DOI:10.16016/j.2097-0927.202311151

2.5 T 太赫兹辐射暴露对小鼠睾丸组织损伤效应及机制研究

马秦龙,林 敏,高 鹏,杨玲玲,卢永辉,张彦文,余争平,陈纯海 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室

[**摘要**] **目的** 探讨太赫兹(terahertz, THz)辐射暴露对小鼠睾丸组织的损伤效应及其潜在的分子机制。**方法** 采用 125 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,通过频点为 2.5 T 的 THz 辐射单次暴露动物,暴露平均功率密度为 38、115 和 318 mW/cm^2,暴露时间为 5 或 10 min。于暴露结束后即刻或 24 h 分别采用 HE 染色检测病理损伤,采用 ELISA 检测睾丸组织炎症因子表达量,采用转录组测序检测睾丸组织基因表达变化整体情况,并通过生物信息学对差异表达基因进行聚类分析,筛选敏感基因并通过 RT-qPCR 检测其在 THz 辐射暴露后表达的时效量效关系,最后在显微镜下对精子质量进行形态学分析。**结果** 3 个剂量 THz 辐射暴露均未造成小鼠睾丸组织显著病理损伤;平均功率密度 115 mW/cm^2 暴露后即刻 TNF-α 表达增高(P<0.01),THz 剂量达到 318 mW/cm^2 后,IL-1β 及 TNF-α 的表达均升高(P<0.01),但在 24 h 后均恢复至正常水平。转录组测序结果表明,THz 辐射暴露能够造成 56 个基因表达异常,聚类分析结果表明,这些基因主要富集于免疫与炎症反应、酶活性、精子发育与获能等功能。对筛选出的关键基因 *Crisp*1、*Adam*7、*Ltf*、*Rnase*9 与 *Bsph*1 表达检测发现,115 mW/cm^2 暴露后即刻 *Crisp*1 与 *Rnase*9 表达下调,剂量至 318 mW/cm^2 时,所有 5 个基因表达均发生显著变化(P<0.05),而 24 h 后均恢复至正常水平。对精子功能的形态学检测发现,3 个剂量 THz 辐射暴露均不导致精子质量的变化。**结论** THz 辐射单次暴露引起睾丸组织的暂时性炎症反应和精子功能相关基因表达异常,但 24 h 后可恢复正常,不影响精子质量。

[**关键词**] 太赫兹;睾丸;炎症反应;精子功能;转录组测序
[**中图法分类号**] R321.1; R322.64; R818.023 [**文献标志码**] A

Effects and mechanisms of 2.5T terahertz radiation exposure on testis injury in mice

MA Qinlong, LIN Min, GAO Peng, YANG Lingling, LU Yonghui, ZHANG Yanwen, YU Zhengping, CHEN Chunhai
Department of Occupational Health, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of terahertz (THz) radiation on mouse testicular tissue and its potential molecular mechanisms. **Methods** A total of 125 male C57BL/6J mice (6~8 weeks old) were randomly divided into control group and low-, medium- and high-radiation power groups. The mice of the latter 3 groups were exposed to THz radiation at a frequency of 2.5 T, with an average power density of 38, 115, or 318 mW/cm^2, for 5 or 10 min. The detection time was immediately or 24 h after exposure. HE staining was used to observe pathological damage. ELISA was employed to detect the expression of inflammatory factors in testicular tissue. RNA-seq was utilized to detect the global changes of gene expression. The differentially expressed genes (DEGs) were screened and bioinformatics was used to cluster them. The screened genes were further analyzed with RT-qPCR to determine the time-dependent and dose-dependent relationships of the expression with THz exposure. Finally, sperm quality was evaluated morphologically using

[**基金项目**] 国家自然科学基金 NSAF 联合基金(U2130107),重庆英才·优秀科学家项目(cstc2024ycjh-bgzxm0053)
[**通信作者**] 陈纯海,chunhai_chen@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

a microscope. **Results** Three doses of THz radiation exposure did not cause significant pathological damages to mouse testicular tissue. TNF-α expression was increased immediately after exposure at average power density of 115 mW/cm^2 ($P<0.01$), and the expression of IL-1β and TNF-α were both increased when the dose reached 318 mW/cm^2 ($P<0.01$). However, all the 3 factors returned to normal levels in 24 h after exposure. RNA-seq results showed that THz radiation exposure caused abnormal expression of 56 genes. Cluster analysis indicated that these DEGs were mainly enriched in immune and inflammatory responses, enzyme activity, sperm development and capacitation functions. Then for 5 selected key genes, *Crisp*1, *Adam*7, *Ltf*, *Rnase*9, and *Bsph*1, the expression of *Crisp*1 and *Rnase*9 was decreased immediately after exposure to 115 mW/cm^2 THz radiation, the dose of 318 mW/cm^2 resulted in obvious changes in the expression of the 5 genes ($P<0.05$), and their expression returned to normal levels in 24 h after exposure. Morphological observation displayed that exposure to all the 3 doses of THz had no influence on sperm quality. **Conclusion** THz radiation exposure causes temporary inflammatory response in testicular tissue and abnormal expression of sperm functions-related genes. However, these changes return to normal 24 h after exposure, and additionally, do not impair sperm quality.

[**Key words**] terahertz; testis; inflammatory response; sperm function; RNA-seq

Supported by the Joint Project of National Natural Science Foundation of China and National Scholastic Athletics Foundation (U2130107) and the Excellent Scientist Project of Chongqing Talent Program (cstc2024ycjh-bgzxm0053). Corresponding author: CHEN Chunhai, E-mail: chunhai_chen@tmmu.edu.cn

太赫兹(terahertz,THz,1 THz = 10^{12} Hz)辐射是指频率在0.1~10 THz的电磁波,由于其独特的物理特性,使得THz技术在各个领域都得到了极为广泛的应用。2004年,美国政府已将THz技术评为“改变未来世界的十大技术”之一,日本政府于2005年更是将其列为“国家支柱十大重点战略目标”之首,在生物医学检测、安全检测、爆炸材料标示、高数据率通信等领域有广泛的应用[1-3]。近年来,THz技术的应用开发进展迅速,国内外THz技术的研发和应用已经产生了广泛而深刻的变化,在各个领域已逐步由实验室走入现实场景[4-7]。

由于THz技术的发展主要发生于近十年左右,相对于THz技术的应用研发,THz辐射的生物效应研究明显不足,导致对其生物安全性缺乏了解,针对逐渐增加的暴露人群,目前尚缺少相应的安全暴露标准[8]。既往研究表明,在培养细胞模型上,THz辐射暴露可造成多种细胞出现明显损伤,包括影响细胞增殖分化、细胞周期模式及DNA损伤修复等重要生理过程[9-11];THz辐射暴露还可通过影响Na^+,-K^+-ATP酶活性、钙通道活性及神经元的电活动来改变动物神经行为功能,及引起造血系统血小板聚集等[12-14]。这些结果均提示,THz辐射暴露可对机体各系统产生影响,亟待进一步全面研究阐明THz生物效应,为揭示其生物安全性,提出安全暴露限值奠定基础。

