



鸭精液品质相关睾丸代谢物的差异分析

朱春红¹, 陶志云¹, 耿明阳³, 王志成¹, 宋卫涛¹, 顾昊天¹, 刘宏祥¹, 章双杰¹, 陈黎²,
徐文娟¹, 王逸飞¹, 李慧芳^{1*}

(1. 江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125; 2. 浙江省农业科学院, 杭州 310009;
3. 伊犁哈萨克自治州畜牧总站, 伊犁哈萨克自治州畜牧科学研究所, 伊犁 835000)

摘要: 旨在从代谢组学角度分析鸭精液品质相关的睾丸组织代谢机制。本研究选择精液品质高低差异显著的公鸭各6只, 共12只, 采集睾丸组织, 使用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)技术分析不同组别睾丸组织代谢物差异, 通过富集差异代谢物筛选睾丸精液品质相关的潜在关键通路。在不同精液品质的睾丸组织中共检测到98个差异代谢物, 其中显著上调15个, 显著下调83个。差异代谢物主要包括脂肪酰类、氨基酸及其代谢物、甘油磷脂类、核苷酸及其代谢物、苯及其衍生物、辅酶和维生素、激素及激素相关物质等类别。差异代谢物之间相关性分析发现, 脂肪酰类和苯及其衍生物呈最大正相关; 碳水化合物及其代谢物和醛、酮、酯类呈最大负相关。精液品质指标与差异代谢物相关性分析发现, 脂肪酰类、甘油磷脂类等多种代谢物与精液活力、精子动态参数呈显著正/负相关, $|R| \geq 0.80$ 。对差异代谢物进行富集分析, 筛选出2条潜在的重要代谢通路, 分别为脂肪酸降解($P=0.00059$)和甘油磷脂代谢($P=0.01276$)。本试验从代谢组学角度揭示了鸭不同精液品质睾丸的差异代谢物和潜在代谢机制, 筛选出以脂质代谢物(脂肪酸类、甘油磷脂类)为主导的98个差异代谢物, 其中精液品质高组肉碱类显著下调而十六烷酸和麦芽糖醇富集, 并锁定脂肪酸降解和甘油磷脂代谢两条核心通路与精液品质显著关联, 为家禽睾丸功能研究提供了关键代谢物和通路靶点。

关键词: 鸭; 睾丸; 代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路

中图分类号: S834.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0270-12

Differential Analysis of Testicular Metabolites Associated with Semen Quality in Ducks

ZHU Chunhong¹, TAO Zhiyun¹, GENG Mingyang³, WANG Zhicheng¹, SONG Weitao¹, GU Haotian¹,
LIU Hongxiang¹, ZHANG Shuangjie¹, CHEN Li², XU Wenjuan¹, WANG Yifei¹, LI Huifang^{1*}

(1. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China; 2. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310009, China; 3. Yili Kazakh Autonomous Prefecture Livestock Station, Yili Kazakh Autonomous Prefecture Institute of Animal Science, Yili 835000, China)

Abstract: This study aimed to analyze the metabolic mechanisms of testicular tissue associated with semen quality in ducks from a metabolomics perspective. Semen quality was evaluated in a duck population. Twelve drakes (6 with significantly high semen quality and 6 with significantly low semen quality) were selected, and testicular tissues were collected. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to analyze differences in testicular metabolites between groups. Enrichment analysis of differential metabolites was performed to screen potential key

收稿日期: 2025-06-04

基金项目: 国家重点研发计划资助(2022YFD1300100); 江苏省“种业振兴”揭榜挂帅项目(JBGS(2021)111); “天池英才”引进计划; 国家家养动物种质资源库; 扬州市现代农业(YZ2024054)

作者简介: 朱春红, 博士生, 研究员, 主要从事家禽遗传资源评价与保护研究, E-mail: zhuch_1304428@126.com

* 通信作者: 李慧芳, 主要从事家禽遗传资源保护与创新利用研究, E-mail: lhxf_002@aliyun.com

pathways related to testicular semen quality. A total of 98 differentially abundant metabolites was identified in testicular tissues of ducks with varying semen quality, including 15 significantly upregulated and 83 significantly downregulated metabolites. These metabolites primarily belonged to categories such as fatty acyls, amino acids and their metabolites, glycerophospholipids, nucleotides and their metabolites, benzene derivatives, coenzymes and vitamins, and hormones. Correlation analysis revealed the strongest positive correlation between fatty acyls and benzene derivatives, while the strongest negative correlation was observed between carbohydrates/their metabolites and aldehydes/ketones/esters. Semen quality parameters (e. g., sperm motility and kinematic parameters) showed significant positive/negative correlations ($|R| \geq 0.80$) with fatty acyls, glycerophospholipids, and other metabolites. Enrichment analysis highlighted two critical metabolic pathways: fatty acid degradation ($P=0.000\ 59$) and glycerophospholipid metabolism ($P=0.012\ 76$). This study elucidated differential metabolites and potential metabolic mechanisms associated with semen quality in duck testicular tissues through metabolomics. It identifies 98 differential metabolites dominated by lipids (fatty acyls and glycerophospholipids), characterized by significant downregulation of carnitines and enrichment of hexadecanoic acid (FFA16:0) and maltitol in the high semen quality group, and identifies fatty acid degradation and glycerophospholipid metabolism as core pathways significantly associated with semen quality. These findings provide key metabolites and pathway targets for research on avian testicular function.

Keywords: duck; testis; metabolomics; differential metabolites; metabolic pathways

* **Corresponding author:** LI Huifang, E-mail: lhxf_002@aliyun.com

鸭作为重要的经济家禽,其繁殖效率直接影响养殖业的经济效益^[1]。精液品质是评估繁殖能力的关键指标,其核心参数包括精子活力、动态运动特征及形态完整性^[2]。睾丸作为精子发生和成熟的核心器官,不仅通过生精上皮支持精原细胞分化为成熟精子,其间质细胞分泌的雄激素(如睾酮)还调控精子发生的微环境^[3-4]。近年来研究表明,睾丸局部代谢物的动态平衡(如脂质、氨基酸、核苷酸)对精子能量供应、质膜稳定性及抗氧化防御具有关键作用^[5]。例如,脂肪酸 β -氧化为精子运动提供ATP,而甘油磷脂代谢紊乱可导致精子顶体结构异常^[6]。因此,解析睾丸代谢物与精液品质的关联机制,是提升家禽繁殖性能的重要突破口。

代谢组学技术具有高通量、高灵敏度的特点,多用于揭示组织生理状态与代谢机制^[7]。在哺乳动物中,基于质谱的代谢组学已系统阐明了睾丸脂质代谢、氧化还原平衡与精子发生的关系^[8]。然而,禽类因其独特的生殖生理特征,其精子成熟机制与代谢过程呈现显著差异^[9]。这种差异源于禽类精子缺乏附睾的浓缩与修饰过程,其功能成熟高度依赖睾丸内代谢微环境的直接调控^[10]。例如,附睾缺失导致脂肪酸转运无法依赖传统路径,鸭睾丸中肉碱介导

