

# 热应激诱导的氧化应激对雄性生殖的影响

邓成宸 霍元楠 王鲜忠\*

(西南大学动物医学院, 重庆市牧草与草食家畜重点实验室, 重庆 400716)

**摘要** 精子的发生过程具有温度依赖性, 睾丸温度升高严重影响哺乳动物精子发生和精液品质。热应激会促进活性氧生成, 并导致氧化应激。氧化应激诱导睾丸细胞发生自噬、凋亡、DNA损伤、血睾屏障受损、雄激素分泌异常等一系列反应, 最终导致不育。该文概述了引起睾丸热应激的内外因素、睾丸细胞在热应激下的分子响应机制, 并就如何减少热应激对雄性生殖的影响进行了展望。

**关键词** 热应激; 氧化应激; 睾丸细胞

## Influences of Heat Stress-Induced Oxidative Stress on Male Reproduction

DENG Chengchen, HUO Yuannan, WANG Xianzhong\*

(College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing Key Laboratory of Forage & Herbivore, Chongqing 400716, China)

**Abstract** Mammalian spermatogenesis is a temperature-dependent process. Spermatogenesis and semen quality will be severely compromised under high-temperature. Heat stress escalates the synthesis of reactive oxygen species and induces oxidative stress. Oxidative stress results in apoptosis, autophagy, and DNA damage of testicular cells, impairment of the blood-testis-barrier, as well as abnormal secretion of androgen, and causes male infertility. This paper outlines the intrinsic and extrinsic factors that increase testicular heat stress and discusses the molecular mechanisms involved in response of testicular cells under oxidative stress. Moreover, this review gives an outlook on how to reduce effects of heat stress on male reproduction.

**Keywords** heat stress; oxidative stress; testicular cells

恒温动物的体温调节存在等热区(thermo-neutral zone, TNZ)。在此环境温度范围内, 动物能够借助物理调节来维持正常体温。当环境温度超过等热区的最高临界温度时, 物理调节无法维持机体热量产生与释放的平衡, 核心体温升高, 机体产生非特异性应答反应, 即出现热应激<sup>[1]</sup>。体温升高以及呼吸和心跳频率的加快是发生热应激的明显标志, 另外热应激还伴随着机体血液生化指标的改变<sup>[2]</sup>。热应激引起雄性动物生殖能力下降, 主要表现为交配欲减弱, 睾丸重量减小, 精液品质下降, 精子数量减少、活力降低、畸形率升高。雄性动物的繁殖性能对热敏感的原因在于精子发生过程具有温度依赖性, 通常其温

度低于核心体温的2~8 °C<sup>[3]</sup>。内部或外部因素导致哺乳动物睾丸温度调节失败, 将会引起睾丸热应激, 造成精子质量受损, 增加不育风险。

热应激发生后细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)[特别是超氧阴离子( $\bullet\text{O}_2^-$ )]水平显著升高、线粒体呼吸复合物功能受损、抗氧化酶基因表达水平升高, 因此氧化应激是热应激导致细胞毒性的重要原因<sup>[1]</sup>。氧化应激会对细胞造成多方面的损伤, 包括DNA断裂、蛋白失活、细胞膜受损以及凋亡通路激活等。因此, 探究热应激所诱导的氧化应激对雄性生殖细胞和睾丸细胞造成损伤的机制, 对寻求缓解雄性动物繁殖机能热损伤的方

收稿日期: 2021-6-29 接受日期: 2021-08-10

国家自然科学基金(批准号: 32072940、31672624)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13983086259, E-mail: xianzhong\_wang@yahoo.com.cn

Received: June 29, 2021 Accepted: August 10, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32072940, 31672624)

\*Corresponding author. Tel: +86-13983086259, E-mail: xianzhong\_wang@yahoo.com.cn

法至关重要。

## 1 导致睾丸热应激的内外因素

### 1.1 环境热应激

人类调查数据和动物模型研究均表明,精子参数的季节性变化与环境温度有关。一项针对欧洲不同国家男性的研究发现,夏季男性精子密度约为冬季的70%<sup>[4]</sup>。对意大利5 131名男性连续6年精液品质检测的大数据分析显示,在环境温度最高的夏季,精子总数、密度、正常形态精子数均最低<sup>[5]</sup>。暴露在夏季温度中的兔表现为低活力精子的百分比增加;夏季猪精液品质、精子活力和顶体完整精子的百分率在一年中最低;牛精子的尾部在夏季含有更低比例的不饱和脂肪酸,精子膜的流动性下降,精子活力受损<sup>[6]</sup>。这些数据表明,环境高温对雄性生殖能力具有明显的不利影响。

### 1.2 临床因素

**1.2.1 隐睾** 与环境热应激不同,隐睾是高温直接作用于睾丸,引起可恢复性或永久性的生殖障碍。对单侧隐睾的研究发现,与正常睾丸相比,患侧睾丸更小更轻。长期的隐睾症会损害支持细胞功能,同时也可能影响间质细胞分泌雄激素的功能,组织学分析证实了隐睾症的睾丸中有大量生殖细胞的损失<sup>[7]</sup>。通过对实验性隐睾小鼠睾丸进行基因表达谱研究发现,相较于正常组,实验隐睾小鼠睾丸中葡萄糖转运体3(glucose transporter type 3, *GLUT3*)基因的表达量下降,乳酸脱氢酶活性下降,睾丸能量代谢异常,生殖细胞分化所需能量供应不足,同时谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione *S*-transferase, *GST*)等抗氧化酶类的表达量下降,睾丸氧化应激增强,细胞凋亡增加<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 精索静脉曲张** 当精索周围的静脉发生异常扩张时,与动脉血进行热交换之后获得热量的静脉血滞留甚至回流至精索静脉中,使得睾丸暴露于接近核心体温的温度<sup>[9]</sup>;受精索静脉曲张影响的睾丸温度比正常睾丸高2.5 °C<sup>[9]</sup>。与对照组相比,精索静脉曲张患者的精液品质较差、精子密度较低;在进行手术修复后,患者的正常精子率增加<sup>[10]</sup>。动物模型和人体研究中获得的数据显示,精索静脉曲张是导致雄性不育症的常见原因。精索静脉曲张使睾丸温度升高,ROS增多,导致精子DNA片段化,进而诱发细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

