

# 上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

## 学士学位论文

BACHELOR'S THESIS



论文题目：铅离子对雄性小鼠不同发育时期生殖细胞蛋白酰化修饰的影响

学生姓名： 刘旭睿

学生学号： 515150910065

专    业： 动物科学

指导教师： 李新红

学 院(系)： 农业与生物学院

## 铅离子对雄性小鼠不同发育时期生殖细胞蛋白 酰化修饰的影响

### 摘 要

重金属铅是自然界中广泛存在的污染物,对于机体尤其是生殖系统具有极强的毒性,但其生殖毒性作用机理仍不清楚。蛋白酰化修饰对生殖细胞的正常发育尤其是精子的发生具有重要作用,而铅离子对于生殖细胞蛋白酰化修饰的影响鲜有报道。本研究以雄性小鼠为动物模型,采用体内氯化铅溶液腹腔注射(1.5mg/kg 体重)的方法,利用蛋白免疫印迹技术和组织免疫荧光技术对小鼠不同发育时期生殖细胞蛋白酰化修饰进行检测,以及采用免疫组化技术和组织免疫荧光技术对精子发生过程中过渡蛋白和鱼精蛋白的表达量进行检测。结果显示,铅离子显著抑制 20、40、60 天蛋白乙酰化修饰,提示在不同发育时期铅离子都对乙酰化修饰影响显著。铅离子对蛋白琥珀酰化修饰在 20 天时作用不明显,40 天和 60 天时具有明显的抑制作用;有趣的是,本研究发现铅离子导致了处理组小鼠生殖细胞 ATP 含量显著下降和线粒体复合体 I 和 II 的活性显著下降,以及糖酵解的第三个限速酶 PK 的活性也显著下降,有研究报道,三羧酸循环中的乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 是蛋白乙酰化修饰和琥珀酰化修饰的重要来源之一,这提示铅离子可能是通过影响能量代谢导致的蛋白酰化修饰异常。此外,本研究还发现铅离子会导致精子发生过程中组蛋白-鱼精蛋白替换过程的异常,表现为处理组过渡蛋白表达量显著高于对照组,而鱼精蛋白的表达量低于对照组。已有研究证明,组蛋白 H4 的高乙酰化是组蛋白-鱼精蛋白替换的先决条件,这提示铅离子可能通过影响小鼠生殖细胞能量代谢导致蛋白酰化修饰异常进而导致小鼠精子发生过程异常,最终导致生殖损伤。本研究为揭示铅离子的生殖毒性作用机理提供了新的思路,为探讨铅离子繁殖毒理机制、防治由铅离子引发的雄性不育疾病提供了相关的基础资料。

**关键词:** 铅离子, 小鼠, 生殖毒性, 酰化修饰, 代谢, 组蛋白-鱼精蛋白替换

# EFFECT OF LEAD IONS ON PROTEIN ACYLATION OF GERM CELLS IN MALE MICE AT DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES

## ABSTRACT

Heavy metal lead is a widely distributed pollutant in nature, and it is extremely toxic to the body, especially the reproductive system, but its reproductive toxicity mechanism remains unclear. Protein acylation plays an important role in the normal development of germ cells, especially spermatogenesis, and the effect of lead ions on the protein acylation of germ cells has rarely been reported. In this study, male mice were used as animal models, and intraperitoneal injection of lead chloride solution (1.5mg/Kg body weight) was used to detect protein acylation of germ cells in different developmental stages of mice by Western blotting and tissue immunofluorescence. And the expression levels of transition protein and protamine in spermatogenesis were detected by immunohistochemistry and tissue immunofluorescence. The results show that lead ions significantly inhibit protein acetylation at 20, 40, and 60 days, suggesting that lead ions have significant effects on acetylation at different developmental stages. The effect of lead ion on protein succinylation is not obvious at 20 days, and it has obvious inhibition at 40 and 60 days. Interestingly, this study finds that lead ions cause a significant decrease in ATP content in germ cells of treated mice. The activities of the Mitochondrial Complex I and II decrease significantly, and the activity of the rate-limiting enzyme PK of glycolysis is also significantly decreased. It has been reported that acetyl-CoA and succinyl-CoA in the TCA cycle are one of the important sources of protein acetylation and succinylation, suggesting that lead ions can cause abnormalities in protein acylation by affecting energy metabolism. In addition, this study also finds that lead ions can cause abnormalities in the process of histone-protamine replacement during spermatogenesis. The expression of transition protein in the treatment group is significantly higher than that in the control group, while the expression level of protamine is lower than that in the control group. Studies have shown that hyperacetylation of histone H4 is a prerequisite for histone-protamine replacement, suggesting that lead ions may lead to abnormal protein acylation by affecting the energy metabolism and thereby disturbing spermatogenesis in mice. The abnormality of the process eventually leads to reproductive damage. This study provides a new idea for revealing the reproductive toxicity mechanism of lead ions, and provides relevant basic data for exploring the toxicological mechanism of lead ion and preventing male sterility caused by lead ions.

**Key words:** Lead, mice, reproductive toxicology, acylation, metabolism, transition protein

## 目 录

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 第一章 绪论 .....                                            | 1  |
| 1.1 铅离子毒性相关研究 .....                                     | 1  |
| 1.1.1 铅离子的污染来源 .....                                    | 1  |
| 1.1.2 铅离子的生殖毒性作用 .....                                  | 1  |
| 1.1.3 铅离子的生殖损伤机理 .....                                  | 1  |
| 1.2 雄性生殖细胞增殖分化简介 .....                                  | 2  |
| 1.2.1 生殖细胞增值分化过程 .....                                  | 2  |
| 1.2.2 组蛋白-鱼精蛋白替换过程简介 .....                              | 3  |
| 1.2.3 鱼精蛋白的功能 .....                                     | 3  |
| 1.3 生殖细胞蛋白酰化修饰相关研究 .....                                | 3  |
| 1.3.1 生殖细胞组蛋白乙酰化修饰研究 .....                              | 3  |
| 1.3.2 生殖细胞非组蛋白乙酰化修饰研究 .....                             | 4  |
| 1.3.3 生殖细胞蛋白琥珀酰化修饰研究 .....                              | 4  |
| 1.4 本论文主要研究内容及目的意义 .....                                | 5  |
| 第二章 实验材料与方法 .....                                       | 6  |
| 2.1 试剂和材料 .....                                         | 6  |
| 2.2 试验设计 .....                                          | 6  |
| 2.3 组织材料和蛋白的提取 .....                                    | 6  |
| 2.4 SDS-PAGE 及蛋白免疫印迹 .....                              | 7  |
| 2.5 ATP 水平测定 .....                                      | 7  |
| 2.6 PK 活性测定 .....                                       | 7  |
| 2.7 线粒体复合体 I 和 II 活性测定 .....                            | 7  |
| 2.8 组织的免疫荧光 .....                                       | 8  |
| 2.9 数据统计分析 .....                                        | 8  |
| 第三章 结果及分析 .....                                         | 9  |
| 3.1 $Pb^{2+}$ 对小鼠睾丸和产子数的影响 .....                        | 9  |
| 3.2 小鼠睾丸组织切片图 .....                                     | 10 |
| 3.3 $Pb^{2+}$ 对小鼠发育过程中睾丸内生殖细胞蛋白乙酰化修饰的影响 .....           | 11 |
| 3.4 $Pb^{2+}$ 对小鼠发育过程中睾丸生殖细胞蛋白琥珀酰化修饰的影响 .....           | 11 |
| 3.5 $Pb^{2+}$ 对小鼠不同发育时期睾丸蛋白乙酰化和琥珀酰化修饰的影响（免疫荧光图） .....   | 12 |
| 3.6 $Pb^{2+}$ 对小鼠 40、60 日龄睾丸生殖细胞内代谢酶活性和 ATP 水平的影响 ..... | 14 |
| 3.7 生殖细胞的分离 .....                                       | 15 |
| 3.8 $Pb^{2+}$ 抑制 SPG、RS 和减数分裂时生殖细胞蛋白乙酰化修饰 .....         | 16 |
| 3.9 $Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白和鱼精蛋白表达量的影响 .....  | 17 |
| 3.10 $Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞过渡蛋白表达量的影响 .....       | 18 |
| 3.11 $Pb^{2+}$ 生殖毒性机理示意图（酰化修饰角度） .....                  | 19 |
| 第四章 讨论 .....                                            | 21 |
| 第五章 结论与展望 .....                                         | 23 |
| 5.1 结论 .....                                            | 23 |
| 5.2 展望 .....                                            | 23 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 参考文献 .....          | 24 |
| 致谢 .....            | 28 |
| 本科期间录用或参与发表的论文..... | 29 |

## 第一章 绪论

### 1.1 铅离子毒性相关研究

#### 1.1.1 铅离子的污染来源

铅是一种有毒的重金属，具有蓄积性和多亲和性，造成了广泛的环境污染<sup>[1]</sup>。含铅的“三废”——废水、废气和废渣的任意排放是造成重金属铅污染的主要原因之一。铅不可被生物降解，所以其在环境中持久存在。以及由于其独特的物理和化学性质，铅被应用于各种工业化活动。金属的广泛使用导致人类更多地接触到重金属元素，这给人类造成了相当大的疾病负担，尤其是在缺乏严格法规和政策的发展中国家。

众所周知，饮用水和食品中的铅是几十年来人类铅摄入量的重要来源。糖果、药品，陶瓷餐具，儿童玩具，服装饰品，钥匙链以及其他金属或涂漆物品，以及塑料和橡胶等产品是其他潜在的铅来源<sup>[2]</sup>。自从停止生产含铅汽油以来，含铅的涂料是人类接触铅的主要来源之一<sup>[3]</sup>。

铅以有机和无机两种形式存在，无机铅不会被代谢，而是沉积在软组织和骨骼中，时间可长达数十年。用作汽油添加剂的有机铅易被皮肤和呼吸道吸收，孕妇和儿童的吸收率较高。

#### 1.1.2 铅离子的生殖毒性作用

铅离子一方面是通过人体直接摄入被污染的空气和水体进入人体，另一方面是通过食物链的传递在人体内富集。铅的急性中毒常表现为恶心呕吐、阵发性腹部绞痛、出汗、头痛，严重时甚至会出现抽搐、昏迷瘫痪及循环衰竭。慢性中毒则会表现为肌肉痉挛、视力模糊、意识不清、记忆丧失等症状<sup>[4]</sup>。

有研究报道铅离子会导致雄性精子活力下降，精子密度降低，核染色质凝集成块状，严重者出现核溶解。此外，铅接触男性的精子总数，存活精子数，精子存活率均降低，畸形精子数及精子畸形率增高<sup>[5-7]</sup>。

铅对女性的生殖功能也造成巨大损伤。铅接触女性会出现月经失调，白带异常、腹痛、腰痛、痛经等现象。在接触高浓度铅的已婚妇女中，自然流产率和死产率显著增加。以上结果皆表明铅离子对生殖系统具有强烈毒性作用。

#### 1.1.3 铅离子的生殖损伤机理

铅离子对生殖系统的毒性作用是明确的，但是铅离子进入体内造成生殖系统损伤的机理仍然不清楚。目前有以下三种主流观点来解释铅离子如何导致生殖损伤：(i) 铅离子会导致氧化损伤，其诱导产生氧化自由基<sup>[8]</sup>，并且铅离子对 SOD（超氧化物歧化酶），GPx（谷胱甘肽过氧化物酶）和 CAT（过氧化氢酶）等抗氧化酶的活性具有明显的抑制作用<sup>[9]</sup>，所以铅离子不仅诱导产生更多 ROS（活性氧），而且损伤了细胞的抗氧化系统。这导致了氧化自由基无法被有效地清除从而加剧了氧化损伤。当 ROS 积聚时会对蛋白质，DNA 和膜脂质造成氧化损伤。睾丸膜富含不饱和脂肪酸，很容易与自由基反应，随后，LPO（脂质过氧化物）引起连锁反应，导致睾丸膜结构恶化和精子完整性受损<sup>[10]</sup>。故铅离子可导致活性氧（ROS）的过量产生并损伤细胞的抗氧化系统，进而导致生殖组织的氧化损伤<sup>[11]</sup> (ii) 铅离子可能对

下丘脑-垂体-睾丸轴产生不利影响,进而造成生殖损伤。生殖轴的功能障碍,在青春期发育期间最易感和不可逆。铅离子通过影响 FSH (卵泡生成激素), LH (黄体生成激素), 睾酮, 雌激素(包括 E2) 及其受体激素等进而导致生殖损伤<sup>[9, 12]</sup>。雌激素(特别是雌二醇, E2) 在精子发生的调节中起重要作用,其表达水平的异常或其下游途径的异常都可导致雄性不育<sup>[13, 14]</sup>。睾丸中雌激素的产生由芳香酶(P450 arom)介导,该酶不可逆地将雄激素转化为雌激素。P450 arom 由 Cyp19 编码。E2 通过结合雌激素受体- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 和雌激素受体- $\beta$  (ER $\beta$ ) 介导其生物学效应,两者均在哺乳动物睾丸中表达。E2 调节睾丸细胞(精原细胞,精母细胞和 Leydig 细胞)的增殖<sup>[15]</sup>;并在精子的运动和附睾精子成熟中发挥重要作用<sup>[14, 16]</sup>,这些功能在鱼类和哺乳动物物种中是保守的<sup>[16, 17]</sup>。有研究报道 P450 突变或敲除的小鼠表现出精子受损,随后成年后不育<sup>[18, 19]</sup>。(iii) 铅离子通过减少精子细胞内 cAMP、钙离子和蛋白酪氨酸磷酸化进而抑制精子活力、获能和孕酮诱导的顶体反应<sup>[20]</sup>。成熟精子的细胞核高度浓缩,缺乏活跃的转录机制,cAMP 和钙离子等信号分子在调节哺乳动物精子功能中发挥重要作用<sup>[21]</sup>,这些第二信使水平的改变可以触发一系列细胞内信号如酪氨酸磷酸化,从而调节精子功能<sup>[22]</sup>。故该通路的紊乱会对精子活力造成损伤。上述观点均有相应的试验结果支撑,但铅离子的生殖毒性作用机理依然值得进一步探究与完善,随着研究的深入相关理论会逐渐完善。

## 1.2 雄性生殖细胞增殖分化简介

### 1.2.1 生殖细胞增殖分化过程

睾丸(testis)是雄性哺乳动物产生生殖细胞以及维持全身雄性激素水平的重要器官,睾丸内包括间质细胞和曲细精管(又名生精小管)两大部分,间质细胞数量较少但产生的雄性激素遍布全身对维持雄性第二性征具有重要作用,曲细精管则是雄性生殖细胞增殖分化的主要场所。雄性生殖细胞在睾丸生精小管内增殖分化一般包括三个过程:精原细胞的增殖,精母细胞的减数分裂以及精子的形成<sup>[23]</sup>。这三大过程与精子的最终产生有密不可分的联系。

