

不同海拔藏绵羊附睾各区段组织形态及精子成熟相关基因的表达

张雅茹 尉斌艳 姚博元 李伊建 王欣荣*

甘肃农业大学动物科学技术学院 兰州 730070

摘要: 本文旨在探讨藏绵羊 (*Ovis arise*) 附睾对高原环境的适应性机理。采集海拔约 3 500 m 的青海省海晏县和海拔约 2 300 m 的青海省循化县两个海拔的藏绵羊附睾组织, 通过附睾精子提取、石蜡组织切片、荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹和免疫组化方法, 对藏绵羊附睾尾的精液品质、附睾组织学特征及影响精子成熟的基因 *PRDX2*、*STAR* 和 *GALNTL5* 的表达与分布进行比较研究。结果显示, 高海拔藏绵羊附睾中精液品质略有降低, 但均符合受精标准; 高海拔藏绵羊的附睾管腔内径较小, 附睾尾的柱状上皮较厚; *PRDX2* 蛋白在高海拔藏绵羊中的表达量下调, 且主要定位于附睾管的上皮细胞; *STAR* 蛋白在高海拔藏绵羊中的表达量上调, 且主要定位于附睾管上皮细胞的主细胞中; *GALNTL5* 蛋白在高海拔藏绵羊中的表达量上调, 且其主要定位于附睾主细胞和基细胞中。本研究认为, 不同海拔藏绵羊附睾组织学特征和精液品质的差异可能是对不同高寒低氧环境的适应性改变。推测 *PRDX2* 蛋白的表达特征可能是低氧环境下附睾内环境中氧含量降低所致, *STAR* 蛋白可调控合成更多雄激素来维持高海拔低氧环境下附睾管腔内环境的稳定, 而 *GALNTL5* 蛋白能够在高寒低氧环境下通过调节合成更多糖蛋白来维持附睾中精子的成熟。

关键词: 藏绵羊; 高海拔; 低氧; 精子; 附睾; 组织学; 基因表达

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 04-584-13

Tissue Morphology and Expression of Genes Related to Sperm Maturation in Epididymis of Tibetan Sheep at Different Altitudes

ZHANG Ya-Ru YU Bin-Yan YAO Bo-Yuan LI Yi-Jian WANG Xin-Rong*

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: [Objectives] This article aims to explore the adaptive mechanism of Tibetan Sheep *Ovis arise* epididymis in high-altitude environments. **[Methods]** The epididymal tissue and semen samples were collected from Tibetan Sheep in Haiyan County (at an altitude of approximately 3 500 m) and Xunhua County (at an altitude of approximately 2 300 m) in Qinghai Province. Sperm extraction, paraffin embedding and

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32160792);

* 通讯作者, E-mail: wangxr@gsau.edu.cn;

第一作者介绍 张雅茹, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传育种与繁殖; E-mail: 3369941973@qq.com.

收稿日期: 2024-10-09, 修回日期: 2025-01-24 DOI: 10.13859/j.cjz.202524224 CSTR: 32109.14.cjz.24224

tissue sectioning, fluorescence quantitative PCR, Western blotting, and immunohistochemistry were employed to compare semen quality, epididymal histology, and expression and distribution of sperm maturation-associated genes *PRDX2*, *STAR*, and *GALNTL5*. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was adopted to calculate the relative mRNA level, and Western blot results were analyzed by Image J. The data were analyzed in SPSS 25.0. Independent sample *t*-test was performed to compare gene and protein expression levels between two altitudes, and one-way analysis of variance and multiple comparisons were performed among three different tissues. The results are expressed as mean $\pm$ SD. $P < 0.05$ indicates a significant difference. **[Results]** The semen quality of high-altitude Tibetan Sheep slightly decreased, while meeting the fertilization criteria (Table 3). High-altitude Tibetan Sheep had a smaller inner diameter of the lumen and thicker columnar epithelium at the tail of the epididymis (Table 4). *PRDX2* was mainly expressed in epididymal epithelial cells, and its expression level was down-regulated in the epididymis of high-altitude Tibetan Sheep. *STAR* mainly existed in the principal cells of the epididymal epithelium, with up-regulated expression in the epididymis of high-altitude Tibetan Sheep. *GALNTL5* was mainly located in the main and basal cells of the epididymis, and its expression level in the epididymis was up-regulated in high-altitude Tibetan Sheep (Figs. 2 - 4). **[Conclusion]** The differences in histology of epididymal tissue and semen quality between Tibetan Sheep at different altitudes are adaptive changes to high-altitude and low-oxygen environments. The down-regulated expression of *PRDX2* as an antioxidant for sperm in the epididymis of high-altitude Tibetan Sheep is hypothesized to be due to the decrease in oxygen content in the epididymal environment under low-oxygen conditions. The upregulated expression of *STAR* in the epididymis of high-altitude Tibetan Sheep indicates that this protein promotes the synthesis of androgens to maintain the stability of the epididymal lumen environment under high-altitude and low-oxygen conditions. *GALNTL5* as a starting enzyme for catalyzing the synthesis of glycoproteins is upregulated in the epididymis of high-altitude Tibetan Sheep, indicating that this protein promotes the synthesis of glycoproteins in the high-altitude and low-oxygen environment to maintain sperm maturation in the epididymis.

Key words: Tibetan Sheep; High altitude; Low oxygen; Sperm; Epididymis; Histology; Gene expression

藏绵羊 (*Ovis aries*) 主要分布在西藏和青海地区, 是中国三大粗毛绵羊品种之一, 也是我国存栏量最大的绵羊品种, 具有耐干旱、耐高寒、耐粗饲的特性 (毛学荣 2005, 石红梅等 2011)。但其繁殖性能低, 藏绵羊公羊 1 岁左右性成熟, 2 岁开始投入配种, 一年繁殖一次, 多为单羔 (许正林 2009, 逯来章等 2012)。为了应对繁殖力低的问题, 有学者提出了一些提高藏绵羊生产力的方法。其中, 藏绵羊的优良精液是确保雌性藏绵羊受精成功的重要前提之一 (王霄悦 2023)。附睾是精子最后成熟的场所, 精子发生后, 未成熟的精子经过附睾一系列生化修饰获得运动能力和受精能力 (Chen

2021)。附睾在功能和结构上分为头、体和尾 3 部分, 精子细胞经附睾 3 个区段独特的管腔环境相互作用后逐渐成熟。附睾头部与体部分别执行早期和晚期精子成熟活动, 而尾部则是精子最后成熟及功能性精子的主要储存位置 (James et al. 2020)。

高寒、低氧环境对雄性动物生殖系统有负面影响, 研究表明, 其能通过下丘脑-垂体-性腺轴产生抑制作用, 影响性激素水平, 干扰生殖系统的正常运作 (Barati et al. 2020)。此外, 高寒、低氧环境通过诱发线粒体损伤和氧化应激影响生殖系统健康。线粒体对生殖细胞的能量供应至关重要, 在高原低氧环境下, 线粒体

