

• 动物及兽医生物技术 •

基于转录组学和代谢组学联合分析黑线姬鼠睾丸下降的功能与机制

李强, 王再山, 王迎新, 任占辰, 万祥旭, 鲁思含, 孙悦, 贾修歧, 金志民*

牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157011

李强, 王再山, 王迎新, 任占辰, 万祥旭, 鲁思含, 孙悦, 贾修歧, 金志民. 基于转录组学和代谢组学联合分析黑线姬鼠睾丸下降的功能与机制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2178-2194.

LI Qiang, WANG Zaishan, WANG Yingxin, REN Zhanchen, WAN Xiangxu, LU Sihan, SUN Yue, JIA Xiuqi, JIN Zhimin. Functions and mechanisms of testicular descent in *Apodemus agrarius* based on transcriptomics and metabolomics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2178-2194.

摘要: 为了探究黑线姬鼠睾丸下降的功能与机制, 分析其基因及代谢物水平的变化规律。本研究使用高通量测序技术和超高效液相色谱技术对黑线姬鼠下降期和正常期睾丸分别进行了转录组学和代谢组学分析。转录组学中基因本体数据库(gene ontology, GO)富集分析得到 240 个差异基因, 包括 *Spesp1*、*Izumo1*、*Hyal5* 和 *Fabp9* 等, 京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析得到 52 个差异表达基因, 包括 *Pcyt1*、*Pla2g4e*、*Gpd1l* 和 *Lypla3* 等。实时荧光定量 PCR 结果表明, 随机选取的 6 个基因在黑线姬鼠下降期和正常期睾丸中的表达模式与转录组结果一致。代谢组学结果表明, 差异代谢集中与睾丸功能相关差异代谢物有 28 个, 包括 3-脱氢奎宁酸、 α -亚麻酸、磷酸二羟丙酮和 1,6-二磷酸果糖等。联合分析结果显示, 甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢和花生四烯酸代谢可能是调控黑线姬鼠睾丸下降及功能发生关键代谢通路。本研究将有助于解读黑线姬鼠睾丸下降对其功能的影响机制, 也可为后续深入探究黑线姬鼠种群数量变化机制及实验动物资源开发奠定理论基础。

关键词: 黑线姬鼠; 睾丸下降; 转录组学; 代谢组学; 联合分析

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFF0724603-4); 2023 年度省属高校基本科研业务费科研项目(MNUQN202305); 生物学学科卓越研究生培养模式改革创新项目(MSYZYXM2022004); 牡丹江师范学院“揭榜挂帅”项目(kjcx2023-105mdjnu)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFF0724603-4), the 2023 Provincial Universities Basic Research Business Expenses Research Project (MNUQN202305), the Reform and Innovation Project of Biology Discipline Excellence Graduate Training Model (MSYZYXM2022004), and the Mudanjiang Normal University “Announce and Be in Command” Project (kjcx2023-105mdjnu).

*Corresponding author. E-mail: swxjzm@126.com

Received: 2024-01-10; Accepted: 2024-03-12; Published online: 2024-03-14

Functions and mechanisms of testicular descent in *Apodemus agrarius* based on transcriptomics and metabolomics

LI Qiang, WANG Zaishan, WANG Yingxin, REN Zhanchen, WAN Xiangxu, LU Sihan, SUN Yue, JIA Xiuqi, JIN Zhimin*

College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang, China

Abstract: This study aims to explore the functions and mechanisms of testicular descent in *Apodemus agrarius*, and analyze the changes in genes and metabolite levels in this process. Illumina NovaSeq and liquid chromatography-mass spectrometry were used for the transcriptomic analysis and metabolomic analysis, respectively, of the normal and descending testis of *A. agrarius*. Gene ontology (GO) enrichment of the transcriptomic results revealed 240 differentially expressed genes (DEGs), such as *Spesp1*, *Izumol1*, *Hyal5*, and *Fabp9*. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment showed 52 DEGs, including *Pcytl*, *Pla2g4e*, *Gpd1l*, and *Lypla3*. The qRT-PCR results were consistent with the transcriptomic results in terms of the expression patterns of six randomly selected genes in the normal and descending testis. The metabolomic results revealed 28 differential metabolites associated with the testicular function, including 3-dehydroquinic acid, α -linolenic acid, dihydroxyacetone phosphate, and fructose 1,6-bisphosphate. The conjoint analysis showcased that glycerophospholipid metabolism, α -linolenic acid metabolism, and arachidonic acid metabolism may be the key metabolic pathways regulating testicular descent in *A. agrarius*. This study will help to understand the mechanism of testicular descent and lay a theoretical foundation for exploring the mechanisms of the population changes of *A. agrarius* and developing laboratory animal resources.

Keywords: *Apodemus agrarius*; testicular descent; transcriptomics; metabolomics; conjoint analysis

黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)是一种小型啮齿动物,在分类上隶属于啮齿目鼠科姬鼠属,别名田姬鼠、黑线鼠、长尾黑线鼠等^[1],具有体型小、繁殖期短、适应能力强的特点,分布极广且数量众多,是我国常见的野生鼠类。黑线姬鼠主要栖息生境为农田生境,以植物茎、叶、种子及小型昆虫为食^[2],在农田生态系统中处优势地位^[3],是危害我国农作物生产的重要害鼠之一^[4]。黑线姬鼠的活动范围与人类生活区相近,是多种病原体的天然携带者和传播者,如

汉坦病毒(Hantavirus)、钩端螺旋体(*Leptospira grippityphosa*)和日本血吸虫(*Schistosoma japonicum* K)等^[5-7]。基于黑线姬鼠的鼠害治理工作,我国黑线姬鼠繁殖特征方面研究较多,内容包括肥满度、性别比例、种群密度、年龄组成、繁殖高峰和胎仔数等繁殖参数^[8-12],但内在分子机制方面研究较少。

传统的啮齿动物繁殖行为研究主要以雌性为研究对象,这是由于其怀孕率、胎仔数与种群数量直接相关,而雄性繁殖强度的意义往往

被低估^[13]。睾丸是动物的雄性生殖器官^[14]，也叫精巢，主要功能是产生精子和分泌雄激素。不同季节的睾丸形态变化有所不同，在繁殖季节，黑线姬鼠的睾丸逐渐发育膨大，自腹腔落入阴囊，发生下降现象，以提高繁殖的成功率。随着人们对雄性繁殖强度的深入研究，雄鼠睾丸的下降率也成为了种群繁殖能力的评估标准之一。2023年，何佳凝等^[15]对洞庭湖区域黑线姬鼠的繁殖特征进行了调查，在计算该种群繁殖参数时，也将黑线姬鼠睾丸的下降率作为参考之一。但此类研究更多是从生态调查角度出发，并未探究其睾丸下降的功能机制。

近年来，转录组学、代谢组学、蛋白组学和宏基因组等多组学技术已经广泛用于生物学研究，可以通过多组学技术揭示动物的损伤修复、器官发育及各类胁迫下的作用机制。2021年，van Every等^[16]探究了鸡在孵化过程中肝脏的转录组和代谢组数据变化，发现柠檬酸盐、磷酸烯丙酮酸和甘油是发育过程中的关键代谢物。2022年，Zeng等^[17]通过转录组学和代谢组学联合分析揭示了在脊髓急性损伤条件下大鼠代谢失调的潜在分子通路，为促进神经修复和再生的靶点收集提供帮助；2024年，Wu等^[18]通过转录组学和代谢组学探究了水体常见污染物溴氰菊酯(deltamethrin, Del)对鲫鱼脑部的损伤作用，揭示了Del暴露扰乱的关键信号通路。截至目前，针对黑线姬鼠繁殖特征的研究多以形态学调查为主，其睾丸下降的功能与机制尚未清晰。本研究通过转录组学筛选出黑线姬鼠睾丸下降期和正常期的关键差异基因，对差异表达基因进行注释和表达量分析，通过代谢组学剖析繁殖季节睾丸的差异代谢物，结合转录组学中的差异表达基因对关键代谢物的代谢通路进行基因注释，从基因及代谢物角度揭示黑线姬鼠睾丸下降对其功能的影响机制，既可以

为研究黑线姬鼠种群数量变化规律提供依据，也可为构建基因缺陷模式生物提供候选基因，为后续黑线姬鼠的实验动物化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为体重17–22 g的成年雄性黑线姬鼠睾丸，动物实验经牡丹江师范学院实验动物伦理委员会批准(批准号：IACUC-MNU-2022-108)，捕捉地点为黑龙江省牡丹江市三道关自然保护区，捕捉时间为春季、夏季和秋季，分别对应C、X、Q共3组，每个季节9只，共27只，其中春季与夏季为睾丸下降时期，秋季为正常时期，转录组每组3个生物学重复，样品编号(C, X, Q)-HXG1-3，代谢组每组6个生物学重复，样品编号(C, X, Q)-HXG1-6。采用二氧化碳窒息法将黑线姬鼠安乐死，解剖后取其睾丸，放入无菌冻存管中液氮速冻，置于-80℃冰箱保存，以备后续转录组学与代谢组学分析。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和文库构建

使用Trizol磁珠法进行黑线姬鼠睾丸总RNA的提取，使用NanoDrop 2000对所提RNA的浓度和纯度进行检测，通过Agilent2100测定RNA质量参数(RNA quality number, RQN)值进而评估核酸质量。将检测合格的样本送往上海美吉生物医药科技有限公司测序，采用Illumina TruseqTM RNA Sample Prep Kit进行文库构建，测序平台为Illumina NovaSeq 6000 (PE文库，读长2×150 bp)。