的脂肪酸 β -氧化系统可能通过增强线粒体供能效率来补偿精子运动能量需求^[11];同时,由于禽类精子质膜暴露于体外环境的风险更高,睾丸中甘油磷脂代谢的动态平衡通过调节膜流动性,直接影响精子对低温保存等应激条件的耐受性^[12]。此外,禽类精液对氧化损伤的敏感性尤为突出,代谢组学证据显示,睾丸中谷胱甘肽与维生素E等抗氧化代谢物的丰度与精子存活率呈正相关^[13],而多不饱和脂肪酸的过度积累可能打破氧化还原稳态,诱发脂质过氧化并导致精子功能损伤^[14]。禽类特异性代谢通路在睾丸中的功能存在理论空白,限制了通过营养干预或分子育种手段精准提升家禽繁殖效率的实践应用。

本研究以精液品质差异显著的鸭为模型,利用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)技术,结合非靶向代谢组学策略,系统分析睾丸组织代谢物谱的差异。通过筛选与精液参数显著相关的关键代谢物及通路,揭示鸭睾丸代谢调控精液质量的分子机制,进一步为鸭繁殖性能的提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与分组

试验选用230日龄健康公鸭(体重无显著差异)

160 只(试验动物由国家家养动物种质资源库提供),公鸭采精训练后,采集新鲜精液于 1.5 mL 离心管中,轻轻混合均匀,按 1:1 比例加入 4℃ 预冷的精液稀释液平衡 1 h。连续收集精液 3 次,利用迈朗全自动精子分析仪进行精液品质分析,统计指标包括:精子活力指标(活动精子数、精子活力、精子活率、精子死亡率)以及动态参数指标(直线速率、曲线速率、路径速度、侧摆幅值、摆动性、线性度、移动角度以及前向性)。根据精液品质测定结果,选择精液品质显著差异的高低个体进行生物样本选留(精液品质高组 *vs* 精液品质低组, G_H *vs* G_L)。

经过精液品质分析结果选留个体,空腹 12 h 称重,随后放血屠宰,收集睾丸组织样,并迅速置于液氮中保存(每组 6 个生物重复样本)。

1.2 代谢组样品处理及 MS-MS 检测

取 50 mg 鸭睾丸样本于 2 mL 离心管中,于冰上操作。样本经液氮研磨后,加入 400 μ L 70% 甲醇内标提取液进行代谢产物提取。混合物经涡旋振荡、冰上静置 15 min 及离心 10 min(4℃, 12 000 r·min⁻¹)后,移取上清液。上清液经 -20℃ 静置 30 min 及再次离心 3 min(4℃, 12 000 r·min⁻¹)后,移取 200 μ L 上清液至进样瓶内衬管,供上机分析。所有样品均采用超高效液相色谱(UPLC, ExionLC AD, SCIEX)串联三重四极杆质谱(MS/MS, QTRAP®, SCIEX)系统进行数据采集。代谢组数据采集由武汉迈维代谢生物科技股份有限公司技术指导完成。

色谱条件:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m);流动相 A 为含 0.1% 甲酸超纯水, B 为含 0.1% 甲酸乙腈;洗脱梯度:0 min (95:5, A:B, v/v), 2.0 min (80:20), 5.0 min (40:60), 6.0 min (1:99), 7.5 min (1:99), 7.6 min (95:5), 10.0 min (95:5);流速 0.4 mL·min⁻¹;柱温 40℃;进样量 2 μ L。

表 1 公鸭体重与精子活力指标比较

Table 1 Comparison of body weight and sperm motility parameters in drakes

分组 Group	体重/g Body weight	活动精子数/个 Motile sperm count	精子活力/% Sperm motility	精子活率/% Sperm viability	精子死亡率/% Sperm mortality rate
精液质量低组 G_L 组 Low semen quality group (G_L Group)	1 397.125±141.50	490.88±134.32	71.23±7.79	81.60±5.27	18.40±5.27
精液质量高组 G_H 组 High semen quality group (G_H Group)	1 343.00±109.75	892.69±131.53	98.21±0.33	99.64±0.07	0.37±0.07
P 值 P-value	0.408 00	0.000 03	0.000 02	0.000 03	0.000 03

质谱条件:电喷雾离子源(ESI);温度 500℃;离子源电压 5 500 V(正离子模式)/-4 500 V(负离子模式);气体 I(GSI) 55 psi, 气体 II(GSII) 60 psi;气帘气(CUR) 25 psi;碰撞诱导电离(CAD)参数设置为高。在多重反应监测(MRM)模式下,各离子对根据优化的去簇电压(DP)和碰撞能(CE)进行检测。

1.3 代谢组的数据分析

利用主成分分析(PCA)和正交最小偏二乘判别分析(OPLS-DA)来判定各样本间的差异大小。差异代谢物的选择基于变量权重值(VIP)和 Student's-t 检验 P 值来确定, VIP $\geq$ 1 且 P-adjust $<$ 0.05 的代谢物为显著差异代谢物。通过 KEGG 数据库进行的代谢通路注释,以 P-adjust $<$ 0.05 为条件判断 KEGG 通路存在显著富集情况。利用 R 语言 cor 函数算出两者的斯皮尔曼(Spearman)系数,以相关系数大于 0.8 为筛选标准。

1.4 数据处理与分析

试验数据以“均值 $\pm$ 标准差”形式表示,使用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),并通过 Tukey HSD 法检验组间差异,显著性水平设为 P $<$ 0.05。图表绘制使用 GraphPad Prism 9.0。

2 结 果

2.1 精液品质分析

选留公鸭在 230 日龄时人工采精后利用迈朗全自动精子分析仪进行精液品质分析,结果如表 1 和表 2 所示。统计精子活力指标(活动精子数、精子活力、精子活率、精子死亡率)以及动态参数指标(直线速率、曲线速率、路径速度、侧摆幅值、摆动性、线性度、移动角度以及前向性),除直线速率差异显著(P=0.020 10)外,其他指标均展示为差异极显著(P $\leq$ 0.01)。

表 2 公鸭精子动态参数比较

Table 2 Comparison of sperm kinematic parameters in drakes

分组 Group	直线速率/ ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) Straight-line velocity	曲线速率/ ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) Curvilinear velocity	路径速度/ ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) Path velocity	侧摆幅值/ μm Amplitude of lateral head displacement	摆动性 Wobble	线性度 Linearity	移动角度 Movement angle	前向性 Straightness
精液质量低组 G_L 组 Low semen quality group (G_L Group)	21.35 $\pm$ 3.34	44.23 $\pm$ 4.96	31.27 $\pm$ 3.51	12.95 $\pm$ 1.45	0.85 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.05	389.00 $\pm$ 6.28	0.69 $\pm$ 0.06
精液质量高组 G_H 组 High semen quality group (G_H Group)	28.51 $\pm$ 6.58	66.07 $\pm$ 6.92	46.72 $\pm$ 4.90	19.35 $\pm$ 2.03	0.96 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.04	909.14 $\pm$ 137.89	0.60 $\pm$ 0.05
P 值 P-value	0.020 10	0.000 01	0.000 01	0.000 01	0.000 33	0.007 41	0.000 00	0.006 63

