

原佳妮, 赵延辉, 侍玉梅, 等. 利用 WGCNA 挖掘种公鸡睾丸和附睾中影响精子活力的核心基因[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 762-769.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.017

利用 WGCNA 挖掘种公鸡睾丸和附睾中影响精子活力的核心基因

原佳妮, 赵延辉, 侍玉梅, 倪和民, 郭勇, 盛熙晖, 齐晓龙, 王相国, 邢凯
(北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

摘要: 种公鸡的精子活力对养禽业的可持续发展至关重要, 通过加权基因共表达网络(WGCNA)分析法挖掘种公鸡睾丸、附睾中调控精子活力的基因共表达模块和核心基因, 并构建与种公鸡精子活力相关的调控网络。基于团队前期对不同精子活力种公鸡睾丸、附睾组织转录组测序数据的分析, 用 WGCNA 方法构建基因共表达网络, 识别与表型性状显著相关的基因模块, 并对关键模块基因进行 GO 功能注释、KEGG 通路富集分析。用 Cytoscape 软件筛选每个关键模块的核心基因并构建可视化共表达网络。结果表明, 14 227 个基因聚类到 11 个模块, 以决定系数(R^2) ≥ 0.6 、 $P < 0.05$ 为标准挖掘出青绿色(Turquoise)模块、黄色(Yellow)模块、红色(Red)模块与表型显著相关。对 3 个关键模块的基因进行功能分析, 发现这些基因显著富集在核苷酸切除修复、同源重组、细胞色素 P450 对异类物质代谢、MAPK 信号通路和细胞凋亡等通路上。选出的 IFT 家族基因与 HMOX2、CYP4B1、ANG、ITGB2 基因是与种公鸡精子活力相关的核心基因, 可作为提高精子活力的潜在基因。

关键词: 种公鸡; 精子活力; 加权基因共表达网络(WGCNA); 核心基因

中图分类号: S831.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)03-0762-08

Mining of hub genes affecting sperm motility in testes and epididymides of breeder cocks by WGCNA method

YUAN Jia-ni, ZHAO Yan-hui, SHI Yu-mei, NI He-min, GUO Yong, SHENG Xi-hui, QI Xiao-long, WANG Xiang-guo, XING Kai

(Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The sperm motility of breeding roosters is crucial for the sustainable development of the poultry farming. The coexpression modules and core genes regulating sperm motility in testis and epididymis were explored by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), and the regulatory network related to sperm motility in breeder cocks was constructed. The transcriptome sequencing data of testicular and epididymis tissues of breeder cocks with high and low sperm motility were analyzed. The gene co-expression network was constructed by WGCNA method, and gene modules significantly associated with phenotypic traits were identified. GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis were performed for the module genes. Cytoscape software was used to screen key genes and visualize the co-expression network. The results showed that 14 227 genes were clustered into 11 modules, Turquoise, Yellow and Red modules were mined with $R^2 \geq 0.6$ and $P < 0.05$ as criteria. Functional analysis of the genes in the three key modules showed that these genes were mainly enriched in nucleotide excision repair, homologous recombination, effects of cytochrome P450 on xenobiotic metabolism, MAPK signaling pathway, apoptosis and other signaling pathways. In this study, the selected IFT family genes HMOX2, CYP4B1, ANG and ITGB2 were core genes related

收稿日期: 2022-06-25

作者简介: 原佳妮(1999-), 女, 山西晋城人, 硕士研究生, 研究方向为功能基因组学与生物信息学。(E-mail) BUAYjn@163.com

通讯作者: 邢凯, (E-mail) xk181986@163.com

to sperm motility of breeder cocks, which could be used as potential genes for improving sperm motility.

Key words: breeder cocks; sperm motility; weighted gene co-expression network analysis (WGCNA); hub gene

种公鸡在家禽生产中具有重要作用,每年每羽种公鸡可以使超过 1 000 个种蛋受精^[1]。对于家禽养殖业而言,高繁殖力的种公鸡可以提高畜禽生产经济效益。精液品质是种公鸡最主要的繁殖性状,良好的精液品质可以提高种公鸡的利用效率,加速鸡的遗传改良进程^[2]。公鸡的精液品质主要包括精液颜色、精子活力、精子密度等^[3],其中精子活力是精子生存能力、受精能力的体现,最能反映精液的品质。精子活力是高遗传力性状^[2],研究精子活力的分子遗传机制是提高种公鸡精子活力的有效方法。