1.2.2 测序数据质控与转录组从头组装

得到原始测序数据(raw reads)后，筛选出Q20>85%、Q30>80%的高质量序列(clean reads)。使用Trinity对所有样本的clean reads进行从头组装，再通过TransRate^[19]和CD-HIT^[20]对初始组

装序列进行优化过滤,使用 BUSCO^[21]对转录组的完整性进行评估。

1.2.3 差异表达基因筛选与功能富集分析

通过 RSEM^[22]计算基因表达量,采用每百万读段中来自于某转录本的读段数值(transcripts per million, TPM)^[23]统计各组基因与转录本的表达量,使用 DESeq2^[24]进行多组间表达量差异分析,以差异倍数(fold change, FC) ≥ 2 且 $P \leq 0.01$ 作为筛选条件,筛选出 A 组与 C 组、B 组与 C 组之间的差异表达基因,再取交集,即为 A 和 B 两组与 C 组的共同差异表达基因,命名为差异基因(differentially genes, DG)。使用 Goatools 对 DG 进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,获得该基因集中与睾丸发育及配子发生相关 GO 和 KEGG 功能基因。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 验证

随机选取 6 个差异基因进行实时荧光定量 PCR 验证,扩增程序为: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 58 °C 60s, 95 °C 15 s, 40 个循环; 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。使用 Primer 6.0 设计特异性引物,内参基因 *Eid3* 和目的基因 *Cyp17a1*、*Gata4*、*Ntn4*、*Plxna1*、*Tprgl* 和 *Ldhc* 引物见表 1。运用归一化计算各个基因的相对表达量,每个基因设 3 次生物学重复。数据结果以平均值 \pm 标准差表示,使用 SPSS 19 进行方差分析。

1.2.5 代谢物提取

精准称取 50 mg 样品至 2 mL 离心管中,加入直径为 6 mm 的研磨珠与 400 μ L 提取液(包含 4:1 的甲醇和水及 0.02 mg/mL 的 L-2-氯苯丙氨酸等);使用冷冻组织研磨仪研磨 6 min (-10 °C, 50 Hz); 于 -20 °C 下静置 30 min; 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液置于带内插管的进样小瓶中上机分析; 每个样本取 20 μ L 上清液混合作为质控样本(quality control, QC)。

1.2.6 LC-MS 检测参数与质量控制

本次液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析仪器平台为赛默飞世尔科技公司的超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱系统。色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m; Waters); 流动相 A 为 95%水+5%乙腈(含 0.1%甲酸), 流动相 B 为 47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含 0.1%甲酸), 进样量为 3 μ L, 柱温 40 °C; 流动相洗脱包括正离子模式和负离子模式, 具体流动相洗脱梯度见表 2。

质谱条件: 样品经电喷雾电离, 分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。具体条件如下: (1) 扫描范围 70–1 050 m/z ; (2) 鞘气流为 50 arb; (3) 辅助气流速 13 arb; (4) 加热温度 425 °C; (5) 毛细管温度 325 °C; (6) 喷雾电压(正模式) 3 500 V; (7) 喷雾电压(负模式) -3 500 V; (8) S-Lens 电压 50 V; (9) 碰撞能 20、40、60 eV。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers

Gene ID	Gene name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
TRINITY_DN1144_c1_g1	<i>Eid3</i>	GAAGAGGAGTGCAGGAGATTGA	GCTTGCAGCATCCAGGACTTG
TRINITY_DN12713_c0_g2	<i>Cyp17a1</i>	TGGAAGAGGCTGTCGGTGATG	AGCTGCTGTCGTGCTTGGT
TRINITY_DN195_c0_g1	<i>Gata4</i>	TTCCTGACTCTGCCTCCTTGC	ACTGCTGCTGCTGCTGCTA
TRINITY_DN8651_c0_g1	<i>Ntn4</i>	TAGGCTGCGTGATGACAGTGTT	TGGATGGAGAGGAACCGTGGA
TRINITY_DN840_c0_g1	<i>Plxna1</i>	TGACTGGAAGAGGCTGAA	AGACGAGTTGGAGATGTTG
TRINITY_DN33842_c0_g1	<i>Tprgl</i>	AAGCAGAGCCGCCCTTCTTT	TCTCGTCCATGCCAGCCATC
TRINITY_DN5940_c0_g1	<i>Ldhc</i>	GTGGTCCGAGTCCGCAATGT	GCTTGGAGTTGGCAGATACACTG

表 2 流动相洗脱梯度

Table 2 Mobile phase elution gradient

Mode	Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
Positive	0.0	0.4	100.0	0.0
	3.0	0.4	80.0	20.0
	4.5	0.4	65.0	35.0
	5.0	0.4	0.0	100.0
	6.3	0.4	0.0	100.0
	6.4	0.4	100.0	0.0
	8.0	0.4	100.0	0.0
Negative	0.0	0.4	100.0	0.0
	1.2	0.4	96.7	3.3
	1.5	0.4	95.0	5.0
	2.0	0.4	90.0	10.0
	2.5	0.4	87.0	13.0
	4.5	0.4	70.0	30.0
	5.0	0.4	0.0	100.0
	6.3	0.4	0.0	100.0
	6.4	0.4	100.0	0.0
	8.0	0.4	100.0	0.0

质控样本(QC)由 18 份样本的提取物等量混合而成,每个 QC 的体积及处理方式与样本相同,在分析过程中,每 5-15 个分析样本中插入 1 个 QC,用来评估检测质量。

1.2.7 代谢产物鉴定与筛选

代谢组原始数据导入 ProgenesisQI V3.0 进行基线过滤、峰识别和积分等数据处理,得到数据矩阵后利用该软件进行特征峰搜库鉴定,将 MS 和 MS/MS 质谱信息与人类小分子代谢物组数据库(human metabolome database, HMDB)、梅特林数据库(metabolite link, METLIN)等公共数据库及自建数据库进行匹配,MS 质量误差设置为<10 ppm。根据代谢物在不同样本间的表达情况,使用 Ropls (R 包)和 Scipy (Python)进行主成分分析和相关性热图分析,评价组内样本的相似性和组间样本的差异性。利用 KEGG 和 HMDB 数据库对得到的代谢产物进行分类及功能注释。运用 *t* 检验(双尾)对各组代谢物的 *P* 值

进行计算,设置 *P* 值<0.05、表量重要性(variable importance, VIP)>1、FC>1 作为筛选条件,筛选出 A 组与 C 组、B 组与 C 组之间的差异代谢物,再取交集,即为 A 和 B 两组与 C 组的共同差异代谢物,命名为差异代谢物(differential metabolites, DM)。随后基于 KEGG 数据库对差异代谢物进行通路富集,预测出与睾丸功能有关的重要代谢通路。

1.2.8 转录组学和代谢组学联合分析

将筛选出的差异表达基因集合(DG)和差异代谢集合(DM)先进行双向正交偏最小二乘法分析(two-way orthogonal partial least squares, O2PLS),评估样本质量与组学关联性,再进行 KEGG 富集分析,获得 DG 和 DM 中共同显著的富集通路,结合转录组与代谢组的聚类分析结果,分析基因与代谢物之间的调控机制,揭示黑线姬鼠睾丸下降对其功能的影响机制。

2 结果与分析

2.1 测序数据质控与分析

使用 NanoDrop 2000 和 Agilent 对 9 个样本的总 RNA 进行浓度、纯度及核酸质量评估,经检验所有样本 RQN 值≥4.80, 28/23 S 亮度≥18/16 S,满足建库测序要求,进行无参转录组测序分析。9 个样品的转录组分析共获得 56.72 Gb 的序列数据,各组样品 clean data 均在 6.01 Gb 以上, Q20 碱基百分比在 97.17%以上, Q30 碱基百分比在 92.55%以上, GC 含量均大于 50%。通过 Trinity 等软件组装及优化过滤后得到 114 466 个基因(unigene)和 159 459 个转录本(transcription),平均长度为 875.99 bp 与 1 067.56 bp,优化组装评估结果见表 3,基因和转录本的 BUSCO 评分均在 90%以上,表明转录组数据质量较高、完整性较高,可以用于后续分析。

2.2 差异表达基因筛选与表达分析

以 $FC \geq 2$ 且 $P\text{-adjust} \leq 0.01$ 为条件筛选出睾丸下降期(C、X)与正常期(Q)的差异表达基因(DG), 检测出 6 064 条差异表达基因, 其中上调基因为 4 168 条, 下调基因为 1 896 条。将 DG 进行 GO 功能富集分析, 共富集通路 640 条,

表 3 转录组数据优化组装结果评估表

Table 3 Optimized assembly result evaluation

Type	Unigene	Transcript
Total number	114 466	159 459
Total base (bp)	1 002 712 321	170 231 853
Largest length (bp)	24 484	24 484
Smallest length (bp)	201	201
Average length (bp)	875.99	1 067.56
N50 length (bp)	1 706	2 165
E90N50 length (bp)	4 141	3 733
Fragment mapped percent (%)	77.193	86.154
G+C percent (%)	50.00	50.81
Transrate score	0.457 70	0.499 07
BUSCO score (%)	92.0	99.2