2.2 PCA 分析和 OPLS-DA 分析

对进行差异比较的分组样品进行 PCA 分析,观察差异分组之间和组内样本之间的变异度大小,G_H 组和 G_L 组分别聚集,G_L 组组内样本之间变

异度较大。与 PCA 分析结果类似,OPLS-DA 分析中 G_L 组组内样本之间变异度较 G_H 组大。图 1 结果表明,本试验中高低精液品质组 G_H 组和 G_L 组睾丸组织代谢物存在差异。

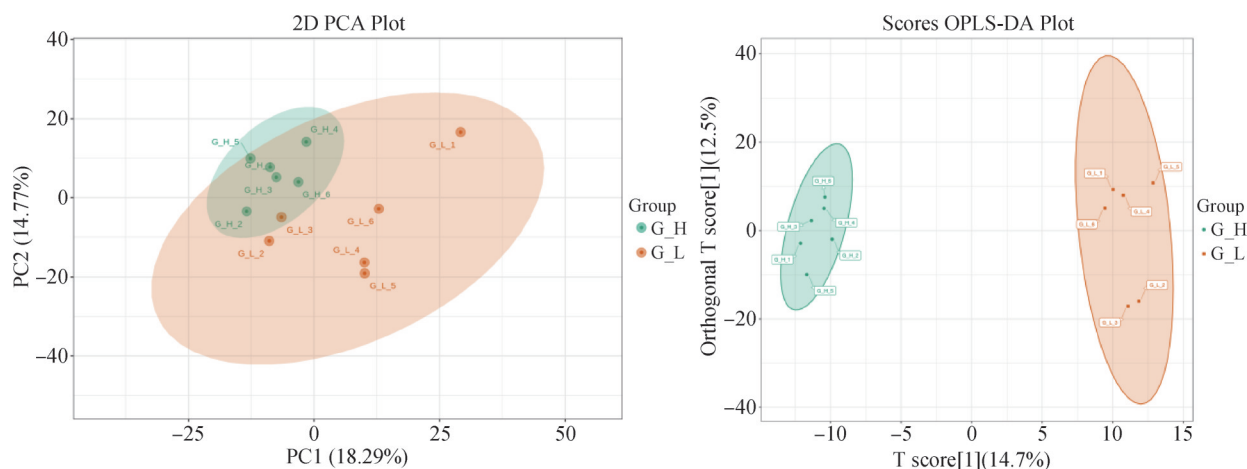


图 1 不同精液品质睾丸组织差异代谢物 PCA 分析和 OPLS-DA 分析

Fig. 1 PCA and OPLS-DA analyses of differential metabolites in testicular tissues with varying semen quality

2.3 差异代谢物筛选

12 个样本共注释到 906 个代谢物,不同精液品质鸭睾丸组织(G_H 组和 G_L 组)共注释到 98 个差异代谢物,其中显著上调 15 个,显著下调 83 个。差异代谢物主要包括:30 个脂肪酰类、19 个氨基酸及其代谢物、12 个甘油磷脂类、7 个核苷酸及其代谢物、7 个苯及其衍生物、4 个辅酶和维生素、4 个激素及激素相关物质、3 个醛、酮、酯类、3 个有机酸及其衍生物、2 个碳水化合物及其代谢物、1 个醇、胺类、1 个胆汁酸、1 个鞘脂类、4 个未能分类等。前 30 个差异代谢物溯源分析见表 3。其中 G_H 组 15 个代谢物含量较高,G_L 组 83 个代谢物含量较高。差异

倍数前 30 代谢物结果中,在 G_H 组中麦芽糖醇、十六烷酸、鞘氨醇_SPH(d18:0)、2-羟基己二酸显著高于 G_L 组。具体结果见图 2。

2.4 差异代谢物相关性分析

显著性差异代谢物之间相关性分析可以评估鸭睾丸代谢密切程度(metabolic proximities),根据 VIP 值大小选取前 50 个差异代谢物进行 Pearson 相关系数计算,范围为-1.0(最大负相关)~1.0(最大正相关),0 表示没有相关性。在不同精液品质健康鸭睾丸组织中,脂肪酰类 2-甲基丁酰肉碱 vs 脂肪酰类 肉碱 C5:0 呈最大正相关($P=1, p=0.000$),其次为脂肪酰类 肉碱 C22:4 vs 苯及其衍生物

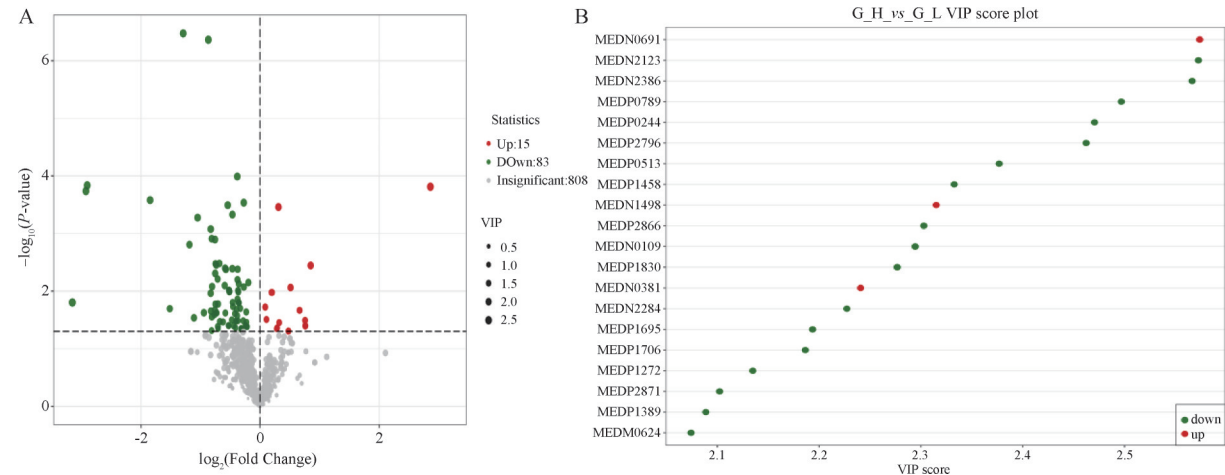


图2 差异代谢物火山图(A)和差异代谢物VIP值图(B)
Fig. 2 Volcano plot of differential metabolites (A) and VIP plot of differential metabolites (B)

