DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251229002
引用格式: 陈文韬, 孙拿拿, 张文众. 全氟辛烷磺酸钾对环青春期雄性大鼠睾丸蛋白组的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 254–262.
CHEN WT, SUN NN, ZHANG WZ. Effects of potassium perfluorooctane sulfonate on the testicular proteome of peripubertal male rats [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 254–262. (in Chinese with English abstract).

全氟辛烷磺酸钾对环青春期雄性大鼠睾丸蛋白组的影响

陈文韬[1], 孙拿拿[2*], 张文众[1*]

(1. 皖南医科大学公共卫生学院, 芜湖 214002; 2. 国家食品安全风险评估中心毒理实验室, 北京 100021)

摘 要: 目的 探究全氟辛烷磺酸钾(potassium perfluorooctane sulfonate, PFOS-K)对环青春期雄性大鼠生殖系统的毒性。**方法** 基于前期 PFOS-K 的环青春期雄性大鼠实验, 提取对照组和 18 mg·kg^{-1}·bw^{-1} PFOS-K 组睾丸组织总蛋白, 每组 15 只, 同组的每 5 只动物等比例混合, 即对照组和 PFOS-K 组各 3 个样品; 使用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)进行蛋白质组学分析, 应用主成分分析(principal component analysis, PCA)来识别蛋白的差异, 使用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行通路富集分析。**结果** 共鉴定出 3320 种蛋白质, 其中 213 个为差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEP), 包括 102 个蛋白显著下调, 111 个蛋白显著上调; PFOS-K 导致 Col14a1-Col6a5-Col12a1、Fn1-Col6a5-Col6a2、PI3K-Akt 转导通路等蛋白下调; PFOS-K 导致 Upf2-Pym1-Casc3-Wdr33、Nup107-Upf2-Pym1-Casc3、Cul4b-Rfc3-Polr2i、Gtf2e1-Taf7l 等蛋白上调。**结论** PFOS-K 抑制了蛋白质合成途径、细胞骨架结构及黏附相关蛋白的表达, 并下调 PI3K-Akt 信号通路关键蛋白, 同时上调 RNA 代谢调控、核质转运以及 DNA 损伤修复相关蛋白的表达。

关键词: 全氟辛烷磺酸钾; 生殖毒性; 环青春期雄性大鼠; 蛋白质组学

Effects of potassium perfluorooctane sulfonate on the testicular proteome of peripubertal male rats

CHEN Wen-Tao[1], SUN Na-Na[2*], ZHANG Wen-Zhong[1*]

(1. *School of Public Health*, *Wannan Medical University*, *Wuhu* 214002, *China*; 2. *Toxicology Laboratory*, *China National Center for Food Safety Risk Assessment*, *Beijing* 100021, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the reproductive toxicity of potassium perfluorooctane sulfonate (PFOS-K) on peripubertal male rats. **Methods** Based on a previous experiment using peripubertal male rats exposed to PFOS-K, total testicular proteins were extracted from the control group and the PFOS-K-exposed group

收稿日期: 2025-12-29
基金项目: 博士研究启动基金项目(X600100102)
第一作者: 陈文韬(1999—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: 575985846@qq.com
***通信作者:** 孙拿拿(1983—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为分子毒理学。E-mail: sunnana@csfa.net.cn
张文众(1976—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: zhangwz2002@sina.com

(18 mg • kg^{-1} • bw^{-1}). For each group (n=15 per group), tissues from 5 animals were pooled in equal proportions, resulting in 3 samples per group. Proteomic analysis was performed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Principal component analysis (PCA) was applied to identify protein differences, and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) database was used for pathway enrichment analysis. **Results** A total of 3320 proteins were identified, of which 213 were differentially expressed proteins (DEPs), including 102 significantly downregulated and 111 significantly upregulated proteins. PFOS-K exposure led to the downregulation of protein clusters such as Col14a1-Col6a5-Col12a1, Fn1-Col6a5-Col6a2, and key proteins involved in the PI3K-Akt signaling pathway. Meanwhile, PFOS-K induced the upregulation of protein clusters including Upf2-Pym1-Casc3-Wdr33, Nup107-Upf2-Pym1-Casc3, Cul4b-Rfc3-Polr2i and Gtf2e1-Taf7l. **Conclusion** PFOS-K inhibits the expression of proteins related to protein synthesis pathways, cytoskeletal structure and cell adhesion and downregulates key proteins in the PI3K-Akt signaling pathway. Simultaneously, PFOS-K upregulates proteins involved in RNA metabolic regulation, nucleocytoplasmic transport and DNA damage repair.

KEY WORDS: potassium perfluorooctane sulfonate; reproductive toxicity; peripubertal male rats; proteomics

0　引　言

人类生育率的下降趋势引发广泛关注[1]。在过去的几十年里, 全球男性精液质量有所下降[2–3]。尽管致病因素仍有待完全发现, 但暴露于环境污染物被认为是导致雄性生殖能力受损的主要因素[4–5]。全氟辛烷磺酸又称全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS), 作为全氟及多氟烷基化合物的重要代表物, 是一类具有独特理化特性的脂肪烃类衍生物。其分子结构特征表现为全氟辛烷链上的氢原子全部被氟原子取代, 且末端带有磺酸基, 这种全氟化结构与官能团组合赋予了该化合物耐高温、疏水、疏油及化学稳定性强等优异特性, 已广泛应用于纺织业、皮革涂饰、涂料加工、消防泡沫等生产领域。但是, 近年来许多研究证明: PFOS 作为持久性有机污染物, 在自然环境中具有难降解、远距离迁移性, 易沿食物链传播并在动物体内富集的特性, 在我国境内和世界范围内均广泛存在[6–8]。PFOS 可通过饮用水、食物链及职业暴露等途径进入人体, 并在血清和肝脏中蓄积, 其生物半衰期长达 5.4~10.4 年[9]。流行病学研究证据表明, PFOS 暴露与多种健康风险存在显著关联, 其暴露可导致甲状腺功能异常、高胆固醇血症、溃疡性结肠炎等代谢性疾病, 以及肾癌、睾丸癌和前列腺癌等恶性肿瘤发病率的升高[10–12]。此外, PFOS 具有免疫毒性, 可干扰免疫系统功能[13]; 同时作为明确的内分泌干扰物, 其对生殖系统产生多靶点不良影响[14–15]。