加权共表达网络分析(Weighted correlation network analysis, WGCNA)是通过构建共表达网络研究基因功能的重要方法^[4]。WGCNA 利用基因共表达数据将大量基因划分为少数模块,将模块与性状关联后可确定核心基因所在关键模块,并筛选出核心基因^[5]。用 WGCNA 分析法将表达模式相似的基因进行聚类^[4],分析基因与性状之间的关系,在动物育种方面得到了广泛应用。Liu 等^[6]通过对牛 28 个精子测序数据进行 WGCNA 分析,发现精子 DNA 甲基化可能会影响公牛的繁殖性能。Xu 等^[7]以湖羊睾丸为试验材料,对不同月龄湖羊睾丸测序数据进行 WGCNA 分析,鉴定出 2 个与睾丸发育高度相关的基因模块,还发现 *DNAH17*、*SPATA4*、*PDGFA*、*VIM* 和 *INHBA* 是影响睾丸大小的关键基因。Robic 等^[8]以影响猪睾丸类固醇代谢的 *CYP11A1* 或 *HSD17B3* 基因为核心,鉴定这 2 个基因所在模块以寻找更多影响类固醇代谢的基因。目前尚无用 WGCNA 分析法鉴定种公鸡精子活力关键基因的报道,本研究拟用 WGCNA 分析法鉴定种公鸡睾丸、附睾中影响精子活力的核心基因,从而进一步阐明种公鸡精子活力遗传的分子机制。

1 材料与方法

1.1 样本的采集与处理

本试验利用笔者所在课题组前期对不同精子活力的种公鸡睾丸、附睾组织进行转录组测序所得数据^[9-10]进行分析。试验前期通过检测种公鸡的精子活力,各选取 4 羽高、低精子活力的公鸡,屠宰后取睾丸、附睾组织。所取组织样本分为 G(睾丸)、F(附睾)2 组,再根据精子活力分为 H(高活力)、L(低活力)组。用 TopHat2^[11]、Haseq2^[12]对转录组数据进行比对和定量,并除去表达量为 0 的基因。

1.2 共表达网络的构建

用 WGCNA 分析包^[13]构建基因共表达网络。首先计算任意 2 个基因之间的相关系数,用 `pickSoftThreshold` 函数确定最佳软阈值,选择相关系数加权值($power$)=7 对关系矩阵进行幂运算,建立无尺度的邻近矩阵。采用 `adjacency` 函数将邻近矩阵转换为 TOM 矩阵,根据 TOM 矩阵的相异程度,按照层次聚类法和动态剪切树的标准进行基因聚类和模块划分。用模块基因进行主成分分析(PCA),得到模块特征值(ME)。

1.3 目标模块的选择

为了筛选与表型数据相关的模块,计算模块特征向量(ME)与样本表型的相关程度。本研究以决定系数(R^2) ≥ 0.6 、显著性水平 0.05 为标准,选取与样本表型显著相关的模块,表型数据见表 1。

表 1 样本分组对应的表型

Table 1 Phenotypes corresponding to different sample groups

表型	精子活力(%)	组织
H-G	86.20 \pm 1.81	睾丸
L-G	28.85 \pm 2.25	睾丸
H-F	86.20 \pm 1.81	附睾
L-F	28.85 \pm 2.25	附睾

精子活力测定方法:使用伟力仪测定,每个精液样品随机选取 5 个显微区域进行分析,取平均值。

1.4 精子活力相关基因的筛选与网络构建

将目标模块中的基因导入 STRING 构建蛋白质互作网络。使用 Cytoscape 软件的 `cytoHABBA` 插件计算基因的连接度,将结果排名前 15 的基因作为核心基因,绘制前 10 个基因的网络图。

1.5 目标模块的 GO 和 KEGG 富集分析

用 ClusterProfiler 包对鸡精子活力相关模块内的基因作 GO、KEGG 富集分析,得出睾丸、附睾中参与精子活力调控的关键基因富集的生物学过程,阈值为 0.05。

2 结果与分析

2.1 WGCNA 分析

对定量数据除去表达量为 0 的基因后,得到 14 227 个基因用于加权基因共表达网络分析。相关系数加权值($power$)大于 7 时,网络中基因之间的连接服从无尺度网络分布,因此选取 $power=7$ 构建无尺度网络(图 1)。采用动态剪切法划分,构建了 11 个