表3 前30种显著差异代谢物

Table 3 Top 30 significantly differential metabolites

物质一级分类 Primary classification of substances	物质 Substance	化合物 Compound	化学式 Formula	VIP	P-value	log ₂ FC
脂肪酰类 Fatty acyl classes	二十二碳七烯酸	FFA(22:7)	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	2.332 6	0.000 1	-0.382 8
	肉碱 C20:3	Carnitine C20:3	C ₂₇ H ₄₇ NO ₄	2.302 8	0.000 8	-0.830 4
	十六烷酸	FFA(16:0)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2.240 7	0.003 6	0.849 6
	肉碱 C24:5	Carnitine C24:5	C ₃₁ H ₅₁ NO ₄	2.102 2	0.004 9	-0.755 5
	肉碱 C18:0	Carnitine C18:0	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	2.088 7	0.003 3	-0.684 9
	肉碱 C22:4	Carnitine C22:4	C ₂₉ H ₄₉ NO ₄	2.067 7	0.001 2	-0.814 3
	肉碱 C20:2	Carnitine C20:2	C ₂₇ H ₄₉ NO ₄	2.058 5	0.010 9	-0.831 1
	肉碱 C20:1-OH	Carnitine C20:1-OH	C ₂₇ H ₅₁ NO ₅	2.027 8	0.029 1	-1.113 0
	肉碱 C20:1	Carnitine C20:1	C ₂₇ H ₅₁ NO ₄	2.026 5	0.003 5	-0.737 8
	肉碱 C18-OH	Carnitine C18-OH	C ₂₅ H ₄₉ NO ₅	2.022 0	0.023 7	-0.946 0
	肉碱 C17:0	Carnitine C17:0	C ₂₄ H ₄₇ NO ₄	2.009 5	0.008 3	-0.807 7
	肉碱 C18:2	Carnitine C18:2	C ₂₅ H ₄₅ NO ₄	2.000 4	0.021 3	-0.760 5
氨基酸及其代谢物 Amino acids and metabolites	L-赖氨酸-L-苏氨酸	Lys-Thr	C ₁₀ H ₂₁ N ₃ O ₄	2.572 6	0.000 1	-2.908 2
	脯氨酸-亮氨酸	Pro-Leu	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	2.019 9	0.004 2	-0.574 9
苯及其衍生物 Benzene and derivatives	4-甲氧基肉桂酸乙酯	Ethyl-4-Methoxycinnamate	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	2.276 6	0.000 3	-0.273 4
	2,6-二叔丁基-1,4-苯醌	2,6-di-tert-butyl-1,4-benzoquinone	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	2.071 8	0.001 6	-1.189 6
醇、胺类 Alcohols and amines classes	十六碳酰胺	Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	2.376 8	0.000 3	-1.847 5
胆汁酸 Bile acids	猪去氧胆酸	Hyodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	2.294 3	0.000 5	-1.051 6
辅酶和维生素 Coenzymes and vitamins	反式-13,14-二羟视黄醇	All-Trans-13,14-Dihydroretinol	C ₂₀ H ₃₂ O	2.470 5	0.015 7	-3.156 6
	(Z)-古尔司酮	(Z)-Guggulsterone	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	2.186 4	0.000 5	-0.464 7

(转下页 Carried forward)

(续表3 Continued)

物质一级分类 Primary classification of substances	物质 Substance	化合物 Compound	化学式 Formula	VIP	P-value	log ₂ FC
甘油磷脂类 Glycerophospholipid classes	溶血磷脂酰丝氨酸_ LPS(20:1)	LPS(20:1)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₉ P	2.566 4	0.000 2	-2.930 1
	LPE(O-18:2)	LPE(O-18:2)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₆ P	2.227 2	0.000 3	-0.543 6
	LPC(O-16:1)	LPC(O-16:1)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₆ P	2.193 5	0.001 3	-0.758 7
核苷酸及其代谢物 Nucleotides and metabolites	5'-腺苷酸硫酸(APS)	5'-Adenylyl sulfate (APS)	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₀ PS	2.074 2	0.004 1	-0.465 5
激素及激素相关物质 Hormones and hormone-related substances	7-胆固醇	7-Ketocholesterol	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	2.462 3	0.000 0	-1.295 0
	20,26-二羟基蜕皮 激素	20,26-dihydroxyecdysone	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	2.134 8	0.004 0	-0.587 9
鞘脂类 Sphingolipid classes	鞘氨醇_SPH(d18:0)	SPH(d18:0)	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	2.043 7	0.008 7	0.510 7
醛、酮、酯类 Aldehydes, ketones and esters classes	2-戊基-3-苯基-2-丙 烯醛	2-Pentyl-3-phenyl-2- propenal	C ₁₄ H ₁₈ O	2.496 8	0.000 0	-0.870 9
碳水化合物及代谢物 Carbohydrates and metabolites	麦芽糖醇	Maltitol	C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁	2.573 8	0.000 2	2.863 4
有机酸及其衍生物 Organic acids and derivatives	2-羟基己二酸	2-Hydroxyadipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₅	2.315 0	0.000 3	0.306 4

MG-132($P=0.991\ 9$, $p=2.66\text{E}-10$);碳水化合物及其代谢物麦芽糖醇 vs 醛、酮、酯类 2-戊基-3-苯基-2-丙烯醛呈最大负相关($P=-0.934\ 5$, $p=8.51\text{E}-06$)。前50个差异代谢物的相关性分析结果见图3。