蛋白质组学作为系统生物学的重要分支, 利用高通量技术全面分析生物体内的蛋白质表达和功能, 为理解细胞的生理状态和分子机制提供了有效的解决方案[16]。毒物暴露显著改变了许多细胞内蛋白质的表达, 这些蛋白质通过不同的生物学过程和信号通路参与机体的代谢和生理调节。研究表明, 砷通过 ERK/AKT/NF-κB 依赖性信号通路引发雄性生殖毒性。此外, 该研究鉴定了 19 种与雄性生殖密切相关的差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEP)以及 2 种代谢物[17]。随着蛋白质组学技术的不断进步, 研究人员能够更精确地检测毒物暴露引发的分子反应, 全面揭示毒物对蛋白表达的影响。这些表达变化的蛋白被认为是毒物引起的生物学反应的重要指示分子[18]。本研究以全氟辛烷磺酸钾(potassium perfluorooctane sulfonate, PFOS-K)的环青春期雄性大鼠实验为基础, 采用液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)蛋白质组学技术, 对大鼠睾丸组织进行系统分析。研究结果将有助于全面揭示 PFOS-K 引发的雄性生殖毒性机制, 并为环境毒物暴露的健康风险评估提供潜在的生物标志物。

1　材料和方法

1.1　材料和试剂

乙腈、三羟甲基氨基甲烷、尿素、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、甲酸(formic acid, FA)(色谱纯)、PFOS-K(纯度 99%)(北京精华耀邦医药科技有限公司); 水合氯醛(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)(浓度 0.01 mol/L, 细胞培养级, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2　仪器与设备

Orbitrap Q-Exactive HF 高分辨率质谱仪、Legend Micro 17R 离心机(中国上海赛默飞世尔科技公司); CPA225D 十万分之一分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); BE-3100 涡旋振荡器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); SevenDirect™ SD20 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); JY92-IIN 超声波细胞粉碎机、S10 智能匀浆

机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 低 pH 反相 C_{18} 毛细管色谱柱(75 μm×150 mm, 3 μm)、EASY-nLC 1200 纳升液相色谱系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

所有实验均依据北京市实验室动物管理规定(涉及动物实验福利与伦理审查相关要求)开展, 并经国家食品安全风险评估中心动物实验伦理常设委员会批准, 批准编号为 2014016。60 只 19 日龄 SD 雄性大鼠(级别: SPF 级, 无特定病原体级), 体重 31.5~56.2 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司(中国北京), 饲养于北京口腔医院(中国北京)。实验动物在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)屏障环境[温度(24±2) ℃, 相对湿度 30%~60%, 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 光照强度≥200 lx]中适应性饲养 3 d, 期间自由摄食饮水, 并进行检疫观察。随后随机分为 4 组, 即对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 15 只动物。从出生后第 23 d (PND 23)至第 53 d (PND 53), 各组大鼠每日给予不同剂量的 PFOS-K, 剂量分别为 0 $mg \cdot kg^{-1} \cdot bw^{-1}$(对照组)、2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot bw^{-1}$(低剂量组)、6 $mg \cdot kg^{-1} \cdot bw^{-1}$(中剂量组)和 18 $mg \cdot kg^{-1} \cdot bw^{-1}$(高剂量组)。

1.4 实验样品的采集和处理

实验结束, 用 3%水合氯醛麻醉后, 取对照组(C 组)和 18 $mg \cdot kg^{-1} \cdot bw^{-1}$ PFOS-K 组(Ah 组)SD 大鼠睾丸组织, 用眼科剪剪碎组织并用 PBS 清洗 3 遍, 随后, 加入裂解液, 并采用匀浆机充分匀浆。每 5 只动物等比例混合, 即对照组和 PFOS-K 组各 3 个样品, 总共收集 6 个样本。将样本管置于冰水混合物中, 利用细胞超声破碎仪在 80 W 功率下超声处理 5 min, 直至液体澄清, 随后冰上静置 20 min。最后, 在 4 ℃条件下, 以 12000 r/min 离心 15 min, 取上清用于后续质谱分析。样品处理过程中制备质量控制(quality control, QC)样本, 以保证分析的稳定性与准确性。

通过将每个睾丸组织样本的 10 μL 等体积混合, 生成了 QC 样品。这些混合后的质控样品在 LC-MS/MS 运行序列中每间隔 10 次实验进样一次。为了确保数据的可靠性, 排除了变异系数(coefficient of variation, CV)超过 30%的蛋白质。此外, 通过计算质控样品重复之间的皮尔逊相关系数(r), 进一步验证了仪器的稳定性, 仅保留了 r>0.90 的特征。

1.5 LC-MS/MS 条件

多肽分离采用 EASY-nLC 1200 纳升液相色谱系统, 配低 pH 反相 C_{18} 毛细管色谱柱(75 μm×150 mm, 3 μm)。参数设置: 柱温: 40 ℃; 样品温度: 5 ℃; 液相流速: 0.30 μL/min。流动相如下: A 相: 99.9%水+0.1% FA; B 相: 80%乙腈+19.9%水+0.1% FA。操作条件: 负离子采集模式: 使用信息依赖采集(information-dependent acquisition, IDA)高灵敏度扫描模式, 并启用动态背景减除。离子源参数: 鞘气流速: 30; 气体 1 流速: 50; 气体 2 流速: 50; 温度: 500 ℃; 扫描时间: 15 min; 以及扫描范围: 首先进行一次主扫描, 扫描范围为 60~1250 m/z, 随后对每次主扫描进行 12 次二次扫描。在正离子收集模式下, 采用相同的扫描模式和参数设置。