模块,基因聚类数量最多的青绿色(Turquoise)模块含有6 753个基因,基因聚类数量最少的紫色(Purple)模

块仅含有 49 个基因,灰色模块代表没有被聚类的基因(图 2)。

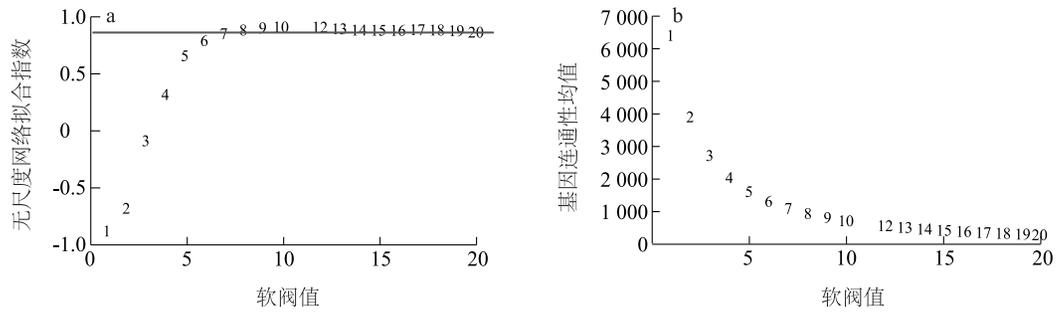


图 1 WGCNA 分析中 power 值的筛选

Fig.1 Screening of power values in weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

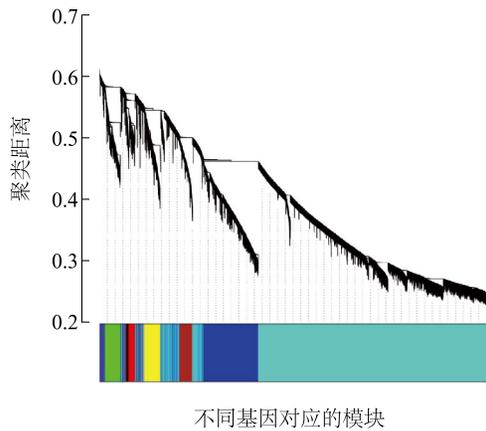
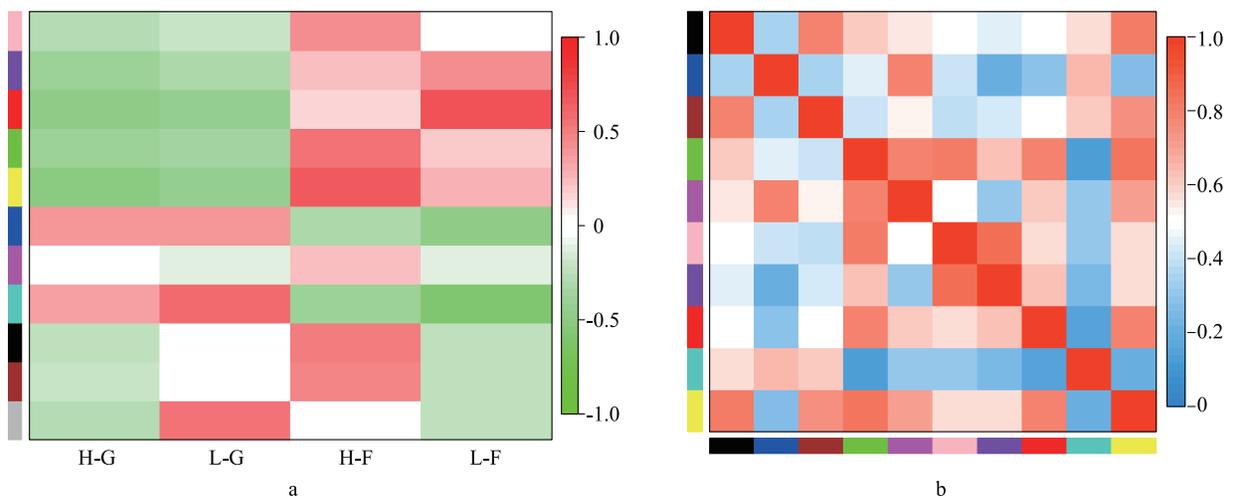


图 2 基因聚类模块

Fig.2 Gene clustering module

2.2 模块相关性与重要模块的识别

每个基因共表达模块与高、低精子活力睾丸和附睾组织的关联性分析结果如图 3 所示。以各基因聚类模块的特征值为标准,发现黄色(Yellow)模块与高精子活力睾丸的相关性最高,但相关性不显著。青绿色(Turquoise)模块是与低精子活力睾丸显著相关的模块($R^2 = 0.6, P = 0.01$)。黄色(Yellow)模块是与高精子活力附睾显著正相关的模块($R^2 = 0.68, P = 0.004$)。红色(Red)模块是与低精子活力附睾显著正相关的模块,且决定系数为 0.70(图 3a)。通过模块相关性分析发现,红色(Red)模块与黄色(Yellow)模块的相关性较高,因此可将这 2 个模块作为影响精子活力的特异性模块(图 3b)。



H-G、L-G、H-F、L-F 分别表示高精子活力睾丸、低精子活力睾丸、高精子活力附睾、低精子活力附睾。a: 基因共表达模块与性状的相关性;b: 模块相关性热图。图例表示不同精子活力睾丸、附睾与模块的相关性,红色表示正相关,绿色表示负相关,颜色越深表明相关性越强。