精原细胞的增殖过程:精原细胞位于曲细精管表皮的基底部有 A 型与 B 型精原细胞之分。最初曲细精管内皮是以原始 A 型精原细胞(Primitive type A spermatogonia)为主,后经原始 A 型精原细胞分裂形成 A 型精原细胞(Type A spermatogonia),A 型精原细胞分化成为过渡精原细胞(Intermediate spermatogonium)最终形成 B 型精原细胞(Type B spermatogonia)<sup>[24]</sup>。精母细胞的减数分裂过程:精母细胞是由 B 型精原细胞有丝分裂形成,精母细胞的减数分裂过程中经历细线期(Leptotene),偶线期(Zygotene),粗线期(Pachytene),双线期(Diplotene)和终变期(Diakinesis)然后经过第一次分裂变为次级精母细胞(Secondary spermatocyte),次级精母细胞经过第二次分裂变为圆形精细胞(Round spermatid),此时的圆形精细胞没有分裂活性,精母细胞的减数分裂完成<sup>[25]</sup>。精子的形成:在鼠中,精子的形成根据核伸长和顶体形态分为总共 16 个步骤。在步骤 1 和步骤 8 之间,圆形精子细胞保持高度活跃的转录输出,接着是步骤 9-11(延长精子细胞),其中细胞核开始伸长,转录机器开始关闭,最后通过步骤 12-14(浓缩)精子细胞)。步骤 15-16(精子)的精子细胞表现出典型的钩状头部形态,准备释放到曲细精管的腔内<sup>[26]</sup>。在精子细胞发育期间,父系基因组被重新组织并包装到精子的高度凝聚的细胞核中。发生的巨大变化之一在于从基于核小体的染色质转变为基于鱼精蛋白的染色质阵列,这有助于精子头部凝结并保护父本 DNA 免受损伤和诱变<sup>[27]</sup>。

## 1.2.2 组蛋白-鱼精蛋白替换过程简介

精子的形成包括精原细胞分裂和分化成睾丸中的成熟精子。这个过程包括两个阶段：第一阶段包括有丝分裂和减数分裂，形成单倍体圆形精子细胞；第二阶段，称为精子发生，特征是圆形精子细胞分化为成熟精子<sup>[28]</sup>。分化发生在睾丸的生精小管中，并从外部进入该结构的内部，进而成熟的精子被释放到管腔中。染色质重塑是精子发生的重要事件之一<sup>[29]</sup>，而组蛋白-过渡蛋白-鱼精蛋白的替换是染色质重塑的重要过程。

在染色质重塑过程中，DNA 需要缩合，而 DNA 缩合需要去除大多数组蛋白，覆盖大部分基因组的组蛋白需要被鱼精蛋白取代。鱼精蛋白的丧失，或组蛋白的去除被影响皆会使雄性小鼠不育<sup>[30, 31]</sup>。机体通过核小体的翻译后修饰启动组蛋白去除。组蛋白 H4 的残基 K5 (H4K5) 和 K8 (H4K8) 的乙酰化为睾丸特异性溴结构域蛋白 BRDT 与核小体结合提供了结合位点<sup>[32]</sup>。在没有 BRDT-H4 结合的情况下，过渡蛋白 2 (TP2) 和鱼精蛋白 (PRM) 不能在延伸和缩合精子细胞的细胞核内正确定位，导致染色质浓缩异常进而导致不育的发生<sup>[33]</sup>。

鱼精蛋白-过渡蛋白-组蛋白替换开始于组蛋白 H4 在延长精子细胞中的高度乙酰化，之后组蛋白被替换，过渡蛋白定位到 DNA，最后用促进 DNA 缩合的鱼精蛋白替代过渡蛋白。鱼精蛋白替换组蛋白在染色质重塑中起到至关重要的作用。

## 1.2.3 鱼精蛋白的功能

在许多物种中，鱼精蛋白构成了成熟精子中最丰富的染色质成分<sup>[34]</sup>。鱼精蛋白通过自身在 DNA 小沟中的组装来稳定精子染色质<sup>[35]</sup>。鱼精蛋白中高水平的精氨酸介导强烈的 DNA 结合，而半胱氨酸则促进形成高度紧密染色质所必需的二硫键的形成<sup>[36]</sup>。此外，有人提出将鱼精蛋白与锌桥连接有助于 DNA-鱼精蛋白的结合<sup>[37]</sup>。组蛋白-鱼精蛋白的替换是为了形成高度紧密的染色质，为什么需要高度紧密的染色质以及鱼精蛋白起到什么重要作用？首先，精子染色质的凝缩可能有助于产生紧凑的流体动力学形状。其次，染色质的压实可以保护父系基因组免受物理和化学损伤。第三，鱼精蛋白可能参与表观遗传调控<sup>[34, 36, 38]</sup>。例如，用鹿精子进行的游泳测试表明，头部更长的精子游得更快<sup>[39]</sup>。在小鼠中，Prm1 或 Prm2 的一个等位基因的破坏会导致雄性不育<sup>[31]</sup>。以及与野生型精子的细胞核相比，具有更少量的鱼精蛋白的精子核对化学破坏的抵抗力较小<sup>[31]</sup>。此外，鱼精蛋白的减少会引起染色质包装，顶体形状以及精子整体结构的明显变化<sup>[35]</sup>。Prm2 缺陷的附睾精子在卵胞浆内进行单精子注射 (ICSI) 后，能够激活大多数中期 II 期的小鼠卵，但只有少数发育成胚胎<sup>[35]</sup>。同样，在人类中，低鱼精蛋白水平也与不育相关。

## 1.3 生殖细胞蛋白乙酰化修饰相关研究

### 1.3.1 生殖细胞组蛋白乙酰化修饰研究

在真核细胞中，组蛋白 (histone) 与 DNA 结合形成核小体，核小体是真核生物染色质的基本结构单元，染色质局部结构的变化对许多重要的生命活动过程产生影响，如 DNA 复制、RNA 转录、DNA 损伤修复、重组等。组蛋白翻译后修饰是影响染色质结构的重要因素，这些修饰主要发生在组蛋白末端的尾巴上，主要包括甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等修饰。乙酰化是一种常见的蛋白质翻译后修饰，一般情况下，组蛋白乙酰化有利于 DNA 与组蛋白八聚体的解离，核小体结构松弛，因为组蛋白含有大量的碱性氨基酸如精氨酸、赖氨酸等，

碱性残基能够与 DNA 暴露出的磷酸基团形成紧密结合, DNA 的转录活性直接受组蛋白与 DNA 的结合紧密程度所调控, 而结合的紧密程度直接受到组蛋白翻译后修饰的影响, 其中组蛋白乙酰化修饰是将负电性的乙酰基引入组蛋白的碱性残基上屏蔽组蛋白正电残基, 进而削弱了组蛋白与 DNA 的结合作用, 导致染色质结构变得松散, 从而转录因子和协同转录因子能与 DNA 结合位点进行特异性结合, 激活基因的转录<sup>[40]</sup>。

组蛋白去乙酰化过程则是将已经发生乙酰化的氨基酸水解, 使组蛋白重新暴露出正电性, 产生与 DNA 的紧密结合使转录活性下降基因沉默<sup>[41]</sup>。细胞核中, 组蛋白去乙酰化酶 HDAC 与组蛋白乙酰化转移酶 HAT 共同调控组蛋白乙酰化的动态平衡, 其中已发现的 HATs 包括 p300/CBP 家族、PCAF/GCN5 家族、SRC/ACTR 家族、MYST 家族、TAF II p250 家族等<sup>[42]</sup>, 已发现的 HDAC 已达到 19 种, 根据其同源性分为三类, 酵母 HDA1 同源、与酵母 SIR2a 同源、酵母 RPD3 同源<sup>[43]</sup>。在生殖细胞的发育过程中存在着大量的乙酰化修饰和去乙酰化修饰, 正是由于这两种乙酰化相关酶的相互调节使生殖细胞的增殖分化得以正常进行。

组蛋白乙酰化是精子形成的必要条件, 在圆形精子向长形精子分化的过程中精子的结构以及核内蛋白组成发生巨大变化, 核内组蛋白大量地被鱼精蛋白所替换, 组蛋白 H4 保持较高的乙酰化水平使核小体结构松散, 便于过渡蛋白和鱼精蛋白替换组蛋白, 组蛋白在最终形成的长形精子核蛋白中比重不足 5%<sup>[44]</sup>。

### 1.3.2 生殖细胞非组蛋白乙酰化修饰研究

蛋白质组学加速了内源性乙酰化蛋白质的发现与鉴定, 同时也揭示了非组蛋白乙酰化的调节过程。非组蛋白乙酰化的发现让 HAT 和 HDAC 分别更名为赖氨酸乙酰转移酶 (KAT) 和赖氨酸脱乙酰酶 (KDAC)。成千上万个乙酰化位点的鉴定激发了生物学工作者的巨大兴趣。并且, 越来越多的工作表明, 非组蛋白乙酰化参与了所有主要生物过程。

蛋白质组学分析证实非组蛋白乙酰化的频率非常高, 且这些蛋白构成哺乳动物细胞中乙酰化蛋白的主要部分。事实上, 非组蛋白乙酰化涉及生理和疾病相关的重要细胞过程, 如基因转录, DNA 损伤修复, 细胞分裂, 信号转导, 蛋白质折叠, 自噬和新陈代谢等

其中微管蛋白乙酰化水平对生殖细胞发育和精子活力具有重要影响。微管在生殖细胞以及体细胞中都大量存在, 微管蛋白 (Tubulin) 组装对微管的形成至关重要。Tubulin 的组装和活性都受到蛋白乙酰化修饰的调节。已有研究证明, 在精子形成过程中 Tubulin 乙酰化发挥重要作用, 如在分裂期以及精子的延伸过程中大量的 Tubulin 乙酰化被观察到<sup>[45]</sup>。Bhagwat, Dalvi 等人证实 Tubulin 乙酰化水平的异常会导致精子形成减少活力下降<sup>[46]</sup>, 并且 Tubulin 乙酰化水平直接影响生殖细胞形成过程中在睾丸基膜上的定位和移动<sup>[45]</sup>。

### 1.3.3 生殖细胞蛋白琥珀酰化修饰研究

赖氨酸琥珀酰化的发现源于对乙酰化进行的广泛研究。这些研究引起了人们对该领域的兴趣, 并引入了各种新的酰化, 包括琥珀酰化。琥珀酰化最初在大肠杆菌中被鉴定出来, 现在在真核生物中, 特别是在真核细胞的线粒体中<sup>[47, 48]</sup>也被鉴定出来。

乙酰化是酰化修饰中经过充分研究的 PTM, 它将从三羧酸 (TCA) 循环代谢物乙酰辅酶 A 中获得的乙酰基连接到蛋白质上, 该过程是可逆的。同样, 琥珀酰化从琥珀辅酶 A (TCA 循环的另一种代谢物) 中获得琥珀酰基。巧合的是, 琥珀酰化也是一个可逆的过程。此外, 乙酰化在线粒体中是非常普遍的, 对糖异生, 糖酵解, 脂肪酸代谢等过程特别重要<sup>[49, 50]</sup>。有趣的是, 琥珀酰化和乙酰化显示出大量相同的结合位点: 人类中高达 27%, 大肠杆菌中高达 66%, 这种重叠以及类似的定位说明琥珀酰化和乙酰化的作用相类似并可能存在相互

作用。目前的共识是，需要做更多的工作来充分阐明琥珀酰化参与的细胞相互作用。未来的工作应该把焦点转移到线粒体内赖氨酸的可逆琥珀酰化，以更好地理解细胞如何利用琥珀酰化介导的调节。

## 1.4 本论文主要研究内容及目的意义

已有研究报道，铅离子对生殖细胞的发育及精子形成具有显著影响，但其作用机理仍不清楚。生殖细胞内蛋白酰化修饰对精子的形成至关重要，然而有关铅离子对小鼠生殖细胞发育过程中蛋白酰化修饰的影响鲜有报道。因此，本研究主要采用腹腔注射的方法对小鼠进行体内攻毒，进而分析铅离子对小鼠生殖细胞发育过程中蛋白酰化修饰的影响，旨在从生殖细胞蛋白酰化修饰角度探讨铅离子的繁殖毒理作用机制。

本论文利用氯化铅腹腔注射法处理雄性小鼠，从小鼠出生 10 天后开始注射，每 2 天注射一次，氯化铅剂量为 1.5mg/kg 体重<sup>[8, 51]</sup>。利用 WB 检测技术分析测定不同发育时期睾丸内生殖细胞蛋白酰化修饰变化，主要包括生殖细胞蛋白乙酰化修饰以及琥珀酰化修饰；采用组织免疫荧光分析技术和免疫组化技术，测定不同发育时期小鼠生殖细胞蛋白酰化修饰变化以及精子发生过程中组蛋白-鱼精蛋白替换过程中过渡蛋白和鱼精蛋白表达量的变化，探讨铅离子对生殖细胞内蛋白酰化修饰的影响和对组蛋白-鱼精蛋白替换过程的影响；已有研究证实，三羧酸循环中的乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 是乙酰化修饰和琥珀酰化修饰的重要来源之一<sup>[48]</sup>，铅离子是否会通过影响能量代谢进而影响蛋白酰化修饰仍不清楚，所以本研究对能量代谢的标志物 ATP 含量、糖酵解的限速酶 PK 活性以及线粒体复合体 I 和 II 活性进行测定，探讨铅离子对小鼠生殖细胞能量代谢的影响。

本研究首次从生殖细胞蛋白酰化修饰变化的角度，探究铅离子对小鼠生殖细胞蛋白质翻译后酰化修饰的影响，深入探讨铅离子影响生殖细胞发育以及正常精子生成的毒理学机理，旨在为铅离子中毒疾病的防治提供新思路，为重金属铅离子对生殖系统作用的机理研究提供理论依据。

## 第二章 实验材料与方法

### 2.1 试剂和材料

试验用清洁级昆明系小白鼠雌鼠、雄鼠各 10 只，日龄 60d，体重约为 25g，购于中国科学院上海实验动物中心。试验用  $\text{PbCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\beta$ -巯基乙醇、甲醛、甲醇、丙烯酰胺、无水乙醇等购于上海化学试剂公司；蛋白琥珀酰化检测抗体（一抗）Anti-succinyllysine antibody、蛋白乙酰化检测抗体（一抗）Anti-acetyllysine antibody 购于杭州景杰生物有限公司； $\beta$ -Tubulin 抗体购于 Abmart 公司；碘化丙啶(PI)和（荧光二抗）Alexa 488-conjugated anti-mouse antibody 购买于 Invitrogen 公司；化学发光检测试剂盒（ECL）购于 GE healthcare 公司；PVDF 膜购于 Millipore 公司。线粒体复合体 I 和 II 试剂盒和丙酮酸激酶试剂盒购于上海少辛生物科技有限公司；ATP 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司；Tnp 抗体和 Prm 抗体购于 Proteintech 公司。化学发光检测仪器为 ChemiScopeMini 化学发光成像系统。

### 2.2 试验设计

将采购的试验小鼠放置于动物房饲养 15 天左右以减少环境应激，按 1:1 的比例随机挑选亲本雄鼠和雌鼠进行配对，共配 10 笼，待子一代小鼠出生后剔除雌性小鼠保留雄性个体。出生后第 10 天每窝随机挑选一半雄鼠按照 1.5mg/kg 体重腹腔注射  $\text{PbCl}_2$  溶液（经过高温灭菌）作为处理组，并剪右耳标记，每隔 2 天注射一次，一直注射到第 60 天，同窝剩余未处理小鼠作为对照组。分别在出生后第 20 天，40 天，60 天将对照组和处理组小鼠断颈处死并提取材料。

