DOI:10.16016/j.2097-0927.202310083

基于蛋白质组学和代谢组学分析初步探讨苯并(k)荧蒽致小鼠生殖损伤的作用机制

李雅文[1,2],王丹丹[2],王芙蓉[2],周妮娅[2],王大朋[1],曹 佳[1,2] 561113 贵阳,贵州医科大学公共卫生与健康学院,环境污染与疾病监控教育部重点实验室[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所[2]

[**摘要**] **目的** 通过蛋白质组学和代谢组学探究苯并(k)荧蒽[Benzo(k)fluoranthene,BkF]对雄性小鼠生殖损伤潜在的作用机制。**方法** 选取20只健康清洁级6周龄雄性昆明小鼠[体质量(18±2)g],按完全随机分组分为对照组、低剂量BkF组(7.5 mg/kg)、中剂量BkF组(15 mg/kg)、高剂量BkF组(30 mg/kg),每组5只。对照组灌胃给予玉米油,低、中、高剂量BkF组分别给予7.5、15.0、30.0 mg/(kg/d)剂量的BkF,按照10 mL/kg的体积,经口连续灌胃35 d生精周期。每周5 d进行灌胃,连续5周。建模完成后,轻断食10 h进行取材。采用计算机辅助精子分析(computer-assisted sperm analysis,CASA)软件检测分析精液参数;HE染色分析睾丸组织病理结构;采用生物信息学技术分析差异蛋白通路;采用火山图分析高剂量BkF组和对照组差异表达前10的蛋白质;液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)非靶向代谢组学技术,筛选出差异代谢物;通过KEGG及KEGG信号通路注释分析和GO富集分析差异代谢物。**结果** 与对照组比较,BkF处理的小鼠精子数量和活力有下降趋势,差异具有统计学意义($P<0.05$)。病理切片结果显示,与对照组比较,BkF处理的小鼠生精小管管腔扩张,生精细胞排列紊乱。蛋白质组学检测睾丸组织蛋白水平,发现Spata46、Rab5b等蛋白水平降低,Zscan21、Aifm2等蛋白水平升高($P<0.01$)。蛋白质组学京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopeclia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析显示,其主要涉及吞噬体、蛋白质输出、核糖体等通路。基因本体(Gene Ontology,GO)富集分析显示其主要涉及雄性减数分裂Ⅰ、组蛋白乙酰化、p53信号通路的调控、细胞周期的正向调节、细胞死亡的正向调节等信号通路。代谢组学KEGG显示发现氨基糖和核苷酸糖代谢与其他代谢途径联系最为密切。**结论** 蛋白质组学和代谢组学分析结果表明BkF暴露与精子生成、细胞凋亡和周期、DNA损伤、氨基糖和核苷酸糖代谢等相关。

[**关键词**] 苯并(k)荧蒽;雄性生殖损伤;精子生成;蛋白质组学分析;代谢组学分析

[**中图法分类号**] R322.64;R394-33;R994.6 [**文献标志码**] A

Mechanism of benzo (k) fluoranthene induced reproductive damage in mice based on proteomics and metabolomics analysis

LI Yawen[1,2], WANG Dandan[2], WANG Furong[2], ZHOU Niya[2], WANG Dapeng[1], CAO Jia[1,2] [1]School of Public Health, Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control of Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 561113; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the potential mechanism of Benzo (K) fluoranthene (BkF) on male reproductive injury in mice by proteomics and metabolomics. **Methods** Twenty healthy and clean male Kunming mice (6 weeks old, 18±2 g) were randomly divided into control group (corn oil group), low-, medium- and high-dose BkF groups (7.5, 15.0 and 30.0 mg/kg), with 5 mice in each group. The corresponding agents were gavaged at a dose of 10 mL/kg, 5 d per week, for 35 consecutive days. After

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(82130097);重庆市科卫联合医学科研项目(2021MSXM123)

[**通信作者**] 曹 佳,E-mail:caojia1962@126.com

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/)

modeling, the rats were fasted for 10 h, and then sperm samples and testicular tissues were harvested. Computer assisted sperm analysis (CASA) was used to detect and analyze semen parameters. HE staining was employed to observe the histopathological structure of the testicular tissue. Bioinformatics analysis was applied to analyze the differential protein pathways. Volcano plot were conducted to analyze the top 10 differentially expressed proteins (DEPs) in the control and high-dose BkF group. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) untargeted metabolomics techniques were utilized to screen out differential metabolites. KEGG signaling pathway and KEGG annotation analyses and GO enrichment analysis were used to analyze the differential metabolites. **Results** Compared with the control group, the sperm number and motility of BkF-treated mice showed a decreased trend, with statistical differences ($P<0.05$). Pathological observation showed that BkF treatment resulted in dilated seminal tubules and badly-arranged spermatogenic cells when compared with the control group. Proteomics analysis found that the protein levels of Spata46 and Rab5b were decreased, while those of Zscan21 and Aifm2 were increased ($P<0.01$). Proteomic KEGG enrichment analysis showed that it was mainly involved in phagosome, protein export, ribosome and other pathways. GO enrichment analysis indicated that it was mainly involved in male meiosis I, histone acetylation, regulation of p53 signaling pathway, positive regulation of cell cycle, positive regulation of cell death and other signaling pathways. Metabonomics KEGG displayed that amino sugar and nucleotide sugar metabolism were most closely related to other metabolic pathways. **Conclusion** Proteomics and metabolomics analyses show that BkF exposure is associated with spermatogenesis, apoptosis and cell cycle, DNA damage, amino sugar and nucleotide sugar metabolism.

[**Key words**] Benzo(k)fluoranthene; injury to male reproductive function; spermatogenesis; proteomics analysis; metabolomics analysis

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82130097) and the Joint Medical Research Project of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2021MSXM123). Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com

苯并(k)荧蒽[Benzo(k)fluoranthene, BkF]是多环芳烃的主要污染物之一,广泛存在于大气、水、土壤等环境中[1]。人类暴露在 BkF 中的途径包括吸入、食入和皮肤接触。研究表明,BkF 是一种致癌物,具有高度的脂溶性,易于经哺乳动物的内脏和肺吸收,与 DNA 结合并形成 DNA 加合物,产生遗传毒性和氧化应激,最终导致 DNA 损伤[2]。BkF 在生殖方面的毒性也不容忽视,研究表明,高环多环芳烃可能是男性生殖健康的潜在危险因素,多环芳烃有可能通过激活芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)对人类和动物的男(雄)性生殖系统产生不利影响[3]。BkF 具有抗雄激素和部分抗雌激素作用,能够最有效激活芳香烃受体的内源性代谢,并通过关键机制诱导早期应激和遗传毒性标志物影响[4]。前期课题组利用建立的重庆市大学生男性生殖健康队列研究发现,$PM_{2.5}$中的高分子量多环芳烃(high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons, HMW PAHs),如 BkF、苯并(b)荧蒽等暴露,会导致精子 DNA 损伤、精子形态异常,进而导致精子质量下降[5]。目前,对环境中 BkF 的毒性的全面研究尚少,因此,BkF 对雄性生殖毒性的影响需要进行更深入的研究。

蛋白质组学和代谢组学分析均是高通量组学技术,多组学的联合分析有助于揭示多个组学水平的潜在机制[6]。通过联合分析可以揭示生物体内复杂的生物学过程和调控机制,从而更全面地了解代谢调控机制,发现新的生物标志物,识别代谢通路的调节机制。然而,目前整合蛋白质组学和代谢组学来评估 BkF 对雄性生殖毒性的机制报道较少。本研究结合蛋白质组学和代谢组学,探讨 BkF 诱导雄性生殖毒性的毒性作用机制,为进一步研究 BkF 雄性生殖毒性提供了基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

