

DOI: 10.11964/jfc.20231114215

施氏鲟精子超低温冷冻前后的蛋白组学分析



陈张帆^{1,2}, 丁兰清^{1,3}, 程鹏¹, 胡谋⁴, 张婷婷^{1,3}, 黄红涛⁵, 杜合军⁵, 陈松林^{1,2*}

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 4. 杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司, 浙江 杭州 311701; 5. 中国长江三峡集团有限公司中华鲟研究所, 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443100

摘要:

【目的】研究施氏鲟精子冷冻损伤分子机理, 从遗传水平分析影响施氏鲟精子冷冻复苏后质量的关键因子。

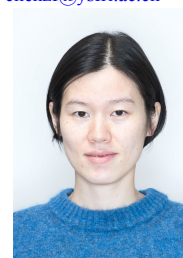
【方法】实验采用 4D Label-free 定量蛋白组学技术筛选施氏鲟精子超低温保存前后的差异蛋白。施氏鲟精子经过 24 h 冻存后复苏检测, 以差异倍数 $FC > 1.5$, 显著性差异值 $P < 0.05$ 为标准筛选差异蛋白质, 对得到的蛋白进行亚细胞定位、结构域预测、GO 富集分析、KEEG 富集分析。

【结果】共鉴定得到 1 859 个蛋白, 差异 1.5 倍以上的蛋白 200 个, 其中下调蛋白 92 个、上调蛋白 108 个。差异蛋白定位到 6 个条目上, 分别为细胞质 120 个、细胞核 100 个、细胞外 36 个、线粒体 35 个、质膜 29 个、溶酶体 2 个。结构域预测结果显示, 胰蛋白酶、脂质运载蛋白/胞浆脂肪酸结合蛋白家族、醛/酮还原酶家族、微管蛋白 C 端结合域及 Nup53/35/40-型 RNA 识别基序是参与精子冻融损伤应答的相关结构域。GO 富集分析结果显示, 差异蛋白主要参与 686 种生物过程、199 种细胞成分以及 394 类分子功能, 主要富集到激素结合、镁离子结合、脂质代谢、核膜等条目。KEEG 富集分析结果显示, 差异蛋白注释到 63 条信号通路, 主要涉及糖代谢、氨基酸代谢和细胞核膜运输等信号通路。

【结论】施氏鲟冻精与鲜精的蛋白质组分差异明显, 这些差异蛋白质可能对精子冷冻效果产生影响, 可作为施氏鲟精子冻融的候选标志蛋白。本研究可为后续进一步优化施氏鲟精子冷冻技术提供理论基础与研究思路。

关键词: 施氏鲟; 精子冷冻损伤; 差异蛋白; 4D label-free

第一作者: 陈张帆, 从事鱼类种质资源保存及重要性状基因功能研究, E-mail: chenzf@ysfri.ac.cn



通信作者: 陈松林, 院士, 从事鱼类种质保存、性别控制与抗病分子育种研究, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn



资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2400103); 山东省重点研发计划 (2021LZGC028, 2023ZLYS02); 泰山学者攀登计划; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2023TD 20); 国家海洋水产种质资源库项目

收稿日期: 2023-11-02

修回日期: 2024-04-03

文章编号:

1000-0615(2025)01-019602-11

中图分类号: S 961

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

水产种质资源是水产增养殖、品种改良及渔业可持续发展的基石^[1]。对于具有较高经济价值和遗传育种价值的水生生物资源,



通过超低温冷冻保存技术可以对其长期保存, 用于养殖生产实践及遗传育种研究^[2]。但冷冻对精子造成损伤是不可避免的, 极大影响了精子冷冻后的活力、寿命及受精率。为探究鱼类精子冷冻损伤机理, 研究人员对不同鱼类的精子冷冻前后的超微结构、能量代谢酶和氧化还原酶活性变化进行了比较, 并对其在基因和蛋白水平上的变化趋势进行分析^[3-8], 以期为进一步优化鱼类精子冷冻效果提供数据参考。

在成熟精子中, 转录和翻译过程基本都已停止, 精子细胞中的生物大分子反应大多发生在蛋白水平^[9], 因此相对于基因表达水平, 蛋白表达水平变化更能直接反映精子生命过程的变化。蛋白组学技术已应用于鲤 (*Cyprinus carpio*)^[10]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[11]、小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) 和西伯利亚鲟 (*A. baerii*)^[12] 等鱼类精子蛋白组研究。此外, 蛋白组学技术也应用于超低温冷冻对鱼类精子蛋白组影响的研究中。超低温冻存会造成精子细胞中的蛋白外溢^[13], 也会造成精子鞭毛和头部蛋白变化, 从而导致精子运动能力和受精能力下降^[14]。鲤精子经超低温冻存后, 参与代谢、能量产生、细胞凋亡、DNA 修复等过程的蛋白含量发生显著变化^[15]。在小体鲟中, 超低温冻存会影响涉及代谢和能量产生、鞭毛组装等过程的蛋白含量变化^[16]。

施氏鲟 (*A. schrenckii*) 隶属硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鲟形目 (Acipenseriformes) 鲟科 (Acipenseridae) 鲟属 (*Acipenser*), 具有生长速率快、寿命长等特点, 为我国优质珍稀鲟类之一。由于施氏鲟人工繁殖中雌雄亲鱼的性腺发育周期不同, 舒德斌等^[17] 建立了施氏鲟精子超低温冻存技术, 并利用冷冻复苏精子进行人工授精和鱼苗孵化, 然而冷冻复苏后的精子活力和受精率与鲜精相比存在一定差距。此前, 本课题组对施氏鲟精子冷冻前后的形态结构变化、能量代谢酶和氧化还原酶类的活性变化进行比较, 发现施氏鲟精子产生的冷冻损伤主要体现在膜系统和细胞器 (如线粒体) 中, 能量代谢酶和抗氧化酶水平下降^[18]。本研究将以 4D Label-free 蛋白组学技术为基础, 分析和比较超低温冷冻保存前后的施氏鲟精子蛋白组, 鉴定差异表达蛋白及信号通路, 进而筛选出检测与精子活力相关的候选标志蛋白, 这些结果旨在深入探究鲟

类精子冷冻损伤的分子机制, 从遗传水平分析影响鲟类精子冷冻复苏后质量的关键因子, 并为预测鲟类精子冷冻复苏过程中的蛋白标志物提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 精子采集及冻存