### 2.3 组织材料和蛋白的提取

睾丸组织固定：提前在 5 毫升离心管中加入 2 毫升的 4% 甲醛溶液，将小鼠断颈处死后进行解剖，完整地取出双侧睾丸放入于 4% 甲醛溶液中，注意保持睾丸的完整性减少睾丸在空气中暴露时间，解剖过程中若睾丸表面有异物可用无菌水冲洗，将睾丸组织置于 4℃ 冰箱中统一保存，最终使用组织免疫荧光技术进行检测。

睾丸内蛋白的提取：取 2 毫升磷酸缓冲液（PBS）于 5 毫升离心管中，将小鼠断颈处死后解剖，取出双侧睾丸后用眼科手术剪剪碎（若睾丸表面存在较多污染物使用磷酸缓冲液进行冲洗），放入提前在 37℃ 水浴锅温育的磷酸缓冲液中，待睾丸内的细胞充分游离后，去除大的睾丸组织块， $13 \times 10^3 g$  离心 7min，用移液枪吸取上清液丢弃，注意不要将底层细胞吸入，后加入 1 毫升的磷酸缓冲液用移液枪进行吹打，清洗三次，第三次清洗之后不加入 PBS 再次离心彻底清除残留的 PBS，向细胞沉淀中按照两倍体积加入蛋白裂解液（Sample Buffer）悬浮细胞沉淀，100℃ 干浴 6min， $13.5 \times 10^3 r/min$  离心 10min，小心吸取上清液于新的 1 毫升离心管中，按照液体的量加入 1/10 体积的  $\beta$ -巯基乙醇，100℃ 干浴 3min，做好标记放置于 -80℃ 冰箱中保存。

## 2.4 SDS-PAGE及蛋白免疫印迹

蛋白样品解冻后, 用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific) 测定样品浓度, 每个样品测三次取平均值。之后按 60 $\mu$ g/孔的上样量进行加样, 用丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质; 再进行电转移 2h, 电压为 90V, 隔一小时进行一次换冰, 将蛋白转移到 PVDF 膜上。用含有 1% 或 5% 牛血清蛋白 (BSA) 的 TBST 封闭液对膜室温封闭 1h。TBST 洗 3 次, 每次 8min, 一抗孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜。Anti-Ace 抗体浓度 1:2500, Anti-Suc 抗体浓度 1:2000。TBST 洗 3 次, 每次 8min, 二抗孵育, 室温孵育 1h。加入化学发光剂 ECL (约 2mL) 对膜孵育 2min 后, 用化学发光仪进行自动曝光拍照。将拍完照后的 PVDF 膜置于 20mL 蛋白膜再生液中, 置于摇床上洗 1h, 重复上述封闭、一抗、二抗等步骤, 得到内参  $\beta$ -Tubulin 的 western-blot 结果。使用软件 ImageJ v1.48 对 Western-blot 结果进行灰度值分析。

## 2.5 ATP水平测定

ATP 水平检测: 本次试验使用碧云天 ATP 检测试剂盒。取 100  $\mu$ L 待测精子样品经稀释后于 37 $^{\circ}$ C 复苏 20 分钟, 孵育结束后 550 g 离心 5 min 去除上清, 并用 PBS 清洗精子 2 次 (550 g, 5 min), 第三次用 8000 g 离心 8 分钟, 去上清。后向沉淀中加入 ATP 检测裂解液 200  $\mu$ L, 冰上裂解 10 分钟后 8000 g 离心 10 分钟, 取上清置于新 EP 管中, 用 96 孔板进行检测, 每孔中加入 50  $\mu$ L 样品并加入 200  $\mu$ L 检测液, 用酶标仪检测发光强度。参数设置依照说明书。

## 2.6 PK活性测定

先提取睾丸细胞, 测定浓度后收集到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量: 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例加入提取液, 本实验采用的是每 500 万细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细胞 (冰浴, 功率 200 w, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次); 8000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清, 置冰上待测。分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 340 nm, 蒸馏水调零。将工作液、试剂三和试剂四 (预先按照说明书配置) 37 $^{\circ}$ C 预热 10 min, 在 1mL 石英比色皿中加入 900  $\mu$ L 工作液、30  $\mu$ L 试剂三、15  $\mu$ L 试剂四和 30  $\mu$ L 样本, 立即混匀, 加样本的同时开始计时, 在 340 nm 波长下记录 20 s 时的初始吸光度 A1 和 2 分 20s 时的吸光度 A2, 计算  $\Delta A = A1 - A2$ , 之后按照说明书中的公式进行 PK 活力的计算。

## 2.7 线粒体复合体I和II活性测定

准确收集 500 万细胞, 加入 1 mL 试剂一和 10  $\mu$ L 试剂三 (预先按照说明书配置), 用冰浴匀浆器匀浆, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min., 弃上清, 在沉淀中加入 200  $\mu$ L 试剂二和 2  $\mu$ L 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 200 w, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 用于复合体 I 和 II 酶活性测定。分光光度计预热 30 min 以上, 测定线粒体复合体 I 时调节波长至 340 nm, 蒸馏水调零。将工作液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 在 1 mL 石英比色皿中加入 40  $\mu$ L 样本、800  $\mu$ L 工作液和 60 $\mu$ L 试剂六, 立即混匀, 记录 340 nm 处初始吸光值 A1 和 2 min 后的吸光值 A2, 计算  $\Delta A = A1 - A2$ , 之后按照说明书中的公式进行活力的计算; 测定线粒体复合体 II 时调节波长至 605 nm, 蒸馏水调零。将工作液 (按

照说明书配置)置于 37℃ 预热 5 min, 在 1 mL 石英比色皿中加入 40  $\mu$ L 样本、800  $\mu$ L 工作液和 100  $\mu$ L 试剂七, 立即混匀, 记录 605 nm 处初始吸光值 A1 和 2 min 后的吸光值 A2, 计算  $\Delta A = A1 - A2$ , 之后按照说明书中的公式进行活力的计算。

## 2.8 组织的免疫荧光

将小鼠睾丸置于 4%多聚甲醛固定液中 4℃ 条件下放置 24 h 以上后备用。脱蜡、水化。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 80% 甲醇, 室温静置 10 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 抗原修复, PBS 洗 3 次各 5 min; 加入封闭液, 室温封闭 25 分钟, 清除剩余封闭液; 加入经过稀释到合适浓度的一抗, 4℃ 过夜; 37℃ 复温 45 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入与一抗相对应的二抗, 室温孵育 1.5 h, PBS 清洗 5 次, 每次 6 min; 二氨基联苯胺 (DAB) 孵育 10 min, 在显微镜下观察控制染色程度; PBS 清洗 8 分钟, 然后进行苏木精染色 2 min, 盐酸酒精分化; 自来水冲洗 10-15 min; 脱水、透明、封片、镜检。用激光共聚焦显微镜选取合适视野获取图像。

## 2.9 数据统计分析

本试验数据用 Mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) 表示, 使用 SPSS17.0 和 Excel 2016 进行数据录入和非配对双向  $t$  检验进行统计分析, 差异显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 第三章 结果及分析

### 3.1 $Pb^{2+}$ 对小鼠睾丸和产子数的影响

铅离子对小鼠睾丸和产子数的影响结果见图 1。结果显示,处理组小鼠的产子数显著少于对照组, 20、40、60 日龄处理组小鼠的睾丸体重比显著低于对照组, 以及铅处理组后代出现弱子, 我们也观察到了显著的器官损伤 (图 1-D)。这说明铅离子对睾丸造成了影响进而影响了小鼠的繁殖能力。

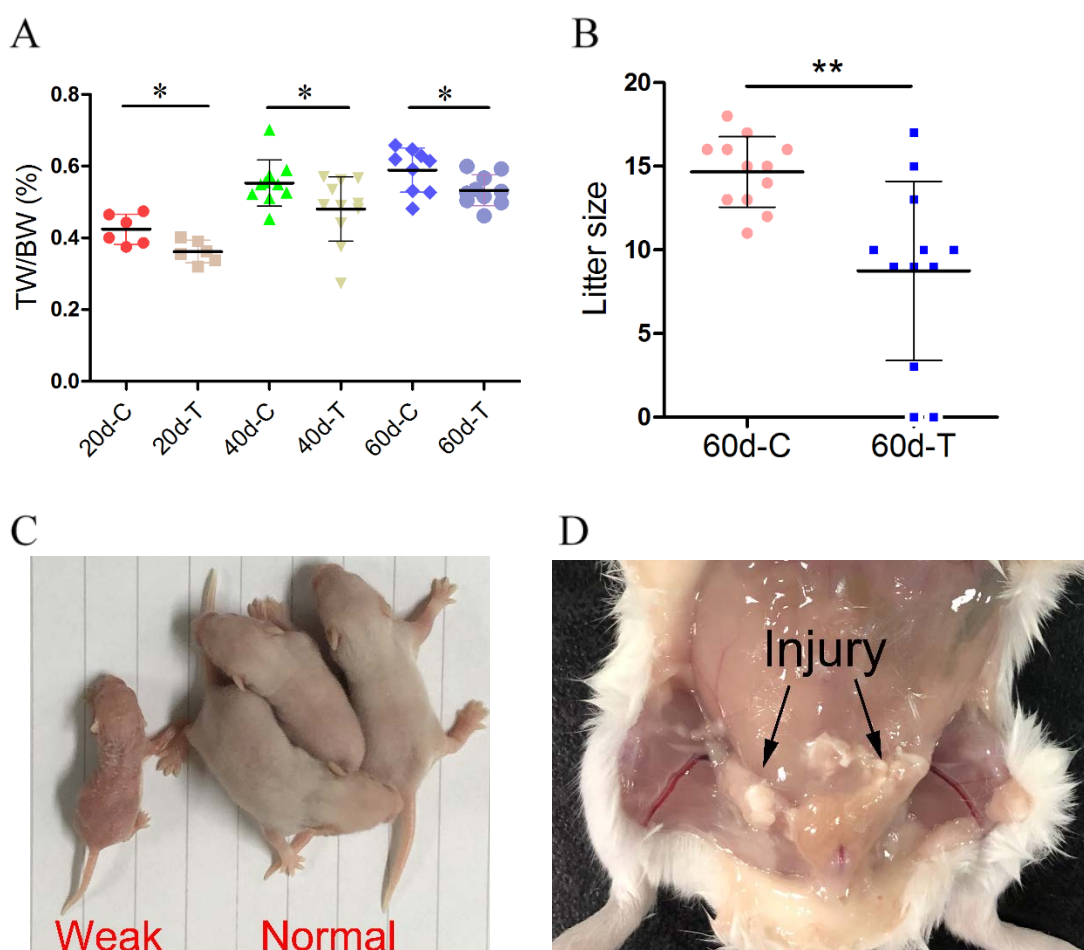


图 1.  $Pb^{2+}$ 对小鼠睾丸和产子数的影响

注: A 为睾丸体重比( $n \geq 6$ ); B 为产子数( $n > 10$ ); C 为铅处理组后代出现弱子; D 为铅注射造成器官损伤;

差异显著性水平\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Fig.1. Effects of  $Pb^{2+}$  on testis and litter size of mice

Note: A: Testis weight/Body weight ( $n \geq 6$ ). B: Litter size ( $n > 10$ ); C: Pb led to female mice producing weak

offspring. D: Intraperitoneal injection of Pb could injure mouse organs

All data were expressed as means  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 3.2 小鼠睾丸组织切片图

$Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸组织的影响结果见图 2。对比 20 日龄小鼠睾丸组织处理组 and 对照组,我们发现处理组中生殖细胞数量明显减少,组织中央出现空腔(见图 2-A2, A3),这说明铅离子对小鼠睾丸造成严重损伤。对比 40 日龄小鼠睾丸组织处理组和对照组,我们可以观察到处理组中出现形态异常的生殖细胞(见图 2-B2, C3)、组织间隙出现空腔(见图 2-C3)以及细胞数量明显减少,组织切片结果与图 1 中处理组睾丸体重比显著下降的结果相互印证。

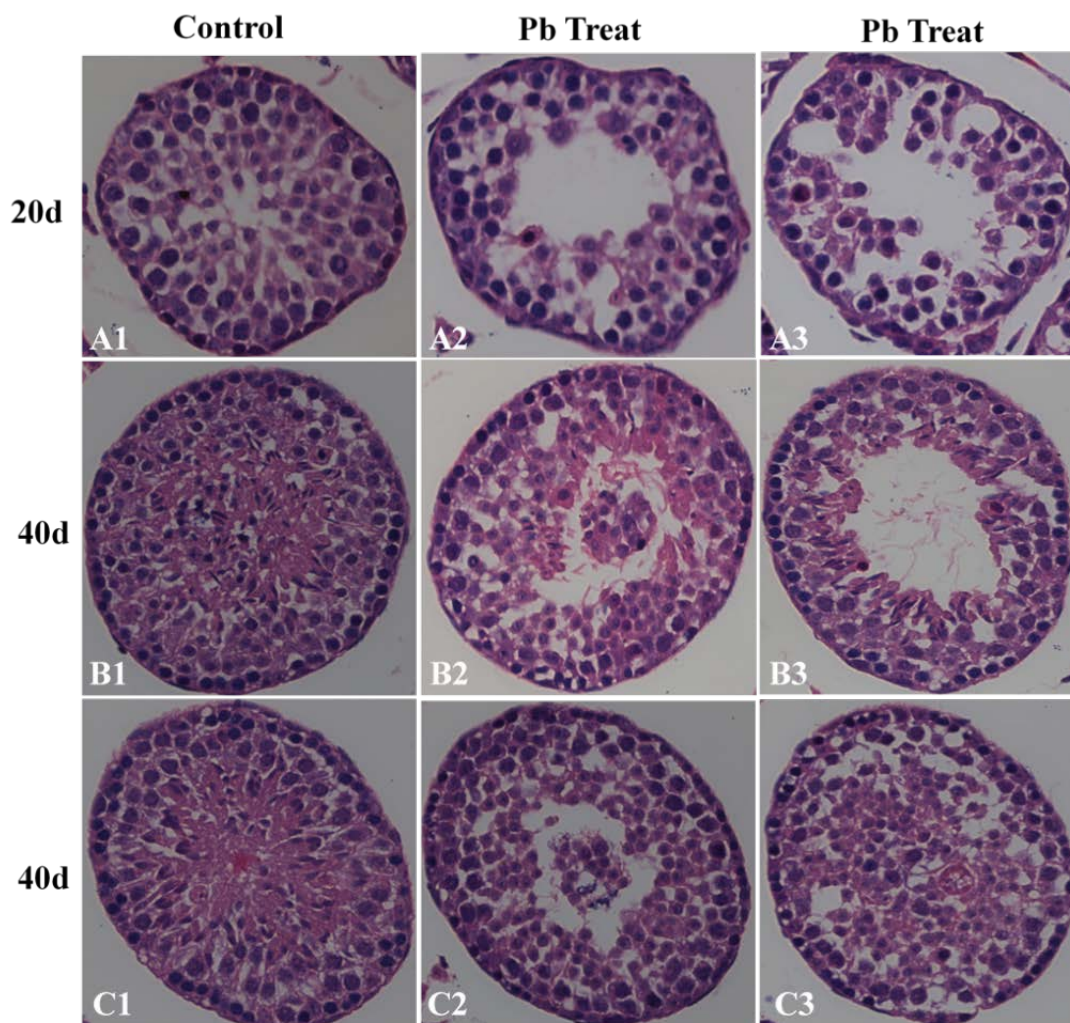


图 2.  $Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸组织的影响

注: A1 为 20 日对照组; A2、A3 为 20 日处理组; B1、C1 为 40 日对照组, B2、B3、C2、C3 为 40 日处理组

Fig.2. Effects of  $Pb^{2+}$  on testicular tissue in postnatal day 20 and 40.

