



王守林, 南京医科大学公共卫生学院教授、博士生导师, 生殖医学与子代健康全国重点实验室研究骨干(PI)。1991年南京医学院本科毕业留校任教至今, 先后获本校劳动卫生与环境卫生学硕士和博士学位; 1999—2006年, 在新加坡和美国的高校做访问学者近4年。目前兼任中国毒理学会理事兼生殖毒理专委会副主任委员、中华预防医学会环境卫生分会常委、江苏省毒理学会理事长等职, 曾获江苏省有突出贡献的中青年专家等荣誉称号。研究方向主要包括环境与生殖健康、靶器官毒性、健康风险评估等。先后主持国家“973”课题、国家自然科学基金和面上项目等30余项; 以通讯作者身份在环境与健康领域权威杂志发表SCI论文40余篇, 申请/获授权国家发明专利8件, 以主要完成人身份获江苏省、教育部科技进步奖一、二等奖等4项。

环境化学物对精母细胞的损伤及其分子机制研究进展

徐抒语^{1,2} 陈柯佳² 何悦文¹ 彭梦凡¹ 杨柳² 王守林^{1,2*}

¹南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室, 南京 211166;

²南京医科大学公共卫生学院/全球健康中心, 南京 211166)

摘要 研究表明, 许多环境化学物可影响男性精子质量和生殖能力。精母细胞是男性生殖系统中的重要组成细胞, 承担着减数分裂等重要任务, 具有高度复杂的基因调控网络及表观遗传修饰稳态, 可能是环境化学物影响精子质量重要的作用靶点。环境化学物不仅可干扰基因调控网络使精母细胞损伤或减数分裂异常, 还可能影响精子中重要蛋白的形成, 导致精子质量下降。该文聚焦环境化学物损伤精母细胞及其分子机制的国内外进展, 以期为探明精子异常及男性不育的分子机制、降低环境化学物的生殖危害、促进男性生殖健康提供线索。

关键词 环境化学物; 精母细胞; 男性生殖; 细胞损伤; 调控机制

Research Progress on the Damage of Spermatocytes Induced by Environmental Chemicals and Related Molecular Mechanisms

XU Shuyu^{1,2}, CHEN Kejia², HE Yuewen¹, PENG Mengfan¹, YANG Liu², WANG Shoulin^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China;

²School of Public Health, Centre for Global Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract Studies report that many environmental chemicals can affect male sperm quality and reproductive ability. Spermatocytes are the important components of the male reproductive system, responsible for important tasks such as meiosis. Spermatocytes have a highly complex gene regulatory network and epigenetic modification homeostasis, which may be the important targets for environmental chemicals affecting spermatocytes and sperm quality. Environmental chemicals can not only interfere with the gene regulatory network, causing damage or abnormal meiosis in spermatocytes, but also may affect the formation of important proteins in sperm, leading to a de-

收稿日期: 2023-12-31

接受日期: 2024-03-11

国家自然科学基金(批准号: 81973091、82173562、91743205)资助的课题

*通信作者。Tel: 13951967488, E-mail: wangshl@njmu.edu.cn

Received: December 31, 2023

Accepted: March 11, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81973091, 82173562, 91743205)

*Corresponding author. Tel: +86-13951967488, E-mail: wangshl@njmu.edu.cn

crease in sperm quality. This review focuses on the domestic and international progress of the environmental chemicals damaging spermatocytes and their molecular mechanisms, in order to provide clues for exploring the molecular mechanisms of abnormal sperm quality and male infertility, reducing the reproductive hazards of environmental chemicals, and promoting male reproductive health.

Keywords environmental chemicals; spermatocytes; male reproduction; cellular damage; regulation mechanisms

据估计,全球有8%~12%的夫妇遭受不孕不育困扰,其中30%~50%的原因与男性因素有关^[1]。先天性解剖因素、睾丸功能障碍、内分泌疾病、衰老、环境因素及生活方式等都可能影响男性不育或生育能力下降^[2]。随着工业化和城市化进程,环境污染对人类健康造成了前所未有的威胁,污染物可能通过干扰激素代谢、破坏睾丸屏障、损伤生精细胞等导致精子发生障碍或功能异常,影响男性生殖能力^[3]。

精子发生是一个复杂的发育过程,生殖细胞在睾丸中按照固定的时间及周期进行有丝分裂、减数分裂而分化发育,并沿小管排列构成“生精上皮波”^[4]。据此,生精过程被划分为4个连续的阶段:精原细胞有丝分裂增殖,自我更新并产生精母细胞;精母细胞减数分裂以产生单倍体精子细胞;精子发生和精子形成。其中,减数分裂自青春期才开始并在后续生命阶段中始终连续性进行,由支持细胞(Sertoli cell)、生精细胞(精原细胞、精母细胞)、间质细胞和血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)之间的适当相互作用共同维持^[5]。精母细胞发育占据生精过程的大部分时间,其在减数分裂过程中需要进行染色质重塑、交叉(crossover, CO)形成、程序性DNA双链断裂(double strand break, DSB)、染色体重组、突触复合体的建立、两次染色体分离(同源染色体分离、姐妹染色单体分离),其中涉及到非常复杂的基因蛋白调控网络及表观遗传修饰重建。为了保证减数分裂的进行和细胞质高度浓缩的精子功能的正常维持,精母细胞中包括蛋白质编码和非编码基因都具有广泛的转录活性,也因此,睾丸中转录的基因和基因间区域比其他组织器官要丰富得多,具有所有器官中最多样化复杂化的转录组^[6-7]。

精母细胞是睾丸生精管腔中数量较多的一种细胞,其形态结构及功能的正常维持是正常精子形成的重要保证^[6]。减数分裂过程中发生错误可能会导致严重的后果,如非整倍体精子数增加、胚胎致死、发育异常等^[8]。有研究报道,约10%非梗阻性无

精子症(non-obstructive azoospermia, NOA)患者的精母细胞出现减数分裂期间的成熟停滞(maturation arrest, MA),其早期组织病理学特征包括生精小管直径减小、生殖细胞数量减少、精母细胞退化和细胞碎片增多^[9]。此外,约10%的NOA患者因减数分裂重组失败率较高,精子密度、活力和形态正常的精子数量下降,非整倍体精子数量增加,导致近一半的患者伴侣发生复发性流产^[9]。因此,精母细胞受到损伤将会导致生精过程无法进行,精子数量减少或产生异常形态功能的精子,影响男性生殖能力。

1 与精液质量下降及精母细胞损伤相关的环境化学物

研究显示,许多环境化学物具有影响男性生殖功能的潜力。无机污染物包括重金属、无机盐等,其中重金属在环境中分布广泛并具有不可降解性,是环境中十分重要的污染物,可经口摄入、经呼吸道吸入以及皮肤接触而进入人体,对健康产生影响^[10],而雄性生殖系统则是对重金属最敏感的组织系统^[11]。有机化学物在自然界中的种类丰富,特别是持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)和环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)可持久存在于环境中,如塑料生产中使用的阻燃剂、增塑剂,农业生产中使用的农药,以及高热加工中产生的多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等,都是可能影响男性生殖能力的有机化学物。由于其种类丰富,接触进入人体的方式多样,可从各个方面引起男性生殖能力下降^[12]。

现有报道提示,无论有机物或无机物都可能损伤精母细胞。早期研究发现,许多环境化学物暴露会引起精母细胞凋亡,如PM_{2.5}引起小鼠精子数量减少、生精细胞排列紊乱、精母细胞空泡化^[13];微塑料颗粒如聚苯乙烯微塑料会在小鼠睾丸中积聚,导致小鼠的精子质量和睾酮水平下降^[14]。而无机