计算机辅助精子分析(computer-aided semen analysis system, CASA)和小鼠精子检测一次性计数板(西班牙 Barcelona 公司);电热恒温水槽(中国精宏实验设备公司);正置显微镜(日本 Olympus 公司);YDS-50 型液氮生物容器(中国成都液氨容器厂公司);恒温水浴锅(中国 Thermo 公司);脱水机(米兰 DIAPATH 公司);包埋机和冻台(中国武汉俊杰公司);病理切片机(中国上海徕卡公司);组织摊片机

(中国金华科迪公司);脱色摇床、掌上离心机和组化笔(中国 Servicebio 公司);BkF 和玉米油(美国 Sigma 公司);睾丸组织固定液和柠檬酸(pH 值为 6.0)抗原修复液(中国 Servicebio 公司);蛋白裂解液和蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司);10% CFAS PAGE 快速凝胶试剂盒(陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司);抗体 Spata46、Zscan21、Rab5b、Aifm2(美国 Immunoway 生物技术公司);超敏 ECL 化学发光试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司);Western blot 成像仪 FUSION FX5(中国北京五洲东方科技发展有限公司)。

1.2 *动物实验*

1.2.1 分组及染毒 选取 20 只购自陆军军医大学动物实验中心的健康清洁级 6 周龄雄性昆明小鼠[体质量(18±2)g],适应环境 1 周后,按完全随机分为 4 组:对照组、低剂量 BkF 组(7.5 mg/kg)、中剂量 BkF 组(15 mg/kg)、高剂量 BkF 组(30 mg/kg),每组 5 只。小鼠染毒剂量根据 BkF 毒物的 IC50 值(为 100 mg/kg)以及前期课题组的预实验设定。对照组灌胃给予玉米油,低、中、高剂量 BkF 组分别给予 7.5、15.0、30.0 mg/(kg/d)的剂量的 BkF 按照 10 mL/kg 的体积,采用强饲法,每周 5 d 持续 5 周,连续 35 d。在 20~22 ℃的温度和 50%~70%的湿度下饲养小鼠,给予小鼠充足的食物和水。所有实验遵循国家实验动物伦理的规定,并通过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20210331)。

1.2.2 动物取材 最后 1 次灌胃后,将小鼠禁食 10 h 后,进行安乐死,并将组织固定以进行组织学分析,或者在液氮中冷冻,储存在-80 ℃下用于组学分析。

1.2.3 小鼠精液质量分析 将双侧睾丸分离,立刻放入盛有 1 mL 提前预温(37 ℃)并含有 4% BSA 的培养液中,随后用眼科剪将附睾剪碎,并用剪刀轻压组织块以便充分获得精子悬液,在 37 ℃水浴锅静置 2 min 后,吸取 20 μL 稀释后的精子悬液加至小鼠一次性精子计数板中,用 CASA 软件检测分析精子总数、精子浓度、精子活力等精液常规参数指标。

1.2.4 睾丸组织病理学分析 将睾丸固定、脱水、修剪、石蜡包埋,利用石蜡切片机将上述过程获得的睾丸蜡块切成 3~4 μm,用摊片机将睾丸组织展平,60 ℃烤干后,将切片依次放入二甲苯、无水乙醇、75%的酒精中脱蜡,用清水清洗并安装在载玻片上。根据形态学分析的标准程序,用 HE 染色法检查形态学变化,将样本脱水后,在光学显微镜下观察。本研究测量的生精小管组分的代表性指标包括:生精小管的横截面积和生精上皮的高度。每组测量 3 个样品,从每个样品中选择 5 个部分。使用切片扫描分析软件(CaseViewer)在显微镜下分别对对照组、低剂量 BkF 组、中剂量 BkF 组、高剂量 BkF 组中的生精小管成分进行测量。生精小管的横截面积为基底到管腔中心的面积。从基底膜到管腔边缘的距离为生精上皮高度,并且计算彼此垂直的 4 个上皮高度,平均值即为该小管的生精上皮高度。

1.3 *蛋白质组学分析*

1.3.1 蛋白样品的制备 蛋白质组学样品分别取自对照组和高剂量 BkF 组,一组取 5 个样,将对照组和高剂量 BkF 组的蛋白混合物,分别放入研钵,加入液氮研碎。在样品中加入适量 SDT 裂解液进行裂解,同时沸水浴 15 min,然后进行超声处理,超声后再沸水浴 15 min。收集蛋白后,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,用 BCA 法进行蛋白质定量。

1.3.2 Western blot 检测 使用 10% CFAS PAGE 快速凝胶试剂盒配制好胶后,每个样本各取 10 μL,进行电泳、转膜、封闭,分别加入稀释比为 1∶1 000 的兔来源的 β-actin 抗体、Spata46 抗体、Rab5b 抗体、Zscan21 抗体、Aifm2 抗体。使用 Image J 软件对蛋白条带进行量化。

1.3.3 差异蛋白质的生物信息学分析 分离出小鼠新鲜睾丸中的总蛋白质,将所有样本混合进行样品酶解,用高效液相色谱-质谱技术进行分级,经过数据依赖型采集(data dependent acquisition,DDA)质谱数据采集,利用液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry,LC-MS)对每个组分进行质谱检测,并进行数据库检索鉴定。然后,采用 Spectronaut pulsar X 软件构建图谱库,利用 Data Independent Acquisition(DIA)技术获得各样品的质谱数据,对各样本分别进行 LC-MS/MS 和数据库搜索,最后对数据进行分析。通过对测序结果进行筛选,获得差异蛋白,然后进行京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopeclia of Genes and Genomes,KEGG)和基因本体(Gene Ontology,GO)富集分析。采用火山图分析高剂量 BkF 组和对照组的差异表达前 10 的蛋白质。

1.4 *代谢组学分析*

1.4.1 代谢物样品制备 代谢组分析的样品分别取自对照组和高剂量 BkF 组,每组取 5 只,对小鼠睾丸组织中代谢物进行分析,样本在 4 ℃环境下缓慢解冻后,取适量样本加入预冷甲醇/乙腈/水溶液(体积分数为 2∶2∶1),涡旋混合,低温超声 30 min,-20 ℃静置 10 min,14 000×*g* 4℃离心 20 min,取上清真空干

燥,质谱分析时加入 100 μL 乙腈水溶液(乙腈与水的体积分数为 1∶1)复溶、涡旋,14 000×*g* 4 ℃离心 15 min,取上清液进样分析。

1.4.2 差异代谢物的生物信息学分析 进一步筛选组间的差异代谢物,进行了偏最小二乘判别分析,用 7 折交叉验证进行检验。然后用交叉验证后得到的 R2Y 和 Q2 对模型有效性进行评判。最后通过置换检验,随机 200 次改变分类变量 Y 的排列顺序得到不同的随机 Q2 值,从而对模型有效性做进一步的检验。提取样本后,采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统 HILIC 色谱柱进行分离,用 Triple TOF 6600 质谱仪进行质谱分析,分别采用电喷雾电离正离子和负离子模式进行检测。通过对测序结果进行筛选获得差异代谢物,然后进行 KEGG 和 GO 富集分析。

1.5 统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件生成统计图。采用单因素方差分析(ANOVA)进行 3 组及以上的多组间均数比较,采用独立样本 *t* 检验进行 2 组间比较的统计分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BkF 对小鼠精子数量和活力的影响