实验所用亲鱼为人工养殖 7 龄施氏鲟 (体长 1.2~1.4 m, 体重 20~25 kg), 由杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司衢州养殖基地提供。在施氏鲟繁殖季节 (2020 年 5 月), 经人工催产后采集鲜精, 用养殖用水激活精子后观察其活力, 选取精子活力 >90% 的新鲜精液作为鲜精组 (xj)。用 ST5 精子稀释液配制含 10% 甲醇的冷冻保存液, 按精液与抗冻剂体积比为 1:2 的比例稀释新鲜精液后以三步法冻存于塑料冻存管中^[2], 冻存 24 h 后在 37 °C 水浴中复苏, 作为冻精组 (dj)。通过观察, 鲜精的活力为 (92.87±2.67)%, 冻精的活力为 (26.67±3.32)%, 存在显著差异^[18], 满足实验用要求。

本研究获得了中国水产科学研究院黄海水产研究所实验动物管理和使用伦理委员会批准 (审查编号: YSFRI-2023006), 实验过程中操作人员严格遵守中国水产科学研究院黄海水产研究所伦理规范, 并按照中国水产科学研究院黄海水产研究所伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 蛋白提取和定量

蛋白提取和定量参考 Yang 等^[8] 的方法。鲜精组和冻精组分别设置 3 个重复, 每份样品中加入 SDT 裂解液 (4% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mol/L DTT), 80 W 冰浴超声 100 s, 沸水浴中加热 15 min, 14 000×g 离心 40 min, 取上清液, 采用 BCA (bicinchoninic acid) 法进行蛋白质定量。每个样品取适量蛋白质, 采用 FASP (filter aided proteome preparation) 法进行胰蛋白酶酶解得到肽段^[19], 肽段脱盐、冻干后加入 40 μL 0.1% 甲酸溶液复溶、定量。

1.3 精子蛋白质组学分析

采用 4D-label free 技术对精子蛋白质组学进行分析, 包括 nano-HPLC-MS/MS 色谱分离、质谱分析、数据库搜索鉴定及定量分析。本研究采用 MaxQuant 软件 (版本号 1.6.14) 进行查库搜

索^[20], 检索条件为 $FDR \leq 0.01$, 以 $FC > 1.5$ 且差异显著性 $P < 0.05$ 为标准筛选差异蛋白。

1.4 生物信息学分析

对筛选出的差异表达蛋白归一化处理后, 采用 Complexheatmap R 包 (R Version 3.4) 进行聚类分析; 采用 CELLO 法 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 进行亚细胞定位预测; 用 InterProScan 软件包对 InterPro 数据库进行搜索, 获得目标蛋白序列的结构域注释信息。通过 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 采用 Blast2GO 对目标蛋白质集合进行 GO 注释; 通过 KEGG 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/>) 采用 KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) 软件, 对目标蛋白质集合进行 KEGG 通路注释; 并采用 Fisher 精确检验, 对目标蛋白质集合进行 GO 注释或 KEGG 通路的富集分析。

2 结果

2.1 施氏鲟精子冻精与鲜精蛋白质表达谱鉴定结果

实验通过质谱分析得到 383 471 张总谱图 (total spectra), 其中匹配到数据库的谱图 (matched spectra) 为 52 200 张; 共获得肽段 (peptide) 11 961 个, 其中特异性肽段 (unique peptide) 9 749 个; 获得蛋白 (protein) 1 875 个, 定量的蛋白 (quantified protein) 为 1 859 个。

2.2 差异蛋白筛选结果

以 $FC > 1.5$ 倍, $P < 0.05$ 为筛选标准, 冻精组与鲜精组对比筛选出差异表达蛋白 200 个。与鲜精组相比, 冻精组中 108 个蛋白表达量上调, 上调超过 10 倍的蛋白有 2 个; 92 个表达量下调, 下调超过 10 倍的蛋白有 1 个。另有 18 个蛋白只在冻精组中表达, 44 个蛋白只在鲜精组中表达。

以 $\log_2(\text{冻精表达量}/\text{鲜精表达量})$ 为横坐标, $-\lg(P\text{-value})$ 为纵坐标, 绘制显著差异表达蛋白火山图 (图 1), 红色点代表上调的显著性差异表达蛋白, 蓝色点表示下调的显著性差异表达蛋白, 越远离 0 点的点表明差异越显著; 灰色为无差异变化的蛋白。

2.3 差异蛋白亚细胞定位分析

CELLO 定位分析显示, 差异表达蛋白定位

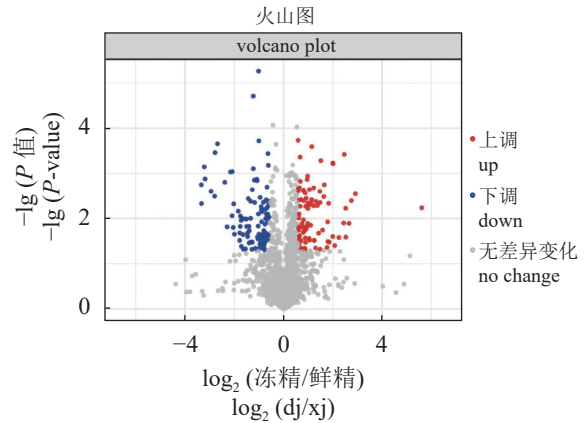


图 1 施氏鲟鲜精组 (xj) 和冻精组 (dj) 中差异蛋白的火山图

Fig. 1 Analysis result of differentially abundant proteins between the proteomes of fresh semen and cryopreserved semen of *A. schrenckii*

到 6 个条目上: 细胞质 120 个差异蛋白、细胞核 100 个差异蛋白、细胞外 36 个差异蛋白、线粒体 35 个差异蛋白、质膜 29 个差异蛋白、溶酶体 2 个差异蛋白。

2.4 差异蛋白结构域分析

利用 InterProScan 对施氏鲟精子冷冻差异蛋白进行结构域预测分析, 共鉴定到 334 个结构域, 前 20 位结构域分析结果如图 2 所示。其中胰蛋白酶、脂质运载蛋白/胞浆脂肪酸结合蛋白家族、醛/酮还原酶家族、微管蛋白 C 端结合域及 Nup53/35/40-型 RNA 识别基序是参与施氏鲟精子冷冻损伤应答的相关结构域。