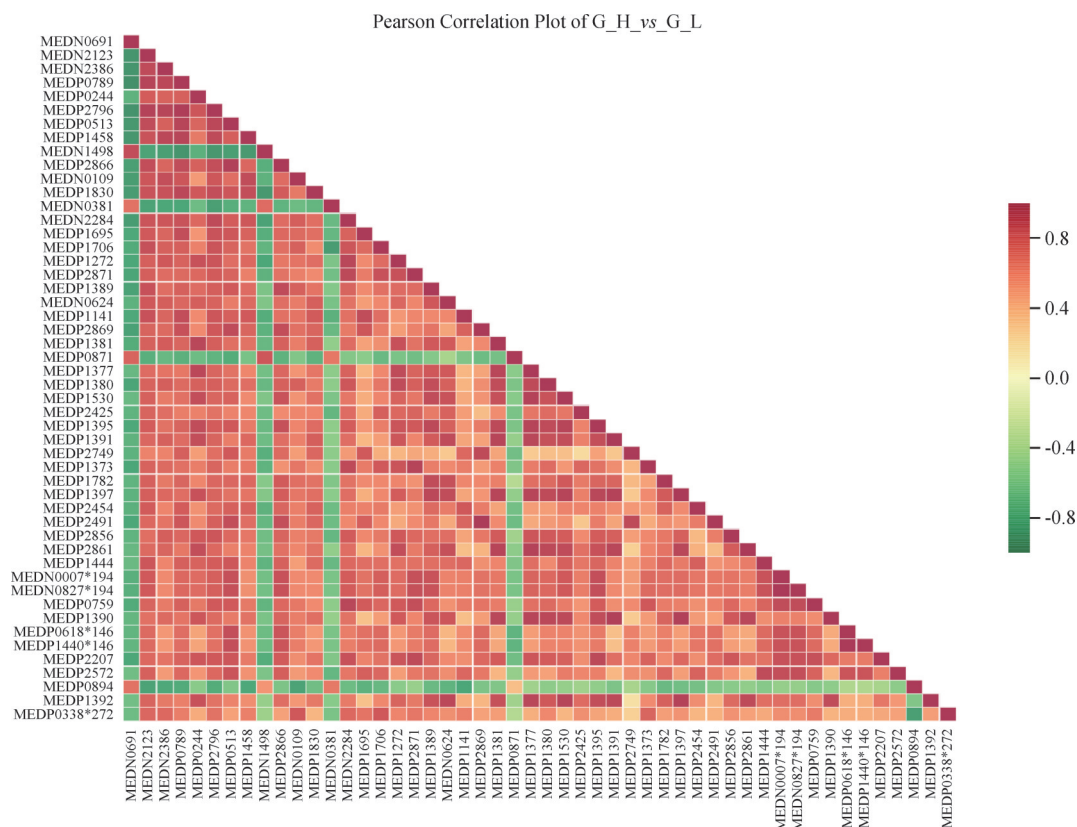
差异代谢物与精液品质相关性指标分析结果表明,麦芽糖醇(碳水化合物及其代谢物)与精液品质(精子活力,精子活率)以及精子动态参数(曲线速率、路径速度、侧摆幅值、摆动型、移动角度)显著正相关,相关系数 $R\geq 0.80$,但与其与精子死亡率呈显著负相关 $R=-0.89$;L-赖氨酸-L-苏氨酸、二十二碳七烯酸、溶血磷脂酰丝氨酸_LPS(20:1)、LPE(O-18:2)、2-戊基-3-苯基-2-丙烯醛与精子死亡率显著正相关,相关系数 $R\geq 0.80$;多种代谢物与精液品质与精子动态参数显著水平负相关, $R\leq -0.80$,具体结果见图4。

2.5 代谢通路的富集分析

对差异显著代谢物 KEGG 的注释结果进行分类展示,大多数差异代谢物聚类于代谢类通路,27.5%的差异代谢物聚类于环境信息处理进程类通路。图5由小到大展示了P-value排名前20的通

路。其中 Fatty acid degradation($P=0.000\ 59$)和 Glycerophospholipid metabolism($P=0.012\ 76$)通路显著水平富集。

脂肪酸降解(fatty acid degradation, ko00071)中相关代谢物如图6所示,分别为十八碳五烯酸脂肪酰类,二十二碳七烯酸脂肪酰类,肉碱 C16:0 脂肪酰类,十六烷酸脂肪酰类,十六醛、酮、酯类,其中十六醛、酮、酯类涉及 ABC transporters。甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism, ko00564)富集相关代谢物为 LPC(0:0/16:0)甘油磷脂类;LPC(O-16:1)甘油磷脂类,LPC(22:3)甘油磷脂类,LPC(O-20:2)甘油磷脂类,溶血磷脂酰乙醇胺_LPE(P-18:1)甘油磷脂类,LPE(0:0/22:4)甘油磷脂类,磷脂酰乙醇胺溶血烯基 16:0 甘油磷脂类,LPE(O-18:2)甘油磷脂类,溶血磷脂酰丝氨酸_LPS(20:1)甘油磷脂类,LPC(16:0/0:0)甘油磷脂类,PC(O-1:0/O-16:0)甘油磷脂类,LPE(22:4/0:0)甘油磷脂类。上述与精液品质显著正相关的差异代谢物主要富集到 ABC transporters 和 Glycerophospholipid metabolism 通路。



红色表示正相关性较强,绿色表示负相关性较强,颜色越深代表样品间相关系数的绝对值越大

Red indicates strong positive correlations, green indicates strong negative correlations, and darker colors represent larger absolute values of correlation coefficients between samples

图3 前50个差异代谢物的相关性分析热图

Fig. 3 Correlation analysis heatmap of the top 50 differential metabolites

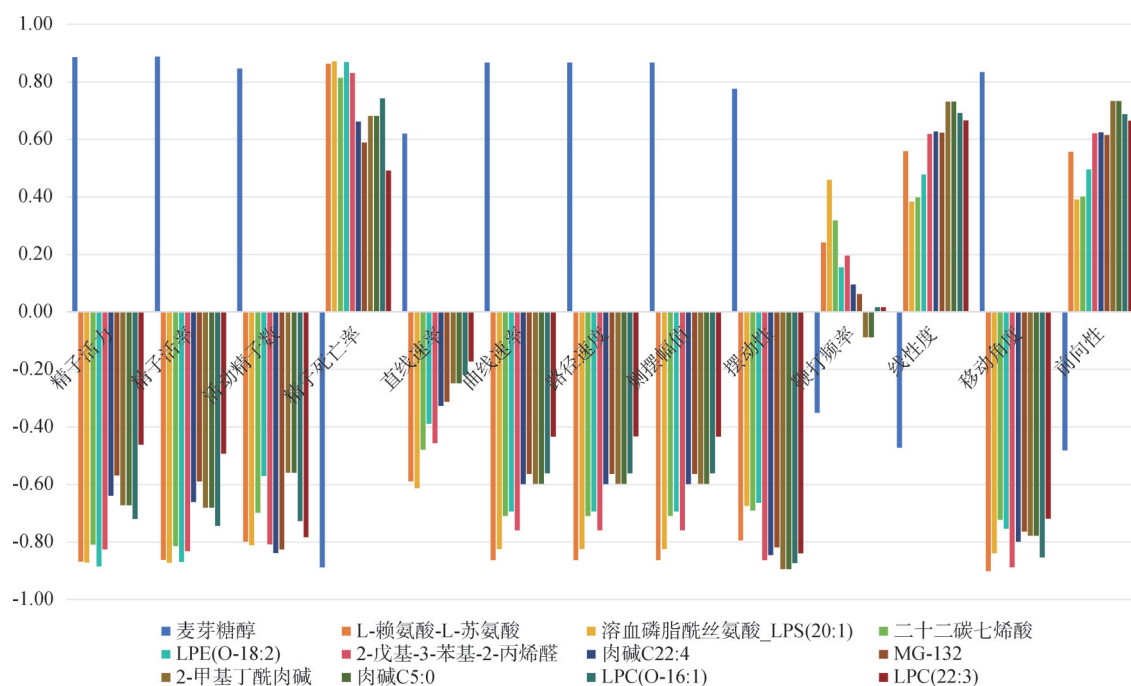


图4 差异代谢物与精液品质相关性指标分析

Fig. 4 Correlation analysis of differential metabolites with semen quality parameters