形态和功能受损、线粒体酶活性降低会影响精子的生成、成熟和能量供应(李勃深等 2023)。过氧化物酶(peroxiredoxin)家族最初是在酵母中发现,包括6个成员,分别是过氧化物还原酶1(PRDX1)至过氧化物还原酶6(PRDX6)(Scarlati et al. 2020, Wu et al. 2022)。其中过氧化物还原酶2(PRDX2)是6个PRDX因子中恢复抗氧化功能最快的(Neumann et al. 2007)。PRDX2与细胞内环境的氧化平衡密切相关,能通过清除过量的活性氧维持细胞的正常发育(Duan et al. 2016)。类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, STAR)是在小鼠(*Mus musculus*)睾丸的间质细胞内纯化得到的一种新型线粒体蛋白(Clark et al. 1995)。研究发现,STAR可以调节类固醇的合成,对睾酮的生物合成和雄性生殖力维持以及精子成熟起到至关重要的作用(Manna et al. 2005, 蒋雨婷等 2024)。Takasaki等(2014)发现了聚糖基转移酶样蛋白5(polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like protein 5, GALNTL5)并将其归类为PP-GalNac-T家族的一员,PP-GalNac-T家族作为催化合成糖蛋白的起始酶,在动物机体中扮演重要角色。已有研究表明,GALNTL5在小鼠(Takasaki et al. 2014)、人(*Homo sapiens*)(Takasaki et al. 2014)、牛(*Bos taurus*)(Li et al. 2016)及湖羊(*O. aries*)(Yao et al. 2017)的睾丸中表达。对湖羊的研究发现,性成熟后GALNTL5基因在附睾的表达量显著高于性成熟前,提示其在精子成熟过程中起重要作用(姚晓磊等 2019)。此外,Takasaki等(2014)发现,GALNTL5突变小鼠由于形成不成熟或不动的精子而表现出不育,这表明GALNTL5对于产生功能成熟的精子和正常受精是必不可少的。本研究通过对比3500 m和2300 m两个海拔藏绵羊附睾精液品质、附睾组织形态及PRDX2、STAR和GALNTL5的表达与分布,探讨藏绵羊附睾适应高原低氧环境的生理特征,为深入研究高原哺乳动物的生殖生理及其高原适应性机制提供

参考。

1 材料与方法

1.1 动物及样品采集

本研究分别选取青海省海北州海晏县(海拔约3500 m,高海拔)和青海省海东市循化县(海拔约2300 m,低海拔)1岁左右、健康状况良好的雄性藏绵羊各5只,屠宰后采集双侧附睾组织样品。一侧附睾用无菌剪刀将头、体和尾分离,其中一部分置于冻存管中保存,后转入实验室-80℃冰箱保存,另一部分则用磷酸盐缓冲液冲洗后固定于4%多聚甲醛溶液中备用。另一侧附睾尾剪碎至培养皿中后放入37℃的水浴锅10 min取出。用镊子挤压附睾组织块,挤出精子并现场测定相关品质参数。

1.2 精液品质的测定

测定藏绵羊附睾尾的精液品质指标包括精子活力、呼吸强度、活精子百分率、畸形率及顶体完整率。

精子活力:将附睾原精液与生理盐水1:5稀释后混匀,在显微镜下观察精子直线运动情况,观察5个视野,每个视野精子数量不少于100,计算沿直线运动的精子数占观察视野总精子数的百分比。**呼吸强度:**用美蓝褪色法测定,取美蓝溶液(北京索莱宝科技有限公司,北京)与原精液各一滴于载玻片混匀后吸入到两段毛细管中2~3 cm,一段置于37℃条件下,另一段置于10℃条件下,比较观察美蓝褪色所需时间。**活精子百分率:**用伊红-苯胺黑染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,北京),取洁净的小试管滴加精液10 μl和等量伊红染液混匀后静置15 s,滴加苯胺黑染液混匀后静置30 s,取上述精液-伊红-苯胺黑染色液10 μl于载玻片上制成抹片观察,活精子不着色,死精子为红色,计数200个精子计算不着色精子百分率。**畸形率:**用苏木精-伊红染色法计数,制备精子抹片,固定后,浸入苏木精染液中5 min,紧接着浸入伊红染液中2 min,水洗后风干,在显微镜下计数200个精子,计算畸形精子的百

分率。精子顶体完整率：用姬姆萨染色法，将风干固定好的精子抹片置于染色架上，取姬姆萨染液（北京索莱宝科技有限公司，北京）2 ml 均匀铺满抹片 1.5 h 后水洗，最后在 1 000 倍油镜下观察，精子顶体呈紫色，计数 200 个精子计算顶体完整率。以上每只羊的精液作为一个样本，测量均重复 3 次。

1.3 切片制作

取 1 cm × 2 cm × 2 cm 的附睾组织块，经水洗、梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，切片脱蜡至水后用苏木精染色，1%盐酸分化，水洗后依次用不同浓度的乙醇（50%、70%、80%、95%、100%）脱水，再经伊红染色，无水乙醇、二甲苯中透明，最后用中性树脂胶封片。

1.4 附睾组织 RNA 提取

使用 Trizol RNA 提取试剂盒（玉博生物公司，上海）提取附睾总 RNA，用 NanoDrop 2 000 超微分光光度计（Thermo Fisher，美国）检测 RNA 的浓度和纯度，最后利用反转录试剂盒（艾科瑞生物公司，湖南）将 RNA 样品反转录为 cDNA，于 - 20 ℃保存。

1.5 引物的设计与合成

根据 NCBI 数据库中绵羊相关基因序列，使用 Primer Premier 6.0 软件设计引物（表 1），引物序列由西安擎科生物公司合成。

1.6 实时荧光定量 PCR

按照实时荧光定量 PCR 试剂盒（艾科瑞生物公司，湖南）说明书进行。反应体系包括：

上下游引物各 0.4 μl（10 μmol/L），2 × qPCR 预混液 10 μl，cDNA 2 μl（200 mg/L），ddH₂O 7.2 μl，共 20 μl。反应条件为：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 30 s，最后在 72 ℃延伸 10 s，共 35 个循环。根据循环阈值（Ct），采用相对定量分析（2^{-ΔΔCt}）法计算目的基因的相对表达量。

1.7 Western blot 检测

用液氮研磨附睾头、体和尾组织后加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液（索莱宝生物公司，北京）提取总蛋白，用 BCA 蛋白定量试剂盒（康为世纪生物科技有限公司，货号 CW0014）测定蛋白浓度。加入 5 × SDS 上样缓冲液，100 ℃煮沸 10 min 充分蛋白变性，并用 12% SDS-PAGE 电泳分离，随后转至 PVDF 膜，用 5%的脱脂奶粉室温封闭转印有蛋白的 PVDF 膜 2 h，加入一抗，STAR 抗体（货号 12225-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）稀释比 1：1 500，PRDX2 抗体（货号 10545-2-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）抗体稀释比 1：6 000，GALNTL5 抗体（货号 17131-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）稀释比 1：800，4 ℃孵育 10 h，加入山羊抗兔 IgG 二抗（稀释比 1：5 000；Signalway Antibody，货号 L3012）室温孵育 1 h，用 PBST 洗膜后加入 ECL 发光液（中实基因科技有限公司）曝光显影。

