C, et al. Mechanisms of hormonal, genetic, and temperature regulation of germ cell proliferation, differentiation, and death during spermatogenesis [J]. *Biomolecules*, 2025, 15(4): 500.
- [12] WANKANIT S, ELZAIAT M V, TALOUARN E, et al. Bilateral testicular regression syndrome and optic nerve atrophy: clinical aspects of a child with a SEMA3E loss-of-function variant [J]. *Sex Dev*, 2025, 19(1/2/3/4/5/6): 75-80.
- [13] YU J J, YANG C F, GUO Y, et al. Tracing the origin of testosterone-producing Leydig cells during pubertal development, homeostasis, and regeneration [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(12): 116674.
- [14] YANG W, ZHANG C, WU Y H, et al. Mice 3D testicular organoid system as a novel tool to study Zika virus pathogenesis [J]. *Virol Sin*, 2023, 38(1): 66-74.
- [15] CORTEZ J, TORRES C G, PARRAGUEZ V C H, et al. Bovine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells self-assemble with testicular cells and integrates and modifies the structure of a testicular organoids [J]. *Theriogenology*, 2024, 215: 259-71.
- [16] SHIMA Y, MOROHASHI K I. Leydig progenitor cells in fetal testis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 445: 55-64.
- [17] TRAVICIC D Z, MILJKOVIC D, ANDRIC S A, et al. Circadian disruption impairs Leydig cell maturation and reproductive development in male rats [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2025, 23(1): 104.
- [18] PARK I H. Generation of brain organoids to study human brain development and diseases [J]. *IBRO Neurosci Rep*, 2023, 15: S48.
- [19] DORISON A, FORBES T A, LITTLE M H. What can we learn from kidney organoids [J]? *Kidney Int*, 2022, 102(5): 1013-29.
- [20] FENG Y C, HE D Y, AN X. Hydrogel innovations for 3D organoid culture [J]. *Biomed Mater*, 2025, doi: 10.1088/1748-605X/add82d.
- [21] CHO Y, YOU J, LEE J H. Natural polymer-based hydrogel platforms for organoid and microphysiological systems: mechanistic insights and translational perspectives [J]. *Polymers*, 2025, 17(15): 2109.
- [22] JIAO C B, KARAKAYA O F, DADGAR N, et al. Mastering organoid growth: a complete guide to overcoming methodological challenges [J]. *MedComm*, 2026, 7(1): e70571.
- [23] KAUR S, KAUR I, RAWAL P, et al. Non-matrigel scaffolds for organoid cultures [J]. *Cancer Lett*, 2021, 504: 58-66.
- [24] ALVES-LOPES J O P, SÖDER O, STUKENBORG J B. Testicular organoid generation by a novel *in vitro* three-layer gradient system [J]. *Biomaterials*, 2017, 130: 76-89.
- [25] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI H, MOHAQIQ M, et al. The role of different compounds on the integrity of blood-testis barrier: a concise review based on *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Gene*, 2021, 780: 145531.
- [26] DE MICHELE F, POELS J, WEERENS L, et al. Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(1): 32-45.
- [27] CUI X R, LIU H F, LIU Y T, et al. Tissue-specific decellularized extracellular matrix rich in collagen, glycoproteins, and proteoglycans and its applications in advanced organoid engineering: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 315: 144469.
- [28] LEE J H, KIM H J, KIM H, et al. *In vitro* spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(14): 2845-53.
- [29] RASTIN H, ABOUSALMAN-REZVANI Z. 3D bioprinting of alginate for cancer therapy: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 320: 145494.
- [30] JABARI A, SADIGHI GILANI M A, KORUJI M, et al. Three-dimensional co-culture of human spermatogonial stem cells with Sertoli cells in soft agar culture system supplemented by growth factors and Laminin [J]. *Acta Histochem*, 2020, 122(5): 151572.
- [31] SATO T, KATAGIRI K, KOJIMA K, et al. *In vitro* spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130171.
- [32] HULEIHEL M, NOURASHRAFEDDIN S, PLANT T M. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) [J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(6): 972-80.
- [33] GHOLAMI K, POURMAND G, KORUJI M, et al. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 249.
- [34] CHAUDHURI O, COOPER-WHITE J, JANMEY P A, et al. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour [J]. *Nature*, 2020, 584(7822): 535-46.