表1 常见环境化学物引起男性生殖功能下降的人群研究

Table 1 Population-based study on the decline of male reproductive function caused by environmental chemicals						
化学物分类	化学物名称	精子异常类型	国家	研究类型	研究人数	参考文献
Classification	Chemicals	Abnormal types	Country	Study type	Number	References
Organic chemicals	Total pesticide	Decreased sperm motility	France	Cross-sectional study	671	[18]
	Organochlorine pesticides	Decreased sperm motility	China	Cross-sectional study	387	[19]
	Organic phosphate	Decreased sperm quantity and motility, sperm malformation	China	Cross-sectional study	1 015	[20]
	Phthalate	Decreased sperm quantity and motility	China	Cross-sectional study	382	[21]
Inorganic chemicals	Phosphorus containing flame retardant	Decreased sperm quantity	USA	Retrospective cohort study	220	[22]
	Arsenic, cadmium, lead	Decreased sperm motility, sperm malformation	China	Cross-sectional study	1 020	[23]
Chemical mixtures	Lead	Decreased sperm quantity and motility	China	Retrospective cohort study	226	[24]
	PM ₁₀ , PM _{2.5} , SO ₂ , NO ₂	Decreased sperm quality and abnormal levels of sperm DNA methylation	China	Cross-sectional study	1 607	[25]
	PM _{2.5} , PM _{2.5-10} , PM ₁₀	Decreased sperm motility	China	Retrospective cohort study	33 876	[26]
	CO, NO ₂ , O ₃ , PM ₁₀ , PM _{2.5}	Decreased sperm quantity and motility	China	Cross-sectional study	1 259	[27]
	PM _{2.5}	Sperm malformation	USA	Cross-sectional study	467	[28]

化学物如金属镍纳米颗粒暴露可导致雄性大鼠出现睾丸生精细胞脱落、管内细胞排列紊乱和细胞凋亡现象^[15]; 混合暴露于邻苯二甲酸酯盐及纳米聚苯乙烯会增加两者单独暴露所造成的生殖损伤^[16]。人群研究也有类似发现, 无机及有机污染物都与人群男性精液及精子质量下降有关。由表1可见, 包括PM_{2.5}、农药、微塑料、金属暴露都会导致人群男性精液质量下降, 表现为不同程度的精子数量减少、活力下降或畸形精子数增加。有些污染物如PAHs还可影响精子蛋白或DNA而引起子代出生缺陷或发育异常^[17]。

2 环境化学物损伤精母细胞的可能途径

精母细胞的正常发育与功能维持不只是单个细胞的作用, 而是由整个安全而合适的睾丸环境与正常的机体功能共同维持的。因此, 环境化学物对精母细胞产生的作用不仅有直接作用, 更多地是通过影响睾丸内其他细胞或影响机体其他组织器官的功能而影响精母细胞的正常发育, 导致生精障碍。这些途径主要包括破坏支持细胞、血睾屏障及激素平衡等。

2.1 环境化学物通过损伤支持细胞引起精母细胞损伤

支持细胞除了作为血睾屏障的主要组成细胞外, 还具有营养生精细胞和调节生精细胞周期的作用, 能通过分泌多种旁分泌因子、细胞因子、免疫抑制因子及其他生物分子调节和维持睾丸免疫稳态来支持生殖细胞发育和精子发生。全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonates, PFOS)和全氟辛酸(perfluorooctanoate acid, PFOA)暴露会扰乱大鼠支持细胞全局转录组基因表达, 其中PFOA影响了维持血睾屏障的经典信号转导与关键基因表达, 包括肌动蛋白细胞骨架信号转导及糖皮质激素生物合成和雄激素生物合成基因, 而PFOS则影响了支持细胞-细胞连接、生殖细胞-支持细胞连接和上皮黏附连接信号转导^[29]。邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[Di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]类物质能损害支持细胞的分泌功能, 导致精母细胞无法获得充足的营养而引起细胞损伤^[30]。米赤霉烯酮是一种霉菌毒素, 可通过PI3K/AKT/m-TOR信号转导通路介导支持细胞G₂/M期细胞停滞、细胞自噬引起生殖损伤^[31]。此外, 相邻支持细胞之间的紧密连接还能构成血睾屏障, 形成特殊的腔内微环境, 支撑

并促进精母细胞发育^[5]。化学物对支持细胞结构的损伤作用还会导致其维持生殖细胞发育所需的腔内生态位的功能受到破坏,破坏血睾屏障完整性,诱导精母细胞脱落,影响精母细胞减数分裂过程,导致生精异常。如DEHP、双酚AF(bisphenol AF, BPAF)能通过破坏BTB完整性,导致血液中的免疫细胞进入睾丸,影响精子发生的微环境,诱发生精障碍^[32-33]。

2.2 环境化学物通过破坏血睾屏障紧密连接而使精母细胞产生损伤

血睾屏障位于生精小管基部附近,将上皮分为基底和管腔。精原细胞和前细线期精母细胞位于基底区室中,而其他初级和次级精母细胞、圆形精子细胞和伸长/细长的精子细胞位于腔室中^[34]。血睾屏障的功能是将腔室中的生殖细胞与循环、淋巴系统隔离开,并与局部免疫抑制一起,为减数分裂的完成提供免疫特权微环境。血睾屏障是由支持细胞之间存在的紧密连接、桥粒和间隙连接维持的,其中,紧密连接的稳定存在是维持血睾屏障最重要的因素之一,其结构蛋白Occludin、Claudin和Tricellulin的正常表达是维持紧密连接的关键^[34]。环境化学物如双酚A(bisphenol A, BPA)、BPAF、全氟及多氟烷基物质(perfluorinated and polyfluoroalkyl substances, PFAS)能降低连接蛋白水平,诱导紧密连接损伤,使血睾屏障的通透性改变,从而改变睾丸微环境,使化学物及血液中的免疫因子等能够通过血睾屏障接触精母细胞,扰乱精子发生,对生精细胞发育产生不良影响^[33,35-36]。

2.3 环境化学物通过干扰激素稳态而引起精母细胞损伤

睾丸间质细胞通过产生和分泌睾酮来维持男性第二性征,调节生殖细胞的发育和减数分裂、维持血睾屏障、支持精子的黏附和调节成熟精子的释放,在生精过程中发挥重要作用。间质细胞损伤会导致睾酮的产生减少,生精小管萎缩、精母细胞减少^[37]。激素的分泌与维持离不开下丘脑-垂体-睾丸轴(hypothalamic-pituitary-testicular axis, HPT)的作用,其通过分泌各种激素来调节雄性生殖生育能力,其中促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)和睾酮(testosterone, T)维持精子发生,黄体生成素(luteinizing hormone, LH)则调节间质细胞的雄激素产生。研究显示,EDCs可通过拟雌激素或抗雄激素特性影响男性生殖系统,导致激素稳态失衡和生殖

功能异常。DEHP通过干扰HPT轴降低血清T、LH和FSH水平,造成初级精母细胞数量减少,精子发生异常^[38];有机磷农药吡丙醚(pyriproxyfen, PPF)通过改变HPT轴基因表达,使雌二醇(estradiol, E2)水平增加、T水平降低,造成成熟精母细胞数量减少、未成熟精母细胞增加^[39]。这些研究结果提示,激素稳态对精母细胞的发育和成熟有着重要作用,过高或过低的激素水平都可能导致精母细胞发育异常。

3 环境化学物损伤精母细胞的分子机制

3.1 环境化学物引起细胞应激导致精母细胞凋亡

环境化学物可导致细胞网络的相对平衡状态遭到破坏,引起细胞应激。精母细胞内氧化剂与抗氧化剂的平衡是维持其正常发育的重要因素之一。表2统计了引起细胞应激的环境化学物及重要效应因子,其中,过高的活性氧(reactive oxygen species, ROS)是化学物引起细胞氧化应激的重要效应因子,可激活凋亡信号直接诱导细胞凋亡或通过激活表观遗传修饰及其他通路引起细胞损伤,而氧化应激与内质网应激可能是环境因素引起精母细胞损伤的重要机制。