1.8 免疫组化检测

附睾组织石蜡切片常规脱蜡、梯度乙醇分化、高压修复抗原，一抗 STAR 抗体（货号

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5' - 3')	退火温度 (°C) Annealing temperature	产物长度 Product length (bp)
PRDX2	F: ACGCCATAATCACTGGACAAC R: ACCCGCTGGACTTTACCTT	60	223
STAR	F: GCCACACTCTACGAGGAGATGC R: CTGCGAGAGGACCTGATTGATGATG	60	180
GALNTL5	F: TGGCCCTCACTCCACAGTAT R: ATCCTTGCTCGAATCAGCCC	60	145
β-actin	F: GCAGATGTGGATCAGCAAGC R: TCTCGTTTTCTGCGCAAGTT	60	133

12225-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司) 稀释比 1 : 400, PRDX2 抗体 (货号 10545-2-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司) 稀释比 1 : 400, GALNTL5 抗体 (货号 17131-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司) 稀释比 1 : 400, 4 °C 孵育过夜, HPR 标记的山羊抗兔二抗 IgG (稀释比 1 : 200, Servicebio, 货号 GB23303) 37 °C 孵育 30 min, 加入链霉亲和素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin-peroxidase complex, SABC, 稀释比 1 : 100, 武汉博士德生物工程有限公司) 温室孵育 30 min, DAB 显色剂 (赛默飞世尔科技) 显色, Mayer 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片。

1.9 数据统计与分析

精液品质数据用 Excel 整理, 组织切片数据用 Imaje J 软件测量, 然后均用 Excel 整理, 用 SPSS 25.0 进行独立样本 *t* 检验。mRNA 的相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 计算, Western blot 表达条带也用 Imaje J 分析灰度曲线。结果用 SPSS 25.0 统计, 基因和蛋白的表达量在两个海拔间数据检验正态分布及方差齐性, 均符合, 后采用独立样本 *t* 检验, 在 3 种组织间数据正态分布及方差齐性检验均符合后, 采用单因素方差分析及多重比较。结果以平均值 ± 标准差表

示, *P* < 0.05 表示差异显著。

2 结果

2.1 两海拔藏绵羊体质量

将藏绵羊停食 24 h 但不停水, 在宰杀前依次用台秤称量体质量, 并记录数据 (表 2)。

2.2 两海拔藏绵羊精液品质分析

低海拔 (2 300 m) 藏绵羊精子活力显著高于高海拔藏绵羊 (*P* < 0.05), 而呼吸强度、活精子百分率、畸形率和顶体完整率两海拔藏绵羊差异不显著 (*P* > 0.05) (表 3)。

2.3 两海拔藏绵羊附睾组织学比较

高低海拔藏绵羊附睾各区段的组织结构相似, 附睾管壁主要由主细胞、基细胞和管周肌细胞组成 (图 1)。主细胞呈高柱状分布, 管周肌样细胞核呈长梭形围绕于附睾管固有膜外周, 基细胞呈单层分布于附睾管固有膜最低部, 附睾管最外层有血管围绕。附睾尾腔面存在大量成熟精子。

两个海拔藏绵羊附睾尾的管腔内径和外径最大, 附睾头、附睾体、附睾尾管腔内径依次增大, 而管腔外径无此变化规律 (表 4)。附睾头的柱状上皮最厚。附睾头和附睾体中的静纤毛比附睾尾的长。高海拔藏绵羊附睾头、附睾

表 2 两海拔藏绵羊体质量

Table 2 Body weights of Tibetan Sheep at two altitudes

	藏绵羊 <i>Ovis arise</i>					平均值 ± 标准差 Mean ± SD
	1	2	3	4	5	
高海拔组 High-altitude group (kg)	47	53	46	53	49	49.6 ± 2.94
低海拔组 Low-altitude group (kg)	53	54	49	48	48	59.4 ± 2.58

表 3 两海拔藏绵羊精液品质分析

Table 3 Semen quality of Tibetan Sheep *Ovis aries* at two altitudes

测定指标 Parameter	高海拔组 (3 500 m) High-altitude group	低海拔组 (2 300 m) Low-altitude group	<i>t</i> 检验 <i>t</i> -test
精子活力 Sperm viability (%)	76.6 ± 0.42	78.6 ± 0.44	<i>t</i> = - 2.01, <i>df</i> = 28, <i>P</i> < 0.05
呼吸强度 Respiratory intensity (min)	4.12 ± 0.32	4.22 ± 0.46	<i>t</i> = - 3.87, <i>df</i> = 28, <i>P</i> > 0.05
活精子百分率 Percentage of live sperms (%)	70.34 ± 8.51	72.76 ± 8.25	<i>t</i> = - 1.58, <i>df</i> = 28, <i>P</i> > 0.05
畸形率 Malformation rate (%)	15.58 ± 3.38	14.23 ± 3.28	<i>t</i> = 3.21, <i>df</i> = 28, <i>P</i> > 0.05
顶体完整率 Acrosome integrity rate (%)	73.80 ± 2.28	74.10 ± 2.01	<i>t</i> = - 2.34, <i>df</i> = 28, <i>P</i> > 0.05

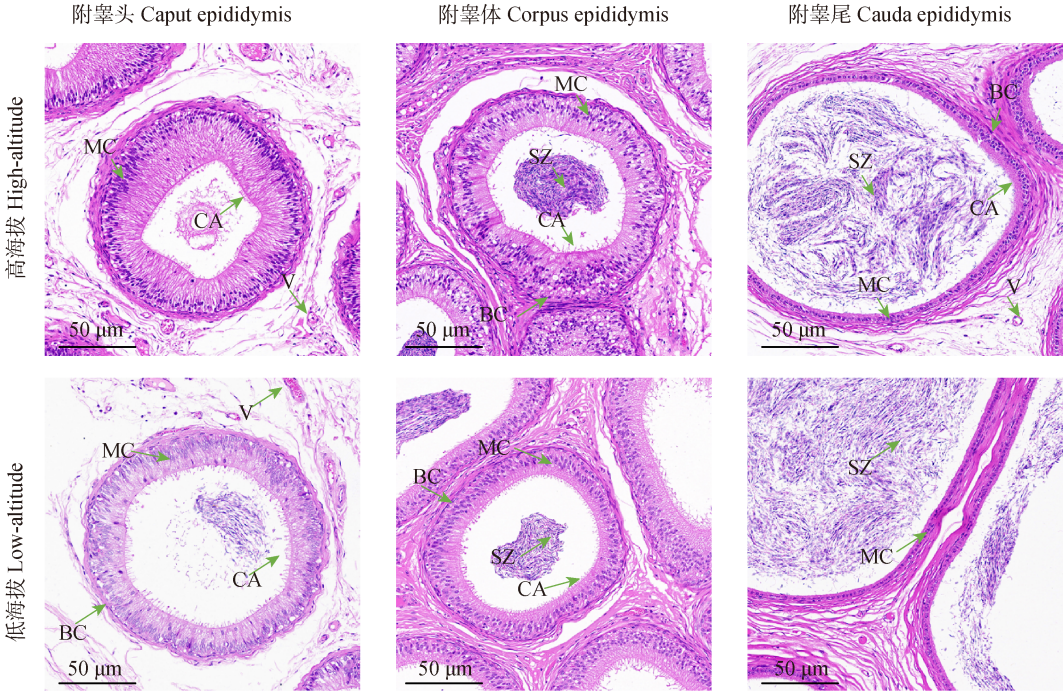


图 1 两海拔藏绵羊附睾切片

Fig. 1 Epididymal slices of Tibetan Sheep *Ovis aries* at two altitudes

BC. 基细胞; CA. 纤毛; MC. 主细胞; SZ. 精子; V. 血管
BC. Basal cell; CA. Cilia; MC. Principal cells; SZ. Spermatozoa; V. Vessels

