

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2025.01.004

环磷酰胺致大鼠弱精症的代谢组学特征*

宋嘉琳 魏雅岚 俞东红 范小路 王心睿[△]

(福建省妇幼保健院医学研究中心 福建 福州 350122)

摘要 目的:观察环磷酰胺致大鼠弱精症模型(CP)与正常组大鼠的代谢差异,探索其潜在的代谢特征及通路机制。**方法:**用环磷酰胺(30 mg/kg)连续腹腔注射7天,建立大鼠弱精症模型;通过精子计数来检测精子浓度和活力;采用HE染色观察睾丸形态;采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)非靶向代谢组学检测两组间的代谢差异。采用试剂盒检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)、脂质氧化酶(MDA)、总谷胱甘肽的浓度。**结果:**与正常组相比,环磷酰胺组的精子浓度降低,精子活力下降。HE染色结果表明,环磷酰胺组的各级生精细胞排列紊乱,数量较正常组显著减少。提示弱精症大鼠模型建立成功。代谢组学分析结果显示两组代谢轮廓分离趋势较好,共筛选出129种差异代谢物。对差异代谢物进行KEGG通路富集分析,结果显示胆碱代谢、甘油磷脂代谢及鞘脂信号通路等代谢通路在两组间具有显著差异。KEGG鞘脂信号通路图显示活性氧(ROS)参与了该信号通路调控。弱精组中血清SOD和总谷胱甘肽浓度下降,MDA浓度增高,差异具有统计学意义。**结论:**弱精症的发生可能与其抗氧化水平下降,脂质氧化水平升高有关,过度的氧化应激可能破坏精子膜结构的完整性,对精子DNA造成一定的损伤,从而降低精子的数量和活力,其机制与鞘脂代谢通路密切相关。

关键词:弱精症;代谢组学;氧化应激;环磷酰胺;活性氧

中图分类号:R3;Q95-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2025)01-26-10

Metabolomic Characteristics of Cyclophosphamide Induced Asthenospermia in Rats*

SONG Jia-lin, WEI Ya-lan, YU Dong-hong, FAN Xiao-lu, WANG Xin-ru[△]

(Medical Research Center, Fujian Maternity and Child Health Hospital, Fuzhou, Fujian, 350001, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to investigate the metabolic differences between control and cyclophosphamide (CP)-induced asthenospermia in rats, and to explore the potential metabolic characteristics and pathway mechanisms involved. **Methods:** A rat model of asthenospermia was established by administering cyclophosphamide at a dose of 30 mg/kg for 7 consecutive days. Sperm concentration and motility were evaluated through sperm count analysis, while testicular morphology was assessed using hematoxylin-eosin (HE) staining. The metabolic differences between the control and asthenospermia groups were analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) within a non-targeted metabolomics framework. Concentrations of superoxide dis-

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2020J05281);福建省妇幼保健院科技创新启动基金项目(妇幼 YCXY21-06)

作者简介:宋嘉琳(1991-),女,博士,研究实习员,主要研究方向:氧化应激与不孕不育,E-mail: jialinson@fjmu.edu.cn

[△] 通讯作者:王心睿(1990-),男,博士,助理研究员,主要研究方向:表观遗传学,E-mail: wanxiru@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2024-09-21)

mutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and total glutathione in serum were measured using specific reagent kits. **Results:** The results revealed a significant reduction in both sperm concentration and motility in the CP-treated group compared to the control group. HE staining showed disorganized testicular architecture and a marked decrease in the number of spermatogenic cells at all stages in the CP group. These findings confirmed the successful establishment of the asthenospermia model. Metabolomic analysis identified 129 differential metabolites between the two groups. KEGG pathway enrichment analysis indicated significant alterations in choline metabolism, glycerophospholipid metabolism, and sphingolipid signaling pathways. Additionally, the sphingolipid signaling pathway analysis highlighted the involvement of reactive oxygen species (ROS) in modulating this pathway. Furthermore, a significant decrease in SOD and total glutathione levels, alongside a marked increase in MDA levels in serum, was observed in the CP group. **Conclusions:** The results suggest that asthenospermia may be associated with reduced antioxidant levels and increased lipid peroxidation. Excessive oxidative stress could compromise the structural integrity of sperm membranes and induce DNA damage, thereby impairing sperm count and motility. This phenomenon appears to be closely linked to alterations in the sphingolipid metabolic pathway.

Key words: Asthenospermia; Metabolomics; Oxidative stress; Cyclophosphamide; Reactive oxygen species

Chinese Library Classification(CLC): R3; Q95-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2025)01-26-10

前言

弱精症在男性不育的病因中最为常见,约占46%,且发病率呈逐年上升趋势^[1,2]。弱精症主要表现为精子运动能力下降,通常伴随低精子浓度或异常形态,该病的发病机制尚未完全阐明。研究证明,精子的代谢是一个复杂而精细的过程,它涉及精子的生成、成熟、储存等多个阶段^[3],弱精症起因可发生在其中任何一个阶段。先前研究表明,精子的运动能力和受精能力都与其代谢调控密切相关^[4]。

氧化应激是指体内氧化系统与抗氧化系统失衡的一种状态,产生大量活性氧自由基和活性氮自由基^[5]。在精子发生发育过程中,当其产生过多或清除不足时,就会对细胞和组织造成损伤,导致精子膜失去流动性和完整性,进而降低精子的运动能力和存活率^[6-9]。然而,体内氧化和抗氧化作用在弱精症代谢中的调控机制尚未完全阐明。

本研究通过代谢组学方法观察弱精症大鼠精子代谢变化差异,探讨氧化应激在弱精症代谢中的作用机制,为弱精症患者的诊断和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级SD雄性大鼠,180 g-200 g,购自上海吴氏动物,动物合格证:SCXK(沪)2022-0004;注射用环磷酰胺,0.2 g/支,购自上海百特公司;SOD、MDA、总谷胱甘肽试剂盒购自碧云天;HE染色试剂盒购自北京酷来博公司;光学显微镜、自动组织脱水机、轮转式切片机、石蜡包埋机购自美国赛默飞公司;全自动酶标仪购自美国bio-rad公司。