2.5 差异蛋白 GO 功能富集分析

为了研究差异蛋白在生物功能方面的作用, 实验对筛选出的 200 个差异蛋白进行 GO 富集分析 (图 3), 结果显示, 200 个差异蛋白富集于 686 种生物过程 (biological process, BP)、199 种细胞成分 (cellular component, CC) 以及 394 类分子功能 (molecular function, MF) 中, 对差异显著性排序得到前 30 个富集的 GO 通路 (表 1)。分子功能差异分析主要涉及激素结合、镁离子结合、无机分子跨膜转运蛋白活性、鸟苷酸结合、水解酶活性及离子跨膜转运蛋白活性等条目; 生物过程差异主要涉及 mRNA 转运、RNA 定位、甘油三酯代谢、神经酰胺代谢、四吡咯生物合成及酰基甘油代谢等条目; 细胞成分差异

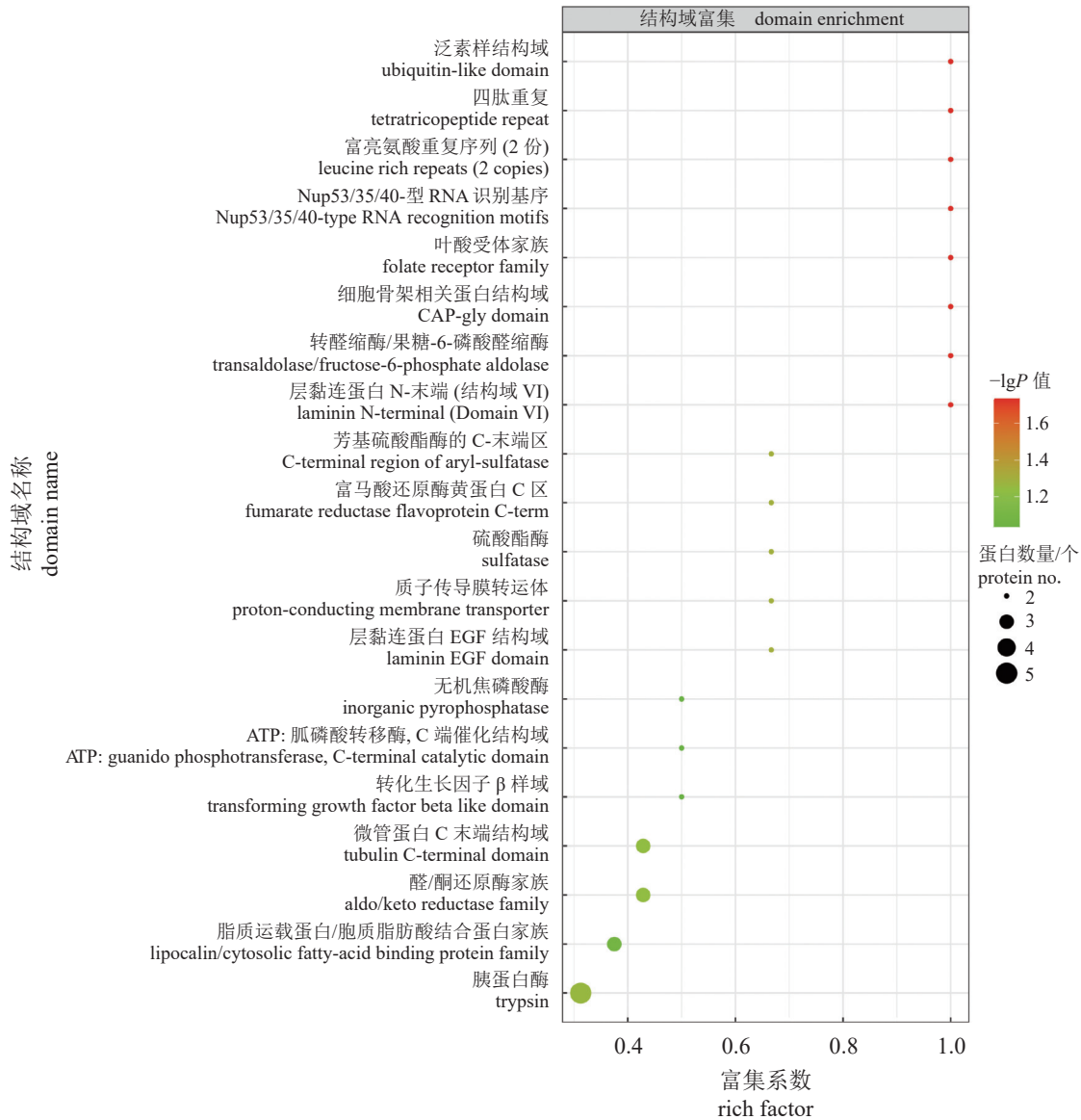


图 2 差异蛋白结构域分析

Fig. 2 Protein domain analysis of differentially abundant proteins

主要涉及蛋白酶体核心复合物, α-亚基复合物、核膜)、cAMP 依赖性蛋白激酶复合物及细胞器膜等条目。

2.6 差异蛋白 KEGG 通路分析

为了进行关键信号通路参与施氏鲟精子冷冻过程的研究, 实验对 200 个差异蛋白进行 KEGG 通路分析, 共注释到 63 条 KEGG 通路, 按功能分类对通路进行排序, 包括核细胞质运输 (含 4 个差异蛋白)、内吞作用 (3 个)、AMP 激活蛋白激酶 (AMPK) 信号通路 (2 个)、磷脂酰肌醇信号系统 (2 个)、cAMP 信号通路 (2 个)、氧化磷酸化 (2 个)、糖酵解/糖异生 (2 个)、色氨

酸代谢 (2 个)、赖氨酸代谢 (2 个) (图 4)。但由于差异蛋白数目有限, 因此每条通路包含的差异蛋白数量并不多。

候选通路涉及到代谢、环境信息处理、遗传信息处理及细胞过程等方面, 注释到的蛋白有 EF-1a、SBPL-A、ECOAH 及 PPH 等, 其中 NUP53-1、NUP85 等蛋白在冻精组中表达上调, NUPS53-2、ANM-1 和 IAC 等蛋白只在冻精中表达, 而 SBPL-A、NADH-2 和 RBP 等蛋白只在鲜精中表达, ECOAH、EGF-1α 和 CMD 等蛋白在冻精组中表达下调 (表 2), 这些蛋白可能在施氏鲟精子超低温冻存中起着重要作用。