表 4 两海拔藏绵羊附睾组织学参数的比较

Table 4 Comparison of histological parameters of epididymis between Tibetan sheep <i>Ovis aries</i> at two altitudes				
部位 Part	测定指标 Parameter	高海拔组 (3 500 m) High-altitude group	低海拔组 (2 300 m) Low-altitude group	t 检验 t-test
附睾头 Caput epididymis (μm)	管腔内径 Internal diameter of lumen	119.73 ± 13.31	142.28 ± 16.36	$t = 34.89, df = 398, P < 0.05$
	管腔外径 External diameter of lumen	226.85 ± 13.93	248.36 ± 27.67	$t' = -9.81, df = 394, P < 0.05$
	柱状上皮厚度 Thickness of columnar epithelium	60.97 ± 5.12	59.03 ± 5.41	$t = 1.07, df = 398, P > 0.05$
	纤毛长度 Cilia length	6.46 ± 1.32	9.67 ± 1.44	$t = -23.15, df = 398, P < 0.05$
附睾体 Corpus epididymis (μm)	管腔内径 Internal diameter of lumen	121.86 ± 12.96	167.70 ± 13.29	$t' = -15.12, df = 382, P < 0.05$
	管腔外径 External diameter of lumen	213.75 ± 22.69	234.82 ± 17.41	$t' = 0.53, df = 373, P < 0.05$
	柱状上皮厚度 Thickness of columnar epithelium	48.83 ± 4.22	56.54 ± 5.32	$t' = -16.05, df = 379, P < 0.05$
	纤毛长度 Cilia length	6.08 ± 1.44	6.59 ± 0.97	$t' = -4.31, df = 347, P < 0.05$
附睾尾 Cauda epididymis (μm)	管腔内径 Internal diameter of lumen	271.08 ± 20.80	345.20 ± 35.84	$t' = -4.31, df = 347, P < 0.05$
	管腔外径 External diameter of lumen	318.76 ± 20.54	385.86 ± 39.09	$t' = -21.49, df = 301, P < 0.05$
	柱状上皮厚度 Thickness of columnar epithelium	23.59 ± 2.65	18.37 ± 5.40	$t' = 12.26, df = 290, P < 0.05$
	纤毛长度 Cilia length	3.47 ± 0.83	4.44 ± 0.66	$t' = 18.25, df = 379, P < 0.05$

数据以平均值 ± 标准差表示。t'和df'分别表示近似t检验的结果及自由度。
Data are expressed as mean ± SD. t' and df' indicate t value and degree of freedom, respectively, in the approximate t test.

体、附睾尾的管腔内径和外径均小于低海拔藏绵羊,附睾尾的柱状上皮厚度大于低海拔藏绵羊,附睾头、附睾体静纤毛长度显著小于低海拔藏绵羊。

2.4 两海拔藏绵羊附睾各区段中 *PRDX2*、*STAR* 和 *GALNTL5* 基因的表达

PRDX2 基因在藏绵羊附睾各区段均表达,其 mRNA 表达水平由低到高依次为附睾体、附睾尾、附睾头(图 2a, b)。*PRDX2* 基因表达水平在高海拔组藏绵羊附睾体显著小于附睾头($F_{2,6} = 25.93$, $P < 0.05$),低海拔组附睾体、附睾尾极显著小于附睾头($F_{2,6} = 6.99$, $P < 0.01$)。*PRDX2* 基因表达水平在两个海拔藏绵羊附睾各区段之间高海拔均显著小于低海拔(附睾头: $t = 4.02$, $df = 4$, $P < 0.05$;附睾体: $t = 3.74$, $df = 4$, $P < 0.05$;附睾尾: $t = 3.20$, $df = 4$, $P < 0.05$, 图 2c)。*STAR* 基因在藏绵羊附睾不同部位表达水平由高到低依次为附睾头、附睾体、附睾尾,附睾尾极显著小于附睾头、附睾体(高海拔: $F_{2,6} = 71.03$, $P < 0.01$;低海拔: $F_{2,6} = 19.70$, $P < 0.01$, 图 2d, e)。*STAR* 基因在低海拔藏绵羊附睾头、附睾体表达量显著小于高海拔(附睾头: $t = 7.94$, $df = 4$, $P < 0.05$;附睾体: $t = 8.08$, $df = 4$, $P < 0.05$, 图 2f)。*GALNTL5* 基因在藏绵羊附睾各区段的表达水平由低到高依次为附睾体、附睾头、附睾尾,附睾尾的表达量最高且显著高于附睾头、附睾体(高海拔: $F_{2,6} = 32.01$, $P < 0.01$;低海拔: $F_{2,6} = 58.44$, $P < 0.05$, 图 2g, h)。低海拔藏绵羊附睾各区段 *GALNTL5* 基因的表达量均显著小于高海拔藏绵羊(附睾头: $t = 4.24$, $df = 4$, $P < 0.05$;附睾体: $t = 5.00$, $df = 4$, $P < 0.05$;附睾尾: $t = 2.82$, $df = 4$, $P < 0.05$, 图 2i)。

2.5 两海拔藏绵羊附睾各区段中 *PRDX2*、*STAR* 和 *GALNTL5* 蛋白的表达

PRDX2、*STAR* 和 *GALNTL5* 蛋白在两海拔藏绵羊附睾各区段中均有表达,但表达水平不同(图 3)。*PRDX2* 蛋白在附睾头的表达量

极显著高于附睾体和附睾尾;附睾尾极显著高于附睾体(高海拔: $F_{2,6} = 99.97$, $P < 0.01$;低海拔: $F_{2,6} = 499.24$, $P < 0.01$, 图 3a, b)。两个海拔之间比较,*PRDX2* 蛋白在高海拔藏绵羊附睾头、附睾体极显著低于低海拔藏绵羊(附睾头: $t = -10.14$, $df = 4$, $P < 0.01$;附睾体: $t = -5.54$, $df = 4$, $P < 0.01$),附睾尾显著低于低海拔藏绵羊($t = -4.06$, $df = 4$, $P < 0.05$, 图 3c)。*STAR* 蛋白在藏绵羊附睾头的表达量最高,附睾尾次之,附睾体最低,3 种组织之间差异极显著(高海拔: $F_{2,6} = 579.66$, $P < 0.01$;低海拔: $F_{2,6} = 188.43$, $P < 0.01$, 图 3d, e)。高海拔藏绵羊附睾头组织中 *STAR* 的相对表达量极显著高于低海拔藏绵羊($t = 8.26$, $df = 4$, $P < 0.01$, 图 3f)。*GALNTL5* 蛋白在藏绵羊附睾头、体、尾均有表达,表达水平由高到低依次为附睾尾、附睾头、附睾体且差异极显著(高海拔: $F_{2,6} = 1\,009.47$, $P < 0.01$;低海拔: $F_{2,6} = 647.11$, $P < 0.01$, 图 3g, h)。*GALNTL5* 蛋白在高海拔藏绵羊附睾各区段均极显著高于低海拔藏绵羊(附睾头: $t = 27.05$, $df = 4$, $P < 0.01$;附睾体: $t = 16.09$, $df = 4$, $P < 0.01$;附睾尾: $t = 9.74$, $df = 4$, $P < 0.01$, 图 3i)。

