

· 研究论文 ·

热应激触发精原细胞线粒体功能障碍与氧化应激 诱导睾丸生精功能障碍的发生

陈思宇^{1,2,3} 卢家伟^{1,2,3} 魏可^{1,2,3} 周立新⁴ 薛佳⁴ 沈林园^{1,2,3} 朱砺^{1,2,3} 甘麦邻^{1,2,3*}

(¹四川农业大学动物科技学院, 猪禽种业全国重点实验室, 成都 611130; ²四川农业大学动物科技学院, 农业农村部畜禽生物学重点实验室, 成都 611130; ³四川农业大学动物科技学院, 畜禽种质资源与生物育种四川省重点实验室, 成都 611130; ⁴成都市动物疫病预防控制中心, 成都 611130)

摘要 为探讨热应激对精原细胞线粒体功能、氧化应激及细胞命运的调控作用, 该研究通过体内实验建立小鼠睾丸热应激模型, 分析睾丸系数、精子密度与精子运动能力变化; 采用苏木素-伊红染色观察生精小管结构改变并计量其直径和面积; 透射电镜观察线粒体超微结构; 利用睾丸转录组测序筛选差异表达通路; 在精原细胞中通过JC-1探针检测线粒体膜电位, DCFH-DA荧光探针检测活性氧水平; 实时荧光定量PCR分析脂质代谢基因表达水平; 通过EdU和PI荧光染色分别评估细胞增殖与凋亡情况。结果显示, 热应激显著降低小鼠睾丸系数、精子密度与精子运动能力, 并导致生精小管结构紊乱; 转录组分析表明, 线粒体功能、TNF响应、代谢过程及氧化应激通路显著富集; 睾丸组织透射电镜显示线粒体超微结构损伤, 而精原细胞呈现线粒体膜电位下降、网络结构异常及活性氧水平升高, 脂质代谢基因*ACSL4*表达上调而*SLC7A11*表达下调; 细胞增殖活性受到显著抑制, 凋亡率显著升高。热应激通过诱导线粒体功能障碍、氧化应激加剧及脂质代谢重编程, 进而抑制精原细胞增殖并促进细胞凋亡, 其中线粒体功能异常与氧化应激可能是介导热应激生殖损伤的关键早期事件。

关键词 热应激; 睾丸; 精原细胞; 精子; 线粒体; 氧化应激

Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Spermatogonia: Mechanisms of Heat Stress-Induced Spermatogenic Impairment in the Testis

CHEN Siyu^{1,2,3}, LU Jiawei^{1,2,3}, WEI Ke^{1,2,3}, ZHOU Lixin⁴, XUE Jia⁴, SHEN Linyuan^{1,2,3},
ZHU Li^{1,2,3}, GAN Mailin^{1,2,3*}

(¹National Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding Industry, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Key Laboratory of Livestock and Poultry Biomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ³Sichuan Provincial Key Laboratory of Livestock and Poultry Genetic Resources and Breeding, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ⁴Chengdu Animal Disease Prevention and Control Center, Chengdu 611130, China)

收稿日期: 2025-11-22 接受日期: 2026-01-08

国家自然科学基金(批准号: 32302689)、四川省科技计划(批准号: 2021YFYZ0007、2021YFYZ0030、2024NSFSC1176)、国家现代农业产业技术体系四川生猪创新团队(批准号: SCCXTD-2026-8)和国家生猪产业技术体系(批准号: CARS-35)资助的课题

*通信作者。Tel: 13540384633, E-mail: ganmailin@sicau.edu.cn

Received: November 22, 2025 Accepted: January 8, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32302689), the Sichuan Science and Technology Program (Grant No.2021YFYZ0007, 2021YFYZ0030, 2024NSFSC1176), the Sichuan Pig Innovation Team of the National Modern Agricultural Industry Technology System (Grant No.SCCXTD-2026-8), and the National Pig Industry Technology System (Grant No.CARS-35)

*Corresponding author. Tel: +86-13540384633, E-mail: ganmailin@sicau.edu.cn

Abstract To investigate the regulatory effects of heat stress on mitochondrial function, oxidative stress, and cell fate in spermatogonia, *in vivo* experiments were conducted to establish a mouse testicular heat stress model. Testicular coefficient, sperm density, and motility were analyzed. Structural alterations in seminiferous tubules were examined by hematoxylin-eosin staining with measurements of their diameter and area, and mitochondrial ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. Additionally, testicular transcriptome sequencing was performed to screen for differentially expressed pathways. In spermatogonia, mitochondrial membrane potential was examined using JC-1 probe, ROS (reactive oxygen species) levels were measured with DCFH-DA fluorescent probe, and lipid metabolism-related gene expression was quantified by real-time PCR. Cell proliferation and apoptosis were assessed by EdU and PI fluorescence staining, respectively. The results demonstrated that heat stress significantly reduced testicular coefficient, sperm density, and motility, and induced disorganization of seminiferous tubules. Transcriptome analysis revealed significant enrichment of pathways related to mitochondrial function, TNF-mediated response, metabolic processes and oxidative stress. TEM (transmission electron microscopy) of testicular tissue revealed ultrastructural damage to mitochondria, while spermatogonia exhibited decreased mitochondrial membrane potential and disruption of the mitochondrial network, with upregulation of lipid metabolism gene *ACSL4* and downregulation of *SLC7A11*. Cell proliferation was significantly inhibited, whereas apoptosis rate was markedly increased. Collectively, heat stress induced mitochondrial dysfunction, an oxidative stress elevation, and lipid metabolic reprogramming, thereby suppressing spermatogonial proliferation and promoting apoptosis. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress may represent key early events mediating heat stress-induced reproductive impairment.