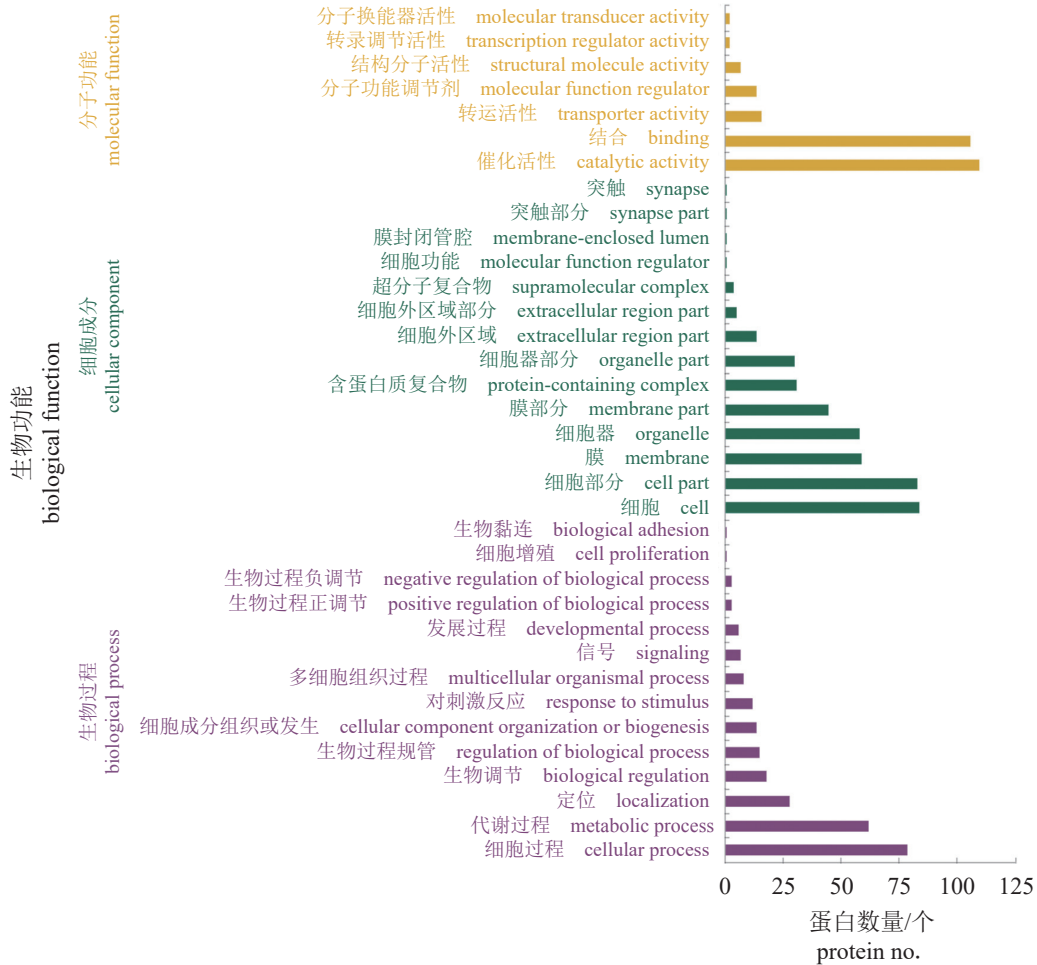


图 3 差异蛋白 GO 富集分析结果

Fig. 3 GO function enrichment analysis of differential proteins

3 讨论

本研究利用 4D Label-free 的蛋白组学技术, 以 $FC > 1.5$ 、 $P < 0.05$ 为条件分析筛选出 200 个差异表达蛋白。这些蛋白质作用广泛, 参与精子应激反应、冷冻损伤、能量代谢、运动能力和抗氧化代谢等生理过程。

本研究中发现, 在冻精组和对照鲜精组中表达差异倍数最大的为 Fas 激活的丝氨酸/苏氨酸磷酸蛋白激酶 (fas-activated serine/threonine phosphoprotein kinase 1, FASTK1), 冻精组中该蛋白的表达量比鲜精组中上调了 48.81 倍。FASTK 蛋白属于线粒体定位蛋白, 是调节线粒体呼吸功能的关键蛋白, 对处于胁迫环境中的细胞起到保护作用^[21]。敲除 FASTK 蛋白会加速细胞凋亡, 而 FASTK 蛋白的过表达则可抑制 UV 诱导的凋亡^[22]。在冻精组中 FASTK1 蛋白表达大幅度上调可能是细胞对于外界环境骤变

的一种应激反应以及自我保护机制的启动。此外, 热休克蛋白 DNAJB13 和冷诱导 RNA 结合蛋白 (cold inducible RNA-binding protein, CIRP) 的表达量分别为鲜精组的 0.10 和 0.52 倍。DnaJB13 属于热休克蛋白 HSP40 亚家族, 在人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 睾丸组织中高表达, 为同家族 HSP70 蛋白的分子伴侣, 在生物体遭受环境胁迫过程中起着极其重要的作用。小鼠的 DNAJB13 蛋白定位在成熟精子尾部, 可通过与己糖激酶的互动, 影响精子的能量代谢, 从而参与精子的运动^[23]。DNAJB13 基因突变会导致原发性纤毛运动障碍, 改变精子尾部鞭毛形态^[24]。施氏鲟精子中 DNAJB13 蛋白含量受超低温冷冻的影响而下降, 与冻精鞭毛结构受损、运动能力受限的情况相吻合。CIRP 是一种在脊椎动物间高度保守的应激反应蛋白, 参与 DNA 修复损伤、细胞周期调控、抗细胞凋亡等生理过程, 在低温、缺氧、紫外线

表 1 差异蛋白 GO 富集分析 (TOP 30)

Tab. 1 GO function enrichment analysis of differential proteins (TOP 30)