1.2 方法

1.2.1 弱精症大鼠模型建立 将SPF级SD雄性大鼠随机分为2组,每组22只,饲养在光照/黑暗周期为12 h的环境内,室温为20℃-25℃,湿度为60%-70%,提供高压鼠粮和灭菌水供大鼠自由进食。适应性养7天后开始实验。环磷酰胺(CP)按30 mg/kg连续腹腔注射7天,观察并记录大鼠体毛、体重变化、饮食和活动情况。到期对大鼠进行取材,心脏采血2 mL,取一侧睾丸放置于4%多聚甲醛中固定,用于组织化学染色。取附睾尾放入37℃生理盐水中,用于检测精子活力和精子数目。取附睾头放于液氮中,冻存至-80℃,用于代谢组学检测。

1.2.2 精子数目及活力检测 取每只大鼠单侧附睾去除脂肪及结缔组织,将附睾尾剪碎,置于预热的37℃生理盐水中(500 μL),静置10 min,使精子充分释放到生理盐水中,过滤后制成精

子悬液。取 10 μL 精子悬液滴入 190 μL 生理盐水中稀释 20 倍, 取 10 μL 滴于血细胞计数板上, 放置显微镜下计数, 通过计算公式计算精子的终浓度。精子浓度计算公式为: 精子浓度 (个/mL) = $a \times 10^4 \times 20$ (a 为血球计数板 4 个区域内的精子个数的平均数)。另取 40 μL 滴到干净的载玻片上, 压片法观察并计算精子活力。根据 WHO 标准, 精子活力分为 4 级: a, 快速向前运动; b, 慢或呆滞向前运动; c, 非向前运动; d, 不动。

1.2.3 睾丸组织化学染色 将睾丸组织浸泡于 4% 多聚甲醛中室温固定 2-3 天, 待定型后用刀片切至合适厚度放于包埋盒中, 放入全自动脱水机进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明, 随后浸蜡包埋冷却, 用手动轮转机进行切片, 捞片, 烘干, 制成石蜡切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水, 采用苏木素-伊红染色试剂盒进行染色, 最后经梯度酒精脱水、烘干、封片, 在显微镜下观察两组睾丸组织病理学形态差异, 并拍摄记录。

1.2.4 非靶向代谢组学检测 剥离新鲜附睾组织, 用眼科剪剪下附睾头, 约黄豆粒大小, 放于 EP 管中, 液氮保存, 用于代谢组学的检测。由上海鹿明生物有限公司完成。多元统计分析采用无监督的主成分分析 (PCA) 以观察两样本之间的总体分布以及在分析过程中的稳定性, 采用有监督的偏最小二乘法分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA) 来识别两组间代谢轮廓的显著差异, 并筛选出组间差异代谢物。为防止模型过拟合, 采用 200 次置换检验以评估该模型质量。T 检验 (Student's t test) 和变异倍数分析 (Fold change analysis), 用于比较两组之间的代谢产物差异。利用 T 检验验证筛选出的差异代谢物的显著性, 筛选标准为 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP 值大于 1, 且 T 检验的 P 值小于 0.05。采用 Pearson 相关系数 / Pearson 积差相关系数来衡量两个变量之间的线性相关性。最后, 通过差异代谢物的 KEGG ID 进行通路富集分析, 获得代谢通路的富集结果。

1.2.5 血清 SOD、MDA 及总谷胱甘肽检测 大鼠心脏采血 2 mL, 室温下静置 30 min, 3000 g 离心 5 min, 取上清液置于新 EP 管中, 用于实验。血清 SOD、MDA 以及总谷胱甘肽浓度依照相应试剂盒说明书依次进行检测。

1.3 统计学分析

采用 Sigmaplot 11.0 统计软件进行数据分析统计, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用单因素方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。代谢组学数据用 Progenesis QI v2.3 软件 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) 进行统计分析。

2 结果

2.1 正常及环磷酰胺注射组大鼠体重的比较

根据大鼠体重变化图 (图 1), 可以看出, 从注射开始第一天起, 环磷酰胺注射使大鼠体重受到抑制, 到第三天体重的抑制逐渐明显, 与正常组相比, 环磷酰胺注射组 (CP 组) 大鼠体重明显较低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

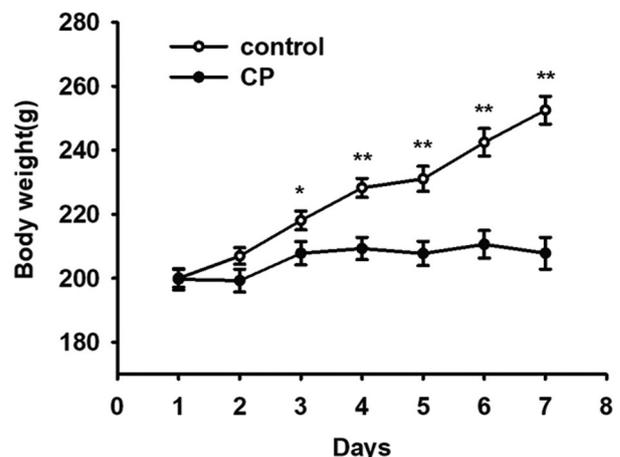


图 1 正常及环磷酰胺注射组大鼠体重的比较

Fig.1 Comparison of the body weight of rat in control group and CP group

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=22$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 正常及弱精症组精子的活力情况

大鼠附睾精子计数结果显示, 正常组中精子浓度为 $72.6 \pm 4.43 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 精子活力为 $63.65 \pm 1.00\%$; 环磷酰胺注射组中, 精子浓度明显减少, 为 $10.2 \pm 3.97 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 精子活力显著下降为 $31.66 \pm 2.15\%$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.3 正常及弱精症组睾丸 HE 染色情况

大鼠睾丸 HE 染色结果显示, 正常组中睾丸中各级生精细胞排列整齐, 几乎所有的生精小管都处于完全生精状态, 曲细精管内可见完整的精子发生; 环磷酰胺注射组中, 各级生精细胞

排列紊乱，睾丸生精小管内各级精母细胞以及成熟精子数量明显减少，管腔直径增大和空泡化(见图 2)。综合表 1 和图 2 提示，大鼠弱精症模型建立成功。

表 1 正常组与环磷酰胺注射组大鼠附睾精子浓度和活力的比较

Table 1 Comparison of sperm concentration and motility rate in control group and CP group

| Groups | Amount(n) | Sperm concentration($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) | Sperm motility rate(%) |
|---------------|-----------|--|------------------------|
| Control Group | 10 | 72.6 \pm 4.43 | 63.65 \pm 1.00 |
| CP Group | 10 | 10.2 \pm 3.97** | 31.66 \pm 2.15** |

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$, n=10. **P<0.01, compared with control group.