3.1.1 环境化学物引起精母细胞氧化应激 ROS是高活性氧化自由基,其内源性来源包括氧化磷酸化、细胞色素P450(cytochrome P450 enzyme system, CYP450)介导的代谢、过氧化物酶体与炎症细胞激活。正常水平的ROS是维持细胞内生理活动的重要因素,但过量ROS形成将诱导细胞氧化应激导致细胞凋亡^[56]。大量证据表明,ROS介导的精子损伤是30%~80%的不孕不育患者的病理学原因。暴露于空气污染物、POPs、增塑剂(如邻苯二甲酸酯)、金属(如镉、铅)和微塑料(如丙烯酸胺微塑料)都会增加精子中的氧化应激水平^[57],提示ROS作为调节因子在男性生殖系统中发挥重要作用。精母细胞接触环境因素刺激产生的ROS可激活下游一系列损伤通路,引起细胞凋亡或精子异常。双环氧丁烷(diepoxybutane, DEB)体内和体外暴露均可抑制精母细胞增殖,其通过诱导ROS产生,导致精母细胞DNA损伤,并激活细胞G₂检查点Chk1/Cdc25c/Cdc2通路,引起精母细胞G₂期阻滞,增殖受到抑制,致使精子发生异常^[57]。高脂饮食(high-fat diet, HFD)和重金属镉(cadmium, Cd)联合暴露能通过激活ROS以m⁶A-YTHDF2依赖性方式降解精母细胞减数分裂关键因子STEAS8,从

表2 环境化学物导致精子异常相关的精母细胞应激类型

化学物分类	化学物名称	损伤表型	重要因子	应激类型	实验动物	参考文献
Classification	Chemicals	Damage	Important factors	Types of stress	Animals	References
Organic chemicals	Cyhalothrin	Apoptosis of spermatocytes	MDA ↑, T-AOC ↓	Oxidative stress	Rat	[40]
	Triazophos	Reduced germ cells	ROS ↑	Oxidative stress	Rat	[41]
	Pyriproxyfen	Destruction of spermatogenesis	Imbalance of Ca ²⁺	ER stress	Zebrafish	[42]
	Polystyrene microplastics	Reduced number of spermatogonia, spermatocytes, and sperm cells	Catalase, superoxide dismutase, and peroxidase ↓	Oxidative stress	Rat	[43]
	Acrylamide	Damage to spermatocytes	Enzyme activity of G6P-DH, SOD and GPX ↓, GST and GSH ↑	Oxidative stress	Rat	[44]
	BDE-209	Meiotic arrest of spermatocytes	SOD and MDA ↑	Oxidative stress	Mouse	[45]
	Dinbutyl phthalate	Apoptosis of spermatocytes	ROS ↑	Oxidative stress	Mouse	[46]
	Bisphenol A	Apoptosis of spermatocytes	ROS ↑	ER stress	Mouse	[47]
	Dibutyl phthalate	autophagy and apoptosis of spermatocytes	GRP-78, ATF-6 and p-EIF2α ↑	ER stress	Rat	[48]
	Fluoride	Apoptosis of germ cells	Activation of ER stress signaling related genes	ER stress	Rat	[49]
Inorganic chemicals	Perfluorooctane sulfonate	Decreased spermatocytes	Imbalance of Ca ²⁺	ER stress	Mouse	[50]
	Nickel	Reduced number of spermatogonia, spermatocytes, and sperm cells	ROS ↑	Oxidative stress	Mouse	[51]
	Hexavalent chromium	Reduced germ cells	Disruption of redox balance	Oxidative stress	Rat	[52]
	Cadmium	Apoptosis of spermatocytes	ATF6 ↑	ER stress	Mouse	[53]
Chemical mixtures	Rare earth yttrium	Reduced germ cells	Activation of Ca ²⁺ -ROS	ER stress	Mouse	[54]
	Mixed exposure to high-fat diet and heavy metal cadmium	Apoptosis of spermatocytes	ROS ↑	Oxidative stress	Mouse	[55]

↑: 增加; ↓: 减少。

↑: increase; ↓: decrease.

而影响精子发生, 而自由基清除剂*N*-叔丁基- α -苯硝基(*N*-tert-Butyl- α -phenylnitron, PBN)则可挽救这种损伤, 进一步说明ROS在其中发挥了重要的调节作用^[55]。

3.1.2 环境化学物引起精母细胞内质网应激 内质网应激是由于病理因素阻碍了细胞内质网(endoplasmic reticulum, ER)内蛋白质的正确折叠和翻译后修饰, 导致内质网中错误折叠的蛋白质积聚或内质网钙稳态破坏产生应激。内质网应激会触发内质网未折叠蛋白反应(unfolded protein reaction, UPR)的发生, 促进细胞凋亡相关基因表达, 抑制抗凋亡蛋白BCL-2表达, 导致线粒体凋亡途径介导的细胞凋

亡^[58]。当内质网应激长期持续在高水平, 超出细胞自我修复能力时, 细胞将发生程序性死亡。小鼠精母细胞暴露于PFOA将激活过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator activated receptor δ , PPAR δ)引起代谢应激, 导致Beclin 1参与下的肌醇1,4,5-三磷酸受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP3R)超敏引起内质网钙稳态破坏, 引发内质网钙耗竭的内质网应激而导致精母细胞凋亡^[50]。

3.2 环境化学物诱导DNA损伤引起精母细胞凋亡

减数分裂过程中的DNA与染色体变化是启动减数分裂的重要开关。有些环境化学物能通过诱导精母细胞基因组及线粒体DNA损伤、染色体损伤而

导致精母细胞凋亡。聚苯乙烯微塑料可通过氧化应激通路破坏精母细胞中线粒体的结构和功能,引起线粒体DNA完整性下降,从而触发受损或老化的线粒体自噬并降解,进而损伤精母细胞结构和功能导致精母细胞死亡^[59];苯并[a]芘-7,8-二氢二醇-9,10-氧化物(Benzo [a] pyrene-7,8-dihydrodiol 9,10-epoxide, BPDE)能激活精母细胞DNA损伤反应,诱导细胞端粒DNA长度缩短、功能障碍从而触发端粒调节的细胞衰老和凋亡^[60]。此外,靶向芳烃受体并由CYP酶代谢活化反应形成的DNA加合物引起的DNA损伤也是PAHs引起精母细胞损伤的重要机制^[61]。

3.3 环境化学物通过影响减数分裂关键事件引起精母细胞减数分裂阻滞

在精子发生过程中,减数分裂是核心环节,其通过频繁的同源重组将基因组一分为二产生单倍体配子细胞并维持基因组多态性,减数分裂过程的失败是男性不育的主要原因之一。多项研究发现,环境化学物可通过直接或间接途径破坏减数分裂过程,从而影响精子发生。

3.3.1 环境化学物引起减数分裂启动失败 减数分裂的开始是由维甲酸(retinoic acid, RA)及维甲酸8(stimulated by retinoic acid gene 8, STRA8)的表达调节的。环境因素影响关键基因表达将导致减数分裂无法正常启动,精原细胞向精母细胞过渡失败^[62]。溴代阻燃剂十溴二苯醚(BDE-209)能通过影响组蛋白H4K20单甲基化(histone H4K20 monomethyl, H4K20me1)及其转移酶SETD8下调减数分裂关键启动因子STRA8的表达,抑制减数分裂启动、阻断细胞周期进程^[63]。柠檬黄的合成有机偶氮燃料食品黄4(food yellow 4, FY4)可显著降低精母细胞中STRA8表达水平,导致减数分裂阻滞^[64]。用重金属镉处理鸡胚,发现其影响视黄醛脱氢酶2(retinaldehyde dehydrogenase 2, *Raldh2*)和RA受体(retinoic acid receptors, *RARs*) mRNA表达,干扰RA信号通路,并降低STRA8表达水平从而抑制减数分裂的启动^[65]。

3.3.2 环境化学物引起减数分裂重组失败 在精母细胞中,DSB修复伴随着重组处理蛋白如DMC1、RAD51、RPA和MSH4/MSH5的表达,这是启动同源染色体重组、维持减数分裂的重要因素^[66]。减数分裂重组是蛋白Spo11通过DNA双链断裂来启动的,这也是同源染色体之间成功联会的关键。CdSe/ZnS量子点处理后,发现Rad51在内的负责减

数分裂中DSB修复的HRR通路基因下调,导致DSB修复受损,DSB修复损伤是量子点暴露后的主要精母细胞损伤类型^[67]。BDE-209可通过诱导精母细胞氧化应激引起DNA链断裂,诱发DSB修复受损导致精母细胞减数分裂阻滞在I期,从而引起精子发生异常^[68]。

