



研究论文 ORIGINAL PAPERS

麝鼠睾丸 *Acsl* 家族基因的表达差异及功能预测

刘铭钦, 牛浩冉, 李澍祺, 李 晨, 张做杨, 张金鹏, 白素英*

(东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨 150040)

稿件运行过程

收稿日期: 2025-09-09

修回日期: 2026-06-10



摘 要

关键词: 麝鼠;

睾丸;

Acsl 家族基因;

季节性繁殖

Keywords: Common muskrat (*Onda-**tra zibethicus*);

Testis;

Acsl family gene;

Seasonal reproduction

中图分类号: Q959.9

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2026)-03-0360-12

DOI: 10.12375/ysdwxb.202509004

麝鼠(*Ondatra zibethicus*)具有典型的季节性繁殖特征,其睾丸脂质代谢与精子发生过程可能受 *Acsl* 家族基因调控,但目前相关研究尚不充分。为探究麝鼠不同时期睾丸组织中 *Acsl* 家族基因(*Acsl1*、*Acsl3*、*Acsl4*、*Acsl5* 和 *Acsl6*)的表达差异并预测其功能,本研究选取体况相近、约 11 月龄的健康雄性麝鼠,分别于繁殖期(4月)、繁殖末期(9月)和非繁殖期(11月)各采集 3 个个体,采用 qPCR 技术检测睾丸中 *Acsl* 家族基因的表达差异,并运用生物信息学方法分析其编码蛋白的理化性质、结构特征及互作网络。结果表明:*Acsl1* 和 *Acsl5* 在繁殖期的表达水平显著高于非繁殖期($P < 0.05$),其余家族基因虽有相对表达量差异但均未达到显著水平,且与非繁殖期相比呈现不同变化趋势;生物信息学分析表明,该家族编码蛋白均为亲水性蛋白,除 *Acsl6* 外其余成员均为稳定蛋白;跨膜结构预测显示,仅 *Acsl6* 含有 2 个跨膜结构域,其余家族成员均含 1 个;所有 *Acsl* 家族蛋白均具有 AMP-binding 结构域;蛋白互作网络预测表明,该家族基因主要参与脂肪酸活化、脂质合成与分解代谢,在脂肪酸的合成、储存及利用以及能量供给过程中发挥关键作用,与精子细胞生成与运动能量代谢过程密切相关。综上,*Acsl* 家族基因在麝鼠睾丸中的表达动态与繁殖周期高度同步。本研究揭示了 *Acsl* 家族基因在麝鼠睾丸组织中的周期性表达规律,为分析麝鼠季节性繁殖的分子机制提供了新证据,对丰富啮齿类动物繁殖生物学研究具有重要参考意义。

第一作者简介: 刘铭钦(1998—),男,硕士研究生;主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: 1187520656@qq.com

*通信作者: 白素英, E-mail: baisynefu@qq.com

Differential Expression and Functional Prediction of *Acsl* Family Genes in the Testes of the Common Muskrat

LIU Mingqin, NIU Haoran, LI Shuqi, LI Chen,
ZHANG Zuoyang, ZHANG Jinpeng, BAI Suying*

(College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: The common muskrat (*Ondatra zibethicus*) exhibits a distinct seasonal reproductive pattern. Testicular lipid metabolism and spermatogenesis are potentially regulated by the *Acsl* family gene; however, research in this area remains limited. To investigate the differential expression of *Acsl* family genes (*Acsl1*, *Acsl3*, *Acsl4*, *Acsl5*, and *Acsl6*) in common muskrat testicular tissue across different reproductive stages, and to predict their functions, healthy male common muskrats (approximately 11 months old with similar body conditions) were selected. Three individuals were sampled during each of the three periods: the breeding season (April), the late breeding season (September), and the non-breeding season (November). qPCR was used to detect differential gene expression in the testes, while bioinformatics methods were employed to analyze the physicochemical properties, structural characteristics, and interaction networks of the encoded proteins. The results showed that the expression levels of *Acsl1* and *Acsl5* were significantly higher during the breeding season than in the non-breeding season ($P < 0.05$); although the remaining family members showed variations in relative expression, these differences were not statistically significant, and the trends differed from those observed in the non-breeding season. Bioinformatics analysis indicated that all encoded proteins are hydrophilic, and all members except *Acsl6* are stable proteins. Transmembrane domain prediction revealed that only *Acsl6* contains two transmembrane domains, whereas the other members contain one. All *Acsl* family proteins possess an AMP-binding domain. Protein-protein interaction network predictions suggest that this family gene is primarily involved in fatty acid activation and lipid synthesis and catabolism, playing key roles in fatty acid synthesis, storage, and utilization, and energy supply; these processes are closely linked to spermatogenesis and the energy metabolism required for sperm motility. In summary, the expression dynamics of *Acsl* family genes in common muskrat testes are highly synchronized with the reproductive cycle. This study reveals the cyclical expression patterns of *Acsl* family genes in common muskrat testicular tissue, providing new evidence for understanding the molecular mechanisms underlying seasonal reproduction in common muskrats and offering valuable insights for research into rodent reproductive biology.

麝鼠 (*Ondatra zibethicus*) 是一种广泛分布于北美洲及欧亚大陆的啮齿类动物, 具有典型的季节性繁殖特征。其雄性个体的香囊腺可分泌麝鼠香, 该分泌物在化学组成上与麝香具有一定相似性^[1]。麝鼠的香腺发育与繁殖活动高度同步, 呈现明显的季节性繁殖特征^[2], 但其睾丸在不同生理时期的分子调控机制尚不明确。

脂质代谢和类固醇激素合成在季节性繁殖动物的睾丸组织中具有关键作用。长链脂酰辅酶 A 合成酶家族 (long-chain acyl-CoA synthetase family, *Acsls*) 是脂肪酸代谢中的关键限速酶, 能够将长链脂肪酸酯化成酰基辅酶 A (acyl-coenzyme A, acyl-CoA) 衍生

物, 进而参与脂肪酸 β -氧化、磷脂合成和胆固醇酯化等代谢途径, 是细胞能量代谢和膜组分更新的关键基础步骤^[3-4]。哺乳动物中共有 5 个 *Acsl* 家族成员 (*Acsl1*、*Acsl3*、*Acsl4*、*Acsl5* 和 *Acsl6*), 多项证据表明该家族在睾丸生理过程中具有潜在的调控功能, 且每个亚型都有独特的生化特性和生理功能^[3,5]。

季节性繁殖动物在繁殖期与非繁殖期之间存在显著的基因表达差异, 尤其涉及脂质代谢及类固醇合成等通路。在山羊 (*Capra hircus*) 和印度水牛 (*Bubalus bubalis*) 等物种中, 转录组研究已证实这些代谢相关基因在不同繁殖阶段呈现差异表达^[6-7]。然而, *Acsl* 家族基因在麝鼠繁殖周期中的具体表达

变化及功能尚不清楚。因此,本研究通过检测麝鼠繁殖期、繁殖末期和非繁殖期睾丸中 *Acs1* 家族基因的表达差异,并结合生物信息学方法分析其编码蛋白的理化性质、结构功能及互作网络,旨在揭示 *Acs1* 家族基因在麝鼠睾丸中的周期性表达规律,为进一步解析季节性繁殖动物的生殖调控分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用麝鼠均来源于黑龙江省哈尔滨市五常市麝鼠养殖场。选取约 11 月龄、体况相近的健康雄性麝鼠 9 只,依据麝鼠的繁殖周期,分别于 2024 年 4 月(繁殖期)、9 月(繁殖末期)和 11 月(非繁殖期)各采集 3 只。解剖后分离双侧睾丸组织,立即置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。本研究方案已通过东北林业大学动物实验伦理委员会审查(批件号:2023054)。