排名前 20 的通路见图 1, 从中筛选出 8 条睾丸功能富集通路, 共有 240 个差异表达基因, 见表 2, 其中单次受精过程中精子与卵质膜的融合(fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization)中有 14 个, 包括 *Spesp1*、*Izumo1*、*Hyal5* 和 *Folr1* 等; 顶体组装(acrosome assembly)中有 15 个, 包括 *Fabp9*、*Txndc8* 和 *Acrbp* 等; 精子获能(sperm capacitation)中有 15 个, 包括 *Pcsk4*、*Tssk3* 和 *Tat1* 等; 精子轴丝组装(sperm axoneme assembly)有 19 个; 精子细胞发育(spermatid development)有 42 个; 精卵识别(sperm-egg recognition)有 26 个; 受精过程(ertilization)有 46 个; 生殖细胞发育(germ cell development)有 63 个。

将 DG 进行 KEGG 功能富集分析, 共富集通路 345 条, 排名前 20 的通路见图 2, 从中筛选出 5 条与睾丸功能相关的富集通路, 共有 52 个差异表达基因, 见表 4, 其中甘油磷脂代谢

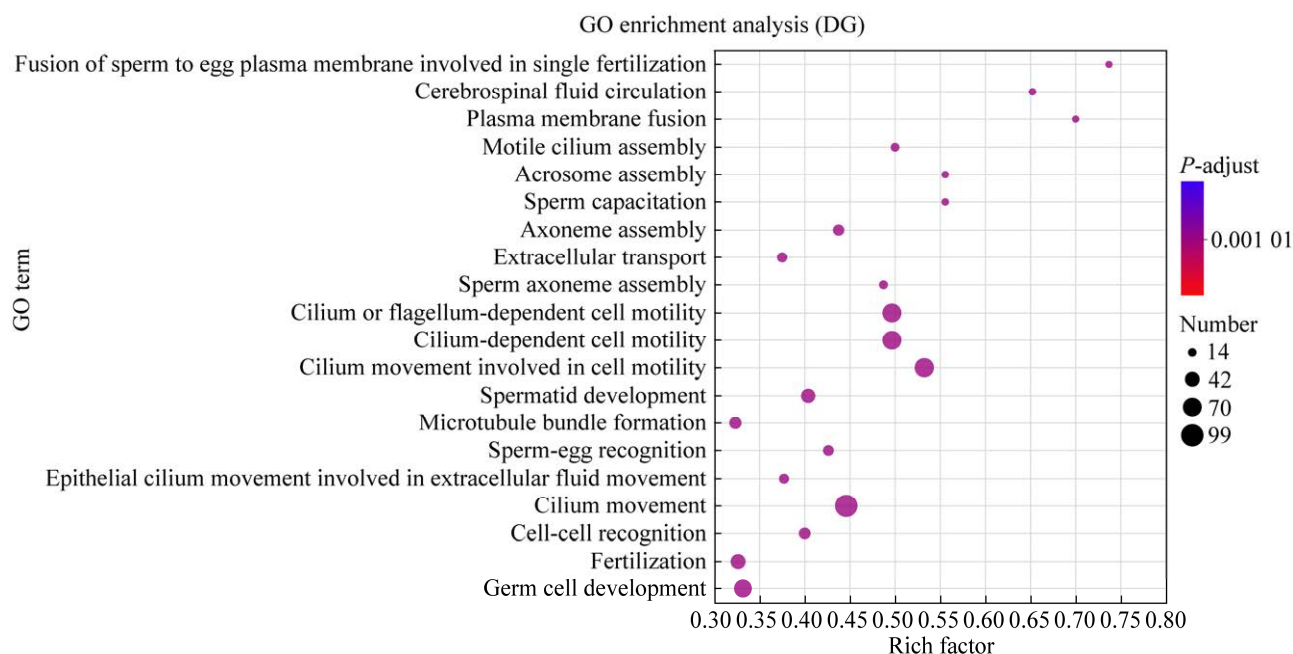


图 1 睾丸差异表达基因 GO 富集分析气泡图

Figure 1 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in testis.

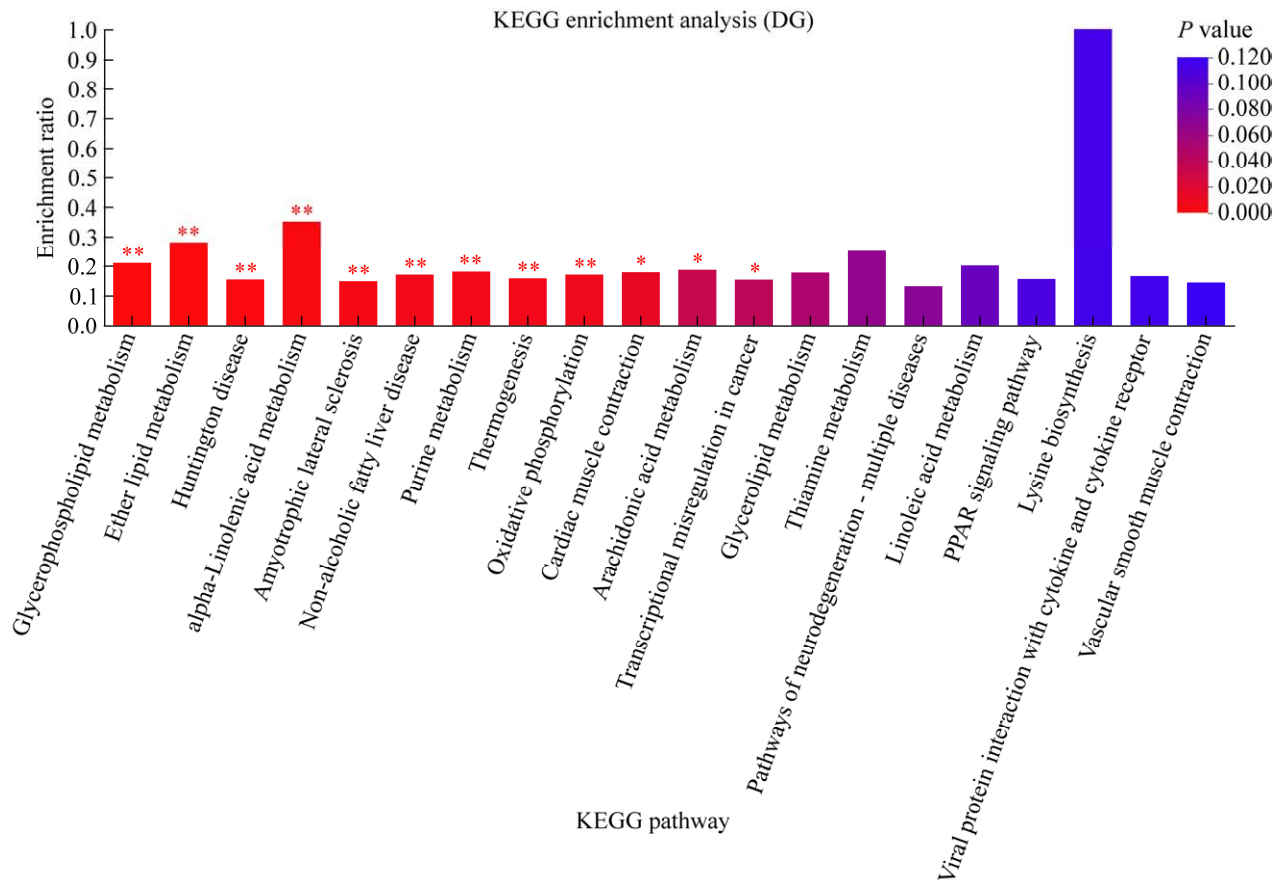


图 2 睾丸差异表达基因 KEGG 富集分析柱形图

Figure 2 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in testis. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

表 4 睾丸功能差异表达基因

Table 4 Differentially expressed genes in testicular function

Description	Database	Branch	ID	Number of unigenes
Fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	GO	BP	GO0007342	14
Acrosome assembly	GO	BP	GO0001675	15
Sperm capacitation	GO	BP	GO0048240	15
Sperm axoneme assembly	GO	BP	GO0007288	19
Spermatid development	GO	BP	GO0007286	42
Sperm-egg recognition	GO	BP	GO0035036	26
Fertilization	GO	BP	GO0009566	46
Germ cell development	GO	BP	GO0007281	63
Glycerophospholipid metabolism	KEGG	PATHWAY	MAP00564	24
Arachidonic acid metabolism	KEGG	PATHWAY	MAP00590	15
Alpha-linolenic acid metabolism	KEGG	PATHWAY	MAP00592	7
Thiamine metabolism	KEGG	PATHWAY	MAP00730	5
Lysine biosynthesis	KEGG	PATHWAY	MAP00300	1

(glycerophospholipid metabolism)中有 24 个, 包括 *Pcyt1*、*Pla2g4e*、*Gpd1l* 和 *Lypla3* 等; 花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)中有 15 个, 包括 *Pla2*、*Ptgds* 和 *Pla2g12a* 等; α -亚麻酸代谢(α -linolenic acid metabolism)中有 7 个, 包括 *Pla2g4a*、*Pla2g2c* 和 *Pla2g6* 等; 硫胺素代谢(thiamine metabolism)中有 5 个, 包括 *Ak5*、*Ak8* 和 *Alpg* 等; 赖氨酸合成(lysine biosynthesis)