质谱数据数据库检索: 使用 MaxQuant 软件(v2.1.0)搭配 Andromeda 搜索引擎, 对 LC-MS/MS 原始数据进行检索。数据库采用 UniProt Rattus norvegicus 参考蛋白质组(序列条目数: 36187 条)。检索参数设置如下: 酶切方式为胰蛋白酶, 允许最多 2 个漏切位点; 固定修饰设为半胱氨酸脲甲基化(carbamidomethylation, C); 可变修饰设为甲硫氨酸氧化(oxidation, M)及蛋白 N 端乙酰化(N-terminal acetylation, protein N-term)。一级质谱质量容差设为第一轮搜索 20.0 ppm, 主搜索 4.5 ppm; 二级质谱质量容差设为 20.0 ppm。肽段谱图匹配、肽段及蛋白水平的假发现率均控制在 1%以下。蛋白质鉴定要求至少含 1 条特异性肽段, 定量分析仅纳入至少含 2 条特异性肽段的高置信度蛋白。

为考察 LC-MS/MS 分析系统的稳定性与重复性, 在样本队列中周期性插入由所有实验样本等体积混合制备的质控样本。基于各组样本共定量蛋白经 $\log_2$ 转换后的 iBAQ 进行相关性分析, 任意两组重复实验共定量蛋白 iBAQ 的 Pearson 相关系数如图 1 所示, 所有相关系数均大于 0.90, 表明研究的质谱检测过程具有高度的仪器稳定性和技术重复性。

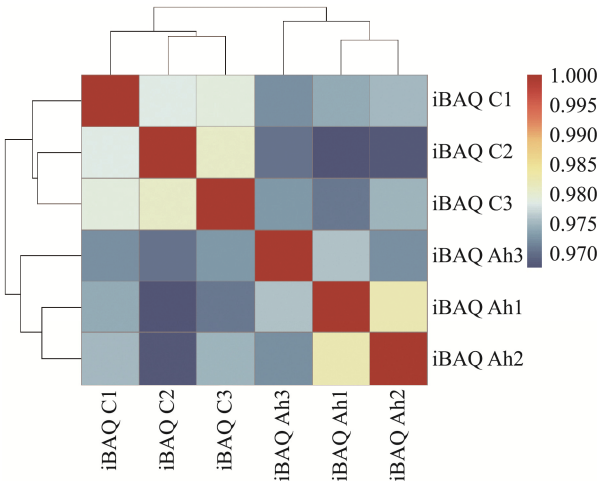


图 1 QC 样本重复进样的 Pearson 相关性分析
Fig.1 Pearson correlation analysis of replicate QC sample injections

1.6 蛋白质组学数据提取和处理

首先使用 MaxQuant 软件(v2.1.0)处理原始质谱数据, 进行质量校准以消除仪器偏差和保留时间漂移。通过反向数据库搜索控制假阳性率≤1%, 并基于非标记定量(label-free quantification, LFQ)算法进行蛋白质定量, 仅保留至少含 2 条独特肽段的可靠蛋白质。同时计算 iBAQ, 用于蛋白质绝对定量评估。数据经过总离子流强度归一化处

理, 采用k-最近邻法填补缺失值。最终获得包含蛋白质ID、iBAQ、肽段计数和修饰信息的综合数据集, 确保后续差异分析和功能注释的可靠性。

1.7　蛋白质组学数据分析方法

用MaxQuant软件(v2.1.0)软件分析了大鼠的睾丸组织数据, 构建了包含蛋白质 ID、iBAQ 和定量强度的多维数据集。基于 UniProt 数据库和 Andromeda 搜索引擎进行蛋白质鉴定, 随后, 将处理后的数据导入 R 平台(v4.1.0), 基于严格的质量控制标准: 错误发现率(false discovery rate, FDR)<1%, 最小肽段数≥2, 设置表达量 CV<30%及至少70%有效值的数据完整性阈值, 筛选获得 519 种高置信度共定量蛋白质用于后续分析。

在数据分析阶段, 本研究首先通过主成分分析(principal component analysis, PCA)评估样本间的整体变异情况, 并采用层次聚类热图、火山图等可视化蛋白质表达谱特征。DEP 的判定采用 Student's t 检验计算原始 P, 并通过 Benjamini-Hochberg 方法进行 FDR 校正。将同时满足 FDR<0.05 且倍数变化(fold change, FC)≥1.5 或 FC≤0.67 的蛋白质判定为显著 DEP, 旨在初步筛选候选蛋白, 为后续验证提供靶点假设。功能注释采用基因本体(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行系统性富集分析, 关键蛋白相互作用网络通过 STRING 数据库(v12.0)构建并经由 Cytoscape (v3.8.2)进行可视化。

1.8　数据处理

数据使用 SPSS 26.0 软件进行记录和分析。以 α=0.05 作为检验水准, P<0.05 判断为具有统计学意义。R 语言编制了火山图、热力图、GO 富集分析图和 KEGG 富集分析图。

2　结果与分析

2.1　DEP 的鉴定

PCA 显示, PFOS-K 组与对照组在前两个主成分上存在明显的分离(图 2)。模型解释了 52.6%的总代谢变异(PC1: 30.2%, PC2: 22.4%), 与对照组(C 组)相比, 高剂量组(Ah 组)表现出更广泛的分布(置换多变量方差分析: P<0.001, F=14.7)。其中 PC1 主要负责区分两组。PFOS-K 组样本(蓝色圆圈)集中在 PC1 轴上(PC1 范围: –20 至–10, PC2 轴: –45 至 42), 显示出组内高度的一致性。相比之下, 对照组样本(红色圆圈)在 PC1 轴(25 至+35)和 PC2 轴(–25 至+22)上分布范围与高剂量组一致, 表明两组样本在 PCA 图中呈现分离趋势。置换多变量方差分析证实了组间显著差异(P<0.001, F=18.3), 而 95%置信椭圆显示分布不重叠, 进一步证实了 PFOS-K 暴露引起的蛋白表达变化。