生殖系统是微波辐射损伤的主要靶器官之一[15],THz辐射与微波同属电磁辐射家族,其生物效应可能会有相似之处,因此,THz辐射暴露对生殖系统的效应是其生物效应研究的重要方向之一,但目前关于此方向的研究尚少,需要深入研究以揭示其具体效应及机制。基于此,本实验构建小鼠THz辐射暴露模型,通过高通量转录组测序(RNA-seq)技术、生物信息学分析并结合分子生物学实验技术进行验证,研究了THz辐射暴露后小鼠睾丸组织病理损伤及基因表达的变化,为全面揭示THz辐射暴露对生殖系统的影响奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 THz辐射暴露系统与动物暴露

采用中国工程物理研究院研制的高平均功率THz自由电子激光源(Chinese Academy of Engineering Physics Terahertz Free Electron Laser,CTFEL),其相关参数如下:中心频率1~3.5 THz,平均功率>10 W,微脉冲长度<1 ps,微脉冲功率>0.5 MW,微脉冲重频54.17 MHz,微脉冲间隔18.5 ns,初始发散角28 mrad,宏脉冲重频1 Hz~1 kHz,宏脉冲长度200 ns~1 ms,时间抖动<300 fs。

实验动物采用C57BL/6J雄性小鼠,共125只,6~8周龄,体质量(23±2)g,购自成都集萃药康公司。所有动物实验操作遵循陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会的相关要求(AMUWEC20210385)。小鼠使用阿佛丁腹腔麻醉(0.2 mL/10 g)、褪毛,固定后睾丸部位接受THz辐照。采用随机数字表法将实验动物分为对照组(Con组)及THz辐射暴露组,暴露组小鼠接受频点为2.5 T的THz辐射,暴露剂量根据太赫兹

源的发射功率进行计算得到动物暴露位点的平均功率密度,分为低剂量(38 mW/cm^2)、中剂量(115 mW/cm^2)和高剂量(318 mW/cm^2),为保持不同组别之间的可比性,不同剂量之间通过调整太赫兹源的发射功率后重新计算暴露位点的实际功率密度,其它参数保持不变;基于现有文献和课题组前期研究结果[16-18],暴露时间为5或10 min,每组动物数量及暴露剂量与时间在具体实验方法和数据中详细标注。根据实验设计,分别于暴露后即刻及24 h取睾丸组织进行相关指标检测。

1.2 HE染色

于THz辐射暴露结束后即刻取睾丸组织,每组3只小鼠(Con组、38 mW/cm^2+5 min组、115 mW/cm^2+5 min组、318 mW/cm^2+5 min组和318 mW/cm^2+10 min组),样本置于4%多聚甲醛(PFA)中固定,然后进行HE染色。

1.3 ELISA检测炎症因子表达

于THz辐射暴露10 min后即刻或24 h后,取小鼠睾丸组织,每组6只小鼠(Con组、38 mW/cm^{2}组、115 mW/cm^{2}组和318 mW/cm^{2}组),PBS匀浆,10 000 r/min,离心10 min后,收集上清。ELSIA检测采用试剂盒(美国R&D公司)进行,其详细操作步骤参见说明书。

1.4 转录组测序及生物信息学分析

于THz辐射暴露5 min后即刻取睾丸组织,每组4只小鼠(Con和318 mW/cm^{2}组),迅速冻入液氮,测序由上海派森诺公司负责,具体流程简述如下:总RNA提取(TRIzol试剂)→RNA质量检测(每组保证RIN值>8.0的样本4个)→mRNA纯化→mRNA片段化(200~300 bp)→cDNA合成→PCR富集建库→文库质检→Illumina平台上机测序。测序完成后对原始数据(raw data)进行过滤,将过滤后得到的序列(clean data)比对到该物种的参考基因组。根据比对结果,计算每个基因的表达量。在此基础上,进一步采用Dseq软件对样品进行表达差异分析。差异基因(differential expressed gene, DEG)的筛选标准采用:$P<0.05$,$|\text{Log2 FC}|\geq 1$。最后将筛选出的DEG进行GO富集分析和聚类分析等,其中基因GO注释采用Blast2go软件。

1.5 RT-qPCR检测敏感基因表达

小鼠于THz辐射暴露10 min后即刻及24 h取睾丸组织迅速冻入液氮保存,每组5只小鼠(Con组、38 mW/cm^{2}组、115 mW/cm^{2}组和318 mW/cm^{2}组),待所有样本收集齐后进行RNA提取及检测。RNA提取时先将组织剪碎、研磨,采用TRIzol(美国Invitrogen公司)试剂提取总RNA,RT-qPCR扩增所用引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
Crisp1	上游:TGTCCTGTTGGCAATTATCAAGG
	下游:CCACAACTATTGGTGCATAGCC
Adam7	上游:CGTGGGGCTCAATTTTACTAAGA
	下游:CTGCGGTACACATACTCATCAG
Ltf	上游:TGAGGCCCTTGGACTCTGT
	下游:ACCCACTTTTCTCATCTCGTTC
Rnase9	上游:TATAAGGGGCGCTGTTACCCA
	下游:TCTGCAAGATTTAACGCCATTCT
Bsph1	上游:GTGCATGTGTCTTTCCGTTCT
	下游:GGGGTGAGTGAACACCACTT
Gapdh	上游:ATACGGCTACAGCAACAGGG
	下游:GCCTCTCTTGCTCAGTGTCC

1.6 小鼠睾丸脏器系数、精子计数、活动度及畸形率检测

小鼠于THz辐照暴露10 min后即刻取睾丸组织,每组6只小鼠(Con组和318 mW/cm^{2}组),测量睾丸脏器系数:用电子天平称小鼠体质量,采用20%乌拉坦(0.2 mL/10 g)将实验动物麻醉,迅速解剖取出睾丸,用蒸馏水洗净,用滤纸吸干组织表面的水分,再称取每个脏器样品质量,计算脏器系数(脏器系数=100×脏器质量/体质量×100%)及其平均值。

小鼠于THz辐射暴露10 min后,在24 h时取睾丸组织,每组6只小鼠(Con组和318 mW/cm^{2}组),进行精子计数、活动度及畸形率检测:①精子计数:将小鼠处死后,取出附睾,用PBS清洗干净,然后置于3 mL PBS的培养皿内,用眼科剪剪成小块,吹打制成悬液,采用红细胞计数板在显微镜下计数精子数目。②精子活动度检测:取一滴精子悬液于载玻片上,在高倍镜下记录5个视野各级精子数目,计算出精子活动度。标准如下:“0级”为不活动;“Ⅰ级”为不向前运动或原地打转;“Ⅱ级”为慢速向前或旋转向前;“Ⅲ级”为中速直线向前运动;“Ⅳ级”为快速直线向前运动。精子活动度(%)=(精子总数-0级的精子数目)/精子总数×100%。③精子畸形率检测:吸取精子悬液于载玻片上,均匀涂片,晾干,甲醇固定5 min,干燥后用2%的伊红染色1 h。在高倍镜下观察精子形态,每只小鼠检测完整精子1 000条。精子畸形率(%)=(畸形精子数/1 000)×100%。

1.7 统计学分析

实验数据采用SPSS 18.0软件进行统计分析,实验结果用$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用Student's t检验,多组比较先进行单因素方差分析,再采用Dunnett3多重检测进行两两比较,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

