

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.05.012

代谢组学技术对非梗阻性无精子症的诊断价值*

彭红波, 刘 晃, 宋小燕, 吴瑞珊, 孟艳辉, 赵文忠[△]

广东省生殖科学研究所(广东省生殖医院)国家卫生健康委员会男性生殖与遗传重点实验室, 广东广州 510600

摘 要:目的 通过对非梗阻性无精子症(NOA)和健康捐精者的血清代谢物进行比较分析,确定与生精功能障碍相关的潜在生物标志物,为 NOA 的病因诊断和治疗提供依据。方法 采用高效液相色谱-串联质谱法检测 NOA 患者(NOA 组,5 例)和健康捐精者(对照组,5 例)的血清标本。通过血清代谢组学技术分析得到 NOA 组和对照组的差异代谢物,从中识别出潜在的 NOA 生物标志物,并分析其可能的代谢途径。结果 共筛选并鉴定出 21 种代谢物可作为 NOA 的潜在生物标志物,这些代谢物主要与精子发生中的能量产生、氧化应激和细胞凋亡密切相关。此外,NOA 患者花生四烯酸代谢、赖氨酸降解、色氨酸代谢、类固醇激素生物合成、萜类骨架合成、叶酸合成等多种代谢途径均受到干扰;FoxO 信号通路、cAMP 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等都受到影响。结论 NOA 的病因可能与血清代谢紊乱有关。血清代谢组学可以识别 NOA 独特的代谢模式,为男性不育的发病机制提供新的见解。

关键词:代谢组学; 非梗阻性无精子症; 生物标志物

中图分类号:R698.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)05-0625-05

Diagnostic value of metabolomics techniques in non-obstructive azoospermia*

PENG Hongbo, LIU Huang, SONG Xiaoyan, WU Ruishan, MENG Yanhui, ZHAO Wenzhong[△]

Key Laboratory of Male Reproduction and Genetics of National Health Commission,

Guangdong Provincial Reproductive Science Institute(Guangdong Provincial

Reproductive Hospital), Guangzhou, Guangdong 510600, China

Abstract: Objective By comparing and analyzing the serum metabolites of non-obstructive azoospermia (NOA) and healthy sperm donors, identify potential biomarkers related to spermatogenic dysfunction, to provide basis for the etiological diagnosis and treatment of NOA. **Methods** The serum samples of NOA patients (NOA group, 5 cases) and healthy sperm donors (control group, 5 cases) were detected by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Serum metabolomics techniques were used to analyze the different metabolites between the NOA group and the control group, from which potential biomarkers of NOA were identified, and possible metabolic pathways were analyzed. **Results** A total of 21 metabolites were identified as potential biomarkers of NOA. These metabolites related closely to energy production, oxidative stress and apoptosis in spermatogenesis. In addition, arachidonic acid metabolism, lysine degradation, tryptophan metabolism, steroid hormone biosynthesis, terpenoid skeleton synthesis, folic acid synthesis and other metabolic pathways were interfered in NOA patients. FoxO signaling pathway, cAMP signaling pathway, mTOR signaling pathway and PI3K/Akt signaling pathway were all affected. **Conclusion** The cause of NOA might relates to the disorder of serum metabolism. Serum metabolomics could identify the unique metabolic patterns of NOA and provide new insights into the pathogenesis of male infertility.

Key words: metabolomics; non-obstructive azoospermia; biomarkers

不孕不育已成为人类重大的健康问题之一,影响全球 8%~15% 的育龄夫妇,其中 50% 的生育问题是由男性因素造成的^[1]。无精子症是男性不育症中最严重的类型,主要分为梗阻性无精子症(OA)和非梗阻性无精子症(NOA)^[2]。OA 是指输精管阻塞或先天性双侧输精管缺如导致的不育症,其生精功能正