中有 1 个: *Aadat*。

2.3 实时荧光定量 PCR 验证

随机选取 6 个基因进行实时荧光定量 PCR 验证, 结果见图 3。*Cyp17a1* 和 *Ldhc* 在睾丸下降期表达量更高, *Gata4*、*Ntn4*、*Plxna1* 和 *Tprgl* 在睾丸正常期表达量更高。六个基因的转录组测序数据见表 5, 其中 *Cyp17a1*、*Gata4*、*Ntn4*、*Plxna1* 和 *Ldhc* 的实时荧光定量 PCR 在睾丸下

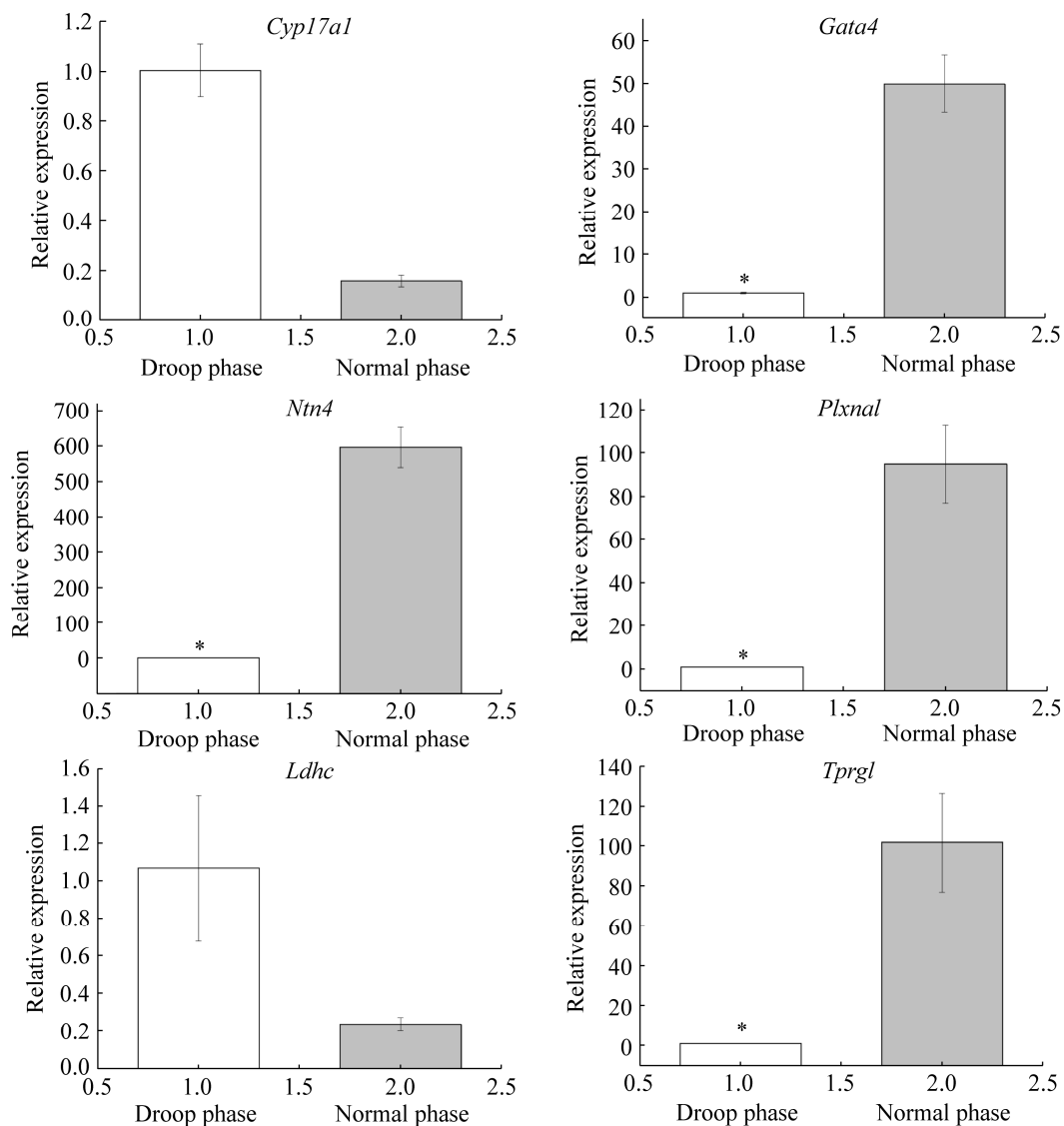


图 3 睾丸下降期与正常期的 6 个随机基因 qRT-PCR 验证

Figure 3 qRT-PCR verification of six random genes in testicular droop phase and normal phase. *: $P < 0.05$.

表 5 睾丸中 6 个基因转录组测序数据

Table 5 Transcriptome sequencing data of six genes in the testis

Gene ID	Gene name	Reference species	Droop phase	Normal phase
TRINITY_DN12713_c0_g2	<i>Cyp17a1</i>	<i>Mastomys coucha</i>	111.61	1.59
TRINITY_DN195_c0_g1	<i>Gata4</i>	<i>Arvicanthis niloticus</i>	3.85	168.63
TRINITY_DN8651_c0_g1	<i>Ntn4</i>	<i>Camelus dromedarius</i>	2.21	183.41
TRINITY_DN840_c0_g1	<i>Plxna1</i>	<i>Grammomys surdaster</i>	1.18	190.79
TRINITY_DN5940_c0_g1	<i>Ldhc</i>	<i>Mus pahari</i>	49.10	4.51
TRINITY_DN33842_c0_g1	<i>Tprgl</i>	<i>Rattus rattus</i>	59.01	115.40

The expression level calculation method for droop phase and normal phase is TPM.

降期和正常期的表达水平与转录组测序结果一致, *Tprgl* 在睾丸下降期和正常期的表达模式与转录组测序结果一致, 但实时定量 PCR 检测的表达量差异显著, 转录组测序差异不显著。

2.4 代谢物分析

基于 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统和上海美吉生物医药科技有限公司构建的数据库, 对春季、夏季和秋季的黑线姬鼠睾丸进行代谢组学分析, 共提取质谱峰 7 351 个, 注释到代谢物 2 649 个, 主要包括脂质和类脂分子(lipids and lipid-like molecules)、有机酸及其衍生物(organic acids and derivatives)、有机杂环化合物(organoheterocyclic compounds)、有机氧化合物(organic oxygen compounds)和苯类化合物(benzenoids)等。

2.5 差异代谢物筛选与分类

对 18 个样品进行主成分分析和相关性热图分析, 主成分分析结果表明所有样本组内聚集性好, 组间离散度高, 相关性热图结果显示样本间代谢物组成和丰度相似度较高。这表明组内重复样本代谢组数据相似度高且组间代谢组数据差异明显。为深入发掘黑线姬鼠睾丸功能相关的关键代谢物, 以 P 值 <0.05 、VIP >1 、FC >1 为条件, 筛选出睾丸下降期(C、X)与正常期(Q)的差异代谢物集(DM)。DM 共有 289 个代谢物, 其中 69 个上调代谢物, 220 个下调代谢

物。通过 HMDB 数据库对 DM 进行分类, 结果见图 4。DM 中占比最多的化合物类别为脂质及类脂分子, 占比 41.20%; 其次为有机酸及其衍生物, 占比 19.85%; 再次为有机氧化物, 占比为 10.86%; 有机杂环化合物, 占比为 10.86%。

2.6 差异代谢物筛选

通过对差异代谢物集 DM 进行 HMDB 分类和 KEGG 富集通路分析发现, 与睾丸功能相关差异代谢物主要存在于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)、 α -亚麻酸代谢、甘油磷脂代谢和花生四烯酸代谢, 相关差异代谢物见表 6, 包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成中的代谢物 3-脱氢奎宁酸(3-dehydroquinic acid)、L-环己烷(L-arogenate)、磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid)和 1,6-二磷酸果糖(fructose 1,6-bisphosphate)等, α -亚麻酸代谢中的代谢物 9-氧代壬酸(9-oxo-nonanoic acid)、 α -亚麻酸(α -linolenic acid)和愈伤酸(tramatic acid)等, 甘油磷脂代谢中的代谢物 1-十七碳酰-甘油-3-磷酸胆碱[PC (17:0/0:0)]、溶血磷脂酰胆碱[PC (22:5/0:0)]和磷酸二羟丙酮(dihydroxyacetone phosphate)等。其中, 1,6-二磷酸果糖、磷酸二羟丙酮和 3-脱氢奎宁酸等 15 种代谢物在睾丸正常期含量较高, 而 L-环己烷等 13 种代谢物在睾丸下降期含量较高, 上述差异代谢物聚类热

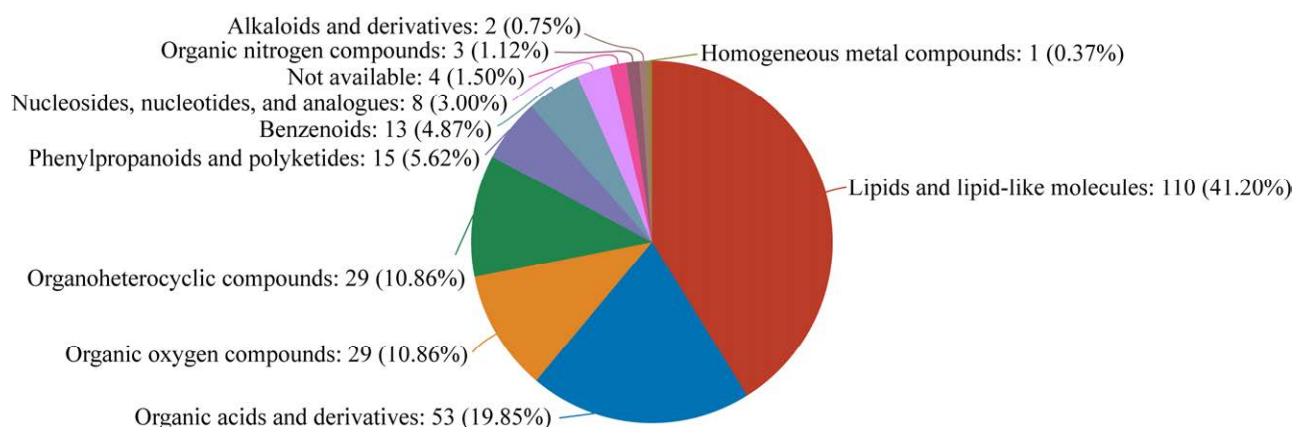


图 4 睾丸差异代谢物 HMDB 化合物分类

Figure 4 Classification of differential metabolites in the testis.