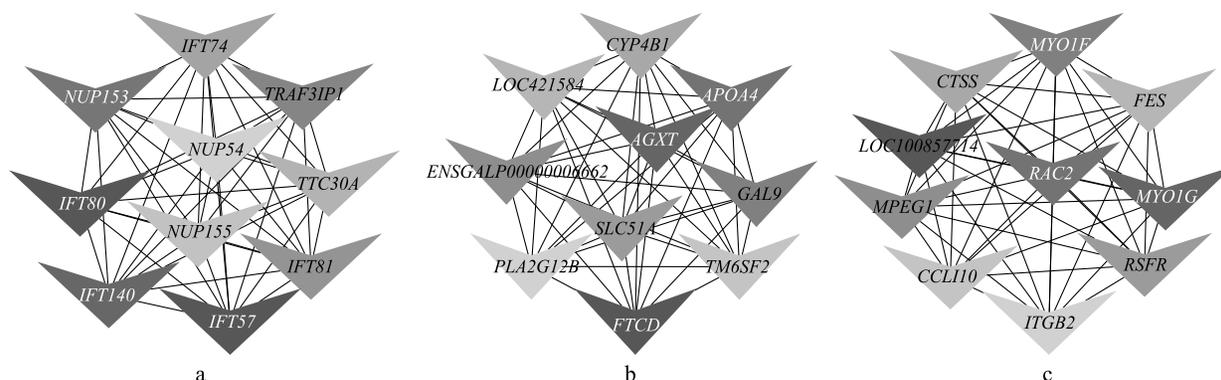
图 3 基因共表达模块的相关性

Fig.3 Correlation of gene co-expression modules

2.3 网络构建与核心基因鉴定

图 4 为 3 个模块的网络构建结果,由 Cytoscape 结果确定 *IFT74*、*TRAF3IP1*、*NUP153*、*NUP54*、*TTC30A*、*IFT80*、*NUP155*、*IFT81*、*IFT140* 和 *IFT57* 是青绿色 (Turquoise) 模块的核心基因, *CYP4B1*、*LOC421584*、*APOA4*、*ENSGALP0000006662*、*AGXT*、

SLC51A、*GAL9*、*PLA2G12B*、*TM6SF2* 和 *FTCD* 是黄色 (Yellow) 模块的核心基因, *MYO1F*、*CTSS*、*FES*、*LOC100857714*、*RAC2*、*MYO1G*、*MPEG1*、*CCLI10*、*RSFR* 和 *ITGB2* 是红色 (Red) 模块的关键基因。此外,未绘入图中的 *HMOX2*、*CYP4B1*、*ANG* 基因也是与种公鸡精子活力相关的核心基因。



颜色的深浅表示基因连接度的高低,颜色越深表明连接度越高。a:青绿色 (Turquoise) 模块核心基因共表达网络;b:黄色 (Yellow) 模块核心基因共表达网络;c:红色 (Red) 模块核心基因共表达网络。

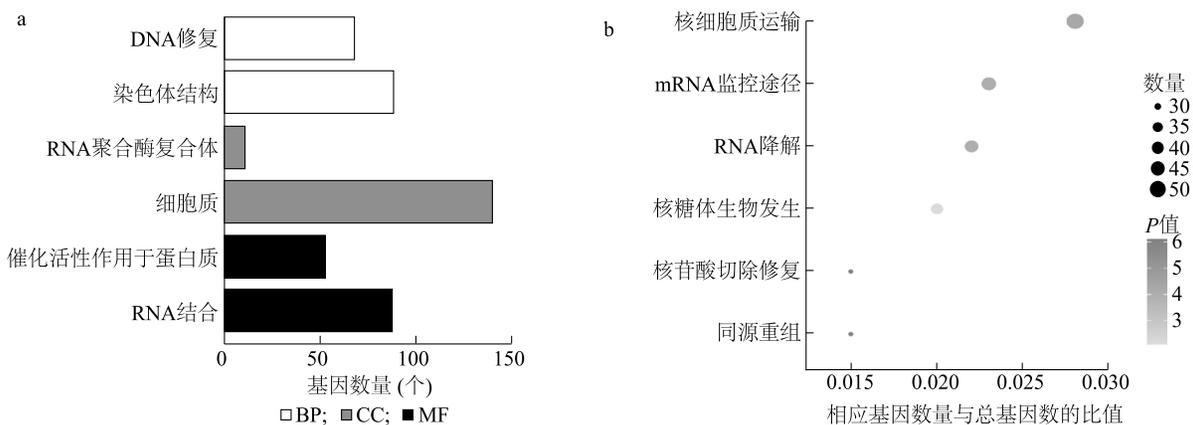
图 4 关键模块核心基因的共表达网络

Fig.4 Co-expression network of core genes in key modules

2.4 目标模块中基因的生物学功能分析

Turquoise 模块的基因富集分析结果见图 5。生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 这几个 GO 类别分别显著富集的前 2 个条目分别为 DNA 修复、染色体结构, RNA 聚合酶复合体、细胞质, 催化活性作用于蛋白质, RNA 结合