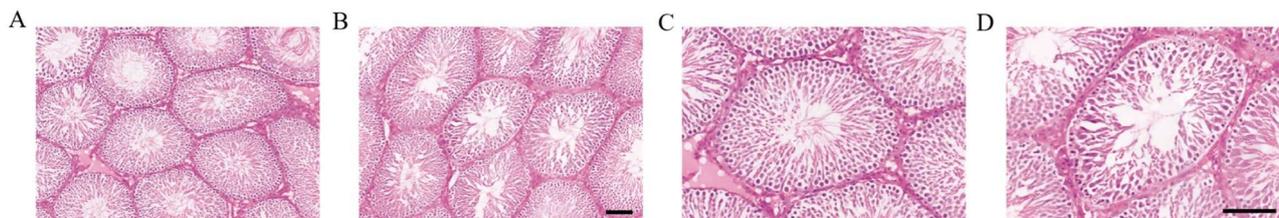


图 2 大鼠睾丸 HE 染色

Fig.2 HE staining image of rat testis

A: 正常组, 10 倍镜; B: 弱精症组, 10 倍镜; C: 正常组, 20 倍镜; D: 弱精症组, 20 倍镜。

A: control group, 10 \times ; B: CP group, 10 \times ; C: control group, 20 \times ; D: CP group, 20 \times .

2.5 非靶向代谢组学分析弱精症大鼠的精子代谢差异

2.5.1 多元统计分析 利用多元统计分析观察两样本之间的总体分布以及在分析过程中的稳定性。如图所示,PCA 结果表明 QC 样本紧密聚集,表示检测过程中仪器的稳定性良好,结果可信;而且两组代谢轮廓呈现出一定的分离趋势,提示弱精症大鼠的附睾精子代谢物与正常

组存在差异。进一步采用有监督的偏最小二乘法分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)模型区分出两组的代谢轮廓,其 R2Y 和 Q2Y 值分别为 0.965 和 -0.444 (为防止模型过拟合,本研究采用 200 次置换检验以评估该模型质量,结果显示 Q2Y =-0.444<0,表明模型有效且未出现过拟合现象,如图 3 所示)。

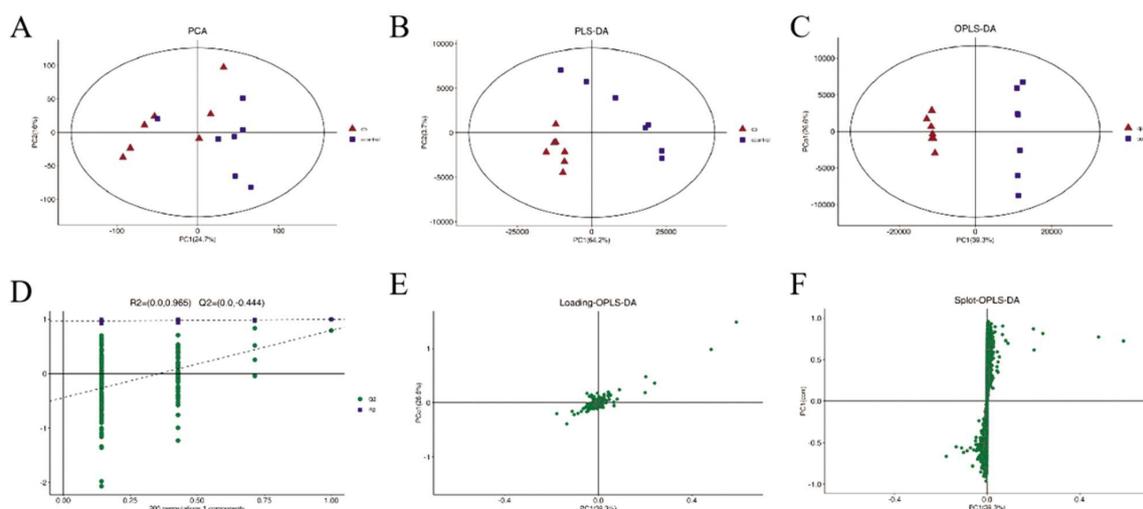


图 3 大鼠附睾组织样本的多元统计分析和检验

Fig.3 Multivariate statistical analysis and model verification in rat epididymis tissue samples

A: PCA 图; B: PLS-DA 图; C: OPLS-DA 图; D: Permutation 图; E: Loading-OPLS-DA 图; F: Splot-OPLS-DA 图。

A: PCA plot; B: PLS-DA plot; C: OPLS-DA plot; D: Permutation plot; E: Loading-OPLS-DA plot; F: Splot-OPLS-DA plot.

2.5.2 单变量统计分析 如图 4 所示,火山图 反映了在正常组和弱精症组大鼠中筛选出来的

差异代谢物的集中和离散趋势。其中左上方的蓝色点表示下调的差异代谢物，右上方的红色点代表上调的差异代谢物，下方的灰色点则表示差异不显著的代谢物。由图可直观地看到正常组和弱精症组间差异代谢物的总体情况，提示正常与弱精症之间存在显著的代谢差异（见图 4）。

2.5.3 差异代谢物筛选 本研究对差异代谢物进行筛选，最终筛选出 129 种差异代谢物，对排列在前 20 的差异代谢物进行统计分析。如图所示，图 A 为差异代谢物的热图，展示差异代谢物在每组样本中的表达丰度。图 B 为差异代谢物的火山图，展示筛选出来的正常组和弱精症组之间差异代谢物显著性排列在前 20 的分布情况（见图 5）。