GO编号 GO no.	通路名称 pathway name	种类 category	差异蛋白数/个 no. of differentially abundant proteins
0042562	激素结合 hormone binding	分子功能 MF	3
0000287	镁离子结合 magnesium ion binding	分子功能 MF	9
0015318	无机分子跨膜转运蛋白活性 inorganic molecular entity transmembrane transporter activity	分子功能 MF	15
0030545	受体调节活性 receptor regulator activity	分子功能 MF	4
0048018	受体配体活性 receptor ligand activity	分子功能 MF	4
0015075	离子跨膜转运蛋白活性 ion transmembrane transporter activity	分子功能 MF	15
0006638	中性脂质代谢 neutral lipid metabolic process	生物过程 BP	2
0006672	神经酰胺代谢 ceramide metabolic process	生物过程 BP	2
0033014	四吡咯生物合成 tetrapyrrole biosynthetic process	生物过程 BP	2
0006687	糖鞘脂代谢 glycosphingolipid metabolic process	生物过程 BP	2
0019377	糖脂分解代谢 glycolipid catabolic process	生物过程 BP	2
0006639	酰基甘油代谢 acylglycerol metabolic process	生物过程 BP	2
0046514	神经酰胺分解代谢 ceramide catabolic process	生物过程 BP	2
0046479	糖鞘脂分解 glycosphingolipid catabolic process	生物过程 BP	2
0006641	甘油三酯代谢 triglyceride metabolic process	生物过程 BP	2
0030551	环核苷酸结合 cyclic nucleotide binding	分子功能 MF	3
0019001	鸟苷酸结合 guanyl nucleotide binding	分子功能 MF	17
0032561	鸟苷核糖核苷酸结合 guanyl ribonucleotide binding	分子功能 MF	17
0008324	阳离子跨膜转运蛋白活性 cation transmembrane transporter activity	分子功能 MF	12
0022890	无机阳离子跨膜转运蛋白活性 inorganic cation transmembrane transporter activity	分子功能 MF	12
0006403	RNA定位 RNA localization	生物过程 BP	3
0051236	RNA定位的建立 establishment of RNA localization	生物过程 BP	3
0050658	RNA转运 RNA transport	生物过程 BP	3
0015931	含核碱基的化合物转运 nucleobase-containing compound transport	生物过程 BP	3
0051028	mRNA转运 mRNA transport	生物过程 BP	3
0050657	核酸转运 nucleic acid transport	生物过程 BP	3
0019773	蛋白酶体核心复合物, α -亚基复合物 proteasome core complex, alpha-subunit complex	细胞成分 CC	3
0031965	核膜 nuclear membrane	细胞成分 CC	3
0016787	水解酶活性 hydrolase activity	分子功能 MF	55
0022857	跨膜转运蛋白活性 transmembrane transporter activity	分子功能 MF	16

照射等应激条件下对细胞起到保护作用^[25]。热应激条件下的小鼠中, CIRP 表达量的降低会加速精子细胞凋亡^[26]。而在本研究中, CIRP 蛋白表达量在冷冻复苏的施氏鲟精子中呈下调趋势, 推测 CIRP 功能同样具有一定的保守性, 鱼类精子在超低温冻存过程中, 其表达量下调同样导致精子细胞凋亡加速, 从而影响精子活力。

黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 是一

种促性腺激素。在男性中, LH 促进精子生成和睾酮分泌, 是精子质量的激素指征之一^[27]。欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 注射含 LH 序列的质粒实验发现, 可有效提高体内 LH 含量, 并促进鱼体的精子产生^[28]。施氏鲟冻精中 LH 含量为鲜精中的 0.1 倍, 表明精子中的促性腺激素水平受超低温的影响, 无法维持精子正常生理活动。

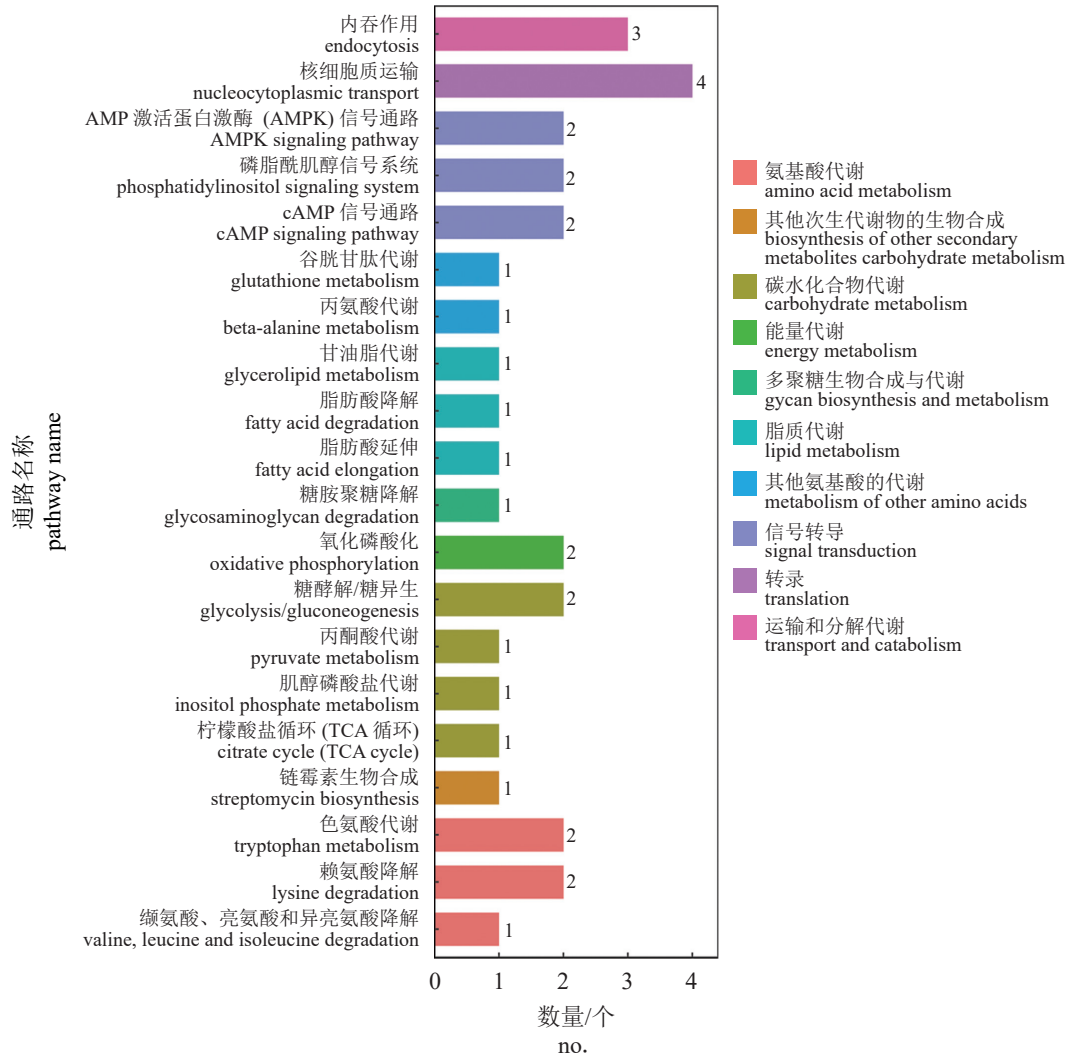


图 4 差异蛋白 KEGG 通路分布图

Fig. 4 The distribution of KEGG pathways of differential proteins

核孔蛋白 (nucleoporins, Nups) 是细胞核和细胞质之间的唯一门户, 分子只能通过 Nups 进出细胞核^[29]。在脊椎动物中 Nup53、Nup93、Nup155 及 Nup205 互相作用, 形成 NUP93 复合体, 对核孔复合物组装起决定性作用^[30]。低温对细胞和细胞膜产生负面影响, 降低膜的流动性, 破坏细胞内环境稳定性。在前期研究发现, 冷冻复苏的施氏鲟精子存在不同程度的膜损伤, 如鞭毛外膜破裂、细胞质膜产生皱褶等^[18]。本研究中, 施氏鲟精子经过超低温冷冻及复苏后, Nup53-1 和 Nup93 蛋白表达上调, Nup53-2 只在冻精中表达, 在鲜精中无表达。Nups 表达量变化可能与超低温冷冻条件下细胞膜蛋白构象的改变有关。此外, 轴丝动力蛋白 (dynein axonemal heavy chain, DNAH) 对精子的运动能