Keywords heat stress; testis; spermatogonia; sperm; mitochondria; oxidative stress

近十几年来,全球范围内极端高温事件频发,对包括人类在内的多种生物的生存与繁殖构成了严重威胁^[1-5]。多项动物模型研究证实,热应激可显著损害雄性生殖健康,引发睾丸组织病理学改变、精子发生障碍、精液质量下降,甚至导致不育^[6-10]。在分子层面,研究已揭示热应激可通过诱导线粒体功能障碍、氧化应激、内质网应激以及激活细胞凋亡等多种途径,破坏生殖细胞稳态^[11-13]。

随着高通量测序技术的应用,研究者们已能够从系统层面描绘热应激下睾丸组织的转录组变化图谱^[14-15]。尽管这些研究构建了从整体动物到细胞水平的坚实证据链,但热应激在精原细胞等特定细胞类型中引发的全转录组变化及其调控网络,仍需在不同模型中进行深入探索和解析^[16]。例如,在精原细胞中,热应激引发的全转录组变化如何与线粒体损伤等关键表型进行系统性关联,其分子图谱尚不完整,有待进一步解析^[17]。

近年来,线粒体在热致生殖损伤中的核心作用受到广泛关注。研究表明,线粒体功能障碍往往作为上游事件,驱动下游的氧化应激与细胞死亡,共同构成热应激病理机制的重要组成部分^[18]。这确立了线粒

体在热应激响应中的核心地位。除了这一经典通路外,近期研究还揭示了新的细胞死亡机制,例如热应激可以在猪支持细胞中通过CYP2C9-Ras-JNK信号轴诱导铁死亡^[19]。然而,尽管热应激对支持细胞和精原干细胞的影响已有报道,但其在精原细胞(如GC-1细胞系)中诱导线粒体功能障碍的具体机制及其在细胞命运决定中的核心作用,目前研究尚不充分^[20]。

因此,本研究拟从整体动物到细胞层面,分析热应激对雄性生殖的损害过程。首先通过构建小鼠热应激模型,在整体水平确认其生殖损伤表型;继而利用睾丸转录组测序,筛选出发生显著改变的关键信号通路;在此基础上,进一步聚焦于精原细胞,在体外验证热应激对线粒体功能、氧化应激及细胞命运的直接影响,以在细胞层面明确热应激损伤生殖细胞的关键事件。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

SPF级10周龄雄性ICR小鼠购自成都达硕生物科技有限公司。所有小鼠均自由采食和饮水,于实验动物房饲养[温度(24±2)℃,相对湿度保持

40%~60%, 光周期为12 h光照/12 h黑暗], 分为两组($n=6$), 对照组(normal control, NC)和热应激小鼠处理组(heat stress, HS), 并于实验前适应性饲养7天, 自由采食和饮水。适应期结束后, 对对照组小鼠采用腹部以下部位34 °C水浴20 min的处理, 对热处理小鼠采用腹部以下部位单次43 °C热水浴20 min的处理, 且都恢复8天^[15]。精原细胞GC-1细胞系购自海星生物科技有限公司。将精原细胞置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养, NC组于34 °C进行处理, HS组于43 °C进行处理。所有动物实验经四川农业大学实验动物福利与伦理委员会审核并批准(批准号: 20230164)。

1.2 样品采集

断颈处死小鼠, 采集并称量一侧睾丸和附睾组织, 同时计算睾丸系数(睾丸系数=睾丸质量/体质量×100%), 另一侧睾丸组织用4%多聚甲醛固定(4 °C、48 h)制备苏木精-伊红(H&E)染色切片, 剩余组织液氮速冻后存于-80 °C冰箱。收集细胞样品, 在处理24 h去除培养基, PBS清洗并离心(4 °C、500 ×g、3 min)收集细胞, 收取沉淀速冻后存于-80 °C冰箱。

1.3 精液质量检测

将0.4 mL生理盐水注入离心管预热至37 °C, 剪取小鼠右侧附睾尾称重、剪碎后放入离心管, 摇匀

并水浴5 min使精子充分游离, 取3 μL悬液滴于精子计数板, 立即置于配有相差显微镜和恒温载物台的计算机辅助精子分析系统(computer-aided sperm analysis, CASA)中进行分析。系统通过自动录制并分析精子运动视频, 同步计算出精子密度、活力及各项运动参数。

1.4 睾丸组织形态学观察

睾丸组织经4%多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4)于4 °C固定24~48 h, 制备石蜡切片, H&E染色, 然后在光学显微镜下观察睾丸组织病理学变化。随后使用WS-10病理切片扫描仪(WISLEAP)进行全片扫描, 并利用NDP.view2软件, 随机测量每组至少30个生精小管圆形切面的直径和面积, 进行量化分析。

1.5 逆转录-实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测

睾丸组织经高速研磨仪破碎后, 利用Trizol法提取总RNA, 随后使用PrimeScript™ RT试剂盒将mRNA逆转录为cDNA。荧光定量PCR反应体系包括5 μL TB Green, 3 μL DEPC水, 上下游引物各0.5 μL及1 μL cDNA模板; 反应条件为95 °C预变性2 min, 随后进行39个循环(95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min)。实验中以 β -actin为mRNA的内参基因, 基因表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 The primer sequences for qRT-PCR

| 基因名称 Gene name | 引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3') |
|-------------------|---|
| <i>HSP90aa</i> | F: AAG ACC GGA CCC TCA CGA TA; R: AGG CAT ACT GCT CGT CAT CG |
| <i>HSP90ab</i> | F: ATA AAG CGA CTG GGG TCT CAC; R: GAG ACA TGA GCT GGG CGA TT |
| <i>Ki67</i> | F: ATC ATT GAC CGC TCC TTT AGG T; R: GCT CGC CTT GAT GGT TCC T |
| <i>CDK1</i> | F: AGA AGG TAC TTA CGG TGT GGT; R: GAG AGA TTT CCC GAA TTG CAG T |
| <i>CCNB1</i> | F: AAG GTG CCT GTG TGT GAA CC; R: GTC AGC CCC ATC ATC TGC G |
| <i>BCL2</i> | F: GAG AGC GTC AAC AGG GAG ATG; R: CCA GCC TCC GTT ATC CTG GA |
| <i>BAX</i> | F: AGA CAG GGG CCT TTT TGC TAC; R: AAT TCG CCG GAG ACA CTC G |
| <i>P27</i> | F: GGC AAG TAC GAG TGG CAA GA; R: CGT GTC CTC AGA GTT AGC CG |
| <i>P53</i> | F: CTC TCC CCC GCA AAA GAA AAA; R: CGG AAC ATC TCG AAG CGT TTA |
| <i>CASPASE1</i> | F: ACA AGG CAC GGG ACC TAT G; R: TCC CAG TCA GTC CTG GAA ATG |
| <i>ACSL4</i> | F: CTT CCT CTT AAG GCC GGG AC; R: AGC CAG CAA TAA AGT ACA CAG AT |
| <i>MT1</i> | F: CTG TTA CGG TTC TTC TTT CCT GT; R: GCA CCA AGG GAT AAG GGT AAA C |
| <i>MT2</i> | F: GAA CAG CTC AAT CCC TAA CTG C; R: ACG ACT ACT GTA GAT AGC ATG GG |
| <i>NOX1</i> | F: GGA GGA ATT AGG CAA AAT GGA TT; R: GCT GCA TGA CCA GCA ATG TT |
| <i>SLC7A11</i> | F: CCT CCC CCA ATG GTC TTG TC; R: CCA TCC ATG TTG TCC AGG CT |
| <i>TFRL</i> | F: ACC ATT GTC ATA TAC CCG GTC A; R: CAA TAG CCC AAG TAG CCA ATC AT |
| <i>GAPDH</i> | F: AGT ATG ACT CCA CTC ACG GC; R: CAC CAG TAG ACT CCA CGA CA |