Note: A1: The control group of postnatal day 20; A2 and A3: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 20; B1 and C1: The control group of postnatal day 40; B2,B3, C2 and C3: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 40.

### 3.3 $Pb^{2+}$ 对小鼠发育过程中睾丸内生殖细胞蛋白乙酰化修饰的影响

铅离子对小鼠发育过程中生殖细胞内蛋白乙酰化修饰的影响 WB 结果如图 3。结果显示，小鼠生殖细胞蛋白乙酰化修饰主要发生在 55KDa 左右的微管蛋白，以及 15KDa 左右的组蛋白。出生后 20、40、60 天小鼠睾丸中生殖细胞内微管蛋白和组蛋白均发生乙酰化修饰，组蛋白乙酰化修饰水平和微管蛋白乙酰化修饰水平均随时间而逐渐增强。分别比较不同时期处理组与对照组，20 天对照组全蛋白乙酰化水平更高，尤其是对照组组蛋白乙酰化水平显著高于处理组；40 天、60 天对照组全蛋白乙酰化水平均显著高于处理组，其中对照组的微管蛋白和组蛋白乙酰化修饰水平皆高于处理组，说明铅离子对不同发育时期小鼠睾丸内生殖细胞微管蛋白和组蛋白乙酰化修饰均有显著抑制作用。

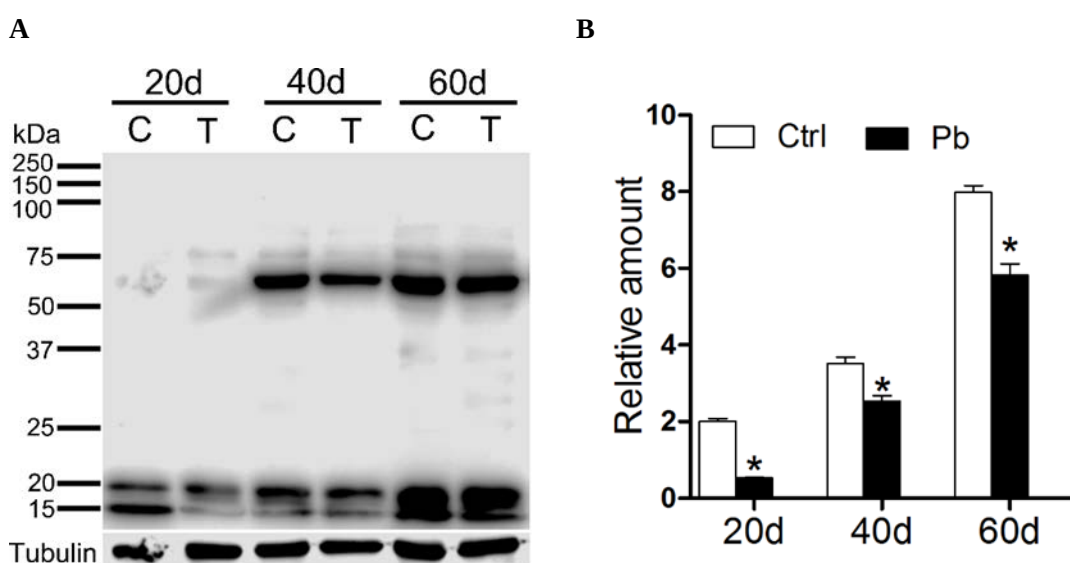


图 3. 铅离子对发育过程中小鼠睾丸内生殖细胞蛋白乙酰化的影响，差异显著性水平\* $p < 0.05$ ( $n=3$ )

注：A：蛋白乙酰化修饰 WB；B：WB 定量结果； $\beta$ -tubulin 作为内参蛋白

**Fig.3. Effects of  $Pb^{2+}$  on protein acetylation in mice testes cells during different development stages. All data were expressed as means  $\pm$  SD of three samples. \* $p < 0.05$ . ( $n=3$ )**

Note: A: WB of protein acetylation; B: The quantified results of WB;  $\beta$ -tubulin as inner control.

### 3.4 $Pb^{2+}$ 对小鼠发育过程中睾丸生殖细胞蛋白琥珀酰化修饰的影响

铅离子对发育过程中小鼠生殖细胞内蛋白琥珀酰化的影响 WB 结果见图 4。结果显示，不同发育时期小鼠生殖细胞琥珀酰化修饰蛋白分子量跨度很大，从 25KDa 到 250KDa 均有被修饰条带，其中以 40、50、75KDa 的蛋白修饰最为明显。在小鼠出生 20 天后，睾丸内生殖细胞琥珀酰化修饰水平较低，且对照组与处理组修饰差异不明显。但处理组小鼠出生后 40 天和 60 天生殖细胞内琥珀酰化水平明显弱于对照组，说明在小鼠发育过程中，铅离子对生殖细胞蛋白琥珀酰化有抑制作用。同时可以观察到琥珀酰化修饰在 40 天和 60 天中保持着较高的水平，提示琥珀酰化对于生殖细胞的形成具有重要功能。

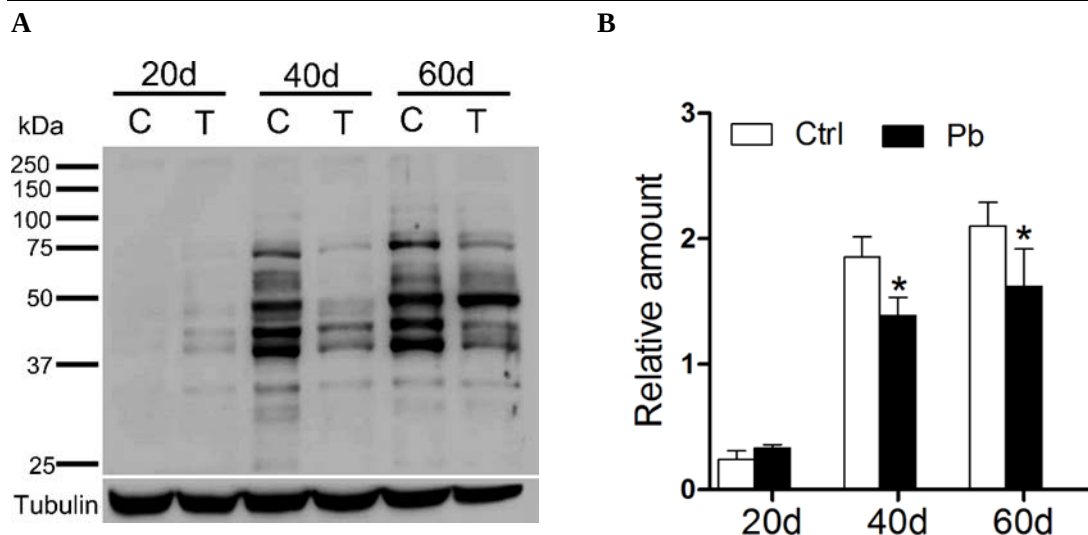


图 4. 铅离子对发育过程中小鼠睾丸内生殖细胞蛋白琥珀酰化的影响, 差异显著性水平 $*p < 0.05(n=3)$

注: A: 蛋白琥珀酰化修饰 WB; B: WB 定量结果;  $\beta$ -tubulin 作为内参蛋白

**Fig.4. Effects of  $Pb^{2+}$  on protein succinylation in mice testes cells during different development stages. All data were expressed as means  $\pm$  SD of three samples.  $*p < 0.05.(n=3)$**

Note: A: WB of protein succinylation; B: The quantified results of WB;  $\beta$ -tubulin as inner control.

### 3.5 $Pb^{2+}$ 对小鼠不同发育时期睾丸蛋白乙酰化和琥珀酰化修饰的影响 (免疫荧光图)

20、40、60 日龄小鼠睾丸蛋白酰化修饰变化及  $Pb^{2+}$ 对蛋白乙酰化、琥珀酰化修饰的影响结果见图 5。结果显示, 20 日龄小鼠睾丸内精原细胞蛋白乙酰化修饰程度较高, 而曲细精管内的精母细胞乙酰化修饰较弱 (结果见图 5-A1)。另外, 对比睾丸内生殖细胞蛋白乙酰化与琥珀酰化修饰, 显示 20 日龄小鼠生殖细胞蛋白乙酰化主要发生在核内, 而琥珀酰化主要发生在细胞质中。 $Pb^{2+}$ 处理的 20 日龄小鼠睾丸内生殖细胞蛋白乙酰化修饰与对照组相比存在明显差异, 处理组的乙酰化修饰明显被铅离子抑制, 曲细精管外侧的精原细胞以及内部的精母细胞乙酰化修饰水平均减弱 (结果见图 5-A1, B1)。20 日龄  $Pb^{2+}$ 处理组小鼠生殖细胞蛋白琥珀酰化修饰与对照组相比并未明显变化, 并且明显观察到处理组和对照组的琥珀酰化修饰均处于低水平 (结果见图 5-A2, B2)。

40 日龄对照组小鼠睾丸精原细胞蛋白乙酰化修饰程度相较于 20 天对照组明显减弱, 而且睾丸内出现大量高乙酰化水平的圆形精子细胞, 但是处理组中睾丸内圆形精子细胞蛋白乙酰化修饰明显减弱 (结果见图 5-C1, D1)。40 日龄中, 对照组小鼠睾丸内蛋白琥珀酰化修饰程度强于 20 日龄。与对照组相比, 处理组中的乙酰化修饰明显呈现出更低水平。 $Pb^{2+}$ 处理组中睾丸内圆形精子细胞数量明显减少, 预示着  $Pb^{2+}$ 影响睾丸生殖细胞发育进程及生殖细胞数量 (结果见图 5-C3, D3)。

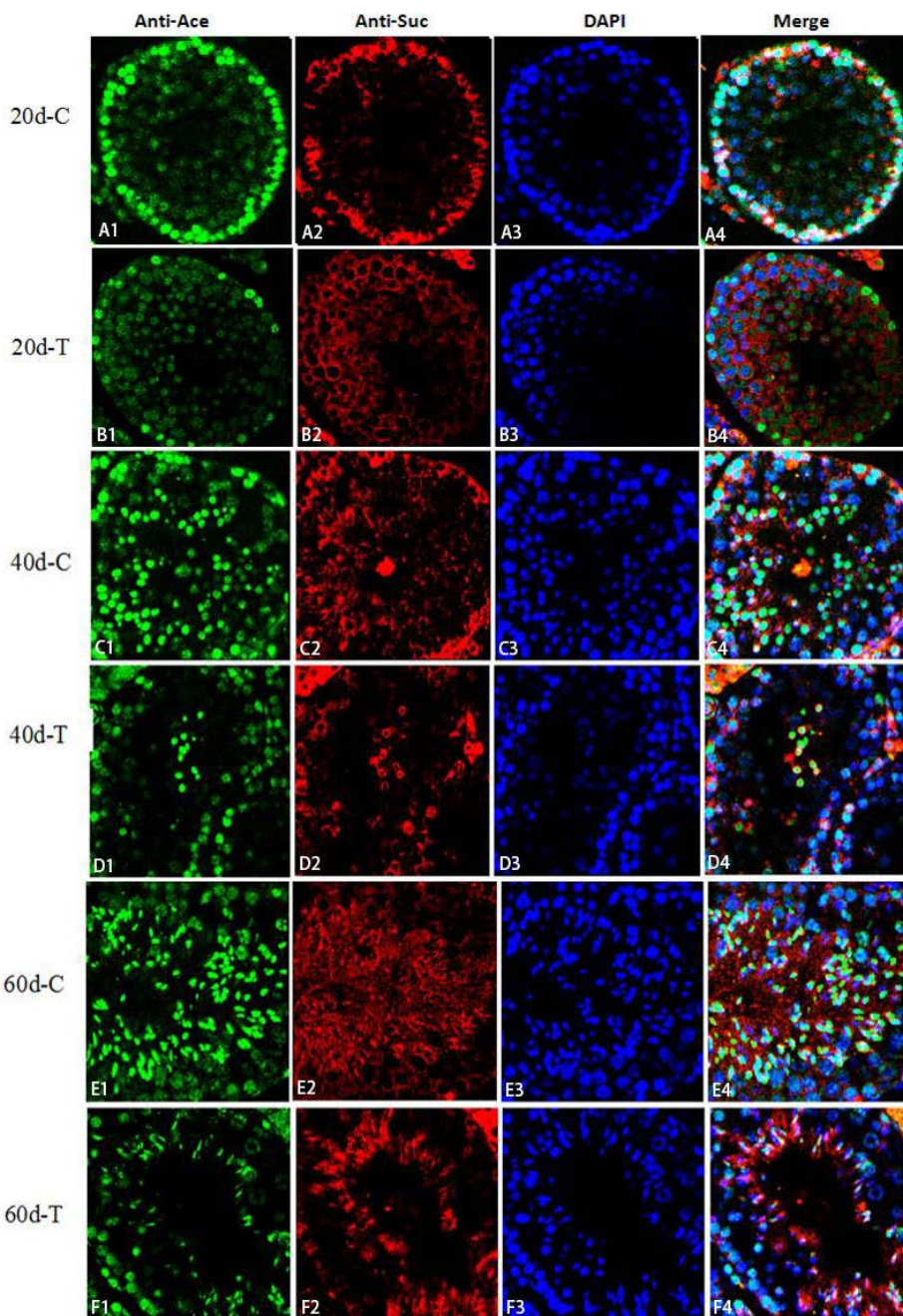


图 5.  $Pb^{2+}$  对小鼠 20、40、60 日龄睾丸生殖细胞内蛋白乙酰化和琥珀酰化修饰的影响

注：A 为 20 日对照组；B 为 20 日处理组；C 为 40 日对照组、D 为 40 日处理组；E 为 60 日对照组、F 为 60 日处理组。

**Fig.5. Effects of  $Pb^{2+}$  on protein acetylation and succinylation of germ cells in postnatal day 20, 40 and 60.**

Note: A: The control group of postnatal day 20; B: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 20;  
C: The control group of postnatal day 40; D: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 40.  
E: The control group of postnatal day 60; F: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 60.  
C means control; T means treatment.