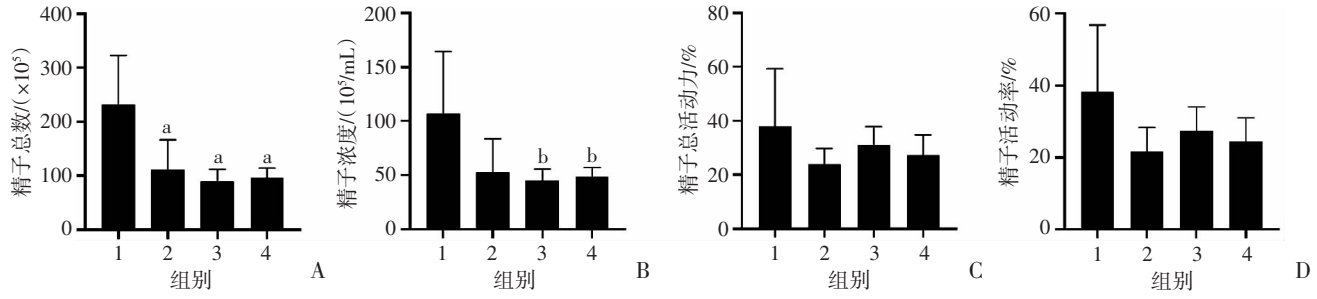
为研究 BkF 的雄性生殖毒性,进一步对精液参数进行分析。结果发现,与对照组比较,随着染毒剂量的升高,精子总数和精子浓度有下降趋势,且差异具有统计学意义($P<0.01$,图 1A、B)。精子总活动力和精子活动率有下降趋势,与对照组比较差异无统计学意义(图 1C、D)。

2.2 BkF 对睾丸组织病理结构的影响

睾丸组织病理学结构显示,对照组的小鼠睾丸组织未观察到生精小管有显著形态学变化,管腔内可观察到大量的精子,各级生精细胞排列有序且紧凑,依次为精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞,未观察到形态学损伤和炎症、充血等组织病理变化。与对照组比较,随着 BkF 剂量升高,各组的睾丸质量略有减小,但外观无变化。在低剂量 BkF 组中,小鼠睾丸生精上皮厚,曲细精管是圆形或椭圆形,结构完整饱满,各级生精细胞排列规则,曲细精管之间的疏松组织的间质细胞也紧密排列,胞质丰富。中剂量 BkF 组和高剂量 BkF 组小鼠表现出明显的生殖损伤,包括睾丸中的生殖细胞减少,生精上皮变薄,生精小管结构疏松外周有明显水肿,曲细精管呈不规则形,管腔扩大,生精细胞排列紊乱伴有精子减少,各曲细精管间隙变大,周围的间质细胞数量减少,呈弥散状分布(图 2A)。与对照组比较,中剂量 BkF 组和高剂量 BkF 组小鼠睾丸生精小管的横截面积有扩大的趋势,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2B)。中剂量 BkF 组和高剂量 BkF 组小鼠睾丸生精上皮高度与对照组比较,有下降趋势,其中,高剂量 BkF 组差异有统计学意义($P<0.05$,图 2C)。

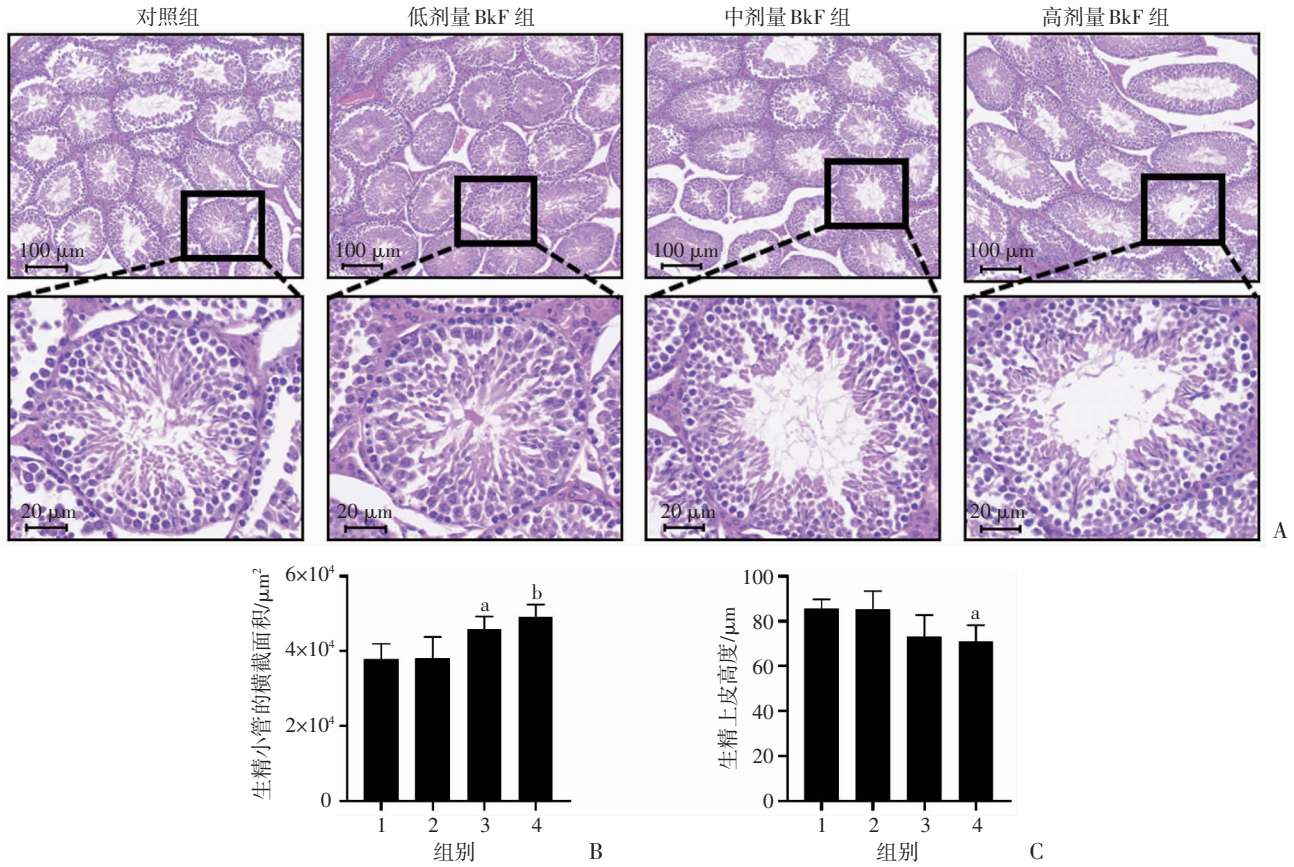
2.3 蛋白组学分析

2.3.1 KEGG 和 GO 分析 为研究 BkF 染毒后小鼠蛋白质的差异,计算高剂量 BkF 组蛋白表达量的均值与对照组蛋白表达量的均值的比值,并以 2 为底取对数,得到差异倍数(fold change, FC)对数折叠变化即 Log2 FC。使用|Log2 FC|>0.585 和 $P<0.05$ 作为筛选差异表达蛋白(differently expressed proteins, DEPs)的条件[7],共筛选出高剂量 BkF 组差异表达蛋白 99 个,其中上调蛋白有 56 个,下调蛋白 43 个。为进一步探究差异蛋白在 BkF 暴露中参与的功能,对差异蛋白进行 KEGG 和 GO 通路富集分析(图 3)。KEGG 富集结果中主要涉及吞噬体、蛋白质输出、核糖体等通路。GO 富集分析结果主要涉及雄性减数分裂Ⅰ与核分裂、组蛋白(H4)乙酰化与修饰、p53 类介导的信号通路、细胞周期和细胞死亡正向调节等信号通路。