1.2 引物设计

基于麝鼠 *Acs1* 家族基因编码区序列,利用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物,同时设计内参基因 β -actin 的引物。所有引物均由哈尔滨博兴科生物技术有限公司合成,具体引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 qPCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
β -actin F	TTGCTGATCCACATCTGCT
β -actin R	GACAGGATGCAGAAGGAGAT
<i>Acs11</i> F	TCGATGGTGATTGTTCCACTC
<i>Acs11</i> R	CGTTCCACTAGATCACTGCC
<i>Acs13</i> F	TGGACAGTTTGGCTTCAGTTT
<i>Acs13</i> R	AGCCAATTATAGTGCCCCAG
<i>Acs14</i> F	GTCCGTATGATGCTGTCTGG
<i>Acs14</i> R	CACCGCATGACTCTGTTAGT
<i>Acs15</i> F	CATCTGCTTTACCACTGGAACCT
<i>Acs15</i> R	AAGACAGCCTGAACAACCTT
<i>Acs16</i> F	GGAGGGAACGCTTAAATCA
<i>Acs16</i> R	GCACAACAATGCCAACCA

1.3 RNA 提取与反转录

取 30 mg 睾丸组织,于液氮冷冻条件下充分研磨成粉末。采用 Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit(货号:#K0371)RNA 提取试剂盒提取组

织总 RNA,经纯化柱洗脱得到总 RNA 样品,使用分光光度计检测其浓度,确保 RNA 质量浓度 $\geq 50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。将符合质量要求的 RNA 样品置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。参照 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(货号:RR092A;宝生物工程(大连)有限公司)说明书进行反转录。

1.4 荧光定量 PCR

RT-qPCR 反应总体系为 $20.0\text{ }\mu\text{L}$,包括 $2\times\text{ Mega Universal qPCR SYBR Fast Mix } 10.0\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$,cDNA 模板 $2.0\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O $7.2\text{ }\mu\text{L}$ 。实验在 384 孔板中进行。按麝鼠繁殖周期将样品分为 3 组(繁殖期、繁殖末期和非繁殖期),每组含 3 个生物学重复样品。每个生物学重复样品均检测内参基因及 5 个 *Acs1* 家族基因(*Acs11*、*Acs13*、*Acs14*、*Acs15* 和 *Acs16*),每个基因设置 3 个技术复孔。实验总计点样 162 孔,以确保生物学重复与技术重复的实验可靠性。PCR 扩增程序: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 10 s, 57°C 退火 30 s,40 个循环。退火时收集荧光信号。

1.5 数据处理

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目标基因的相对表达量。利用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行正态性检验和方差齐性检验,组间差异比较采用独立样本 t 检验。用 GraphPad Prism 5 软件制图。

1.6 麝鼠 *Acs1* 家族基因功能预测分析

采用多维度生物信息学分析方法对麝鼠 *Acs1* 家族基因进行系统性分析,具体分析流程如下:基于麝鼠转录组测序数据,经序列比对及开放阅读框识别获得 *Acs1* 家族基因的编码区(coding sequence, CDS),并进一步预测其编码蛋白的氨基酸序列。在 mRNA 水平,利用 RNAfold 工具(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)在 37°C 默认参数下预测其二级结构特征,并计算最小自由能。在蛋白质水平,通过 ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)对翻译后的蛋白氨基酸序列进行理化性质预测,确定其分子质量等参数,采用 ProtScale 工具(<https://www.expasy.org/resources/protscale>)开展蛋白亲/疏水性图谱分析,绘制全长蛋白的疏水性曲线,识别潜在疏水区段和膜结合片段;借助 TMHMM Server v2.0 工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测蛋白跨膜结构域,明确跨膜区的数量与位置,结合 SMART 工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白功能结构域注释,确定

各结构域的起止位置与对应 *e*-value;使用 SOPMA 工具(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)预测蛋白二级结构,统计 α -螺旋、 β -折叠及无规则卷曲比例,用 SWISS-MODEL 工具(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白同源建模,构建三维空间结构并验证模型的可靠性,最后应用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>),在高置信度模式下构建 *Acs1* 家族蛋白的互作网络,分析其潜在的蛋白相互作用关系及参与的调

控通路。

2 结果

2.1 麝鼠睾丸*Acs1*家族基因 mRNA 表达

在麝鼠繁殖期、繁殖末期和非繁殖期的睾丸组织中,*Acs11*、*Acs15*和*Acs16*基因从繁殖期到非繁殖期呈逐步下调趋势,其中*Acs11*、*Acs15*在繁殖期的表达量显著高于非繁殖期($P < 0.05$),*Acs13*、*Acs14*在繁殖末期相对表达量最高,但各时期差异未达显著水平(表2)。

表2 *Acs1* 家族基因 mRNA 相对表达量
Table 2 Relative mRNA expression levels of *Acs1* family genes

生理时期 Physiological period	mRNA 相对表达量 Relative expression level of mRNA				
	<i>Acs11</i>	<i>Acs13</i>	<i>Acs14</i>	<i>Acs15</i>	<i>Acs16</i>
繁殖期 Breeding period	1.03 ± 0.12 ^a	1.03 ± 0.33 ^a	1.01 ± 0.21 ^a	1.03 ± 0.11 ^a	1.06 ± 0.42 ^a
繁殖末期 Late breeding period	0.69 ± 0.15 ^{ab}	1.68 ± 1.33 ^a	1.78 ± 1.33 ^a	0.62 ± 0.18 ^{ab}	0.86 ± 0.97 ^a
非繁殖期 Non-breeding period	0.36 ± 0.08 ^b	1.18 ± 0.19 ^a	0.93 ± 0.17 ^a	0.33 ± 0.07 ^b	0.48 ± 0.17 ^a

注：同列数据后不同小写字母表示不同生理时期间差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Different lowercase letters within the same column indicate significant differences among breeding periods ($P < 0.05$).

2.2 *Acs1*家族基因 mRNA 二级结构预测

利用 RNA fold 工具对 *Acs1* 家族 5 个基因的 mRNA 二级结构进行预测,各基因 mRNA 二级结构的最小自由能(minimum free energy, MFE)如表3所示。所有基因的 MFE 均为负值,说明该家族基因的 mRNA 二级结构均具有高度稳定性。预测结果(图1)以不同颜色标识碱基配对概率,显示该家族基因的 mRNA 均为多分支茎环结构,部分区域呈现较高的配对概率,提示其空间构象具有一定的灵活性。

表3 *Acs1* 家族基因 mRNA 二级结构最小自由能
Table 3 Minimum free energy of mRNA secondary structure for *Acs1* family genes

基因 Gene	最小自由能/(kcal·mol ⁻¹) Minimum free energy
<i>Acs11</i>	-595.27
<i>Acs13</i>	-463.85
<i>Acs14</i>	-335.84
<i>Acs15</i>	-411.15
<i>Acs16</i>	-836.52

2.3 *Acs1*家族蛋白理化性质

利用 ProtParam 工具对 *Acs1* 家族蛋白的氨基酸组成进行分析,结果显示该家族蛋白均由 20 种基本氨基酸构成。由表4可知,各蛋白中亮氨酸(Leu)含