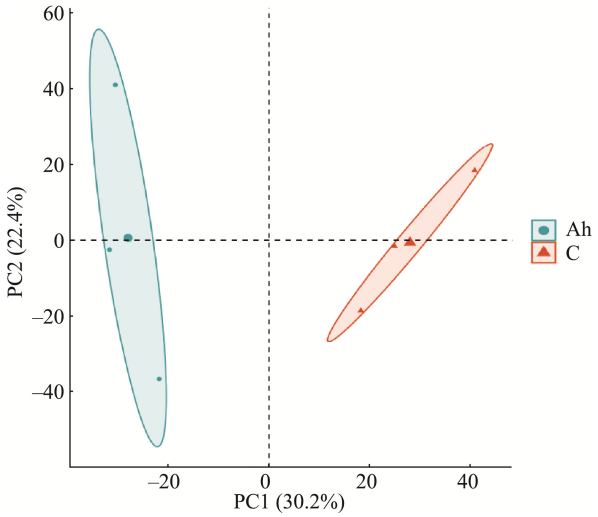


图 2　睾丸蛋白 PCA
Fig.2　PCA of testicular proteins

通过 LC-MS/MS 分析, 本研究共采集获得 286334 张原始质谱谱图。经 MaxQuant 软件(v2.1.0)检索, 以 FDR<1%为阈值, 共鉴定到 218907 张有效谱图(二级有效谱图率 76.4%), 对应 156342 条肽段, 其中 98671 条为独特性肽段。在蛋白水平, 共鉴定到 4126 个蛋白质组。在 UniProt Rattus norvegicus 数据库中匹配共鉴定出 3320 种蛋白质。在 519 个高置信度定量蛋白的基础上, 以 FDR<0.05 且 FC≥1.5 或 FC≤0.67 为阈值, PFOS-K 组中共筛选出 213 种显著差异表达的蛋白质, 其中 111 种上调, 102 种下调。蛋白质定量的统计结果显示在火山图(图 3A)中。分层聚类热图(图 3B)呈现了 DEP 在高剂量组与对照组中的标准化丰度分布模式及分层聚类结果。高剂量组样本以红色调为主, 对照组以蓝色调为主, 颜色模式显示出清晰的组间分离, 且组内重复样本的丰度模式一致性高, 表明实验处理的重复性和稳定性良好。图 3B 将 DEP 聚类为两个主要簇, 分别对应火山图中鉴定的上调和下调蛋白群体, 其表达模式与差异蛋白的调控方向完全一致, 进一步证实了 DEP 筛选结果的可靠性。

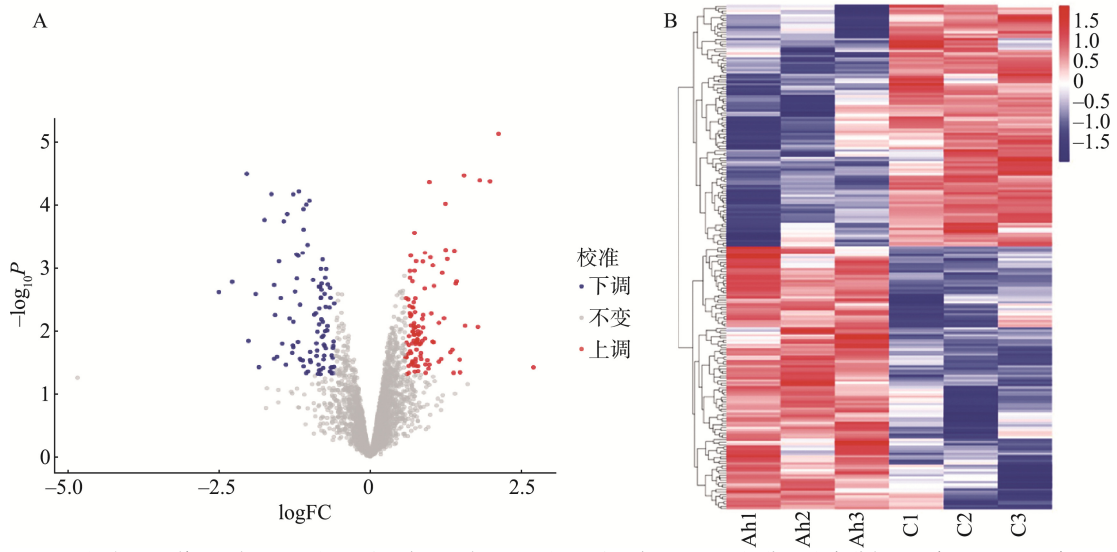
2.2　基因本体分析

对 PFOS-K 组和对照组之间的 DEP 进行 GO 富集分析, 显示 PFOS-K 暴露后上调和下调蛋白的生物学功能和机制。在上调蛋白中, 与 PFOS-K 诱导的生殖毒性相关的生物过程主要涉及核转录的信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)分解代谢和 mRNA 加工。细胞成分分析显示与 U2 型剪接体复合物和小核核糖核蛋白复合物相关的基因显著富集(图 4A)。分子功能分析显示 RNA 聚合酶活性和转录因子结合密切相关。下调蛋白的 GO 分析则显示, 生物过程中急性阶段反应和急性炎症反应显著富集, 细胞组分中细胞外基质和基底膜富集明显, 分子功能方面则以胶原结合和蛋白酶结合等功能的富集为特征。两者均在生物过程中明显富集(图 4B)。

2.3 差异表达蛋白的 KEGG 通路分析和蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

进行 KEGG 通路富集分析，鉴定 DEPs 的功能。结果表明(图 5), PFOS-K 组下调蛋白显著富集于 PI3K-Akt 信号通路、细胞外基质-受体相互作用及黏着斑等通路(P<0.05), 涉及 Fn1、Col6a5、Col6a2、Col1a2 等多个核心蛋白；而上调蛋白则富集于 RNA 转运、剪接体及核苷酸切除修复等通路(图 5B)，涉及 Upf2、Nup107、Cul4b、Gtf2e1 等关键蛋白。