1:对照组;2:低剂量 BkF 组(7.5 mg/kg);3:中剂量 BkF 组(15.0 mg/kg);4:高剂量 BkF 组(30.0 mg/kg);a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

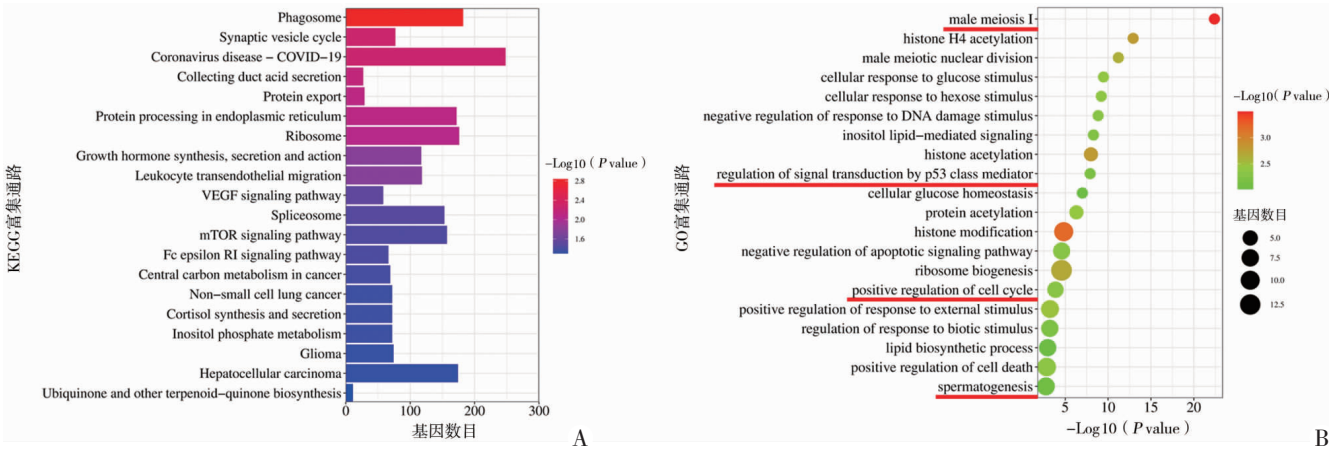
图 1 BkF 暴露后对小鼠精子总数(A)、精子浓度(B)、精子总活动力(C)、精子活动率(D)的影响



1:对照组;2:低剂量 BkF 组(7.5 mg/kg);3:中剂量 BkF 组(15.0 mg/kg);4:高剂量 BkF 组(30.0 mg/kg);a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:睾丸病理观察(HE);B:睾丸生精小管的横截面积量化分析;C:睾丸生精上皮高度量化分析

图 2 BkF 对小鼠睾丸组织病理结构的影响



A:差异蛋白 KEGG 富集通路;B:差异蛋白 GO 富集通路 红线:蛋白质组学筛选出的主要关键蛋白的通路

图 3 蛋白组学差异蛋白通路富集分析

2.3.2 筛选差异蛋白 通过火山图展示对照组和高剂量 BkF 组蛋白差异表达的分布情况(图 4A);通过聚类分析图列出前 10 上、下调差异蛋白,其中上调的蛋白分别是 Dock11、Fcgr2、Ppl、Serpina6、Chmp2a、Slc16a3、Zscan21、Aifm2、Rad51c、Saa4,下调的蛋白分别是 Prm3、Phip、Rab5b、Esyt3、Fdx1、Rpl10l、Setd2、

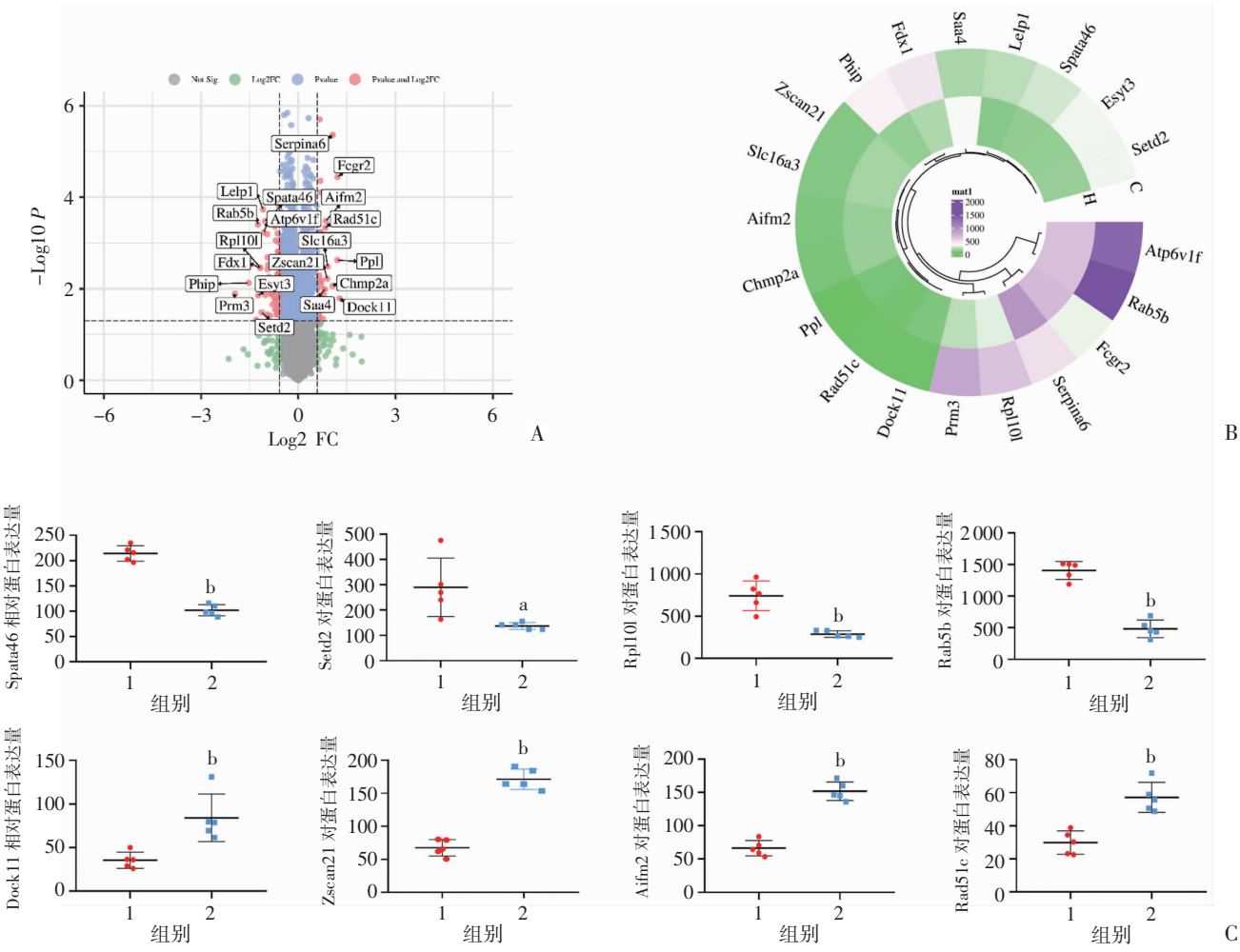
Lelp1、Atp6v1f、Spata46(图 4B)。其中 Spata46、Setd2、Rpl10l、Rab5b 蛋白水平降低,Dock11、Zscan21、Aifm2、Rad51c 蛋白水平升高($P<0.05$,$P<0.01$,图 4C)。

