

DOI: 10.13376/j.cblls/2023056

文章编号: 1004-0374(2023)04-0480-06

## 睾丸巨噬细胞的研究进展

李斯特, 唐玉玲, 张依量, 王 进, 武文卿, 邱业峰\*

(军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071)

**摘要:** 睾丸作为重要的男性生殖器官, 具有复杂的生殖 - 内分泌 - 免疫调控网路。睾丸巨噬细胞在血管形成、精子发生、类固醇激素生成、免疫抑制和细菌病毒感染等方面有着非常重要的作用。本文通过综述睾丸巨噬细胞的定位、分类、发育来源以及功能等来说明其在睾丸中的地位及意义, 以期研究睾丸巨噬细胞的功能和治疗男性不育症、睾丸炎症等提供理论依据。

**关键词:** 睾丸; 巨噬细胞; 组织稳态; 巨噬细胞亚群

**中图分类号:** Q25; Q492.4 **文献标志码:** A

### Research progress of testicular macrophages

LI Si-Te, TANG Yu-Ling, ZHANG Yi-Liang, WANG Jin, WU Wen-Qing, QIU Ye-Feng\*

(Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Science, Beijing 100071, China)

**Abstract:** As an important male reproductive organ, testis has a complex reproductive endocrine immune regulatory network. Testicular macrophages play an important role in angiogenesis, spermatogenesis, testosterone production, immunosuppression, and bacterial/viral infection. In this review, we discuss the location, classification, developmental sources, and functions of testicular macrophages to explain their status and significance in testis, providing a theoretical basis for the study of the function of testicular macrophages and the treatment of male infertility and orchitis.

**Key words:** testis; macrophage; tissue homeostasis; macrophage subpopulation

长期定居在组织器官的巨噬细胞被称为组织驻留巨噬细胞, 它们独立于外周循环, 具有一定的自我更新能力。驻留巨噬细胞不仅具有巨噬细胞基本的免疫功能, 而且具有协助组织重塑、维持组织器官微环境稳态<sup>[1-2]</sup>、维护组织器官异质性<sup>[3]</sup>的非免疫功能。在睾丸中, 最丰富的免疫细胞是巨噬细胞, 被称为睾丸巨噬细胞 (testicular macrophage, tMΦ)。除了具有经典的巨噬细胞功能, 如稳态维持、组织重塑以及病原体吞噬外, tMΦ还具有其他功能, 如调节睾丸发育、类固醇发生、精子生成和视黄酸合成等<sup>[4]</sup>。本文主要总结现有的关于 tMΦ 在睾丸中的亚群分类、位置分布、发育起源以及它在睾丸中作用的研究进展, 以加深对男性生殖功能调节的认识, 为男性生殖疾病的预防和治疗提供研究基础。

### 1 tMΦ在睾丸中的定位、分类及来源

在睾丸中, tMΦ 发挥各项功能与其起源和细胞定位有关, 不同起源、不同细胞定位的巨噬细胞在响应睾丸中微环境稳态或遇炎症时的表型和功能有所区别<sup>[5]</sup>。

#### 1.1 tMΦ在睾丸中的定位

睾丸是一种免疫特权器官<sup>[1]</sup>。成年哺乳动物的睾丸结构高度有序且复杂 (图 1<sup>[6-7]</sup>), 它由两个不同的区域组成: 曲细精管和间质空间。曲细精管高度卷曲, 起源和终止于睾丸网, 是精子发生的场所。

收稿日期: 2022-10-13; 修回日期: 2022-11-25

基金项目: 军队实验动物专项科研课题(SYDW\_KY [2021]08号)