1.6 Western blot 检测

睾丸组织或精原细胞经预冷 PBS 清洗后, 利用 RIPA 裂解液(含 1% PMSF)在冰上裂解 30 min 以提取总蛋白。裂解液于 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 收集上清。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。将等量蛋白样品(通常为 20~30 μg)与 5× 上样缓冲液混合, 于 100 °C 煮沸 10 min 使蛋白变性。随后使用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 并将其转印至 PVDF 膜。转膜结束后, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液在室温下封闭 1 h。随后将膜与相应的一抗在 4 °C 下孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后, 与辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:5 000)在室温下孵育 1 h。经 TBST 再次充分洗涤后, 使用 ECL 化学发光试剂盒在化学发光成像系统上显影。以 β-actin 作为内参, 采用 ImageJ 软件对目标条带的灰度值进行半定量分析。抗体购自正能生物技术有限公司, 使用的一抗为 anti-β-actin(1:5 000)、anti-tubulin(1:1 000)、anti-HSP110(1:500)、anti-HSP90(1:1 000)、anti-P65(1:500)、anti-P27(1:500)。

1.7 转录组测序及其数据分析与可视化

转录组测序由北京诺禾致源生物科技有限公司完成。在提取对照组与热应激组(各 4 例)的冻存睾丸组织总 RNA 并经质检合格后, 采用磁珠富集 mRNA、片段化并合成 cDNA 文库, 使用 NovaSeq 6000 平台完成高通量测序; 下机数据经 FastQC 软件质控并去除接头及低质量 Reads 获得 Clean Reads, 比对至小鼠参考基因组 GRCm39 进行基因表达定量后, 利用 edgeR 软件以 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1.5$ 且 $P < 0.05$ 的标准筛选差异表达基因; 进一步通过 DAVID 数据库对差异基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析, 结果在微生信云平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化分析。

1.8 JC-1、Mitotracker、ROS、EdU、PI 荧光染色及量化

JC-1 和 MitoTracker™ 荧光染色试剂分别购自 ThermoFisher Scientific 公司, 用于检测线粒体膜电位和形态变化及分布。ROS、EdU 和 PI 荧光染色试剂均购自上海碧云天生物技术股份有限公司, 分别用于检测细胞内活性氧水平、标记增殖细胞 DNA 及凋亡细胞核。精原细胞经热应激处理后, 按试剂盒说明书进行染色。ROS 检测采用 DCFH-DA 荧光探针标记细胞, 37 °C 孵育 30 min 后, 通过荧光显微镜观察并拍摄。EdU 染色利用点击化学技术标记增殖期 DNA, 而 PI 染色则用于标记凋亡细胞核。MitoTracker™ Green

FM(100 nmol/L)在 37 °C 下孵育 30 min, 用于标记线粒体网络结构。JC-1 染色(2 μmol/L)在 37 °C 避光孵育 20 min, 通过红绿荧光转换检测线粒体膜电位, 比值下降表明膜电位去极化。所有荧光图像均在相同条件下通过荧光显微镜拍摄, 每组设置 3 个独立重复的细胞培养孔, 每孔随机拍摄不少于 5 个不重叠视野。荧光强度的量化分析使用 ImageJ 软件完成, 通过设置相同的阈值和参数确保数据一致性。MitoTracker™ Green FM 荧光强度以 DAPI 阳性细胞数为参照进行标准化(线粒体活性 = MitoTracker 强度 / DAPI 阳性细胞数)。其中 JC-1 荧光图像分别测量红色荧光(聚集态 JC-1, 激发/发射波长 550/600 nm)和绿色荧光(单体 JC-1, 激发/发射波长 485/535 nm)的强度, 计算红/绿荧光强度比值以评估线粒体膜电位水平, 比值降低表示膜电位下降。凋亡水平以凋亡率表示, 计算公式为: 凋亡率 = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 正常细胞数)。数据结果以均值 ± 标准差形式展示。

1.9 透射电镜观察

睾丸样品采集后, 立即浸入 4 °C 电镜固定液(Servicebio), 磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB, pH 7.4)漂洗, 3 次 × 15 min。用 1% 钨酸 25 °C 避光固定 2 h, PB 漂洗 3 次 × 15 min。乙醇梯度脱水(30% → 50% → 70% → 80% → 95% → 100% → 100%, 各 20 min)和 100% 丙酮 2 次 × 15 min。组织经丙酮与 812 包埋剂按以下比例依次渗透: 1:1 混合液, 37 °C 处理 2~4 h; 1:2 混合液, 37 °C 处理过夜; 纯 812 包埋剂, 37 °C 处理 5~8 h, 60 °C 聚合 48 h。超薄切片 60~80 nm, 孔径约 100 μm 的铜网捞片。2% 醋酸铀避光染色 8 min, 2.6% 枸橼酸铅避 CO₂ 染色 8 min, 透射电镜观察采图。