量均最高,占氨基酸总数的 9.7%~10.9%,色氨酸(Trp)含量均最低,占 1.0%~1.9%。

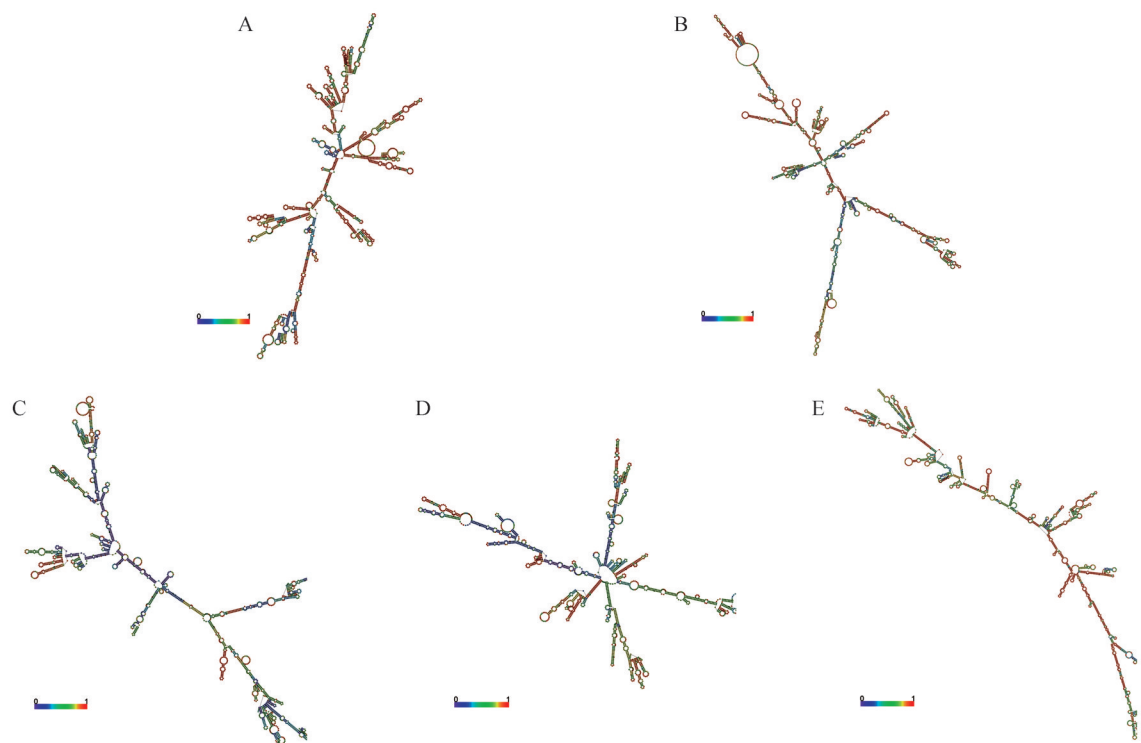
由表5可知,*Acs1*家族蛋白的氨基酸数量为 689~874,分子质量为 76 794.96~96 675.78,理论等电点为 7.06~8.81。脂肪族氨基酸指数为 88.83~96.04,表明各蛋白均具有较高的脂肪族氨基酸含量。蛋白稳定性分析显示,除 *Acs16* 的不稳定指数为 44.35(大于 40)外,其余家族成员的不稳定指数均低于 40,表明 *Acs11*、*Acs13*、*Acs14* 和 *Acs15* 均为稳定蛋白,而 *Acs16* 为不稳定蛋白。

2.4 *Acs1*家族蛋白质亲/疏水性

基于 ProtScale 工具分析结果显示,*Acs1* 家族蛋白平均疏水性分值均小于 0,提示该家族蛋白整体表现为亲水性特征;同时,序列中存在多个疏水性峰值区域,提示该蛋白局部具有疏水特征(图2)。

2.5 *Acs1*家族蛋白跨膜结构与保守功能结构域

TMHMM Server v2.0 预测结果显示,*Acs1* 家族蛋白中均含有跨膜结构,跨膜区段均集中在蛋白 N 端;特殊的是 *Acs16* 蛋白存在两段独立的跨膜螺旋,跨膜位点向序列中段偏移(图3)。表6数据显示,*Acs11* 和 *Acs15* 未预测到低复杂度区域,*Acs13*、*Acs14* 仅含单段低复杂度序列,而 *Acs16* 存在两段分散分布的低复杂度氨基酸区段(表6),该特征与图4结构域示意



A. *Acs11*; B. *Acs13*; C. *Acs14*; D. *Acs15*; E. *Acs16*。

图1 *Acs1* 家族基因 mRNA 茎环二级结构预测

Figure 1 Prediction of stem-loop structure mRNA for *Acs1* family genes

表4 *Acs1* 家族蛋白氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of *Acs1* family proteins

氨基酸 Amino acid	Acs11		Acs13		Acs14		Acs15		Acs16	
	数量 /个 Quantity	含量 /% Content	数量 /个 Quantity	含量 /% Content	数量 /个 Quantity	含量 /% Content	数量 /个 Quantity	含量 /% Content	数量 /个 Quantity	含量 /% Content
丙氨酸 Ala	52	7.45	42	5.83	42	5.91	40	5.81	64	7.32
精氨酸 Arg	31	4.44	29	4.03	21	2.95	29	4.21	56	6.40
天冬酰胺 Asn	24	3.44	38	5.28	35	4.92	33	4.79	19	2.17
天冬氨酸 Asp	34	4.87	29	4.03	31	4.36	32	4.64	38	4.35
半胱氨酸 Cys	17	2.44	17	2.36	19	2.67	13	1.89	20	2.29
谷氨酰胺 Gln	24	3.44	22	3.06	19	2.67	24	3.48	36	4.12
谷氨酸 Glu	47	6.73	47	6.53	47	6.61	41	5.95	53	6.06
甘氨酸 Gly	53	7.59	53	7.36	55	7.74	50	7.26	86	9.84
组氨酸 His	11	1.58	12	1.67	14	1.97	8	1.16	19	2.17
异亮氨酸 Ile	49	7.02	52	7.22	52	7.31	48	6.97	47	5.38
亮氨酸 Leu	71	10.17	70	9.72	70	9.85	72	10.45	95	10.87
赖氨酸 Lys	52	7.42	56	7.77	67	9.42	44	6.39	48	5.49
甲硫氨酸 Met	17	2.43	20	2.78	21	2.96	12	1.74	18	2.06
苯丙氨酸 Phe	34	4.87	27	3.75	23	3.23	42	6.10	35	4.00
脯氨酸 Pro	35	5.01	33	4.58	37	5.20	43	6.24	56	6.41
丝氨酸 Ser	36	5.16	49	6.81	41	5.77	40	5.80	49	5.61
苏氨酸 Thr	36	5.16	45	6.25	39	5.49	38	5.51	40	4.58
色氨酸 Trp	9	1.29	8	1.11	7	0.98	7	1.02	17	1.95
酪氨酸 Tyr	21	3.01	29	4.03	29	4.08	20	2.90	22	2.52
缬氨酸 Val	45	6.45	42	5.83	42	5.91	53	7.69	56	6.40