\*通信作者: E-mail: qiuyefeng2001@163.com

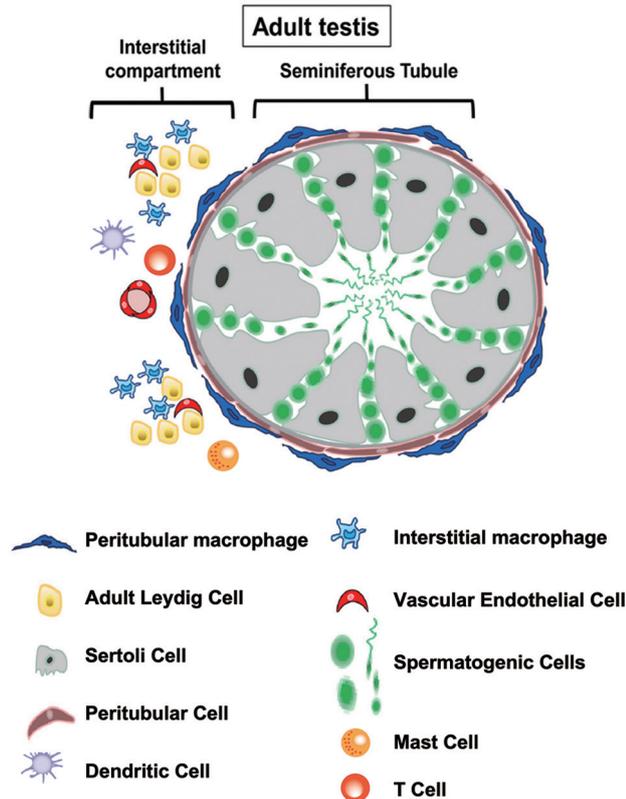


图1 睾丸结构示意图<sup>[6-7]</sup>

间质是睾丸抵御血液病原体的第一道防线,也是间质细胞产生雄激素的场所。tMΦ由两种细胞亚群组成,根据它们分布的位置不同,可以分为间质巨噬细胞和管周巨噬细胞。利用免疫组化、免疫荧光<sup>[8-9]</sup>等细胞定位实验确定了管周巨噬细胞主要在曲细精管周围,定位于紧邻精原细胞前体的肌样层,而间质巨噬细胞位于间质间隙,与间质细胞密切接触<sup>[9-10]</sup>。

### 1.2 tMΦ亚群分类

在稳态条件下,大多数tMΦ表达核心巨噬细胞标志物F4/80、CD11b、AIF和CX3CR1,但也有像MCSFR、CD64、MHCII和CD206等这些表面标记物上的差异表达。这些差异表达的表面标记物不仅有助于通过流式细胞术区分睾丸巨噬细胞的亚型,并且在一定程度上与睾丸中巨噬细胞的空间分布相关<sup>[11]</sup>。2022年,Gayer等<sup>[11]</sup>利用共聚焦显微镜和成像流式细胞仪技术,通过在数千个细胞上表面标记物的差异性表达来量化空间信息,进而评估tMΦ亚群的形状异同。根据测量面积、细胞对比度以及内吞作用分析显示,间质巨噬细胞比管周巨噬细胞大50%左右,但内吞作用和对比度低于管周巨噬细胞,说明tMΦ的内分泌能力存在差异,间质巨噬细胞的复杂性低。综上所述,间质巨噬细胞

和管周巨噬细胞具有不同的表面标记物表达、空间分布和细胞形态与功能<sup>[11]</sup>。

间质巨噬细胞呈圆形,流式定义为MCSFR<sup>+</sup>CD64<sup>hi</sup>MHCII<sup>+</sup>CD206<sup>hi</sup><sup>[8-9]</sup>,是出生时唯一存在的巨噬细胞亚群。它们高表达免疫抑制相关基因,即IL-10和Marco。间质巨噬细胞支持间质细胞功能,促进睾丸激素的产生,并清除血管中的多种物质。相比之下,管周巨噬细胞呈拉长形态,流式定义为MCSFR<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup>MHCII<sup>+</sup>CD206<sup>lo</sup><sup>[10]</sup>,在出生后2周出现,定植于空生态位,青春期精子发生时数量开始增加,逐渐替换掉CD64<sup>hi</sup>MHCII<sup>+</sup>巨噬细胞亚群<sup>[12]</sup>。管周tMΦ高表达抗原呈递的相关基因,如编码MHCII的基因——*H2Dmb*、*H2Eb1*和*H2K1*<sup>[5]</sup>。管周巨噬细胞在免疫耐受和精子生成中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。