2.3.3　蛋白验证结果　　根据上述蛋白质组学分析结果,进一步验证与精子发生、GTP 酶、细胞凋亡相关的蛋白。Western blot 检测结果显示,与对照组比较,高剂量 BkF 组中 Spata46、Rab5b 蛋白表达明显减少($P<0.01$),Zscan21、Aifm2 蛋白表达显著增加($P<0.01$)。研究结果表明,Spata46、Zscan21、Rab5b、Aifm2 的表达与蛋白质组学结果一致(图 5)。

2.4　代谢组学分析

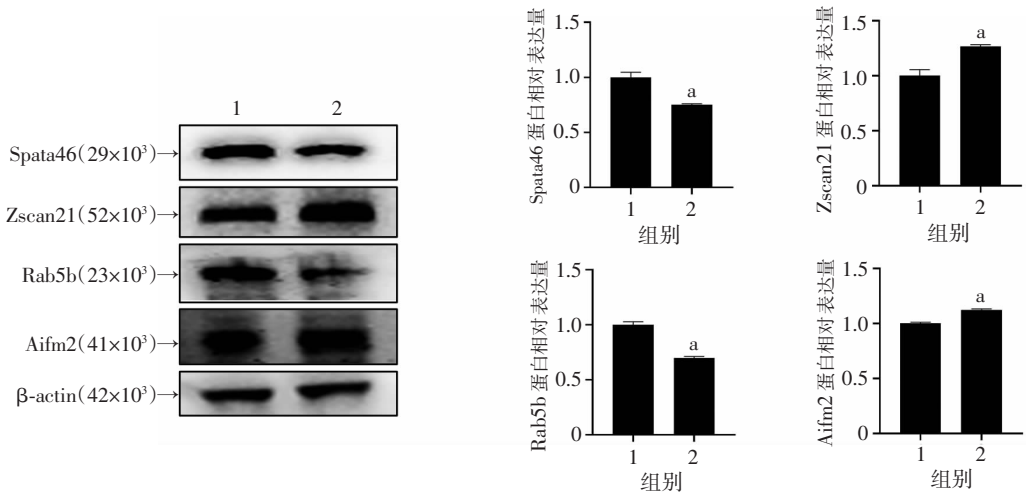
2.4.1　质量控制分析　　PLS-DA 评分图显示,对照组与高剂量 BkF 组有明显的区别,表明数据的解释力强,模型具有良好的预测能力。排列检验结果显示,正离子模式下分别为(R2=0.92,Q2=-0.72),负离子模式下分别为(R2=0.98,Q2=-0.61)。R2 和 Q2 均大于 0.5,表明该数据具有良好的稳定性,不存在过拟合现象(图 6)。

2.4.2　代谢物分类　　代谢组学共鉴定出 1 163 种代谢物,其中正离子模式下有 622 个,负离子模式下有 541 个。进一步对代谢物的种类进行归类,主要包括脂质和类脂、有机酸及其衍生物、有机氧化合物、有机杂环化合物、类苯类等(图 7)。



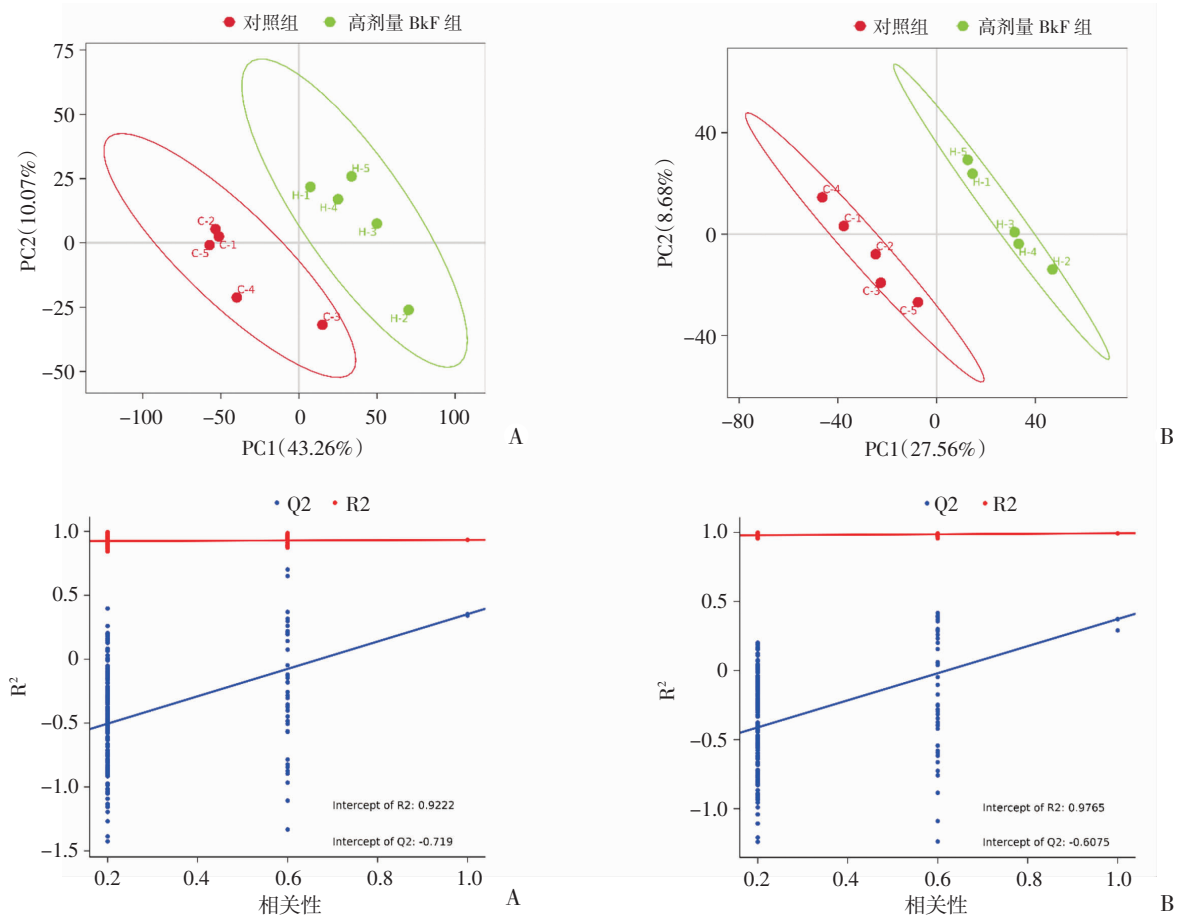
1:对照组;2:高剂量 BkF 组(30.0 mg/kg);a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4　前 10 上、下调差异蛋白的火山图(A)、聚类分析(B)和箱式图(C)



1:对照组;2:高剂量 BkF 组(30.0 mg/kg);a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 5 Western blot 检测 spata46、Zscan21、Rab5b、Afim2 蛋白的表达



