

· 论 著 ·

转铁蛋白水平与男性生育及睾丸足细胞功能的关系

杨 铮¹, 黄 萍^{2△#}, 彭道荣³, 郑善奎³, 张小宁³, 王 菁³

(第四军医大学:1. 学员旅;2. 秦都口腔医院检验科;3. 西京医院全军临床检验医学研究所, 陕西西安 710032)

摘要:目的 探讨转铁蛋白(Tf)水平与男性生育及睾丸足细胞功能的关系。方法 收集临床男性不育症患者和正常生育者的精液标本,采用精子质量分析仪进行精子密度及活动率分析,并检测精液 Tf 水平;无菌切取大鼠睾丸,经胶原酶及透明质酸酶消化,分离出纯度较高的足细胞并培养,测定细胞培养液 Tf 水平;Tf 水平测定均采用免疫速率散射比浊法。结果 男性不育症患者精液 Tf 水平 $[(15\pm 5)\mu\text{mol/L}]$ 低于正常生育者 $[(24.5\pm 6.5)\mu\text{mol/L}, P<0.01]$,而且与精子密度和活动率呈正相关($P<0.01$)。正常生育组大鼠睾丸足细胞悬液 Tf 水平 $[(25\pm 8)\mu\text{mol/L}]$ 高于不育组 $[(15\pm 6)\mu\text{mol/L}, P<0.01]$ 。结论 精液 Tf 水平的测定可作为反映足细胞功能,评价曲细精管生精功能及精子质量的指标,对男性不育症的诊断、治疗具有重要的价值。

关键词:精液; 转铁蛋白; 足细胞; 男性不育症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)03-0336-03

Relationship between transferrin levels and function of male fertility and testicular podocyte

Yang Zheng¹, Huang Ping^{2△#}, Peng Daorong³, Zheng Shanluan³, Zhang Xiaoning³, Wang Jing³

(1. Student Brigade; 2. Department of Clinical Laboratory, Qindu Stomatology Hospital; 3. Clinical Laboratory Institute of PLA, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between levels of transferrin(Tf) and function of male fertility and testicular podocyte. **Methods** Semen samples from male patients with infertility and volunteers with normal infertility were collected and tested for sperm density and motility by using sperm quality analyzer. In addition to that, Tf concentrations of Tf were determined; aseptically excised rat testis and by collagenase and hyaluronidase digestion, podocytes were isolated with high purity and cultured in culture medium, then the concentration of Tf in cell culture medium was determined; Tf concentration were determined by rate nephelometry. **Results** Tf concentration in semen of male-infertility patients $[(15\pm 5)\mu\text{mol/L}]$ was significantly lower than that of normal-fertility volunteers $[(24.5\pm 6.5)\mu\text{mol/L}, P<0.01]$, which were positively correlated sperm count and motility($P<0.01$). Tf concentrations of cell culture medium $[(25\pm 8)\mu\text{mol/L}]$ in which testicular podocytes were cultured were significantly higher than that of infertile rat $[(15\pm 6)\mu\text{mol/L}, P<0.01]$. **Conclusion** Determination of semen Tf levels can reflect podocyte function and be used as an indicator for the evaluation of seminiferous tubules spermatogenesis, which was valuable in the diagnosis and treatment of male infertility.

Key words: semen; transferrin; podocyte; male infertility

睾丸足细胞核均匀地分布在小鼠曲细精管中,而足细胞质与细胞膜以玫瑰花型与曲细精管基底部的干细胞相连,对生殖细胞起营养、支持及保护作用,能分泌多种物质参与生殖过程。目前已知大鼠和人睾丸转铁蛋白(Tf)是足细胞合成的主要蛋白,对促卵泡激素及睾酮等调节精子发生的激素调控起重要作用,铁的转运可能是足细胞的一种重要功能且与精子发生的激素调控有关。目前,只有精液中雄激素结合蛋白(ABP)的水平可以作为反映足细胞功能的特异性指标,但测定 ABP 繁琐费时,其在精液中的水平很低。有学者认为 Tf 水平可作为判断睾丸足细胞功能的指标,对了解睾丸曲细精管内的生精细胞有重要价值^[1-2]。为此,笔者对临床 140 例精液样品中的 Tf 水平及精子活力、密度等进行了检测,分析了其与男性生育的关系,并对大鼠睾丸足细胞 Tf 分泌进行了初步研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取于西京医院泌尿外科、中医科门诊就诊的男性不育症患者 110 例作为不育组,纳入者均已婚并同居 2 年以上,性生活正常,排除女方不孕原因,年龄 22~28(24±3)岁;另外选取有生育能力且自愿献精的男性 30 例作为正常生育组,年龄 21~28 岁,平均(24±3)岁。

1.2 试剂与仪器 试剂和耗材主要有 DMEM-Ham'sF12 培养液(美国 Sigma 公司生产),253 U/mg 的 II 型胶原酶,890 U/mg 透明质酸酶,10 cm×10 cm 培养皿和 24 孔培养板(北京知麟堂生物科技发展有限公司产);主要仪器包括 SQA-V 全自动精子质量分析仪(以色列产);贝克曼 Array360 特种蛋白分析仪(美国产)。

1.3 方法

1.3.1 精液采集 所有受试者禁欲 3~5 d,用新洁尔灭消毒手及尿道口,以手淫法获取 1 次全部精液,放入一次性无菌干燥带盖塑料容器内,置 37℃ 恒温水浴箱中,孵育 30 min,待完全液化后,进行精液分析及 Tf 水平测定。