### 1.3 睾丸巨噬细胞的来源

器官中的组织驻留巨噬细胞基本上起源于三种不同的造血来源:卵黄囊<sup>[10]</sup>、胎肝<sup>[13]</sup>和骨髓中的造血干细胞<sup>[14]</sup>。在许多器官中,巨噬细胞在胚胎发生和出生后以连续波的形式定植。在成年小鼠中,只有脑小胶质细胞是从早期卵黄囊巨噬细胞中分离出来的,而在皮肤、肺脏、肝脏和心脏等器官中巨噬细胞是双重来源的,既有卵黄囊又有胎肝来源,这些巨噬细胞寿命长,且具有自我更新能力<sup>[15]</sup>。除此之外,肠道、真皮的巨噬细胞则是骨髓来源的单核细胞,不断地由血液循环中的单核细胞补充,寿命短<sup>[16]</sup>。

目前关于tMΦ的来源尚不清楚,tMΦ的起源大致可以分成两种观点。一种是Mossadegh-Keller等<sup>[8]</sup>通过谱系追踪模型和过继转移模型的研究证明间质巨噬细胞是卵黄囊来源的,而管周巨噬细胞出现在出生后2周,完全来自血液单核细胞。胚胎来源的巨噬细胞在出生后仍然存在于小鼠睾丸中,但仅限于间质tMΦ,其数量随着年龄增长而下降。间质巨噬细胞通过骨髓衍生细胞的补充得到部分补偿,另一部分可能是在出生后早期由胎肝来源的细胞进行补充。

而另一种是Wang等<sup>[17]</sup>通过免疫表型分析、命运图谱、联体共生和骨髓移植等实验得出的观点:tMΦ都来自原始卵黄囊,随后是胎肝,最后来自新生骨髓衍生细胞。一旦在生态位中建立,tMΦ就可以长时间自我维持,无需从血液单核细胞中补充。与此相似的是,Lokka等<sup>[10]</sup>使用细胞命运图谱、巨噬细胞耗竭实验和质谱流式等得出结论:间质巨噬细胞主要来自卵黄囊和胎肝的前体,而管周巨噬细胞

胞在出生时就已经从胚胎前体中产生。即使在全身性巨噬细胞耗竭后,骨髓来源的单核细胞也不会对睾丸巨噬细胞池的补充做出实质性贡献。

## 2 巨噬细胞在睾丸中的功能

tM $\Phi$  可以在发育和成年期间执行多种功能: (1) 调节胚胎期睾丸血管形成和血管重塑<sup>[18]</sup>; (2) 促进类固醇激素生成<sup>[19-20]</sup>; (3) 支持间质细胞功能, 协助精原细胞分化、精子发生<sup>[9-10]</sup>; (4) 维持睾丸中的免疫抑制环境<sup>[21]</sup>; (5) 摄取病原体 and 凋亡细胞, 消退炎症<sup>[22]</sup>。

### 2.1 巨噬细胞在睾丸血管形成中的作用

在胚胎期 E11.5 和 E13.5 之间, 睾丸发生广泛的血管重塑和新生血管形成, 性腺 - 中肾区的巨噬细胞数量增加。巨噬细胞, 尤其是在胚胎发生过程中表现出 M2 表型的巨噬细胞, 可以在器官发生过程中以 VEGFA (血管内皮生长因子 A) 依赖或非依赖的方式调节血管系统的重塑<sup>[18]</sup>。巨噬细胞耗竭则导致血管系统紊乱和睾丸索异常, 同时巨噬细胞可以积极塑造胎儿肾中的血管结构<sup>[23]</sup>, 说明巨噬细胞介导血管重塑对胎儿器官发生至关重要。此外, 在器官培养实验中, 睾丸血管系统的缺失导致胎儿性腺巨噬细胞大量减少, 这表明胎儿睾丸的血管化可能也是巨噬细胞迁移和维持的关键<sup>[18]</sup>。