常;而 NOA 通常是由不明病因的特发性生精功能障碍引起的。目前,关于 NOA 的发病机制尚不清楚,对 NOA 发生的分子机制进行研究,并在此基础上寻找治疗 NOA 的新方法具有重要意义。代谢组学是一种检测生物样品中小分子代谢物的方法,该技术以生物指纹标记的方式显现生物体内遗传和环境因素所导

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(B2021405)。

作者简介:彭红波,女,副主任技师,主要从事临床检验研究。[△] 通信作者, E-mail: zhaowzphd@163.com。

致的代谢特征,其不仅可展示基因蛋白表达终末产物,而且还可展现接近真实表型的细胞信号事件^[3]。高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)在代谢组学研究中具有高准确性、稳定性和敏感性的特点^[4-5]。血清代谢组学能反映生物体的功能变化,常被用来进行病原分析和病因预测^[6]。本研究运用 HPLC-MS/MS 技术对 NOA 患者和健康捐精者血清标本进行特征分析,以期发现与生精功能障碍相关的潜在生物标志物,为 NOA 的病因诊断和治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院诊治的 5 例 NOA 患者为 NOA 组,患者年龄 25~35 岁,体质量指数 18.5~23.9 kg/m²,无职业及环境暴露,无家族遗传病史,排除其他重大疾病。另选取广东省人类精子库中的 5 例健康捐精者作为对照组,健康捐精者精液满足世界卫生组织发布的《人类精液实验室检验手册(第五版)》相关标准。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者对研究内容知情同意。

1.2 非靶向代谢物提取 取 100 μ L 血清置于 EP 管中,加入 400 μ L 含 0.1%甲酸的 80%甲醇水溶液,涡旋振荡,冰浴静置 5 min,15 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min。取一定量的上清液加入质谱级水稀释至甲醇含量为 53%,置于离心管中 15 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min,收集上清液,按照《非靶向代谢物提取操作手册》设置条件进样,采用 HPLC-MS/MS 进行分析。从每个实验标本中取等体积标本混匀作为质控标本,将含 0.1%甲酸的 53%甲醇水溶液作为空白标本。

1.3 代谢物的鉴定 将下机数据(.raw)文件导入 CD 搜库软件中,进行保留时间、质荷比等参数的简单筛选,然后对不同标本根据保留时间偏差 0.2 min 和质量偏差 5 ppm 进行峰对齐,使鉴定更准确,随后根据设置的质量偏差 5 ppm,信号强度偏差 30%,信噪比为 3,最小信号强度为 100 000,加和离子等信息进行峰提取,同时对峰面积进行定量,再整合目标离子,然后通过分子离子峰和碎片离子进行分子式的预测,并与 mzCloud、mzVault 和 Masslist 数据库进行比对。

1.4 数据分析 数据首先使用 Analysis Base File Converter 转换为 ABF 格式,使用 MSDIAL 软件对转换后的 ABF 文件进行峰寻找、峰对齐、归一化等数据处理,同时基于一级与二级图谱搜索 MassBank、MoNA、Respect、GNPS 数据库,得到鉴定结果。再用 MS-DIAL 软件设置参数,Alignment; MS1 tolerance 0.01 Da; Retention time tolerance 0.1 min; Identification; Accurate mass tolerance(MS1) 0.025 Da; Accurate mass tolerance(MS1) 0.25 Da,对于 MS-DIAL 对齐鉴定出来的数据,通过质控本来控制标本指标变异系数(CV)<30%,然后删除组内缺失值>

50%的离子峰。采用 Pareto-scaling 方法进行归一化,应用 MetaboAnalyst 软件进行多维统计分析,包括无监督主成分分析(PCA)、有监督偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)及正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-PA)。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单维统计分析包括 *t* 检验和变异倍数分析,用空白标本去除背景离子,并对定量结果进行归一化,最后得到数据的鉴定和定量结果。

1.5 潜在生物标志物的筛选 以 VIP>1.0、FC>1.5 或 FC<0.667 且 *P*<0.05 对鉴定到的差异代谢物进行筛选。在此基础上进行差异代谢物聚类分析和差异代谢物相关性分析。