60 日龄小鼠睾丸曲细精管内腔周围圆形精子细胞及长形精子细胞数量明显增加，少量成熟精子头部外型清晰可见（结果见图 5-E4）。从生殖细胞蛋白乙酰化修饰及琥珀酰化修饰

变化来看, 此时期生殖细胞蛋白乙酰化及琥珀酰化修饰均较为明显。同对照组相比,  $Pb^{2+}$  处理组 60 日龄小鼠睾丸曲细精管内圆形精子细胞及长形精子细胞数量明显减少 (结果见图 5-F4)。同样,  $Pb^{2+}$  处理组中睾丸内圆形精子细胞及长形精子细胞蛋白乙酰化修饰及琥珀酰化修饰程度都明显降低 (结果见图 5-E, F)。

### 3.6 $Pb^{2+}$ 对小鼠 40, 60 日龄睾丸生殖细胞内代谢酶活性和 ATP 水平的影响

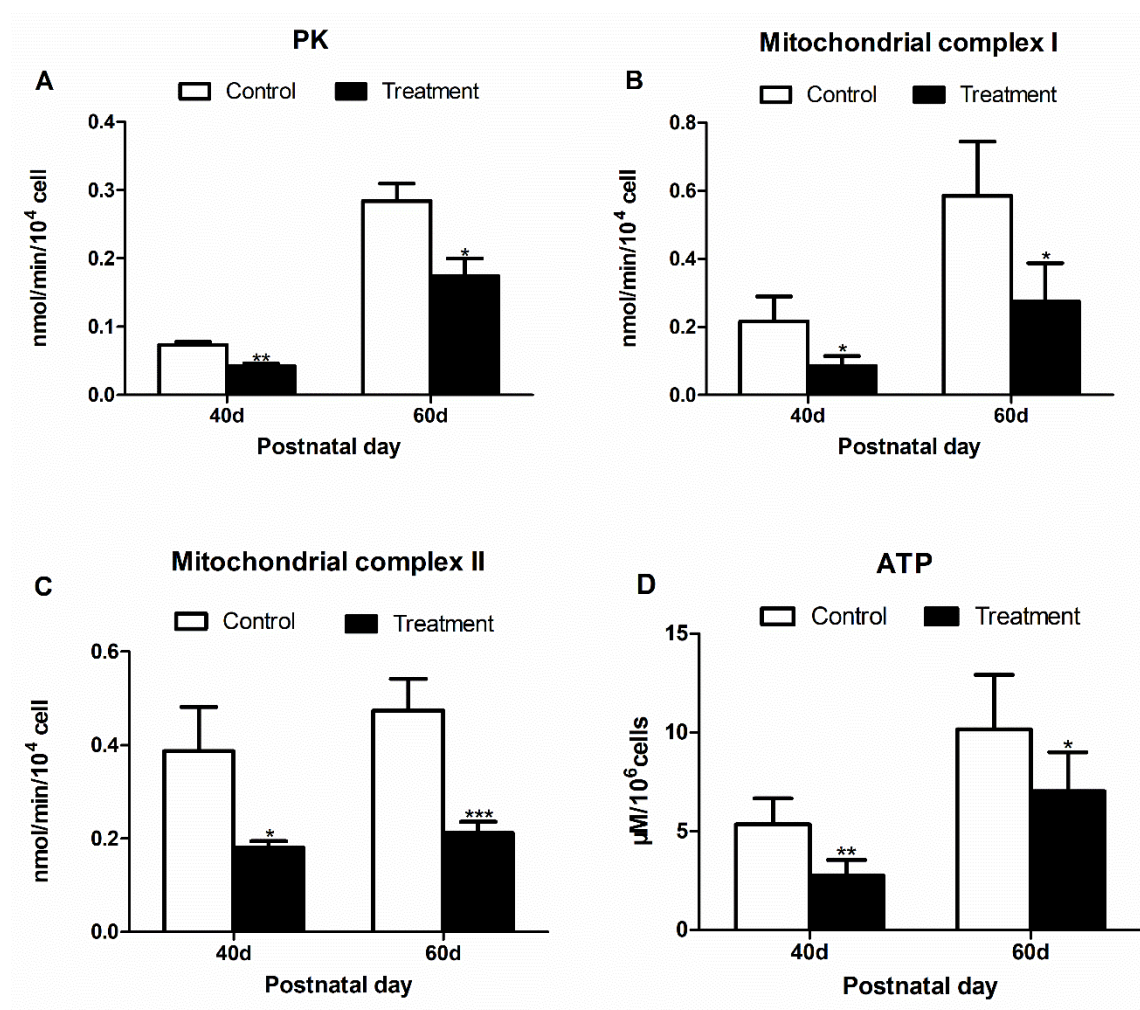


图 6.  $Pb^{2+}$  对小鼠 40, 60 日龄时睾丸生殖细胞内 PK 活性、线粒体复合体 I 活性、线粒体复合体 II 活性和 ATP 水平的影响

注: A 为 PK (n=3); B 为线粒体复合体 I (n=3);

C 为线粒体复合体 II (n=3); D 为 ATP 水平 (n=8) 差异显著性水平 \* $p < 0.05$

**Fig.6. Effects of  $Pb^{2+}$  on PK activity, Mitochondrial Complex I activity, Mitochondrial Complex II activity and ATP levels in testicular germ cells of mice at 40 and 60 postnatal days**

Note: A: PK activity (n=3); B: Mitochondrial Complex I activity (n=3); C: Mitochondrial Complex II activity (n=3);

D: ATP levels (n=8). All data were expressed as means  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ .

铅离子对 PK 活性、线粒体复合体 I 活性、线粒体复合体 II 活性和 ATP 水平的影响见图 6, 结果显示铅离子显著抑制出生后 40 和 60 天小鼠生殖细胞内 PK 的活性以及显著降低出生后 40 和 60 天小鼠生殖细胞内 ATP 水平。PK 是糖酵解的限速酶之一, 这提示铅离子会抑制 TCA 循环。此外, 出生后 40 和 60 天小鼠生殖细胞中线粒体复合体 I 和线粒体复合体 II 的活性被铅离子显著抑制, 这提示铅离子会抑制能量的产生。

### 3.7 生殖细胞的分离

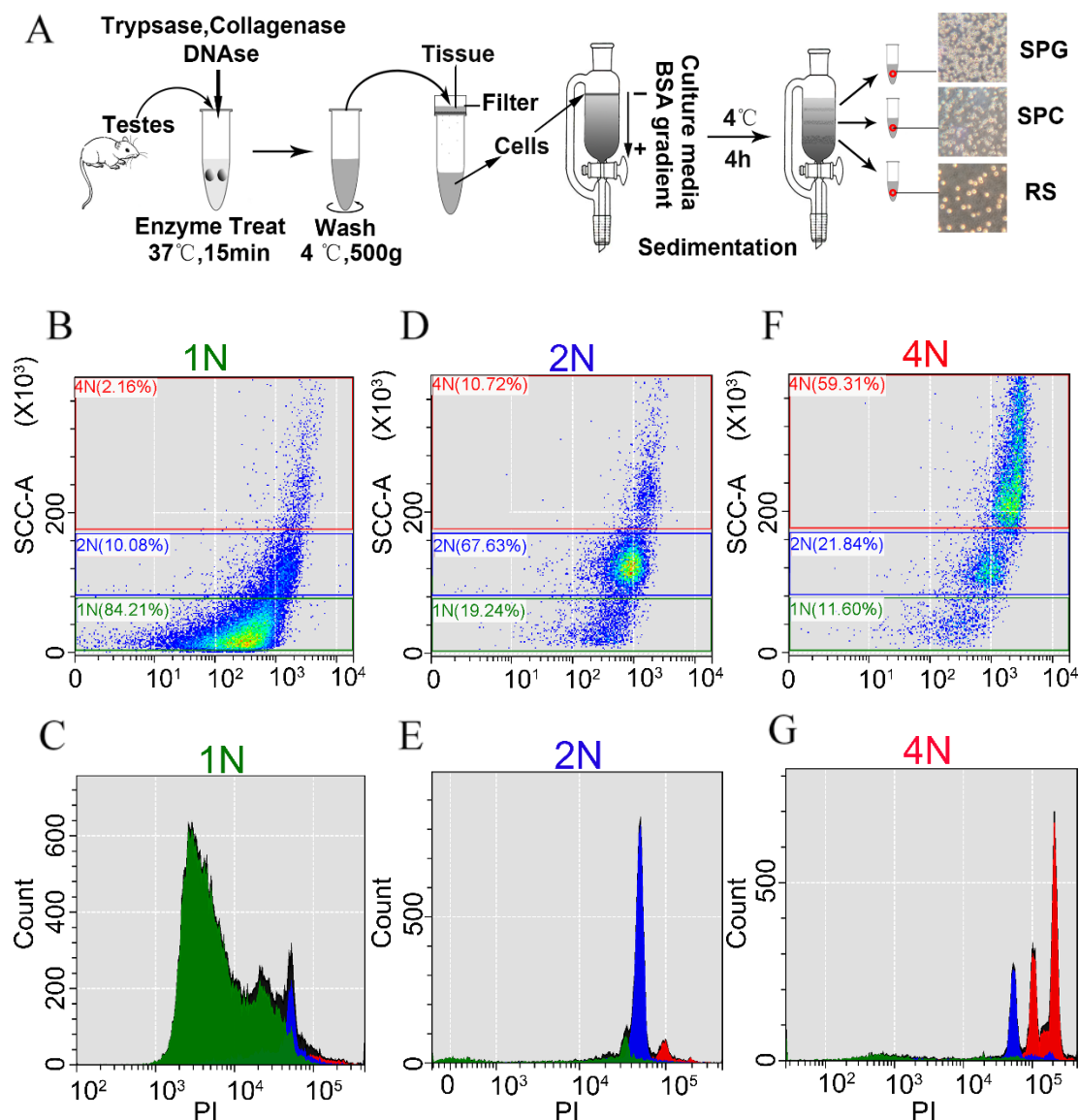


图 7. 生殖细胞的分离

注: (A)生殖细胞分离流程图, 生殖细胞按染色体数量分为 3 组(1N 组、2N 组和 4N 组)。N 表示一组染色体; (B)和(C)用绿色表示 1N 细胞; (D)和(E)用蓝色表示 2N 细胞。(F)和(G)用红色表示 4N 细胞。

**Fig.7. Separation of different reproductive cells**

Note: (A) Brief flow diagram of the separation of different germ cells. Reproductive cells were divided into three groups (1N, 2N and 4N) based on their amount of chromosomes. N indicates one set of chromosomes. (B) and (C) represent the 1N cells in green. (D) and (E) represent the 2N cells in blue. (F) and (G) represent the 4N cells in red.

40 天、60 天小鼠生殖细胞蛋白乙酰化修饰的抑制（图 5）提示乙酰化修饰的异常可能会影响生殖细胞减数分裂和精子伸长等过程，所以我们对生殖细胞进行了分离。生殖细胞分离的流式细胞仪检测结果如图 7 所示，1N、2N、4N 细胞的纯度分别为 84.21%、67.63%和 59.31%，这说明我们对于睾丸不同生殖细胞的分离是有效的，可以进行后续试验。

### 3.8 $Pb^{2+}$ 抑制SPG、RS和减数分裂时生殖细胞蛋白乙酰化修饰

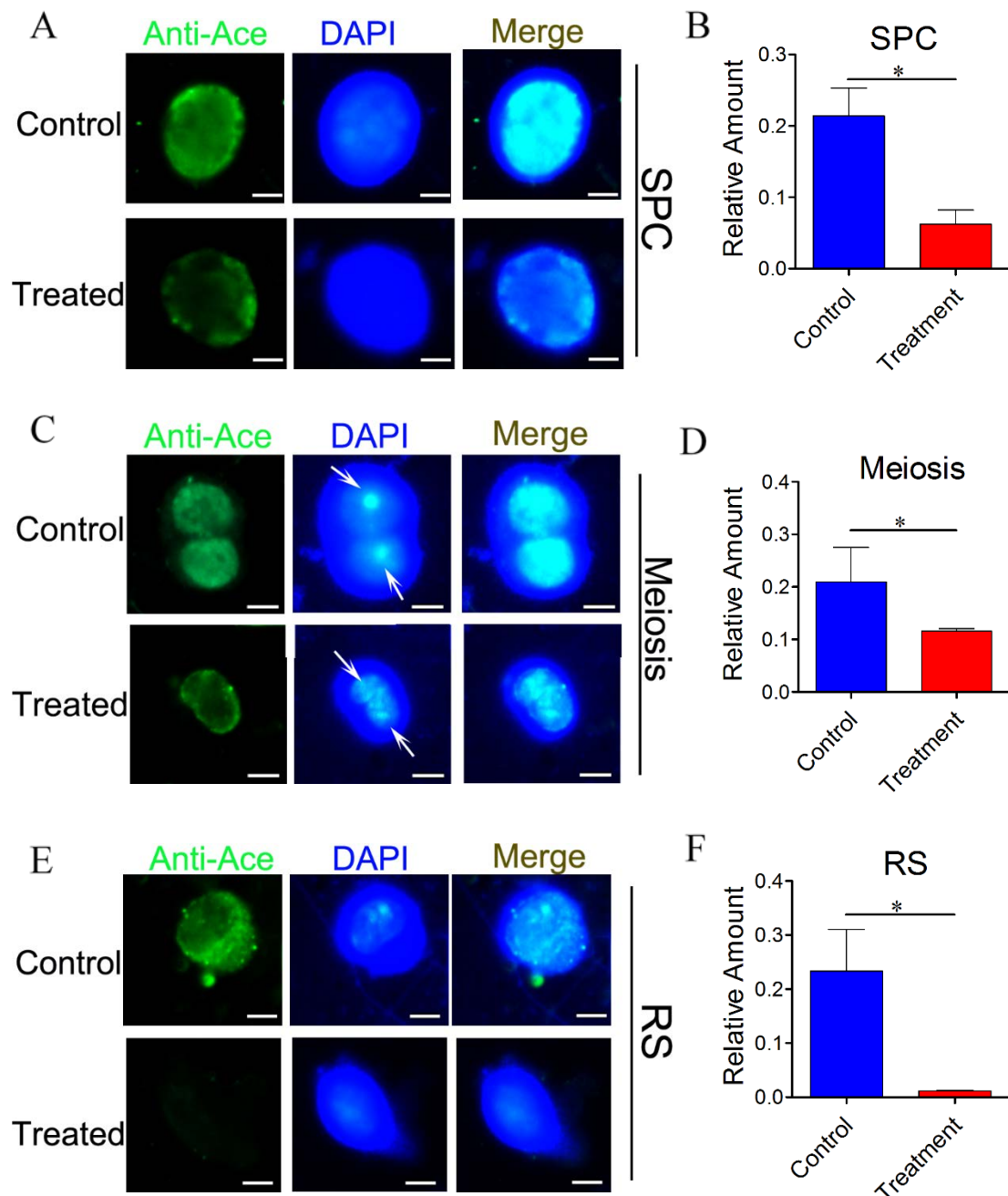


图 8.  $Pb^{2+}$ 抑制 SPG、RS 和减数分裂时生殖细胞蛋白乙酰化修饰

注：左侧为细胞免疫荧光，右侧为相应的定量分析；SPC:减数分裂精母细胞，RS:圆形精子细胞。绿色表示 Pan anti-Kac 抗体。白色箭头表示细胞减数分裂。所有数据均以均值±方差(n=3)表示，\* $p < 0.05$ 。

Fig.8. Kac levels in SPC, RS, and meiosis are decreased by  $Pb^{2+}$

Note: Immunofluorescence of cells is presented on left, and the right panels represent the corresponding quantitative analysis. SPC: meiotic spermatocyte, RS: round spermatid. Pan anti-Kac antibody was used in IF and is shown in green. White arrows indicate meiosis of cell. All data are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments, \* $p$ <0.05.