A:正离子 PLS-DA 评分图;B:负离子 PLS-DA 评分图;C:正离子模式 PLS-DA 置换检验;D:负离子模式 PLS-DA 置换检验

图 6 代谢组学质量控制分析

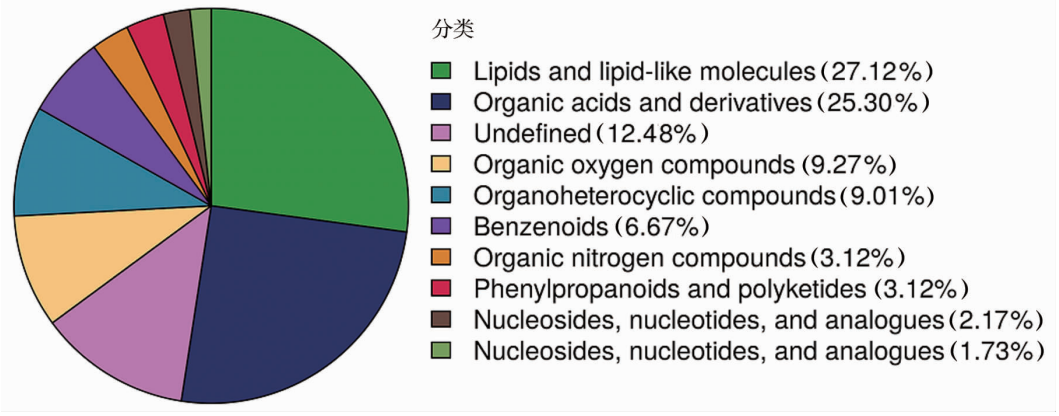
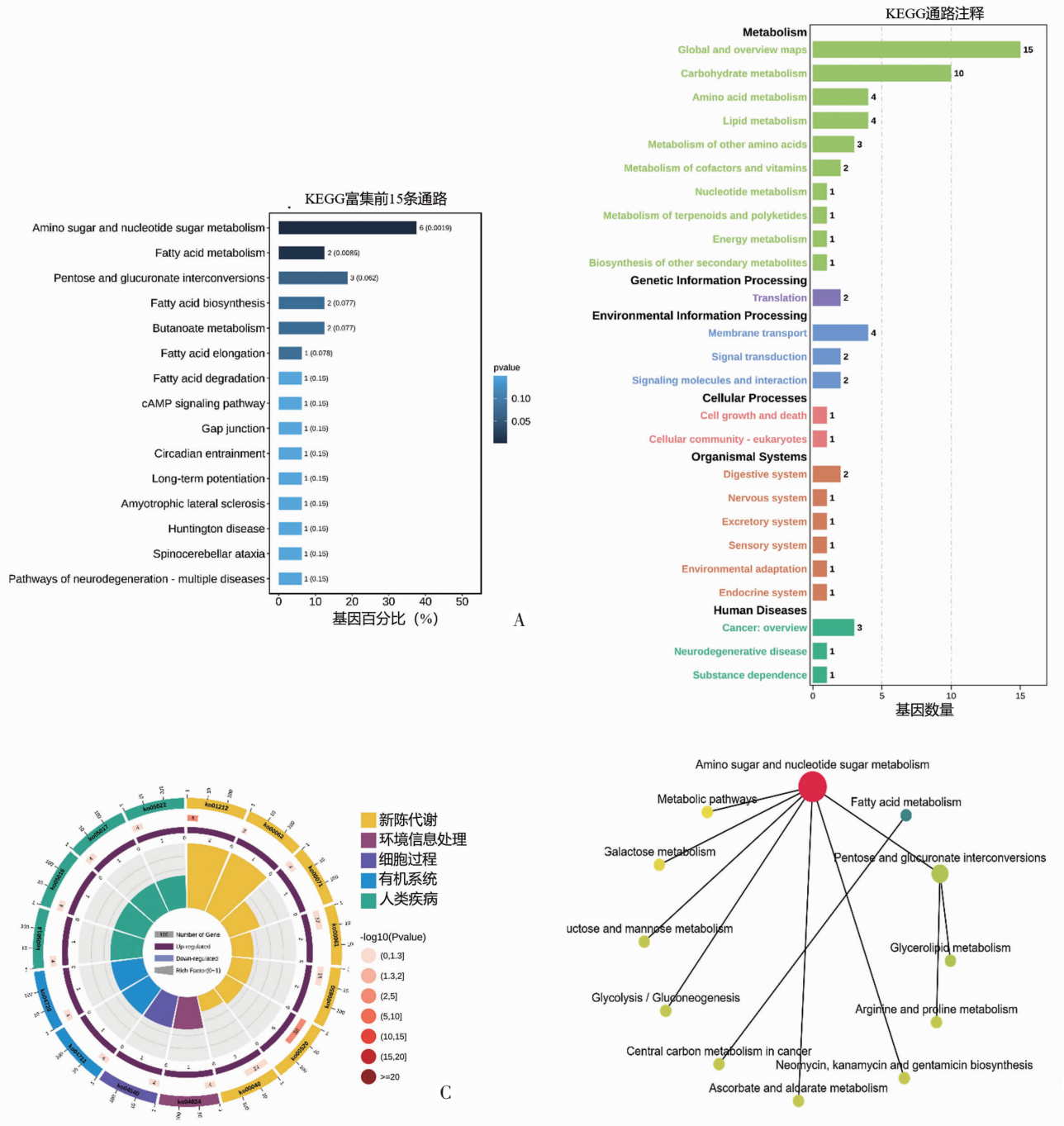


图 7 代谢物的化学分类归属

2.4.3 代谢组学的代谢物和 KEGG 通路分析 为鉴定 BkF 暴露的关键代谢途径,进一步对代谢组学进行分析,对照组和高剂量 BkF 组比较共筛选出差异代谢物 543 种,其中包括 POS 代谢物 223 种,NEG 代谢物 320 种(|Log2 FC|>0.585,P<0.05)。筛选出对照组和高剂量 BkF 组共有且存在相反趋势的前 10 差异代谢物产物(表 1)。进一步对差异代谢产物进行 KEGG 分析,探讨受 BkF 影响的潜在代谢途径,其中 P<0.1 的代谢途径被认为是最相关的途径[9]。将正负离子进行联合分析,KEGG 富集主要涉及氨基糖和核苷酸糖代谢、脂肪酸代谢、戊糖和葡糖醛酸盐的相互转化等信号通路(图 8A)。为进一步了解这些差异代谢物,进行 KEGG 通路注释分析确定生物过程,即代谢、环境信息处理、细胞过程、有机体系统、人类疾病、药物开发等,其中第 1 圈显示了富集的通路和相关代谢产物的数量,第 2 圈显示代谢组背景中的代谢产物数量和富集-Log10(P-value),第 3 圈显示下调代谢物和上调代谢物比例,第 4 圈显示了富集因子。这些生物过程主要与代谢和人类疾病有关(图 8B、C)。通过网络图分析各个通路之间的联系,本研究发现氨基糖和核苷酸糖代谢与其他代谢途径联系最为密切(图 8D)。

表 1 对照组与高剂量 BkF 组共有且存在相反趋势的差异代谢物

代谢物	英文名	质荷比	保留时间/s	FC	P 值	趋势
米格列醇	Miglitol	208.117	123.737	5.101	0.050	上升
戊二酰基肉碱	L-glutarylcarnitine	276.144	384.205	1.872	0.004	上升
脂肪酰基己糖苷	fatty acyl hexoside	353.056	206.022	1.522	0.015	上升
D-2-磷酸甘油酸	D-2-phosphoglyceric acid	184.984	469.641	1.470	0.018	上升
葫芦巴碱	Trigonelline	138.054	285.216	1.336	0.046	上升
3-羟基癸酸	3-Hydroxycapric acid	375.272	36.160	1.330	0.050	上升
吲哚乙酸	Indole lactic acid	158.060	34.725	1.213	0.031	上升
十四烷二酸	Tetradecanedioic acid	257.174	210.928	1.177	0.046	上升
左旋肉碱	L-carnitine	162.112	357.686	1.157	0.019	上升
恩贝酸	Embelin	293.175	109.159	1.147	0.019	上升
松三糖	Melezitose	503.140	306.971	0.717	0.035	下降
1-甲基腺苷	1-methyladenosine	282.119	301.656	0.706	0.036	下降
L-糖蛋白	L-saccharopine	277.139	428.453	0.704	0.014	下降
精氨酸	Arginine	349.230	542.096	0.702	0.047	下降
多肽	Pro-Thr	217.129	376.490	0.672	0.050	下降
β-羟基丁酸	Beta-hydroxybutyrate	103.039	214.131	0.620	0.008	下降
N-乙酰天冬氨酰谷氨酸	N-Acetylaspartylglutamate (NAAG)	363.109	255.293	0.596	0.013	下降
鸢尾蒽酮	Irisxanthone	435.099	24.789	0.427	0.001	下降
S-甲基-5'-硫腺苷	S-Methyl-5'-thioadenosine	298.096	89.639	0.377	0.050	下降
N-神经酰-D-赤型鞘氨酰基磷酸胆碱	N-nervonoyl-d-erythro-sphingosylphosphorylcholine	813.684	202.463	0.246	0.039	下降