1.6 代谢组学途径分析 为了确定 NOA 被影响的可能代谢途径,通过 MetPA 对筛选出的代谢物进行代谢组学途径分析,MetPA 基于京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库。通过 KEGG 富集分析来确定差异代谢物行使的主要生物学功能。

2 结果

2.1 基本资料分析 NOA 组平均年龄为(30.4 $\pm$ 2.5)岁,对照组平均年龄为(28.1 $\pm$ 2.5)岁,两组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。

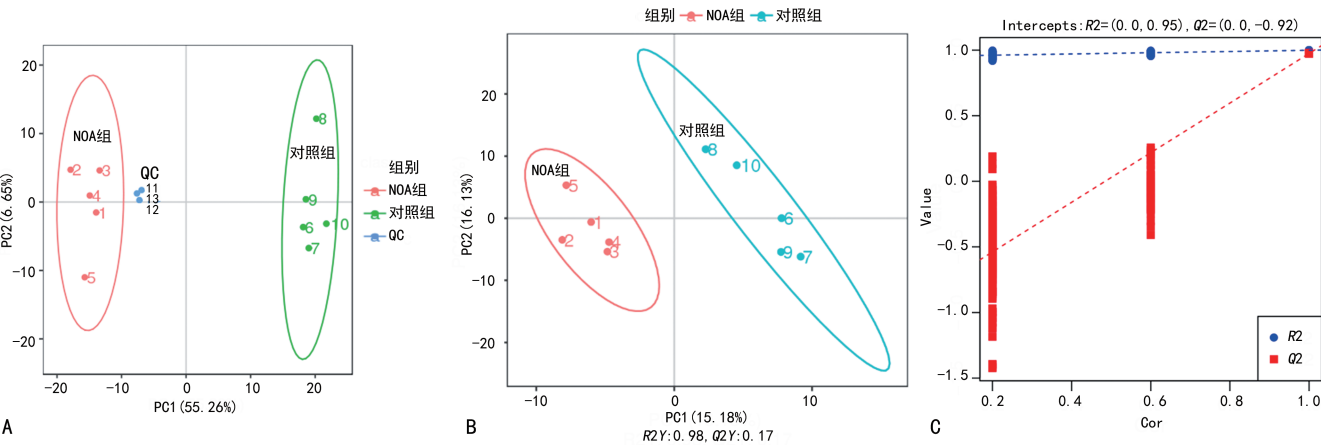
2.2 总样本 PCA 结果 对数据进行初步分析,从 NOA 组和对照组观察到分离的趋势 [*R*²X=0.588, *Q*²=0.115, 4 个成分],见图 1A。通过 PLS-DA 发现,两组出现明显分离,见图 1B。100 个随机排列也显示 PLS-DA 方法是可靠的,并且未检测到过拟合数据,两组代谢物差异分析结果为存在明显差异,见图 1C。

2.3 NOA 潜在生物标志物的筛选 经比较分析,共鉴定出 21 种代谢物可作为 NOA 潜在生物标志物,见表 1。NOA 组和对照组间的差异代谢物进行层次聚类分析,通过热图的颜色显示,本研究选择的两组样本存在明显差异。

差异代谢物分析结果显示,可分成上调和下调两组,上调的包括 PE (14:0e/2:0)、3-羟基-4-甲氧基苯乙酸、三角洲三癸内酯、4-甲基儿茶酚、DL-3,4-二羟基苯基乙二醇、GM3 d34:1;[M-H]、3-(2-萘基)-D-丙氨酸、法赫法、18- β -甘草次酸、N1-环己基-4-(4-氟苄基)-1,4-二氮烷-1-硫代甲酰胺、溶血磷脂酸 22:6、花生四烯酸、2-(3,4-二甲氧基苯基)乙胺、溶血磷脂酸 18:2、溶血磷脂酸;与对照组相比,上述代谢物在 NOA 组中的水平更高。下调的有 4-甲基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-碳腈、2-氰基-3-(四氢-3-硫苯基氨基)丙烯酸酯、硫酸雌酮、葡萄糖醛酸雄激素、LPC;与对照组相比,上述代谢物在 NOA 组中的水平较低。