2.6 两海拔藏绵羊附睾各区段中 *PRDX2*、*STAR*、*GALNTL5* 蛋白的分布与定位

PRDX2 和 *STAR* 蛋白主要定位于藏绵羊附睾头、体、尾的主细胞和精子中(图 4a~l)。*GALNTL5* 蛋白定位于藏绵羊附睾头、体、尾的主细胞和基细胞(图 4m~r),同时在附睾体、附睾尾精子中也检测有阳性信号(图 4n, o, q, r)。

3 讨论

众所周知,精子由睾丸生成,到附睾的过程就是精子逐渐成熟的过程(张盛兴 1994)。影响藏绵羊精液品质的因素有遗传背景、个体大小、日照、季节以及饲养管理水平。本研究对 3 500 m 和 2 300 m 两个海拔自由放牧、体型大小均一的藏绵羊,在同一季节测量其精液

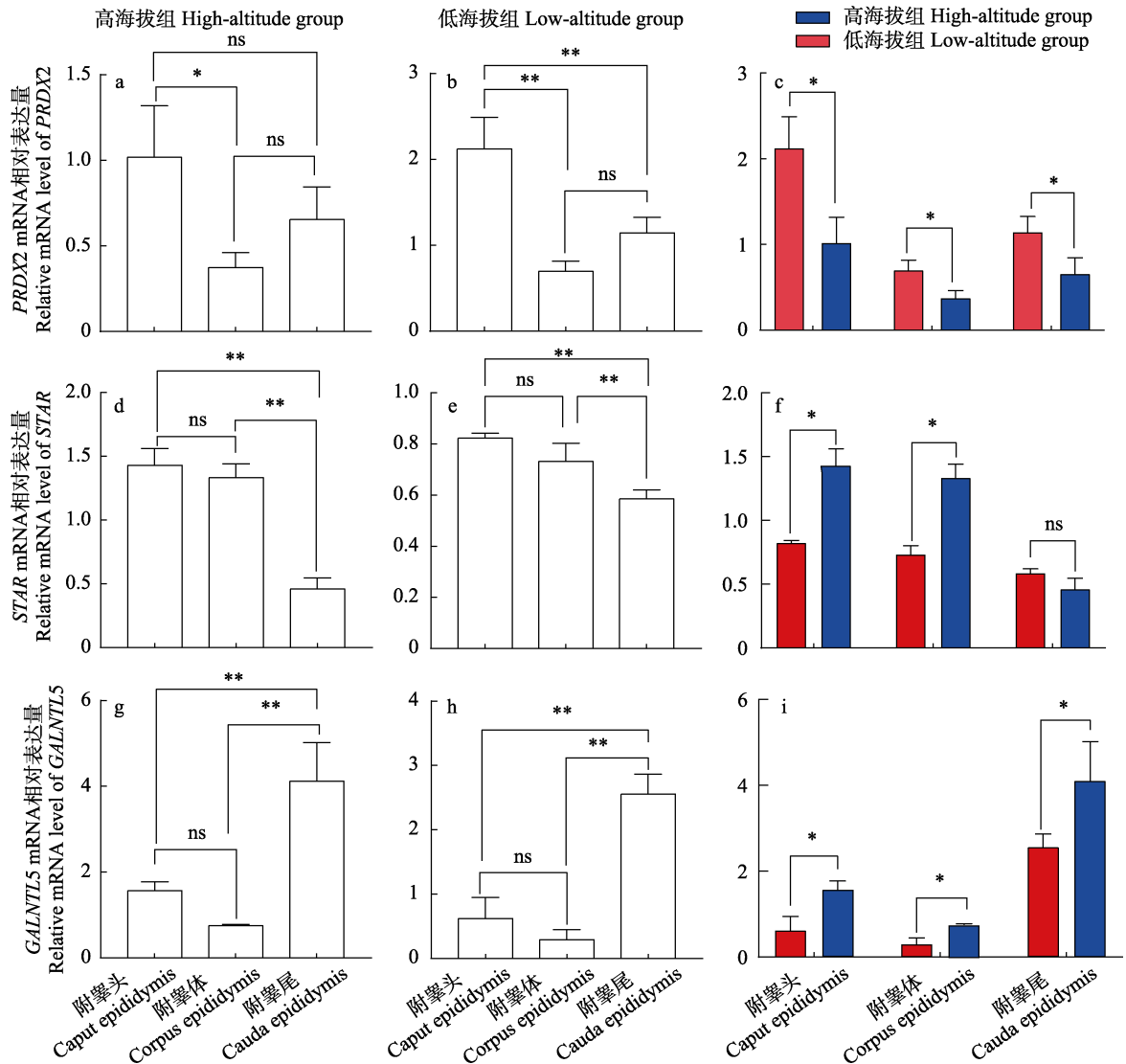


图2 两海拔藏绵羊附睾组织 mRNA 的表达

Fig. 2 Relative mRNA levels of genes in the epididymal tissue of Tibetan Sheep *Ovis aries* at two altitudes

a ~ c. *PRDX2* 基因的 mRNA 表达; d ~ f. *STAR* mRNA 的表达; g ~ i. *GALNTL5* mRNA 的表达. ** 组间差异极显著, $P < 0.01$; * 组间差异显著, $P < 0.05$; ns. 组间差异不显著, $P > 0.05$

a - c. Relative mRNA level of *PRDX2*; d - f. Relative mRNA level of *STAR*; g - i. Relative mRNA level of *GALNTL5*. **: $P < 0.01$ between groups; *: $P < 0.05$ between groups; ns: $P > 0.05$ between groups

品质, 结果显示, 与低海拔组比较, 高海拔藏绵羊附睾精液的精子活力、活精子百分率、畸形率及顶体完整率略有下降。精子活力是检测精液品质的关键性指标, 在人工授精过程中精子活力可直接反映出精子质量、存活和授精能力(木沙·托合提等 2022)。光线强度和日照时

间能刺激山羊 (*Capra aegagrus*) 后脑垂体分泌有关生殖激素, 温度可直接影响精子活力(伍克高等 2001)。本研究测得高海拔藏绵羊附睾精子活力低于低海拔藏绵羊。说明高原低氧环境会抑制精子活力。精子畸形率是精液中畸形精子数占总精子数的百分率。畸形精子中尾部