3.3.3 环境化学物引起减数分裂染色体活动异常 染色体动态变化是维持精母细胞减数分裂的重要因素。特定阶段的开放染色质用于维持不同生精过程中高度复杂的基因转录。因此,不同阶段的生精细胞上具有不同的染色质景观,在精母细胞中具有更多的异染色质簇以维持减数分裂。在有丝分裂过渡至减数分裂时期,染色质可及性被重组,用以促进特殊基因的转录;在减数分裂前期,除启动子区外,基因间和内含子区域发生可及染色质的从头形成;而在减数分裂后期形成圆形精子细胞的过程中,染色质可及性则大大降低,染色质逐渐闭合,圆形精子细胞全基因组染色质进行压缩以形成精子^[69-70]。在减数分裂过程中联会复合体(synaptonemal complex, SC)的形成、同源染色体之间的重组、减数分裂性染色体失活(meiotic chromosome inactivation, MSCI)、可及染色质从头形成都是重要的染色质事件^[70]。哺乳动物SC包含三种减数分裂特异性成分,突触复合体蛋白1(synaptonemal complex protein 1, SCP1)、SCP2和SCP3,它们分别为横丝、轴向/侧向的主要组成部分,其中SCP3是侧体核心。当环境化合物导致精母细胞核内联会复合体结构破坏时,一般呈现三种损伤形态:碎片状的、未联会的、虚线状的。研究证实,六价铬暴露会导致大鼠精母细胞联会复合体出现9.3%碎片状、4.2%不联会和0.4%虚线状,且浓度越高,SC异常率越高^[71]。大鼠体外生精小管BPA染毒模型显示,细线期SC出现了未极化的异常长轴核,粗线期出现了未联会的SC和粉碎的SC,双线期SC出现了单链和碎片状,以上SC结构的异常诱导了减数分裂过程阻滞^[72]。此外,二氧化硅纳米颗粒可能通过影响PIWI样蛋白1(Piwi like RNA-mediated gene silencing 1, PIWI1)的表达及功能,使减数分裂后期的染色体闭合失败、组蛋白与鱼精蛋白的交换被抑制导致圆形精子染色质重塑异常引起单倍体精子无法正常形成^[73]。可见,在减数分裂整个过程中,染色体的正常活动是维持分裂进行的关键。

3.4 环境化学物通过改变表观遗传修饰影响精母细胞

精母细胞的减数分裂活动十分复杂,是在多种表观遗传因素协同关键减数分裂蛋白作用下完成的复杂生理活动。在生精过程中,表观遗传修饰的积累具有相对固定的周期和规律,环境化学物能够通过表观遗传修饰的影响进而引起精母细胞损伤。精母细胞正常生理活动的进行离不开表观遗传修饰参与的基因调控,染色质修饰、DNA甲基化、RNA甲基化、非编码小RNA等表观遗传修饰是形成健康精子的重要保障。

3.4.1 环境化学物引起染色体修饰异常 在减数分裂时期,为配合染色质活动,大量染色质修饰在此重塑,如组蛋白高乙酰化促进染色质松弛^[74]、甲基化促进染色质重塑与压缩^[75]。当环境化学物引起精母细胞染色质修饰重塑破坏时,生精过程可能被打断引起生精异常或失败。一方面,化学物通过影响有丝分裂至减数分裂过渡过程中的染色质修饰变化,引起减数分裂启动失败,精母细胞凋亡。BDE-209可引起组蛋白甲基化异常并抑制精母细胞减数分裂启动和细胞周期进程导致精母细胞凋亡、精子发生障碍、精子数量减少^[63]。另一方面,环境化学物也可能通过干扰染色质修饰的形成导致圆形精子细胞中的染色质压缩异常引起精子功能异常。BPA可使睾丸中表观遗传重塑酶转录本失调,促进DNA高甲基化和H3K27me3去甲基化,引发组蛋白乙酰转移酶活性增加,导致组蛋白(H3K9ac、H3K14ac、H4K12ac)过度乙酰化,损害精母细胞周期进程^[76]。

3.4.2 环境化学物引起DNA甲基化修饰异常 在精子发生过程中,DNA甲基化在沉默组织特异性基因、印记因子集以及重复元件等方面具有重要性,其用于抑制减数分裂期转座子激活以保护染色质与DNA的完整性并促进精母细胞减数分裂重组。虽然转座子的去抑制主要由染色质介导,但在减数分裂开始时,重复区域的DNA甲基化逐渐重建,而染色质修饰在精子发生过程中逐渐丢失,染色质活动引起染色质标记丢失,此时DNA甲基化变得至关重要^[77-79]。缺失DNA甲基化酶,或当DNA甲基化的转座子控制有缺陷时,逆转录转座子再激活产生的过多DNA断裂可能会与DSB竞争并阻断修复机制,使减数分裂染色体配对受损导致减数分裂失败和精母细胞凋亡。许多环境化学物可引起睾丸DNA甲基化酶或DNA

甲基化位点改变而造成生精异常。如大气细颗粒物PM_{2.5}可通过引起基因组DNA低甲基化导致精母细胞数量减少和类固醇激素基因表达异常,进而造成精子发生障碍^[80];二噁英、多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)、苯并[a]芘(BaP)等化学物会使精母细胞DNA甲基化修饰异常而引起生精异常^[81-82],其中BaP引起DNA甲基化升高,而PCBs引起DNA甲基化下调,说明DNA甲基化的平衡在维持精母细胞的正常功能中具有重要作用,其丰度需保持在适当的阈值范围内,环境化学物的干扰使其丰度过高或过低都将引起生精异常。

3.4.3 环境化学物引起RNA甲基化修饰异常 除DNA甲基化之外,RNA上的甲基化修饰对维持精母细胞同样具有重要作用,其中,m⁶A修饰在减数分裂启动及过程中具有重要作用,可逆的m⁶A修饰是晚期减数分裂和单倍体生精细胞中mRNA转录后调控的关键机制。m⁶A甲基化修饰在减数分裂时期开始积累,到圆形精子时期细胞内存在较高水平的m⁶A甲基化修饰。m⁶A甲基化相关调节因子在精母细胞不同阶段发挥着重要的作用。甲基转移酶METTL3、METTL14,阅读蛋白YTHDC1、YTHDF2可促进精原细胞向精母细胞转化并促进精母细胞进入减数分裂;而去甲基酶FTO和ALKBH5,阅读蛋白家族在精母细胞中促进RNA的选择性剪切与翻译(包括小RNA的剪切与形成),以维持正常的转录翻译^[83-85]。邻苯二甲酸酯类物质可靶向精母细胞,引起甲基酶METTL14及阅读蛋白YTHDC表达水平增加、去甲基酶FTO表达水平下降,使细胞中m⁶A甲基化水平升高。有趣的是,低剂量邻苯二甲酸酯引起的m⁶A水平升高能稳定精母细胞中mRNA而使精母细胞免于凋亡,而高剂量下过高的m⁶A水平却引起了精母细胞凋亡,导致生精细胞脱落^[86-87]。提示环境化学物具有通过影响RNA甲基化调节因子而引起精母细胞凋亡的能力,精母细胞中m⁶A的稳态平衡是维持生精过程的重要保障。

3.4.4 环境化学物引起非编码小RNA表达异常 在精母细胞时期,非编码小RNA的生成累积及作用发挥也是重要的表观遗传现象,miRNA、环状RNA(circRNA)、PIWI相互作用RNA(piRNA)、tRNA衍生小RNA(tsRNA)和rRNA衍生小RNA(rsRNA)在转录、转录后和翻译水平上调控雄性生殖细胞正常发育^[88]。编码或非编码RNA作为基因表达和染色质结

构的调控元件,都可能作为环境化学物诱导的表观遗传程序改变的靶标,作用于生精细胞并引起损伤。二氧化硅纳米颗粒作用于睾丸精母细胞时,会下调miRNA等小RNA,促进精母细胞凋亡^[89]。另外,精母细胞时期的小RNA积累是精子中维持功能的许多成熟RNA存在的重要原因。PAHs类物质暴露会使积累到精浆的miRNA表达改变,引起精液质量下降^[17],其机制可能与PAHs进入睾丸后直接作用于精母细胞并影响细胞内的miRNA转录形成有关。