### 2.2 睾丸巨噬细胞在支持间质细胞再生和分泌类固醇激素中的作用

巨噬细胞在睾丸间质细胞的再生中起着关键作用。特异性消耗巨噬细胞的研究显示, tM $\Phi$  对睾丸间质细胞增殖和分化有直接影响。睾丸间质中的间质细胞分泌类固醇激素, 它对维持精子生成和男性生育能力至关重要<sup>[24]</sup>。巨噬细胞是间质中仅次于间质细胞的第二大细胞群, 平均每 4 个间质细胞中就有 1 个巨噬细胞。在出生后发育过程中, 巨噬细胞通过形成胞质凹陷与间质细胞的指状突起进行密切的细胞间接触, 从而有效地在巨噬细胞和间质细胞之间传递细胞因子<sup>[25]</sup>。

tM $\Phi$  具有能够刺激睾丸间质细胞生成类固醇激素的独特能力。tM $\Phi$  分泌 25-羟基胆固醇, 经过 25-羟化酶催化可被邻近的睾丸间质细胞转化为类固醇激素。当巨噬细胞耗尽后, 类固醇激素水平下降。此外, 类固醇激素通过抑制 25-羟化酶 mRNA 的转录来抑制 25-羟基胆固醇的表达, 这表明 tM $\Phi$  与间质细胞之间存在相互作用<sup>[26]</sup>。tM $\Phi$  在间质细胞分化中具有营养功能, 在生产后睾丸成熟期间,

没有巨噬细胞的情况下, 间质细胞不发生增殖, 间充质干细胞也无法分化为间质细胞。但在成年期, 耗尽睾丸巨噬细胞对间质细胞的数量则没有影响, 说明睾丸巨噬细胞对于维持成年间质细胞数量稳态并不重要<sup>[20]</sup>。

### 2.3 睾丸巨噬细胞在精子发生中的作用

精原干细胞 (SSC) 可以在体内外自我更新, 或者分化成精子。SSC 正常的自我更新和分化分裂有利于提高生育能力。相反, 若自我更新或分化缺陷则会导致精子耗竭和不育<sup>[27]</sup>。精子生成是一个复杂的过程, 受内分泌和旁分泌 / 自分泌因子的调节。tM $\Phi$  分泌细胞因子 M-CSF 可以直接刺激 SSC 的增殖<sup>[28]</sup>; 消融 tM $\Phi$ , 则 M-CSF 表达失调, SSC 增殖减弱<sup>[9, 29]</sup>。

精子发生也受到视黄酸 (RA) 的调节, RA 促进精原细胞分化和减数分裂启动<sup>[30]</sup>。通过饮食方式、抑制剂或生物合成途径中酶失活来消耗 RA, 导致未分化阶段的精子发生停滞<sup>[31]</sup>。RA 合成途径中的两个关键酶 ALDH1A2 (RALDH2) 和 RDH10 在 tM $\Phi$  中表达, ALDH1A2 在间质巨噬细胞和管周巨噬细胞中表达, RDH10 在间质细胞和成年小鼠管周巨噬细胞中表达。巨噬细胞耗竭导致睾丸间质细胞中 ALDH1A2 表达减少, 而在间质和管周间隙中 RDH10 几乎没有表达, 表明 tM $\Phi$  可能是通过 RA 的产生影响精子发生<sup>[9]</sup>。

邻苯二甲酸单 (2-乙基己基) 酯 (MEHP) 是一种内分泌干扰化学物质, 人类暴露于 MEHP 会导致精子质量下降, 生育能力和生殖功能减弱<sup>[32]</sup>。用 MEHP 处理后, 小鼠精子数量下降, 进而导致管周巨噬细胞被大量招募到曲细精管表面, 同时未分化和分化早期的精子数量也出现增长, 表明管周巨噬细胞在睾丸损伤精子大量流失时, 能刺激精子分化来取代丢失精子<sup>[33]</sup>。