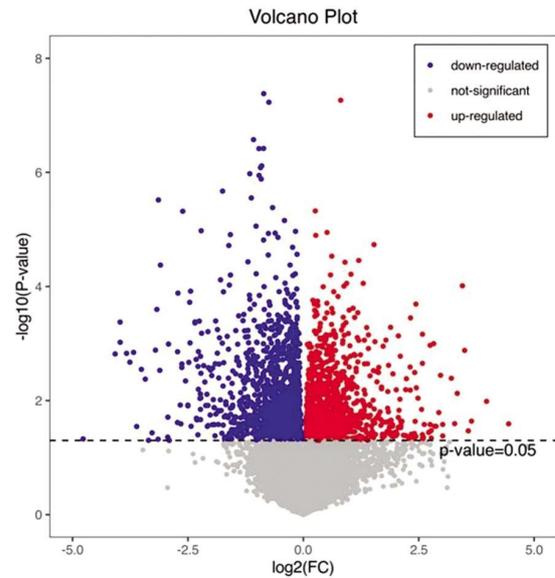


图 4 差异代谢物分布情况火山图

Fig.4 Volcano plot of differential metabolite distribution

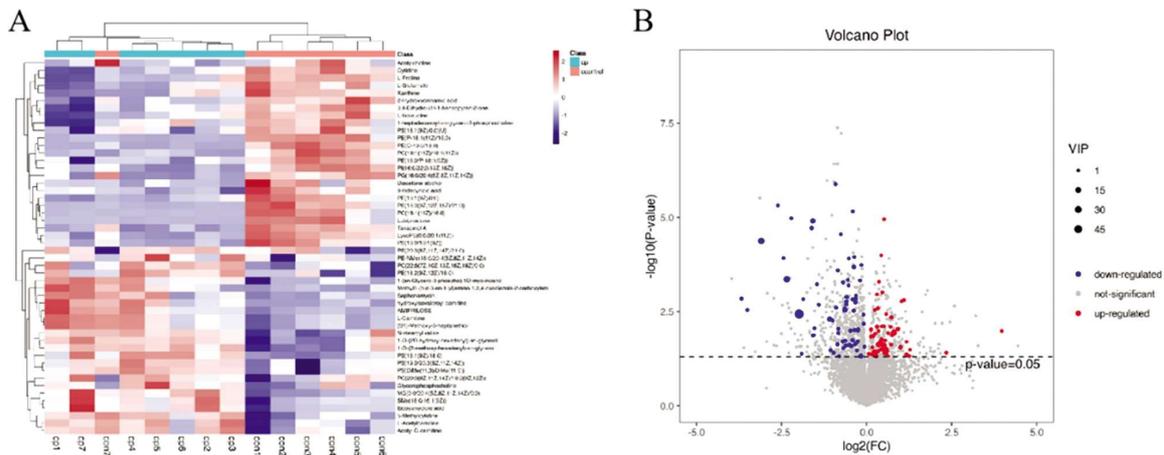


图 5 显著差异代谢物的热图和火山图

Fig.5 Heatmap and volcano plot of significantly difference in metabolites

2.5.4 相关性分析 本研究进一步对正常组和弱精症组大鼠的差异代谢物进行相关性分析。如图所示为相关性程度排列在前 50 的差异代谢物的相关程度，其中红色区域的点代表差异代谢物正相关，蓝色区域的点表示差异代谢物负相关（见图 6），如 L- 肉碱等有机氮化合物以及 L- 乙酰肉碱、乙酰-D- 肉碱、甘油磷酸胆碱等脂质样分子，提示在正常组和弱精症组的显著差异的代谢物中，存在明显的相关性，其相互作用可能共同导致了弱精症的发生发展。

2.5.5 代谢通路富集分析 本研究进一步对差异代谢物进行 KEGG 富集分析，结果显示胆碱代谢、甘油磷脂代谢及鞘脂信号通路等代谢通路在正常组和弱精症组之间具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 7)。其中，在鞘脂信号通路富集图

中，我们进一步发现了 ROS 参与了该信号通路调控，提示氧化应激可能与鞘脂信号通路密切相关，共同促进了弱精症的发生发展(图 8)。

2.6 正常及弱精症组血清 SOD、MDA、总谷胱甘肽情况

取大鼠血清，检测 SOD、MDA、总谷胱甘肽的含量，如图 9 所示，弱精症组的 SOD 和总谷胱甘肽浓度明显低于正常组（SOD 正常组 VS 弱精症组： 0.59 ± 0.06 VS 0.44 ± 0.11 ；总谷胱甘肽正常组 VS 弱精症组： 12.47 ± 3.20 VS 9.27 ± 1.94 ），差异具有统计学意义，提示弱精症大鼠血清中的抗氧化水平降低。

而弱精症中的 MDA 水平明显高于正常组（MDA 正常组 VS 弱精症组： 21.99 ± 11.30 VS 46.39 ± 12.33 ），差异具有统计学意义，提示弱