力起关键作用, 其缺失将引起精子运动能力缺陷, 造成精子活力严重下降^[31-32]。在冻精组中, DNAH-9 表达量显著下调, 这可能与鞭毛结构异常、轴丝脱落和断裂有关, 直接表现为冻精复苏后的快速运动时间和寿命都呈不同程度下降^[18]。糖酵解和氧化磷酸化是精子能量来源的主要途径^[33]。肌酸激酶 (CK) 和琥珀酸泛醌氧化还原酶 (SDHC) 等酶的活性与精子能量代谢的活跃度密切相关, 黄晓荣等^[34] 以上述酶活性的高低作为评价大黄鱼精子质量的标准。CK 是参与细胞内能量供给和 ATP 再生反应的重要激酶, 在机体的能量代谢过程中发挥重要作用^[35]。SDHC 在调节细胞内的几种生理过程、产生能量以维持正常细胞生长方面起重要作用, 并参与细胞凋亡过程^[36]。施氏鲟精子经过超低温冷

表 2 KEGG 通路相关蛋白

Tab. 2 Related proteins for KEGG pathway

KEGG通路 KEGG pathway	蛋白数量/个 no. of proteins	蛋白名称 protein
内吞作用 endocytosis	3	SBPL-A、RBP、RAB-8A
细胞核膜运输 nucleocytoplasmic transport	4	EF-1 α 、NUP53-1、NUP85、NUPS53-2
AMPK信号通路 AMPK signaling pathway	2	RAB-8A、GTP
磷脂酰肌醇信号系统 phosphatidylinositol signaling system	2	IP-P、CMD
cAMP信号通路 cAMP signaling pathway	2	CMD、LZH
谷胱甘肽代谢 glutathione metabolism	1	GTF
β -丙氨酸代谢 beta-alanine metabolism	1	ECOAH
甘油脂代谢 glycerolipid metabolism	1	LPL
脂肪酸降解 fatty acid degradation	1	ECOAH
脂肪酸延伸 fatty acid elongation	1	ECOAH
糖胺聚糖降解 glycosaminoglycan degradation	1	NAS-6S
氧化磷酸化 oxidative phosphorylation	2	CYT-C、IGDP
糖酵解/糖异生 glycolysis/ gluconeogenesis	2	GTP、PPH
丙酮酸代谢 pyruvate metabolism	1	GTP
肌醇磷酸盐代谢 inositol phosphate metabolism	1	IP-P
TCA循环 citrate cycle (TCA cycle)	1	GTP
链霉素生物合成 streptomycin biosynthesis	1	IP-P
色氨酸代谢 tryptophan metabolism	2	ECOAH、ODST
赖氨酸降解 lysine degradation	2	ECOAH、ODST
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 valine, leucine and isoleucine degradation	1	ECOAH

冻及复苏后 CK 表达下调, SDHC 表达上调。在此前研究中发现, 经过超低温冷冻及复苏后, 施氏鲟精子能量代谢酶的活性与鲜精相比均显著下降^[18], 与本研究结果相符, 其中 SDHC 的表达量上调可能为代偿引起。这些能量代谢相关酶的表达量改变会直接影响精子能量供给, 从而导致精子活动能力、受精能力等发生变化。

26S 蛋白酶体 (26S proteasome) 是真核细胞内依赖 ATP 进行蛋白质降解的主要分子, 参与大部分生物过程, 其中包括精子获能过程^[37]。它由 19S 调节颗粒和 20S 核心颗粒两部分组成。带泛素链标记的蛋白质底物通过 19S 调节颗粒的识别、折叠, 再传送到 20S 核心颗粒中降解。在热休克或氧应激环境下, 26S 蛋白酶体通过参与错误结构多肽和蛋白的降解、非功能性 (有毒) 蛋白的清除、氨基酸循环的重新活化和开始对细胞进行保护^[38]。在大鼠 (*Rattus norvegicus*) 中, 19S 调节颗粒中利用 ATP 水解提供能量的 PSMC 可能参与顶体生物发生、精子体头部塑造及头尾偶联装置的发展^[39]。在杜泊羊 (*Ovis aries*) 精子体外获能前后, PSM 家族蛋白表达

变化存在显著差异, 是潜在的获能标记物^[40]。施氏鲟精子冷冻复苏后, PSMC6 表达量仅为鲜精的 22.83%, 而 19S 调节颗粒的非 ATP 酶亚基 PSMD1 和 PSMD13 表达显著上调 3.48 和 1.98 倍, 其他 PSMD 和 PSMC 蛋白也有不同程度的表达变化, 这说明低温冷冻和复苏过程中 26S 蛋白酶体的功能可能受到 ATP 酶活性下降的影响^[13], 同时, 各个亚基蛋白表达变化可能通过蛋白质降解过程影响精子获能。

精子在抗氧化能力缺陷时会引起自由基堆积, 导致 DNA 损伤、脂质过氧化反应, 进而引起线粒体功能受损, 精子活力降低^[41], 而抗氧化酶如过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 等在抗氧化应激过程中发挥重要作用, 因此, 抗氧化酶的变化也用于衡量个体或细胞受外界胁迫或损伤的程度^[34]。CAT 可以清除过量的活性氧, 降低炎症因子表达, 从而保护细胞^[42]。冷冻可导致猫 (*Felis catus*) 精子内抗氧化酶活性降低, 而体外补充 SOD 可以在一定程度上提高猫的冷冻精子的活力^[43]。施氏鲟精子经过超低温冷冻及复苏后 CAT 和 SOD 表达下调,