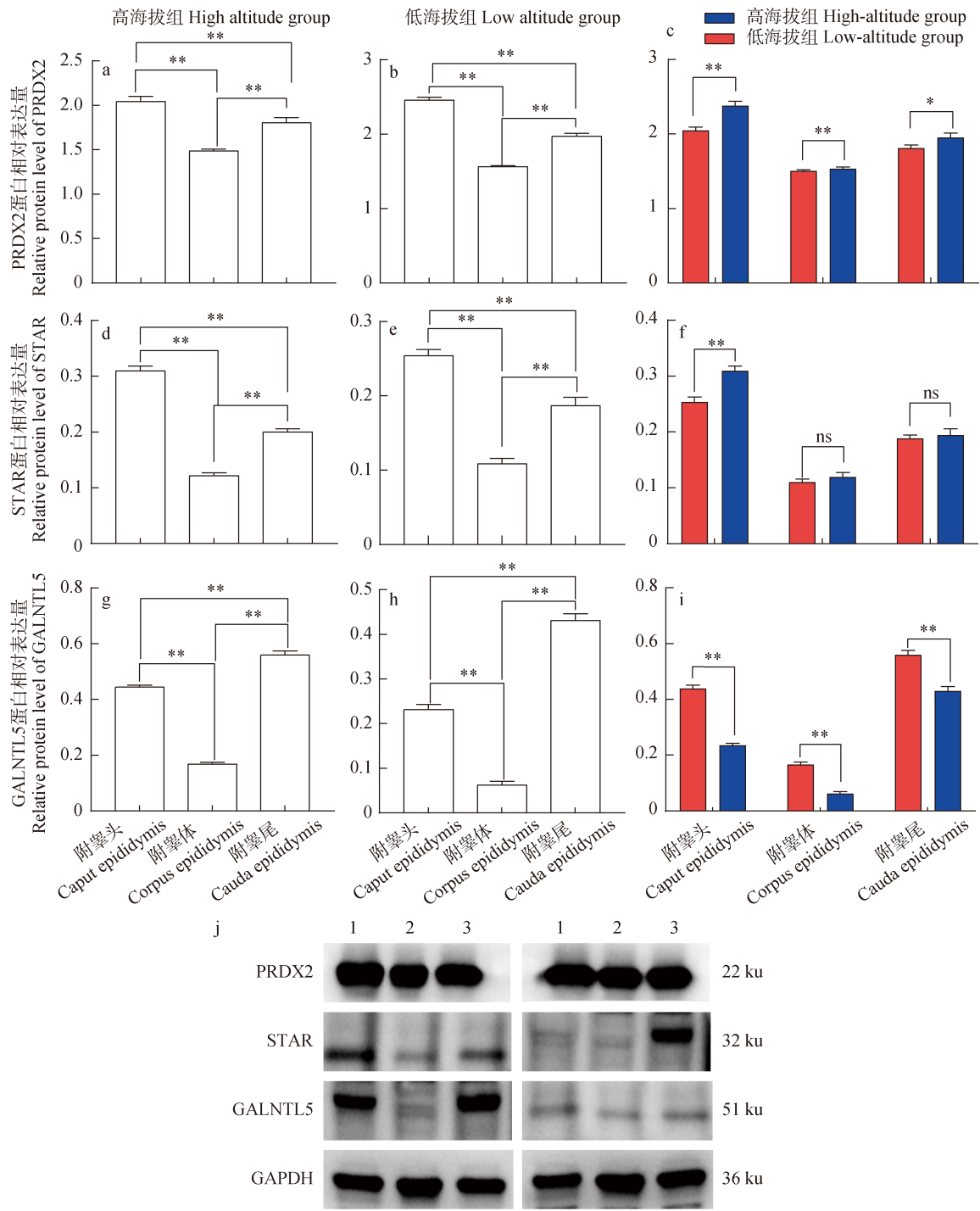


图3 两海拔藏绵羊附睾组织蛋白的表达

Fig. 3 Expression of proteins in the epididymal tissue in Tibetan Sheep *Ovis aries* at two altitudes

a ~ c. PRDX2 蛋白的表达; d ~ f. STAR 蛋白的表达; g ~ i. GALNTL5 蛋白的表达; j. 蛋白表达条带: 1. 附睾头; 2. 附睾体; 3. 附睾尾。
a - c. Relative protein level of PRDX2; d - f. Relative protein level of STAR; g - i. Relative protein level of GALNTL5; j. Protein expression bands:
1. Caput epididymidis; 2. Corpus epididymidis; 3. Cauda epididymidis.

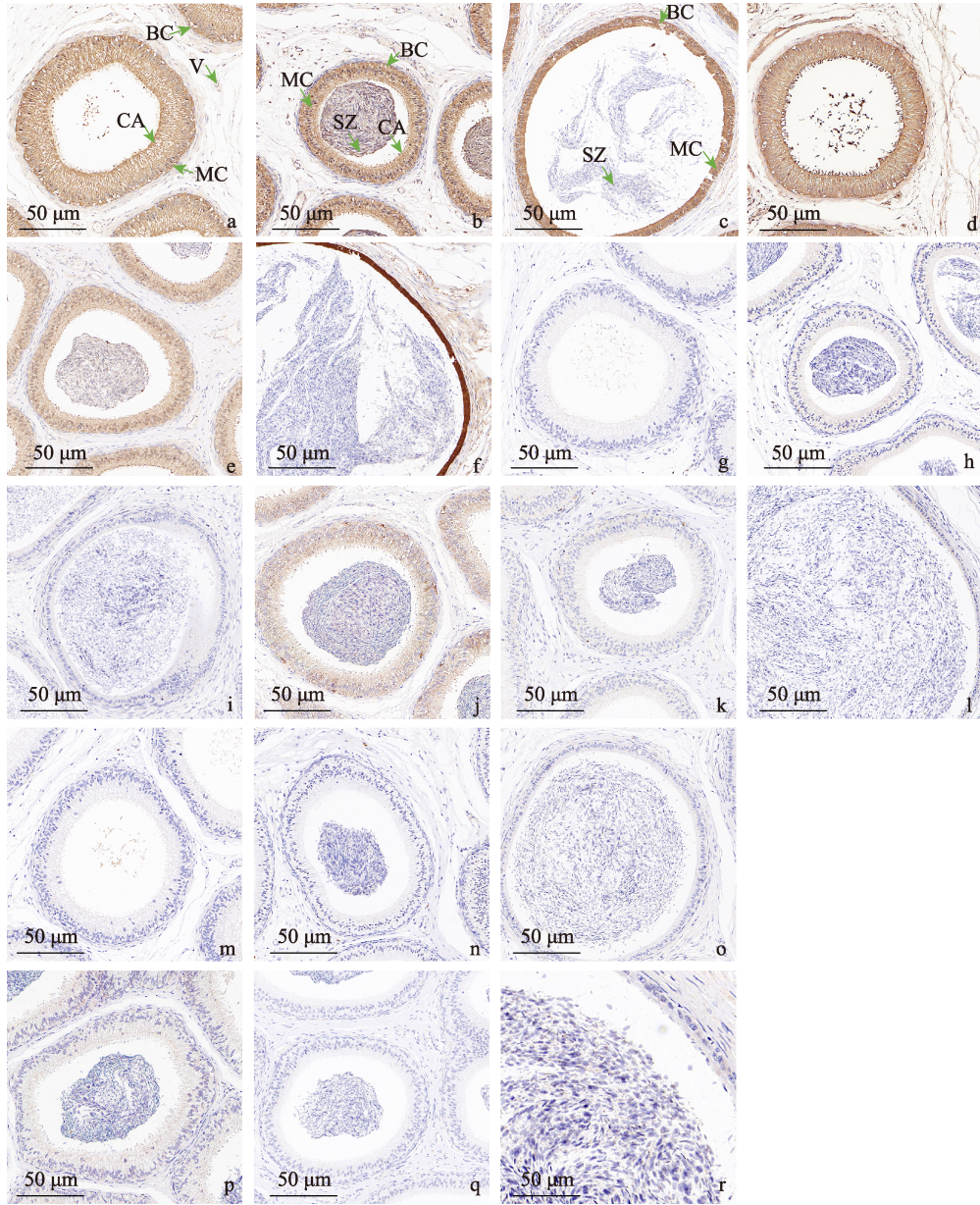


图4 PRDX2、STAR 和 GALNTL5 在两海拔藏绵羊附睾组织中的定位

Fig. 4 Localization of RDDX2, STAR, and GALNTL5 in the epididymic tissue of Tibetan Sheep *Ovis aries* at two altitudes