精症大鼠血清可能存在较高的氧化应激水平，MDA(见图9)。导致脂质过氧化反应增强，从而产生更多的

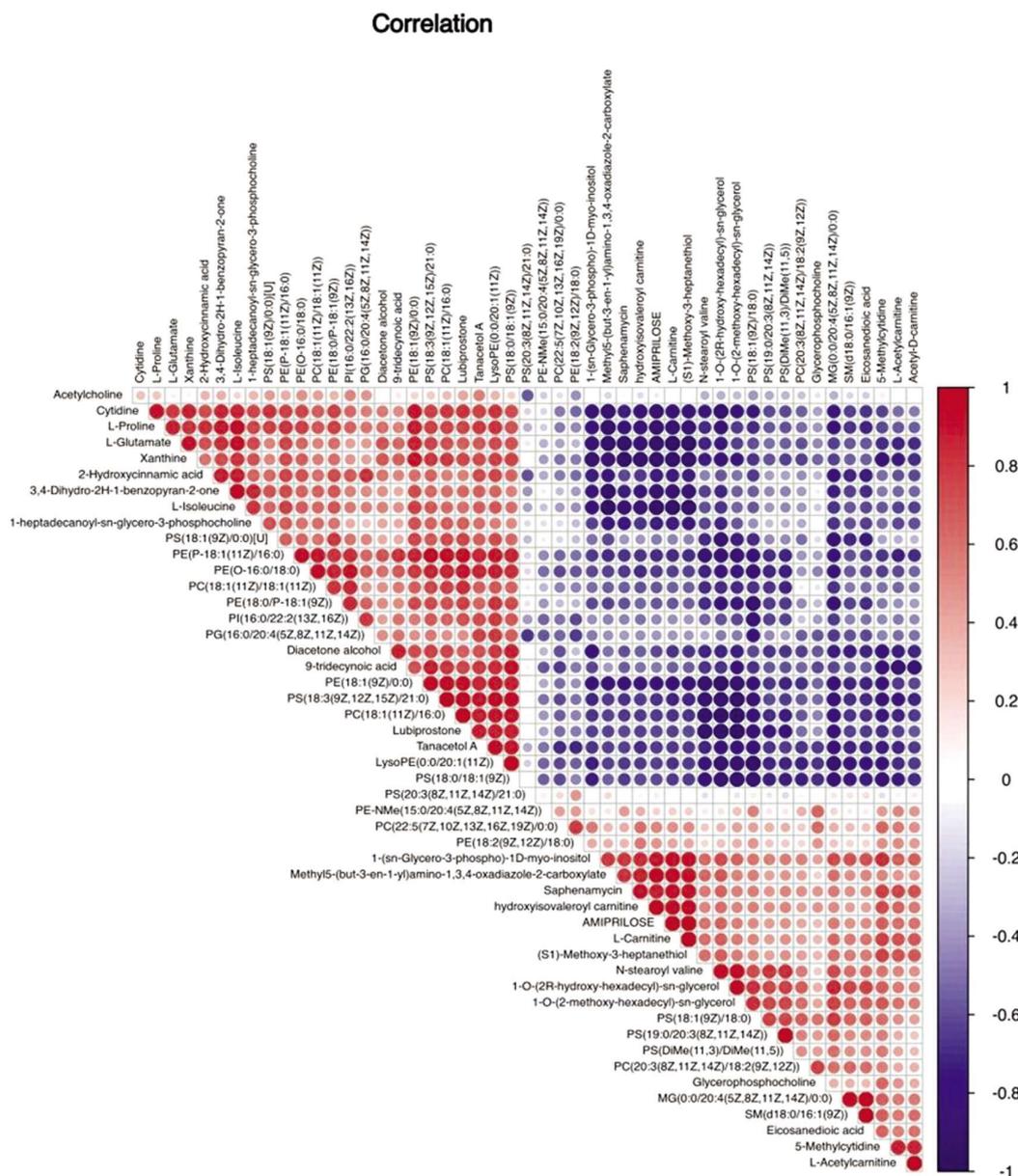


图 6 TOP-50 差异代谢物的相关性分析

Fig.6 Correlation analysis diagram of TOP-50 differential metabolites

3 讨论

弱精症是男性不育患者群体中的常见病症。研究表明,弱精症的发生与生殖道感染^[10-12]、基因突变^[13-16]、以及环境因素(如环境污染、化学物质暴露)^[17,18]等多种因素密切相关。其发病机制复杂多样,且不同患者之间存在差异性,导致临床上弱精症的治疗难度较大,即使经过现有的一些治疗也很难达到理想的生育效果。尽管近年来,国内外研究人员对弱精症的病因及其发病机制进行了深入研究,但至今仍有许多

问题尚未解决,比如弱精症中精子运动能力下降的具体分子机制仍不清楚。随着组学技术的发展,研究者们开始从分子水平精准探讨弱精症的发病机制,为弱精症的临床诊断和治疗提供了新的思路。

本研究通过连续腹腔注射环磷酰胺(30 mg/kg)7天建立大鼠弱精症模型,在注射环磷酰胺第3天开始逐渐表现出精神萎靡,体重增长受到明显抑制,甚至呈现下降趋势(图1)。环磷酰胺注射7天后取材发现环磷酰胺注射组较正常组大鼠精子浓度和活力明显下降(表1)。辜

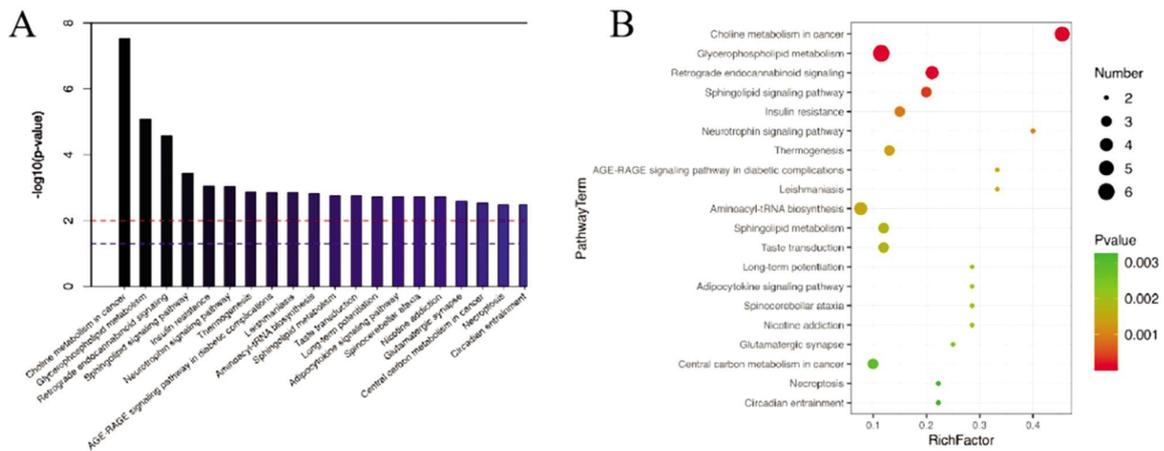


图 7 前 20 显著差异代谢通路富集图和气泡图

Fig.7 Enrichment map and bubble chart of top 20 significantly different metabolic pathways