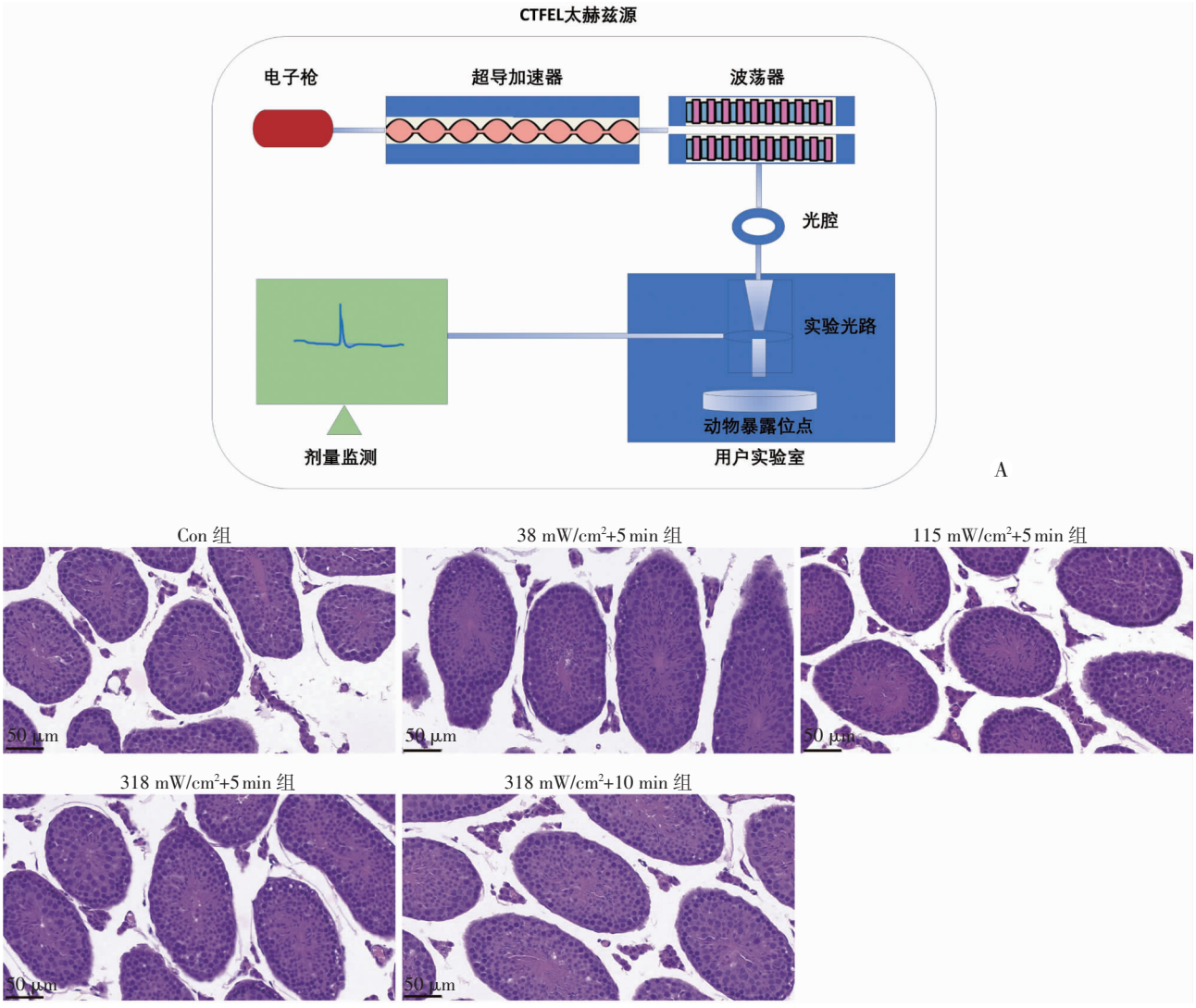
2 结果

2.1 太赫兹辐射暴露对小鼠睾丸组织病理损伤

如高平均功率 CTFEL 太赫兹源示意图所示,由 CTFEL 源所产生的 THz 波导入温湿度恒定的实验室,经过搭建的 THz 光路,使光路成为接近于垂直向下的平行光,测量得光斑中心直径为 10 mm。小鼠麻醉后置于实验台上,睾丸组织正对 THz 光斑接受辐照。根据 THz 源的发射的宏脉冲功率、占空比以及暴露部位的光斑面积等参数,计算所得小鼠实际接受的 THz 平均功率密度为 38、115 及 318 mW/cm^2(图 1A)。HE 染色结果显示,3 个剂量的 THz 辐射暴露 5 min 对小鼠睾丸组织无明显损伤,当延长暴露时间到 10 min 时,采用最大的平均功率密度 318 mW/cm^2 暴露时,睾丸组织仍然无明显的病理损伤(图 1B)。以上结果表明,在平均功率密度为 318 mW/cm^2 及以下时,未观察到 THz 辐射暴露对小鼠睾丸组织产生明显的急性病理损伤效应。