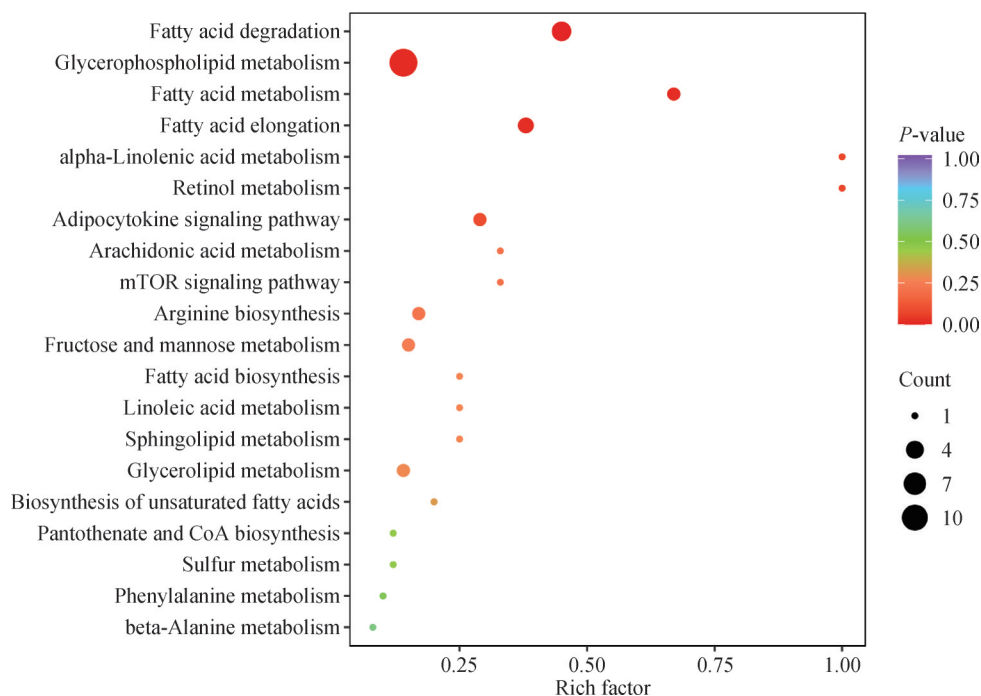
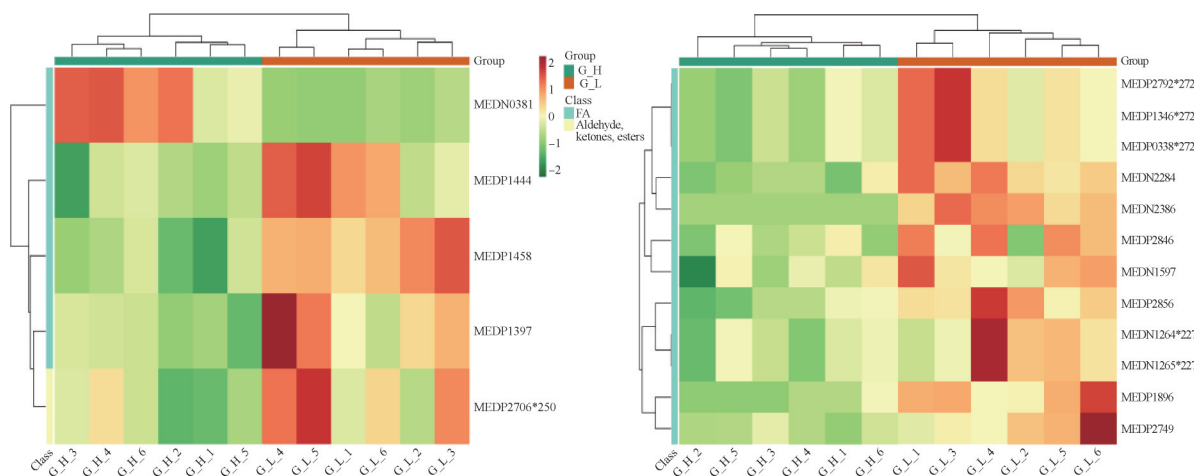


图5 前20条代谢通路富集图

Fig. 5 Enrichment plot of the top 20 metabolic pathways



横坐标为样品名称,纵坐标为差异代谢物,不同颜色为不同相对含量标准化处理后得到的不同数值进行填充的颜色(红色代表高含量,绿色代表低含量),热图上方的注释条对应样品分组

The x-axis represents sample names, the y-axis represents differential metabolites, and colors correspond to normalized relative abundance values (red indicate high abundance, green indicate low abundance). The annotation bar above the heatmap indicates sample grouping (Group)

图6 通路脂肪酸降解 (Fatty acid degradation, ko00071) 和甘油磷脂代谢 (Glycerophospholipid metabolism, ko00564) 的差异代谢物聚类热图

Fig. 6 Clustering heatmap of differential metabolites in the fatty acid degradation (ko00071) and glycerophospholipid metabolism (ko00564) pathways

3 讨论

基因组学和蛋白质组学分别从基因和蛋白质层面探寻生命活动,但细胞内的多数生命活动是

发生在代谢物层面的^[15]。代谢物是生物体表型的基础,是基因表达的最终产物,在代谢酶的作用下,反映细胞所处的环境和生理状态,可以直观有效地了解生物学过程及其机理^[16-17]。广靶代谢组整合了

非靶向和靶向代谢物检测技术的优点,具有高通量、高灵敏度、定性准确、重复性好等优点^[18-19]。本研究利用广泛靶向代谢组技术研究睾丸组织中代谢物种类与含量,筛选出关键代谢物与精液品质指标之间的关系。近年来,对睾丸的研究重点集中在小鼠、猪、牦牛和人的睾丸基因组、转录组和蛋白质组上^[20-23],目前关于家禽,特别是水禽睾丸精液品质相关代谢组研究相对较少。

本试验分析了不同精液品质组别鸭睾丸差异代谢物的变化,共鉴定出 98 个差异代谢物,组间差异均有生物学意义,其中显著上调 15 个,显著下调 83 个;包括脂肪酰类、甘油磷脂类、鞘脂类等脂质、氨基酸及其代谢物、核苷酸及其代谢物、碳水化合物及其代谢物、苯及其衍生物、激素及激素相关物质等不同类别。