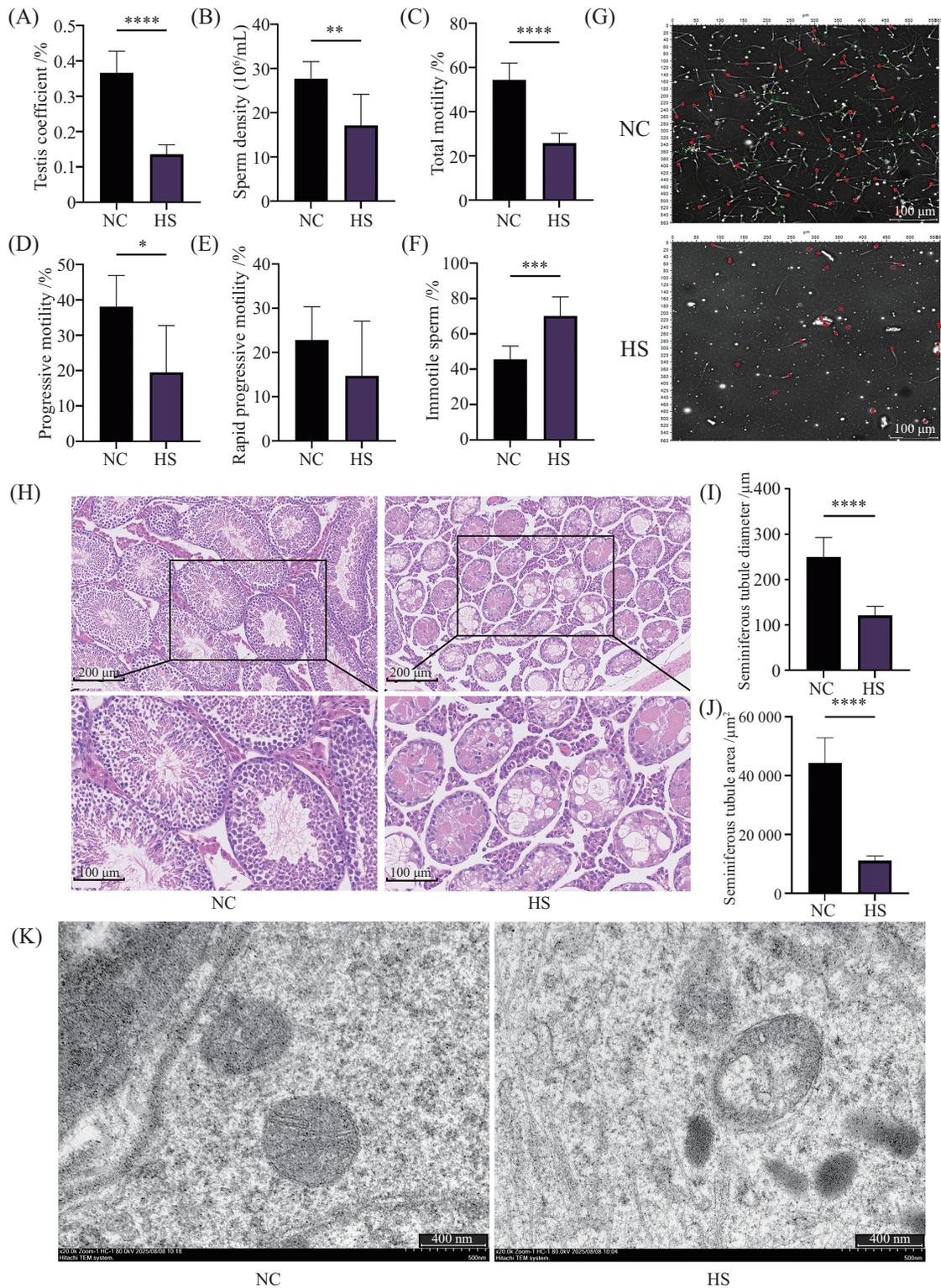
1.10 数据分析

实验数据使用 Microsoft Excel 进行整理, 并以均值 ± 标准差表示。采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析。组间比较采用未配对 *t* 检验或单因素方差分析。统计显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。图中使用星号标记显著性: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.000 1$ 。

2 结果

2.1 热应激导致小鼠睾丸组织损伤与精子功能障碍

通过建立小鼠热应激模型, 评估热应激对小鼠生殖系统的影响。结果(图 1)显示, 热应激显著降低了小鼠的睾丸系数(**** $P < 0.000 1$, 图 1A)、精子密度



A: 睾丸组织系数分析; B: 精子密度分析; C: 精子总运动能力分析; D: 精子前进运动能力分析; E: 精子快速前进运动能力分析; F: 静止精子比例分析; G: 精子运动轨迹显微镜图像; H: 睾丸组织H&E染色显微镜图像; I: 生精小管直径分析; J: 生精小管面积分析; K: 睾丸组织透射电镜图像。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: testis coefficient analysis; B: sperm density analysis; C: total sperm motility analysis; D: progressive sperm motility analysis; E: rapid progressive sperm motility analysis; F: immotile sperm percentage analysis; G: microscopic images of sperm motility trajectories; H: H&E-stained images of testicular tissue; I: analysis of seminiferous tubule diameter; J: analysis of seminiferous tubule area; K: transmission electron microscopy images of testicular tissue. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