表5 *Acs1*家族蛋白理化性质

Table 5 Physicochemical properties of *Acs1* family proteins

蛋白 Protein	氨基酸数量/个 Number of amino acids	分子质量 Molecular weight	理论等电点 Ideal isoelectric point	分子式 Molecular formula	原子总数 Total number of atoms	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic amino acid index	不稳定指数 Instability index
<i>Acs11</i>	698	77 852. 38	7. 76	C ₃₅₁₅ H ₅₅₅₄ N ₉₂₂ O ₁₀₀₂ S ₃₄	11 027	93. 19	36. 28
<i>Acs13</i>	720	80 503. 99	8. 60	C ₃₆₀₄ H ₅₇₁₃ N ₉₅₅ O ₁₀₅₆ S ₃₇	11 365	88. 83	35. 09
<i>Acs14</i>	711	79 204. 03	8. 60	C ₃₅₅₅ H ₅₆₅₆ N ₉₃₀ O ₁₀₃₁ S ₄₀	11 212	89. 96	27. 52
<i>Acs15</i>	689	76 794. 96	7. 06	C ₃₄₉₇ H ₅₄₈₆ N ₉₀₀ O ₉₉₁ S ₂₅	10 899	96. 04	39. 71
<i>Acs16</i>	874	96 675. 78	8. 81	C ₄₃₄₄ H ₆₈₅₂ N ₁₂₀₀ O ₁₂₂₃ S ₃₈	13 657	89. 27	44. 35

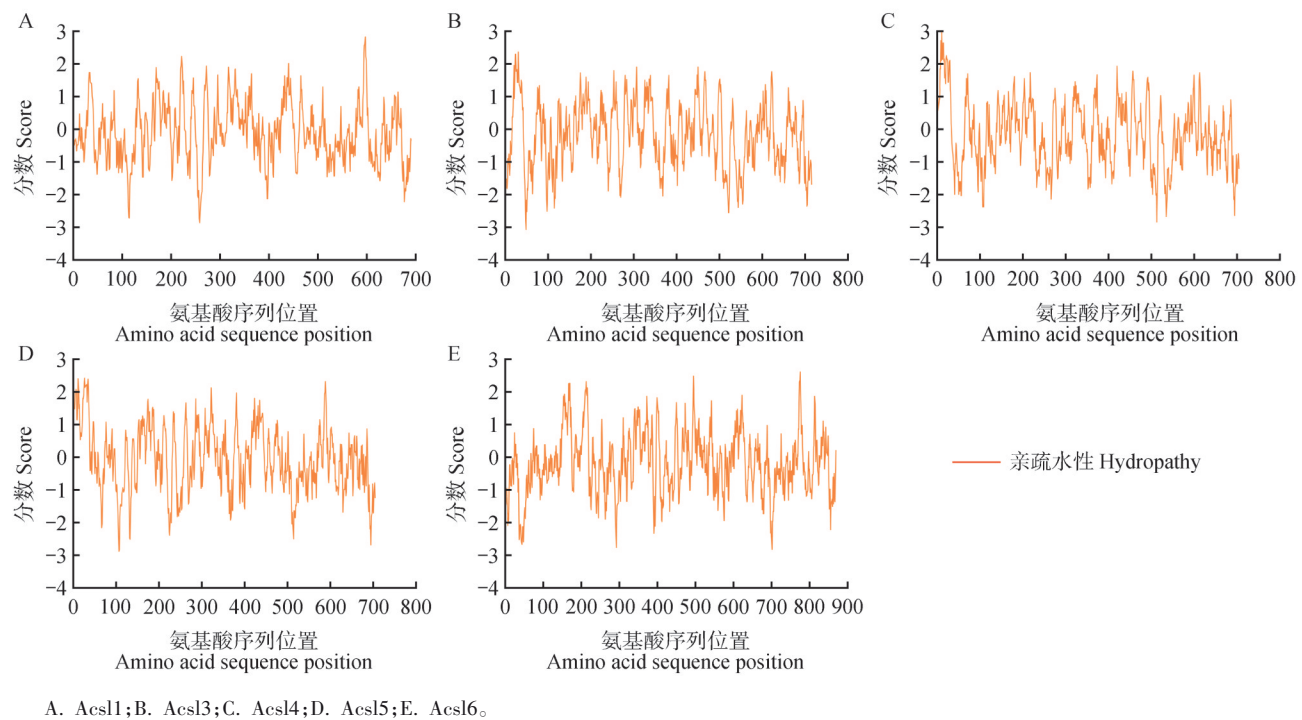


图2 *Acs1*家族蛋白的亲疏水性

Figure 2 Hydrophilic/hydrophobic profiles of *Acs1* family proteins

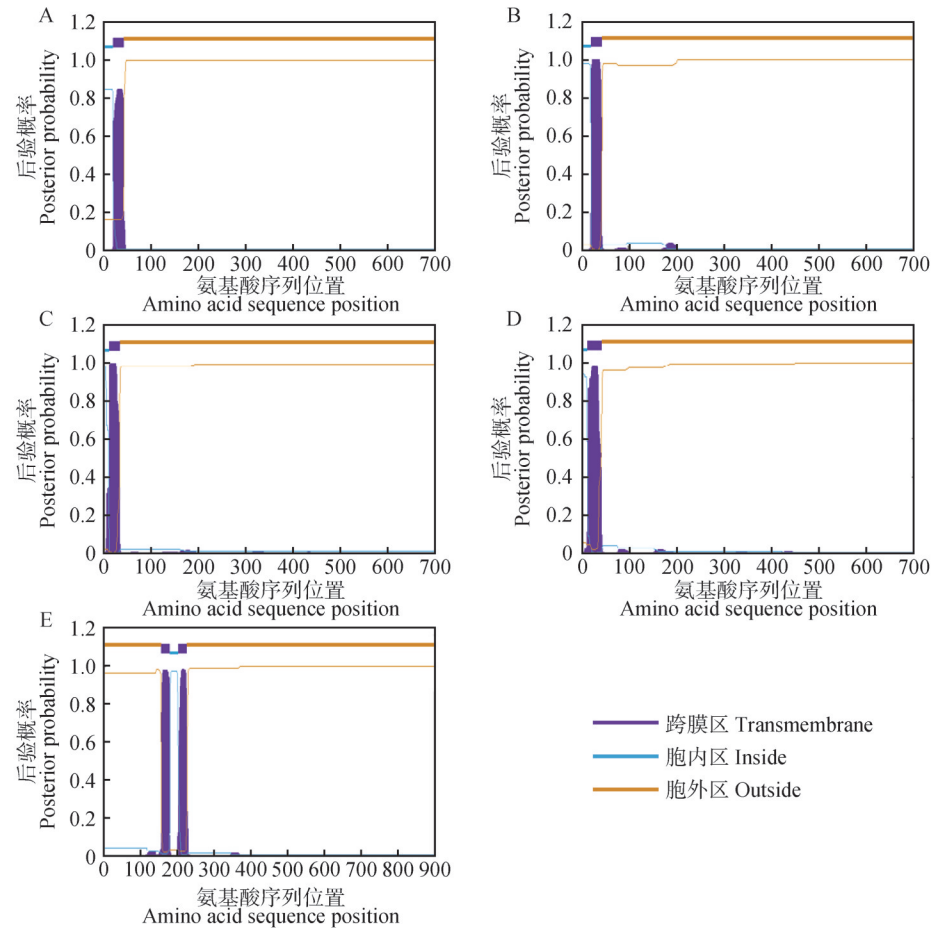
表6 *Acs1*家族蛋白跨膜结构及AMP-binding结构域分析

Table 6 Transmembrane structure and AMP-binding domain analysis of *Acs1* family proteins