化活性作用于蛋白质和 RNA 结合 (图 5a)。KEGG 通路分析发现, Turqueious 模块的基因显著富集到核苷酸切除修复、核糖体生物发生和 RNA 降解等与核苷酸相关的通路上 (图 5b)。



a: Turquoise 模块 GO 功能注释; b: Turquoise 模块 KEGG 富集分析。BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能。

图 5 青绿色 (Turquoise) 模块功能富集分析

Fig.5 Functional enrichment analysis of Turquoise module

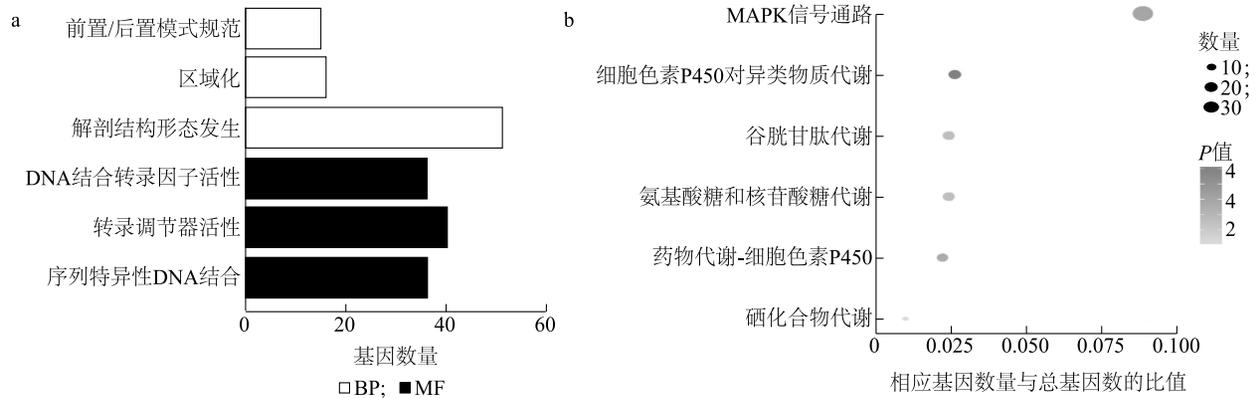
Yellow 模块的基因显著富集在区域化、解剖结构形态发生和前置/后置模式规范 3 个生物学过程及 DNA 结合转录因子活性、转录调节器活

性、序列特异性 DNA 结合等分子功能条目 (图 6a)。细胞色素 P450 对异类物质的代谢、MAPK 信号通路、谷胱甘肽代谢和药物代谢-细胞色素

P450 是 Yellow 模块基因显著富集的信号通路 (图 6b)。

Red 模块的基因显著富集于免疫系统过程、白细胞的细胞-细胞粘连、对细菌的反应、对生物刺激的反应、对 T 细胞活化的正向调控和淋巴细胞活化

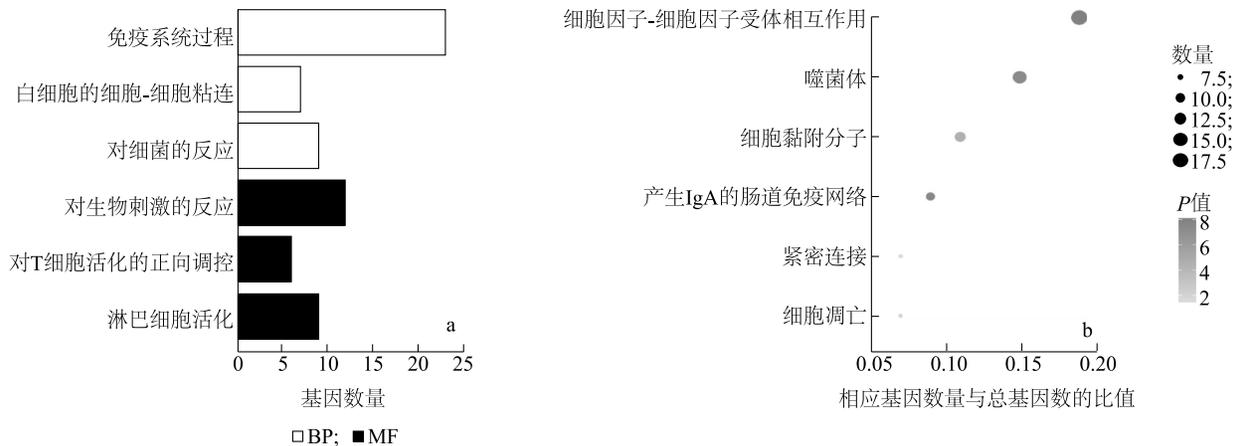
等生物学过程 (图 7a)。信号通路主要涉及细胞因子-细胞因子受体相互作用、产生 IgA 的肠道免疫网络、噬菌体、细胞黏附分子、细胞凋亡和紧密连接等 (图 7b)。