**1.2.3 发烧** 在雄性动物发烧期间,阴囊温度随核

心体温一起升高。持续一天或更长时间的发烧会干扰正在进行的生精过程,进而影响精子总数、精液参数和精子DNA完整性<sup>[9]</sup>。在生殖细胞发生减数分裂期间的发烧会导致精子密度降低;在减数分裂之后的精子发生时期,高烧则对精子形态和运动产生更多不良影响;而在其他时期发烧对精子参数没有显著影响,且这种对精子的副作用与发烧天数有关。随着机体病理状态的解除,精子活力等相关参数也会回升<sup>[12]</sup>。

## 2 热应激对睾丸不同类型细胞的影响

### 2.1 热应激对各级生精细胞的影响

精原细胞对热应激有一定的抵抗力,能够通过自我更新和分化补充在高温下受损的精子细胞,这也是公畜在夏季结束后精液品质得以恢复的原因。但精原细胞的耐热能力会随着年龄的增长而降低,且从热损伤中恢复的能力也会下降<sup>[13]</sup>。WANG等<sup>[14]</sup>通过对热应激处理的精原细胞进行转录组测序发现,热应激上调了*Socs3*基因,而*Socs3*蛋白表达增加显著抑制了对精原干细胞分化至关重要的JAK-STAT信号通路。同时热应激通过上调精原干细胞中*p53*上游*Osm*基因和*p53*下游*Bbc3*、*Trp53inp1*和*Trp53cor1*基因的表达,诱导细胞出现S期停滞(图1)。由于精原细胞也具有较强的恢复能力,在热应激后第18 h时,细胞的S期停滞状态得以消除至正常水平<sup>[14]</sup>。

在其他各级生精细胞中,染色质状态正在发生剧烈变化的粗线期和双线期精母细胞,以及圆形精子细胞对睾丸升温最为敏感<sup>[15]</sup>。粗线期和双线期精母细胞的染色质处于高度活跃状态,并呈现开放构象,使DNA容易暴露在不利环境中<sup>[16]</sup>。热应激容易引起这个时期的细胞出现发育停滞和DNA损伤,损害精母细胞向精子细胞发育的能力。在圆形精子转化为完全分化的精子过程中,精细胞DNA修活性逐渐下降,热应激导致的DNA损伤将会伴随其后续的分化过程,直至形成成熟精子。精细胞富含多不饱和脂肪酸,容易受到热应激所诱导的ROS攻击,造成精子顶体缺失、鞭毛畸形等异常<sup>[17]</sup>。

### 2.2 热应激对支持细胞分泌能力和屏障功能的影响

支持细胞分泌的乳酸是生精细胞主要能量代谢物质。大量研究表明,热应激会促进体外培养的猪睾丸支持细胞乳酸的分泌,该过程所涉及的分子

信号包括 AMPK(AMP-activated protein kinase)相关的能量代谢调节通路、Caspase3参与的自噬通路、胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)介导的细胞内信号转导通路等<sup>[18-20]</sup>。虽然乳酸能作为营养底物提供能量,减少细胞凋亡,但曲细精管内发生高浓度乳酸积累将引起酸中毒。免疫组织化学结果显示,支持细胞热应激后,热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)的核内表达增加,

同时雄激素受体(androgen receptor, AR)的核内表达能力也有所增强(图2)。多项研究表明, HSP70与AR的结合增加会降低支持细胞对雄激素的敏感性,进而降低支持细胞的分泌能力,影响精子发生和精液质量<sup>[21-22]</sup>。

支持细胞所形成的血睾屏障能够为精子发生提供适宜的微环境,热应激对支持细胞形态结构的改变会极大地影响其屏障功能。在激光共聚焦显微

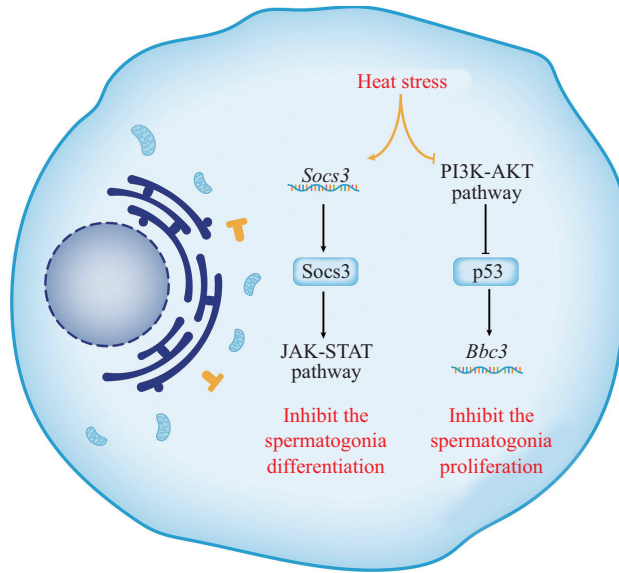


图1 热应激影响精原细胞增殖、分化的机制

Fig.1 The mechanism by which heat stress affects the proliferation and differentiation of spermatogonia