铅显著抑制了 SPC（减数分裂精母细胞）的蛋白乙酰化修饰（与图 5-A1,B1 中的结果一致）和 RS（圆形精子）的蛋白乙酰化修饰（与图 5-E1, F1 中的结果一致）。以及我们发现生殖细胞减数分裂过程中出现了乙酰化的高表达（见图 8-C），铅显著抑制了这种高表达。

### 3.9 $Pb^{2+}$ 对小鼠20、40日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白和鱼精蛋白表达量的影响

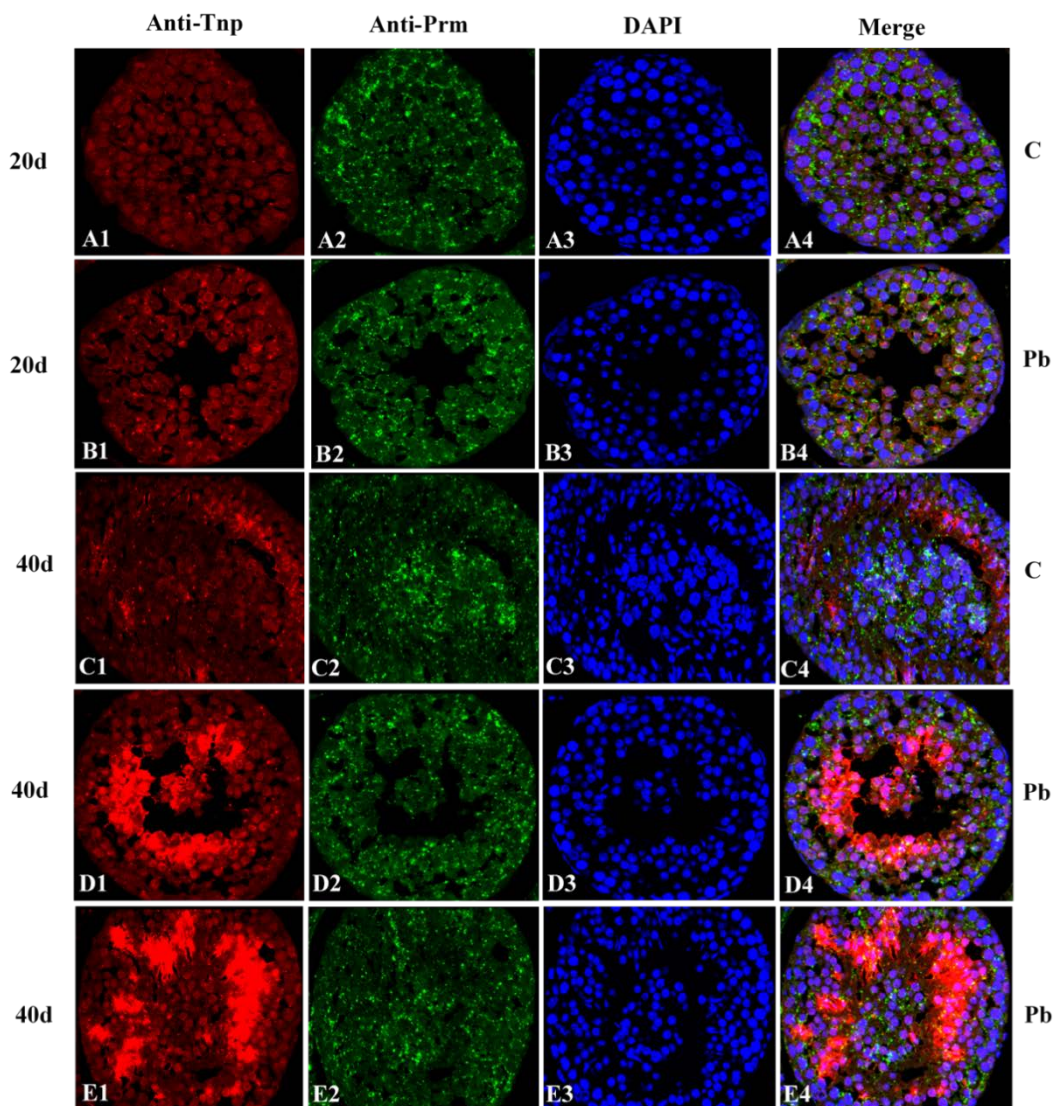


图 9.  $Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白和鱼精蛋白表达量的影响

注: A 为 20 日对照组; B 为 20 日处理组; C 为 40 日对照组; D 为 40 日处理组; E 为 40 日处理组

Fig.9. Effects of  $Pb^{2+}$  on transition protein and protamine of germ cells

### in postnatal day 20 and 40.

Note: A: The control group of postnatal day 20; B: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 20;  
C: The control group of postnatal day 40; D: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 40.  
E: The  $Pb^{2+}$ -treatment group of postnatal day 40.; C means control; Pb means treatment.

$Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白和鱼精蛋白表达量的影响结果见图 9。结果显示,20 日龄小鼠睾丸生殖细胞内鱼精蛋白的表达量高于过渡蛋白(见图 9-A1,A2,A4),这提示鱼精蛋白的表达可能先于过渡蛋白,另外 20d 处理组过渡蛋白的表达量高于对照组,说明铅离子可能促进了过渡蛋白的表达。鱼精蛋白和过渡蛋白都集中表达于圆形精子向长形精子发育的过程(见图 9-C2, D1 等),对比 40d 处理组和对照组中过渡蛋白的表达量,我们发现处理组中的过渡蛋白表达量远高于对照组(见图 9-C1,D1,E1),对比 40d 处理组和对照组中鱼精蛋白的表达量,我们发现对照组中的鱼精蛋白的表达量略高于处理组。有趣的是,在 40d 对照组中,我们发现处于伸长期的精子中鱼精蛋白表达较强,过渡蛋白表达较弱;而在 40d 处理组中,伸长期的精子中过渡蛋白表达异常强烈,鱼精蛋白表达微弱,这说明铅离子导致了过渡蛋白-鱼精蛋白替换过程的异常(见图 9-C1,C2,D1,D2)。已有研究报道,乙酰化介导的蛋白酶体降解是在精子发生过程中去除乙酰化组蛋白 H4 所必需的<sup>[52]</sup>,并且类似的机制也可能对过渡蛋白在晚期精子发生步骤中的降解起作用。在这种情况下,值得注意的是,两种主要的内源性过渡蛋白 TP1 和 TP2 都被乙酰化,这提示铅离子可能通过抑制过渡蛋白乙酰化导致过渡蛋白在细胞内沉积。与此同时,也有文献报道,高乙酰化水平会抑制 TP2 与 NPM3 的相互作用进而影响 TP2 在染色质上的沉积<sup>[53]</sup>,这提示在低乙酰化水平下,过渡蛋白在染色质上的高量表达可能是上述两方面共同导致的结果。过渡蛋白,组蛋白 H1 变体(H1LS 和 H1T2),以及在精子发生过程中表达并沉积在染色质上的鱼精蛋白等可能通过自聚集或与核酸和其他蛋白质混杂而对细胞造成损伤<sup>[53]</sup>。

### 3.10 $Pb^{2+}$ 对小鼠20、40日龄睾丸生殖细胞过渡蛋白表达量的影响

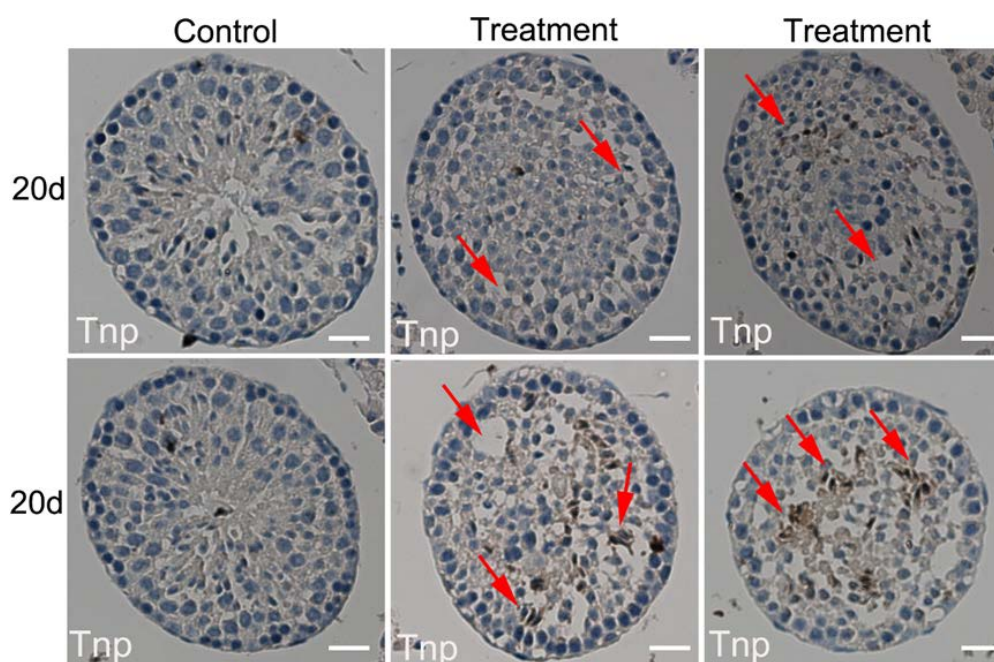


图 10 (1).  $Pb^{2+}$ 对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白表达量的影响

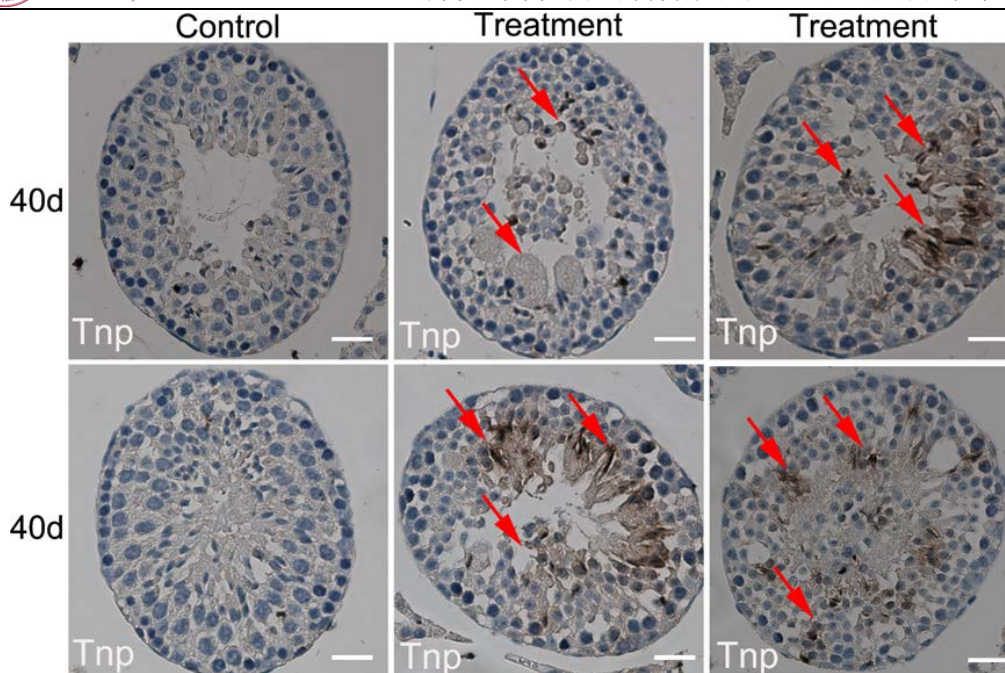


图 10(2).  $Pb^{2+}$  对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白表达量的影响

注：Tnp 呈深色

**Fig.10. Effects of  $Pb^{2+}$  on transition protein of germ cells in postnatal day 20 and 40.**

Note: Tnp was stained in dark color

$Pb^{2+}$  对小鼠 20、40 日龄睾丸生殖细胞内过渡蛋白表达量的影响见图 10。免疫组化结果显示，对照组和处理组 20 日龄小鼠睾丸生殖细胞内过渡蛋白的表达量都比较微弱。对比 40 日龄对照组和处理组，我们发现过渡蛋白主要表现在长形精子中，对照组过渡蛋白的分布集中且有序，处理组过渡蛋白的分布杂乱无章。另外，处理组中的过渡蛋白表达量显著高于对照组，这与图 9 中的免疫荧光结果相一致。这进一步说明了铅离子导致了过渡蛋白-鱼精蛋白的替换过程的异常。

### 3.11 $Pb^{2+}$ 生殖毒性机理示意图（酰化修饰角度）

铅离子越过血睾屏障进入细胞，之后穿过细胞膜进入细胞。其对糖酵解过程产生影响，表现为抑制了糖酵解过程的第三个限速酶 PK 的活性，进而导致 TCA 循环被抑制。与此同时，细胞内 ATP 的含量也显著下降，进一步说明铅离子影响了能量代谢过程。有研究报道，发生乙酰化修饰和琥珀酰化修饰的蛋白很大一部分是来自于线粒体<sup>[54]</sup>，乙酰基与琥珀酰基的分别来自于乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 是线粒体三羧酸循环的重要参与物质。故铅离子可能通过抑制 TCA 循环进而导致乙酰化和琥珀酰化修饰的下降，而乙酰化修饰的下降导致了生殖细胞减数分裂时的异常和精子发生过程的异常，分别表现为乙酰化的高表达被抑制和组蛋白-过渡蛋白-鱼精蛋白替换过程的异常，进而导致了生殖损伤。