### 2.4 睾丸巨噬细胞在免疫抑制中的作用

精子发生完成于机体免疫系统建立之后, 在这一过程中, 新发育的精子及其祖细胞具有高度的免疫原性, 需要保护其免受自身免疫攻击, 保持男性生育能力。由于曲细精管 (包括支持细胞紧密连接) 的物理屏障不能完全屏蔽, 睾丸中的免疫特权也由免疫抑制环境维持, 该环境在很大程度上依赖于 tM $\Phi$  不同的极化状态<sup>[34]</sup>。

巨噬细胞呈现不同极化状态, 包括高表达抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  为特征的 M2 型免疫抑制极化。在炎症刺激或感染时, 组织内的巨噬细胞通常会极化为典型的激活 M1 型, 其特征为高水平的

促炎细胞因子表达, 如 IL-12、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ 。与肝脏、骨髓来源或腹腔巨噬细胞相比, LPS 和 INF- $\gamma$  的刺激不会导致 tM $\Phi$  经典的 M1 型极化, 但会增加免疫抑制相关的细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 的表达。此外, IL-4 的刺激通常会导致巨噬细胞向 M2 型交替极化, 导致睾丸巨噬细胞中 IL-10 分泌增加<sup>[35]</sup>。因此, 当受到炎症刺激时, tM $\Phi$  不会激活 M1 型的极化, 而是向 M2 型方向极化, 显示出独特的针对 tM $\Phi$  的免疫抑制特性。

与 MHCII<sup>+</sup> 表面标记物表达谱一致, 管周巨噬细胞也高表达调节抗原处理和呈递的基因, 如 *H2.Dmb*、*H2.Eb1*、*Nlrp3*、*H2.K1* 和 *Icam1*<sup>[8]</sup>, 而间质巨噬细胞则不表达。管周巨噬细胞也可以耐受减数分裂生殖细胞的自身抗原, 这些抗原在精子受精过程中释放, 其中一部分可以通过支持细胞的精管屏障<sup>[36]</sup>。由于生精小管周围巨噬细胞的解剖位置接近, 可能使它们能够吞噬这些抗原, 而 MHCII 的高表达可能与自身抗原呈递给调节性 T 细胞有关。

睾丸中的两群巨噬细胞在维持免疫特权方面发挥着不同但互补的作用。这两个群体表现出高度相似的基因表达谱, 即不表达促炎基因, 但却都表达大量免疫抑制和替代 M2 型基因<sup>[37]</sup>。然而, 也有一些基因受到差异性调控。例如, 间质 tM $\Phi$  群高表达 IL-10、MCSF 和 Marco (一种具有胶原结构的巨噬细胞受体) 以维持免疫抑制状态, 管周巨噬细胞耐受抗原呈递依赖于特异性调节抗原处理和呈递的基因的表达, 以及吞噬精子形成的自身抗原。

2021 年的研究表明, 睾丸巨噬细胞免疫抑制功能的调节机制与 S100A9 (一种 Ca<sup>2+</sup> 结合蛋白, 主要来自巨噬细胞) 有关, 它通过激活 PI3K/Akt 通路, 促进骨髓源性巨噬细胞从 M0 向 M2 方向极化, 增加 IL-10 和 TGF- $\beta$  的 mRNA 表达, 维持巨噬细胞的免疫抑制功能<sup>[38]</sup>。