蛋白 Protein	预测跨膜结构数量/个 Predicted number of transmembrane domains	跨膜的氨基酸位置 Amino acid range across the membrane	低复杂度区域的氨基酸范围 Amino acid range of low complexity region	AMP-binding结构域氨基酸位置 Amino acid range of AMP-binding domain
<i>Acs11</i>	1	21 ~ 43	—	96 ~ 563
<i>Acs13</i>	1	21 ~ 43	435 ~ 452	116 ~ 587
<i>Acs14</i>	1	12 ~ 34	206 ~ 217	103 ~ 578
<i>Acs15</i>	1	12 ~ 41	—	90 ~ 554
<i>Acs16</i>	2	153 ~ 175	49 ~ 56	280 ~ 740
		198 ~ 220	122 ~ 133	

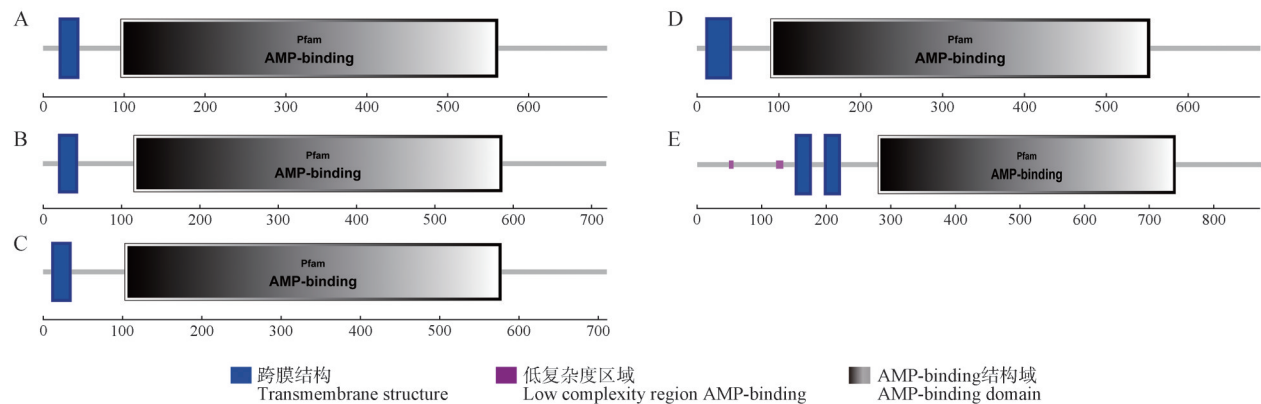
图中紫色色块分布完全对应。经 SMART 分析, Acs1 家族蛋白均含有 Pfam AMP-binding 保守功能结构域 (图 4)。5 个蛋白 AMP-binding 结构域氨基酸长度稳定分布于 460 ~ 475 个残基区间, 序列保守性极高;

但结构域在整条肽链上的排布位置差异显著, Acs11 ~ Acs15 的 AMP-binding 结构域紧邻 N 端跨膜区, 而 Acs16 的保守结构域大幅向序列 C 端偏移, 两段跨膜螺旋、低复杂度区域均位于结构域上游 (表 6)。



A. Acs11; B. Acs13; C. Acs14; D. Acs15; E. Acs16。
图 3 Acs1 家族蛋白跨膜结构预测

Figure 3 Prediction of transmembrane structure of Acs1 family proteins



A. Acs11; B. Acs13; C. Acs14; D. Acs15; E. Acs16。
图 4 Acs1 家族蛋白保守结构域分布

Figure 4 Distribution of conserved domains of Acs1 family proteins

2.6 Acs1家族蛋白二级、三级结构与互作网络

2.6.1 蛋白二级结构预测

经过SOMPA预测,各蛋白二级结构元件占比如表7所示,结构预测见图5。所有蛋白均以无规则卷曲为主要结构元件,同时穿插 α -螺旋及 β -折叠。

2.6.2 蛋白三级结构同源建模

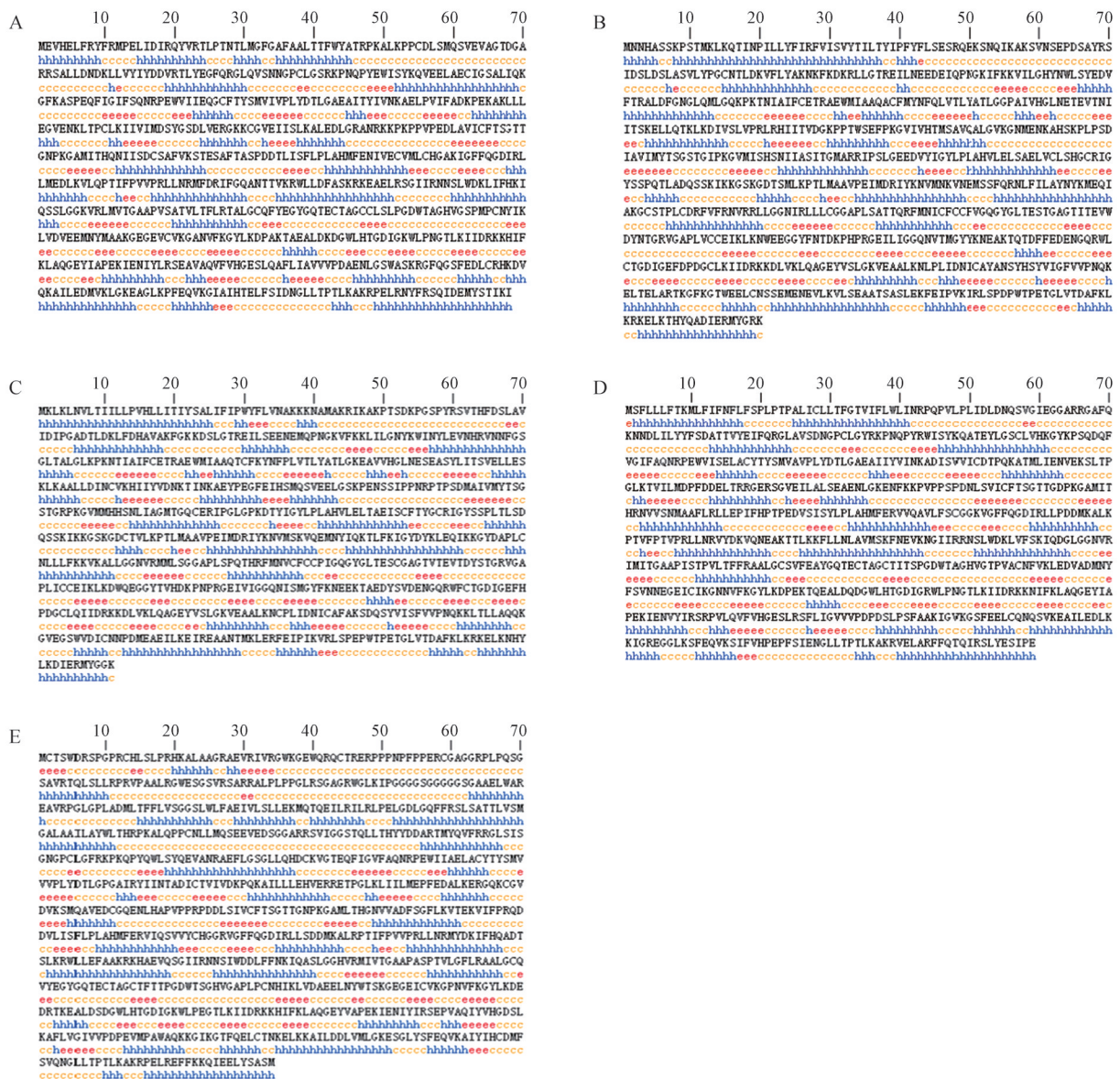
SWISS-MODEL同源建模结果显示,Acs1家族蛋白三级结构的序列一致性(seq identity)均在90%以上,GMQE值均高于0.70,说明构建的三维模型可信度高、空间构象可靠,预测三维结构见图6。Acs1家