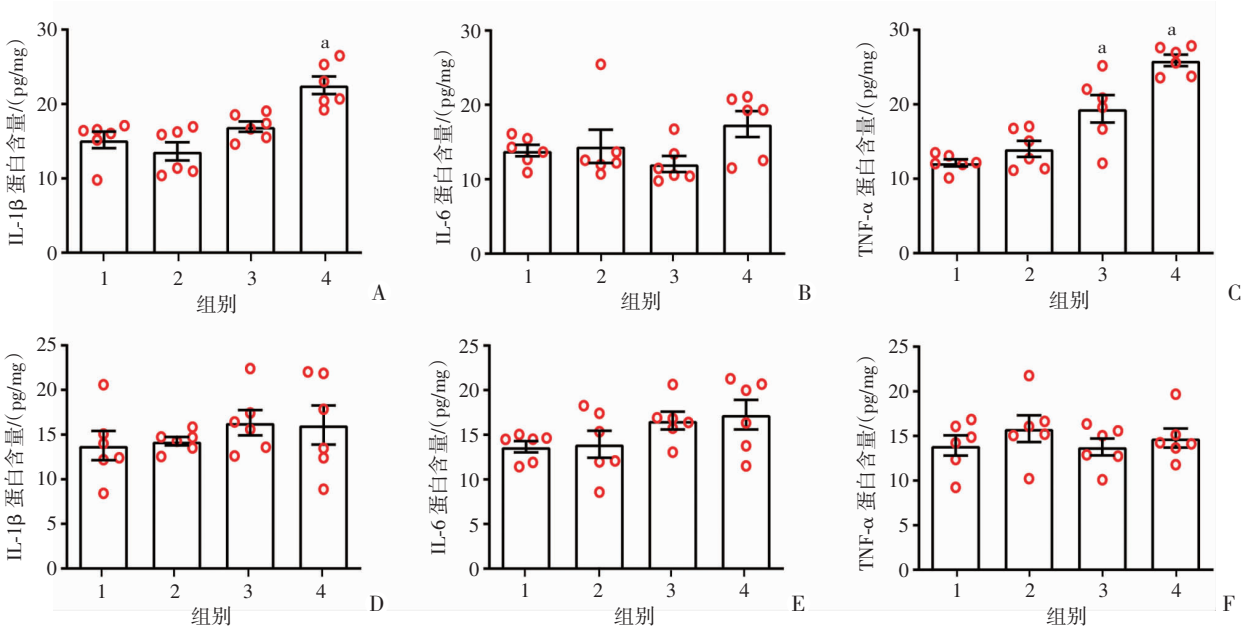
2.2 太赫兹辐射暴露对小鼠睾丸组织炎症因子的影响

通过 ELISA 检测了 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 在睾丸组织的表达变化情况。与 Con 组比较,THz 辐射暴露 10 min 后即刻,IL-1β 和 TNF-α 在平均功率密度 318 mW/cm^2 暴露后均明显升高,其中 TNF-α 在平均功率密度 115 mW/cm^2 暴露后即明显升高(P<0.01,图 2A~C)。以上结果表明,THz 辐射暴露能够导致睾丸组织炎症因子分泌增加。为探讨 THz 所诱导的炎症反应持续的时间,进一步检测了暴露后 24 h 的炎症因子表达情况,发现 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 在暴露组与 Con 组之间差异无统计学意义(图 2D~F)。以上结果说明在该暴露条件下,THz 所诱导的睾丸组织炎症反应持续时间较短。



A:CTFEL THz 源及动物暴露模式图;B:高倍镜下观察小鼠睾丸组织病理损伤情况(HE 染色)

图 1 THz 辐射暴露后各组小鼠睾丸组织病理损伤情况(n=3)



1：Con 组；2：38 mW/cm^2 组；3：115 mW/cm^2 组；4：318 mW/cm^2 组；a：P<0.01，与 Con 组比较

A～C：各组 THz 辐射暴露 10 min 后即刻 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量；D～F：各组 THz 辐射暴露 10 min 后，24 h 时 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量

图 2 ELISA 检测 THz 辐射暴露后小鼠睾丸组织的炎症因子含量（n=6，$\bar{x}\pm s$）

2.3 太赫兹辐射暴露对小鼠睾丸组织基因表达的影响

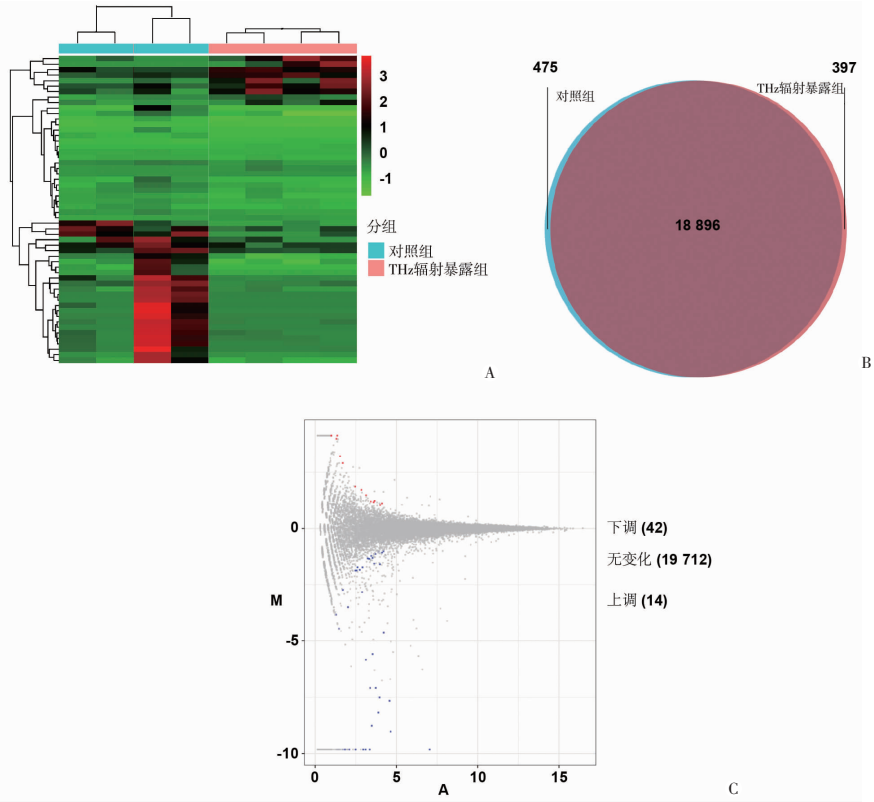
为全面探讨 THz 辐射暴露对睾丸组织基因表达的影响，采用转录组测序技术对平均功率密度为 318 mW/cm^2 的 THz 辐射暴露 5 min 后睾丸组织 RNA 进行测序分析。热图结果显示，对照组与 THz 辐射暴露组比较，基因表达存在明显差异（图 3A）；其中，有 475 个基因只在对照组高表达，有 397 个基因只在 THz 辐射暴露组特异性高表达（图 3B）；当进一步采用筛选条件（P<0.05，|Log2 FC|≥1），对 DEG 进行筛选时，共筛选出上调基因 14 个，下调基因 42 个。根据所筛选出来的 DEG，进行了生物信息学分析。GO 聚类分析结果表明，DEG 主要富集在发育成熟及精子获能，如细胞成熟、发育成熟、精子获能，如 *Grip*2 和 *Bsph*1 上调，*Ltf*、*Rnase*9、*Bsph*2 和 *Slfn*14 下调；酶的活性，如内肽酶活性、蛋白水解酶活性，如 *Vil*1 上调，*Wfdc*15*b*、*Fetub*、*Ltf*、*Spink*10 和 *Spint*5 下调；以及对有害因素刺激的免疫反应，如对细菌等微生物的免疫反应、先天免疫反应及黏膜免疫反应，如 *Vil*1 上调，*Wfdc*15*b*、*Ltf*、*Tlr*1、*Defb*20、*Defb*26、*Defb*28、*Defb*37、*Oas*1*a* 和 *Rab*17 下调（图 4、表 2）。

2.4 太赫兹辐射暴露对小鼠睾丸组织损伤敏感基因表达的影响

根据转录组测序的结果，从上调及下调表达前 10 的 DEG 中根据其功能进行筛选，找出 5 个与精子功能功能高度相关的基因，进行了表达的量效及时效关系验证。这 5 个基因分别为 *Crisp*1、*Adam*7、*Ltf*、*Rnase*9 与 *Bsph*1。通过表达的量效关系验证，检测了平均功率密度为 38、115 及 318 mW/cm^2 THz 辐射暴露 10 min 对以上基因表达的影响。结果表明，*Rnase*9 与 *Crisp*1 在 115 mW/cm^2 暴露后即刻发生明显的表达变化，所有 5 个基因在 318 mW/cm^2 暴露后均出现显著变化（P<0.05，P<0.01，图 5A～E）。为检测 THz 所诱导的基因表达变化持续的时间，接下来检测暴露 10 min 后，24 h 的基因表达情况。结果表明，即使是在最高剂量 318 mW/cm^2 THz 辐射暴露后 24 h，所有 5 个基因的表达均恢复至正常水平（图 5F）。以上结果说明在该暴露条件下，THz 辐射暴露所诱导的睾丸组织基因表达变化持续时间较短。