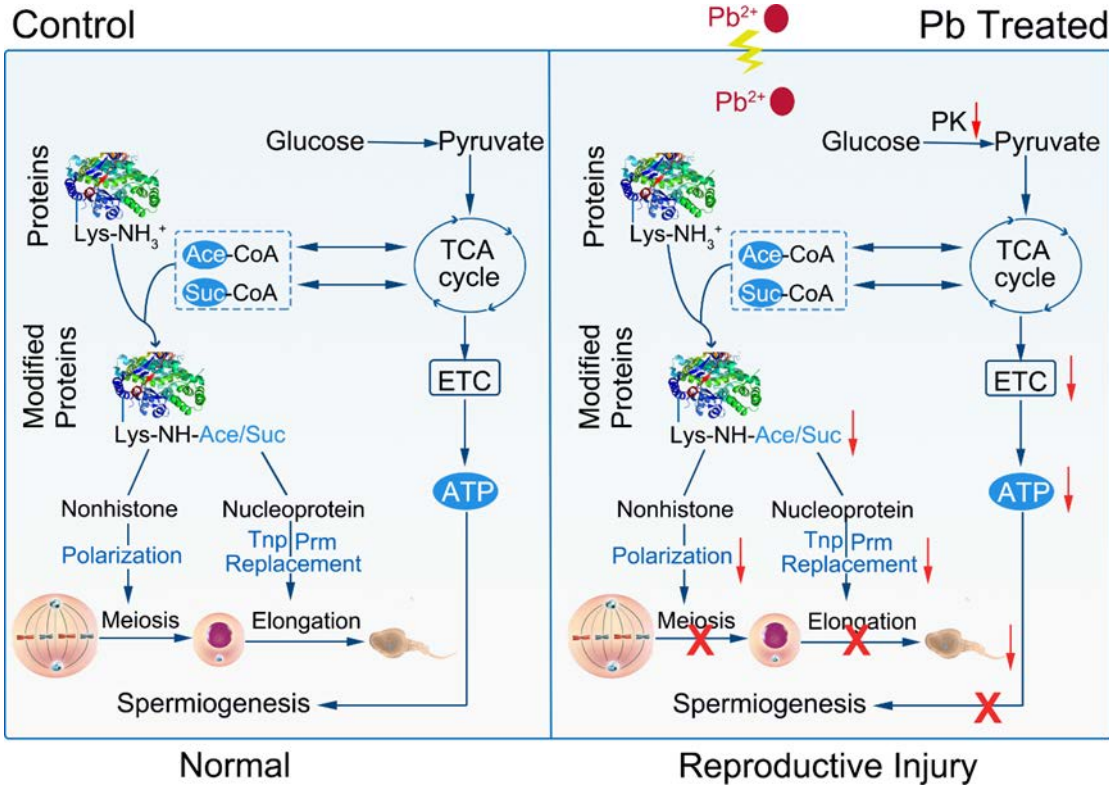


图 9.  $Pb^{2+}$  生殖毒性机理示意图

注：红色箭头表示在我们的实验中观察到的下降；红色的“X”表示对生物过程的抑制

**Fig.11. Schematic diagram of  $Pb^{2+}$  reproductive toxicity mechanism**

Note: The red arrow indicates the decrease observed in our experiment. The red “X” indicates inhibition of the biological process

## 第四章 讨论

本研究首次揭示了铅离子可能通过抑制能量代谢（三羧酸循环）导致蛋白乙酰化修饰异常进而导致小鼠精子发生过程中组蛋白-过渡蛋白-鱼精蛋白替换异常，最终造成生殖损伤。

关于铅中毒对睾丸重量的影响存在争议，有些研究报告显示无明显差异<sup>[55]</sup>，有些研究报告显示显著下降<sup>[10]</sup>。这种差异可能归因于动物年龄，动物种类，铅剂量和给药途径的不同。在这里，我们观察到睾丸重量和产子数的显著抑制（图 1），这是因为铅离子导致了睾丸组织的严重损伤，如生殖细胞数量减少和精子形态异常（图 2-A2,B2,C3），这与最近的一些报告结果相互印证<sup>[56]</sup>。

目前为止，鲜有铅离子对于生殖细胞蛋白乙酰化修饰影响的报道，但是乙酰化修饰对于生殖细胞的形成至关重要，所以我们首先利用 WB 技术进行乙酰化修饰的检测。小鼠生殖细胞内全蛋白乙酰化结果（图 3）所示，铅离子对出生后 20 天、40 天、60 天睾丸中的蛋白乙酰化修饰有明显的抑制作用，其中 55KDa 左右的  $\alpha$  微管蛋白乙酰化修饰在生殖细胞发育过程中是逐渐增多的，提示微管蛋白乙酰化与细胞的形成密切相关，这与分裂间期 Tubulin 乙酰化水平较低，在分裂期以及精子的延伸过程中大量的 Tubulin 乙酰化被观察到的报道相一致<sup>[45]</sup>。

本试验中组织免疫荧光结果直观地反映了在睾丸组织中铅离子对于乙酰化和琥珀酰化修饰的影响。在正常小鼠 20 日龄的睾丸中，曲细精管中最外层为精原细胞，内部为精母细胞（图 5-A1）。与处理组乙酰化结果（图 5-B1）对比，铅离子使精原细胞乙酰化减弱。在 40 日龄小鼠睾丸中，精原细胞蛋白乙酰化修饰程度明显减弱，睾丸曲细精管内层出现圆形精子细胞及长形精子细胞，且睾丸内圆形精子细胞及长形精子细胞蛋白乙酰化修饰明显增强（图 5-C1）。与对照组相比处理组中圆形精子和长形精子蛋白乙酰化修饰明显减弱（图 5-D1），睾丸内圆形精子细胞及长形精子细胞数量明显减少，预示着铅离子会抑制圆形精子和长形精子的乙酰化修饰，并导致睾丸内生殖细胞数量的减少。

组织免疫荧光结果也反映出，在 60 日龄小鼠睾丸中生殖细胞处于伸长期（图 5-E1、图 5-F1），并且伴随着高水平的乙酰化修饰，但是在铅离子处理组中处于伸长期的生殖细胞乙酰化程度明显减弱，这一结果说明，铅离子抑制了伸长期精细胞乙酰化修饰进而影响了精子的形成。

琥珀酰化修饰是赵英明等<sup>[47]</sup>在 2011 年鉴定出的赖氨酸新的修饰种类，该修饰广泛存在于哺乳动物的细胞中，而且已经鉴定出琥珀酰化修饰和乙酰化修饰在小鼠肝细胞中有 57% 的位点重合<sup>[48]</sup>，此外，去乙酰化酶 SIRT5 被发现同时具有去琥珀酰化修饰的功能<sup>[57]</sup>。以上研究均表明琥珀酰化与乙酰化密切相关，提示二者可能对生殖细胞发育具有重要影响。因此我们补充了琥珀酰化修饰的检测，探究琥珀酰化修饰与乙酰化修饰在生殖细胞中的联系以及铅离子对于琥珀酰化修饰的影响。琥珀酰化修饰相关结果显示，在 20 日龄小鼠睾丸内乙酰化与琥珀酰化修饰部位是不同的，乙酰化主要存在于细胞核内而琥珀酰化修饰主要存在于细胞质中（图 5-A1、图 5-A2）。在 40 日龄的小鼠睾丸内可以明显看出曲细精管外层的精原细胞和精母细胞的乙酰化和琥珀酰化修饰部位是分离的，乙酰化在细胞核内而琥珀酰化在细胞质中，但是同时可以观察到曲细精管内层的圆形精细胞乙酰化与琥珀酰化发生位置开始重合（图 5-C1、图 5-C2）。琥珀酰化与乙酰化修饰重合现象在 60 日龄的睾丸中表现的更为明显，在伸长期的精细胞中细胞核既发生强烈的乙酰化修饰也发生强烈的琥珀酰化修饰，并且琥珀酰化修饰不仅在细胞核中还在细胞质中表达，而乙酰化修饰并没有在细胞质中被观察到（图

5-E1、图 5-E2)。上述结果说明琥珀酰化修饰和乙酰化修饰在发生的位置和发生的时间上存在一定的分离,琥珀酰化修饰在圆形精子中开始明显增强,而乙酰化是先在精原细胞中增强之后减弱,二者在伸长期精子中皆保持较高水平。二者修饰的不同步提示它们在细胞中发挥中不同的功能。铅离子对于琥珀酰化修饰的抑制作用也可以明显地被观察到。在 40 天和 60 天睾丸中蛋白琥珀酰化修饰被铅离子显著地抑制(图 4),并且在组织免疫荧光结果中也发现了同样的抑制作用(图 5)。这与乙酰化修饰受铅离子影响的变化是类似的,提示铅离子是通过类似的途径影响琥珀酰化修饰和乙酰化修饰的。

有研究报道发生乙酰化修饰和琥珀酰化修饰的蛋白很大一部分是来自于线粒体<sup>[54]</sup>,乙酰基与琥珀酰基的分别来自于乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 是线粒体三羧酸循环的重要参与物质<sup>[48]</sup>。这些试验都表明乙酰化修饰与琥珀酰化修饰与线粒体能量代谢密切相关,而我们已经证实铅离子对于这两种修饰均产生影响,所以决定继续探究铅离子与能量代谢的关系。我们在试验中选取了能量代谢标志物 ATP 含量(图 6)、糖酵解限速酶 PK 活性(图 6)以及线粒体复合体 I 和 II 活性(图 6)进行检测,结果表明铅离子对这四种物质在 40 天和 60 天均出现明显的抑制作用,说明铅离子对于能量代谢具有抑制作用,有趣的是,PK 是糖酵解的限速酶之一,而 ATP 和三羧酸循环密切相关,其二者被抑制则说明三羧酸循环被抑制,而乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 是三羧酸循环的重要参与物,这提示铅离子可能是通过抑制能量代谢进而导致蛋白乙酰化修饰异常,但也有研究报导,蛋白乙酰化修饰也可以调控能量代谢<sup>[58]</sup>,乙酰化修饰和能量代谢之间是否是一个互相影响互相调控的过程,这个问题有待进一步的试验探究。

据报道组蛋白 H4 的超乙酰化是组蛋白-过渡蛋白-鱼精蛋白替换的先决条件<sup>[44]</sup>,本研究发现乙酰化水平的降低造成了该过程的异常,从组织免疫荧光结果可以观察到相同时期铅离子处理组的过渡蛋白量显著高于对照组(图 9-D1,E1),免疫组化的结果也显示相同时期处理组过渡蛋白表达量显著高于处理组(图 10-B2)。这提示铅离子可能导致过渡蛋白高表达或者铅离子使得过渡蛋白表达时期延后,也可能是过渡蛋白-鱼精蛋白的替换受到了抑制导致过渡蛋白在细胞核中的累积进而对精子的发生造成损伤。从图 9-C2,我们可以看到对照组的鱼精蛋白的表达量显著高于处理组,此外,有相应文献报道,乙酰化介导的蛋白酶体降解已被证明是在精子发生过程中去除乙酰化组蛋白 H4 所必需的<sup>[52]</sup>,并且类似的机制也可能对过渡蛋白在晚期精子发生步骤中的降解起作用。在这种情况下,值得注意的是,两种内源性主要转换蛋白 TP1 和 TP2 都被乙酰化<sup>[59]</sup>,以上结果提示乙酰化的降低可能抑制了过渡蛋白-鱼精蛋白的替换。总而言之,低水平的乙酰化导致了精子发生过程中组蛋白和鱼精蛋白的替换的异常,想进一步明确则需要解析鱼精蛋白替换过渡蛋白的分子机理。

综上所述,本研究立足于生殖细胞内蛋白乙酰化修饰对铅离子生殖毒性进行探究,铅离子处理可能通过影响能量代谢进而导致生殖细胞内蛋白乙酰化修饰出现异常,这些异常会导致精子发生过程中组蛋白-鱼精蛋白的替换过程异常,最终导致生殖系统损伤。还有一些有趣的问题需要进一步探究,铅离子是否影响体外培养精子的琥珀酰化和乙酰化?赖氨酸乙酰化与精子发生中的琥珀酰化有什么不同的作用?乙酰化和能量代谢之间的影响机制如何?精子发生过程中组蛋白、过渡蛋白和鱼精蛋白三者的动态变化过程如何?乙酰化是否是过渡蛋白-鱼精蛋白替换的必要条件?

## 第五章 结论与展望

### 5.1 结论

总结分析试验结果得出以下结论:

1. 铅离子在小鼠发育过程中影响小鼠的睾丸重量和成熟之后的产子数, 对睾丸组织造成严重损伤, 并对睾丸中蛋白乙酰化修饰和蛋白琥珀酰化修饰具有明显抑制作用。
2. 琥珀酰化修饰与乙酰化修饰在发生的时间和发生的位置不同步。精原细胞和精母细胞中琥珀酰化在细胞质中比较明显, 圆形精子向长形精子转化时琥珀酰化修饰在细胞核内增强。
3. 铅离子对于生殖细胞内的能量代谢具有抑制作用, 表现在对生殖细胞内糖酵解的限速酶 PK 活性的抑制和降低生殖细胞内 ATP 含量以及对线粒体复合体 I 和线粒体复合体 II 的活性的抑制。
4. 铅离子造成了小鼠精子发生过程中组蛋白-过渡蛋白-鱼精蛋白替换过程的异常。
5. 铅离子可能通过影响能量代谢 (TCA 循环) 导致蛋白酰化修饰异常, 进而导致小鼠精子发生过程中的组蛋白-过渡蛋白-鱼精蛋白替换过程的异常, 最终导致生殖损伤。

### 5.2 展望

本研究从蛋白修饰的角度阐释了铅离子对生殖细胞发育的影响, 从乙酰化修饰, 琥珀酰化修饰以及能量代谢的角度反映出铅离子对生殖细胞的影响, 并获得相应的结果, 但其中仍存在一些疑问需要后续试验探究。

1. 铅离子对于蛋白修饰与能量代谢的影响的顺序如何, 二者是否是互相影响和调控的关系, 这需要进一步探究。
2. 本研究结果显示琥珀酰化修饰与乙酰化修饰有关, 那么琥珀酰化修饰在精子发生过程中发挥功能的是是什么, 这个问题还有待探究。
3. 精子发生过程中组蛋白、过渡蛋白和鱼精蛋白三者的动态变化过程如何? 乙酰化是否是过渡蛋白-鱼精蛋白替换的必要条件?