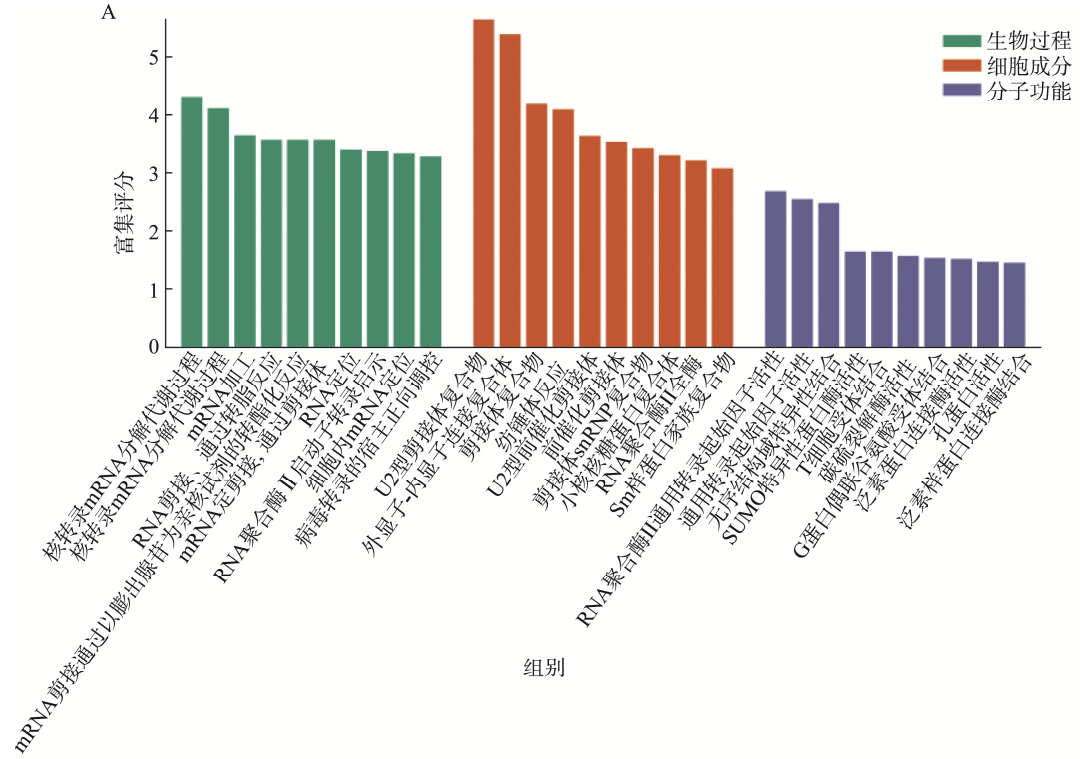
使用 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络分析进一步揭示了 DEPs 之间的功能关联。如图 5C 所示，下调蛋白网络中识别出一个以细胞外基质组分为核心的功能模块(包含 Col14a1、Col6a5、Col12a1、Fn1、Col6a2



注: A. DEP 的火山图谱；红点. 上调的差异蛋白；蓝点. 下调的差异蛋白; B. DEP 的分层聚类分析；红色. 上调；蓝色. 下调；图 B 中 Ah 为 PFOS-K 组大鼠；图 B 中 C 为对照大鼠。

图 3 大鼠睾丸蛋白组学分析图

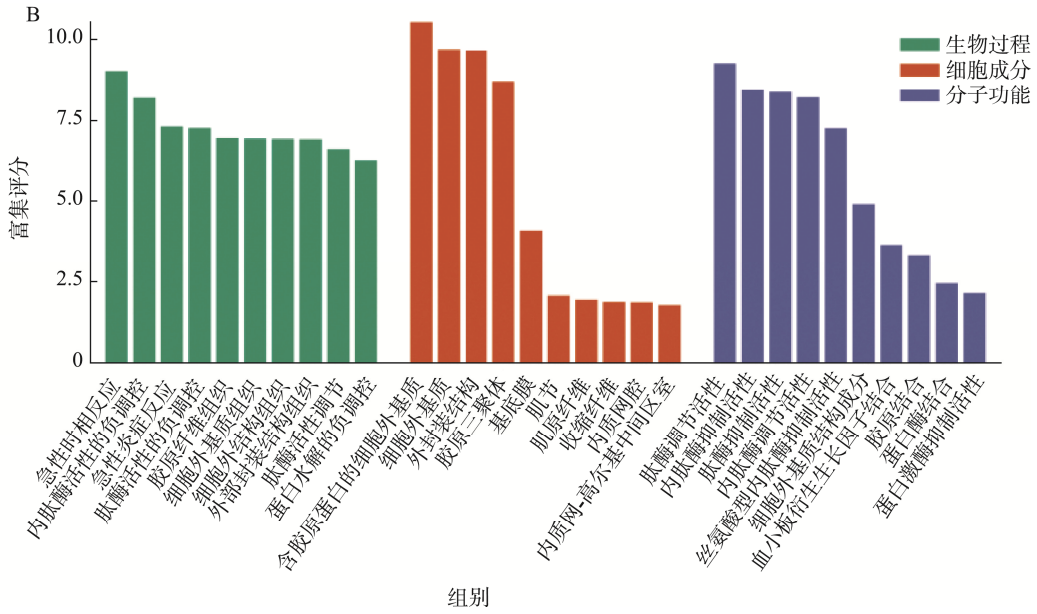
Fig.3 Proteomics analysis diagram of rat testis



注: A. 上调差异表达基因的 GO 功能富集分析; B. 下调差异表达基因的 GO 功能富集分析；选择具有最低 P 的 10 个项目来绘制条形图。

图 4 DEPs 的 GO 富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of differentially DEPs



注: A. 上调差异表达基因的 GO 功能富集分析; B. 下调差异表达基因的 GO 功能富集分析; 选择具有最低 P 的 10 个项目来绘制条形图。

图 4(续)　DEPs 的 GO 富集分析

Fig.4　GO enrichment analysis of DEPs

等), 该模块与细胞黏附及细胞外基质稳态密切相关。上调蛋白网络(图 5D)中则识别出多个高度互联的功能模块(图 5E), 主要包括 RNA 代谢与监控模块(Upf2、Pym1、Casc3、Wdr33、Snrpf 等); 核质转运模块(Nup107、Upf2、Pym1、Casc3 等); DNA 损伤修复模块(Cul4b、Rfc3、Polr2i 等); 转录调控模块(Gtf2e1、Taf7l 等)。网络中心性分析显示, Snrpf、Casc3、Snw1 等蛋白在上调网络中具有较高的连接度(图 5F), 提示其在应激响应中发挥核心作用; 下调网络中 Fga、Ahsg、Serpina1 等蛋白处于枢纽位置。