2.5 太赫兹辐射暴露对小鼠精子质量的影响

THz 所诱导的睾丸组织炎症反应、酶活性的变化及与精子功能相关的基因表达变化提示 THz 辐射暴露可能会对精子的质量产生影响。因此，检测了最高剂量平均功率密度 318 mW/cm^2 THz 辐射暴露 10 min 后即刻睾丸组织的脏器系数的变化，结果表明，THz 辐射暴露并不导致脏器系数变化（表 3）；接着检测了暴露后 24 h 的精子质量，包括精子数量、活动度与畸形率，结果表明，平均功率密度 318 mW/cm^2 的 THz 辐射暴露后，并未对精子质量产生影响（表 4）。



A：基因表达热图；B：基因表达 Veen 图；C：差异基因表达 MA 图

图 3　转录组测序检测 THz 辐射暴露后小鼠睾丸组织基因表达变化整体情况（$n=4$）

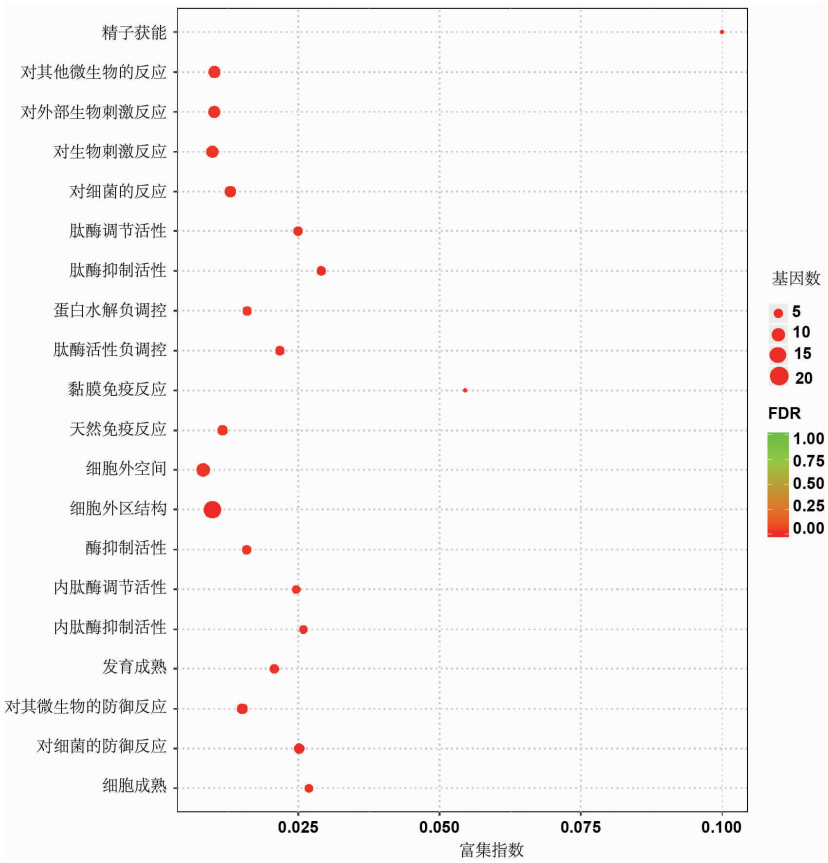
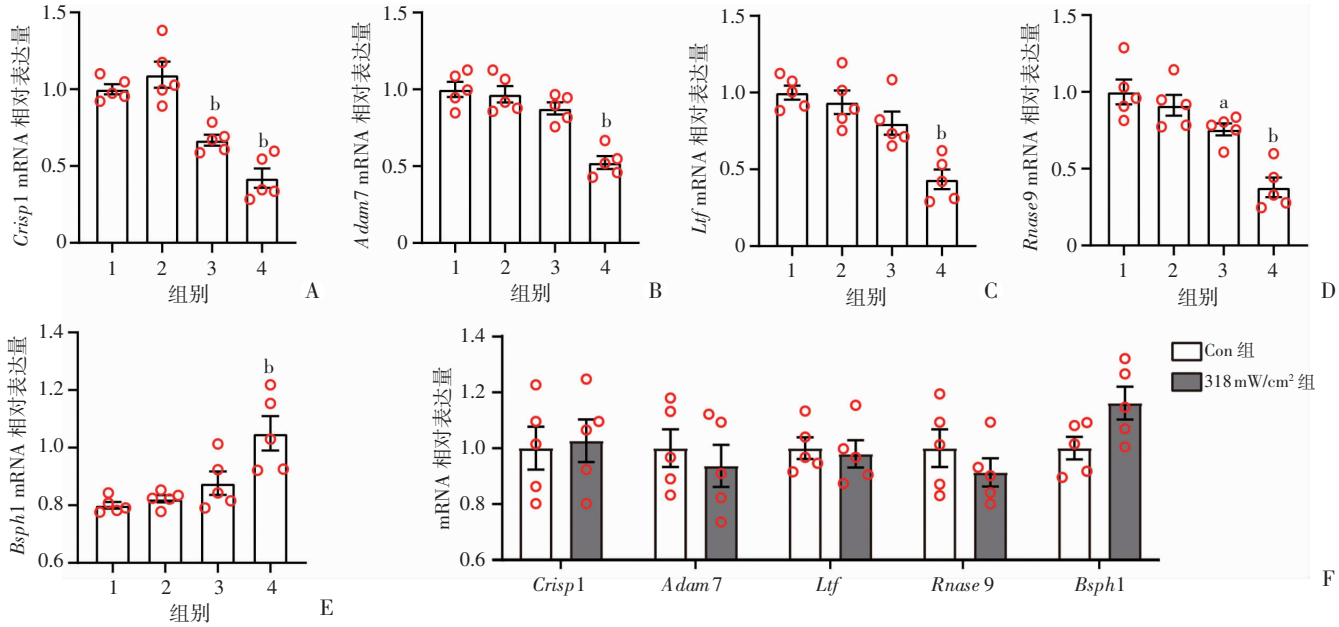


图 4　THz 辐射暴露后小鼠睾丸组织 DEG 的 GO 富集分析

表 2 GO 富集分析上调和下调基因

GO 富集条目	上调基因	下调基因
精子获能	*Bsph1*	*Rnase9*, *Bsph2*
对其他微生物的反应	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Ltf*, *Tlr1*, *Defb20*, *Oas1a*, *Defb37*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
对外部生物刺激反应	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Ltf*, *Tlr1*, *Defb20*, *Oas1a*, *Defb37*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
对生物刺激反应	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Ltf*, *Tlr1*, *Defb20*, *Oas1a*, *Defb37*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
对细菌的反应	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Ltf*, *Tlr1*, *Defb20*, *Defb37*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
肽酶调节活性	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
肽酶抑制活性	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
蛋白水解负调控	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
肽酶活性负调控	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
黏膜免疫反应	–	*Rab17*, *Ltf*, *AY761185*
天然免疫反应	–	*Defb22*, *Ltf*, *Tlr1*, *Defb20*, *Oas1a*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
细胞外空间	*H2M10.4*, *Bsph1*, *Gm9780*	*Fetub*, *Crisp1*, *Defb22*, *Npy*, *Ltf*, *Tacstd2*, *Col13a1*, *Bglap3*, *Spint5*, *AY761185*
细胞外区结构	*Tulp1*, *H2-M10.4*, *Apol10a*, *Bsph1*, *Gm9780*	*Wfdc15b*, *Fetub*, *Crisp1*, *Defb22*, *Npy*, *Ltf*, *Defb20*, *Tacstd2*, *Rnase9*, *Defb37*, *Col13a1*, *Rnase12*, *Bglap3*, *Spint5*, *Defb28*, *Defb26*, *Bsph2*, *AY761185*
酶抑制活性	*Vil1*	*Wfdc15b*, *Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
内肽酶调节活性	*Vil1*	*Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
内肽酶抑制活性	*Vil1*	*Fetub*, *Ltf*, *Spink10*, *Spint5*
发育成熟	*Grip2*, *Bsph1*	*Ltf*, *Rnase9*, *Bsph2*, *Slfn14*
对其微生物的防御反应	–	*Wfdc15b*, *Ltf*, *Defb20*, *Oas1a*, *Defb37*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
对细菌的防御反应	–	*Wfdc15b*, *Ltf*, *Defb20*, *Defb37*, *Defb28*, *Defb26*, *AY761185*
细胞成熟	*Grip2*, *Bsph1*	*Rnase9*, *Bsph2*, *Slfn14*