与此前研究一致^[18], 抗氧化蛋白的表达量改变可能造成活性氧堆积, 从而导致精子活力下降, 是精子超低温冷冻损伤的主要因素之一。

4 结论

本研究利用 4D Label-free 定量蛋白组学技术筛选施氏鲟精子超低温保存前后的 200 个差异表达蛋白质, 对获得的差异蛋白进行生物信息学分析, 发现差异蛋白参与精子应激反应 (FAST-KD、DNAJB13 和 CIRP)、冷冻损伤 (Nups)、能量代谢 (CK 和 SDHC)、运动能力 (DNAH) 和抗氧化代谢 (CAT 和 SOD) 等生理过程。施氏鲟精子在冻融前后蛋白质存在显著差异, 这些差异蛋白可作为进一步研究精子耐冻性的候选标志物, 但其影响机制还有待研究。

参考文献 (References):

- [1] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望 [J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
Chen S L. Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 26(2): 161-168 (in Chinese).
- [2] 陈松林, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究 [J]. 动物学报, 1992, 38(4): 413-424.
Chen S L, Liu X T, Lu D C, et al. Cryopreservation of spermatozoa of silver carp, common carp, blunt snout bream and grass carp[J]. Acta Zoologica Sinica, 1992, 38(4): 413-424 (in Chinese).
- [3] Kiriyakit A, Gallardo W G, Bart A N. Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* × *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm[J]. *Aquaculture*, 2011, 320(1-2): 106-112.
- [4] 周洲, 李世凯, 赵飞, 等. 超低温冷冻保存对西伯利亚鲟精子酶活性的影响 [J]. 贵州农业科学, 2020, 48(1): 77-80.
Zhou Z, Li S K, Zhao F, et al. Effect of cryopreservation on enzymatic activity of *Acipenser baerii* spermatozoa[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2020, 48(1): 77-80 (in Chinese).
- [5] 邢露梅, 肖伟, 李兰兰, 等. 兰州鲌精液超低温冷冻保存技术研究及细胞损伤检测 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(3): 547-556.
Xing L M, Xiao W, Li L L, et al. Study of sperm cryopreservation in *Silurus lanzhouensis* and detection of cell damages after cryopreservation[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3): 547-556 (in Chinese).
- [6] 丁小雨, 李振通, 段鹏飞, 等. 长期超低温冷冻保存对鞍带石斑鱼精子超微结构及酶活性的影响 [J]. 水产学报, 2023, 47(7): 48-64.
Ding X Y, Li Z T, Duan P F, et al. Effects of long-term cryopreservation on ultrastructure and enzyme activity of *Epinephelus lanceolatus* sperm[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(7): 48-64 (in Chinese).
- [7] 黄晓荣, 张涛, 冯广朋, 等. 超低温冷冻对俄罗斯鲟精子顶体酶活性及 DNA 损伤的影响 [J]. 海洋渔业, 2016, 38(5): 487-494.
Huang X R, Zhang T, Feng G P, et al. Effects of cryopreservation on acrosin activity and DNA damage of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) semen[J]. Marine Fisheries, 2016, 38(5): 487-494 (in Chinese).
- [8] Yang Y, Wang T, Yang S, et al. Corrigendum: the effects of storage *in vitro* on functions, transcriptome, proteome, and oxidation resistance of giant grouper sperm[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 780244.
- [9] Arnold G J, Fröhlich T. Dynamic proteome signatures in gametes, embryos and their maternal environment[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, 23(1): 81-93.
- [10] Dietrich M A, Dietrich G J, Mostek A, et al. Motility of carp spermatozoa is associated with profound changes in the sperm proteome[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 138: 124-135.
- [11] Nynca J, Arnold G J, Fröhlich T, et al. Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins[J]. *Proteomics*, 2014, 14(12): 1569-1573.
- [12] Li P, Guo W, Yue H M, et al. Variability in the protein profiles in spermatozoa of two sturgeon species[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186003.
- [13] Nynca J, Arnold G J, Fröhlich T, et al. Cryopreservation-induced alterations in protein composition of rainbow trout semen[J]. *Proteomics*, 2015, 15(15): 2643-2654.
- [14] Zilli L, Beirão J, Schiavone R, et al. Comparative proteome analysis of cryopreserved flagella and head plasma membrane proteins from sea bream spermatozoa: effect of antifreeze proteins[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99992.
- [15] Dietrich M A, Arnold G J, Fröhlich T, et al. Proteomic analysis of extracellular medium of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio* L.) semen[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2015, 15: 49-57.
- [16] Horokhovatskiy Y, Dietrich M A, Lebeda I, et al. Cryopreservation effects on a viable sperm sterlet (*Acipenser ruthenus*) subpopulation obtained by a Percoll density gradient method[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202514.
- [17] 舒德斌, 郭柏福. 史氏鲟精子超低温冷冻保存研究 [J]. 水产科学, 2012, 31(4): 232-234.
Shu D B, Guo B F. Cryopreservation of sperm in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) [J]. Fisheries Science, 2012, 31(4): 232-234 (in Chinese).
- [18] 陈张帆, 程鹏, 胡谋, 等. 海藻糖对施氏鲟精子冷冻保存效果的影响及其冷冻损伤机理的初步探究 [J]. 海洋渔业, 2023, 45(1): 1-13.