2.4 NOA 代谢组学途径分析 通过 KEGG 富集分析发现,两组标本在不饱和脂肪酸代谢和类固醇激素生物合成方面存在显著差异代谢物(图 2),这些代谢物主要与精子发生中的能量产生、氧化应激和细胞凋

亡密切相关。



注:A为PCA图;B为PLS-DA图;C为OPLS-DA图。

图1 总样本PCA结果

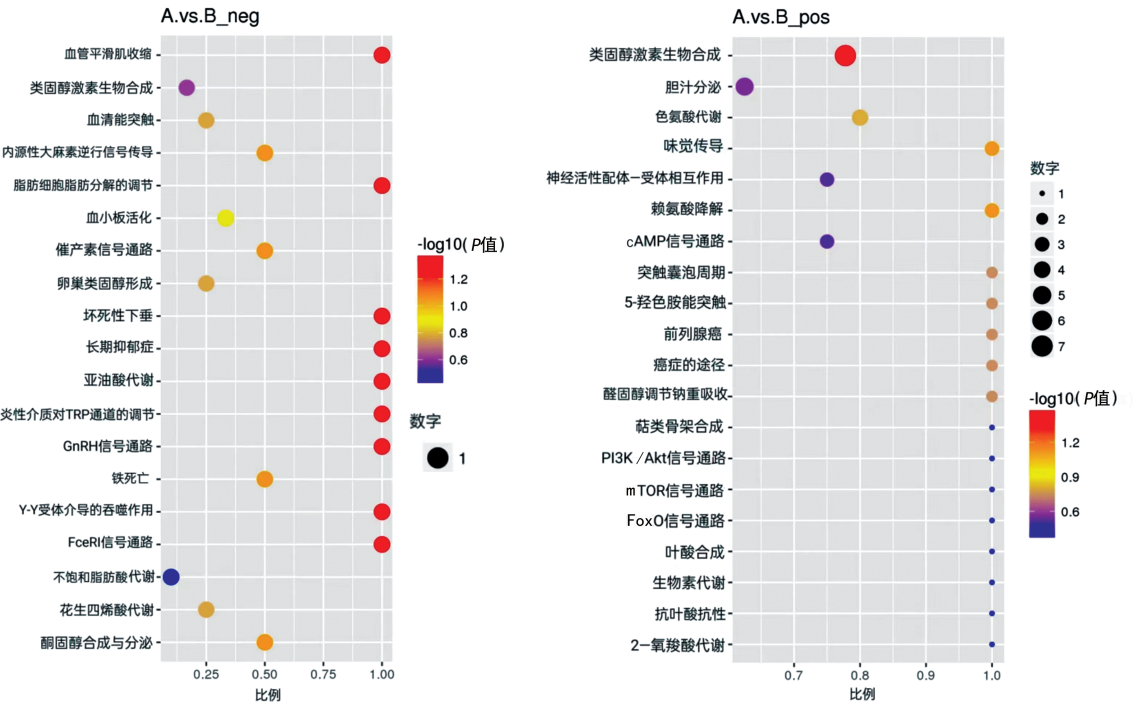


图2 KEGG富集分析

表1 NOA潜在生物标志物

名称	分子式	保留时间(min)	差异倍数(倍)	P	ROC	表达情况
PE (14 : 0e/2 : 0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	9.62	2 224.51	<0.000 01	1.00	上调
3-羟基-4-甲氧基苯乙酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	11.01	30.05	<0.000 01	1.00	上调
4-甲基-2-氧代-1,2-二氢喹啉-3-碳腈	C ₁₁ H ₈ N ₂ O	13.41	0.18	<0.000 01	1.00	下调
三角洲三癸内酯	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	13.20	22.35	<0.000 01	1.00	上调
4-甲基儿茶酚	C ₇ H ₈ O ₂	12.66	5.44	0.002 30	1.00	上调
DL-3,4-二羟基苯基乙二醇	C ₈ H ₁₀ O ₄	10.59	2.51	0.003 17	1.00	上调
2-氰基-3-(四氢-3-硫苯基氨基)丙烯酸乙酯	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	11.67	0.28	0.006 52	0.96	下调
硫酸雌酮	C ₁₈ H ₂₂ O ₅ S	11.49	0.31	0.006 89	0.92	下调
GM3 d34 : 1;[M-H]	C ₅₇ H ₁₀₄ N ₂ O ₂₁	15.56	3.12	0.007 49	0.88	上调
3-(2-萘基)-D-丙氨酸	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂	11.09	2.74	0.008 13	0.96	上调

续表 1 NOA 潜在生物标志物

名称	分子式	保留时间(min)	差异倍数(倍)	P	ROC	表达情况
法赫法	C ₃₈ H ₆₄ O ₄	14.85	2.30	0.009 46	1.00	上调
18-β-甘草次酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	14.24	4.90	0.013 89	0.92	上调
N1-环己基-4-(4-氟苄基)-1,4-二氮烷-1-硫代甲酰胺	C ₁₉ H ₂₈ FN ₃ S	10.46	3.14	0.027 09	0.84	上调