1: Con 组; 2: 38 mW/cm^2 组; 3: 115 mW/cm^2 组; 4: 318 mW/cm^2 组; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 Con 组比较
A~E: 各组 THz 辐射暴露 10 min 后即刻小鼠睾丸组织敏感基因表达情况; F: 318 mW/cm^2 THz 辐射暴露 10 min 后,24 h 时各组小鼠睾丸组织敏感基因表达情况

图 5 RT-qPCR 检测 THz 辐射暴露后小鼠睾丸组织敏感基因表达情况 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

表 3 THz 辐射暴露对睾丸质量及脏器系数的影响($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	睾丸质量/g	体质量/g	脏器系数/%
对照组	0.22±0.03	22.88±1.45	0.97±0.11
辐照组	0.21±0.05	21.61±1.86	0.98±0.23

表 4 THz 辐射暴露对精子质量的影响($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	精子数量/(10^6/mL)	活动度/%	畸形率/%
对照组	23.03±3.75	84.17±3.32	9.62±1.12
辐照组	22.20±3.34	83.23±4.22	9.99±1.58

3 讨论

THz 是近年来广受关注的一种新型物理因素,其广泛的应用领域将导致暴露人群的逐步增多,因此,亟待系统研究揭示 THz 辐射生物效应及生物安全性,为 THz 技术的应用提供支撑。本研究以男性生殖系统睾丸为靶点,研究了 THz 辐射暴露后睾丸组织的病理损伤及炎症反应特点,并通过高通量 RNA-seq 技术分析了暴露后基因表达变化的全貌,进一步筛选与精子功能相关的敏感基因,检测了其在 THz 辐射暴露后的表达变化时效量效关系,以及由此所导致的精子质量的变化情况。

3.1 太赫兹辐射暴露剂量选择

到目前为止,THz 生物的研究在很大程度上仍受到 THz 源的限制,频率连续可调,平均功率达到“瓦级”的 THz 源在全球范围内屈指可数,因此,高平均功率 THz 相关的生物效应研究报道较少[19-20]。区别于既往大部分研究中所使用的 THz 源装置,本研究所使用的 CTFEL 源平均功率可达到“瓦级”。考虑到 THz 辐射本身在生物组织中的穿透性较弱[21],为更好地揭示产生效应的可能阈值,在暴露剂量的选择上,使用的最高平均功率密度较高,为 318 mW/cm^2 THz,然后在此基础上以 30%左右的梯度设置另外 2 个暴露剂量;在频点的选择上,选择关注度较高的频点 2.5 T。考虑到高平均功率 THz 在实际的暴露场景中可能主要以单次暴露为主,本研究选择单次暴露模式。综合来看,THz 单次暴露对睾丸组织产生损伤的阈值可能在 115~318 mW/cm^2 之间。

3.2 太赫兹辐射引起睾丸组织炎症

从组织水平的结果来看,虽然睾丸组织局部炎症因子表达有所升高,但所有剂量暴露均没有观察到明显的病理损伤,说明在该剂量下 THz 辐射暴露所致效应不足以在小鼠体内诱导组织明显的急性病理损伤。限于观察时间的限制,没有采集到长时程病理损伤的数据,这是在未来研究中需要解决的问题。既往研究表明,在体外培养细胞模型上,可观察到 THz 辐射暴露对细胞产生明显的损伤效应,还发现一些与炎症反应相关的信号通路分子,如 NF-κB 磷酸化水平升高[22-23],提示调控机体炎症反应可能是 THz 辐射所致生物效应机制之一。类似的生物效应在 mMSCs 细胞上也有发现,如炎症反应相关的信号分子 PPARγ 的激活[24]。动物实验研究结果也表明 THz 辐射暴露能够诱导皮肤组织急性炎症反应[25],且本课题组前期研究也发现 THz 辐射暴露小鼠皮肤后,与炎症反应相关的分子和信号通路受到显著影响[17-18],这与本研究在睾丸组织的发现相符。IL-1β 与 TNF-α 是诱导炎症反应的重要因子[26],其表达水平升高提示 THz 辐射暴露有可能间接造成生殖系统损伤。没有观察到明显的病理损伤,可能与大部分能量在表浅组织被吸收、实际到达睾丸组织的能量较少有关,但目前受技术水平的限制,尚无法直接测量深层生物组织对 THz 辐射的直接吸收剂量。我们的数据尚不能明确睾丸组织炎症因子来源。根据推测,睾丸组织炎症因子增加可能是由于太赫兹辐射造成的血睾屏障通透性增加,导致血液中炎症细胞或炎症因子进入睾丸组织;或是由于睾丸细胞的病理改变诱发了局部炎症反应,也有可能二者兼有。此外,反复的太赫兹辐射暴露是否会在暴露部位形成慢性炎症刺激,这也是我们在下一步的研究工作中需要解决的关键问题。

3.3 太赫兹辐射暴露对睾丸组织基因转录的影响

THz 对基因表达的影响可通过多种机制,如影响组蛋白的结构等,在既往研究中已有较多报道[27-28]。在本研究中,RNA-seq 测序及分析较为全面地反映了 THz 辐射暴露在睾丸组织所产生的效应,基于 DEG 的 GO 富集分析结果表明主要受影响的功能集中在 3 部分。一是一些细胞对外界刺激及免疫应答反应相关的信号通路。比如富集到的 11 个基因中,有 10 个基因显著下调,其中 β-防御素家族基因(*Defb*20、*Defb*26、*Defb*28 和 *Defb*37)在雄性生殖器官中表达广泛,研究表明 Defb 家族成员通过协同模式促进精子成熟[29],*Oas*1*a* 与 *Rab*17 与抗病毒免疫、局部免疫稳态调节以及特异性炎症细胞浸润均密切相关[30-31],这些基因的下调提示了睾丸组织中存在炎症反应,这与前面炎症因子的表达变化及前期研究报道相符。二是与各种酶活性相关的通路。精子在附睾中的成熟是通过改变管腔离子浓度和修饰精子表面的多种糖苷酶和蛋白酶来调节的,而这些蛋白酶的活性又受到相关酶抑制剂的