脂质对各种生物学功能至关重要,作为蛋白质和核酸的下游产物,脂质可以更直接反映组织细胞的实时生理状态^[24],研究表明脂质在细胞中扮演着 3 个重要的角色:维持细胞膜结构、调节细胞信号传导和储存能量^[25]。在睾丸代谢组研究中,脂质代谢显著影响睾丸发育与精子质量^[26]。国际上通常将脂质分为 8 大类,即脂肪酰类、甘油酯类、甘油磷脂类、鞘脂类、固醇脂类、孕烯醇酮脂类、糖脂类和多聚烯烃类^[27]。本研究中,43.88%(43/98)的差异代谢物为脂质代谢物,其中脂肪酰类数量最多,其次为甘油磷脂类、鞘脂类。精子细胞质膜结构富含各种脂类,对精子细胞的结构和功能有重要影响^[28-29]。脂肪酰类中十六烷酸、肉碱在两组有较大差异,十六烷酸即棕榈酸是一种长链饱和脂肪酸,在小鼠中,通过腹腔注射十六烷酸的方式构建高脂肪酸模型,结果高脂肪酸小鼠精子浓度显著下降,局部脂肪堆积增多,睾丸 ROS 水平亦升高,TUNEL 染色结果显示睾丸支持细胞的凋亡明显增加^[30],本研究中,十六烷酸在鸭 G_H 组中含量较高,原因未知。肉碱是机体内重要的条件必需营养素,具有广泛的生理作用。男性附睾与精子中含有体内最高浓度的肉碱,肉碱不仅在启动精子运动、促进精子成熟和提高精子受精能力等方面具有重要作用,而且在调节支持细胞功能、保护精子对抗氧化损伤、减少生精细胞凋亡、抑制精子聚集等方面具有重要意义^[31-33]。甘油磷脂类和鞘脂是细胞膜主要组成部分之一,维持细胞膜的完整性和流动性^[34];鞘脂代谢产物如神经酰胺等是细胞内信号分子,参与各种调

节活动。猪精子质膜脂质组分析表明,精液冷冻后质膜中鞘脂类代谢物含量显著降低,其质膜成分趋向单一性^[35]。

精液品质指标与差异代谢物相关性分析发现,脂肪酰类、甘油磷脂类等多种代谢物如二十二碳七烯酸、溶血磷脂酰丝氨酸_LPS(20:1)、LPE(O-18:2)等与精液死亡率显著正相关^[36],上述结果与脂质代谢物的代谢过程显著影响睾丸精子质量的结论一致。精子的动态参数客观地反映了精子微细运动特点,并与受精率显著相关。本研究同时分析到多种代谢物与精子动态参数显著水平相关,表现为脂类(溶血磷脂酰丝氨酸_LPS(20:1)等)、醛、酮、酯类(2-戊基-3-苯基-2-丙烯醛)、氨基酸及其代谢物(L-赖氨酸-L-苏氨酸)类与动态参数指标负相关,碳水化合物及其代谢物(麦芽糖醇)与精子动态参数指标正相关,提示睾丸组织代谢物对精子细胞动态参数和运动能力有显著影响。目前对睾丸代谢物与精子动态参数之间关系的关注较少,是后续课题组关注的方向之一。差异代谢物之间相关性分析发现,脂肪酰类和苯及其衍生物呈最大正相关;碳水化合物及其代谢物和醛、酮、酯类呈最大负相关,提示上述代谢物在睾丸组织中具有一定的颌颌和平衡作用。

本试验富集到 2 条潜在的关键代谢通路,分别为脂肪酸降解和甘油磷脂代谢通路。脂肪酸是精子能量代谢的重要底物,研究表明,脂肪酸降解通路特别是脂肪酸的 β -氧化(FAO)对于精子的活力至关重要。IKBA(核因子- κ B 抑制剂 α)介导的信号通路通过调控 FAO 代谢途径中的乙酰辅酶 A 羧化酶的水平来控制人类精子的活力。IKBA 磷酸化的抑制会增强精子的活力,而脂多糖刺激的 IKBA 磷酸化则会降低精子活力^[37]。研究表明,甘油磷脂代谢的紊乱会影响精子的形态和功能。代谢组学分析 PM2.5 致雄性生殖损伤大鼠睾丸组织中甘油磷脂代谢物的含量降低,表明甘油磷脂代谢的改变可能与精子损伤有关^[38]。在公猪精液品质与精子脂质成分的研究中,发现不同活力的精子中甘油磷脂的含量有所不同,这些差异与精子活力呈显著相关^[39]。在精子成熟过程中,甘油磷酸胆碱(GPC)的含量逐渐下降,推测是为了建立必要的生物膜构型,以适应受精过程^[40]。上述脂质代谢与精液品质之间存在复杂的相互作用,脂质的种类和浓度变化可能直接影响精子的活力和功能,进而影响精液的

整体质量。

4 结 论

本研究基于代谢组学技术,揭示了鸭睾丸代谢物与精液品质的关联机制。共筛选出 98 个差异代谢物,其中脂质代谢物(脂肪酸类、甘油磷脂类)占比最高(43.88%),表明脂代谢紊乱是影响精液品质的关键因素。精液品质高组(G_H)中肉碱类代谢物显著下调,而十六烷酸和麦芽糖醇富集,提示禽类精子能量代谢存在独特适应性。相关性分析表明,脂肪酸类(如肉碱)和甘油磷脂类代谢物的显著差异与精子活力、动态参数及死亡率存在强相关($|R| \geq 0.80$)。KEGG 富集分析进一步锁定两条核心通路:脂肪酸降解通路($P=0.00059$)的抑制限制能量供应,甘油磷脂代谢通路($P=0.01276$)的失调引发膜结构损伤。

参考文献 (References):

- [1] 张 博,唐 静,赵 睿,等. 种母鸭核黄素缺乏对子代雏鸭初生重、器官指数、体尺指标及血浆生化指标的影响[J]. 动物营养学报,2020,32(5):2185-2191.
ZHANG B, TANG J, ZHAO R, et al. Effects of riboflavin deficiency in breeder ducks on birth weight, organ index, body size indexes and plasma biochemical indexes of offspring ducklings [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(5): 2185-2191. (in Chinese)
- [2] 解广娟. 公鸭精液品质及精浆蛋白组学的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2022.
XIE G J. Study on semen quality and seminal plasma proteomics of male ducks [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [3] GRISWOLD M D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1998, 9(4): 411-416.
- [4] 李金梅. 雄激素通过间接调控 PLZF 介导的精原干细胞分化机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2016.
LI J M. Study on the mechanism of androgens indirectly regulating PLZF-mediated spermatogonial stem cell differentiation [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [5] 彭红波,刘 晃,宋小燕,等. 代谢组学技术对非梗阻性无精子症的诊断价值[J]. 检验医学与临床,2023, 20(5):625-629.
PENG H B, LIU H, SONG X Y, et al. Diagnostic value of metabolomics technology in non-obstructive azoospermia [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2023, 20(5): 625-629. (in Chinese)
- [6] ZHU Z, LI R, FENG C, et al. Exogenous oleic acid and palmitic acid improve boar sperm motility via enhancing mitochondrial beta-oxidation for ATP generation[J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(4): 591.
- [7] KARAHALIL B. Overview of systems biology and omics technologies [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23 (37):4221-4230.
- [8] ZHAO Q, HUANG J F, CHENG Y, et al. Polyamine metabolism links gut microbiota and testicular dysfunction[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 224.
- [9] SETIAWAN R, PRIYADARSHANA C, MIYAZAKI H, et al. Functional difference of ATP-generating pathways in rooster sperm (*Gallus gallus domesticus*) [J]. *Anim Reprod Sci*, 2021, 233: 106843.
- [10] 赵延辉,陈 余,王 梁,等. 基于 RNA-seq 数据筛选鸡睾丸附睾间差异表达基因及其功能分析[J]. 中国畜牧杂志,2022,58(1):117-122.
ZHAO Y H, CHEN Y, WANG L, et al. Screening of differentially expressed genes between testis and epididymis of chickens based on RNA-seq data and their functional analysis[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2022, 58(1): 117-122. (in Chinese)
- [11] KUANG W, ZHANG J, LAN Z, et al. SLC22A14 is a mitochondrial riboflavin transporter required for sperm oxidative phosphorylation and male fertility [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(3): 109025.
- [12] 赵志显,常雪蕊,郭 勇,等. 种公鸡精液品质营养调控的研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2022,53(8):2435-2443.
ZHAO Z X, CHANG X R, GUO Y, et al. Research progress on nutritional regulation of breeder rooster semen quality [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(8): 2435-2443. (in Chinese)
- [13] JERYSZ A, LUKASZEWICZ E. Effect of dietary selenium and vitamin E on ganders' response to semen collection and ejaculate characteristics [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 153(1-3): 196-204.
- [14] WANG Y, FU X, LI H. Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2025, 16: 1520835.
- [15] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29