表 6 睾丸差异代谢物

Table 6 Differential metabolites in the testis

No.	Metabolite	KEGG ID	Formula	RSD
1	PC (22:5/0:0)	C04230	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	0.018
2	9-oxo-nonanoic acid	C16322	C ₉ H ₁₆ O ₃	0.035
3	PC (17:0/0:0)	C04230	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	0.030
4	PC (22:6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)/P-18:1 (9Z))	C00157	C ₄₈ H ₈₂ NO ₇ P	0.257
5	LysoPC (17:0/0:0)	C04230	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	0.010
6	PC (18:0/0:0)	C04230	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	0.009
7	LysoPC (22:5 (7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)/0:0)	C04230	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	0.020
8	LysoPC (P-18:0/0:0)	C04230	C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P	0.071
9	LysoPC (20:1 (11Z)/0:0)	C04230	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	0.032
10	GPEtn (16:1/22:5)	C00350	C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P	0.108
11	LysoPC (18:1 (11Z)/0:0)	C04230	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	0.023
12	3-dehydroquinic acid	C00944	C ₇ H ₁₀ O ₆	0.044
13	L-arogenate	C00826	C ₁₀ H ₁₂ NO ₅	0.078
14	LysoPC (20:4 (8Z, 11Z, 14Z, 17Z)/0:0)	C04230	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	0.020
15	Phosphoenolpyruvic acid	C00074	C ₃ H ₅ O ₆ P	0.060
16	LysoPC (16:1 (9Z)/0:0)	C04230	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	0.031
17	Fructose 1,6-bisphosphate	C05378; C00354	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	0.092
18	LysoPC (14:0/0:0)	C04230	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	0.003
19	Alpha-linolenic acid	C06427	C ₁₈ H ₃₀ NO ₂	0.030
20	Dihydroxyacetone phosphate	C00111	C ₃ H ₇ O ₆ P	0.005
21	Traumatic acid	C16308	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	0.014
22	9(S)-HpOTrE	C16321	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	0.021
23	Shikimic acid	C00493	C ₇ H ₁₀ O ₅	0.118
24	Quinic acid	C00296	C ₇ H ₁₂ O ₆	0.015
25	20-hydroxy-leukotriene E4	C03577	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆ S	0.061
26	5-trans-PGE2	C00584	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	0.001
27	5(S)-HETE	C04805	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	0.025
28	15-deoxy-delta-12,14-PGJ2	C14717	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	0.040

图分析见图 5，从中筛选出磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、 α -亚麻酸和磷酸二羟丙酮(glycerone-P)等 4 种代表性差异代谢物，其二级质谱图见图 6。

2.7 转录组和代谢组联合分析

为探究黑线姬鼠下降期和正常期睾丸中基因和代谢物的影响机制，将 DG 与 DM 进行转录组和代谢组联合分析。O2PLS 分析(图 7)表明，

不同样本组内聚集性良好，组间差异明显，转录组和代谢组同一样本关联性较好，表明转录组和代谢组数据较准确，可以进行后续分析。将 DG 与 DM 进行 KEGG 通路富集分析，共发现 4 条在 DM 和 DG 均显著富集的通路。其中甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢和花生四烯酸代谢存在关联且与睾丸功能相关，对这些通路进行综合分析，结果见图 8。图中共富集到 17 种与睾丸功能差异代谢物，包括 9-氧代壬酸、磷

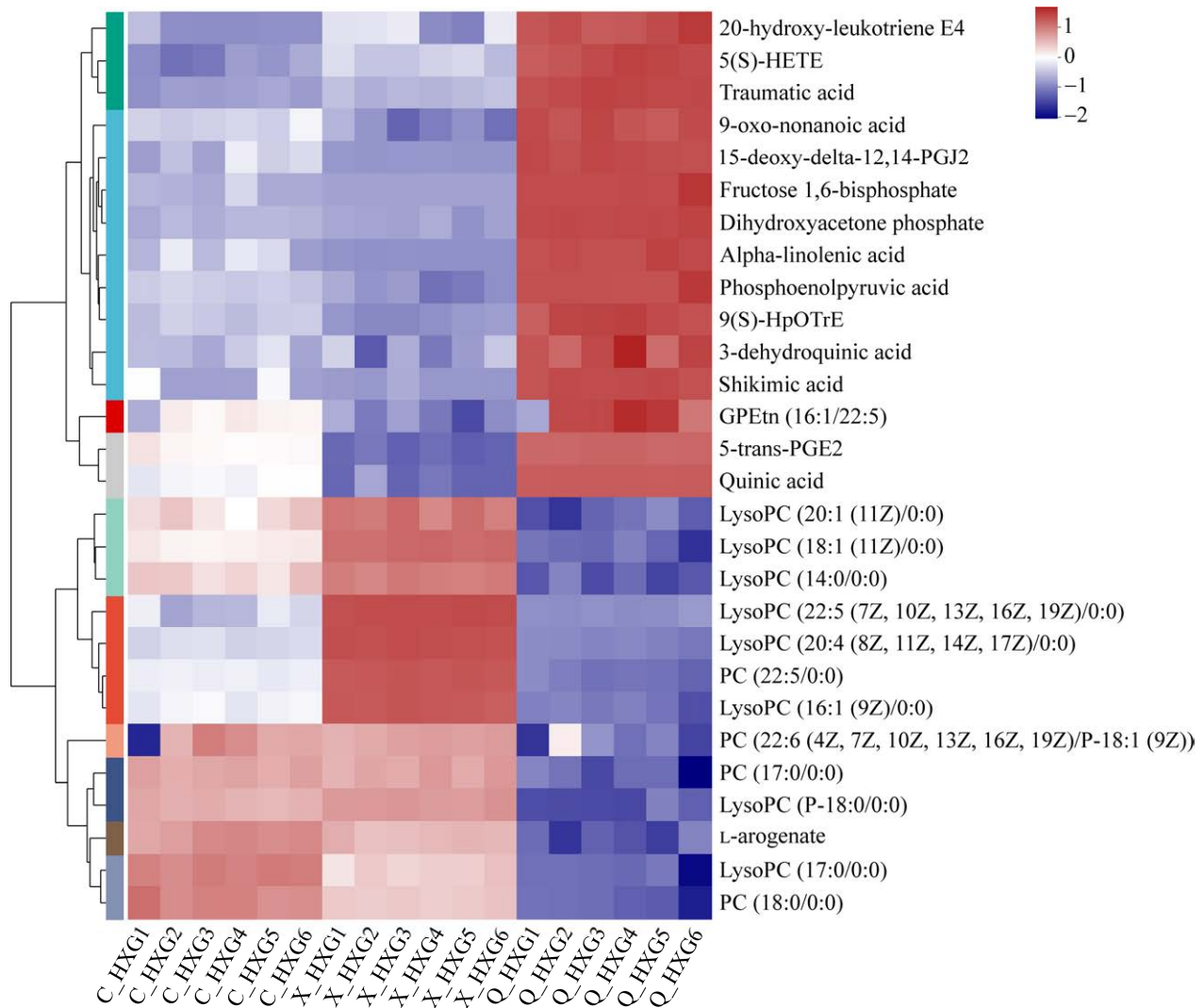


图 5 睾丸差异代谢物热图

Figure 5 Testicular differential metabolite heat map.