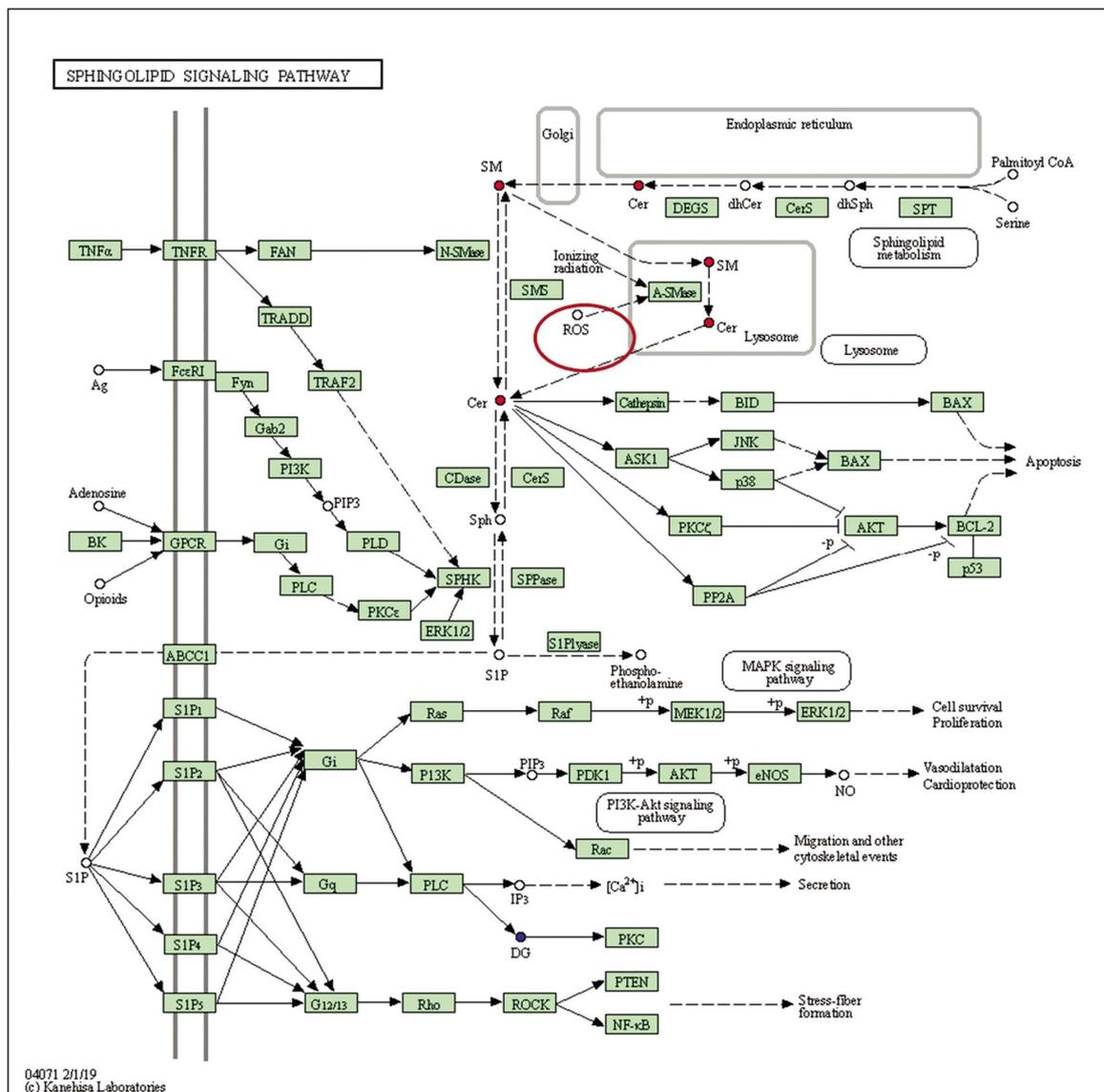


图 8 KEGG 鞘脂信号富集通路图

Fig.8 KEGG enrichment map of sphingolipid signaling pathway

丸 HE 染色显示与正常组相比，环磷酸胺注射组睾丸生精小管排列紊乱，各级生精细胞数量

减少(图 2)。提示：弱精症模型建立成功。环磷酸胺是一种广泛应用的抗肿瘤药物，其在体内

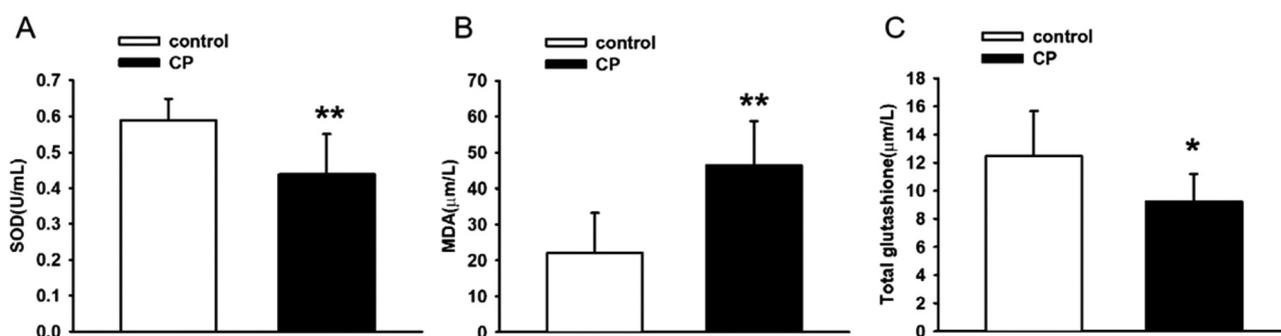


图9 正常及弱精症组血清 SOD、MDA、总谷胱甘肽情况

Fig.9 Serum SOD, MDA, and total glutathione levels in normal and asthenospermia groups

A: 正常及弱精症组血清 SOD 浓度; B: 正常及弱精症组血清 MDA 浓度;

C: 正常及弱精症组血清总谷胱甘肽浓度。

A: Concentration of SOD in serum of normal and asthenospermia groups; B: Concentration of MDA in serum of normal and asthenospermia groups;

C: Concentration of total glutathione in serum of normal and asthenospermia groups.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=12. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group.