A:正负离子 KEGG 富集通路图;B:KEGG 通路注释;C:KEGG 的功能注释 D:KEGG 通路的相互联系

图 8 KEGG 差异代谢产物的关键途径分析

3 讨论

BkF 是高分子量多环芳烃的代表物,在高环多环芳烃中占主导地位,目前,空气中 BkF 的含量可能会逐渐增加[8-9]。现阶段对于 BkF 的研究报道相对较少,其雄性生殖毒性及其作用机制尚不明确。在本研究中,通过构建 BkF 致成年小鼠雄性生殖损伤模型,探讨 BkF 暴露对成年雄性小鼠的生殖毒性作用。结果显示,BkF 暴露下小鼠精子数量和总活力下降,病理染色提示睾丸组织发生损伤,睾丸细胞数量减少。结果表明,BkF 可能通过影响生殖细胞的增殖能力和精子功能,从而对精子质量和男性的生育能力产生不利

的影响。进一步对 BkF 雄性生殖损伤的作用机制进行探索,通过蛋白质组和代谢组的综合分析,阐明 BkF 的雄性生殖毒性作用。其中蛋白质组学分析 KEGG 和 GO 分析发现主要通过调控细胞凋亡和周期以及 DNA 损伤,从而导致雄性生殖损伤。代谢组学分析显示,BkF 可能参与氨基糖和核苷酸糖代谢、脂肪酸代谢、戊糖和葡糖醛酸盐的相互转化等代谢过程。上述结果提示 BkF 可能抑制糖代谢途径和干扰脂肪代谢、线粒体的正常功能,导致葡萄糖的摄取和利用减少、脂肪酸的合成和降解出现问题、造成能量代谢和氧化应激的紊乱,最终导致细胞凋亡、周期改变、DNA 损伤等。

3.1 BkF 对男性生殖毒性的作用机制

前期课题组通过对 CTD 数据库进行筛选和富集分析发现,BkF 对男性生殖损伤主要集中在细胞周期阻滞、氧化应激等通路,并通过细胞实验证实 BkF 主要激活 AhR 受体,导致细胞发生氧化应激和遗传损伤[10]。进一步提示 BkF 可能激活下游分子,引起糖代谢、脂质代谢和能量代谢紊乱。有研究表明,多环芳烃代表物 BaP 降解后糖酵解代谢途径、磷酸戊糖途径、氨基糖和核苷酸糖代谢上调[11]。这与本研究的组学结果分析一致,故推测 BkF 可能也有类似的作用。正常细胞在细胞质进行糖酵解将葡萄糖代谢为丙酮酸,然后在线粒体中代谢为二氧化碳[12]。细胞增殖中,细胞代谢对脂肪酸、核苷酸、戊糖和己糖衍生物等维持生物功能分子需求增加,以促进合成代谢过程[12]。

3.2 蛋白质组学与细胞凋亡、增殖、DNA 损伤及精子发生的关联研究

蛋白质是细胞功能的执行剂。在蛋白质水解中,蛋白质被降解为小分子氨基酸,氨基酸进一步代谢产生代谢产物如尿素、尿酸、丙酮酸等,并且蛋白质结构和稳定性的改变直接影响代谢过程[13]。本研究采用蛋白质组学在 BkF 暴露的睾丸组织中共鉴定出 99 个差异蛋白,其中与精子相关的蛋白包括 Spata46、Setd2、Rpl10l、Rad51c、Zscan21 等。研究发现,Spata46 仅在睾丸中表达,缺乏会损害精子形状和生育能力[14]。Sted2 与 DNA 损伤和细胞骨架蛋白甲基化有关[15],缺乏会导致参与糖酵解代谢酶上调,影响细胞内丙酮酸浓度,干扰代谢过程[16]。Rpl10l 是小鼠生精细胞中的核糖体成分,也是导致男性不育的新型候选基因,其和 Rad51c[17] 都在精子的减数分裂过程中发挥关键作用[18]。Zscan21 在小鼠睾丸中的表达,具有调节精子发生过程中转录的潜力[19]。Rab5b 是一种小的 GTP 酶,参与各种细胞活动包括增殖、迁移、凋亡以及激活丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MEK-ERK)信号[20]。Dock11 与免疫疾病有关,激活鸟嘌呤核苷酸交换因子 GTP 酶,导致细胞活化、DNA 合成以及蛋白质表达和增殖的变化[21]。Aifm2 被称为细胞凋亡诱导因子样线粒体相关死亡诱导剂,也是 P53 诱导基因,过表达则导致核外围染色质凝聚和凋亡体形成[22]。这些蛋白质许多都和细胞凋亡增殖、DNA 损伤、精子发生有关,提示其可能参与 BkF 致雄性生殖损伤过程,但具体机制还需进一步研究。

3.3 代谢组学揭示的氨基糖和核苷酸糖代谢与其他代谢途径的密切关联性

基于代谢组学分析,本研究共筛选出差异代谢物 543 种,其中包括 POS 代谢物 223 种,NEG 代谢物 320 种。其中显著上调的差异代谢物中吲哚乙酸是一种重要的植物激素,研究表明,吲哚乙酸会导致精子发生停滞、睾丸退行性变化、生精小管大小减小等精子发生过程紊乱[23]。精子的脂肪酸组成已被证明对其功能很重要,左旋肉碱在精子代谢中起着关键作用,很容易通过 β 氧化提供能量[24]。显著下调的代谢物中,β-羟基丁酸是维持代谢稳态的能量底物、调节脂肪分解、氧化应激和神经保护的信号分子,缺乏会导致脂肪分解、异常的糖酵解、ATP 生成减少[25]。精氨酸是精子发生的营养必需氨基酸,精氨酸含量减少可能会降低男性的生育能力[26]。以上文献报道与本研究结果一致,本研究结果表明,BkF 暴露可能会导致脂代谢、糖代谢和能量代谢异常。我们通过差异代谢物进行 KEGG 富集分析发现,BkF 导致雄性生殖损伤主要涉及氨基糖和核苷酸糖代谢、脂肪酸代谢、戊糖和葡糖醛酸盐的相互转化等代谢通路,其中氨基糖和核苷酸糖代谢与其他代谢途径联系最为密切。

有研究表明,毒物对睾丸的作用可能通过提高磷酸戊糖途径与脂肪酸合成从而造成睾丸发育的差异,同时睾丸与精子中的脂质(胆固醇、磷脂、脂肪酸等)影响着其形态与功能,并对脂代谢的相关代谢物进行检测[27]。目前,对于代谢物的种类和鉴定,本研究还未能全部探索,后续将会进行相关的研究进一步探讨 BkF 对男性生殖毒性的作用机制。此外,本研究大多数多环芳烃数据来自动物研究,但对于多环芳烃暴露后的毒性作用了解可能不足。后续将进一步扩大样本