表7 Acs1家族蛋白二级结构元件占比

Table 7 Proportion of secondary structure characteristic values of Acs1 family proteins

蛋白 Protein	α -螺旋 / % α -helix	β -折叠 / % β -sheet	无规则卷曲 / % Random curl
Acs11	38.97	17.62	43.41
Acs13	39.72	17.78	42.50
Acs14	39.52	18.00	42.28
Acs15	39.04	18.00	42.96
Acs16	37.19	15.22	47.60

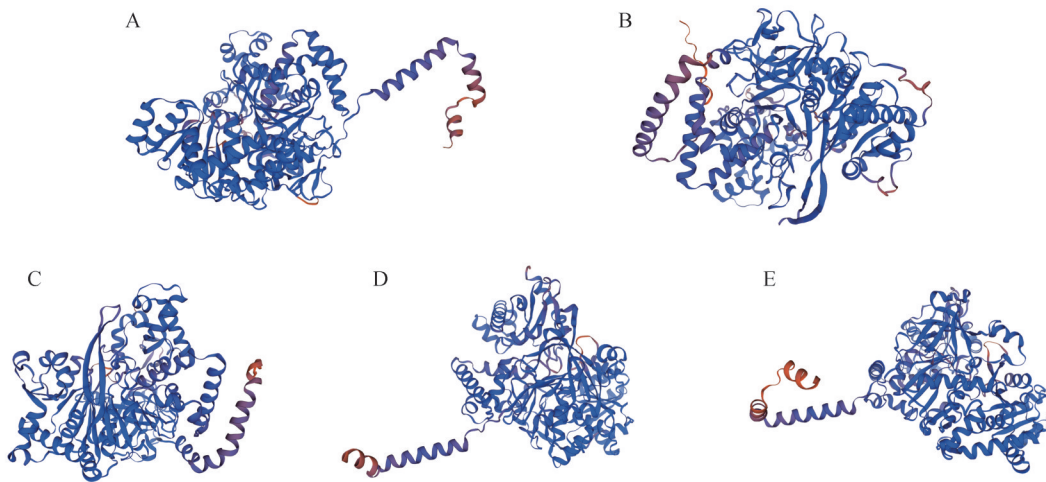
族蛋白整体均以 α -螺旋为主要结构元件,其间穿插分布 β -折叠与无规则卷曲。



A. Acs11; B. Acs13; C. Acs14; D. Acs15; E. Acs16。

图5 Acs1家族蛋白二级结构

Figure 5 Secondary structure of the Acs1 family of proteins



A. Acs1; B. Acs3; C. Acs4; D. Acs5; E. Acs6。

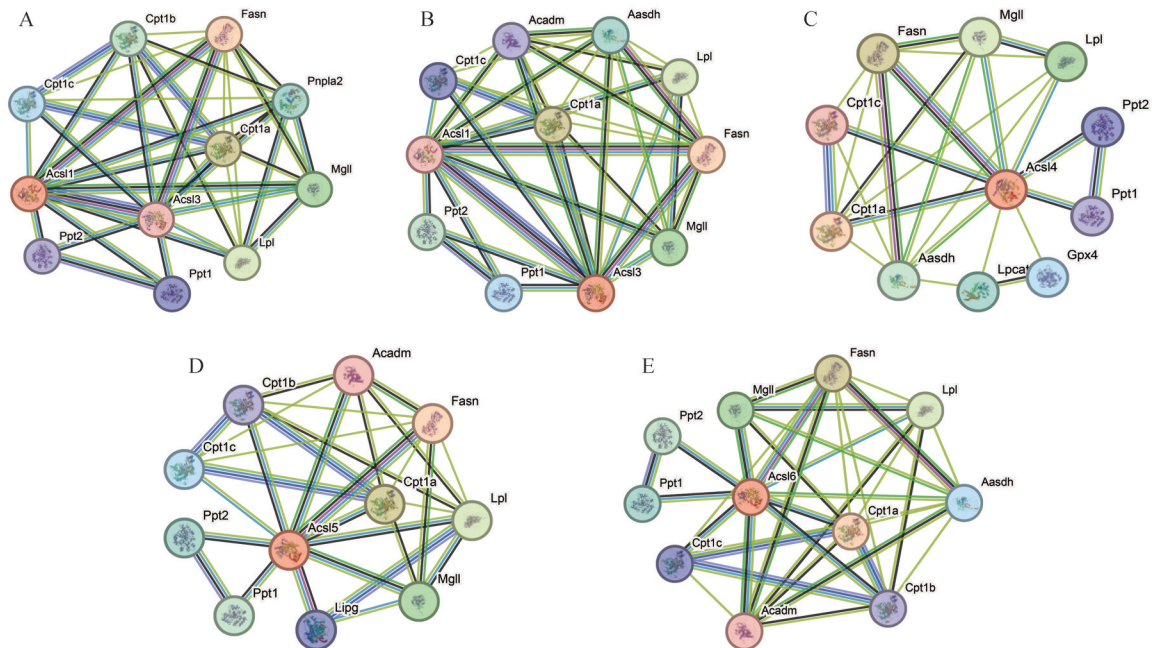
图 6 基于SWISS-MODEL预测的Acs1家族蛋白三级结构

Figure 6 Tertiary structure models of Acs1 family proteins predicted by SWISS-MODEL

2.6.3 蛋白互作网络预测

利用STRING数据库进行蛋白互作网络预测,结果如图7所示。在Acs1家族蛋白中,Acs11和Acs13可与Fasn、Mgli等蛋白发生相互作用,其功能主要涉及能量供应和脂肪酸的合成、存储及动员。Acs14则

主要与Lpcat3、Gpx4等蛋白互作,与膜结构动态活动密切相关。Acs15和Acs16可能通过与Cpt1、Acadm等 β -氧化相关酶系协同作用,参与维持膜流动性并为脂肪酸氧化提供代谢通路。