- (11):1181-1189.
- [16] HAN G, HONG S H, LEE S J, et al. Transcriptome analysis of testicular aging in mice [J]. *Cells*, 2021, 10(11):2895.
- [17] PATTI G J, YANES O, SIUZDAK G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4):263-269.
- [18] YANG K, XIA B, WANG W, et al. A comprehensive analysis of metabolomics and transcriptomics in cervical cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:43353.
- [19] WANG Y T, YANG Y, SUN X L, et al. Development of a widely-targeted metabolomics method based on gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Se Pu*, 2023, 41(6):520-526.
- [20] STOCKL J B, SCHMID N, FLENKENTHALER F, et al. Proteomic insights into senescence of testicular peritubular cells from a nonhuman primate model [J]. *Cells*, 2020, 9(11):2498.
- [21] ALPAUGH W F, VOIGT A L, DARDARI R, et al. Loss of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 impairs long-term differentiation competence and metabolic regulation in murine spermatogonial stem cells [J]. *Cells*, 2021, 10(9):2265.
- [22] CAI X, WU S, MIPAM T, et al. Testis transcriptome profiling identified lncRNAs involved in spermatogenic arrest of cattleyak [J]. *Funct Integr Genomics*, 2021, 21(5-6):665-678.
- [23] O'DONNELL L, REBOURCET D, DAGLEY L F, et al. Sperm proteins and cancer-testis antigens are released by the seminiferous tubules in mice and men [J]. *FASEB J*, 2021, 35(3):e21397.
- [24] WENK M R. Lipidomics: new tools and applications [J]. *Cell*, 2010, 143(6):888-895.
- [25] IUCHI K, TAKAI T, HISATOMI H. Cell Death via lipid peroxidation and protein aggregation diseases [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(5):399.
- [26] LEE W K, LAM T K Y, TANG H C, et al. PFOS-elicited metabolic perturbation in liver and fatty acid metabolites in testis of adult mice [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14:1302965.
- [27] 覃佐剑. 基于LC-MS/MS氧化脂肪酸数据库的构建和应用 [D]. 北京:中国农业科学院, 2020.
- QIN Z J. Construction and application of oxidized fatty acid database based on LC-MS/MS [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020. (in Chinese)
- [28] 陈嘉康, 吕春荣, 苗永旺, 等. 脂质组学技术在家畜精液质量评价和体外保存研究中的应用研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(12):4697-4706.
- CHEN J K, LV C R, MIAO Y W, et al. Research progress on the application of lipidomics technology in livestock semen quality evaluation and in vitro preservation [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(12):4697-4706. (in Chinese)
- [29] FLESCH F M, GADELLA B M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1469(3):197-235.
- [30] 胡学春. 脂肪酸对小鼠睾丸支持细胞存活率的影响及机制研究 [D]. 南京:南京大学, 2018.
- HU X C. Study on the effect and mechanism of fatty acids on the survival rate of mouse testicular Sertoli cells [D]. Nanjing: Nanjing University, 2018. (in Chinese)
- [31] ILICETO M, STENSEN M H, ANDERSEN J M, et al. Levels of L-carnitine in human seminal plasma are associated with sperm fatty acid composition [J]. *Asian J Androl*, 2022, 24(5):451-457.
- [32] ARSLAN E, KOYUNCU I, TEMIZ E, et al. Comparison of sperm carnitine profiles of normospermic, oligospermic and azospermic individuals [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27(17):8154-8162.
- [33] MATEUS F G, MOREIRA S, MARTINS A D, et al. L-carnitine and male fertility: Is supplementation beneficial? [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(18):5796.
- [34] VAN MEER G, VOELKER D R, FEIGENSON G W. Membrane lipids: where they are and how they behave [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2):112-124.
- [35] 张宇霆. 猪精子差异耐冻性机制与耐冻性生物标志物筛选 [D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2021.
- ZHANG Y T. Mechanism of differential freezing tolerance of boar sperm and screening of freezing tolerance biomarkers [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [36] ENGEL K M, BAUMANN S, ROLLE-KAMPCZYK U, et al. Metabolomic profiling reveals correlations between spermiogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2):e0211679.
- [37] LI Y, HU Y, WANG Z, et al. IKBA phosphorylation governs human sperm motility through ACC-mediated fatty acid beta-oxidation [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1):323.

- [38] 何慧慧,刘卫红,贾 瑞,等. 当归芍药散对PM_{2.5}致雄性生殖损伤大鼠睾丸组织代谢组学的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2022,57(1):38-44.
HE H H, LIU W H, JIA R, et al. Effect of Danggui Shaoyao Powder on metabolomics of testicular tissue in rats with male reproductive injury induced by PM_{2.5} [J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2022, 57(1): 38-44. (in Chinese)
- [39] AM-IN N, KIRKWOOD R N, TECHAKUMPHU M, et al. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility [J]. *Theriogenology*, 2011, 75(5): 897-903.
- [40] 陈佳颖,马博闻,赵青余,等. 公猪精液质量与精子脂质成分相关性研究[J]. 中国畜牧兽医,2024,51(4): 1537-1548.
CHEN J Y, MA B W, ZHAO Q Y, et al. Study on the correlation between boar semen quality and sperm lipid components [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(4): 1537-1548. (in Chinese)
- (编辑 郭云雁)