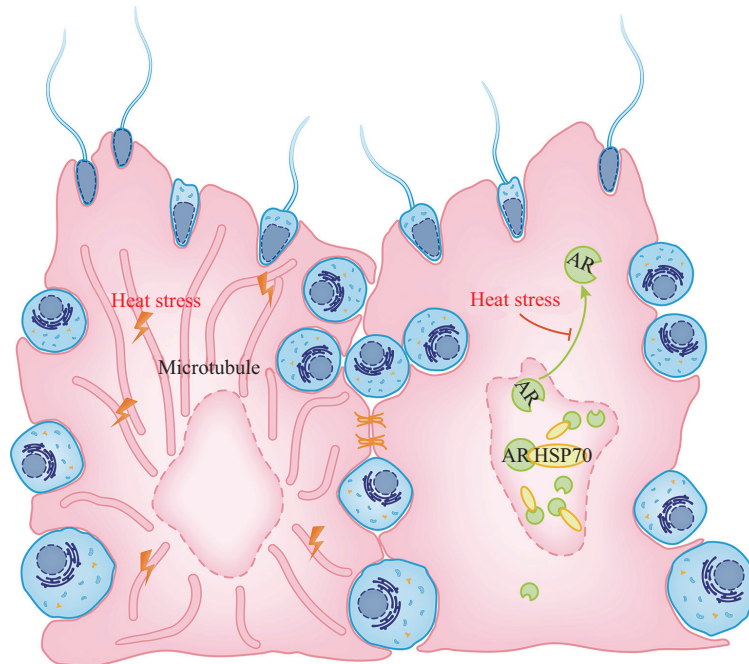


图2 热应激对支持细胞的影响

Fig.2 The impact of heat stress on Sertoli cell

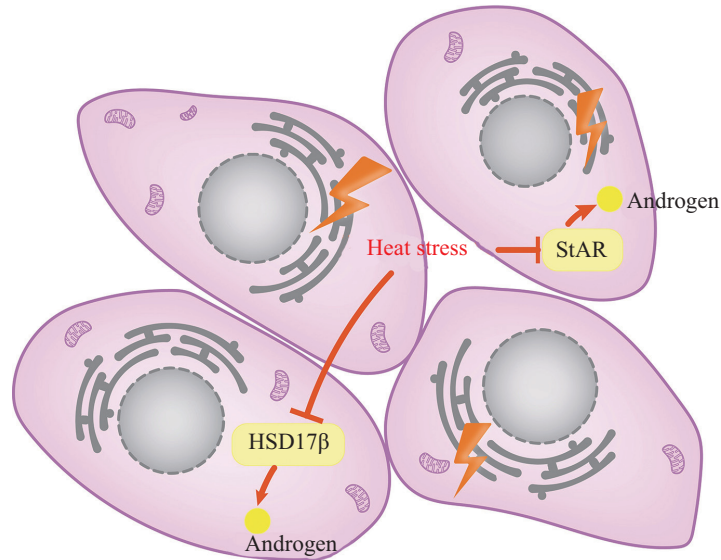


图3 热应激对间质细胞睾酮合成的影响

Fig.3 The impact of heat stress on testosterone synthesis in Leydig cell

镜下观察热处理后的支持细胞,发现细胞微管发生聚集和损坏<sup>[23]</sup>(图2)。观察隐睾症猪的睾丸生精上皮结构发现,睾丸中未成熟的支持细胞存在退化迹象,且在后续成熟过程中支持细胞分化异常<sup>[24]</sup>。

### 2.3 热应激对间质细胞睾酮合成的影响

急性热应激会在短期内增加间质细胞中细胞周期相关蛋白的表达,同时诱导内质网应激并显著下调合成睾酮激素所需的关键酶类,如17- $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶(17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, HSD17 $\beta$ )和类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR),最终表现为睾丸间质细胞增生而睾酮生物合成减少<sup>[25]</sup>(图3)。如果对睾丸进行反复热处理,热应激在抑制睾酮生成的同时还会引起间质细胞凋亡增加,从而进一步降低睾丸合成睾酮的能力<sup>[26]</sup>。相比之下,隐睾、精索静脉曲张等慢性热应激通常不会影响睾酮的生成,实验性隐睾小鼠的睾丸间质细胞中的StAR蛋白在热应激初期迅速减少,而后逐渐恢复到基础水平,这说明间质细胞会逐渐适应热应激并保持类固醇合成的能力。如果敲除小鼠的热休克转录因子,在进行实验性隐睾处理后,小鼠间质细胞的StAR蛋白持续降低无法恢复,但同时StAR的mRNA水平并未下降,这可能是由于热应激初期间质细胞的StAR蛋白翻译后修饰(而非转录)受阻,而后热休克转录因子能恢复StAR的蛋白水平维持睾酮生成<sup>[27]</sup>。

## 3 热应激诱导的氧化应激

### 3.1 细胞中ROS产生与清除机制

广义的ROS包括超氧阴离子( $\cdot\text{O}^{2-}$ )、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、脂质过氧化物( $\text{LOO}\cdot$ )等。ROS的产生分为酶性和非酶性,酶性产生通常与呼吸链复合物(respiratory chain complex)、NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)、脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)所催化的反应过程相关;非酶性产生则来源于活性小分子的氧化,如四环素类药物引发的光敏反应、 $\text{Fe}^{2+}$ 引发的芬顿反应等<sup>[28]</sup>。正常情况下细胞内ROS处于产生与清除的动态平衡之中,在化学、物理或生物因素引起细胞应激的状态下,ROS水平升高,超出正常范围,进而导致急性或慢性氧化应激。此时细胞需要启动抗氧化系统来预防和抵抗ROS的负面影响,其中以核因子红系2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)-抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)抗氧化通路最为敏感。该通路被ROS激活后能上调超氧化物歧化酶(superoxid-dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathioneperoxidase, Gpx)等抗氧化酶的表达,提高ROS的清除效率,恢复细胞的ROS稳态<sup>[28]</sup>。