a: Yellow 模块 GO 功能注释; b: Yellow 模块 KEGG 富集分析。BP: 生物过程; MF: 分子功能。

图 6 黄色 (Yellow) 模块功能富集分析结果

Fig.6 Functional enrichment analysis of Yellow module



a: Red 模块 GO 功能注释; b: Red 模块 KEGG 富集分析。BP: 生物过程; MF: 分子功能。

图 7 红色 (Red) 模块功能富集分析

Fig.7 Functional enrichment analysis of Red module

3 讨论

本研究通过 WGCNA 分析将 14 227 个基因富集到 11 个共表达模块,利用各个模块的 ME 值对各模块与目标性状进行相关性分析,得出精子活力性状研究的 3 个关键目标模块为 Turquoies 模块、Yellow 模块、Red 模块。再通过互作网络的

连接度筛选得出, IFT 基因家族、HMOX2、CYP4B1、ANG、ITGB2 为影响精子活力的候选基因。

Turquoies 模块的基因主要参与核苷酸切除修复 (NER)、同源重组和核糖核酸降解等与核糖体相关的通路。其中,核苷酸切除修复系统在精子发生过程中对于去除大块 DNA 加成物至关重要

要^[14]。研究发现,核苷酸切除修复参与大鼠睾丸的氧化应激^[15]。通过对牦牛、牛睾丸转录组的分析发现,生精停滞导致雄性不育的差异长链非编码 RNA(lncRNA)富集在核苷酸切除修复通路上^[16],这与本研究结果相似。同源重组(HR)以程序化的 DNA 双链断裂(DSBs)的产生为起点,从而造成遗传信息的交换和基因组的多样性^[17]。睾丸精子干细胞同源重组途径可以检测 DNA 损伤修复^[18],因此同源重组对于睾丸精子发生至关重要。*IFT* 家族基因和 *HMOX2* 是睾丸组织中与精子活力相关的关键基因。*IFT* 基因家族中的 *IFT57*、*IFT74*、*IFT80*、*IFT81*、*IFT140* 和 *HMOX2* 是 Turquoise 模块的核心基因,在低精子活力睾丸中高表达。*IFT172* 的失活似乎对有丝分裂、减数分裂没有影响,但会阻碍精子发生。*IFT* 基因敲除会导致小鼠精子数量、活力减少 60%,从而造成雄性不育^[19]。早期研究检测到 *HMOX1*、*HMOX2* 在人类睾丸等生殖器官中表达^[20],表明这些基因可能在动物睾丸中表达。从 Leydig 细胞中的 HO-1 衍生的 CO 调节了精子发生并引起生殖细胞的凋亡^[21]。*HMOX2* 通过调节类固醇激素的生成来影响精子活力。*IFT* 家族基因和 *HMOX2* 是睾丸组织中影响精子活力的基因。

Yellow 模块的基因可能在异类物质代谢、外源药物代谢过程中发挥作用。细胞色素 P450 对异类物质代谢通路、MAPK 信号通路和谷胱甘肽代谢通路是与高精子活力附睾显著相关的通路。细胞色素 P450 对异类物质代谢在胚胎干细胞分化成精子干细胞的过程中发挥着重要作用,细胞色素 P450 基因家族内 *CYP450* 基因的相对表达量降低使得精子畸形率升高,并对精子活力、密度也有影响^[22],这与本研究结果相似。MAPK 信号通路通过调节附睾中紧密连接蛋白质的表达和分布,有助于维持附睾储存、精子成熟所需的腔内环境^[23]。此外,MAPK 信号通路影响 Sertoli 细胞的乳酸供应,并且 MAPK 信号通路在调节精原干细胞自我更新中也占据主导地位^[24]。谷胱甘肽代谢是能量代谢的一种,其代谢产物半胱氨酸可以促进睾丸类固醇激素的合成,类固醇激素又可以合成睾酮、雄烯酮,因此谷胱甘肽代谢间接影响睾丸内精子发生相关激素的合成。谷胱