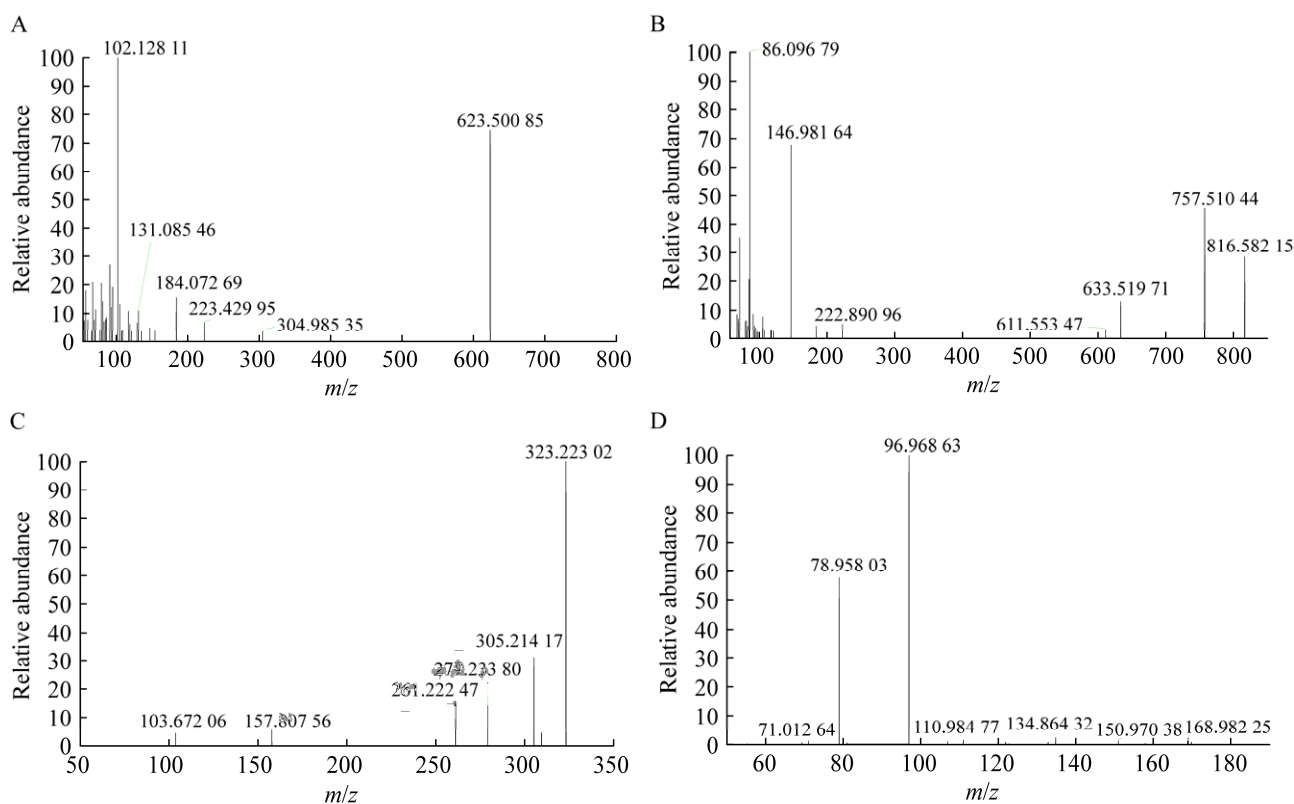


图 6 四种差异代谢物的二级质谱图

Figure 6 Secondary mass spectrometry of four differential metabolites. A: Phosphaticylethanolamine. B: Phosphaticylcholine. C: Alpha-linolenic acid. D: Glycerone-P.

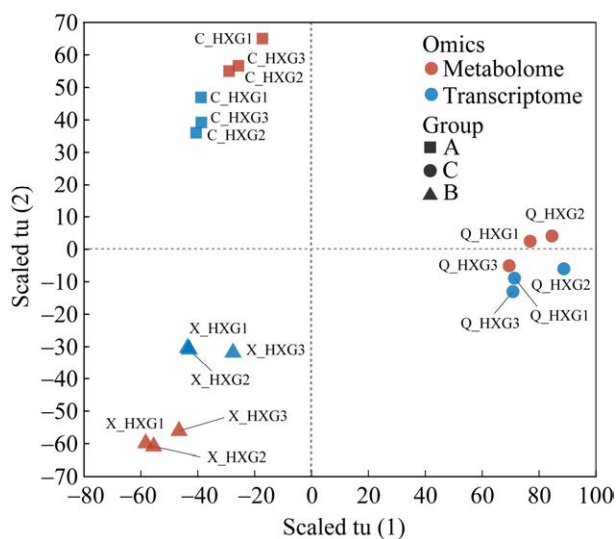


图 7 DG 与 DM 的 O2PLS 分析

Figure 7 O2PLS analysis of DG and DM.

脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷酸二羟丙酮、 α -亚麻酸和 9(S)-过氧羟基十八碳三烯酸等，其中与 1-酰基甘油磷酸胆碱酰(1-acyl-sn-glycerol-3-phosphocholine)功能相似的物质有 11 个。12 个差异表达基因，包括 *Chpt1*、*Cept1*、*Pla2g4*、*Pla2g6*、*Pla2g16*、*Lypla3*、*Plb* (*Plb1*)、*Nte*、*Gpd1*、*Glpa*、*Cyp2j*、*Cyp2c*。通过综合分析发现，相关基因和代谢物在黑线姬鼠下降期和正常期睾丸中变化明显，与代谢物变化趋势相近的差异表达基因如下，在甘油磷脂代谢过程中，磷脂酰乙醇胺在睾丸正常期含量更高，属于 EC 2.7.8.2 的 *Chpt1* 和 *Cept1* 的调控趋势与之一致，1-酰基甘油磷酸胆碱酰(1-acyl-sn-glycerol-3-phosphocholine)在睾丸正常期含量更高，属

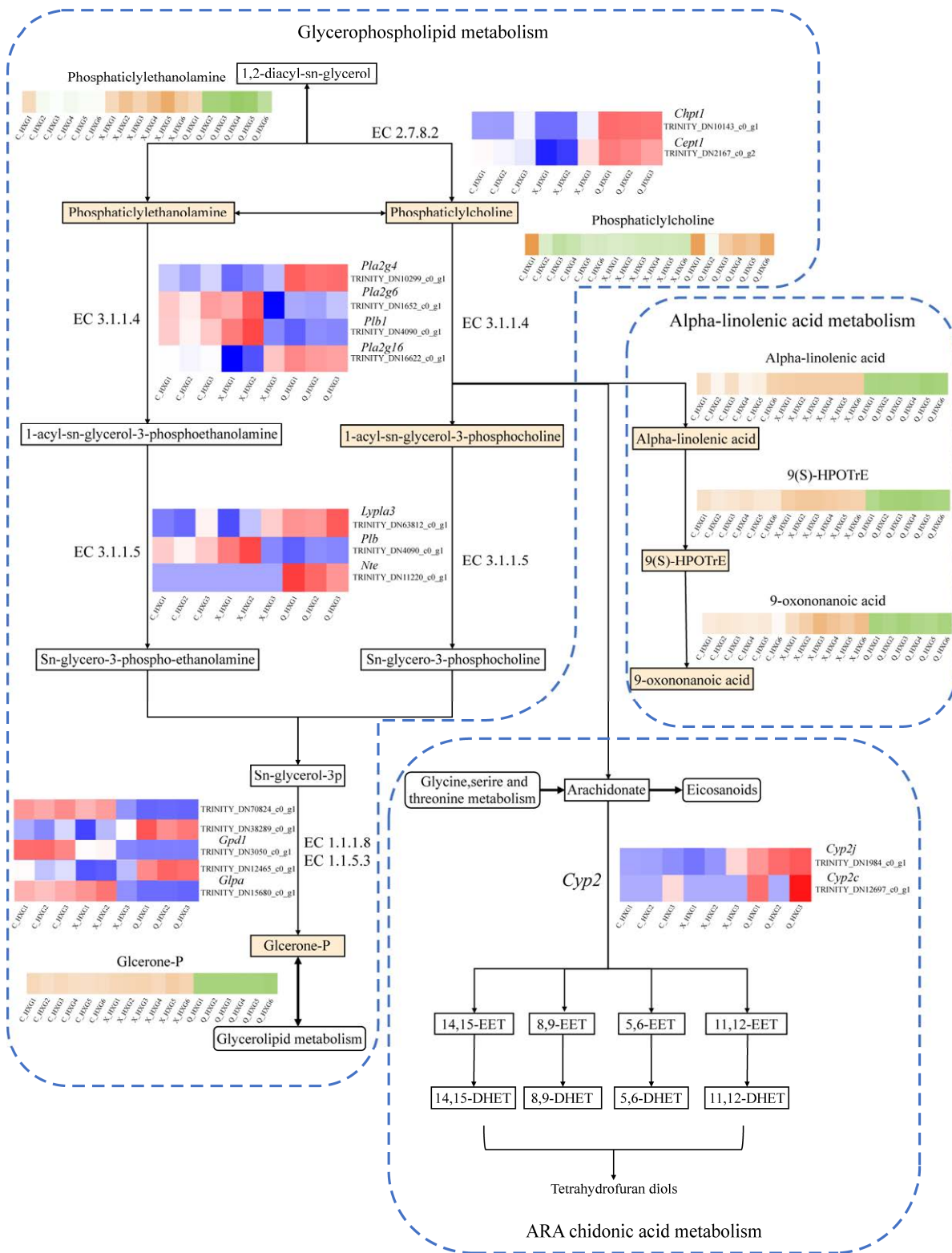


图 8 睾丸功能代谢途径差异分析

Figure 8 Analysis of differences in metabolic pathways of testicular function. The expression/content of red/green is higher than that of blue/yellow in the heat map.