- Chen Z F, Cheng P, Hu M, *et al.* Effect of trehalose on sperm cryopreservation of *Acipenser schrenckii* and preliminary study on the mechanism of its cryoinjury[J]. *Marine Fisheries*, 2023, 45(1): 1-13 (in Chinese).
- [19] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [20] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p. p. b. -range mass accuracies and proteome-wide protein quantification[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(12): 1367-1372.
- [21] Srivastava S, Syed S B, Kumar V, *et al.* Fas-activated serine/threonine kinase: structure and function[J]. *Gene Reports*, 2017, 8: 117-127.
- [22] Li W, Simarro M, Kedersha N, *et al.* FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(24): 10718-10732.
- [23] Yan P Z, Ren J, Zhang W Q, *et al.* Protein quality control of cell stemness[J]. *Cell Regeneration*, 2020, 9(1): 22.
- [24] Abayev-Avraham M, Salzberg Y, Gliksberg D, *et al.* DNAJB6 mutants display toxic gain of function through unregulated interaction with Hsp70 chaperones[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7066.
- [25] Sato Y, Tajima A, Kiguchi M, *et al.* Genome-wide association study of semen volume, sperm concentration, testis size, and plasma inhibin B levels[J]. *Journal of Human Genetics*, 2020, 65(8): 683-691.
- [26] Zhao W, Jing J, Shao Y, *et al.* Circulating sex hormone levels in relation to male sperm quality[J]. *BMC Urology*, 2020, 20(1): 101.
- [27] Xia Z P, Zheng X M, Zheng H, *et al.* Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(19): 3299-3308.
- [28] Lui H Y, Xu C C, Bao M, *et al.* Cold-inducible RNA-binding protein regulates cyclin B1 against spermatogenesis arrest caused by heat stress[J]. *Andrology*, 2022, 10(2): 392-403.
- [29] 王萍, 余自华. 核孔复合体的结构及其功能 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(3): 566-571.
- Wang P, Yu Z H. The structure and functions of the nuclear pore complex[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2019, 19(3): 566-571 (in Chinese).
- [30] Hawryluk-Gara L A, Shibuya E K, Wozniak R W. Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(5): 2382-2394.
- [31] Dawe H R, Shaw M K, Farr H, *et al.* The hydrocephalus inducing gene product, Hydin, positions axonemal central pair microtubules[J]. *BMC Biology*, 2007, 5(1): 33.
- [32] Ciolfi S, Mencarelli C, Dallai R. The evolution of sperm axoneme structure and the dynein heavy chain complement in cecidomid insects[J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016, 73(4): 209-218.
- [33] Du Plessis S S, Agarwal A, Mohanty G, *et al.* Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2015, 17(2): 230-235.
- [34] 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 超低温冷冻保存对大黄鱼精子酶活性的影响 [J]. *海洋渔业*, 2012, 34(4): 438-443.
- Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, *et al.* Effects of cryopreservation on enzyme activity of spermatozoa in *Pseudosciaena crocea*[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(4): 438-443 (in Chinese).
- [35] Saks V A. Molecular system bioenergetics: energy for life[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2007: 59-109.
- [36] Wang Q, Li M, Zeng N N, *et al.* Succinate dehydrogenase complex subunit C: role in cellular physiology and disease[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2023, 248(3): 263-270.
- [37] Kerns K, Morales P, Sutovsky P. Regulation of sperm capacitation by the 26S proteasome: an emerging new paradigm in spermatology[J]. *Biology of Reproduction*, 2016, 94(5): 117.
- [38] Goldberg A L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins[J]. *Nature*, 2003, 426(6968): 895-899.
- [39] Rivkin E, Kierszenbaum A L, Gil M, *et al.* Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development[J]. *Developmental Dynamics*, 2009, 238(7): 1851-1861.
- [40] 孙凤飞. 基于 TMT 技术对杜泊羊冻融前后精子的差异蛋白组分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019: 44-45.
- Sun F F. Analysis of the differential proteomics between fresh and frozen-thawed dorper sheep spermatozoa based on TMT technique[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019: 44-45 (in Chinese).
- [41] Aitken R J, Jones K T, Robertson S A. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health[J]. *Journal of Andrology*, 2012, 33(6): 1096-1106.
- [42] 朱安南, 刘欢, 孟勇, 等. 过氧化氢酶的功能及在畜禽中的研究进展 [J]. *饲料研究*, 2022, 45(10): 143-145.
- Zhu A N, Liu H, Meng Y, *et al.* Research progress on function of catalase and its application in livestock and poultry production[J]. *Feed Research*, 2022, 45(10): 143-145 (in Chinese)
- [43] Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, *et al.* Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of *in vitro* antioxidant enzymes supplementation and lipid peroxidation induction[J]. *Theriogenology*, 2010, 73(8): 1076-1087.

Proteomic analysis between fresh and freeze-thawing semen in *Acipenser schrenckii*

CHEN Zhangfan^{1,2}, DING Lanqing^{1,3}, CHENG Peng¹, HU Mou⁴, ZHANG Tingting^{1,3},
HUANG Hongtao⁵, DU Hejun⁵, CHEN Songlin^{1,2*}

1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory of Marine Fisheries and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Hangzhou Qiandaohu Xunlong Sci-tech Co., Ltd., Hangzhou 311701, China;

5. Hubei Key Laboratory of Three Gorges Project for Conservation of Fishes, Chinese Surgeon Research Institute, China Three Gorges Corporation, Yichang 443100, China

Abstract: *Acipenser schrenckii*, commonly known as the Amur sturgeon, is a vital species in China's sturgeon industry due to its significant economic value. Cryopreservation of sperm is a crucial technique for conserving and utilizing sturgeon germplasm resources, facilitating long-term storage of viable sperm. Previous studies have optimized the extender formulas, assessed antioxidant activities, examined enzyme functions related to energy metabolism, and compared sperm ultrastructure. However, there remains a paucity of research on the molecular changes occurring during sturgeon sperm cryopreservation. Addressing this gap, a recent study utilized 4D label-free quantitative proteomics to discern differentially abundant proteins between fresh and freeze-thawing *A. schrenckii* semen, post-thawing at 24 h. Proteins were extracted using SDT lysis buffer (4% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mol/L DTT) and sonication, followed by centrifugation for collection, identifying a total of 1 859 proteins. Employing a threshold of a 1.5-fold difference factor (FC) and a significance level (*P*-value) less than 0.05, 200 differentially abundant proteins were delineated, including 92 down-regulated and 108 up-regulated. Subcellular mapping revealed protein localization across various cellular compartments, while GO and KEGG enrichment analyses unveiled involvement in diverse biological processes, cellular components, molecular functions, and signaling pathways. Notably, Fas-activated serine/threonine phosphoprotein kinase 1 (FASTK1) was up-regulated in freeze-thawing semen for 48.81-fold, indicating a role in cell proliferation regulation for self-protection. Conversely, the down-regulation cold inducible RNA-binding protein (CIRP) suggested its involvement in cell proliferation, which ultimately affected the motility of free-thawing semen. Up-regulated Nup proteins potentially contributed to membrane protein conformation changes, destabilizing intracellular environments. Down-regulated DNAH-9 was linked to flagellum membrane disruption and fracture. Changes in proteins associated with energy metabolism and antioxidant response, including CK, SDHC, 26S proteasome, CAT and SOD, may elucidate the decreased motility of sturgeon semen after freeze-thawing process. These molecular alternations may impact sperm viability and function, possibly explain reduced fertilization success post-cryopreservation. The identified proteins could serve as candidate markers for *A. schrenckii* semen quality during the freeze-thawing process, guiding the development of improved cryopreservation protocols. This research lays a valuable foundation for deeper exploration into the molecular mechanisms of sturgeon sperm cryopreservation, crucial for the conservation and sustainable utilization of this vital fish resource.

Key words: *Acipenser schrenckii*; sperm cryoinjury; differentially abundant proteins; 4D label-free

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2022YFD2400103); Key Research and Development Program of Shandong Province (2021LZGC028, 2023ZLYS02); Taishan Scholar Climbing Project Fund of Shandong, China; Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD20); Project for National Marine Genetic Resource Center