a ~ c. PRDX2 在高海拔藏绵羊附睾中的表达; d ~ f. PRDX2 在低海拔藏绵羊附睾中的表达; g ~ i. STAR 在高海拔藏绵羊附睾中的表达; j ~ l. STAR 在低海拔藏绵羊附睾中的表达; m ~ o. GALNTL5 在高海拔藏绵羊附睾中的表达; p ~ r. GALNTL5 在低海拔藏绵羊附睾中的表达。a、d、g、j、m、p. 附睾头; b、e、h、k、n、q. 附睾体; c、f、i、l、o、r. 附睾尾。BC. 基细胞; CA. 纤毛; MC. 主细胞; SZ. 精子; V. 血管
a - c. Expression of PRDX2 in the epididymis of Tibetan Sheep at the high altitude; d - f. Expression of PRDX2 in the epididymis of Tibetan Sheep at the low altitude; g - i. Expression of STAR in the epididymis of Tibetan Sheep at the high altitude; j - l. Expression of STAR in the epididymis of Tibetan Sheep at the low altitude; m - o. Expression of GALNTL5 in the epididymis of Tibetan Sheep at the high altitude; p - r. Expression of GALNTL5 in the epididymis of Tibetan Sheep at the low altitude. a, d, g, j, m, p. Caput epididymidis; b, e, h, k, n, q. Corpus epididymidis; c, f, i, l, o, r. Cauda epididymidis. BC. Basal cells; CA. Cilia; MC. Principal cells; SZ. Spermatozoa; V. Vessels

畸形较为常见。造成精子畸形的原因有年龄、遗传、生殖系统病变及环境条件等。本研究发现,高海拔藏绵羊附睾精子畸形率高于低海拔,可能是低温低氧环境导致附睾精子畸形率偏高。精子顶体完整对精子的存活和发挥正常功能起着至关重要的作用。精子顶体内含有多钟与受精有关的酶,在精卵结合中具有重要作用。高海拔藏绵羊精子顶体完整率略低于低海拔藏绵羊,表明高寒低氧环境可能会抑制精子顶体发育。

附睾各区段管壁上皮主要由主细胞、基细胞、顶端细胞和晕细胞及管周肌样细胞组成。上皮细胞功能和类型不同,组织化学也有明显差异(周艺等 1990)。主细胞是附睾管数量最多、最主要的细胞,主细胞能分泌肉毒碱、甘油磷酸胆碱等多种酶,这些物质与精子的生理功能及成熟息息相关(史岩等 2017)。通过比较发现,附睾头、体和尾管腔面积依次变大,附睾尾管腔面积最大,便于贮存大量精子。除此之外,附睾管上皮厚度逐渐变小,纤毛长度逐渐变短,此结果与柳苗苗等(2022)对藏绵羊和小尾寒羊附睾的研究结果一致。高海拔藏绵羊附睾的管腔内径、外径及纤毛长度均小于低海拔藏绵羊。综上所述,两个海拔之间藏绵羊附睾组织学特征有一定差异,推测与高海拔低氧环境的适应性改变相关。

PRDX2 是 PRDX 家族的重要成员之一,是一种抗氧化蛋白,维持体内的氧化平衡(Kang et al. 2017)。PRDX2 在人类的附睾中呈现细胞特异性,可以清除多余的活性氧分子,是精子的抗氧化保护剂(Liu et al. 2018)。有研究发现,PRDX2 能够在相对较低的 H_2O_2 浓度下进行氧化还原反应,可有效维持精子细胞的氧化还原平衡(Talwar et al. 2020)。胥国麟等(2024)的研究也证实,PRDX2 通过调节活性氧来影响精子活力。本研究结果显示,PRDX2 基因和蛋白均在附睾头中表达量最高,且高海拔藏绵羊的表达量低于低海拔地区藏绵羊,表明低氧环境下附睾内环境中氧含量也较低,从

而使得 PRDX2 基因和蛋白的表达量下降。此外,本研究发现 PRDX2 蛋白主要表达在附睾管上皮主细胞中。主细胞能够合成和分泌多种特异性成分以保证精子成熟和获能。由此推测,附睾上皮组织分泌的 PRDX2 蛋白影响附睾管腔环境,参与精子的成熟。STAR 基因参与调控睾酮合成,在精子成熟和雄性生育中起关键作用(Davey et al. 2016, Sun et al. 2018)。研究发现,附睾可以代谢睾酮为 5α -二氢睾酮和 5β -二氢睾酮,这些代谢物对精子的成熟有重要调控作用,睾酮含量的变化会影响精子的活力(Stanworth et al. 2008)。研究发现在猪(*Sus scrofa domesticus*, Zhang et al. 2018)、鸡(*Gallus gallus domesticus*, Sechman et al. 2014)、羊(蒋雨婷等 2024)中 STAR 基因主要在睾丸和卵巢中表达。本研究发现,高海拔藏绵羊 STAR 基因和蛋白的表达量升高。推测 STAR 的表达上调诱导更多雄激素的合成,以保障精子成熟过程。进一步定位研究结果显示,STAR 蛋白主要分布在附睾管上皮的主细胞中,主要通过附睾上皮细胞的分泌和吸收功能在附睾精子成熟中发挥作用。GALNTL5 作为 pp-GalNAc-T 家族中的一员,在动物繁殖性能发挥着重要的作用(Kierszenbaum et al. 2003)。PP-GalNAc-T 家族成员在表达分布、底物选择及功能上存在差异。由于每一个家族成员都具有独特的亚基结构和表达模式,导致它们呈现不同的生物学功能(Elhammer et al. 1986)。例如,ppGalNAcT-1 在调节造血系统的细胞和糖蛋白选择性功能中起关键作用(Tenno et al. 2007),PP-GalNAc-T14 可调节细胞凋亡起始蛋白 caspase8 的募集和活化(Park et al. 2010),而 GALNTL5 催化附睾糖蛋白的合成进而调控在精子成熟。有研究发现, GALNTL5 缺陷型突变小鼠精子量比野生型小鼠的少,精子畸形率比野生型高 5 倍以上(Takasaki et al. 2014)。同时发现,缺陷型小鼠精子运动能力下降,体内伴随运动所需的糖酵解酶含量明显降低,说明 GALNTL5 可以控制糖酵解所需的酶来调控精子的活力