### 2.5 睾丸巨噬细胞在感染和炎症中的作用

全球约有 7% 的男性患有不育症, 男性生殖道的感染和炎症是导致男性不育症的重要原因<sup>[39]</sup>。白细胞的流入以及随之而来对睾丸体细胞和生殖细胞的损伤阻碍了精子发生、类固醇生成, 最终阻碍了生育能力<sup>[40]</sup>。睾丸炎症主要是由细菌 (大肠杆菌和克雷伯菌属) 或病毒感染 (HIV-1、寨卡病毒和腮腺炎原红疹病毒) 引发, 而由自身免疫或化学细胞毒性引起的无菌性炎症相对少见<sup>[22]</sup>。以寨卡病毒 (ZIKV) 为例, ZIKV 感染后可在感染患者的精液中持续长达 141 天, 导致睾丸损伤和男性不育症, 且

存在性传播风险<sup>[41]</sup>。

在男性中, 细菌可以通过管腔感染到达睾丸<sup>[40]</sup>, 而病毒主要通过造血途径传播到睾丸<sup>[42]</sup>。在附睾睾丸炎症的小鼠模型研究中发现, 该小鼠模型中有大量的免疫细胞浸润, 如中性粒细胞、M1 型炎性巨噬细胞和肥大细胞等, 而免疫细胞浸润伴随着间质空间的纤维化重塑<sup>[43]</sup>。另外, 在小鼠 UPEC (尿源性大肠杆菌) 感染模型中, 观察到在炎症条件下常驻巨噬细胞的局部增殖<sup>[17]</sup>。

在啮齿类动物睾丸中, tM $\Phi$  的抗炎特性减弱、病毒感应因子表达减少、病毒感应级联抑制因子表达增加<sup>[36]</sup>, 可能会抑制巨噬细胞的正常免疫功能。在人类和非人灵长类动物 (NHP) 睾丸中发现的一些病毒可以感染巨噬细胞, 包括 HIV-1、ZIKV、埃博拉病毒和马尔堡病毒, 以及腮腺炎原红疹病毒。有证据表明巨噬细胞可能被病毒利用, 通过小鼠和人类的几种非排他性机制促进其在睾丸中的传播<sup>[44]</sup>。例如, 巨噬细胞通过细胞间感染将 HIV-1 转移给其他细胞。这种转移可以通过间质 tM $\Phi$  与间质细胞之间或管周细胞和精原细胞相邻的管周 tM $\Phi$  之间的物理接触产生。ZIKV 感染是一个双相过程, 从间质细胞感染开始, 然后在曲细精管中复制<sup>[42]</sup>。被招募的免疫细胞或受感染的睾丸细胞释放的炎性细胞因子可以改变支持细胞 (SC) 的紧密连接, 并导致血-睾屏障的破坏, 从而促进病毒进入生殖细胞并进入睾丸, 最终进入精液。

### 3 总结

本文总结了两种不同的 tM $\Phi$  的来源、定位的相关研究进展, 在血管形成、精子发生、生成类固醇激素、保护睾丸免受自身免疫中的作用, 以及在感染和炎症状态下维持稳态的机制。间质巨噬细胞来源于胚胎, 与睾丸间质细胞结合以支持类固醇激素的产生, 并通过表达 IL-10 为免疫抑制微环境做出贡献。而管周巨噬细胞通过免疫耐受生殖细胞自身抗原来保护睾丸免受自身免疫的攻击。

根据不同的表面标记物进行流式和共聚焦实验表明, 间质巨噬细胞定位于间质细胞和脉管系统中间; 管周巨噬细胞定位于靠近血-睾屏障的部位。管周巨噬细胞在出生后两周、精子发生前出现, 并长期存在于组织中, 说明只有在精子发生开始时才被填充的新生态位可能诱导一个特定的微环境, 用于招募特定和专用的巨噬细胞群体, 这表明微环境在塑造巨噬细胞身份定位中的重要性。

另外, 在细菌感染和炎症情况下, 睾丸中伴随着免疫细胞的浸润, 例如炎性巨噬细胞、中性粒细胞和单核细胞; 同时, 还存在驻留巨噬细胞的局部增殖。在病毒感染过程中, 病毒可利用巨噬细胞破坏血-睾屏障而在睾丸中传播, 最终使精子受损。浸润巨噬细胞和驻留巨噬细胞在细菌和病毒感染过程中的作用有何异同有待进一步研究。