### 3.2 热应激诱导氧化应激的途径

#### 3.2.1 热应激通过干扰线粒体呼吸诱导氧化应激

细胞ROS的主要来源是线粒体呼吸作用和NOX。目前关于细胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生部位的研究表明, 45%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来自于线粒体, 40%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来自细胞质中的NADPH氧化酶<sup>[29]</sup>。线粒体内至少有十个位置产生ROS, 而线粒体呼吸电子传递链(electron transport chain, ETC)中的复合物I、II、III是线粒体ROS的主要来源<sup>[29]</sup>。其中复合物I和II在线粒体基质中产生超氧阴离子( $\bullet\text{O}^{\cdot-}$ ), 复合物III能够在线粒体基质和膜间隙中产生 $\bullet\text{O}^{\cdot-}$ 。当电子沿呼吸链反向流动(reverse electron transport, RET)时, 复合物I会产生ROS。研究证明这种RET-ROS在热应激条件下被激活, 同时热应激还会使复合物I失活, 导致电子在呼吸链中的流动速度变慢, 代谢产生的能量无法通过呼吸链有效地合成ATP, 加剧线粒体负荷, 最终导致呼吸链崩解, 细胞进入氧化应激状态<sup>[30]</sup>。

**3.2.2 热应激通过损伤细胞抗氧化系统诱导氧化应激** 短暂热应激情况下, ROS水平急剧升高, 抗氧化酶系统迅速应答(CAT、SOD、GSH-Px等酶的活性明显升高), 从而使应激结束后细胞ROS逐渐降低至正常水平。但随着热应激时间变长, 抗氧化酶系统被破坏, 无法持续清除大量ROS, 从而引起氧化应激。有研究表明, 热应激对线粒体中抗氧化酶活性的影响是诱导ROS过量产生的重要因素之一<sup>[30]</sup>。主要分布于线粒体的锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)在细胞耐热性中起重要作用, 缺少MnSOD的细胞在热应激后凋亡率上升, 而稳定转染MnSOD过表达载体的细胞则表现出对热应激的抗性<sup>[1]</sup>。热应激还会导致谷胱甘肽过氧化物酶水平急剧下降, ROS水平上升, 增加细胞对热应激的敏感性, 因此氧化应激被认为是热应激诱导细胞凋亡的早期事件。

### 3.3 热应激所诱导的氧化应激的特点

热应激主要通过线粒体途径产生ROS, 超氧化物是其中主要的ROS种类。热应激通过稳定转染使细胞内MnSOD高表达, 从而增强细胞的抗热性。但仅有MnSOD不足以防止氧化损伤, MnSOD将超氧阴离子( $\bullet\text{O}^{\cdot-}$ )转化为具有高反应性的羟自由基( $\bullet\text{OH}$ ), 此时需要Gpx将 $\bullet\text{OH}$ 转化为毒性相对弱的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 继后经CAT分解成O<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O, 至此才能完全解毒<sup>[31]</sup>。一些研究发现, 热应激后, 细胞中MnSOD和Gpx的过度表达, 表明线粒体是热应激下ROS产生的主要场所, 超氧化物是热应激诱导的主要氧化物质<sup>[32]</sup>。另有研究

发现, 热应激会降低或抑制SOD的表达和活性, 这种抑制作用可归因于酶的热失活或氧化导致的失活<sup>[33]</sup>。超氧化物的产生使ERK通路激活, 抑凋亡蛋白Bcl-2去磷酸化, 促进Bcl-2泛素化和降解, 引起细胞凋亡<sup>[34]</sup>。

热应激增加细胞质中的氧化酶水平, 降低抗氧化酶活性, 加剧ROS积累。有研究表明, 热应激后禽类肌细胞中NOX4表达增多并刺激ROS产生, 同时下调HMOX1表达<sup>[35]</sup>。对人皮肤进行局部加热后, 发现一氧化氮(nitric oxide, NO)的血管舒张作用被热暴露激活的血管紧张素II(angiotensin II, ANGII)减弱, ANGII通过其1型受体(angiotensin II receptor type 1, AT1R)增强了NADPH氧化酶和黄嘌呤氧化酶活性, 产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>并引起血管收缩, 而使用抗氧化剂能够恢复NO依赖性血管舒张<sup>[36]</sup>。热应激诱导的ROS对皮肤血管收缩的调节作用, 可能与在阴囊皮肤受热过程中的机制相似, 从而造成散热受阻和更广泛的氧化应激。

## 4 热应激诱导的氧化应激对雄性生殖的影响

### 4.1 氧化应激对精子活性和功能的影响

正常生理状态下, 适当水平的ROS在调节精子活力、精子获能以及顶体反应等方面发挥着重要的作用。但当热应激等外部因素使细胞内抗氧化机制异常时, ROS的产生与清除不能维持平衡, 细胞将处于氧化应激状态, 此时过量的ROS就会引起精子损伤(图4), 主要体现在以下几个方面。(1) 质膜受损, 受精能力降低。精子质膜在精子获能、顶体反应以及卵细胞表面结合中起着不可或缺的作用。丙二醛(malondialdehyde, MDA)和4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)是细胞膜氧化损伤的标志性产物, 其含量在热应激后的精子中显著升高<sup>[37]</sup>。这两种脂质过氧化物参与细胞信号转导, 能够激活对压力敏感的转录因子, 例如Nrf2, 以启动细胞内的抗氧化系统; 还能够激活细胞中的应激反应通路, 例如促分裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)途径、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)/AKT途径和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)途径<sup>[38]</sup>。同时MDA和4-HNE具有与蛋白质形成加合物的能力, 进一步破坏质膜结构, 可改变膜通透性和流动性<sup>[39]</sup>。质膜受损的精