(Takasaki et al. 2014)。本研究结果显示, *GALNTL5* 定位于藏绵羊附睾细胞、基细胞和精子中。这一结果和湖羊相关研究一致(姚晓磊等 2019)。*GALNTL5* mRNA 和蛋白在藏绵羊附睾尾的表达量显著高于附睾头和附睾体, 且在高海拔藏绵羊中的表达量显著高于低海拔藏绵羊, 说明在高寒低氧环境中, 附睾中 *GALNTL5* 表达量上调会引起附睾糖蛋白含量的升高, 能在很大程度上拮抗高原环境对精子成熟能力的损害。

参 考 文 献

- Barati E, Nikzad H, Karimian M. 2020. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1): 93–113.
- Chen H, Alves M B R, Belleannée C. 2021. Contribution of epididymal epithelial cell functions to sperm epigenetic changes and the health of progeny. *Human Reproduction Update*, 28(1): 51–66.
- Clark B J, Stocco D M. 1995. Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocrine Research*, 21(1/2): 243–257.
- Davey R A, Grossmann M. 2016. Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *The Clinical Biochemist Reviews*, 37(1): 3–15.
- Duan T, Fan K, Chen S R, et al. 2016. Role of peroxiredoxin 2 in H_2O_2 -induced oxidative stress of primary Leydig cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(6): 4807–4813.
- Elhammer A, Kornfeld S. 1986. Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from bovine colostrum and murine lymphoma BW5147 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261(12): 5249–5255.
- James E R, Carrell D T, Aston K I, et al. 2020. The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15): 5377.
- Kang D H, Lee D J, Lee S M, et al. 2017. Interaction of tankyrase and peroxiredoxin II is indispensable for the survival of colorectal cancer cells. *Nature Communications*, 8(1): 40–54.
- Kierszenbaum A L, Rivkin E, Tres L L. 2003. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular Biology of the Cell*, 14(11): 4628–4640.
- Li H, Jiang Q, Ju Z H, et al. 2016. A novel splice variant of the bovine *GALNTL5* gene identified in Chinese Holstein bull testis tissue and its mRNA expression. *Genetics and Molecular Research*, 15(2): 15027723.
- Liu J, Wang W T, Liu X, et al. 2018. Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin 2 fusion protein improves human sperm quality and function. *Fertility and Sterility*, 110(6): 1058–1066.
- Manna P R, Stocco D M. 2005. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences. *Current Drug Targets Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(1): 93–108.
- Neumann C A, Fang Q. 2007. Are peroxiredoxins tumor suppressors? *Current Opinion in Pharmacology*, 7(4): 375–380.
- Park J H, Nishidate T, Kijima K, et al. 2010. Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Research*, 70(7): 2759–2769.
- Scarlata E, O’Flaherty C. 2020. Antioxidant enzymes and male fertility: lessons from knockout models. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(8): 569–580.
- Sechman A, Antos P, Katarzyńska D, et al. 2014. Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on secretion of steroids and STAR, HSD3B and CYP19A1 mRNA expression in chicken ovarian follicles. *Toxicology Letters*, 225(2): 264–274.
- Stanworth R D, Hugh Jones T. 2008. Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clinical Interventions in Aging*, 3(1): 25–44.
- Sun D L, Dong W H, Jin B F, et al. 2018. Mechanisms of Yangjing capsule in Leydig cell apoptosis and testosterone synthesis via promoting StAR expression. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 41(9): 1401–1405.

- Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, et al. 2014. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3): 1120–1125.
- Talwar D, Messens J, Dick T P. 2020. A role for annexin A2 in scaffolding the peroxiredoxin 2-STAT3 redox relay complex. *Nature Communications*, 11(1): 4512.
- Tenno M, Ohtsubo K, Hagen F K, et al. 2007. Initiation of protein O glycosylation by the polypeptide GalNAcT-I in vascular biology and humoral immunity. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24): 8783–8796.
- Wu M Y, Deng C J, Lo T H, et al. 2022. Peroxiredoxin, senescence, and cancer. *Cells*, 11(11): 1772.
- Yao X L, El-Samahy M A, Feng X, et al. 2017. Expression and localization of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like protein 5 in the reproductive organs and sperm of Hu sheep. *Animal Reproduction Science*, 187: 159–166.
- Zhang Y H, Cui Y, Zhang X L, et al. 2018. Pig StAR: mRNA expression and alternative splicing in testis and Leydig cells, and association analyses with testicular morphology traits. *Theriogenology*, 118: 46–56.
- 扈添琴, 胡宁玺, 马元梅, 等. 2015. 牦牛、藏羊放牧家畜鲜精精子顶体完整率对比研究. *青海畜牧兽医杂志*, 45(4): 17–18.
- 蒋雨婷, 王霞, 宋娟娟, 等. 2024. STAR 基因在不同发育期绵羊睾丸和附睾中的表达与组织分布. *中国畜禽种业*, 20(4): 77–84.
- 李勃深, 张宇轩, 范容晖, 等. 2023. 高原对线粒体功能及能量代谢影响研究进展. *中国比较医学杂志*, 33(10): 106–113.
- 柳苗苗, 郭亚军, 伏晓玉, 等. 2022. 藏绵羊和小尾寒羊雄性生殖器官组织结构比较. *动物学杂志*, 57(1): 124–131.
- 逯来章, 杨卓. 2012. 天峻县高原型藏绵羊种质特性. *草业与畜牧*, (10): 35–37.
- 毛学荣. 2005. 高寒牧区放牧条件下陶塞特羊与欧拉型藏羊杂交试验. *家畜生态学报*, 26(4): 100–102.
- 木沙·托合提, 莫合塔尔·夏甫开提, 布海力且木·吐尼牙孜. 2022. 两种肉用品种公羊采精量及精子活率的比较分析. *草食家畜*, (6): 17–20, 35.
- 石红梅, 丁考仁青, 杨勤, 等. 2011. 甘南欧拉型藏羊杂交改良半农半牧区绵羊试验研究. *畜牧兽医学杂志*, 30(2): 12–14.
- 史岩, 张建海. 2017. 二氧化硫对大鼠附睾组织形态的影响. *山西农业科学*, 45(5): 746–748.
- 王霄悦. 2023. 提高绵羊人工授精受胎率的主要措施. *中国畜牧业*, (22): 59–60.
- 伍克高, 赵伟伟. 2001. 影响山羊繁殖力的因素和提高繁殖力的主要措施. *河南畜牧兽医*, 22(8): 19.
- 胥国麟, 叶晓林, 钱体军, 等. 2024. 弱精子症合并超重人群精液 PRDX2 的表达变化与运动能力的相关性分析. *大理大学学报*, 9(2): 67–71.
- 许正林. 2009. 天峻县高原型藏羊资源调查. *上海畜牧兽医通讯*, (4): 73–75.
- 姚晓磊, 孟繁星, 王书婷, 等. 2019. GALNTL5 基因在不同月龄湖羊附睾中的表达模式及其 miRNA 的预测. *南京农业大学学报*, 42(3): 519–525.
- 张盛兴. 1994. Pelibuey 公羊的精子日产量、睾丸组织内精子的产生和附睾内精子的贮留数量的研究. *黑龙江动物繁殖*, 2(4): 20.
- 周艺, 郑世彬. 1990. 附睾管上皮的组织结构和功能. *广东解剖学通报*, 12(2): 206–209.