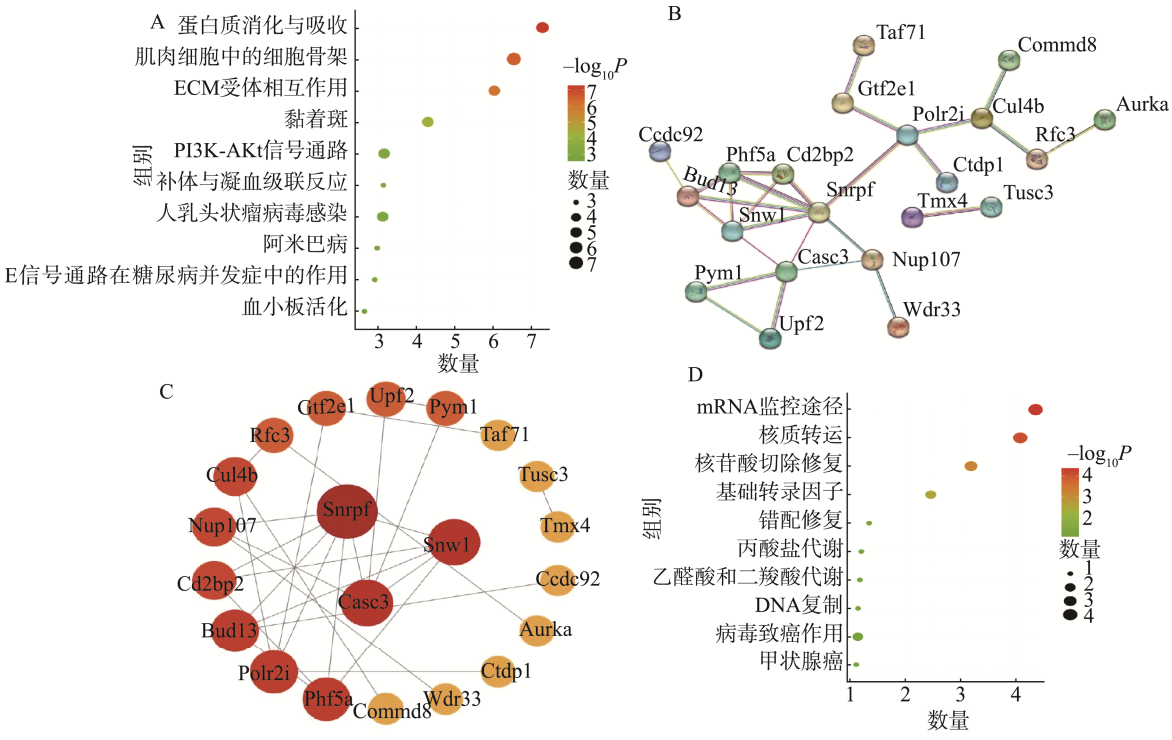


图 5　DEPs 的 KEGG 通路分析和蛋白质-蛋白质相互作用网络图

Fig.5　KEGG pathway analysis and protein-protein interaction network diagram of DEPs

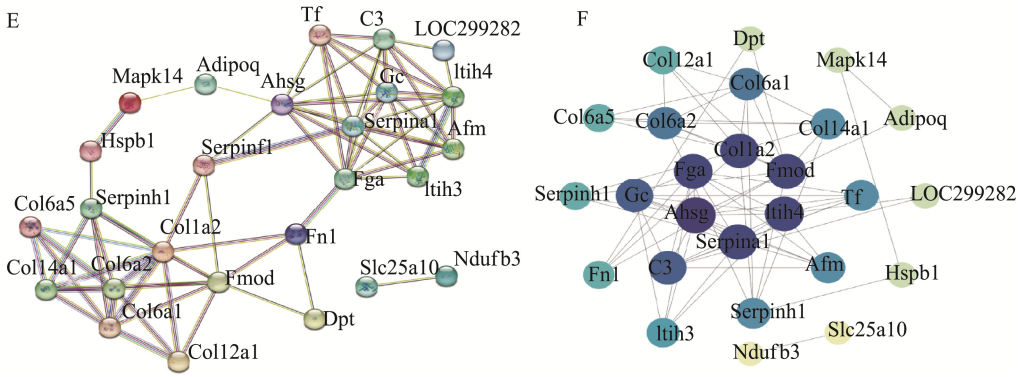


图 5(续) DEPs 的 KEGG 通路分析和蛋白质-蛋白质相互作用网络图

Fig.5 KEGG pathway analysis and protein-protein interaction network diagram of DEPs

3 讨论与结论

前期研究已发现 PFOS-K 对环青春期雄性大鼠具有明显的抗雄激素作用，18 mg • kg^{-1} • bw^{-1} PFOS-K 组精子畸形率增加，活性下降[19]。因此本研究以睾丸为靶器官研究 PFOS-K 对睾丸的毒性机制。选取出生后第 23~53 d (PND 23~53)这一暴露窗口，旨在覆盖雄性大鼠环青春期的核心发育阶段。该阶段是生殖系统发育编程的关键窗口，对外源性毒物的干扰高度敏感，因此更易于捕捉和鉴定 PFOS-K 暴露所引起的分子毒性效应。

作为调控细胞增殖、生长、代谢及存活的核心通路，PI3K-Akt 信号通路在维持细胞生存、增殖和代谢稳态中具有关键作用，其通路活性与结构蛋白和代谢调控密切相关[20–21]。已有研究证实，该通路的抑制会直接影响精子活力、过度激活和顶体反应等关键生殖功能[22]。本研究显示，PFOS-K 暴露特异性抑制了雄性大鼠睾丸组织中 PI3K-Akt 信号通路的多个关键蛋白表达。提示 PFOS-K 抑制 PI3K-Akt 信号通路是导致雄性生殖毒性的重要机制之一。