目前 tM $\Phi$  的细胞来源尚不明确, 间质巨噬细胞和管周巨噬细胞的发育、维持以及处于特定的生态位受何种信号调控; 当耗尽其中一种 tM $\Phi$  亚群时, 生态位由另一种 tM $\Phi$  亚群来补充还是由循环血单核细胞进行补充; 局部睾丸生态位和不同细胞类型之间的相互作用如何决定 tM $\Phi$  亚群的表型, 以及由哪些转录因子驱动这些程序等, 都未得到解决。不同 tM $\Phi$  亚群之间的细胞定位和与生殖细胞接触的全部功能意义尚未完全阐明, 可能与睾丸形态发生、免疫调节、生殖细胞的发育和功能相关。上述问题的解决有助于男性睾丸炎症疾病分子机制的研究, 并提供新的不育男性的治疗策略。这些研究还可以帮助我们确定使 tM $\Phi$  成为特洛伊木马和某些病毒宿主的局部内在因素和分子机制。tM $\Phi$  可以说是“生育的守卫者”, 进一步了解 tM $\Phi$  的特征和功能将有助于确定其在男性自身免疫反应和特发性不育症中的作用。

### [参 考 文 献]

- [1] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 2013, 496: 445-55
- [2] Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 206-18
- [3] Guilliams M, Thierry GR, Bonnardel J, et al. Establishment and maintenance of the macrophage niche. *Immunity*, 2020, 52: 434-51
- [4] Biniwale S, Wijayarathna R, Pleuger C, et al. Regulation of macrophage number and gene transcript levels by activin A and its binding protein, follistatin, in the testes of adult mice. *J Reprod Immunol*, 2022, 151: 103618
- [5] Mossadegh-Keller N, Sieweke MH. Testicular macrophages: guardians of fertility. *Cell Immunol*, 2018, 330: 120-5
- [6] Gu X, Li SY, Defalco T. Immune and vascular contributions to organogenesis of the testis and ovary. *FEBS J*, 2022, 289: 2386-408
- [7] Redgrove KA, McLaughlin EA. The role of the immune response in *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: a double-edged sword. *Front Immunol*, 2014, 5: 534
- [8] Mossadegh-Keller N, Gentek R, Gimenez G, et al. Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *J Exp Med*, 2017, 214: 2829-41
- [9] Defalco T, Potter SJ, Williams AV, et al. Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Rep*, 2015, 12: 1107-19
- [10] Lokka E, Lintukorpi L, Cisneros-Montalvo S, et al. Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. *Nat Commun*, 2020, 11: 4375
- [11] Gayer FA, Reichardt SD, Bohnenberger H, et al. Characterization of testicular macrophage subpopulations in mice. *Immunol Lett*, 2022, 243: 44-52
- [12] Meinhardt A, Dejuq-Rainsford N, Bhushan S. Testicular macrophages: development and function in health and disease. *Trends Immunol*, 2022, 43: 51-62
- [13] Frame JM, Mcgrath KE, Palis J. Erythro-myeloid progenitors: “definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 51: 220-5
- [14] Lin Y, Yoder MC, Yoshimoto M. Lymphoid progenitor emergence in the murine embryo and yolk sac precedes stem cell detection. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 1168-77
- [15] Perdiguero EG, Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol*, 2016, 17: 2-8
- [16] Shaw TN, Houston SA, Wemyss K, et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J Exp Med*, 2018, 215: 1507-18
- [17] Wang M, Yang Y, Cansever D, et al. Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2013686117
- [18] Defalco T, Bhattacharya I, Williams AV, et al. Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: E2384-93
- [19] Bhushan S, Meinhardt A. The macrophages in testis function. *J Reprod Immunol*, 2017, 119: 107-12
- [20] Gu X, Li SY, Matsuyama S, et al. Immune cells as critical regulators of steroidogenesis in the testis and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 894437
- [21] Meinhardt A, Wang M, Schulz C, et al. Microenvironmental signals govern the cellular identity of testicular macrophages. *J Leukoc Biol*, 2018, 104: 757-66
- [22] Pleuger C, Silva EJ, Pilatz A, et al. Differential immune response to infection and acute inflammation along the epididymis. *Front Immunol*, 2020, 11: 599594
- [23] Munro DAD, Wineberg Y, Tarnick J, et al. Macrophages restrict the nephrogenic field and promote endothelial connections during kidney development. *Elife*, 2019, 8: e43271
- [24] Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 30: 2-13
- [25] Winnall WR, Hedger MP. Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a