甘肽代谢通路中的谷胱甘肽过氧化物酶 5 基因(*GPx5*)是在附睾中强表达的基因,*GPx5* 可以调节附睾内活性氧自由基的浓度,促进精子发育成熟,维持精子完整性^[25]。*CYP4B1* 是 Yellow 模块的核心基因,在高精子活力附睾中表达。*CYP4B1* 是一种哺乳动物的细胞色素 P450 单加氧酶,能够羟基化不饱和脂肪酸。Lahnsteiner 等^[26]研究发现,脂质的组成和代谢对精子活力有显著影响。此外,Yellow 模块中的基因通过参与附睾的代谢活动来调控精子活力。

Red 模块的基因可以保护精子免受氧化应激的危害,具有抗凋亡、抗炎症的功能。细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞凋亡、细胞黏附分子是与低精子活力附睾性状相关的通路。研究发现,细胞因子-细胞因子受体相互作用通路上相关基因的表达可导致雄性附睾炎,表明该通路参与附睾炎症的发生^[27]。通过探索新鲜、冷冻后解冻公猪精子中的 miRNA、mRNA 谱发现,新鲜、冷冻公猪精液的差异 mRNA 在细胞因子-细胞因子受体相互作用通路富集^[28],表明该通路是调控精子活力的通路。细胞凋亡是细胞在基因作用下的正常死亡,可以维持机体内环境的相对稳定。在精子发生过程中,涉及生精细胞的凋亡,而生精细胞的凋亡可以维持支持细胞与生精细胞的数量平衡^[29]。细胞凋亡通路上基因的表达与精子凋亡、精液质量显著相关^[30],这与本研究结果一致。黏附分子在附睾中的表达可以调节附睾内的炎症反应^[31]。*ANG*、*ITGB1* 是 Red 模块内与精子活力相关的基因,其中 *ANG* 参与应激反应,在炎症反应期间其表达量增加^[32]。研究发现,*ANG* 缺失阻止了炎症诱导的精子中 5'-tsRNA 表达谱的改变,下调了线粒体氧化磷酸化、翻译/核糖体途径,进而影响精子活力^[33]。*ITGB1* 是细胞黏附分子家族基因中的 1 个基因,参与细胞表面黏附信号通路^[34]。Matsuyama 等^[35]研究发现,*ITGB1* 的表达使得精子数量减少,造成 Sertoli-生殖细胞黏附连接的功能障碍。Azizi 等^[36]研究发现,*ITGB1* 在精子分化过程中表达量下调。此外,*ANG*、*ITGB1* 是与附睾组织炎症反应有关的基因。