表观遗传修饰的正常建立及平衡与生精过程的正常维持有着重要的关系,其动态变化易被环境所干扰,是环境化学物引起精母细胞损伤中值得关注的机制。各种表观遗传修饰之间存在复杂的相互作用,环境化学物导致的表观遗传修饰改变不局限于一种,而是可能同时导致细胞内的多种表观遗传景观异常,引起精母细胞损伤导致精子数量减少或功能异常。环境砷暴露可通过三价砷甲基转移酶[arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase, As3MT]导致S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)和5-甲基胞嘧啶(5-mC)水平降低,组蛋白和DNA低甲基化,长散布元件1类(LINE1或L1)上调,DSB修复缺陷和减数分裂停滞,进而导致精母细胞凋亡^[90]。

3.5 环境化学物损伤精母细胞的其他新机制

近年来,新机制在精母细胞中的作用不断被关注,如铁离子介导的细胞死亡——铁死亡。铁离子在细胞正常活动中具有核心作用,其在细胞内的转化维持了电子传递链,因此细胞铁稳态受到精细控制。当环境化学物产生刺激时,铁稳态紊乱则会诱发细胞内氧化反应异常,铁依赖性的芬顿反应是细胞铁死亡机制中的重要因素^[91]。研究发现,在精母细胞中脂质代谢基因(*Acs14*和*Aloxe3*)和抗氧化基因*Gpx4*是PM_{2.5}致精母细胞铁死亡的关键靶基因,而铁螯合剂甲磺酸去铁胺(*desferrioxamine B mesylate*, DFOM)和脂质过氧化抑制剂铁抑素-1(*ferrostatin-1*, Fer-1)可以逆转PM_{2.5}的损伤作用,表明PM_{2.5}会引起精母细胞铁死亡^[13]。这提示铁死亡作为一个新发现的细胞死亡机制,在环境因素引起生殖系统损伤中具有一定作用。

此外,环境化学物还能通过影响代谢引起精母细胞异常,比如饮食诱导的肠道微生物群失调能通过肠-睾轴影响睾丸内精子发生。研究发现,能量过

高的饮食诱导肠道菌群失调,由胆汁酸失调和肠道菌群失调介导维生素A的异常代谢作用可通过循环血液转移到睾丸,而维生素A代谢在减数分裂基因激活中起着重要作用,其紊乱将导致睾丸精原细胞分化急剧下降、精母细胞减数分裂无法启动,进而影响精母细胞的功能维持与正常发育^[92]。

4 环境化学物对精母细胞损伤研究的新策略

当前,新技术如单细胞测序、空间蛋白组学及其他组学的高速发展,双光子显微镜和冷冻电镜等的广泛运用,为从组织或细胞层面上原位检测化学物及其代谢物以及精准解析精母细胞的损伤机制提供了全新的策略,可以更全面地诠释环境化学物对男性生殖功能的影响。

4.1 组织和细胞中环境化学物的检测新策略

原位、精准的环境化学物识别和检测是评价其生殖损伤的重要环节。长期以来,探针都被用于检测生物组织中的特定蛋白、分子表达及分布情况,化学物检测也不例外。一些研究通过荧光探针成像直观展示化学物进入细胞过程,如以纳米塑料包裹BaP,添加荧光基团后作为荧光探针识别和实时监测BaP在组织中的分布和进入细胞的过程^[93]。除了传统荧光探针外,拉曼光谱利用光学效应也能直接反映分子的结构和化学性质,在活细胞和组织中可直接可视化化学反应。拉曼显微镜及基于拉曼光谱原理的小分子标记能用于标记并可视化生物活性小分子,提供有关生物活性物质的相关信息如组织细胞定位及蛋白相互作用。目前已有一些纳米粒子、药物能被拉曼探针识别并实现亚细胞定位^[94]。除此之外,冷冻电镜技术在病原体检测、细胞内小分子化学物检测、细胞生物质绿色化工生产的技术开发中也得到广泛应用,可观测自然状态下吸附在纳米颗粒上的生物分子电晕的真实性质,展示分子直接相互结合关系^[95]。先进的可视化手段能够更加直观地在睾丸组织中展现化学物进入细胞的过程,以及进入细胞后与关键分子结合的过程。除了显微成像外,人群暴露、效应评估的方法也在不断更新。研究者开发建立了生物系统的场分辨红外光谱,可用于多种分子识别,制作化学物分子指纹,尤其适用于人群血样或尿样中的特殊物质识别及暴露评估^[96]。而对于具有挥发性的化学物,气相色谱-串联质谱

(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、多维 GC-MS 等光谱和质谱方法, 以及质子转移反应质谱 (proton transfer reaction mass spectrometry, PTR-MS)、离子流管质谱 (selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS)、二次电喷雾电离质谱法 (secondary electrospray ionization mass spectrometry, SEMI-MS)、实时直接质谱 (direct analysis in real time direct analysis in real time, DART-MS) 等方法也被广泛运用^[97]。此外, 高分辨率质谱法 (high resolution mass spectroscopy, HRMS) 可对人体内部化学物暴露情况进行整体表征, 可用于重复分析人群队列大量生物样本中的可数千种内源性代谢物和外部衍生的化学物质及其生物转化产物^[98], 这些技术将极大地推动环境化学物对男(雄)性生殖功能的风险评估。

4.2 环境化学物损伤精母细胞机制的评价新策略

多种组学运用及测序技术的逐步成熟、更新是研究环境化学物引起精母细胞损伤相关机制的重要手段。空间蛋白组学、代谢组学、转录组学测序、单细胞测序技术及多种表观遗传测序技术已被广泛运用于男性精子发生的机制研究中。研究者利用长读纳米孔测序技术检测父系 DNA 甲基化遗传印迹, 绘制遗传图谱, 明晰父系介导的基因遗传机制^[99]。在对精子发生中的 m⁶A 甲基化修饰作用研究中, 研究者使用定量超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS/MS) 技术监测精子发生中的 m⁶A 甲基化修饰丰度; 结合 m⁶A 甲基化测序及转录组测序技术, 绘制了精子发生中的 m⁶A 甲基化修饰含量及分布变化图谱^[85]。对发育中的人类睾丸的单细胞分析揭示了体细胞生态位和胎儿生殖系干细胞的建立过程, 有助于分析细胞的发育历程^[100]。另有研究报道运用单细胞测序技术研究了不育男性生殖细胞再生障碍相关的分子机制, 确定了间质细胞的不成熟、慢性组织炎症、纤维化和体细胞的衰老表型, 以及血液中慢性炎症的标志物^[101]。这类技术有助于明确生精细胞损伤中的靶细胞群及差异表达基因, 为全面客观的机制研究提供了新的途径。

4.3 潜在生殖毒性化学物的筛选和识别新策略

《21世纪毒理学愿景》中提出的不良结局途径 (adverse outcome pathway, AOP) 概念提供了一个基于机制的框架来解释现有化学物的毒理学评价和管理的新策略, 目前已在环境化学物的内分泌干扰评估中广泛运用, 而环境化学物的定量构效关系 (quan-

titative structure-activity relationship, QSAR) 研究、基于人工智能和大数据的计算毒理学研究的快速发展使得从大量环境化学物中筛选和评估具有生殖毒性潜力的化学物变得可能^[102]。有研究运用 QSAR 比较了 11 种 BPA 类似物对人和大鼠胎盘芳香化酶细胞色素 P450 家族 19 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1, CYP19A1) 的抑制效力, 分析了苯环取代基位置对 BPA 类似物的内分泌干扰能力的影响及 CYP 酶在其中的作用^[103]。计算毒理学和预测毒理学的发展有助于整合环境化学物引起的生殖系统损伤的已有数据, 并筛选重要的通路及机制, 力图构建一个完整全面的毒性评估模型, 用于筛选未知的生殖毒物。分析已被报道的化学物生殖毒性活性数据, 结合 QSAR, 加以计算机模拟和人工智能可实现高效快速预测新型化学物引起生殖损伤的潜力, 为环境化学物的生殖毒性评估提供有力的技术支撑。