调控,我们发现,大部分下调的基因 *Wfdc*15*b*、*Fetub*、*Spink*10 和 *Spint*5 均具有肽酶或蛋白酶抑制剂活性,并且在免疫防御、精子成熟和雄性生育能力方面发挥重要作用[32-35],这些变化也说明睾丸组织可能是 THz 辐射暴露损伤的主要靶器官之一。三是发育成熟及精子获能等直接相关的通路。我们发现富集到的基因中 *Ltf* 和 *Slfn*14 均出现显著下调。已有研究表明,*Ltf* 通过提高抗氧化能力和抑制炎症反应来缓解脱氧雪腐镰刀菌烯醇所致的精子发生受损和血睾屏障完整性[36];*Slfn*14 作为一种新型抗病毒因子,参与控制病毒复制,抑制炎症反应[37]。这些变化与前两点在逻辑上也是相符的,因炎症反应及酶活性的改变,可能影响精子的功能。

为此,筛选了与精子功能高度相关的 5 个敏感基因。*Crisp*1 是调控精子及附睾功能的关键基因,*Crisp*1 敲除后,会导致精子活动度明显降低,精子运动方向调控障碍以及小鼠生育率降低[38-39];*Adam*7 编码蛋白可直接从附睾通过外分泌转移到精子细胞,调控精子功能,其表达下降会严重影响精子的产量及质量,尤其是精子细胞膜的完整性会受到较大影响[40];*Ltf* 是调控精子细胞膜功能的关键基因,此外也是调控精子获能及细胞间信号交流的重要基因[41];*RNAse*9 是新发现的调控生殖功能的关键基因,*RNAse*9 敲除会严重影响精子成熟及附睾功能[42];*Bsph*1 是调控精子结合输卵管上皮,以及其在输卵管内的存活及运动能力的关键基因[43]。虽然我们在精子质量的检测中没有看到明显的损伤效应,但以上基因在 THz 辐射暴露后的表达变化充分说明 THz 辐射暴露能够导致生殖损伤。尽管尚不清楚 THz 辐射暴露改变这些基因表达的机制,但是基于 THz 辐射的特性以及现有数据,我们推测可能有如下原因:①太赫兹辐射直接导致了这些基因的表达变化,因为许多生物大分子的振动频率均位于太赫兹频段,不排除太赫兹可以直接影响调控上述基因表达的相关蛋白分子;②由于太赫兹所造成损伤,如炎症损伤,间接导致相应的基因表达变化,由于太赫兹生物效应机制研究较少,目前尚不能做出明确的回答,需要进一步深入研究以揭示其损伤效应的特点及机制。

本研究通过建立 THz 辐射暴露小鼠模型,采用高通量测序及多种分子生物学实验方法,揭示了 THz 辐射暴露可导致睾丸组织炎症因子的表达升高;并诱导与精子功能、酶活性及免疫反应相关的一系列基因表达异常;尤其是与精子发育成熟及活性相关的基因 *Crisp*1、*Adam*7、*Ltf*、*Rnase*9 与 *Bsph*1 表达改变;但是单次暴露并不造成明显的病理损伤及精子质量的改变,且所有发生的变化在暴露后 24 h 基本恢复至正常水平。本实验研究对理解 THz 辐射暴露生殖损伤具有重要意义,为深入研究提供了数据支撑。尤其是相关数据为认识 THz 辐射暴露剂量与机体恢复时间之间的关系提供了重要线索,对提出 THz 职业暴露限值和暴露间隔时间的控制均具备参考价值。

参考文献:

[1] YANG X, ZHAO X, YANG K, *et al*. Biomedical applications of terahertz spectroscopy and imaging[J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(10): 810-824. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.04.008.

[2] LI Z R, LIN H, WANG L, *et al*. Optical sensing techniques for rapid detection of agrochemicals: Strategies, challenges, and perspectives[J]. Sci Total Environ, 2022, 838: 156515. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156515.

[3] LOU J, JIAO Y N, YANG R S, *et al*. Calibration-free, high-precision, and robust terahertz ultrafast metasurfaces for monitoring gastric cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(43): e2209218119. DOI: 10.1073/pnas.2209218119.

[4] ZHAO H B, LI K, HAN M D, *et al*. Buckling and twisting of advanced materials into morphable 3D mesostructures[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(27): 13239-13248. DOI: 10.1073/pnas.1901193116.

[5] ZHAO S T, ZHANG Y H, QIU Z J, *et al*. Towards a fast and generalized microplastic quantification method in soil using terahertz spectroscopy[J]. Sci Total Environ, 2022, 841: 156624. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156624.

[6] SHAO Y N, WANG Y T, ZHU D, *et al*. Measuring heavy metal ions in water using nature existed microalgae as medium based on terahertz technology[J]. J Hazard Mater, 2022, 435: 129028. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129028.

[7] JUN S W, AHN Y H. Terahertz thermal curve analysis for label-free identification of pathogens[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3470. DOI: 10.1038/s41467-022-31137-2.

[8] 余争平, 张蕾. 太赫兹辐射生物效应研究进展与展望[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(23): 2259-2266. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008139.
YU Z P, ZHANG L. Progress and prospective in biological effects of terahertz radiation[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(23): 2259-2266. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008139.

[9] WANG Y X, XIONG Y, CHEN M, *et al*. The biological effects of terahertz wave radiation-induced injury on neural stem cells[J]. iScience, 2023, 26(10): 107418. DOI: 10.

1016/j.isci.2023.107418.

[10] ZHAO X H, ZHANG M, LIU Y M, *et al*. Terahertz exposure enhances neuronal synaptic transmission and oligodendrocyte differentiation *in vitro*[J]. iScience, 2021, 24(12): 103485. DOI: 10.1016/j.isci.2021.103485.

[11] CHERKASOVA O P, SERDYUKOV D S, NEMOVA E F, *et al*. Cellular effects of terahertz waves[J]. J Biomed Opt, 2021, 26(9): 090902. DOI: 10.1117/1.JBO.26.9.090902.

[12] KIRICHUK V F, ANTIPOVA O N, KRYLOVA Y A. Effect of continuous irradiation with terahertz electromagnetic waves of the NO frequency range on behavioral reactions of male albino rats under stress conditions[J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 157(2): 184-189. DOI: 10.1007/s10517-014-2521-1.

[13] TAN X X, GAO M X, CHANG C. A new means of energy supply driven by terahertz photons recovers related neural activity[J]. iScience, 2023, 26(2): 105979. DOI: 10.1016/j.isci.2023.105979.

[14] BO W F, CHE R, LIU Q, *et al*. Investigations on Na+, K+-ATPase energy consumption in ion flow of hydrophilic pores by THz unipolar stimulation[J]. iScience, 2023, 26(10): 107849. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107849.

[15] MEN J Q, ZHANG L, PENG R Y, *et al*. Metformin ameliorates 2.856 GHz microwave-radiation-induced reproductive impairments in male rats *via* inhibition of oxidative stress and apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 12250. DOI: 10.3390/ijms241512250.

[16] WEI C, ZHANG Y C, LI R, *et al*. Terahertz irradiation-induced motility enhancement and intracellular calcium elevation in human sperm *in vitro*[J]. Biomed Opt Express, 2018, 9(9): 3998-4008. DOI: 10.1364/BOE.9.003998.

[17] 陈纯海, 马秦龙, 陶嘉雯, 等. 太赫兹辐射暴露致小鼠皮肤损伤效应研究[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(23): 2282-2289. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008138.