子难以与卵母细胞融合,最终表现为雄性动物的繁殖力减弱。(2) DNA受损,畸形精子增加。畸形精子症是雄性不育的主要原因之一,通常伴有精子DNA缺陷。在雄性小鼠热应激模型中,热应激导致精子氧化性DNA损伤(oxidative DNA damage, ODD)显著增多。内切核酸酶VIII样3(endonuclease VIII-like 3, NEIL3)负责修复双链DNA中的多种氧化(主要是氧化的嘧啶和嘌呤)损伤。然而精子在形成过程中丢失了大量DNA修复相关的酶,导致氧化应激引起的DNA损伤难以恢复<sup>[40]</sup>。这些受损的DNA在形成精子的过程中会导致畸形精子的产生,而畸形精子也是ROS来源之一,由此形成一个恶性循环,使精子畸形率不断升高,最终导致不育。(3) 线粒体受损,精子活力下降。精子鞭毛的中段有丰富的线粒体,这些线粒体所产生的可控水平的ROS和ATP对精子游动速度和受精率至关重要。研究发现,低水平葡萄糖培养基中孵育的精子提高线粒体氧化磷酸化的效率,生成足够的ATP,但同时ROS作为其副产物水平也在升高<sup>[41]</sup>。这些过多的ROS改变了蛋白质的电荷,使蛋白质更容易被水解,同时由线粒体基因编码的ETC蛋白(MT-ND1、MT-ND6)、TFAM蛋白和POLRMT蛋白都被脂质过氧化物4-HNE修饰。一些外源性添加的抗氧化剂并不能解除这种影响,但能够保护线粒体的转录系统,以增加新的ETC酶的基因表达<sup>[41]</sup>。热应激诱导的ROS加速了蛋白质水解过程,影响了线粒体内电子传递效率,致使ATP产生速率减慢,导致精子活力下降。(4) 细胞凋亡,精子数量下降。肿瘤抑制因子p53是热应激诱导生殖细胞凋亡的潜在分子。热应激后检测到睾丸的p53活性升高,同时生殖细胞数量减少<sup>[42]</sup>。ROS诱导p53磷酸化,以增加促凋亡Bax蛋白的表达或使抗凋亡Bcl-2蛋白失活,促进线粒体通透性过渡孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的打开,引起细胞色素C(cytochrome c, Cyt c)从线粒体释放到细胞质中,从而激活Caspase9及其下游效应子Caspase3,诱导细胞凋亡<sup>[42]</sup>。同时ROS水平升高导致内质网和线粒体损伤,其中储存的钙离子释放至细胞质中。钙离子作为细胞内第二信使,参与凋亡相关蛋白激酶和核酸酶的活化,进一步促使细胞凋亡<sup>[43]</sup>。

#### 4.2 氧化应激对支持细胞紧密连接和分泌功能的影响

睾丸支持细胞可通过多种旁分泌因子调节

生精细胞,对保持雄性生育能力很重要。热应激诱导的氧化应激从多个方面影响支持细胞功能。

(1) 紧密连接异常,血睾屏障受损。支持细胞通过紧密连接构成的血睾屏障对于维持睾丸微环境至关重要。热应激条件下生成的ROS通过抑制CaMKK $\beta$ (calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$ )-AMPK(AMP-activated protein kinase)轴参与热应激诱导的支持细胞紧密连接蛋白ZO-1、 $\beta$ -catenin和connexin43的表达下调<sup>[44]</sup>,这说明在发生氧化应激的支持细胞中,自噬体由于降解受阻而大量积累,使得支持细胞形态异常、血睾屏障受损。补充抗氧化剂后,随着支持细胞从氧化应激的状态中恢复,自噬缺陷和紧密连接损伤也得到挽救。临床实验已经证明,氧化应激严重影响了血睾屏障的稳定性<sup>[45]</sup>(图4)。(2) 氧化应激影响支持细胞的分泌功能和生精过程。支持细胞通过旁分泌Fas诱导多余生殖细胞凋亡,ROS是Fas活化后激发下游凋亡通路的关键因子<sup>[46]</sup>。支持细胞维持生精过程的另一个方式是吞噬凋亡的生精细胞,确保微环境的稳定。正常情况下,凋亡的精细胞通过分泌TNF- $\alpha$ ,激活支持细胞内LMCD1(LIM and cysteine rich domains 1)的表达,进而上调其下游吞噬相关蛋白NFAT1、TXLNA的表达,提高支持细胞的吞噬能力。热应激诱导的高水平的ROS通过诱导支持细胞中STAT3蛋白酪氨酸磷酸化,促使磷酸化的STAT3与LMCD1启动子结合,抑制其表达,最终抑制支持细胞吞噬能力,导致微环境内脂质堆积,生精受阻<sup>[47]</sup>。

#### 4.3 氧化应激对间质细胞雄激素合成与分泌的影响

睾丸间质细胞是雄性动物中雄激素的主要来源,雄激素的生成过程中伴随着ROS的产生(主要源于细胞色素P450酶的催化反应中发生的电子泄漏)。氧化应激对间质细胞的影响主要在于抑制其睾酮分泌和影响机体内分泌。间质细胞中StAR对氧化应激尤其敏感,环境激素(endocrine disruptors, EDs)引起的高水平ROS与cAMP协同作用,抑制了间质细胞睾酮激素的生物合成<sup>[48]</sup>。当热应激等因素抑制了抗氧化酶活性,未能被及时清除的ROS可降低睾酮生物合成途径中的酶活性,最终使睾酮合成和分泌受抑制<sup>[49]</sup>(图4)。有研究发现,下调睾丸间质细胞miR-200a表达能够显著减弱雷公藤甲素(triptolide, TP)诱导的氧化应激<sup>[50]</sup>。对于下调miR-200a能否缓解热应激导致的氧化应激对间质细胞雄激素合成能力的影