细胞骨架维持及黏附功能密切相关的多种结构蛋白在维持睾丸组织完整性、支持精原细胞定位与形态方面发挥重要作用，对维持睾丸微环境的结构稳定性和生殖功能至关重要[23–24]。本研究 PFOS 致 Fn1、Col6a5、Col6a2 等表达水平明显下降，提示 PFOS-K 可干扰细胞黏附复合物和细胞外基质网络。此外，伴随着细胞结构与黏附功能的受损，代谢相关通路中的多种蛋白亦表现出下调趋势。代谢通路异常可能是细胞结构破坏和信号传导障碍的进一步表现，形成由信号通路抑制到结构功能受损再到代谢紊乱的层级性毒理机制。蛋白定位分析进一步表明，下调蛋白主要富集于核糖体、胞质骨架、胞外基质及细胞膜相关结构中。KEGG 通路富集结果显示，这些蛋白涉及蛋白质合成、细胞外基质-受体相互作用、焦点黏附、PI3K-Akt 信号通路等核心生物过程。因此，PFOS-K 可能通过“信号通路抑制-结构功能受损-代谢紊乱”这一多级干预链，对睾丸产生毒性。值得注意的是，上述细胞外基质组分及 PI3K-Akt 通路关键蛋白的下调，在成年期 PFOS 暴露研究中鲜有报道，提示环青春期睾丸对细胞外基质稳态和生长因子信号的扰动可能具有独特的发育窗口敏感性。细胞外基质不仅是睾丸结构的物理支架，更通过整合素信号参与 BTB 的定向组装与支持细胞极性建立。因此，PFOS-K 对细胞外基质网络的破坏可能直接干扰 BTB 的形成成熟，此为成年期暴露所不具备的毒性特征。

RNA 代谢是调控基因表达稳定性和细胞应激反应的关键过程，其中 mRNA 监控机制在识别和降解异常转录本中起着核心作用[25]。研究表明，转录后调控异常与多种生殖疾病密切相关，而 RNA 监控通路的激活可能是细胞对毒性应激的早期反应之一[26]。Casc3、Upf2 等上调蛋白参与了真核生物无义介导 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay，NMD)过程，该过程通过清除有缺陷的 mRNA 以维持基因表达的准确性。核质转运作为细胞核与细胞质之间信息与物质交流的重要机制，在调节蛋白质和 RNA 进出核孔的过程中发挥重要作用[27]。研究显示，Nup107 等核孔复合体蛋白的表达变化与细胞周期调控及应激反应密切相关[28]。本研究中，PFOS-K 致多个核质转运相关蛋白表达上调。提示睾丸组织对 PFOS-K 的毒性产生了应激反应。

此外，DNA 损伤修复机制对维持基因组稳定性至关重要[29]。本研究中，PFOS-K 致核苷酸切除修复通路中的关键蛋白(如 Cul4b、Rfc3、Polr2i)在 PFOS-K 暴露组中呈现明显上调。这些蛋白参与识别并修复 DNA 链中的损伤区域，防止突变积累和细胞凋亡[30]，提示 PFOS-K 可能诱发 DNA 损伤，并激活了睾丸的修复通路作为补偿。GO 定位分析显示，上调蛋白主要分布于核内、核孔复合体及 RNA 结合复合体等亚细胞结构，进一步支持其在 RNA 代谢与核功能调控中的活跃作用。

综上所述，可提出一个层级性毒理假说—“损伤-代偿-失衡”。PFOS-K 暴露首先抑制蛋白质合成、细胞外基质

网络及 PI3K-Akt 信号通路, 构成原发性结构损伤与生长信号抑制(第一层级); 继而激活 NMD、核质转运及 DNA 损伤修复等核内应激通路, 反映细胞在毒性胁迫下的代偿性应激响应(第二层级); 然而, 这种代偿是不充分且不可持续的, 结构损伤未获修复、信号通路持续受抑, 加之应激反应的高能耗状态, 最终导致睾丸发育编程失衡与功能不全(第三层级)。该假说将“抑制”与“上调”统一为时序性因果链条, 为后续机制验证提供了可检验的分子框架。

本研究的样本合并策略主动将每 5 只动物的睾丸组织等比例混合为一个生物学重复, 是为了有效均化个体间的生物学变异, 从而最大限度地凸显由 PFOS-K 暴露驱动的组间系统性蛋白表达差异, 此策略在资源有限的初步筛选中尤为适用, 通过降低个体差异, 能够更专注于识别具有群体代表性的核心差异蛋白及通路。但此策略削弱了统计推断效力, 无法反映真实的个体间生物学变异。研究表明, 样本池化虽可降低表观方差, 但其降低幅度远小于理论预期, 实际后果是统计检验效力下降, 并可能导致低丰度差异蛋白的漏检(假阴性) 以及因池化偏差而产生的错误关联(假阳性)[31]。因此, 本研究所鉴定的 213 个差异表达蛋白及其富集通路, 需视为初步筛选结果, 而非最终定论。其次本研究主要基于动物模型, 所得结果在人类中的适用性仍需进一步验证, 差异蛋白互作及生殖毒性相关具体功能仍需基因操作等实验明确。研究仅聚焦蛋白表达变化, 对转录后修饰等复杂分子机制探讨不足, 限制了对 PFOS-K 作用机制的深入理解。

本研究是一项探索性、假说生成性的蛋白质组学研究, 结果发现 18 mg • kg^{-1} • bw^{-1} PFOS-K 可影响雄性大鼠睾丸组织的蛋白表达谱, 表现为蛋白质合成通路受抑, 细胞骨架结构与黏附相关蛋白下调, 以及 PI3K-Akt 信号通路关键蛋白表达显著降低, 提示 PFOS-K 破坏了细胞结构和信号传导。同时, PFOS-K 亦可诱导 RNA 代谢调控、核质转运及 DNA 损伤修复等应激相关通路的上调。此研究并非提供终末验证的毒性靶点, 而是为后续研究提供候选蛋白列表与可检验的通路假说, 上述蛋白可在后续研究通过不同模型和方法进行严格验证。

参考文献

[1] SKAKKEBÆK NE, LINDAHL-JACOBSEN R, LEVINE H, *et al*. Environmental factors in declining human fertility [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2022, 18(3): 139–157.