溶血磷脂酸 22:6	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P	14.60	2.92	0.029 83	0.88	上调
花生四烯酸	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	14.84	1.60	0.036 75	0.92	上调
2-(3,4-二甲氧基苯基)乙胺	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	10.80	2.60	0.037 41	0.88	上调
葡萄糖醛酸雄激素	C ₂₅ H ₃₈ O ₈	12.38	0.51	0.044 14	1.00	下调
溶血磷脂酸 18:2	C ₂₁ H ₃₉ O ₇ P	14.66	2.73	0.044 74	0.88	上调
溶血磷脂酸	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	14.79	2.06	0.046 43	0.92	上调
LPC	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	15.29	0.28	0.049 00	0.88	下调

3 讨 论

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科,是系统生物学的重要组成部分。代谢组学的概念来源于代谢组,代谢组是指某一生物或细胞在一特定生理时期内所有的低分子量代谢物,代谢组学则是对某一生物或细胞在一特定生理时期内所有低分子量代谢物同时进行定性和定量分析的一门新学科^[7]。代谢组学作为一种新兴的技术在男性生殖领域受到越来越多的关注,代谢组学的评估结果不仅代表基因/蛋白质表达的最终产物,也是最终细胞信号事件产生的原因——基因组/蛋白质组与环境刺激的相互作用,更接近于实际表型^[8]。血清代谢组学分析技术检测灵敏度高,检测标本易于获取,常作为疾病早期小分子代谢物变化情况的重要检测手段^[9]。血液中的代谢物作为所有细胞代谢过程的产物,在反映疾病和环境变化方面有着较高的灵敏度与特异度,也是代表所有器官生理功能的终末产物,形成对个体当前生理状态的详细系统表征^[10]。

目前,采用代谢组学方法解析男性不育的原因及机制成为研究热点,在男性不育人群中,血清代谢组学表现出不同的代谢活动模式^[11]。类固醇激素作为内分泌干扰物的重要组成部分,其较低水平就能引起生物体发育异常和生殖障碍等。不同的类固醇有不同的作用,其中胆固醇主要是构成细胞膜和细胞器膜的一种组分,其可以调节生物膜脂质的物理状态,保持膜的流动性,还可以合成胆汁酸和类固醇激素前体。胆汁酸可以与牛磺酸或甘氨酸形成结合物胆汁盐,胆汁盐的生理功能主要是分泌到肠内,促进脂质的乳化与吸收。类固醇激素的变化影响糖代谢、脂代谢,进而影响男性生殖发育。花生四烯酸是天然存在的 ω-6 必需脂肪酸,其也是前列腺素合成的主要直接前体,前列腺素与体育锻炼后蛋白质合成和肌肉肥大的关系密切^[12-13]。葡萄糖醛酸雄激素在肝脏和睾丸中产生,其是睾酮激素的一种代谢物,可以发挥与激素前导物一样的作用,同时其也是男性体内一种作用