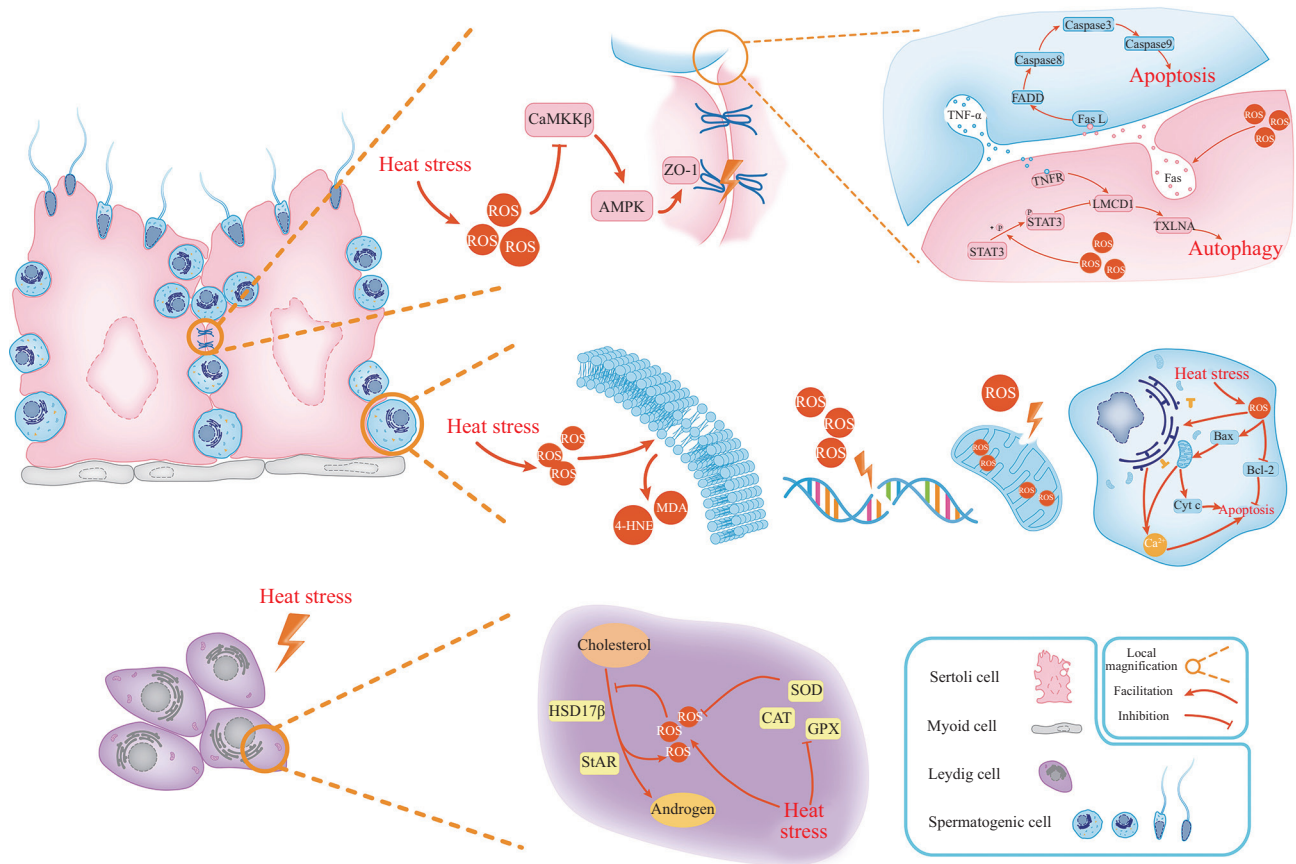


图4 热应激诱导的氧化应激对睾丸细胞的影响

Fig.4 The impact of the heat stress-induced oxidative stress on testicular cells

利影响, 还需进一步验证。

有大量研究表明, 热应激除直接影响睾酮合成与分泌外, 还会通过改变机体内分泌对睾丸激素产生影响。下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)是调节睾丸激素的主要内分泌系统。与暴露于相同温度条件下的新生雄性大鼠相比, 高温环境对成年雄性大鼠HPG轴功能的影响更为明显。适应高温环境的成年大鼠血清中的促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)水平显著升高, 血清睾丸激素水平显著降低<sup>[51-52]</sup>。LH具有诱导睾丸间质细胞产生睾酮的功能, 但在此实验条件下, 高水平的LH伴随着低水平的睾酮, 可能是由于高温诱导的氧化应激损伤了间质细胞的睾酮合成功能, 而机体则促使垂体补偿性分泌大量LH以刺激睾酮合成<sup>[53]</sup>。

## 5 总结与展望

睾丸温度调节对精子产生和维持雄性生育能力至关重要。睾丸热应激所诱发的高水平ROS攻击细胞DNA、蛋白质和质膜, 激活睾丸细胞自噬或凋

亡途径中的关键分子, 导致生精过程停滞, 生殖细胞凋亡, 支持细胞形成的血睾屏障受损, 间质细胞分泌睾酮的能力下降。同时由于睾丸激素水平变化, 下丘脑-垂体-性腺轴的激素分泌水平也会发生波动。了解睾丸热应激的分子机制有助于制定针对性治疗雄性不育的方法, 减少环境热应激带来的不利影响。

关于热应激导致氧化应激, 从而影响雄性生殖能力的分子机制, 大多数研究关注点在于细胞氧化与抗氧化平衡。但面对极端生存环境, 不论是机体还是细胞, 首要任务是保证其存活, 而非繁殖或增殖。因此, 热应激与氧化应激导致的首要问题可能是细胞能量代谢的改变。热应激环境下如何激活耐热基因、抗氧化基因, 并调节细胞能量分配, 从而保障基础生命活动, 则是需要进一步研究的问题。