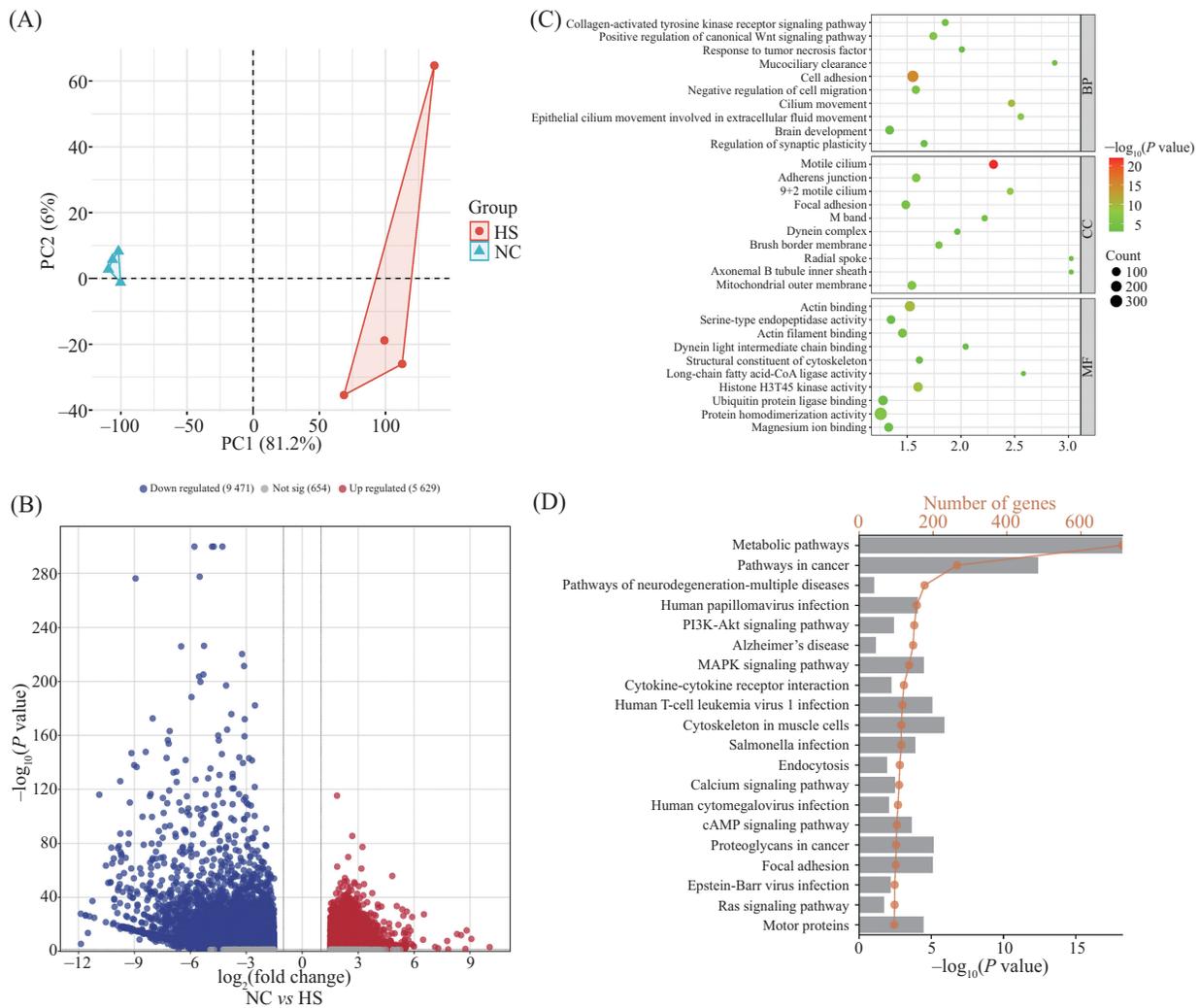
图1 热应激对小鼠睾丸组织系数、精子密度、精子运动能力及组织形态学特征的影响

Fig.1 Effects of heat stress on testis coefficient, sperm density, sperm motility, and testicular histology in mice

(** $P < 0.01$, 图1B)、精子总运动能力(**** $P < 0.0001$, 图1C)、前向运动能力(* $P < 0.05$, 图1D),同时显著增加了静止精子的比例(** $P < 0.001$, 图1F)。快速前向运动能力呈下降趋势,但无统计学差异($P > 0.05$, 图1E)。显微镜下观察显示,热应激组精子的运动轨迹显著减少,表现为精子分布稀疏且轨迹覆盖区域缩小(图1G)。组织病理学分析表明,热应激导致睾丸组织结构受损,表现为生精小管排列松散、层数减少,以及部分区域空腔化,并且其直径与面积均显著减小(图1H~图1J)。透射电镜结果直接证实,热应激损伤了生精细胞的线粒体超微结构,线粒体表现为嵴断裂和空泡化(图1K)。这些结果表明,热应激导致了小鼠睾丸组织损伤与精子功能障碍。

2.2 热应激睾丸转录组分析揭示热应激影响代谢与细胞稳态关键通路

对热应激小鼠的睾丸组织进行转录组测序分析,结果如图2A~图2D所示。PCA显示HS组与NC组在PC1(81.2%)上完全分离,表明热应激诱导系统性转录组重塑(图2A)。下调基因数量(9 471个)显著多于上调基因(5 629个),提示热应激可能引起了广泛的基因表达抑制(图2B)。GO富集分析显示,TNF响应、线粒体外膜及细胞骨架功能相关条目显著富集(图2C)。值得注意的是,TNF信号与线粒体外膜功能异常是氧化应激的经典上游触发因素。KEGG分析揭示代谢通路、PI3K-Akt信号通路及神经退行性疾病相关通路显著富集(图2D)。上述结果共同提



A: PCA分析; B: 差异表达基因火山图; C: GO功能富集分析; D: KEGG通路富集分析。

A: PCA analysis; B: volcano plot of differentially expressed genes; C: GO functional enrichment analysis; D: KEGG pathway enrichment analysis.

图2 热应激对小鼠睾丸转录组的影响及其功能分析

Fig.2 Effects of heat stress on the transcriptome of mouse testes and its functional analysis

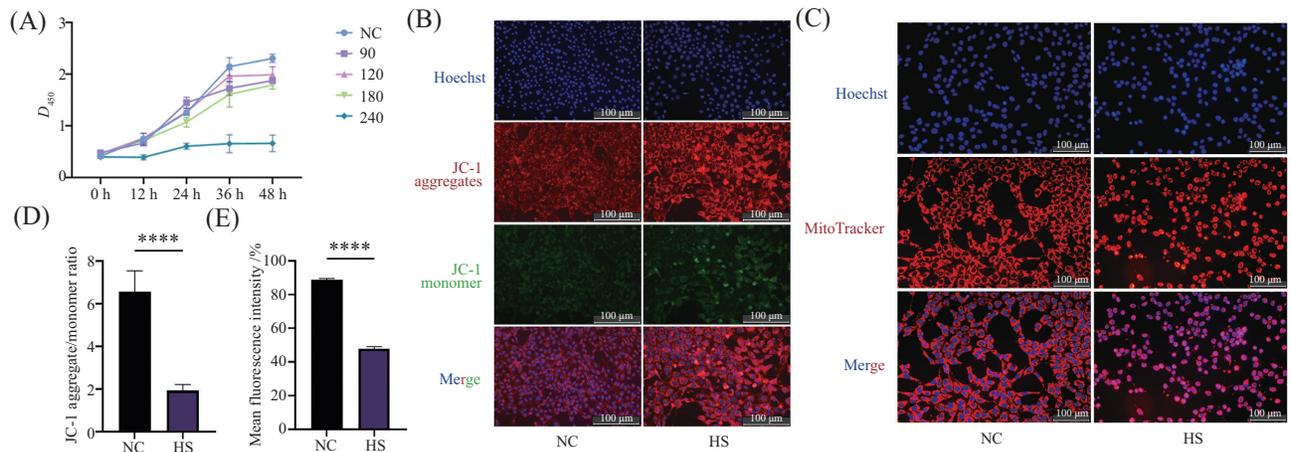


图3 热应激对精原细胞线粒体膜电位和线粒体动态的影响
Fig.3 Effects of heat stress on mitochondrial membrane potential and morphology in spermatogonia cells

示, 热应激可能通过破坏转录调控稳态、诱导代谢重编程, 并激活TNF介导的氧化应激, 导致睾丸组织损伤。

2.3 热应激诱导精原细胞线粒体功能紊乱与形态损伤

转录组测序结果显示, 热应激显著调控了多种基因的表达。基于这些发现, 实验进一步选取精原细胞模拟睾丸组织中细胞的生理和应激反应, 以验证并补充动物实验的观察结果。