5 总结与展望

精母细胞作为雄性生殖系统中生殖细胞的重要组成部分, 发挥着减数分裂并形成精子、维持生育能力的重要作用。精母细胞的发育涉及高度复杂的基因、蛋白调控网络与表观遗传修饰动态平衡, 可能是环境化学物引起男性生殖功能下降的重要靶点。图 1 总结了环境化学物对精母细胞产生影响的途径与机制。环境化学物能通过损伤支持细胞及紧密连接使精母细胞失去营养与支撑, 或破坏血睾屏障而直接接触精母细胞干扰其发育; 也能通过影响内分泌稳态使精母细胞失去合适的生长发育环境导致精母细胞凋亡, 其中的机制涉及细胞应激、DNA 损伤、减数分裂阻滞及表观遗传修饰异常等。精母细胞的生理活动复杂, 其中有许多过程还不为人熟知, 加之环境化学物复杂多样, 因此环境化学物引起精母细胞损伤的机制还有待进一步探索。除了进一步规范和完善不孕不育专病队列、出生队列、辅助生育队列等人群研究外, 利用现代分析技术、多组学和测序技术并结合大数据和人工智能等新策略在环境化学物的生殖系统暴露评估、生殖细胞的原位检测及动态变化、对关键分子的靶向作用及其损伤机制的全景解析等方面也是未来生殖毒理学发展的可行方向, 而精母细胞无疑仍是备受关注的重要靶点, 值得系统深入研究。

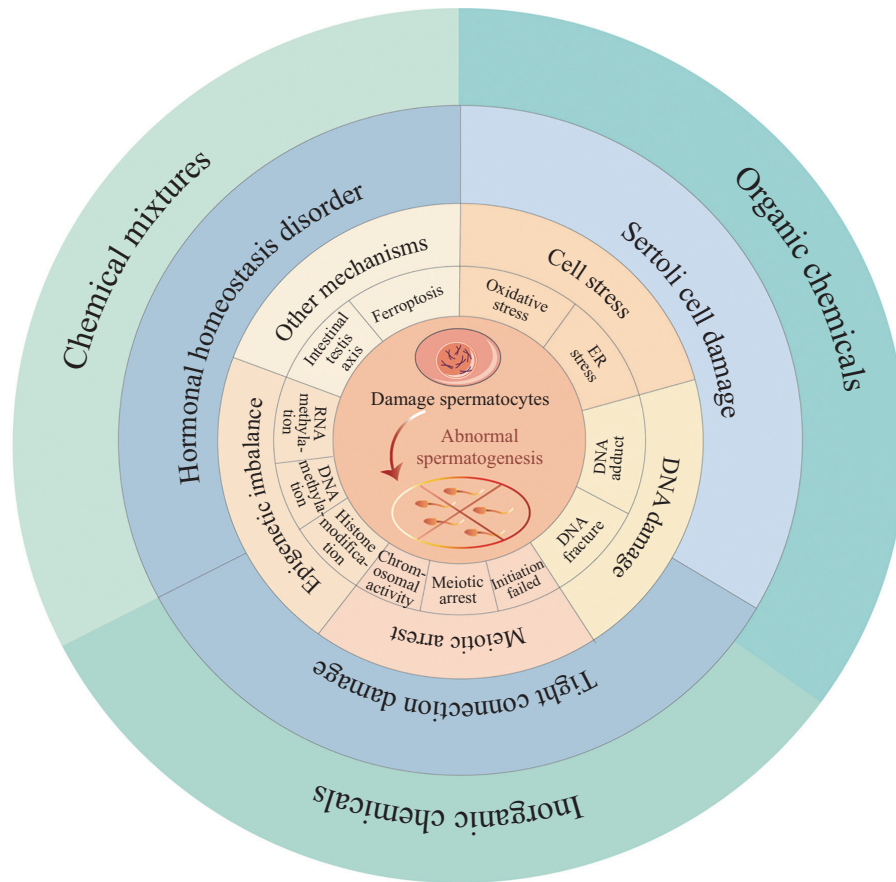


图1 环境化学物对精母细胞产生影响的可能途径和机制

Fig.1 Possible pathways and mechanisms of environmental chemicals affecting spermatocytes

参考文献 (References)

- [1] INHORN M C, PATRIZIO P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(4): 411-26.
- [2] BELLADELLI F, MUNCEY W, EISENBERG M L. Reproduction as a window for health in men [J]. Fertil Steril, 2023, 120(3 Pt 1): 429-37.
- [3] CAI X, NI H, WANG Q, et al. Sperm quality decline associated with gaseous pollutant exposure: evidence from a large cohort multicenter study [J]. J Hazard Mater, 2023, 460: 132330.
- [4] GRISWOLD M D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis [J]. Physiol Rev, 2016, 96(1): 1-17.
- [5] WU S, YAN M, GE R, et al. Crosstalk between sertoli and germ cells in male fertility [J]. Trends Mol Med, 2020, 26(2): 215-31.
- [6] ALAVATTAM K G, MAEZAWA S, SAKASHITA A, et al. Attenuated chromatin compartmentalization in meiosis and its maturation in sperm development [J]. Nat Struct Mol Biol, 2019, 26(3): 175-84.
- [7] SOUMILLON M, NECSULEA A, WEIER M, et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis [J]. Cell Rep, 2013, 3(6): 2179-90.
- [8] HANDEL M A, COBB J, EAKER S. What are the spermatocyte's requirements for successful meiotic division [J]? J Exp Zool, 1999, 285(3): 243-50.
- [9] NETO F T, BACH P V, NAJARI B B, et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors [J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 59: 10-26.
- [10] SALEK MAGHSOUDI A, HASSANI S, MIRNIA K, et al. Recent advances in nanotechnology-based biosensors development for detection of arsenic, lead, mercury, and cadmium [J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 803-32.
- [11] RANA S V. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals: a review [J]. Biol Trace Elem Res, 2014, 160(1): 1-14.
- [12] KAHN L G, HARLEY K G, SIEGEL E L, et al. Persistent organic pollutants and couple fecundability: a systematic review [J]. Hum Reprod Update, 2021, 27(2): 339-66.
- [13] WANG J, ZHANG Z, SHI F, et al. PM_{2.5} caused ferroptosis in spermatocyte via overloading iron and disrupting redox homeostasis [J]. Sci Total Environ, 2023, 872: 162089.
- [14] JIN H, MA T, SHA X, et al. Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice [J]. J Hazard Mater, 2021, 401: 123430.
- [15] KONG L, TANG M, ZHANG T, et al. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 21253-69.
- [16] DENG Y, YAN Z, SHEN R, et al. Enhanced reproductive toxicities induced by phthalates contaminated microplastics in male mice (*Mus musculus*) [J]. J Hazard Mater, 2021, 406: 124644.
- [17] YANG P, CHEN D, WANG Y X, et al. Mediation of association between polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and semen