- [35] BROWN M, ZHU S, TAYLOR L, et al. Unraveling the relevance of tissue-specific decellularized extracellular matrix hydrogels for vocal fold regenerative biomaterials: a comprehensive proteomic and *in vitro* study [J]. *Adv Nanobiomed Res*, 2023, 3(4): 2200095.
- [36] LAUDE M, KOLLIPOULOS V, MIKOS A G, et al. Extracellular-matrix-based materials from decellularized tissue: opportunities, challenges, and future directions in regenerative medicine [J].

- Adv Healthc Mater, 2026, 15(1): e02107.
- [37] BAERT Y, DE KOCK J, ALVES-LOPES J O P, et al. Primary human testicular cells self-organize into organoids with testicular properties [J]. Stem Cell Rep, 2017, 8(1): 30-8.
- [38] REZAEI TOPRAGGALEH T, REZAZADEH VALOJERDI M, MONTAZERI L, et al. A testis-derived macroporous 3D scaffold as a platform for the generation of mouse testicular organoids [J]. Biomater Sci, 2019, 7(4): 1422-36.
- [39] BÉDUER A L, GENTA M, KUNZ N, et al. Design of an elastic porous injectable biomaterial for tissue regeneration and volume retention [J]. Acta Biomater, 2022, 142: 73-84.
- [40] LEE J H, GYE M C, CHOI K W, et al. *In vitro* differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix [J]. Fertil Steril, 2007, 87(4): 824-33.
- [41] KULIBIN A Y, MALOLINA E A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture [J]. Reproduction, 2016, 152(4): 271-81.
- [42] WENG H J, DECARLI M C, CHEN W, et al. Engineering bioactive fibrous constructs: bioprinting stem cell-laden collagen-derived hydrogels with short collagen microfibers [J]. Biomaterials, 2026, 329: 123965.
- [43] KALTSAS A, KYRGIAFINI M R A A, MARKOU E, et al. Artificial gametogenesis and *in vitro* spermatogenesis: emerging strategies for the treatment of male infertility [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(15): 7383.
- [44] SHAMS A, ESLAHI N, MOVAHEDIN M, et al. Future of spermatogonial stem cell culture: application of nanofiber scaffolds [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2017, 12(7): 544-53.
- [45] GOLDSMITH T M, SAKIB S, WEBSTER D, et al. A reduction of primary cilia but not hedgehog signaling disrupts morphogenesis in testicular organoids [J]. Cell Tissue Res, 2020, 380(1): 191-200.
- [46] OVERGAARD N H, PRINCIPE D R, JAKOBSEN J T, et al. Immunological characterization of the Oncopig model and detection of cell-mediated immune responses to cancer [J]. Cancer Res, 2017, doi:10.1158/1538-7445.AM2017-1659.
- [47] NAKAMURA N, SLOPER D T, DEL VALLE P L. Evaluation of an *in vitro* mouse testis organ culture system for assessing male reproductive toxicity [J]. Birth Defects Res, 2019, 111(2): 70-7.
- [48] BAERT Y, RUETSCHLE I, COOLS W, et al. A multi-organ-chip co-culture of liver and testis equivalents: a first step toward a systemic male reprotoxicity model [J]. Hum Reprod, 2020, 35(5): 1029-44.
- [49] STOUT M A, HANNICK J H, CORONA L E. Fertility preservation in pediatric cancer patients [J]. Urology, 2025, 205: 152-9.
- [50] FAYOMI A P, PETERS K, SUKHWANI M, et al. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring [J]. Science, 2019, 363(6433): 1314-9.
- [51] NGUYEN H T K, TERAO M A, GREEN D M, et al. Testicular involvement of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: diagnosis, biology, and management [J]. Cancer, 2021, 127(17): 3067-81.
- [52] SADEK A, KHRAMTSOVA Y, YUSHKOV B. Mast cells as a component of spermatogonial stem cells' microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(23): 13177.
- [53] PIPREK R P, KLOC M, TASSAN J P E R, et al. Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix [J]. Dev Biol, 2017, 432(2): 298-310.
- [54] LI J Z, CHU J, LUI V C H, et al. Bioengineering liver organoids for diseases modelling and transplantation [J]. Bioengineering, 2022, 9(12): 796.
- [55] XIA P, LUO Y X. Vascularization in tissue engineering: the architecture cues of pores in scaffolds [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2022, 110(5): 1206-14.