较强的性激素。本研究结果显示,NOA 组患者硫酸雌酮、葡萄糖醛酸雄激素水平低于对照组,4-甲基儿茶酚、花生四烯酸、溶血磷脂酸水平高于对照组。NOA 组与对照组代谢物相比,有独特的血清代谢特征,其中部分代谢物与精子发生中的能量产生、氧化应激和细胞凋亡密切相关。

精子发生是睾丸生精小管(STs)内的精原干细胞(SSCs)分化为成熟精子的复杂过程,是研究男性生殖功能的关键环节。SSCs 必须维持自我更新和分化的平衡,才能使精子源源不断地产生。整个生精过程大约需要 74 d,贯穿于机体整个生命过程中。男性每天的精子产量为每个睾丸 4 500 万个,睾丸结构、生精细胞和支持细胞等在精子发生过程中起着重要作用,而酶、激素、信号因子等一系列因素是调节细胞增殖和凋亡的重要因素,最终影响男性生育。根据近年来的研究报道,精子发生过程中已知的信号通路归纳为以下 3 种:(1) PI3K/Akt 信号通路;(2) cAMP 信号通路;(3) mTOR 信号通路^[14]。PI3K/Akt 信号通路对于生精细胞增殖和凋亡均具有重要调控作用;cAMP 信号通路参与精子超激活运动、顶体反应及精卵结合等过程;mTOR 信号通路对生精过程中减数分裂细胞及其子细胞的正常发育起着调节作用^[15]。本研究中,参与精子发生的 mTOR 信号通路、PI3K/Akt 信号通路及 cAMP 信号通路都受到一定程度的影响,从而影响精子生成,导致 NOA 的出现。

本研究也存在一定的局限性,一是 NOA 患者的样本量较小,虽然在 NOA 患者中发现了一些代谢紊乱,但还需要增加样本量,进一步研究验证潜在的发病机制;二是由于机体代谢活动容易受到环境、生活方式和饮食等各种因素的影响,受试者个体间的代谢差异没有很好的控制。因此,为了消除这些混杂因素的影响,需要制订更严格的研究对象选择标准和开展动物模型研究。