4 结论

本研究通过 WGCNA 分析,获得了与鸡精子

活力相关的基因集,筛选出3个与精子活力显著相关的模块。关键模块中的 *IFT* 家族基因、*HMOX2*、*CYP4B1*、*ANG*、*ITGB2* 等基因在调控鸡精子活力中发挥着关键作用。本研究结果为阐明种公鸡睾丸、附睾调控精子活力的分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘一帆. 基于睾丸测序的鸡精子活力性状 mRNA-miRNA-lncRNA 转录调控研究[D]. 北京:中国农业大学, 2018.
- [2] 徐秀丽. 基于睾丸转录组测序筛选影响家鸽精子活力的关键 mRNAs 和非编码 RNAs[D]. 杭州:浙江大学, 2021.
- [3] 熊婷, 郭崇华, 陈彪, 等. 笼养山麻鸭精液品质的测定与分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(14):53-56.
- [4] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008,9(1):559.
- [5] CHENG Y, LI L, QIN Z, et al. Identification of castration-resistant prostate cancer-related hub genes using weighted gene co-expression network analysis[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(14):8006-8017.
- [6] LIU S, FANG L, ZHOU Y, et al. Analyses of inter-individual variations of sperm DNA methylation and their potential implications in cattle[J]. BMC Genomics, 2019,20(1):888.
- [7] XU H, SUN W, PEI S, et al. Identification of key genes related to postnatal testicular development based on transcriptomic data of testis in Hu Sheep[J]. Front Genet, 2021,12:773695.
- [8] ROBIC A, FARAUT T, FEVE K, et al. Correlation networks provide new insights into the architecture of testicular steroid pathways in pigs[J]. Genes, 2021,12(4):519-551.
- [9] XING K, CHEN Y, WANG L, et al. Epididymal mRNA and miRNA transcriptome analyses reveal important genes and miRNAs related to sperm motility in roosters[J]. Poult Sci, 2022,101(1):101558.
- [10] XING K, GAO M J, LI X, et al. An integrated analysis of testis miRNA and mRNA transcriptome reveals important functional miRNA-targets in reproduction traits of roosters[J]. Reproductive Biology, 2020,20(3):433-440.
- [11] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions[J]. Genome Biology, 2013,14(4):R36.
- [12] ANDERS S, PYL P T, HUBER W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data[J]. Bioinformatics, 2015,31(2):166-169.
- [13] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008,9(1):559.
- [14] GU A H, JI G X, ZHOU Y, et al. Polymorphisms of nucleotide-excision repair genes may contribute to sperm DNA fragmentation and male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2010,21(5):602-609.
- [15] ZHAO H X, SONG L X, MA N, et al. The dynamic changes of Nrf2 mediated oxidative stress, DNA damage and base excision repair in testis of rats during aging[J]. Experimental Gerontology, 2021,152:111460.
- [16] WU S X, MIPAM T D, XU C F, et al. Testis transcriptome profiling identified lncRNAs involved in spermatogenic arrest of cattleyak[J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0229503.
- [17] LIN M, LYU J X, ZHAO D, et al. MRNIP is essential for meiotic progression and spermatogenesis in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021,550:127-133.
- [18] LE W, QI L, XU C, et al. Preliminary study of the homologous recombination repair pathway in mouse spermatogonial stem cells[J]. Andrology, 2018,6(3):488-497.
- [19] ZHANG S Y, LIU Y H, HUANG Q, et al. Murine germ cell-specific disruption of *Ift172* causes defects in spermiogenesis and male fertility[J]. Reproduction, 2020,159(4):409-421.
- [20] TRAKSHEL G M, MAINES M D. Detection of two heme oxygenase isoforms in the human testis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1988,154(1):285-291.
- [21] OZAWA N, GODA N, MAKINO N, et al. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress[J]. J Clin Invest, 2002,109(4):457-467.
- [22] FRANASIAK J M, BARNETT R, MOLINARO T A, et al. CYP11A1 3801T>C polymorphism implicated in altered xenobiotic metabolism is not associated with variations in sperm production and function as measured by total motile sperm and fertilization rates with intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertility and Sterility, 2016,106(2):481-486.
- [23] KIM B, BRETON S. The MAPK/ERK-signaling pathway regulates the expression and distribution of tight junction proteins in the mouse proximal epididymis[J]. Biology of Reproduction, 2016,94(1):22.
- [24] NI F, HAO S, YANG W. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis[J]. Cell Death & Disease, 2019,10(8):515-541.
- [25] 伊茹汗. *GPx5* 在骆驼附睾上的时空表达研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2020.
- [26] LAHNSTEINER F, MANSOUR N, CABERLOTTO S. Composition and metabolism of carbohydrates and lipids in *Sparus aurata* semen and its relation to viability expressed as sperm motility when activated[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010,157(1):39-45.
- [27] SONG X, LIN N H, WANG Y L, et al. Comprehensive transcriptome analysis based on RNA sequencing identifies critical genes for lipopolysaccharide-induced epididymitis in a rat model[J]. Asian J Androl, 2019,21(6):605-611.
- [28] DAI D H, QAZI I H, RAM M X, et al. Exploration of miRNA and

- mRNA profiles in fresh and frozen-thawed boar sperm by transcriptome and small RNA sequencing[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(4):802.
- [29] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019,20(3):175-193.
- [30] JI G X, GU A H, HU F, et al. Polymorphisms in cell death pathway genes are associated with altered sperm apoptosis and poor semen quality[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(10):2439-2446.
- [31] OZTÜRK H, OZTURK H, DOKUCU A I. The role of cell adhesion molecules in ischemic epididymal injury[J]. *Int Urol Nephrol*, 2007,39(2):565-570.
- [32] OLSON K A, VERSELIS S J, FETT J W. Angiogenin is regulated *in vivo* as an acute phase protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998,242(3):480-483.
- [33] ZHANG Y W, REN L, SUN X X, et al. Angiogenin mediates paternal inflammation-induced metabolic disorders in offspring through sperm tsRNAs[J]. *Nat Commun*, 2021,12(1):6673.
- [34] MATSUURA N, TAKADA Y. Subclassification, molecular structure, function and ligand in integrin superfamily[J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, 1995, 53(7):1623-1630.
- [35] MATSUYAMA T, NIINO N, KIYOSAWA N, et al. Toxicogenomic investigation on rat testicular toxicity elicited by 1,3-dinitrobenzene[J]. *Toxicology*, 2011,290(2/3):169-177.
- [36] AZIZI H, NIAZI T A, SKUTELLA T. Successful transplantation of spermatogonial stem cells into the seminiferous tubules of busulfan-treated mice[J]. *Reprod Health*, 2021,18(1):189.

(责任编辑:徐 艳)