A. Acs1; B. Acs3; C. Acs4; D. Acs5; E. Acs6。

图 7 基于STRING数据库预测的Acs1家族蛋白互作网络

Figure 7 Acs1 family proteins interaction network predicted by STRING database

3 讨论与结论

本研究首次在麝鼠中检测了Acs11、Acs13、Acs14、

Acs15和Acs16五个Acs11家族成员在繁殖期、繁殖末期和非繁殖期睾丸组织中的表达动态,结果发现Acs11和Acs15在繁殖期的表达量显著高于非繁殖期

($P < 0.05$), 且从繁殖期到非繁殖期呈逐步下调趋势。*Acs11* 主要定位于线粒体、脂滴和微粒体^[8], *Acs15* 主要定位于线粒体和内质网, 在肝脏、脂肪组织和小肠等脂质代谢旺盛的组织中高表达^[9]。已有研究表明, 达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 在繁殖期睾丸及附睾内雄激素受体表达显著上升, 血清睾酮与双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 水平亦明显升高, 该过程伴随大量能量代谢及膜脂质合成^[10]。在本研究中, 这两个家族成员在繁殖期高表达的模式与该时期能量需求增加和睾酮合成增强的生理过程相一致。*Acs13* 和 *Acs14* 在繁殖末期均呈表达上调趋势, 且变化趋势相似, 提示二者在睾丸脂质代谢和功能维持中可能存在协同作用。*Acs13* 主要定位于内质网和脂滴^[11], 可促进脂滴形成并维持膜脂稳定性。*Acs14* 则定位于质膜、细胞质及内质网与线粒体接触区域^[12], 能够催化花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA) 发生酯化, 生成参与铁死亡过程的脂质过氧化物^[13]。对小鼠睾丸的研究表明, 睾丸内脂滴可能是功能活跃的细胞器, 参与类固醇合成与精子发生过程^[14]。另有研究发现, 铁死亡通路可通过调控脂肪酸代谢、减轻线粒体氧化应激损伤, 进而维持睾丸内环境稳定^[15]。在本研究中, 繁殖末期二者表达上调, 可能反映了睾丸组织在繁殖活跃期结束前的代谢适应, 如维持膜脂稳定、抵抗氧化应激, 以减缓生精上皮的退行性变化。*Acs16* 是该家族重要亚型, 主要定位于细胞质膜^[3]。本研究中 *Acs16* 从繁殖期到非繁殖期总体呈下降趋势, 尽管各时期差异未达显著水平, 但表达趋势与繁殖周期高度相关。对小鼠的研究显示, DHA 在睾丸中含量丰富, *Acs16* 可通过催化脂肪酸与辅酶 A 结合, 调控细胞内脂肪酸的合成与分解代谢, 且在睾丸中高表达, 是调节睾丸生殖细胞 DHA 含量的关键因子^[16]。*Acs16* 在繁殖期的相对高表达可能有助于在精子发生旺盛阶段为生殖细胞膜提供充足的 DHA, 保障精子细胞膜的正常结构与功能。

mRNA 的二级结构在基因表达调控中发挥重要作用。本研究中 *Acs1* 家族基因的 mRNA 最小自由能均为负值 ($-335.84 \sim -836.52$ kcal/mol), 表明其二级结构具有高度热力学稳定性。这种热力学稳定性一方面可有效抵抗核糖核酸酶的降解作用, 延长 mRNA 半衰期, 保证脂酰辅酶 A 合成酶持续稳定合成, 维持细胞脂肪酸活化、脂质合成与能量代谢等基

础生理过程的正常运转; 另一方面, 保守稳定的二级结构能够在翻译水平精准调控基因表达效率, 同时为 miRNA、RNA 结合蛋白等转录后调控因子提供特异性结合位点, 实现 *Acs1* 基因在不同组织、生理阶段的时序与空间特异性表达, 进而精准调控机体脂质代谢稳态, 保障机体生长发育、繁殖等生物学功能正常发挥^[17]。

跨膜结构预测结果显示, *Acs1* 家族蛋白中仅 *Acs16* 含有 2 个跨膜结构域, 其余成员均含 1 个。*Acs11* 跨膜结构域 N 端位于细胞质侧, 其定位于线粒体外膜的特征有利于将 C16 ~ C18 脂肪酸活化并介导其进入线粒体进行 β -氧化^[18]。该蛋白 N 端的锚定作用对其亚细胞定位与功能耦联至关重要, 与本研究预测的“单段 N 端跨膜结构”结果一致。*Acs13* 的 N 端疏水区域具有显著两亲性, 疏水面与亲水面分区明显, 使其能动态锚定在内质网膜和脂滴的单层磷脂膜上^[11]。其酶活性是脂滴形成的关键环节^[19], 可能对睾丸内精子发生进程产生间接影响。*Acs14* 跨膜区疏水性相对较低, 对 ARA 具有高度底物亲和性^[20], 并在睾丸等类固醇生成组织中表达, 参与脂质代谢过程, 从而调控类固醇合成相关功能。*Acs15* 的 N 端存在较为明显的跨膜螺旋结构, 而 C 端主要位于胞质或胞外区域, 整体呈现典型的“膜锚定+功能域外露”结构特征。该结构提示 *Acs15* 可能通过 N 端跨膜区锚定于细胞膜系统, 从而参与脂质代谢的协调调控^[9]。*Acs16* 以双跨膜结构嵌入细胞膜, 可形成通道或信号传导界面。小鼠相关研究表明, *Acs16* 参与精子细胞中 DHA/DPA 的富集, 并维持精子发生的时序稳定性, 推测其跨膜结构有助于在内质网特定位点为生精细胞膜提供 PUFA^[21], 进而保障精子正常进行。

SMART 结构域预测结果显示, 所有 *Acs1* 家族蛋白均含有 AMP-binding 保守结构域, 其中 *Acs11* 结构域中含有典型的腺苷酸化催化位点, 其高效催化特性可迅速将摄取的长链脂肪酸定向导入线粒体 β -氧化通路^[22]。*Acs13* 的 N 端存在内质网/脂滴定位信号, 有利于参与膜磷脂合成与脂滴形成^[23]。*Acs14* 可催化 ARA 及其他 ω -6 PUFA 活化为脂酰-CoA, 并将其整合至磷脂中, 提高膜内易发生脂质过氧化的 PUFA 比例, 从而促进细胞铁死亡; 尽管本研究未直接检测铁死亡指标, 但结合文献, 推测其 AMP-binding 结构域不仅构成催化中心, 还包含决定

PUFA底物选择性的关键氨基酸残基^[24]。Acs15的AMP-binding结构域在长度和构象上与Acs11相近,其定位于内质网和线粒体外膜,可催化长链脂肪酸的活化并参与其在 β -氧化及脂质合成途径中的利用,同时在组织特异性的能量代谢调控中发挥重要作用^[9]。Acs16的AMP-binding结构域具备对DHA的高选择性结构基础,可稳定结合并活化长链多不饱和DHA,在睾丸中参与维持生殖细胞膜中DHA的富集,对正常精子发生具有重要意义^[16]。总体而言,Acs1家族成员均具有高度保守的AMP-binding结构域,该结构域为脂肪酸活化提供了共同的催化基础;同时,不同成员在结构长度、局部氨基酸组成及空间构象上的差异,可能赋予其对不同脂肪酸底物的选择性识别能力。因此,Acs1家族在保持共同催化功能的基础上,通过结构特异性实现了对不同脂肪酸代谢途径的功能分化。

STRING蛋白互作网络分析显示,Acs11、Acs13可与Fasn、Mgll等蛋白发生相互作用,表明Acs1家族可能通过调控脂肪酸合成与活化的平衡影响能量代谢方向^[25]。Fasn、Lpl、Pnpla2、Mgll等脂滴生成与脂解相关蛋白可为Acs11催化反应提供底物^[26-28]。Acs13可介导脂肪酸进入脂滴并参与脂滴的生长与积累,这与互作网络中Fasn、Mgll和Ppt1/2等上游供给节点的分布相吻合。Acs14主要与Lpcat3、Gpx4等蛋白互作,参与膜结构动态调控。一方面,Acs14可与Lpcat3协同将PUFA-CoA整合至膜磷脂,提升膜脂质过氧化敏感性;另一方面,Gpx4作为该通路下游关键抗氧化修复酶,在网络中与Lpcat3、Acs14的互作关系也进一步印证了这一调控途径^[29-31]。Acs15主要参与线粒体相关代谢通路,可与Cpt1、Acadm等 β -氧化关键酶处于同一通路,提升脂肪酸氧化效率^[32]。Acs16则可通过长链脂肪酸代谢与Cpt1a/b/c互作参与精子发生,并经由Lpcat3、Gpx4等维持膜稳定性及流动性。综上,Acs1家族各成员通过与脂质代谢相关蛋白形成互作调控网络,协同介导麝鼠睾丸内脂肪酸的活化、转运、储存和氧化,以满足不同繁殖阶段对能量供给和膜脂质合成的生理需求。