- quality by spermatogenesis-related microRNAs: a pilot study in an infertility clinic [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 384: 121431.
- [18] LAHIMER M, CAPELLE S, LEFRANC E, et al. Effect of pesticide exposure on human sperm characteristics, genome integrity, and methylation profile analysis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(31): 77560-7.
- [19] MIAO Y, ZENG J Y, RONG M, et al. Organochlorine pesticide exposures, metabolic enzyme genetic polymorphisms and semen quality parameters among men attending an infertility clinic [J]. *Chemosphere*, 2022, 303(Pt 1): 135010.
- [20] LI Y, LUO D, ZHAO X, et al. Urinary concentrations of organophosphate esters in relation to semen quality: a cross-sectional study [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 865: 161202.
- [21] YANG P, DENG L J, XIE J Y, et al. Phthalate exposure with sperm quality among healthy Chinese male adults: the role of sperm cellular function [J]. *Environ Pollut*, 2023, 331(Pt 1): 121755.
- [22] INGLE M E, MINGUEZ-ALARCON L, CARIGNAN C C, et al. The association between urinary concentrations of phosphorous-containing flame retardant metabolites and semen parameters among men from a fertility clinic [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2018, 221(5): 809-15.
- [23] HE Y, ZOU L, LUO W, et al. Heavy metal exposure, oxidative stress and semen quality: exploring associations and mediation effects in reproductive-aged men [J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125498.
- [24] REN J, CUI J, CHEN Q, et al. Low-level lead exposure is associated with aberrant sperm quality and reproductive hormone levels in Chinese male individuals: results from the MARHCS study low-level lead exposure is associated with aberrant sperm quality [J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125402.
- [25] CHENG Y, TANG Q, LU Y, et al. Semen quality and sperm DNA methylation in relation to long-term exposure to air pollution in fertile men: a cross-sectional study [J]. *Environ Pollut*, 2022, 300: 118994.
- [26] ZHAO Y, ZHU Q, LIN J, et al. Association of exposure to particulate matter air pollution with semen quality among men in china [J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(2): e2148684.
- [27] HUANG G, ZHANG Q, WU H, et al. Sperm quality and ambient air pollution exposure: a retrospective, cohort study in a Southern province of China [J]. *Environ Res*, 2020, 188: 109756.
- [28] NOBLES C J, SCHISTERMAN E F, HA S, et al. Ambient air pollution and semen quality [J]. *Environ Res*, 2018, 163: 228-36.
- [29] WAN H T, LAI K P, WONG C K C. Comparative analysis of PFOS and PFOA toxicity on sertoli cells [J]. *Environ Sci Technol*, 2020, 54(6): 3465-75.
- [30] RADKE E G, BRAUN J M, MEEKER J D, et al. Phthalate exposure and male reproductive outcomes: a systematic review of the human epidemiological evidence [J]. *Environ Int*, 2018, 121(Pt 1): 764-93.
- [31] CORPUZ-HILSABECK M, CULTY M. Impact of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals on Sertoli cell development and functions [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1095894.
- [32] ZHAO Y, CHEN M S, WANG J X, et al. Connexin-43 is a promising target for lycopene preventing phthalate-induced spermatogenic disorders [J]. *J Adv Res*, 2023, 49: 115-26.
- [33] SCHUMM M, EDIE S M, COLLINS K S, et al. Common latitudinal gradients in functional richness and functional evenness across marine and terrestrial systems [J]. *Proc Biol Sci*, 2019, 286(1908): 20190745.
- [34] MRUK D D, CHENG C Y. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(5): 564-91.
- [35] TIWARY R, RICHBURG J H. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) reversibly disrupts the blood-testis barrier (BTB) in pubertal rats [J]. *Toxicol Sci*, 2023, 197(2): 147-54.
- [36] XIA Y, HAO L, LI Y, et al. Embryonic 6:2 FTOH exposure causes reproductive toxicity by disrupting the formation of the blood-testis barrier in offspring mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 250: 114497.
- [37] WANG J, ZHAO T, CHEN J, et al. Multiple transcriptomic profiling: p53 signaling pathway is involved in DEHP-induced prepubertal testicular injury via promoting cell apoptosis and inhibiting cell proliferation of Leydig cells [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 406: 124316.
- [38] HA M, GUAN X, WEI L, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits testosterone level through disturbed hypothalamic-pituitary-testis axis and ERK-mediated 5alpha-Reductase 2 [J]. *Sci Total Environ*, 2016, 563-564: 566-75.
- [39] MAHARAJAN K, MUTHULAKSHMI S, KARTHIK C, et al. Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 735: 139496.
- [40] LI X Y, SUN J, MA L Y, et al. The role of G3BP1 gene mediates P38 MAPK/JNK pathway in testicular spermatogenic dysfunction caused by cyfluthrin [J]. *Toxics*, 2023, 11(5): 451.
- [41] SUHAS K S, VIJAPURE S, YADAV S, et al. Nano-quercetin mitigates triazophos-induced testicular toxicity in rats by suppressing oxidative stress and apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2024, 183: 114331.
- [42] STALDONI DE OLIVEIRA V, GOMES CASTRO A J, MARINS K, et al. Pyriproxyfen induces intracellular calcium overload and alters antioxidant defenses in *Danio rerio* testis that may influence ongoing spermatogenesis [J]. *Environ Pollut*, 2021, 270: 116055.
- [43] IJAZ M U, SHAHZADI S, SAMAD A, et al. Dose-dependent effect of polystyrene microplastics on the testicular tissues of the male sprague dawley rats [J]. *Dose Response*, 2021, doi: 10.1177/15593258211019882.
- [44] SANTOS L D D, SOUZA T L, SILVA G I D, et al. Prepubertal oral exposure to relevant doses of acrylamide impairs the testicular antioxidant system in adulthood, increasing protein carbonylation and lipid peroxidation [J]. *Environ Pollut*, 2023, 334: 122132.
- [45] ZHANG T, HE H, WEI Y, et al. Vitamin C supplementation rescued meiotic arrest of spermatocytes in Balb/c mice exposed to BDE-209 [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 242: 113846.
- [46] ZHANG G, YANG W, JIANG F, et al. PERK regulates Nrf2/ARE antioxidant pathway against dibutyl phthalate-induced mitochondrial damage and apoptosis dependent of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 308: 24-33.
- [47] YIN L, DAI Y, CUI Z, et al. The regulation of cellular apoptosis by the ROS-triggered PERK/EIF2alpha/chop pathway plays a