通过CCK-8实验建立了不同时间梯度的精原细胞热应激模型(图3A)。结果显示, 热应激显著抑制精原细胞的增殖能力, 且抑制效果随热应激时间延长而加剧。基于CCK-8结果, 选择抑制效果显著且细胞存活率尚可的43 °C处理3 h用于后续研究。之后, 通过JC-1和MitoTracker染色评估热应激对精原细胞线粒体功能和形态的影响。结果表明, 热应激显著降低了线粒体膜电位(**** $P < 0.0001$), 表现为JC-1染色中绿色荧光(单体态)增强而红色荧光(聚集态)减弱(图3B和图3D)。同时, MitoTracker染色显示线粒体分布稀疏, 荧光信号强度显著降低(**** $P < 0.0001$), 表明线粒体形态受损(图3C和图3E)。这些结果直接表明, 热应激导致了严重的线粒体功能障碍与线粒体网络结构受损, 这可能是加剧细胞整体应激反应并推动细胞走向死亡的重要基础。

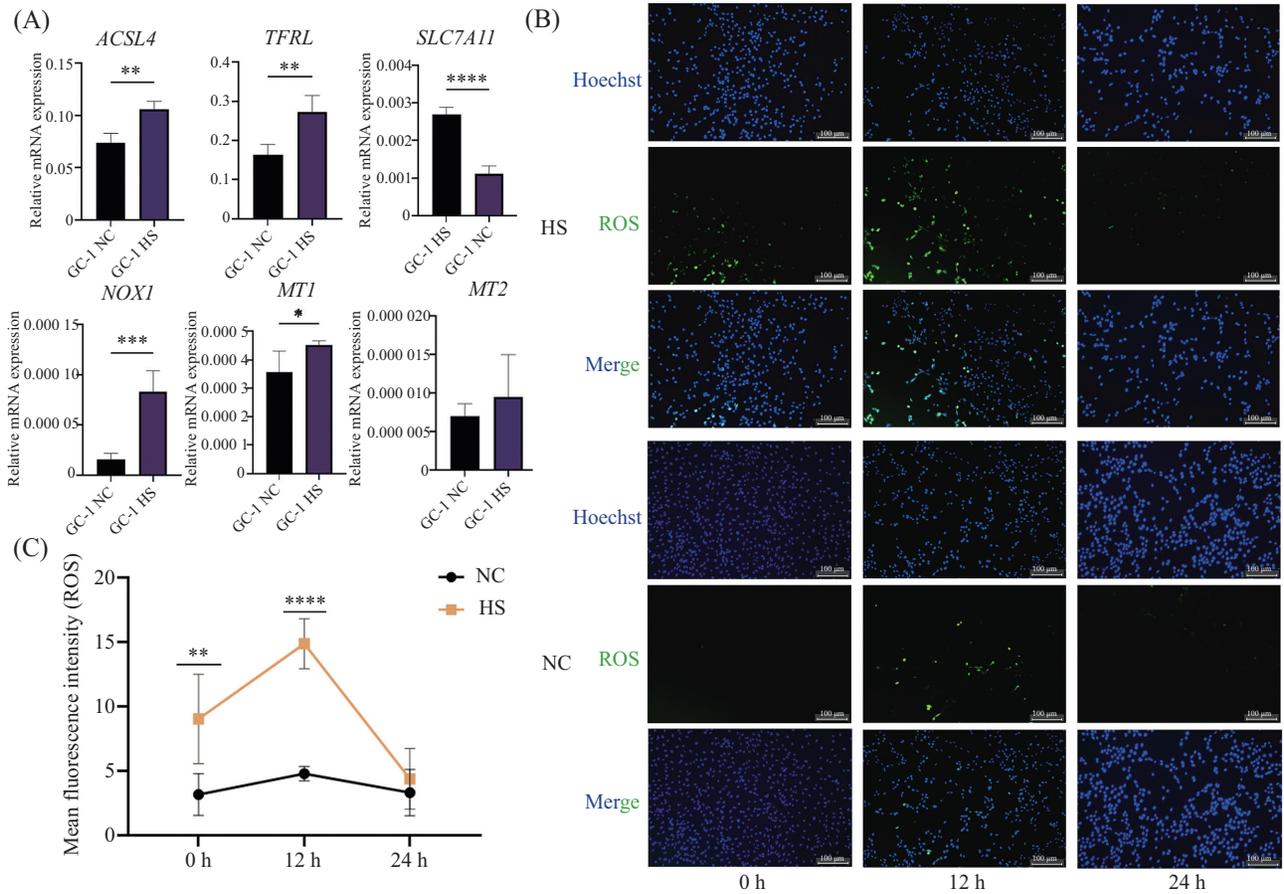
2.4 热应激上调氧化应激相关基因并促进ROS生成

热应激显著影响了精原细胞的基因表达及ROS

水平。RT-qPCR结果显示, 热应激显著上调了包括*ACSL4*(** $P < 0.01$)、*TFRL*(** $P < 0.01$)、*MT1*(* $P < 0.05$)、*MT2*(** $P < 0.01$)和*NOX1*(*** $P < 0.001$)在内的基因表达, 并下调了*SLC7A11*(**** $P < 0.0001$)的表达(图4A)。ROS荧光染色显示, 热应激组细胞内ROS水平呈时间依赖性变化, 表现为在0 h(** $P < 0.01$)到12 h(**** $P < 0.0001$)时ROS荧光信号显著增强, 24 h($P > 0.05$)时减弱(图4B和图4C)。这些结果表明, 热应激导致细胞内ROS累积, 并改变氧化应激及脂质代谢相关基因表达, 提示脂质代谢紊乱可能参与了热应激诱导的氧化损伤。

2.5 热应激抑制精原细胞增殖并诱导凋亡

前述结果显示热应激会诱导精原细胞线粒体功能紊乱和氧化应激, 细胞功能实验显示: 热应激组EdU阳性绿色荧光信号显著减弱, 表明细胞增殖能力下降(图5B和图5C); PI染色显示热应激组红色荧光信号显著增强, 表明细胞凋亡水平升高(图5D和图5E)。Western blot结果显示热应激对细胞分子机制的影响: 热应激显著上调热休克蛋白(*** $P < 0.001$, HSP110和HSP90)、NF- κ B信号通路相关蛋白(*** $P < 0.001$, P65)及肿瘤抑制因子(*** $P < 0.001$, P53)的表达水平(图5F和图5G)。RT-qPCR实验显示, 热应激显著上调*HSP90ab*的mRNA表达水平, 同时显著下调抗凋亡基因*BCL2*的表达, 并上调*P53*的mRNA表达水平(图5A)。这些结果表明, 热应激通过调控热休克蛋白和凋亡相关基因的表达, 显著抑制精原细胞的增殖并诱导其凋亡。



A: RT-qPCR分析; B: ROS荧光染色; C: ROS荧光强度定量分析(0~24 h)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: RT-qPCR analysis; B: ROS fluorescence staining; C: quantitative analysis of ROS fluorescence intensity (0-24 h)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图4 热应激对精原细胞基因表达及ROS水平的影响