对于因隐睾或精索静脉曲张而不育的雄性动物, 其睾丸处于接近体温环境而非全身性反应状态时, 则需要借助医疗手段进行改善, 并在恢复过程中辅以抗氧化剂。在实际生产中, 人们对家畜高繁殖力和高产奶量的遗传选择可能会无意间增加家畜的

热敏感性,使得夏季高温对畜牧业生产的不利影响增加。在进行环境控制预防热应激的同时,可以根据睾丸热应激反应的分子机制,对已受高温影响的个体按照精子恢复周期调整生产安排,或通过药物增加雄性家畜耐热基因和相关短链非编码RNA的表达水平,使之在夏季也能保持较好的生产力。

### 参考文献 (References)

- [1] BELHADJ SLIMEN I, NAJAR T, GHRAM A, et al. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2016, 100(3): 401-12.
- [2] 卢曾奎, 李青, 金美林, 等. 湖羊热应激相关的生理生化指标筛选[J]. *核农学报*(LU Z K, LI Q, JIN M L, et al. Study on screening for physiological and biochemical indexes of heat stress of Hu sheep [J]. *J Nucl Agric Sci*), 2020, 34: 2352-9.
- [3] LI Z, LI Y, REN Y, et al. High ambient temperature disrupted the circadian rhythm of reproductive hormones and changed the testicular expression of steroidogenesis genes and clock genes in male mice [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 500(4): 1106-39.
- [4] JORGENSEN N, ANDERSEN A G, EUSTACHE F, et al. Regional differences in semen quality in Europe [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5): 1012-9.
- [5] SANTI D, MAGNANI E, MICHELANGELI M, et al. Seasonal variation of semen parameters correlates with environmental temperature and air pollution: a big data analysis over 6 years [J]. *Environ Pollut*, 2018, 235(9): 806-13.
- [6] AURICH C, ORTEGA FERRUSOLA C, PENA VEGA F J, et al. Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony stallions [J]. *Theriogenology*, 2018, 107(1): 149-53.
- [7] GAO P, GAO J, DOU X, et al. The relationship between vascular endothelial growth factor and spermatogenesis disturbance in an experimentally-induced unilateral cryptorchidism murine model [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(5): 3605-13.
- [8] LI Y C, HU X Q, XIAO L J, et al. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism [J]. *Front Biosci*, 2006, 11(1): 2465-82.
- [9] DURAIRAJANAYAGAM D, AGARWAL A, ONG C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress [J]. *Reprod Biomed Online*, 2015, 30(1): 14-27.
- [10] JENSEN C F S, ØSTERGREN P, DUPREE J M, et al. Varicocele and male infertility [J]. *Nat Rev Urol*, 2017, 14(9): 523-33.
- [11] SHIRAIISHI K, TAKIHARA H, UROLOGY H M. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis [J]. *World J Urol*, 2010, 28(3): 359-64.
- [12] EVENSON D P, JOST L K, CORZETT M, et al. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study [J]. *J Androl*, 2000, 21(5): 739-46.
- [13] HOUSTON B J, NIXON B, MARTIN J H, et al. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line [J]. *Biol Reprod*, 2018, 98(4): 593-606.
- [14] WANG J, GAO W J, DENG S L, et al. High temperature suppressed SSC self-renewal through S phase cell cycle arrest but not apoptosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 227.
- [15] ZHENG Y, ZHANG P, ZHANG C, et al. Surgery-induced cryptorchidism induces apoptosis and autophagy of spermatogenic cells in mice [J]. *Zygote*, 2019, 27(2): 101-10.
- [16] SOLER-VENTURA A, CASTILLO J, DE LA IGLESIA A, et al. Mammalian sperm protamine extraction and analysis: a step-by-step detailed protocol and brief review of protamine alterations [J]. *Protein Pept Lett*, 2018, 25(5): 424-33.
- [17] VORILHON S, BRUGNON F, KOCER A, et al. Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(4): 553-62.
- [18] YU C L, GUAN J Y, DING J, et al. AMP-activated protein kinase negatively regulates heat treatment-induced lactate secretion in cultured boar sertoli cells [J]. *Theriogenology*, 2018, 121(3): 35-41.
- [19] BAO Z Q, LIAO T T, YANG W R, et al. Heat stress-induced autophagy promotes lactate secretion in cultured immature boar Sertoli cells by inhibiting apoptosis and driving SLC2A3, LDHA, and SLC16A1 expression [J]. *Theriogenology*, 2017, 87(5): 339-48.
- [20] GUAN J Y, LIAO T T, YU C L, et al. ERK1/2 regulates heat stress-induced lactate production via enhancing the expression of HSP70 in immature boar Sertoli cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2018, 23(6): 1193-204.
- [21] SHEN H, FAN X, ZHANG Z, et al. Effects of elevated ambient temperature and local testicular heating on the expressions of heat shock protein 70 and androgen receptor in boar testes [J]. *Acta Histochem*, 2019, 121(3): 297-302.
- [22] EFTEKHARZADEH B, BANDUSEELA V C, CHIESA G, et al. Hsp70 and Hsp40 inhibit an inter-domain interaction necessary for transcriptional activity in the androgen receptor [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3562.
- [23] SUN J, YIN B, TANG S, et al. Vitamin C mitigates heat damage by reducing oxidative stress, inducing HSP expression in TM4 Sertoli cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(6): 673-85.
- [24] PINART E, SANCHO S, BRIZ M D, et al. Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism [J]. *J Morphol*, 2000, 244(3): 190-202.
- [25] LI Z, TIAN J, CUI G, et al. Effects of local testicular heat treatment on Leydig cell hyperplasia and testosterone biosynthesis in rat testes [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2015(10): 168-73.
- [26] BONI R. Heat stress, a serious threat to reproductive function in animals and humans [J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(10): 1307-23.
- [27] SHINTARO O, KOJI S, MITSUAKI F, et al. Role of heat shock factor 1 in conserving cholesterol transportation in leydig cell steroidogenesis via steroidogenic acute regulatory protein [J]. *Endocrinology*, 2017(8): 8.
- [28] HARRIS I S, DENICOLA G M. The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 440-51.
- [29] WONG H S, BENOIT B, BRAND M D. Mitochondrial and cytosolic sources of hydrogen peroxide in resting C2C12 myoblasts [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130(7): 140-50.
- [30] SCIALÒ F, SRIRAM A, STEFANATOS R, et al. Mitochondrial complex I derived ROS regulate stress adaptation in *Drosophila*