- vital role in bisphenol A-induced male reproductive toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 314: 98-108.
- [48] ZHANG G, LIU K, LING X, et al. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective role against apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 245: 86-98.
- [49] ZHANG S, JIANG C, LIU H, et al. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 271(2): 206-15.
- [50] YANG W, LING X, HE S, et al. Perturbation of IP3R-dependent endoplasmic reticulum calcium homeostasis by PPARdelta-activated metabolic stress leads to mouse spermatocyte apoptosis: a direct mechanism for perfluorooctane sulfonic acid-induced spermatogenic disorders [J]. *Environ Pollut*, 2023, 343: 123167.
- [51] GUO H, YANG Y, LOU Y, et al. Apoptosis and DNA damage mediated by ROS involved in male reproductive toxicity in mice induced by Nickel [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 268: 115679.
- [52] PEREIRA S C, OLIVEIRA P F, OLIVEIRA S R, et al. Impact of environmental and lifestyle use of chromium on male fertility: focus on antioxidant activity and oxidative stress [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(9): 1365.
- [53] LEE S W, KIM B, SEONG J B, et al. ATF6 is a critical regulator of cadmium-mediated apoptosis in spermatocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2023, 194(2): 167-77.
- [54] HOU F, HUANG J, QING F, et al. The rare-earth yttrium induces cell apoptosis and autophagy in the male reproductive system through ROS-Ca²⁺-CamkII/Ampk axis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 263: 115262.
- [55] XIONG Y W, TAN L L, ZHANG J, et al. Combination of high-fat diet and cadmium impairs testicular spermatogenesis in an m6A-YTHDF2-dependent manner [J]. *Environ Pollut*, 2022, 313: 120112.
- [56] BISHT S, FAIQ M, TOLAHUNASE M, et al. Oxidative stress and male infertility [J]. *Nat Rev Urol*, 2017, 14(8): 470-85.
- [57] DONG J, WANG Z, ZOU P, et al. Induction of DNA damage and G₂ cell cycle arrest by diepoxybutane through the activation of the Chk1-dependent pathway in mouse germ cells [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(3): 518-31.
- [58] OAKES S A, PAPA F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 173-94.
- [59] LIU T, HOU B, WANG Z, et al. Polystyrene microplastics induce mitochondrial damage in mouse GC-2 cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 237: 113520.
- [60] LING X, YANG W, ZOU P, et al. TERT regulates telomere-related senescence and apoptosis through DNA damage response in male germ cells exposed to BPDE *in vitro* and to B[a]P *in vivo* [J]. *Environ Pollut*, 2018, 235: 836-49.
- [61] ESAKKY P, HANSEN D A, DRURY A M, et al. Cigarette smoke-induced cell death of a spermatocyte cell line can be prevented by inactivating the Aryl hydrocarbon receptor [J]. *Cell Death Discov*, 2015, 1: 15050.
- [62] ANDERSON E L, BALTUS A E, ROEPERS-GAJADIEN H L, et al. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(39): 14976-80.
- [63] LI X, ZHANG Y, GAO L, et al. BDE-209 induced spermatogenesis disorder by inhibiting SETD8/H4K20me1 related histone methylation in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 864: 161162.
- [64] ELEWA Y H A, MOHAMED A A, GALAL A A A, et al. Food Yellow4 reprotoxicity in relation to localization of DMC1 and apoptosis in rat testes: roles of royal jelly and cod liver oil [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 169: 696-706.
- [65] HOU F, XIAO M, LI J, et al. Ameliorative effect of grape seed proanthocyanidin extract on cadmium-induced meiosis inhibition during oogenesis in chicken embryos [J]. *Anat Rec*, 2016, 299(4): 450-60.
- [66] BOLCUN-FILAS E, HANDEL M A. Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction [J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 112-26.
- [67] YANG Q, LI F, MIAO Y, et al. CdSe/ZnS quantum dots induced spermatogenesis dysfunction via autophagy activation [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 398: 122327.
- [68] ZHAI J, GENG W, ZHANG T, et al. BDE-209 induce spermatocytes arrest at early-pachytene stage during meiotic prophase I in mice [J]. *Toxicology*, 2022, 467: 153061.
- [69] MAEZAWA S, YUKAWA M, ALAVATTAM K G, et al. Dynamic reorganization of open chromatin underlies diverse transcriptomes during spermatogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(2): 593-608.
- [70] GUO J, GROW E J, YI C, et al. Chromatin and single-cell RNA-Seq profiling reveal dynamic signaling and metabolic transitions during human spermatogonial stem cell development [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(4): 533-46.e6.
- [71] GEOFFROY-SIRAUDIN C, PERRARD M H, CHASPOUL F, et al. Validation of a rat seminiferous tubule culture model as a suitable system for studying toxicant impact on meiosis effect of hexavalent chromium [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 116(1): 286-96.
- [72] ALI S, STEINMETZ G, MONTILLET G, et al. Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106245.
- [73] LIU J, LI X, ZHOU G, et al. Silica nanoparticles inhibiting the differentiation of round spermatid and chromatin remodeling of haploid period via MIWI in mice [J]. *Environ Pollut*, 2021, 284: 117446.
- [74] LUENSE L J, DONAHUE G, LIN-SHIAO E, et al. Gcn5-mediated histone acetylation governs nucleosome dynamics in spermiogenesis [J]. *Dev Cell*, 2019, 51(6): 745-58.e6.
- [75] LI Z, ZHANG X, XIE S, et al. H3K36me2 methyltransferase NSD2 orchestrates epigenetic reprogramming during spermatogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(12): 6786-800.
- [76] GONZALEZ-ROJO S, LOMBO M, FERNANDEZ-DIEZ C, et al. Male exposure to bisphenol A impairs spermatogenesis and triggers histone hyperacetylation in zebrafish testes [J]. *Environ Pollut*, 2019, 248: 368-79.
- [77] DURA M, TEISSANDIER A, ARMAND M, et al. DNMT3A-dependent DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis [J]. *Nat Genet*, 2022, 54(4): 469-80.
- [78] BARAU J, TEISSANDIER A, ZAMUDIO N, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity [J]. *Science*, 2016, 354(6314): 909-12.

- [79] ZAMUDIO N, BARAU J, TEISSANDIER A, et al. DNA methylation restrains transposons from adopting a chromatin signature permissive for meiotic recombination [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(12): 1256-70.
- [80] ZHANG Z, WANG J, SHI F, et al. Genome-wide alternation and effect of DNA methylation in the impairments of steroidogenesis and spermatogenesis after PM_{2.5} exposure [J]. *Environ Int*, 2022, 169: 107544.
- [81] REDMOND L S, KAUFMAN J A, TERRELL M L, et al. Birth outcomes associated with paternal polybrominated and polychlorinated biphenyl exposure [J]. *Environ Res*, 2022, 214(Pt 4): 114215.
- [82] XU K, GAO D, LIN J, et al. Benzo(a)pyrene exposure in early life suppresses spermatogenesis in adult male zebrafish and association with the methylation of germ cell-specific genes [J]. *Aquat Toxicol*, 2023, 258: 106504.
- [83] TANG C, XIE Y, YU T, et al. m⁶A-dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 211-28.
- [84] TANG C, KLUKOVICH R, PENG H, et al. ALKBH5-dependent m⁶A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(2): E325-E33.
- [85] LIN Z, HSU P J, XING X, et al. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N(6)-methyladenosine modulates murine spermatogenesis [J]. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1216-30.
- [86] FU H, ZHU X, DI Q, et al. m⁶A contributes to a pro-survival state in GC-2 cells by facilitating DNA damage repair: novel perspectives on the mechanism underlying DEHP genotoxicity in male germ cells [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 859(Pt 2): 160432.
- [87] ZHAO T X, WANG J K, SHEN L J, et al. Increased m⁶A RNA modification is related to the inhibition of the Nrf2-mediated antioxidant response in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury [J]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113911.
- [88] GUI Y, YUAN S. Epigenetic regulations in mammalian spermatogenesis: RNA-m(6)A modification and beyond [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(11): 4893-905.
- [89] ZHOU G, WANG J, REN L, et al. Silica nanoparticles suppressed the spermatogenesis via downregulation of miR-450b-3p by targeting Layilin in spermatocyte of mouse [J]. *Environ Pollut*, 2023, 318: 120864.
- [90] WU L, LI H, YE F, et al. As3MT-mediated SAM consumption, which inhibits the methylation of histones and LINE1, is involved in arsenic-induced male reproductive damage [J]. *Environ Pollut*, 2022, 313: 120090.
- [91] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-82.
- [92] ZHANG T, SUN P, GENG Q, et al. Disrupted spermatogenesis in a metabolic syndrome model: the role of vitamin A metabolism in the gut-testis axis [J]. *Gut*, 2022, 71(1): 78-87.
- [93] JI Y, WANG Y, SHEN D, et al. Mucin corona delays intracellular trafficking and alleviates cytotoxicity of nanoplastic-benzopyrene combined contaminant [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 406: 124306.
- [94] DODO K, FUJITA K, SODEOKA M. Raman spectroscopy for chemical biology research [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(43): 19651-67.
- [95] GONG Y, GU T, LING L, et al. Visualizing hazardous solids with cryogenic electron microscopy (Cryo-EM) [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 436: 129192.
- [96] PUPEZA I, HUBER M, TRUBETSKOV M, et al. Field-resolved infrared spectroscopy of biological systems [J]. *Nature*, 2020, 577(7788): 52-9.
- [97] LI Y. Analytical methods for the analysis of volatile natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2023, 40(4): 922-56.
- [98] DAVID A, CHAKER J, PRICE E J, et al. Towards a comprehensive characterisation of the human internal chemical exposome: challenges and perspectives [J]. *Environ Int*, 2021, 156: 106630.
- [99] GIGANTE S, GOUIL Q, LUCATTINI A, et al. Using long-read sequencing to detect imprinted DNA methylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(8): e46.
- [100] GUO J, SOSA E, CHITIASHVILI T, et al. Single-cell analysis of the developing human testis reveals somatic niche cell specification and fetal germline stem cell establishment [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(4): 764-78, e4.
- [101] ALFANO M, TASCINI A S, PEDERZOLI F, et al. Aging, inflammation and DNA damage in the somatic testicular niche with idiopathic germ cell aplasia [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5205.
- [102] YU Y, SUN Q, LI T, et al. Adverse outcome pathway of fine particulate matter leading to increased cardiovascular morbidity and mortality: an integrated perspective from toxicology and epidemiology [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 430: 128368.
- [103] ZHENG J, CHEN S, LU H, et al. Enhanced inhibition of human and rat aromatase activity by benzene ring substitutions in bisphenol A: QSAR structure-activity relationship and in silico docking analysis [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 465: 133252.