Fig.4 Effects of heat stress on gene expression and ROS levels in spermatogonia cells

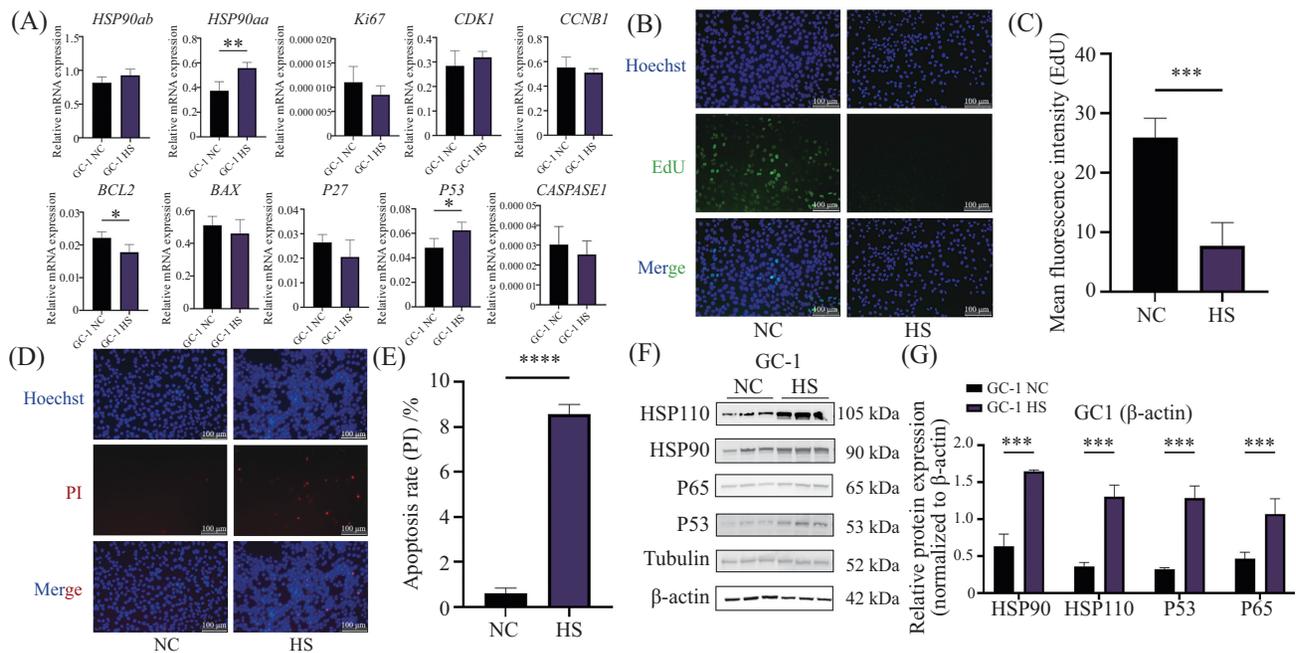
3 讨论

通过构建小鼠热应激模型,在整体水平上确认了热应激对雄性生殖系统的损伤,表现为睾丸组织损伤与精子功能障碍。为了系统性地解析这些表型背后的分子基础,本研究通过对睾丸组织进行转录组学分析发现,代谢紊乱、转录调控异常及TNF介导的应激响应等相关通路是热应激最显著的响应通路。这为后续细胞水平研究提供了依据。基于上述发现,本研究选用GC-1精原细胞系,旨在直接验证热应激是否能在特定生殖细胞中引发上述通路的核心事件。

基于体内转录组分析提供的线索,研究在精原细胞热应激模型中进一步观察了热应激的直接影响。首先,通过CCK-8实验选定43 °C、3 h作为本研究的处理条件,结果证实,热应激能直接诱发精原细胞的线粒体功能障碍与氧化损伤,这与睾丸组织透射电镜和转录组中TNF响应和线粒体

外膜相关条目富集的结果相互印证。JC-1与MitoTracker染色结果直接表明,热应激导致了线粒体膜电位的显著下降与线粒体网络结构异常。鉴于线粒体作为细胞能量代谢中枢,其功能紊乱被认为是细胞应激响应的早期关键事件^[21-24]。同时,研究发现热应激导致细胞内ROS水平呈时间依赖性变化,于12 h达到峰值后回落,并显著改变了与氧化应激及脂质代谢相关的关键基因(如*ACSL4*、*SLC7A11*)的表达。其中,*ACSL4*作为长链脂肪酸激活的限速酶,其表达上调可能改变细胞膜的磷脂组成^[25-26]。在ROS爆发的情况下,这种脂质代谢的重编程可能显著提高脂质过氧化水平,从而与线粒体功能障碍协同,放大氧化损伤。因此,上述结果提示,线粒体功能早期损伤可能为ROS过量产生的上游事件,但二者间的因果关系尚需通过干预实验进一步验证。

值得注意的是,本研究主要揭示了热应激下线



A: RT-qPCR analysis; B: EdU染色; C: EdU荧光强度定量分析; D: PI染色; E: PI凋亡率; F: Western blot; G: Western blot定量分析。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: RT-qPCR analysis; B: EdU staining; C: quantitative analysis of EdU fluorescence intensity; D: PI staining; E: PI apoptosis rate; F: Western blot; G: quantitative Western blot analysis. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图5 热应激对精原细胞增殖、凋亡及相关蛋白和基因表达的影响

Fig.5 Effects of heat stress on the proliferation, apoptosis, and related protein and gene expression in spermatogonia cells

粒体损伤、氧化应激与细胞凋亡之间的紧密时序性与强相关性。尽管这些观测结果高度支持“线粒体功能障碍是驱动后续氧化损伤与细胞死亡的上游事件”这一经典通路,但目前的数据尚不足以确立其直接的因果关系。例如,利用线粒体特异性抗氧化剂或功能保护剂进行干预,观察其能否逆转热应激的表型,将是未来验证此因果链条的关键。与此同时, *ACSL4*与 *SLC7A11*等基因的表达变化,也为“热应激可能通过引发脂质代谢紊乱进而触发铁死亡”这一新颖假说提供了初步线索;然而,该假说的验证需要对脂质过氧化水平的直接检测、相应蛋白的表达验证以及铁死亡特异性抑制剂的挽救实验。尽管仍存在这些有待未来探索的领域,但本工作不仅描述了热应激对精原细胞的损害表型,更重要的是为后续深入剖析其分子机制,特别是线粒体与脂质代谢紊乱的交叉作用,指明了明确的方向。