于 EC 3.1.1.4 的 *Pla2g4* 和 *Pla216* 的调控趋势与之一致, 而磷脂酰胆碱在睾丸下降期含量更高, *Pla2g6* 和 *Plb1* 的调控趋势与之一致, 磷酸二羟丙酮在睾丸正常期含量更高, *Gpd1* (TRINITY_DN12465_c0_g1 和 TRINITY_DN38289_c0_g1) 的调控趋势与之相同; 在 α -亚麻酸代谢过程中, α -亚麻酸、9(S)-过氧羟基十八碳三烯酸 [9(S)-HpOTrE] 和 9-氧代壬酸 (9-ox-ononanoic acid) 在睾丸正常期含量更高, 属于 EC 3.1.1.4 的 *Pla2g4* 和 *Pla2g16* 的调控趋势与之一致; 在花生四烯酸代谢过程中, 该分支代谢终产物为四氢呋喃-二醇 (tetrahydrofuran diols, THF-diols), 差异基因 *Cyp2j* 和 *Cyp2c* 在睾丸正常期表达量更高。由此推测, 上述差异表达基因可能是调控黑线姬鼠睾丸下降及功能发生的关键基因。

3 讨论与结论

黑线姬鼠是我国常见的农业有害生物, 截至目前, 关于黑线姬鼠繁殖特征的分子生物学研究相对较少。因此, 本研究通过高通量测序获得黑线姬鼠下降期和正常期睾丸的转录组信息, 从中筛选出差异表达基因集 DG, 进行 GO 和 KEGG 富集分析, GO 富集分析筛选出 8 条通路, 主要与精细胞发育、精子发生、精子获能和精卵识别等睾丸基础功能有关, 240 个差异表达基因, 均是睾丸功能基因, 如 *Spesp1* 可以显著影响精子顶体鞘赤道区域膜的生成, 是精子具备精卵结合能力的关键^[25], *Fabp9* 在包括小鼠在内的哺乳动物睾丸中表达, 可能具有促进精子形成和维持精子受精能力的作用^[26], 而 *Tssk3* 属于睾丸特异性丝氨酸/苏氨酸激酶 (threonine kinase, TSSK) 家族, 缺乏该基因的小鼠精子会发生严重的形态缺陷^[27], 说明其在精子形态维持方面具有重要作用; KEGG 富集分析筛选出 5 条通路, 51 个差异表达基因, 主要与甘油磷脂、 α -亚麻

酸和赖氨酸等精子成分有关。实时荧光定量 PCR 结果表明, 随机选取基因的表达趋势与测序结果一致, 表明转录组数据真实准确。

为了解黑线姬鼠下降期和正常期睾丸在代谢水平的变化情况, 本研究基于非靶向代谢组学技术对黑线姬鼠下降期和正常期睾丸中代谢物进行了检测分析, 从中筛选出差异代谢物集 DM, KEGG 富集分析筛选出 4 条与睾丸功能代谢通路, 28 种代谢物, 其中 3 条代谢通路与转录组的 KEGG 分析相同。进一步对差异表达基因集 DG 和差异代谢物 DM 进行联合分析, 对睾丸功能通路进行基因注释, 共注释到 13 个基因, 涉及代谢物 17 个。磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺是真核细胞中最主要的两种磷脂, 约占总磷脂含量的 50% 和 25%^[28], 是精子的主要成分之一, EC 2.7.8.1 包括 *Chpt1* 和 *Cept1*, 作为甘油磷脂代谢过程中的关键酶, EC 2.7.8.1 可以催化 1,2-二油酰基-sn-甘油 (1,2-dioleoyl-sn-glycerol) 与胞磷胆碱 (CDP-choline) 合成 PC 或者 PE^[29-30], 其中 *Chpt1* 专门合成 PC, *Cept1* 可以合成 PC 和 PE^[28], 本实验中 *Chpt1* 和 *Cept1* 基因呈下调趋势, 与磷脂酰乙醇胺相同, 与磷脂酰胆碱相反, 推测是由于睾丸下降期代谢旺盛, 磷脂酰乙醇胺参与了更多的代谢反应, 作为上游代谢产物被大量消耗, 而磷脂酰胆碱则相对消耗较少; EC 3.1.1.4 催化 PC 和 PE 的次生代谢过程^[31], 是甘油磷脂 sn-2 位置脱酰基的关键酶^[32], 与精子活力和雄性繁殖能力密切相关^[33]。本实验中 *Pla2g4* 和 *Pla2g16* 呈下调趋势, 与 α -亚麻酸趋势相同, *Pla2g6* 和 *Plb* 呈上调趋势, 与 1-酰基甘油磷酸胆碱酰趋势相同, 推测是因为 EC 3.1.1.4 参与了甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢和花生四烯酸代谢等多个代谢反应, 代谢产物较多, 而 *Pla2g4*、*Pla2g6*、*Pla2g16* 和 *Plb1* 虽同属于 EC 3.1.1.4, 但功能已有分化, 比如 *Pla2g4*

可以选择性水解花生四烯酸^[34-35], *Pla2g6* 的功能则体现在膜重塑方面^[36], 因此表达模式存在差异。EC 3.1.1.5 是 1-酰基甘油磷酸胆碱酰和 1-酰基甘油磷酸乙醇胺 (1-acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) 合成 3-磷酸甘油 (Sn-glycero-3phosphocholine, G3P) 过程中的关键酶^[37], 本实验中 *Lypla3* 和 *Plb* 呈上调趋势, *Nte* 呈下调趋势, 推测 *Nte* 可能对 G3P 的合成起负向调控作用; G3P 在 EC 1.1.1.8 和 EC 1.1.5.3 共同催化下转化为磷酸二羟丙酮, 本实验中 *Glpa* 呈上调趋势, *Gpd1* 共注释到 4 个基因, 其中 *TRINITY_DN70824_c0_g1* 和 *TRINITY_DN3050_c0_g1* 上调, *TRINITY_DN38289_c0_g1* 和 *TRINITY_DN12465_c0_g1* 下调, 磷酸二羟丙酮作为糖酵解和甘油代谢的中间产物^[38-39], 是甘油磷脂的前体物质, 在睾丸下降期消耗量更高; α -亚麻酸是精子质膜中的一种磷脂^[40], 也是二十二碳五烯酸(docosapentenoic acid, DPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic Acid, DHA)的前体, 具有调节质膜功能、改善膜完整性和增强精子活力的功能^[41], 而在 α -亚麻酸代谢过程中, PC 在 EC 3.1.1.4 的催化下转化为 α -亚麻酸^[31], 部分 α -亚麻酸转化为 9(S)-过氧羟基十八碳三烯酸和 9-氧代壬酸, 本实验中 3 种次生代谢物均在睾丸下降期消耗量更高, 推测 α -亚麻酸代谢旺盛有利于精子的大量产生; 四氢呋喃二醇 (tetrahydrofurandiols, THF-diols) 是一种雄性内分泌干扰物^[42], 有研究表明四氢呋喃二醇会对生物体内的类固醇激素产生影响, 干扰雄性个体的性行为^[43], 本实验中 *Cyp2* 基因在睾丸正常期表达较高, 表明黑线姬鼠在非繁殖季节可能通过分泌 THF-diols 来抑制繁殖行为。

综上所述, 以上基因、代谢物和信号通路可能是黑线姬鼠睾丸功能发生的关键组成部分, 会在睾丸下降期发生显著变化, 以此提高雄性黑线

姬鼠的繁殖强度。本研究对黑线姬鼠下降期和正常期睾丸进行了转录组学和代谢组学研究, 结合 GO 和 KEGG 数据库挖掘出睾丸下降期与正常期的差异基因和代谢物, 并且对睾丸功能代谢通路进行了基因注释, 从基因及代谢物水平上揭示了黑线姬鼠睾丸下降对其功能的影响机制。研究结果可以为后续黑线姬鼠繁殖学研究、实验动物化及分子生物学研究提供依据, 并为其他野生啮齿动物多组学研究提供参考。

REFERENCES

- [1] 李维贤. 辽宁省林地害鼠调查[J]. 辽宁林业科技, 1985(2): 33-35.
LI WX. Investigation on rodents in woodlands of Liaoning Province[J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 1985(2): 33-35 (in Chinese).
- [2] 李天保. 济源市王屋山地区林栖鼠类食性分析[J]. 现代农业科技, 2020(20): 83-85, 88.
LI TB. Dietary analysis of forest rodents in Wangwu Mountain area of Jiyuan City[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(20): 83-85, 88 (in Chinese).
- [3] 孙佼. 黑线姬鼠岛屿与大陆种群形态及遗传变异研究[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2020.
SUN J. Study on morphology and genetic variation of *Apodemus agrarius* populations on islands and continent[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2020 (in Chinese).
- [4] 秦萌, 郭永旺. 2023 年全国农区鼠害发生趋势预报[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(1): 36-39.
QIN M, GUO YW. Trend forecast of rodent infestation in rural areas of China in 2023[J]. China Plant Protection, 2023, 43(1): 36-39 (in Chinese).
- [5] LEE HW, LEE PW, JOHNSON KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1978, 137(3): 298-308.
- [6] BORCIĆ B, KOVACIĆ H, SEBEK Z, ALERAJ B, TVRTKOVIĆ N. Small terrestrial mammals as reservoirs of leptospires in the Sava Valley (Croatia)[J]. Folia Parasitologica, 1982, 29(2): 177-182.
- [7] 周培盛, 柯常禄, 陈龙, 李国祥, 黄佳亮. 洞庭湖区两种鼠自然感染日本血吸虫的调查研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1996, 7(2): 161.
ZHOU PS, KE CL, CHEN L, LI GX, HUANG JL. Investigation on natural infection of *Schistosoma*