- new regulatory model. *J Reprod Immunol*, 2013, 97: 147-58
- [26] Lukyanenko Y, Chen JJ, Hutson JC. Testosterone regulates 25-hydroxycholesterol production in testicular macrophages. *Biol Reprod*, 2002, 67: 1435-8
- [27] Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res*, 2018, 29: 207-14
- [28] Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, et al. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*, 2009, 136: 1191-9
- [29] Sawaied A, Arazi E, Abuelhija A, et al. The presence of colony-stimulating factor-1 and its receptor in different cells of the testis; it involved in the development of spermatogenesis *in vitro*. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 2325
- [30] Li H, Palczewski K, Baehr W, et al. Vitamin A deficiency results in meiotic failure and accumulation of undifferentiated spermatogonia in prepubertal mouse testis. *Biol Reprod*, 2011, 84: 336-41
- [31] Amory JK, Muller CH, Shimshoni JA, et al. Suppression of spermatogenesis by bisdichloroacetyldiamines is mediated by inhibition of testicular retinoic acid biosynthesis. *J Androl*, 2011, 32: 111-9
- [32] Wang YX, You L, Zeng Q, et al. Phthalate exposure and human semen quality: Results from an infertility clinic in China. *Environ Res*, 2015, 142: 1-9
- [33] Gillette R, Tiwary R, Voss J, et al. Peritubular macrophages are recruited to the testis of peripubertal rats after mono-(2-ethylhexyl)phthalate exposure and is associated with increases in the numbers of spermatogonia. *Toxicol Sci*, 2021, 182: 288-96
- [34] Xue J, Schmidt SV, Sander J, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 2014, 40: 274-88
- [35] Bhushan S, Tchatalbachev S, Lu Y, et al. Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity. *J Immunol*, 2015, 194: 5455-64
- [36] Tung KS, Harakal J, Qiao H, et al. Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *J Clin Invest*, 2017, 127: 1046-60
- [37] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, 41: 14-20
- [38] Fan ZP, Peng ML, Chen YY, et al. S100A9 activates the immunosuppressive switch through the PI3K/Akt pathway to maintain the immune suppression function of testicular macrophages. *Front Immunol*, 2021, 12: 743354
- [39] Fijak M, Pilatz A, Hedger MP, et al. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum Reprod Update*, 2018, 24: 416-41
- [40] Lu Y, Bhushan S, Tchatalbachev S, et al. Necrosis is the dominant cell death pathway in uropathogenic *Escherichia coli* elicited epididymo-orchitis and is responsible for damage of rat testis. *PLoS One*, 2013, 8: e52919
- [41] Shang J, Li C, Jin Z, et al. Immune profiles in mouse brain and testes infected by Zika virus with variable pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 948980
- [42] Tsetsarkin KA, Maximova OA, Liu G, et al. Routes of Zika virus dissemination in the testis and epididymis of immunodeficient mice. *Nat Commun*, 2018, 9: 5350
- [43] Nicolas N, Michel V, Bhushan S, et al. Testicular activin and follistatin levels are elevated during the course of experimental autoimmune epididymo-orchitis in mice. *Sci Rep*, 2017, 7: 42391
- [44] Mahe D, Matusali G, Deleage C, et al. Potential for virus endogenization in humans through testicular germ cell infection: the case of HIV. *J Virol*, 2020, 94: e01145-20