经过肝脏的细胞色素 P450 氧化酶的代谢转化为醛磷酰胺。值得注意的是,醛磷酰胺本身并不稳定,能够在肿瘤细胞内进一步转化为具有活性的磷酰胺氮芥,从而干扰 DNA 和 RNA 的功能^[19]。尽管环磷酰胺在疾病治疗中发挥了重要作用,但其也伴随了一系列不良反应,尤其是对生殖系统的损害^[20]。研究表明,环磷酰胺能够影响精子发生,导致弱精症甚至不育。此外,环磷酰胺还会抑制精原细胞的 DNA 合成,并影响其细胞周期^[21]。因此,利用环磷酰胺建立弱精症模型,对于探讨弱精症中精子活力下降的机制具有重要的研究价值。

代谢组学 (Metabonomics) 作为系统生物学的重要组成部分,传承了基因组学、转录组学和蛋白质组学的研究思路,使研究对象从微观的基因视角变成宏观的代谢物及其代谢表型,更接近生物体的表型特征^[22]。本研究利用非靶向代谢组学 (LC-MS) 方法检测正常组和弱精症组大鼠附睾精子的差异代谢物,首先对数据进行监督和检验,图 3 显示两组数据分离较好,有明显的差异,并且该模型没有过拟合,说明在正常与弱精症中精子的代谢确实存在差异,这些差异可能是导致弱精症发生发展的重要因素,探究这些差异代谢物的代谢通路对弱精症的治疗有重要意义。本研究采用多维分析与单维分析相结合的策略,筛选出 129 种显著差异的代谢物,主要包括脂质、类脂质分子及有机氮化合物等 (见图 5)。通过相关性分析评估显著差异代谢物之间的相关程度,以进一步理解弱精症发

病过程中代谢物之间的相互关系。对差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析,探讨样品中差异代谢变化的机制。KEGG 通路富集分析结果显示,胆碱代谢、甘油磷脂代谢及鞘脂信号通路等代谢通路具有显著的生物学意义 (见图 6、7)。研究表明,胆碱、甘油磷脂、鞘脂等脂质代谢在精子获能和顶体反应中发挥重要作用^[23,24]。在精子的发生和成熟的过程中,胆碱及其代谢产物在精子中不仅参与细胞膜的构成,还可能通过影响精子的能量代谢、信号传导等途径,对精子的运动能力、受精能力等产生重要影响^[25-27]。甘油磷脂在精子中不仅作为精子膜的主要脂质成分,还参与信号传导、物质运输等过程^[28-30]。鞘脂信号通路是细胞内一种重要的信号传导途径,与精子的生长、发育和功能密切相关^[31,32]。

在 KEGG 通路富集图中,我们发现在鞘脂信号代谢通路中与 ROS 密切相关 (如图 8),提示氧化应激与弱精症中鞘脂信号通路的调控密切相关。本研究进一步在大鼠血清中检测 SOD、MDA 以及总谷胱甘肽浓度 (图 9),发现与正常组相比,弱精症组 SOD 和总谷胱甘肽浓度明显下降,而 MDA 水平显著增加。提示机体氧化水平增加,而抗氧化水平减少,说明在弱精症大鼠中氧化应激水平增加。氧化应激是指生物体内氧化与抗氧化作用之间的失衡,氧化作用大于抗氧化能力,机体中产生了过多的氧化产物,这些氧化产物的积累破坏了机体原来的生理秩序,影响细胞的正常功能^[5]。鞘脂是一类含有鞘氨醇骨架的脂质分子,它们在生物体内发挥着

重要的生理功能。鞘脂信号通路主要涉及鞘脂的代谢、转运以及与细胞信号传导,大量研究表明氧化应激可以影响鞘脂代谢酶的活性,导致鞘脂的合成和分解失衡,在细胞增殖、分化、凋亡、迁移等过程中都扮演着重要角色,与肺炎、肾损伤、动脉粥样硬化、大肠癌等生理病理过程密切相关^[33-36]。氧化应激可以抑制鞘磷脂合成酶的活性,减少鞘磷脂的合成;同时,也可以激活神经磷脂酶等水解酶,促进鞘磷脂的水解。氧化应激还可以影响鞘脂的转运和分布,导致鞘脂在细胞内的异常积累或缺失^[37]。然而,在弱精症中鞘脂信号通路的具体研究相对较少,临床上虽然有应用抗氧化剂来治疗弱精症患者,但效果不是非常显著,在用药的剂量上需要进一步完善。深入研究氧化应激与鞘脂信号通路在弱精症中的关系,对于揭示生物体内氧化应激反应的分子机制和调控网络具有重要意义。同时,这也为弱精症的治疗提供了新的靶点和策略。此外,针对鞘脂信号通路的药物研发也可能为弱精症的治疗带来新的希望,联合用药或成为可能。