- japonicum* in two kinds of mice in Dongting Lake area[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 1996, 7(2): 161 (in Chinese).
- [8] 李梅, 徐加林, 尹文书, 敖成红, 宋致书. 黑线姬鼠肥满度变化规律研究[J]. 现代农业科技, 2023(14): 86-89. LI M, XU JL, YIN WS, AO CH, SONG ZS. Study on the change rule of relative fatness of *Apodemus agrarius*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2023(14): 86-89 (in Chinese).
- [9] 罗泽珣. 大兴安岭及三江平原黑线姬鼠的种群年龄组成[J]. 动物学报, 1963, 15(3): 382-396. LUO ZX. Age distribution of the striped field mouse populations in the Ta-khingan Moutains and Sankiang Plains of northeastern China[J]. Acta Zoologica Sinica, 1963, 15(3): 382-396 (in Chinese).
- [10] 刘堂仁, 陆洪清, 郭学俭. 江西省鄱阳湖地区黑线姬鼠的生物学研究[J]. 江西植保, 1983(1): 35-37. LIU RT, LU HQ, GUO XJ. Biological research on *Apodemus agrarius* in the Poyang Lake area of Jiangxi Province[J]. Jiangxi Plant Protection, 1983(1): 35-37 (in Chinese).
- [11] 张洁. 北京地区黑线姬鼠种群年龄和繁殖的研究[J]. 兽类学报, 1989, 9(1): 41-48. ZHANG J. On the population age and reproduction of *Apodemus agrarius* in Beijing area[J]. Acta Theriologica Sinica, 1989, 9(1): 41-48 (in Chinese).
- [12] 叶正襄, 汪笃栋, 龙丘陵, 杨定生, 许云飞, 衷尔钧, 黄小平. 安义农区黑线姬鼠种群繁殖生态研究[J]. 江西农业学报, 1990, 2(2): 63-69. YE ZX, WANG DD, LONG QL, YANG DS, XU YF, ZHONG EJ, HUANG XP. Studies on the population reproduction ecology of *Apodemus agrarius* in Anyi, northern Jiangxi[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 1990, 2(2): 63-69 (in Chinese).
- [13] 孙儒泳, 张玉书, 方喜叶. 啮齿类繁殖生态研究中雄性繁殖强度的意义[J]. 动物学报, 1977, 23(2): 187-200. SUN RY, ZHANG YS, FANG XY. On the role of male reproductive intensity in the ecological studies of the rodent reproduction[J]. Acta Zoologica Sinica, 1977, 23(2): 187-200 (in Chinese).
- [14] KUWAHARA S, MIZUKAMI T, OMURA M, HAGIHARA M, IINUMA Y, SHIMIZU Y, TAMADA H, TSUKAMOTO Y, NISHIDA T, SASAKI F. Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-testes axis of the Japanese wood mouse (*Apodemus speciosus*)[J]. The Anatomical Record, 2000, 260(4): 366-372.
- [15] 何佳凝, 张琛, 杨桂燕, 徐正刚, 张美文, 王勇, 李波, 周训军, 黄华南. 洞庭湖区域黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)种群迁入湖滩后的繁殖特征[J]. 湖泊科学, 2023, 35(6): 2101-2111. HE JN, ZHANG C, YANG GY, XU ZG, ZHANG MW, WANG Y, LI B, ZHOU XJ, HUANG HN. The reproductive status of *Apodemus agrarius* populations inhabiting the lake beach in Lake Dongting area after Three Gorges Project[J]. Journal of Lake Sciences, 2023, 35(6): 2101-2111 (in Chinese).
- [16] van EVERY HA, SCHMIDT CJ. Transcriptomic and metabolomic characterization of post-hatch metabolic reprogramming during hepatic development in the chicken[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 380.
- [17] ZENG Z, LI M, JIANG ZF, LAN YX, CHEN L, CHEN YJ, LI HL, HUI JW, ZHANG LJ, HU X, XIA HC. Integrated transcriptomic and metabolomic profiling reveals dysregulation of purine metabolism during the acute phase of spinal cord injury in rats[J]. Frontiers in Neuroscience, 2022, 16: 1066528.
- [18] WU H, GAO JW, XIE ZG, XIE M, SONG R, YUAN XP, WU YA, OU DS. Effect of chronic deltamethrin exposure on brain transcriptome and metabolome of juvenile crucian carp[J]. Environmental Toxicology, 2024, 39(3): 1544-1555.
- [19] SMITH-UNNA R, BOURSNELL C, PATRO R, HIBBERD JM, KELLY S. TransRate: reference-free quality assessment of *de novo* transcriptome assemblies[J]. Genome Research, 2016, 26(8): 1134-1144.
- [20] LI WZ, GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [21] SIMÃO FA, WATERHOUSE RM, IOANNIDIS P, KRIVENTSEVA EV, ZDOBNOV EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs[J]. Bioinformatics, 2015, 31(19): 3210-3212.
- [22] LI B, DEWEY CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.
- [23] CONESA A, MADRIGAL P, TARAZONA S, GOMEZ-CABRERO D, CERVERA A, McPHERSON A, SZCZEŚNIAK MW, GAFFNEY DJ, ELO LL, ZHANG XG, MORTAZAVI A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis[J]. Genome Biology, 2016, 17: 13.
- [24] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.

- [25] FUJIHARA Y, MURAKAMI M, INOUE N, SATOUH Y, KASEDA K, IKAWA M, OKABE M. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse[J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 123(Pt 9): 1531-1536.
- [26] MORADI A, FOROOTAN FS, HOSSEINI M, POURESMAEILI F. Leydig cells express the FABP9 in human testis[J]. *Human Antibodies*, 2019, 27(4): 275-278.
- [27] NAYYAB S, GERVASI MG, TOURZANI DA, CARABALLO DA, JHA KN, TEVES ME, CUI W, GEORG GI, VISCONTI PE, SALICIONI AM. TSSK3, a novel target for male contraception, is required for spermiogenesis[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2021, 88(11): 718-730.
- [28] HENNEBERRY AL, WRIGHT MM, McMASTER CR. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 13(9): 3148-3161.
- [29] COLEMAN R, BELL RM. Phospholipid synthesis in isolated fat cells. Studies of microsomal diacylglycerol cholinephosphotransferase and diacylglycerol ethanolaminophosphotransferase activities[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252(9): 3050-3056.
- [30] LEE TC, BLANK ML, FITZGERALD V, SNYDER F. Formation of alkylacyl- and diacylglycerophosphocholines via diradylglycerol cholinephosphotransferase in rat liver[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982, 713(2): 479-483.
- [31] VENUTI E, SHISHMAREV D, KUCHEL PW, DUTT S, BLUMENTHAL CS, GASKIN KJ. Bile salt stimulated lipase: inhibition by phospholipids and relief by phospholipase A₂[J]. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2017, 16(6): 763-770.
- [32] SHIMIZU T, OHTO T, KITA Y. Cytosolic phospholipase A₂: biochemical properties and physiological roles[J]. *IUBMB Life*, 2006, 58(5/6): 328-333.
- [33] ANFUSO CD, OLIVIERI M, BELLANCA S, SALMERI M, MOTTA C, SCALIA M, SATRIANO C, La VIGNERA S, BURRELLO N, CAPORARELLO N, LUPO G, CALOGERO AE. Asthenozoospermia and membrane remodeling enzymes: a new role for phospholipase A₂[J]. *Andrology*, 2015, 3(6): 1173-1182.
- [34] LESLIE CC. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A₂[J]. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 2004, 70(4): 373-376.
- [35] GHOSH M, LOPER R, GELB MH, LESLIE CC. Identification of the expressed form of human cytosolic phospholipase A₂β (cPLA₂β): cPLA₂β3 is a novel variant localized to mitochondria and early endosomes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(24): 16615-16624.
- [36] BALSINDE J, DENNIS EA. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(26): 16069-16072.
- [37] DOI Y. Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(13): 5079-5093.
- [38] HOXHAIJ G, LOCASALE JW, BEN-SAHRA I. A spoonful of DHAP keeps mTORC1 running on sugars[J]. *Nature Metabolism*, 2020, 2: 801-802.
- [39] HE QH, TOH JD, ERO R, QIAO Z, KUMAR V, SERRA A, TAN J, SZE SK, GAO YG. The unusual di-domain structure of *Dunaliella salina* glycerol-3-phosphate dehydrogenase enables direct conversion of dihydroxyacetone phosphate to glycerol[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2020, 102(1): 153-164.
- [40] LEE WH, KIM WH, CHEONG HT, YANG BK, PARK CK. Effect of alpha-linolenic acid with bovine serum albumin or methyl-beta-cyclodextrin on membrane integrity and oxidative stress of frozen-thawed boar sperm[J]. *Development & Reproduction*, 2019, 23(1): 11-19.
- [41] SAFARINEJAD MR, HOSSEINI SY, DADKHAH F, ASGARI MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men[J]. *Clinical Nutrition*, 2010, 29(1): 100-105.
- [42] MARKAVERICH BM, ALEJANDRO M, THOMPSON T, MANI SL, REYNA A, PORTILLO W, SHARP J, TURK J, CROWLEY JR. Tetrahydrofurandiols (THF-diols), leukotoxindiols (LTX-diols), and endocrine disruption in rats[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(5): 702-708.
- [43] MANI SK, REYNA AM, ALEJANDRO MA, CROWLEY J, MARKAVERICH BM. Disruption of male sexual behavior in rats by tetrahydrofurandiols (THF-diols)[J]. *Steroids*, 2005, 70(11): 750-754.

(本文责编 陈宏宇)