## 参考文献

- [1] Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld E K, et al. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review.[J]. Environmental health perspectives, 2007,115(3):472-482.
- [2] Pollack A Z, Mumford S L, Mendola P, et al. Kidney biomarkers associated with blood lead, mercury, and cadmium in premenopausal women: a prospective cohort study.[J]. Journal of toxicology and environmental health. Part A, 2015,78(2):119-131.
- [3] Orr S E, Bridges C C. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals.[J]. International journal of molecular sciences, 2017,18(5).
- [4] 刘岚. 铅对人类健康的危害及其防治[J]. 职业与健康, 2005(05):665-666.
- [5] 张学书, 徐国刚, 周袁芬, 等. 接铅男工精液质量研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1992(06):13-17.
- [6] 胡文媛, 吴沈春, 王丽莉, 等. 铅暴露的男性生殖毒理流行病学研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1991(03):11-14.
- [7] 王丽莉, 胡文媛, 吴沈春, 等. 铅作业工人生殖功能调查及精子超微结构观察[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1991(05):40-42.
- [8] Hsu P C, Liu M Y, Hsu C C, et al. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm.[J]. Toxicology, 1997,122(1-2):133-143.
- [9] El-Magd M A, Kahilo K A, Nasr N E, et al. A potential mechanism associated with lead-induced testicular toxicity in rats.[J]. Andrologia, 2017,49(9).
- [10] Acharya U R, Acharya S, Mishra M. Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice.[J]. Industrial health, 2003,41(3):291-294.
- [11] Vaziri N D, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension.[J]. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2007,34(9):920-925.
- [12] Gandhi J, Hernandez R J, Chen A, et al. Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning.[J]. Zygote (Cambridge, England), 2017,25(2):103-110.
- [13] Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances.[J]. Advances in medical sciences, 2008,53(2):139-144.
- [14] Carreau S, Hess R A. Oestrogens and spermatogenesis.[J]. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2010,365(1546):1517-1535.
- [15] Cacciola G, Chioccarelli T, Fasano S, et al. Estrogens and spermiogenesis: new insights from type 1 cannabinoid receptor knockout mice.[J]. International journal of endocrinology, 2013,2013:501350.
- [16] Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, et al. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro.[J]. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2000,85(5):2057-2067.
- [17] Schulz R W, de França L R, Lareyre J, et al. Spermatogenesis in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010,165(3):390-411.
- [18] Bois C, Delalande C, Nurmio M, et al. Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis.[J]. Journal of molecular endocrinology,

- 2010,45(3):147-159.
- [19] Joseph A, Shur B D, Hess R A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis.[J]. *Biology of reproduction*, 2011,84(2):207-217.
- [20] He Y, Zou Q, Chen H, et al. Lead Inhibits Human Sperm Functions by Reducing the Levels of Intracellular Calcium, cAMP, and Tyrosine Phosphorylation.[J]. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2016,238(4):295-303.
- [21] Braun R E. Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis.[J]. *Seminars in cell & developmental biology*, 1998,9(4):483-489.
- [22] Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between  $\text{Ca}^{2+}$ , cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human spermiogenesis.[J]. *Journal of andrology*, 1998,19(4):434-443.
- [23] Mazza A, Felluga B. Electron microscope observations on lambda bacteriophage ultrastructure.[J]. *Journal of ultrastructure research*, 1973,45(3):259-278.
- [24] Bellve A R, Cavicchia J C, Millette C F, et al. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization.[J]. *The Journal of cell biology*, 1977,74(1):68-85.
- [25] Bellve A R, Millette C F, Bhatnagar Y M, et al. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells.[J]. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 1977,25(7):480-494.
- [26] Meistrich M L, Hess R A. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules.[J]. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2013,927:299-307.
- [27] Rathke C, Baarends W M, Awe S, et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2014,1839(3):155-168.
- [28] Russell L D, Ettlin R A, Hikim A P S, et al. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis[J]. *International Journal of Andrology*, 1993,16(1):83.
- [29] Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells.[J]. *Nature*, 2005,434(7033):583-589.
- [30] Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, et al. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B.[J]. *Genes & development*, 2013,27(15):1680-1692.
- [31] Cho C, Willis W D, Goulding E H, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice.[J]. *Nature genetics*, 2001,28(1):82-86.
- [32] Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, et al. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain.[J]. *Nature*, 2009,461(7264):664-668.
- [33] Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, et al. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt.[J]. *The EMBO journal*, 2012,31(19):3809-3820.
- [34] Oliva R. Protamines and male infertility[J]. *Human Reproduction Update*, 2006,12(4):417-435.
- [35] Cho C, Goulding E H, Jung-Ha H, et al. Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2003,69(1):211-217.
- [36] Carrell D T, Emery B R, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?[J]. *Human reproduction update*, 2007,13(3):313-327.
- [37] Bjorndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including

- zinc bridges.[J]. Molecular human reproduction, 2010,16(1):23-29.
- [38] Braun R E. Packaging paternal chromosomes with protamine[J]. Nature Genetics, 2001,28:10.
- [39] Malo A F, Gomendio M, Garde J, et al. Sperm design and sperm function[J]. Biology Letters, 2006,2(2):246-249.
- [40] Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code.[J]. Science (New York, N.Y.), 2001,293(5532):1074-1080.
- [41] Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun J, et al. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions.[J]. Science (New York, N.Y.), 2006,311(5762):844-847.
- [42] Wynne Aherne G, Rowlands M G, Stimson L, et al. Assays for the identification and evaluation of histone acetyltransferaseinhibitors.[J]. Methods (San Diego, Calif.), 2002,26(3):245-253.
- [43] Gray S G, Ekström T J. The Human Histone Deacetylase Family[J]. Experimental Cell Research, 2001,262(2):75-83.
- [44] Awe S, Renkawitz-Pohl R. Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to aprotamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophilamelanogaster*. [J]. Systems biology in reproductive medicine, 2010,56(1):44-61.
- [45] Luo J, Rodriguez-Sosa J R, Tang L, et al. Expression pattern of acetylated alpha-tubulin in porcine spermatogonia[J]. Molecular reproduction and development, 2010,77(4):348-352.
- [46] Bhagwat S, Dalvi V, Chandrasekhar D, et al. Acetylated alpha-tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility.[J]. Fertility and sterility, 2014,101(1):95-104.
- [47] Zhang Z, Tan M, Xie Z, et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification.[J]. Nature chemical biology, 2011,7(1):58-63.
- [48] Weinert B T, Scholz C, Wagner S A, et al. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation.[J]. Cell reports, 2013,4(4):842-851.
- [49] Zhao S, Xu W, Jiang W, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation.[J]. Science (New York, N.Y.), 2010,327(5968):1000-1004.
- [50] Kim S C, Sprung R, Chen Y, et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomic survey.[J]. Molecular cell, 2006,23(4):607-618.
- [51] Al-Omair M A, Sedky A, Ali A, et al. Ameliorative potentials of quercetin against lead-induced hematological and testicular alterations in Albino rats.[J]. The Chinese journal of physiology, 2017,60(1):54-61.
- [52] Qian M, Pang Y, Liu C H, et al. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis.[J]. Cell, 2013,153(5):1012-1024.
- [53] Pradeepa M M, Nikhil G, Hari Kishore A, et al. Acetylation of transition protein 2 (TP2) by KAT3B (p300) alters its DNA condensation property and interaction with putative histone chaperone NPM3.[J]. The Journal of biological chemistry, 2009,284(43):29956-29967.
- [54] Kosono S, Tamura M, Suzuki S, et al. Changes in the Acetylome and Succinylome of *Bacillus subtilis* in Response to Carbon Source.[J]. PloS one, 2015,10(6):e131169.
- [55] Marchlewicz M, Michalska T, Wiszniewska B. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence.[Z]. 2004: 57, 1553-1562.
- [56] Elgawish R A R, Abdelrazek H M A. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats.[J].

- Toxicology reports, 2014,1:795-801.
- [57] Park J, Chen Y, Tishkoff D X, et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways.[J]. Molecular cell, 2013,50(6):919-930.
- [58] Fukushima A, Lopaschuk G D. Acetylation control of cardiac fatty acid beta-oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure.[J]. Biochimica et biophysica acta, 2016,1862(12):2211-2220.
- [59] Gupta N, Madapura M P, Bhat U A, et al. Mapping of Post-translational Modifications of Transition Proteins, TP1 and TP2, and Identification of Protein Arginine Methyltransferase 4 and Lysine Methyltransferase 7 as Methyltransferase for TP2.[J]. The Journal of biological chemistry, 2015,290(19):12101-12122.

## 致谢

流光容易把人抛，红了樱桃，绿了芭蕉。转眼间，四年时光便在指尖流逝，常言道：“雁过无痕，岁月无声”。但悄悄前行的岁月依旧在我的大学生活里留下了精彩的点点滴滴，于人，于事，都镌刻在心间。

我首先要感谢的是李新红老师，李老师不仅是良师亦是益友。从“农耀计划”相识，到后来进入实验室进行 IPP 项目，我无处不感受到李老师严谨的治学态度和无微不至的关心。他厨艺和科研双绝，是一位认真负责的师长，也正是在他的悉心指导下我才能完成我的毕业论文，故特此表达衷心的感谢，祝李老师身体健康，工作顺利！

另外，我还需要特别感谢实验室的杨强震师兄、文艺师姐、王立蕊师姐、李思思师姐、李玉华师兄、付杰丽师姐、李培飞师兄和刘桓师兄以及被我打扰到的学习室的师兄师姐，我的毕业设计离不开他们的帮助和鼓励，感谢你们！

在“农耀计划”和 IPP 项目中，我不仅学会了试验技能，更收获了珍贵的友谊，在此特别感谢我的搭档陈俊，我们一起养的实验动物、取的材料、配的胶、跑的蛋白和吹过的牛都是我大学最宝贵的财富之一。是你的陪伴让枯燥的实验变得有趣，让熬过的夜没那么漫长，感谢你的相伴和帮助！

在学习和生活中，我要感谢我的室友们，我们从四面八方而来聚在一起，如今也将分开向天下而去。我们一起奋斗过的上千个日日夜夜是我们情谊的最好见证，不论是学习室里的挑灯夜读还是篮球场上的“骑马射箭”。我们在学习、生活以及毕业设计上互相鼓励和帮助，尤其是黄祖柳同学在论文上给予我莫大的帮助，让我节约了大量时间，在此表示由衷感谢！此外，与班上同学的友谊是我这辈子最宝贵的财富，交通大学的老师也是我的引路人，非常感谢在最美好的年华里遇见了你们！

谁言寸草心，报得三春晖。父母和亲人们永远是最坚强的后盾和最温馨的港湾，此处无声胜有声，愿你们都幸福安康，我要努力成为你们的骄傲！

最后，我想感谢自己。感谢在放弃边缘咬牙坚持的自己，感谢慢慢懂事的自己，希望自己能够进一步走出自己的舒适圈，遇见更优秀的自己！

## 本科期间录用或参与发表的论文

已投稿论文:

1. **Xurui Liu** #, Jun Chen #, Qiangzhen Yang #, Yi Wen, Huan Liu, Zijun Peng, Ranna Yeerken, Lirui Wang, Xinhong Li. Lead-mediated inhibition of lysine acetylation and succinylation causes reproductive injury of the mouse testis during development. Toxicology letters

参与发表的论文:

1. Yang, Q., Li, P., Wen, Y., Li, S., Chen, J., **Liu, X.**, ... & Li, X. (2018). Cadmium inhibits lysine acetylation and succinylation inducing testicular injury of mouse during development. Toxicology letters, 291, 112-120.

## EFFECT OF LEAD IONS ON PROTEIN ACYLATION OF GERM CELLS IN MALE MICE AT DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES

With the widespread use of heavy metals in the mineral industry, pollution problems are also increasing, especially lead pollution. Lead production can cause air and water pollution. On the one hand, lead enters the human body directly through the body's direct intake of polluted air and water, and on the other hand, enters the human body through the food chain. Studies have reported that lead ions can cause decreased sperm motility, decreased sperm density, and abnormal nuclear shape. In addition, the total number of sperm exposed to lead in men, the number of surviving sperm, and sperm survival rate were reduced. However, the mechanism by which lead affects the reproductive system is unclear, but there are several mainstream views as follows. First, lead ions induce the production of oxidative free radicals, and lead ions have a significant inhibitory effect on the activities of antioxidant enzymes such as SOD, GPx and CAT, so lead ions not only induce more ROS, but also damage the antioxidant system of cells. This results in oxidative free radicals being unable to be effectively removed, thereby exacerbating oxidative damage. Second, lead ions may adversely affect the hypothalamic-pituitary-testicular axis, which in turn causes reproductive damage. The dysfunction of the reproductive axis is most susceptible and irreversible during puberty development. Lead ions cause reproductive damage by affecting FSH, LH, testosterone, estrogen (including E2) and its receptor hormones. Third, lead inhibits sperm motility, capacitation, and progesterone-induced acrosome reaction by reducing cAMP, calcium, and protein tyrosine phosphorylation in sperm cells. Although these three points are reasonable to some extent, the lead mechanism affecting the reproductive system is still uncertain, and the theory on this will be perfected.

Protein post-translational modifications (PTMs) are one of the most efficient biological mechanisms for expanding the genetic code and for regulating cellular physiology. There are many kinds of PTMs such as acetylation, phosphorylation and methylation to take part in the cellular process, and these PTMs especially acetylation are also important to the development of reproductive cells.

Some researches confirmed that histone acetylation is a necessary condition for sperm formation, and histone acetylation is a dynamic process during the different stages of sperm formation. In the spermatogonia mitosis process: due to the replication proteins are mainly completed in interphase transcription activity and histone acetylation level are high at the interphase, but the histone acetylation expression quantity is extremely low or no expression at the metaphase. In spermatocyte meiotic division process: first meiotic interphase histone acetylation levels remain high, especially in diplotene histone acetylation levels throughout meiosis was highest and histone acetylation levels dropped to the lowest in the splitting process. In spermatids elongating process: the structure and nuclear protein composition of sperm cells change materially in this process, and the nucleus histone is replaced by the protamine. Histone H4 always maintains high levels of acetylation to keep the nucleosome structure loose, that makes transition nuclear

protein and protamine replace the histones easier. Finally, histone has a proportion of less than 5% in the elongated sperm nuclear protein. The level of histone acetylation is changing during the development of reproductive cells, that suggests histone acetylation has a different function in different stage.

Not only histone acetylation plays an important role in the formation and development of reproductive cells, but also non-histones acetylation is important to reproductive cells. There are many kinds of non-histones in cells and the quantity of non-histones is large, so non-histones acetylation has a great influence on the formation of reproductive cells in different ways. For example,  $\alpha$ -tubulin acetylation is essential to sperm location and movement on the basement membrane of the testis, moreover, the lack of  $\alpha$ -tubulin acetylation may reduce sperm motility. Dazap1/Prpp(deleted in azoospermia associated1/proline-rich RNA binding protein)participate in the process that transport matters through the karyotheca and they can be acetylated on lysine 150(K150). Acetylated K150 makes Dazap1/Prpp stay in the cell nucleus and non-acetylated K150 makes Dazap1/Prpp get into the mitochondria so that acetylation can determine where Dazap1/Prpp will stay to influence the sperm physiological process. We can conclude that non-histones acetylation is also indispensable in the development of reproductive cells from the above evidence.

Lead has a significant influence on the growth and formation of reproductive cells, but that remains mystic and difficult to confirm how lead acts on the reproductive system. There is no doubt that reproductive cellular protein acetylation can affect the formation of sperm and lead is toxic to the reproductive system, but there is no research combining lead with protein acetylation. So we decided to explore the relationship between lead and protein acetylation trying to explain the mechanism of lead on the male reproductive system at the subcellular level.

In my study, male mice were used as animal models, and intraperitoneal injection of lead chloride solution (1.5mg/Kg body weight) was used to detect protein acylation of germ cells in different developmental stages of mice by Western blotting and tissue immunofluorescence. And the expression levels of transition protein and protamine in spermatogenesis were detected by immunohistochemistry and tissue immunofluorescence. The results show that lead ions significantly inhibit protein acetylation at 20, 40, and 60 days, suggesting that lead ions have significant effects on acetylation at different developmental stages. The effect of lead ion on protein succinylation is not obvious at 20 days, and it has obvious inhibition at 40 and 60 days. Interestingly, this study finds that lead ions cause a significant decrease in ATP content in germ cells of treated mice. The activities of the Mitochondrial Complex I and II decrease significantly, and the activity of the rate-limiting enzyme PK of glycolysis is also significantly decreased. It has been reported that acetyl-CoA and succinyl-CoA in the TCA cycle are one of the important sources of protein acetylation and succinylation, suggesting that lead ions can cause abnormalities in protein acylation by affecting energy metabolism. In addition, this study also finds that lead ions can cause abnormalities in the process of histone-protamine replacement during spermatogenesis. The expression of transition protein in the treatment group is significantly higher than that in the control group, while the expression level of protamine is lower than that in the control group. Studies have shown that hyperacetylation of histone H4 is a prerequisite for histone-protamine replacement, suggesting that lead ions may lead to abnormal protein acylation by affecting the energy metabolism and thereby disturbing spermatogenesis in mice. The abnormality of the process eventually leads to reproductive damage. This study provides a new

idea for revealing the reproductive toxicity mechanism of lead ions and provides relevant basic data for exploring the toxicological mechanism of lead ion and preventing male sterility caused by lead ions.