本研究亦存在以下几点不足:① 本研究只是大鼠的数据,而非人的结果;② 本研究只是发现了代谢物差异以及代谢通路富集,需要进一步进行生物学分子研究来验证机制。针对以上2点问题,下一步研究仍有必要对鞘脂信号代谢通路调控进行验证和分析,进一步评估在弱精症大鼠氧化应激水平以及鞘脂信号代谢通路靶点干预的可行性,进而在人的精液中继续研究。综上所述,鞘脂信号代谢通路的激活可能与氧化应激导致弱精症的发生发展密切相关,鞘脂信号代谢通路中的关键基因靶点可作为弱精症的潜在生物标志物。目前关于精子中鞘脂信号通路的具体机制尚不完全清楚。未来的研究需要进一步探讨鞘脂在精子中的代谢途径、信号传导机制以及其对精子功能的影响。后续需要进一步的分子生物学实验,进一步阐明该通路在弱精症患者中的作用机制,进而为弱精症的诊治提供一定的理论依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility[J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(6): 369-384.
- [2] Jiao S Y, Yang Y H, Chen S R. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice [J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(1): 154-189.
- [3] Amaral A. Energy metabolism in mammalian sperm motility[J]. *WIREs Mech Dis*, 2022, 14(5): e1569.
- [4] Wei Y L, Fan X J, Lin X C, et al. Kinesin-14 KIF1C1 promotes acrosome formation and chromatin maturation during mouse spermiogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2023, 1870(7): 119555.
- [5] Lushchak V I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 224: 164-175.
- [6] Drevet J R, Hallak J, Nasr-Esfahani M H, et al. Reactive Oxygen Species and Their Consequences on the Structure and Function of Mammalian Spermatozoa [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(7-9): 481-500.
- [7] Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, et al. Oxidative stress and male infertility[J]. *Nat Rev Urol*, 2017, 14(8): 470-485.
- [8] Cao N, Hu C, Xia B, et al. The Activated AMPK/mTORC2 Signaling Pathway Associated with Oxidative Stress in Seminal Plasma Contributes to Idiopathic Asthenozoospermia [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4240490.
- [9] Moretti E, Signorini C, Corsaro R, et al. Human Sperm as an In Vitro Model to Assess the Efficacy of Antioxidant Supplements during Sperm Handling: A Narrative Review [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5): 1098.
- [10] Hou Y, He Y, Wang J, et al. Comprehensive metabolomics profiling of seminal plasma in asthenozoospermia caused by different etiologies [J]. *Clin Chim Acta*, 2023, 548: 117530.
- [11] Shen Q Z, Wang Y F, Fang Y W, et al. Seminal plasma S100A8/A9 as a potential biomarker of genital tract inflammation [J]. *Asian J Androl*, 2024, 26(5): 464-471.
- [12] Cavarocchi E, Whitfield M, Saez F, et al. Sperm Ion Transporters and Channels in Human Asthenozoospermia: Genetic Etiology, Lessons from Animal Models, and Clinical Perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3926.
- [13] Li Y, Wang Y, Wen Y, et al. Whole-exome sequencing of a cohort of infertile men reveals novel causative genes in teratozoospermia that are chiefly related to sperm head defects[J]. *Hum Reprod*, 2021, 37(1): 152-177.
- [14] Gao K, Wang Z Q, Liu X C, et al. Genetic genes associated with oligospermia, asthenospermia and teratospermia: Advances in studies [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2017, 23(4): 367-371.

- [15] Zhang B, Ma H, Khan T, et al. A DNAH17 missense variant causes flagella destabilization and asthenozoospermia [J]. *J Exp Med*, 2020, 217 (2): e20182365.
- [16] Sha Y, Liu W, Li S, et al. Deficiency in AK9 causes asthenozoospermia and male infertility by destabilising sperm nucleotide homeostasis [J]. *EBioMedicine*, 2023, 96: 104798.
- [17] Xu S, Wu Y, Chen Y, et al. Environmental metal exposure, seminal plasma metabolome and semen quality: Evidence from Chinese reproductive-aged men [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 838(Pt 2):155860.
- [18] Peng Z, Yang Q, 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.
- [19] Emadi A, Jones R J, Brodsky R A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009, 6(11): 638-647.
- [20] Delahousse J, Molina L, Paci A. Cyclophosphamide and analogues; a matter of dose and schedule for dual anticancer activities [J]. *Cancer Lett*, 2024, 598: 217119.
- [21] Ghobadi E, Moloudizargari M, Asghari M H, et al. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, 13(5): 525-536.
- [22] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29 (11): 1181-1189.
- [23] Zanetti S R, Monclus Mde L, Rensetti D E, et al. Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction [J]. *Biochimie*, 2010, 92 (12): 1886-1894.
- [24] Cesen M, Elerseck T, Novak M, et al. Ecotoxicity and genotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and their mixtures [J]. *Environ Pollut*, 2016, 210: 192-201.
- [25] Hanley P J. Elusive physiological role of prostatic acid phosphatase (PAP): generation of choline for sperm motility via auto-and paracrine cholinergic signaling [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1327769.
- [26] Thakur B, Hasooni L P, Gera R, et al. Presence of key cholinergic enzymes in human spermatozoa and seminal fluid [J]. *Biol Reprod*, 2024, 110(1): 63-77.
- [27] Karakus C, Ozyurt R. Correlation between high Choline metabolite signal in spectroscopy and sperm retrieval chance at micro-TESE [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(4): 1125-1130.
- [28] Lenzi A, Picardo M, Gandini L, et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy [J]. *Hum Reprod Update*, 1996, 2(3): 246-256.
- [29] Eslamian G, Amirjannati N, Noori N, et al. Effects of coadministration of DHA and vitamin E on spermatogram, seminal oxidative stress, and sperm phospholipids in asthenozoospermic men: a randomized controlled trial [J]. *Am J Clin Nutr*, 2020, 112(3): 707-719.
- [30] Medica A J, Aitken R J, Nicolson G L, et al. Glycerophospholipids protect stallion spermatozoa from oxidative damage in vitro [J]. *Reprod Fertil*, 2021, 2 (3): 199-209.
- [31] Yu W, Li Y, Chen H, et al. STK33 Phosphorylates Fibrous Sheath Protein AKAP3/4 to Regulate Sperm Flagella Assembly in Spermiogenesis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2023, 22(6): 100564.
- [32] Lü M, Tang D, Yu H, et al. Novel FSIP2 Variants Induce Super-Length Mitochondrial Sheath and Asthenoteratozoospermia in Humans [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2): 393-411.
- [33] Thomas J M, Sudhadevi T, Basa P, et al. The Role of Sphingolipid Signaling in Oxidative Lung Injury and Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1254.
- [34] Ueda N. A Rheostat of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate as a Determinant of Oxidative Stress-Mediated Kidney Injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 4010.
- [35] He J, Zhang Q, Xia X, et al. Lagopsis supina ameliorates myocardial ischemia injury by regulating angiogenesis, thrombosis, inflammation, and energy metabolism through VEGF, ROS and HMGB1 signaling pathways in rats [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155050.
- [36] Li R, Hao Y, Wang Q, et al. ECHS1, an interacting protein of LASP1, induces sphingolipid-metabolism imbalance to promote colorectal cancer progression by regulating ceramide glycosylation [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(10): 911.
- [37] Huwiler A, Beck K F, Pfeilschifter J. Cross-Regulation of the Cellular Redox System, Oxygen, and Sphingolipid Signalling [J]. *Metabolites*, 2023, 13(3): 426.