本研究通过对机体的整体代谢组分分析发现了 NOA 独特的代谢模式,找出了一些特异性生物标志

物,有助于临床对 NOA 进行及时、准确的诊断,并为男性不育的发病机制研究提供了新的方向,为研究疾病新型治疗策略提供了理论依据。

参考文献

- [1] SENGUPTA P, DUTTA S, KRAJEWSKA-KULAK E. The disappearing sperms; analysis of reports published between 1980 and 2015[J]. *Am J Mens Health*, 2017, 11(4):1279-1304.
- [2] TOURNAYE H, KRAUSZ C, OATES R D. Concepts in diagnosis and therapy for male reproductive impairment [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(7):554-564.
- [3] COURANT F, ANTIGNAC J P, MONTEAU F, et al. Metabolomics as a potential new approach for investigating human reproductive disorders[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(6):2914-2920.
- [4] SHACKLETON C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 121(3/5):481-490.
- [5] ZHANG J, HUANG Z, CHEN M, et al. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(1):44-53.
- [6] UCHIYAMA K, YAGI N, MIZUSHIMA K, et al. Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer[J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(6):677-694.
- [7] LI Y, NYATI M K, AHSAN A, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression[J]. *Nature*, 2009, 457(7231):910-914.
- [8] GUIJAS C, MONTENEGRO-BURKE J R, WARTH B, et al. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4):316-320.
- [9] 杜梦繁, 张光远, 王志玮, 等. 基于 L-NAME 诱导的高血压小鼠血清代谢组学研究[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(12):1775-1776.
- [10] KWON H, OH S, JIN X, et al. Cancer metabolomics in basic science perspective [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(3):372-380.
- [11] RAUSCHERT S, UHL O, KOLETZKO B, et al. Metabolomic biomarkers for obesity in humans; a short review [J]. *Ann Nutr Metab*, 2014, 64(3/4):314-324.
- [12] TANG B, SHANG X, QI H, et al. Metabonomic analysis of fattyacids in seminal plasma between healthy and asthenozoospermic men based on gaschromatography mass spectrometry[J]. *Andrologia*, 2017, 49(9):e12744.
- [13] YU L, YANG X, MA B, et al. Abnormal arachidonic acid metabolic network may reduce sperm motility via P38MAPK[J]. *Open Biol*, 2019, 9(4):180091.
- [14] 管斯琪, 王景尚, 祝雨田. 生精细胞增殖、凋亡相关蛋白及通路的研究进展[J]. *中国性科学*, 2021, 30(8):4-7.
- [15] 赵娜, 甄林青, 胡启蒙, 等. 哺乳动物精子获能过程中信号通路研究进展[J]. *生命科学*, 2014, 26(4):369-376.

(收稿日期:2022-08-25 修回日期:2022-11-22)

(上接第 624 页)

- 脑病发病机制及危险因素的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(11):1529-1532.
- [2] 吕信鹏, 邓颖. 一氧化碳中毒迟发性脑病的相关研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(1):100-103.
- [3] 庞国忠, 孙爱芹, 刘文帅, 等. 醒脑静注射液联合低分子肝素治疗急性一氧化碳中毒迟发性脑病的临床研究[J]. *世界复合医学*, 2019, 5(7):177-179.
- [4] 高建强, 史兴卫, 王光磊, 等. 醒脑静注射液治疗急性一氧化碳中毒后迟发性脑病研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19(6):466-468.
- [5] 赵燕, 郝玉贵, 易凡凡, 等. 醒脑静对急性一氧化碳中毒后迟发性脑病患者 hs-CRP 和 IL-6 的影响及临床意义[J]. *社区医学杂志*, 2017, 15(5):49-51.
- [6] ZHAO N J, LIANG P C, ZHUO X Y, et al. After treatment with methylene blue is effective against delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122(5):470-480.
- [7] 蔡国荣, 陈雪琴, 赵龙, 等. 急性一氧化碳中毒迟发性脑病的 MRI 诊断[J]. *中国社区医师*, 2015, 31(8):91-92.
- [8] MYRBERG K, LARS-CHRISTER H N, SAMUELSON C. The mini-mental state examination (MMSE) from a language perspective; an analysis of test interaction[J]. *Clin Linguist Phon*, 2020, 34(7):652-670.
- [9] 张磊, 刘建民. 美国国立卫生研究院卒中量表[J]. *中华神经外科杂志*, 2014, 30(1):79.
- [10] 杨卫军, 张静余, 严敏鸣. 亚甲基蓝检测方法及其代谢动力学研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(10):2419-2425.
- [11] 吴敏, 方庆, 师忠芳, 等. 亚甲基蓝对大鼠局灶性脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用[J]. *中国康复理论与实践*, 2016, 22(2):125-131.
- [12] 程方圆, 路凯, 刘捷, 等. 亚甲基蓝对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用[J]. *实用药物与临床*, 2021, 24(4):289-294.
- [13] 项文平, 王宝军, 薛慧, 等. 白细胞介素-6 和髓鞘碱性蛋白在急性一氧化碳中毒迟发性脑病中的作用[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(11):697-702.

(收稿日期:2022-09-12 修回日期:2022-11-22)