CHEN C H, MA Q L, TAO J W, *et al*. Effects of terahertz exposure on skin injury in mouse model[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(23): 2282-2289. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008138.

[18] 高鹏, 卢永辉, 马秦龙, 等. NLRP3 炎症小体激活在太赫兹暴露所致小鼠皮肤炎症中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(23): 2290-2295. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008142.

GAO P, LU Y H, MA Q L, *et al*. NLRP3 inflammasome activation mediates terahertz exposure-induced skin aseptic inflammation in mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(23): 2290-2295. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008142.

[19] SHIN D C, KIM B S, JANG H, *et al*. Photonic comb-rooted synthesis of ultra-stable terahertz frequencies[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 790. DOI: 10.1038/s41467-023-36507-y.

[20] CHEVALIER P, AMIRZHAN A, WANG F, *et al*. Widely tunable compact terahertz gas lasers[J]. Science, 2019, 366(6467): 856-860. DOI: 10.1126/science.aay8683.

[21] NIKITKINA A I, BIKMULINA P Y, GAFAROVA E R, *et al*. Terahertz radiation and the skin: a review[J]. J Biomed Opt, 2021, 26(4): 043005. DOI: 10.1117/1.JBO.26.4.043005.

[22] FRANCHINI V, DE SANCTIS S, MARINACCIO J, *et al*. Study of the effects of 0.15 terahertz radiation on genome integrity of adult fibroblasts[J]. Environ Mol Mutagen, 2018, 59(6): 476-487. DOI: 10.1002/em.22192.

[23] DE AMICIS A, SANCTIS S D, CRISTOFARO S D, *et al*. Biological effects of *in vitro* THz radiation exposure in human foetal fibroblasts[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2015, 793: 150-160. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.06.003.

[24] ALEXANDROV B S, PHIPPS M L, ALEXANDROV L B, *et al*. Specificity and heterogeneity of terahertz radiation effect on gene expression in mouse mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2013, 3: 1184. DOI: 10.1038/srep01184.

[25] HWANG Y, AHN J, MUN J, *et al*. *In vivo* analysis of THz wave irradiation induced acute inflammatory response in skin by laser-scanning confocal microscopy[J]. Opt Express, 2014, 22(10): 11465-11475. DOI: 10.1364/OE.22.011465.

[26] SCHWAGER S, DETMAR M. Inflammation and lymphatic function[J]. Front Immunol, 2019, 10: 308. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00308.

[27] SITNIKOV D S, ILINA I V, REVKOVA V A, *et al*. Effects of high intensity non-ionizing terahertz radiation on human skin fibroblasts[J]. Biomed Opt Express, 2021, 12(11): 7122-7138. DOI: 10.1364/BOE.440460.

[28] SHANG S, WU X J, ZHANG Q, *et al*. 0.1 THz exposure affects primary hippocampus neuron gene expression via alternating transcription factor binding[J]. Biomed Opt Express, 2021, 12(6): 3729-3742. DOI: 10.1364/BOE.426928.

[29] ZHANG C B, ZHOU Y C, XIE S S, *et al*. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals the synergistic effects of β-defensin family members on sperm maturation in rat epididymis[J]. FASEB J, 2018, 32(3): 1354-1363. DOI: 10.1096/fj.201700936R.

[30] PULIT-PENALOZA J A, SCHERBIK S V, BRINTON M A.

Activation of Oas1a gene expression by type I IFN requires both STAT1 and STAT2 while only STAT2 is required for Oas1b activation[J]. Virology, 2012, 425(2): 71-81. DOI: 10.1016/j.virol.2011.11.025.

[31] ZENG Z H, ZHANG Z C, CHENG X F, *et al*. Downregulation of RAB17 have a poor prognosis in kidney renal clear cell carcinoma and its expression correlates with DNA methylation and immune infiltration[J]. Cell Signal, 2023, 109: 110743. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110743.

[32] 刘娟,王海燕,李建远. 附睾相关 WFDC 型丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展[J]. 中华男科学, 2008, 14(11): 1027-1030. DOI:10.13263/j.cnki.nja.2008.11.006.
LIU J, WANG H Y, LI J Y. Advances in researches on epididymal WFDC-type serine protease inhibitors[J]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2008, 14(11): 1027-1030. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2008.11.006.

[33] DIETZEL E, WESSLING J, FLOEHR J, *et al*. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization[J]. Dev Cell, 2013, 25(1): 106-112. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.03.001.

[34] JALKANEN J, KOTIMÄKI M, HUHTANIEMI I, *et al*. Novel epididymal protease inhibitors with Kazal or WAP family domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(1): 245-254. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.08.023.

[35] ROBERTSON M J, KENT K, THARP N, *et al*. Large-scale discovery of male reproductive tract-specific genes through analysis of RNA-seq datasets[J]. BMC Biol, 2020, 18(1): 103. DOI: 10.1186/s12915-020-00826-z.

[36] LI Z J, ZHAO Y H, ZONG Q F, *et al*. Lactoferrin restores the deoxynivalenol-impaired spermatogenesis and blood-testis barrier integrity via improving the antioxidant capacity and modifying the cell adhesion and inflammatory response[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(1): 152. DOI: 10.3390/antiox12010152.

[37] SEONG R K, SEO S W, KIM J A, *et al*. Schlafen 14 (SLFN14) is a novel antiviral factor involved in the control of viral replication[J]. Immunobiology, 2017, 222(11): 979-988. DOI: 10.1016/j.imbio.2017.07.002.

[38] MURDICA V, CERMISONI G C, ZAROVNI N, *et al*. Proteomic analysis reveals the negative modulator of sperm function glycodelin as over-represented in semen exosomes isolated from asthenozoospermic patients[J]. Hum Reprod, 2019, 34(8): 1416-1427. DOI: 10.1093/humrep/dez114.

[39] WEIGEL MUÑOZ M, CARVAJAL G, CURCI L, *et al*. Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility[J]. Andrology, 2019, 7(5): 610-617. DOI: 10.1111/andr.12638.

[40] CHOI H, HAN C, JIN S, *et al*. Reduced fertility and altered epididymal and sperm integrity in mice lacking ADAM7[J]. Biol Reprod, 2015, 93(3): 70. DOI: 10.1095/biolreprod.115.130252.

[41] MARTINS H S, DA SILVA G C, CORTES S F, *et al*. Lactoferrin increases sperm membrane functionality of frozen equine semen[J]. Reprod Domest Anim, 2018, 53(3): 617-623. DOI: 10.1111/rda.13148.

[42] WESTMUCKETT A D, NGUYEN E B, HERLEA-PANA O M, *et al*. Impaired sperm maturation in RNASE9 knockout mice[J]. Biol Reprod, 2014, 90(6): 120. DOI: 10.1095/biolreprod.113.116863.

[43] ESKANDARI-SHAHRAKI M, PRUD'HOMME B, BERGERON F, *et al*. Epididymal proteins Binder of SPerm Homologs 1 and 2 (BSPH1/2) are dispensable for male fertility and sperm motility in mice[J]. Sci Rep, 2020, 10: 8982. DOI: 10.1038/s41598-020-66017-6.

(**收稿**:2023-11-30;**修回**:2024-05-09)

(编辑 邓强庭)