上述细胞器与分子水平的紊乱,最终导致细胞增殖抑制与凋亡激活。本研究发现,在经历热应激后,精原细胞的增殖能力被显著抑制,同时细胞凋亡相关通路被激活。在分子层面,促凋亡相关蛋白 P53与 NF- κ B信号通路蛋白 P65的表达上调,以及抗

凋亡基因 *BCL2*的 mRNA表达下调,这些变化共同表明细胞凋亡通路被激活。因此,上述结果显示,细胞增殖抑制与凋亡激活是热应激引发线粒体功能障碍、氧化应激及脂质代谢紊乱等一系列上游事件所导致的最终结果之一。这一“热应激→线粒体/氧化损伤→细胞命运改变”的级联反应,深入揭示了热应激损害精原细胞稳态,进而导致了生精功能障碍的细胞机制。

本研究提出的机制通路仍有待未来通过功能获得/丧失实验(如使用线粒体保护剂、抗氧化剂或 *ACSL4*抑制剂等)进行直接验证,并对脂质过氧化水平等关键中间指标进行直接检测,以进一步完善该理论模型。

4 结论

本研究通过体内外实验证实,热应激可导致小鼠睾丸组织损伤与精子发生障碍。睾丸转录组分析表明,线粒体功能紊乱、氧化应激与细胞死亡是热应激响应的核心环节。在精原细胞中,热应激直接诱导线粒体膜电位崩溃与网络结构异常,引发活性氧大量生成,并上调 *ACSL4*等脂代谢相关基因表达,

提示脂质过氧化可能参与其中。上述细胞器与分子水平的紊乱共同导致细胞增殖抑制与凋亡激活。综上所述,热应激通过破坏精原细胞线粒体功能、引发氧化应激,进而破坏细胞稳态,这可能是热应激导致雄性生殖损伤的重要细胞学机制。

参考文献 (References)

- [1] THOMPSON V, KENNEDY-ASSER A T, VOSPER E, et al. The 2021 western North America heat wave among the most extreme events ever recorded globally [J]. *Sci Adv*, 2021, 8(18): eabm6860.
- [2] ZHOU J, ZHAO J, LI Y, et al. The hottest center: characteristics of high temperatures in midsummer of 2022 in Chongqing and its comparison with 2006 [J]. *Theor Appl Climatol*, 2024, 155(1): 151-2.
- [3] ZHAO Q, YU P, MAHENDRAN R, et al. Global climate change and human health: pathways and possible solutions [J]. *Eco Environ Health*, 2022, 1(2): 53-62.
- [4] TIAN P, ZHANG F, YAN Y, et al. Inequalities of population exposure and mortality due to heatwaves in China [J]. *J Clean Prod*, 2025, 511: 145626.
- [5] SINGH M, CELINA A, KATIYAR R, et al. Alteration in sperm mitochondrial membrane potential and antioxidant biomarkers in summer adversely affects Hampshire-Ghungroo crossbred boar semen fertility in sub-tropical climate [J]. *Front Vet Sci*, 2025, 12: 1562988.
- [6] GUO Y, CHEN H, WANG Q J, et al. Prolonged melatonin treatment promote testicular recovery by enhancing RAC1-mediated apoptotic cell clearance and cell junction-dependent spermatogenesis after heat stress [J]. *Theriogenology*, 2021, 162: 22-31.
- [7] GAUER R, MEYERS B K. Heat-related illnesses [J]. *Am Fam Physician*, 2019, 99(8): 482-9.
- [8] BAUMAN J, SPANO S, STORKAN M. Heat-related illnesses [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2024, 42(3): 485-92.
- [9] DING H, WANG Y, ZHAO H, et al. Negative effect of seasonal heat stress on testis morphology and transcriptomes in Angora rabbit [J]. *BMC Genomics*, 2025, 26: 478.
- [10] LI B, XIE L, SONG M, et al. Evaluation of the efficacy of icariin against heat stress-induced spermatogenic dysfunction in the testes of dogs [J]. *Front Vet Sci*, 2025, 12: 1631149.
- [11] KIM B, PARK K, RHEE K. Heat stress response of male germ cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 70(15): 2623-36.
- [12] PEMBURY SMITH M Q R, TROJMAR D, GOTTHARD K, et al. Sex-specific variation in thermal sensitivity has multiple negative effects on reproductive trait performance [J]. *J Anim Ecol*, 2025, 94(5): 943-57.
- [13] PHONG N V, KIM H S, YOON J W, et al. Bioactive metabolites from *Paeonia lactiflora* protect against heat-induced male infertility in *Drosophila melanogaster* by modulating Vasa: integrating in vivo and computational analyses [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2025, 39(2): 1-19.
- [14] BAI L, ZHANG Y, ZHENG C, et al. Tanshinone IIA protects mouse testes from heat stress injury by inhibiting apoptosis and TGF β 1/Smad2/Smad3 signaling pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2023, 28(6): 749-59.
- [15] MAILIN G, YANG Y, LIU C, et al. The RNA-seq mapping of testicular development after heat stress in sexually mature mice [J]. *Sci Data*, 2024, 11(1): 913.
- [16] DENG Q F, LIU Y, CHU H, et al. Heat stroke induces pyroptosis in spermatogonia via the cGAS-STING signaling pathway [J]. *Physiol Res*, 2024, 73(1): 117-25.
- [17] QIAO N, CHEN H, DU P, et al. Acetyl-L-carnitine induces autophagy to promote mouse spermatogonia cell recovery after heat stress damage [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8871328.
- [18] ARYAL B, KWAKYE J, ARIYO O W, et al. Major oxidative and antioxidant mechanisms during heat stress-induced oxidative stress in chickens [J]. *Antioxidants*, 2025, 14(4): 471.
- [19] HU Y, LUO N J, GAN L, et al. Heat stress upregulates arachidonic acid to trigger autophagy in sertoli cells via dysfunctional mitochondrial respiratory chain function [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 501.
- [20] DING X, GAO B. Heat stress-mediated multi-organ injury: pathophysiology and treatment strategies [J]. *Compr Physiol*, 2025, 15(3): e70012.
- [21] JAVADOV S, KUZNETSOV A V. Mitochondria: the cell powerhouse and nexus of stress [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 207.
- [22] GUO C, SUN L, CHEN X, et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(21): 2003-14.
- [23] CHOI E H, KIM M H, PARK S J. Targeting mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species for neurodegenerative disease treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(14): 7952.
- [24] WANG C H, WANG C C, HUANG H C, et al. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes [J]. *FEBS J*, 2013, 280(4): 1039-50.
- [25] YUAN H, LI X, ZHANG X, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1338-43.
- [26] ZHANG H L, HU B X, LI Z L, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 88-98.