量,结合细胞、动物、人群实验3个方面对BkF暴露后凋亡信号通路的关键靶分子进行研究。

综上所述,本研究揭示了BkF对雄性生殖系统的损伤机制,重点聚焦于与精子生成、细胞凋亡和周期、DNA损伤及能量代谢相关的关键蛋白。这些蛋白的变化与代谢组学数据相互呼应,涉及氨基酸代谢、脂代谢及能量代谢等重要代谢途径,提示这些生物过程可能在BkF诱导的雄性生殖损伤中发挥着重要的作用。未来的研究可以进一步探索这些关键途径,以寻找潜在的治疗策略或预防措施,减少BkF对生殖系统的不良影响。

参考文献:

[1] MASIH J, DYAVARCHETTY S, NAIR A, *et al*. Concentration and sources of fine particulate associated polycyclic aromatic hydrocarbons at two locations in the western coast of India[J]. Environ Technol Innov, 2019, 13: 179-188. DOI: 10.1016/j.eti.2018.10.012.

[2] YAZDANI M. Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity[J]. Drug Chem Toxicol, 2020, 43(1): 71-78. DOI: 10.1080/01480545.2018.1497054.

[3] ZHANG L, JI X L, DING F, *et al*. Apoptosis and blood-testis barrier disruption during male reproductive dysfunction induced by PAHs of different molecular weights[J]. Environ Pollut, 2022, 300: 118959. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.118959.

[4] GARLAND M A, GEIER M C, BUGEL S M, *et al*. Aryl hydrocarbon receptor mediates larval zebrafish fin duplication following exposure to benzofluoranthenes[J]. Toxicol Sci, 2020, 176(1): 46-64. DOI: 10.1093/toxsci/kfaa063.

[5] DU L, CHEN W, CHENG Z X, *et al*. Novel gene regulation in normal and abnormal spermatogenesis[J]. Cells, 2021, 10(3): 666. DOI: 10.3390/cells10030666.

[6] LI M H, ZENG Y X, GE L L, *et al*. Evaluation of the influences of low dose polybrominated diphenyl ethers exposure on human early retinal development[J]. Environ Int, 2022, 163: 107187. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107187.

[7] PENG Z J, YANG Q Z, YEERKEN R, *et al*. Multi-omics analyses reveal the mechanisms of Arsenic-induced male reproductive toxicity in mice[J]. J Hazard Mater, 2022, 424(Pt C): 127548. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127548.

[8] LELE C K, OLUBA O M, ADEYEMI O S. Impact of COVID-19 lockdown and health risk modeling of polycyclic aromatic hydrocarbons in Onne, Nigeria[J]. Environ Monit Assess, 2022, 195(1): 166. DOI: 10.1007/s10661-022-10670-z.

[9] BARBOSA F Jr, ROCHA B A, SOUZA M C O, *et al*. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination, kinetics in the human body, and toxicity[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2023, 26(1): 28-65. DOI: 10.1080/10937404.2022.2164390.

[10] 王丹丹, 王芙蓉, 杨晓燕, 等. 苯并[k]荧蒽(BkF)致雄性生殖细胞损害的初步研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(8): 740-748. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202111178.
WANG D D, WANG F R, YANG X Y, *et al*. Benzo[k]fluoranthene induces male germ cell damage[J]. J Army Med Univ, 2022, 44(8): 740-748. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202111178.

[11] LU Q Y, CHEN K Y, LONG Y, *et al*. Benzo(a)pyrene degradation by cytochrome P450 hydroxylase and the functional metabolism network of *Bacillus thuringiensis*[J]. J Hazard Mater, 2019, 366: 329-337. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.004.

[12] LEAL-ESTEBAN L C, FAJAS L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(5): 165715. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165715.

[13] NALBANTOGLU S, KARADAG A. Metabolomics bridging proteomics along metabolites/oncometabolites and protein modifications: Paving the way toward integrative multiomics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 199: 114031. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114031.

[14] CHEN J B, GU Y L, ZHANG Z, *et al*. Deficiency of SPATA46, a novel nuclear membrane protein, causes subfertility in male mice[J]. Biol Reprod, 2016, 95(3): 58. DOI: 10.1095/biolreprod.116.140996.

[15] HU M, HU M, ZHANG Q, *et al*. SETD2, an epigenetic tumor suppressor: a focused review on GI tumor[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2020, 25(4): 781-797. DOI: 10.2741/4834.

[16] WIEDNER H J, TORRES E V, BLUE R E, *et al*. SET domain containing 2 (SETD2) influences metabolism and alternative splicing during myogenesis[J]. FEBS J, 2022, 289(21): 6799-6816. DOI: 10.1111/febs.16553.

[17] KUZNETSOV S, PELLEGRINI M, SHUDA K, *et al*. RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest

in males and sister chromatid separation at metaphase II in females[J]. J Cell Biol, 2007, 176(5): 581-592. DOI: 10.1083/jcb.200608130.

[18] TU C F, MENG L L, NIE H C, *et al*. A homozygous RPL10L missense mutation associated with male factor infertility and severe oligozoospermia[J]. Fertil Steril, 2020, 113(3): 561-568. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.10.029.

[19] YAN Z C, FAN D D, MENG Q J, *et al*. Transcription factor ZFP38 is essential for meiosis prophase I in male mice[J]. Reproduction, 2016, 152(5): 431-437. DOI: 10.1530/REP-16-0225.

[20] ZHAO X, YI Y P, MENG C, *et al*. MiRNA-575 suppresses angiogenesis by targeting Rab5-MEK-ERK pathway in endothelial cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20181218. DOI: 10.1042/BSR20181218.

[21] TANGYE S G, MEYTS I. *DOCK*11 and immune disease[J]. N Engl J Med, 2023, 389(6): 563-567. DOI: 10.1056/NEJMe2305431.

[22] TAN J H, CAO R C, ZHOU L, *et al*. ATF6 aggravates acinar cell apoptosis and injury by regulating p53/AIFM2 transcription in severe acute pancreatitis[J]. Theranostics, 2020, 10(18): 8298-8314. DOI: 10.7150/thno.46934.

[23] HASSAN H A, ISA A M, EL-KHOLY W M, *et al*. Testicular disorders induced by plant growth regulators: cellular protection with proanthocyanidins grape seeds extract[J]. Cytotechnology, 2013, 65(5): 851-862. DOI: 10.1007/s10616-012-9525-3.

[24] ROMAROWSKI A, FEJZO J, NAYYAB S, *et al*. Mouse sperm energy restriction and recovery (SER) revealed novel metabolic pathways[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1234221. DOI: 10.3389/fcell.2023.1234221.

[25] WANG L, CHEN P J, XIAO W H. β-hydroxybutyrate as an anti-aging metabolite[J]. Nutrients, 2021, 13(10): 3420. DOI: 10.3390/nu13103420.

[26] CHEN J Q, LI Y S, LI Z J, *et al*. Dietary l-arginine supplementation improves semen quality and libido of boars under high ambient temperature[J]. Animal, 2018, 12(8): 1611-1620. DOI: 10.1017/S1751731117003147.

[27] 要荣宇. 影响湖羊睾丸发育的差异代谢物筛选及机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
YAO R Y. Screening of differential metabolites affecting testicular development in Hu sheep and its mechanism[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.

(**收稿**:2023-10-22;**修回**:2024-02-19)

(编辑 邓强庭)