[2] CENTOLA GM, BLANCHARD A, DEMICK J, *et al*. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: Observations from a U.S. sperm bank [J]. Andrology, 2016, 4(2): 270–276.

[3] PUNJANI N, ALAWAMLH OA, KIM SJ, *et al*. Changes in semen analysis over time: A temporal trend analysis of 20 years of subfertile non-azoospermic men [J]. The World Journal of Men’s Health, 2023, 41(2): 382–389.

[4] KRZASTEK SC, FARHI J, GRAYM, *et al*. Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential [J]. Translational Andrology and Urology, 2020, 9(6): 2797–2813.

[5] MOHAMMADZADEH M, KHOSHAKHLAGH AH, CALDERÓN-GARCIDUEÑAS L, *et al*. Inhaled toxins: A threat to male reproductive health [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 286: 117178.

[6] WANG Q, ZHAO Z, RUAN Y, *et al*. Occurrence and distribution of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in natural forest soils: a nationwide study in China [J]. Science of the Total Environment, 2018, 645: 596–602.

[7] JIAN JM, GUO Y, ZENG L, *et al*. Global distribution of perfluorochemicals (PFCs) in potential human exposure source-a review [J]. Environment International, 2017, 108: 51–62.

[8] KURWADKAR S, DANE J, KANEL SR, *et al*. Per- and polyfluoroalkyl substances in water and wastewater: A critical review of their global occurrence and distribution [J]. Science of the Total Environment, 2022, 809: 151003.

[9] SUMAN TY, KWAK IS. Current understanding of human bioaccumulation patterns and health effects of exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2025, 487: 137249.

[10] SEYYEDSALEHI MS, BOFFETTA P. Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS) exposure and risk of kidney, liver, and testicular cancers: A systematic review and meta-analysis [J]. La Medicina del lavoro, 2023, 114(5): e2023040.

[11] ZHU L, LIU B, HU Y, *et al.* Per- and polyfluoroalkyl substances, apolipoproteins and the risk of coronary heart disease in US men and women [J]. Environmental Health, 2024, 23(1): 108.

[12] LI S, OLIVA P, ZHANG L, *et al*. Associations between per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and county-level cancer incidence between 2016 and 2021 and incident cancer burden attributable to PFAS in drinking water in the United States [J]. Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology, 2025, 35(3): 425–36.

[13] EHRLICH V, BIL W, VANDEBRIEL R, *et al*. Consideration of pathways for immunotoxicity of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) [J]. Environ Health, 2023, 22(1): 19.

[14] CHEN L, LIANG S, LI J, *et al*. Analyzing the impact of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the reproductive system using network toxicology and molecular docking [J]. Heliyon, 2024, 10(20): e39419.

[15] ALAM MN, HAN X, NAN B, *et al*. Chronic low-level perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure promotes testicular steroidogenesis through enhanced histone acetylation [J]. Environmental Pollution, 2021, 284: 117518.

[16] AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. Nature, 2003, 422(6928): 198–207.

[17] HUANG Q, LUO L, ALAMDAR A, *et al*. Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: Mechanism of arsenic-induced male

reproductive toxicity [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32518.

[18] ZHU Y. Plasma/serum proteomics based on mass spectrometry [J]. Protein & Peptide Letters, 2024, 31(3): 192–208.

[19] ZHANG WZ, WANG S, JI CL, *et al*. Anti-androgenic and hormetic effects of perfluorooctyl sulfonate on male rats [J]. Clinical and Experimental Medicine, 2021, 14(9): 2343–2351.

[20] HWANG JM, LEE WJ, JO JH, *et al*. Effects of oridonin on sperm function and the PI3K/PDK1/AKT signaling pathway: Implications for reproductive toxicity [J]. Reproductive Toxicology, 2024, 128: 108659.

[21] DENG S, LEONG HC, DATTA A, *et al*. PI3K/AKT signaling tips the balance of cytoskeletal forces for cancer progression [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(7): 1652.

[22] JUNG EJ, LEE WJ, BAE JW, *et al*. Miltefosine induces reproductive toxicity during sperm capacitation by altering PI3K/AKT signaling pathway [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2024, 111: 104565.

[23] SKINNER MK, STALLARD B, ANTHONY CT, *et al*. Cellular localization of fibronectin gene expression in the seminiferous tubule [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1989, 66(1): 45–52.

[24] SAWADA H, YAZAMA F. Type VI collagen in the rat testis: Monoclonal antibody, isolation, and localization during development [J]. Biology of Reproduction, 1994, 50(3): 702–710.

[25] CZAPLINSKI K, RUIZ-ECHEVARRIA MJ, GONZÁLEZ CI, *et al*. Should we kill the messenger? The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover [J]. Bioessays, 1999, 21(8): 685–696.

[26] KHALAJ K, MILLER JE, FENN CR, *et al*. RNA-Binding proteins in female reproductive pathologies [J]. The American Journal of Pathology, 2017, 187(6): 1200–1210.

[27] SLOAN KE, GLEIZES PE, BOHNSACK MT. Nucleocytoplasmic transport of RNAs and RNA-protein complexes [J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(10): 2040–2059.

[28] JAGOT-LACOUSSIERE L, FAYE A, BRUZZONI-GIOVANELLI H, *et al.* DNA damage-induced nuclear translocation of Apaf-1 is mediated by nucleoporin Nup107 [J]. Cell Cycle, 2015, 14(8): 1242–1251.

[29] LIU WF, YU SS, CHEN GJ, *et al*. DNA damage checkpoint, damage repair, and genome stability [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(5): 381–390.

[30] GUERRERO-SANTORO J, KAPETANAKI MG, HSIEH CL, *et al*. The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A [J]. Cancer Research, 2008, 68(13): 5014–22.

[31] DIZ AP, TRUEBANO M , SKIBINSKI DOF. The consequences of sample pooling in proteomics: An empirical study [J]. Electrophoresis, 2010, 30(17): 2967–2975.

(责任编辑：安香玉 曹岱琳)