- melanogaster* [J]. Redox Biol, 2020, 32(6): 1014-50.
- [31] SHIMONI C, GOLDSTEIN M, RIBARSKI-CHOREV I, et al. Heat shock alters mesenchymal stem cell identity and induces premature senescence [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(2): 5659-70.
- [32] YANG W R, LI B B, HU Y, et al. Oxidative stress mediates heat-induced changes of tight junction proteins in porcine sertoli cells via inhibiting CaMKK $\beta$ -AMPK pathway [J]. Theriogenology, 2020, 142(6): 104-13.
- [33] SHI L, XU Y, MAO C, et al. Effects of heat stress on antioxidant status and immune function and expression of related genes in lambs [J]. Int J Biometeorol, 2020, 64(12): 2093-104.
- [34] LI L, TAN H, YANG H, et al. Reactive oxygen species mediate heat stress-induced apoptosis via ERK dephosphorylation and Bcl-2 ubiquitination in human umbilical vein endothelial cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(8): 12902-16.
- [35] KIKUSATO M, YOSHIDA H, FURUKAWA K, et al. Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells [J]. J Therm Biol, 2015, 5(2): 8-13.
- [36] MEDOW M S, BAMJI N, CLARKE D, et al. Reactive oxygen species (ROS) from NADPH and xanthine oxidase modulate the cutaneous local heating response in healthy humans [J]. J Appl Physiol, 2011, 111(1): 20-6.
- [37] SINGH M, TALIMOA MOLLIER R, SHARMA P R, et al. Dietary flaxseed oil improve boar semen quality, antioxidant status and *in-vivo* fertility in humid sub-tropical region of North East India [J]. Theriogenology, 2021, 159(4): 123-31.
- [38] CLEMENTE S M, MARTÍNEZ-COSTA O H, MONSALVE M, et al. Targeting lipid peroxidation for cancer treatment [J]. Molecules, 2020, 25(21): 5144.
- [39] KEKÄLÄINEN J, OSKOEI P, JANHUNEN M, et al. Sperm pre-fertilization thermal environment shapes offspring phenotype and performance [J]. J Exp Biol, 2018, 221(20): 1172-84.
- [40] BAUER N C, CORBETT A H, DOETSCH P W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(21): 10083-101.
- [41] ZHU Z, KAWAI T, UMEHARA T, et al. Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 141(3): 159-71.
- [42] LIU J, ZHANG J, REN L, et al. Fine particulate matters induce apoptosis via the ATM/P53/CDK2 and mitochondria apoptosis pathway triggered by oxidative stress in rat and GC-2spd cell [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 180(21): 280-7.
- [43] SUZUKI N, KATANO K. Coordination between ROS regulatory systems and other pathways under heat stress and pathogen attack [J]. Front Plant Sci, 2018, 9(11): 490-1.
- [44] YANG W R, LIAO T T, BAO Z Q, et al. Role of AMPK in the expression of tight junction proteins in heat-treated porcine Sertoli cells [J]. Theriogenology, 2018, 121(9): 42-52.
- [45] YI W, XIANG L T, YU Z, et al. DEHP exposure destroys blood-testis barrier (BTB) integrity of immature testes through excessive ROS-mediated autophagy [J]. Genes Dis, 2018, 5(3): 263-74.
- [46] GUO X, CHI S, CONG X, et al. Baicalin protects sertoli cells from heat stress-induced apoptosis via activation of the Fas/FasL pathway and Hsp72 expression [J]. Reprod Toxicol, 2015, 57(21): 196-203.
- [47] JIN X, ZHANG S, DING T, et al. Testicular Lmed1 regulates phagocytosis by Sertoli cells through modulation of NFAT1/Txlna signaling pathway [J]. Aging Cell, 2020, 19(10): 1321-7.
- [48] JAMBOR T, GREIFOVA H, KOVACIK A, et al. Parallel effect of 4-octylphenol and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) alters steroidogenesis, cell viability and ROS production in mice Leydig cells [J]. Chemosphere, 2018, 199(25): 747-54.
- [49] KIM J H, PARK S J, KIM T S, et al. Testosterone production by a Leydig tumor cell line is suppressed by hyperthermia-induced endoplasmic reticulum stress in mice [J]. Life Sci, 2016, 146(2): 184-91.
- [50] MIAO H, MIAO C, HAN J, et al. Downregulation of miR-200a protects mouse leydig cells against triptolide by triggering autophagy [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14(12): 4845-54.
- [51] BOVA T L, CHIAVACCINI L, CLINE G F, et al. Environmental stressors influencing hormones and systems physiology in cattle [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014, 12(7): 58.
- [52] SIROTKIN A V, PARKANYI V, PIVKO J. High temperature impairs rabbit viability, feed consumption, growth and fecundity: examination of endocrine mechanisms [J]. Domest Anim Endocrinol, 2021, 74(1): 1064-78.
- [53] DARBANDI M, DARBANDI S, AGARWAL A, et al. Reactive oxygen species and male reproductive hormones [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 87.