综上所述,Acs1家族各成员通过差异化的亚细胞定位、底物偏好性及蛋白互作网络,在麝鼠睾丸中形成了分工协作的调控体系。Acs11和Acs15在繁殖期表达量最高,并随繁殖期结束呈下降趋势,推测其

核心功能在于供给能量和介导线粒体脂肪酸代谢;Acs13在繁殖末期显著上调,可能在脂滴生成与稳定维持中发挥关键作用;Acs14和Acs16则可能参与脂质过氧化调控和精子膜结构稳定。研究结果不仅为阐明麝鼠季节性繁殖的分子机制提供了新的分子依据,也为后续深入开展脂质代谢与生殖调控网络的关联奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 陈玉山, 佟煜人, 高秀华, 等. 麝鼠香腺发育与活体取香的初步研究[J]. 兽类学报, 1996, 16(1): 43-47.
Chen Yushan, Tong Yuren, Gao Xiuhua, et al. A preliminary study on the scent gland development and the collection of scent secret in living musk rats [J]. Acta Theriologica Sinica, 1996, 16(1): 43-47.
- [2] Zhang T, Peng D, Qi L, et al. Musk gland seasonal development and musk secretion are regulated by the testis in muskrat (*Ondatra zibethicus*) [J]. Biological Research, 2017, 50(1): 10.
- [3] Soupene E, Kuypers F A. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases [J]. Experimental Biology and Medicine, 2008, 233(5): 507-521.
- [4] Yan S, Yang X F, Liu H L, et al. Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update [J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(12): 3492-3498.
- [5] Deng X L, Luo Y Q, Gao Y, et al. Long-chain acyl-CoA synthetases: biological functions, diseases and therapeutic targets [J]. Molecular Biomedicine, 2025, 6(1): 117.
- [6] Shi C B, Liu Q Q, Wang W, et al. Transcriptome and proteome of ovarian tissues revealed the differences in the ovaries of dairy goats during the breeding and non-breeding seasons [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2025, 12: 1565807.
- [7] Capra E, Lazzari B, Russo M, et al. Seasonal effects on miRNA and transcriptomic profile of oocytes and follicular cells in buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. Scientific Reports, 2020, 10: 13557.
- [8] Rossi Sebastiano M, Konstantinidou G. Targeting long chain acyl-CoA synthetases for cancer therapy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(15): 3624.
- [9] Luo Q, Das A, Oldoni F, et al. Role of ACSL5 in fatty acid metabolism [J]. Heliyon, 2023, 9(2): e13316.
- [10] Yu W Y, Zhang Z W, Liu P, et al. Seasonal expressions of SPAG11A and androgen receptor in the epididymis of the wild ground squirrels (*Spermophilus dauricus* Brandt) [J]. European Journal of Histochemistry, 2020, 64(2): 3111.
- [11] Poppelreuther M, Rudolph B, Du C, et al. The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake [J]. Journal of Lipid Research, 2012, 53(5): 888-900.
- [12] Küch E M, Vellaramkalayil R, Zhang I, et al. Differentially lo-

- calized acyl-CoA synthetase 4 isoenzymes mediate the metabolic channeling of fatty acids towards phosphatidylinositol[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, 1841(2): 227–239.
- [13] Yuan W Z, Sun Z B, Ji G J, et al. Emerging roles of ferroptosis in male reproductive diseases [J]. *Cell Death Discovery*, 2023, 9: 358.
- [14] Wang W Y, Wei S N, Li L H, et al. Proteomic analysis of murine testes lipid droplets [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12070.
- [15] Liu H, Chen X R, Feng X, et al. Astaxanthin promotes spermatogenesis in mice by reducing mitochondrial oxidative stress damage and regulating fatty acid metabolism and ferroptosis [J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2025, 19: 7777–7794.
- [16] Hale B J, Fernandez R F, Kim S Q, et al. Acyl-CoA synthetase 6 enriches seminiferous tubules with the ω -3 fatty acid docosahexaenoic acid and is required for male fertility in the mouse [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(39): 14394–14405.
- [17] Wayment-steele H K, Kim D S, Choe C A, et al. Theoretical basis for stabilizing messenger RNA through secondary structure design [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(18): 10604–10617.
- [18] Nan J Y, Lee J S, Lee S A, et al. An essential role of the N-terminal region of ACSL1 in linking free fatty acids to mitochondrial β -oxidation in C2C12 myotubes [J]. *Molecules and Cells*, 2021, 44(9): 637–646.
- [19] Kassin A, Herms A, Fernández-vidal A, et al. Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 203(6): 985–1001.
- [20] Kang M J, Fujino T, Sasano H, et al. A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(7): 2880–2884.
- [21] Shishikura K, Kuroha S, Matsueda S, et al. Acyl-CoA synthetase 6 regulates long-chain polyunsaturated fatty acid composition of membrane phospholipids in spermatids and supports normal spermatogenic processes in mice [J]. *FASEB Journal*, 2019, 33(12): 14194–14203.
- [22] Ellis J M, Li L O, Wu P C, et al. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward β -oxidation and is required for cold thermogenesis [J]. *Cell Metabolism*, 2010, 12(1): 53–64.
- [23] Eck F, Kaulich M, Behrends C, et al. ACSL3 is a novel GABARAPL2 interactor that links ufmylation and lipid droplet biogenesis [J]. *Journal of Cell Science*, 2020, 133(18): jcs243477.
- [24] Doll S, Proneth B, Tyurina Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(1): 91–98.
- [25] Yang Z G, Zhu H B, Huang X P, et al. Molecular characterization, tissue distribution profile, and nutritional regulation of acsl gene family in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6437.
- [26] Lulić A M, Katalinić M. The PNPLA family of enzymes: characterisation and biological role [J]. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2023, 74(2): 75–89.
- [27] Ruby M A, Goldenson B, Orasanu G, et al. VLDL hydrolysis by LPL activates PPAR- α through generation of unbound fatty acids [J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(8): 2275–2281.
- [28] Peña De La Sancha P, Wieser B I, Schauer S, et al. Lipolysis-derived fatty acids are needed for homeostatic control of sterol element-binding protein-1c driven hepatic lipogenesis [J]. *Communications Biology*, 2025, 8: 588.
- [29] Kang J L, Tian S L, Zhang L, et al. Ferroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: review of literature [J]. *Chinese Neurosurgical Journal*, 2024, 10(1): 6.
- [30] Li L L, Bo Y F, Xue D, et al. Ferroptosis-immune crosstalk in cervical cancer: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16: 1657905.
- [31] Ding K Y, Liu C B, Li L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism [J]. *Chinese Medical Journal*, 2023, 136(21): 2521–2537.
- [32] Bu S Y, Mashek D G. Hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 5 mediates fatty acid channeling between anabolic and catabolic pathways [J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(11): 3270–3280.