1.3.2 精液分析 取液化的精液,参照 WHO 标准^[3],于 SQA-V 全自动精子质量分析仪检测。然后将不育男性按精子密度不同分为:无精子、 $<2\times 10^{10}/\text{L}$ 、 $(2\sim 4)\times 10^{10}/\text{L}$ 和 $>4\times 10^{10}/\text{L}$ 组共 4 组,各组分别为 20、28、33、29 例;按精子活动率分为:无活动力、 $<20\%$ 、 $20\%\sim 40\%$ 和 $>40\%$ 组,4 组分别为 21、30、30、29 例;生育男性精子密度为 $(5\sim 10)\times 10^{10}/\text{L}$,精子活动率为 60%~90%,同时测定其各组精液 Tf 水平。

1.3.3 各组精液标本 Tf 水平的检测 采用聚乙烯二醇

(PEG)兔抗人 Tf 血清与待测精液结合,使精液中的 Tf 发生特异性抗原抗体反应,形成极细的乳白色抗原抗体复合物颗粒,悬浮于溶液中,利用散射比浊原理,与标准浓度管相比较,求得精液中的 Tf 水平。具体操作步骤:取精液 50 μL,加入 20 mmol/L PBS 450 μL(1:9 稀释),混匀,于美国贝克曼 Array360 特定蛋白分析仪上选用尿液 Tf 测定应用程序,双管平行测定。

1.3.4 足细胞的分离、培养及实验 参照文献[4]取 20 d 日龄,体质量约 40 g 的雄性大鼠 13 只(第四军医大学动物中心提供),作为正常生育组。颈椎脱臼处死,无菌切取睾丸,用培养液冲洗 3 次,剥去白膜,剪碎放入试管中,每只加入 158.37 nkat 胶原酶和 13.17 nkat 的透明质酸酶,37 °C 水浴震荡,消化 15 min,每隔 5 min 用吸管轻轻吹打一次,然后静置 5 min;弃上层细胞悬液,剩下的细胞用培养液洗 3 次,每次 1 500 r/min 离心 10 min。然后每只加入 31.67 nkat 胶原酶和 2.67 nkat 透明质酸酶,37 °C 水浴震荡,消化 40 min,每 5 min 用吸管轻轻吹打一次;200 目滤网过滤,滤液静置 5 min,去除部分漂浮细胞,1 500 r/min 离心 10 min×3 次备用。经 24 h 培养在倒置显微镜下观察细胞完全贴壁,呈多角形或梭形展开,多数细胞连成片,为典型的足细胞,细胞纯度高达 93%以上,与文献[4]基本相同。取足细胞悬液,调细胞浓度为 8×10⁵/mL,加入 24 孔培养板中,置 37 °C 孵箱 48 h 后,测定上清液中的 Tf 水平。再选雄性大鼠 13 只采用腺嘌呤 500 mg/kg 灌胃 15 d 制作大鼠不育动物模型^[5]作为不育组按上述方法分离、培养足细胞,测定细胞上清液中的 Tf 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同精子密度组 Tf 水平的测定 正常生育组精液 Tf 水平与精子密度呈正相关(*r* = 0.91, *P* < 0.01),不育组各组(无精子、<2×10¹⁰/L、(2~4)×10¹⁰/L 和 >4×10¹⁰/L 组)的精子密度与 Tf 呈正相关(*r* 分别为 0.45、0.69、0.73、0.89, *P* < 0.01),不育各精子密度组 Tf 水平随精子密度增加而上升,见表 1。

表 1 精子密度与精液 Tf 水平间的关系($\bar{x} \pm s$)

组别	精子密度	<i>n</i>	精液 Tf(μmol/L)
正常生育组	(5~10)×10 ¹⁰ /L	30	25±6
不育组	无精子	20	10±3*
	<2×10 ¹⁰ /L	28	13±4*
	(2~4)×10 ¹⁰ /L	33	16±6*
	>4×10 ¹⁰ /L	29	19±7*

* : *P* < 0.01, 与正常生育组比较。

2.2 不同精子活动率组 Tf 水平的测定 正常生育组和不育组各亚组(按精子活动率分为:无活动力、<20%、20%~40% 和 >40% 组)精子活动率与精液 Tf 水平呈正相关(*r* 分别为 0.96、0.46、0.67、0.73、0.88, *P* < 0.01),不育组各亚组 Tf 水平随精子活动率增加而上升,见表 2。

2.3 大鼠睾丸足细胞分泌 Tf 的水平与生育的关系 正常生育组大鼠睾丸足细胞细胞悬液中 Tf 的水平[(25±8)μmol/L]明显高于不育组大鼠睾丸足细胞细胞悬液[(15±6)μmol/L],两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

表 2 不同精子活动率与 Tf 水平间的关系($\bar{x} \pm s$)

组别	精子活动率	<i>n</i>	精液 Tf(μmol/L)
正常生育组	60%~90%	30	24±7
不育组	无活动力	21	11±2*
	<20%	30	14±4*
	20%~40%	30	16±5*
	>40%	29	19±6*

* : *P* < 0.01, 与正常生育组比较。

3 讨 论

睾丸足细胞在精子发生过程中发挥着至关重要的作用,是曲精小管中唯一的非生殖细胞,不仅对生殖细胞发育起支持和营养作用,而且通过形成血-睾屏障决定并保持睾丸液的组分,还能传递支配精子发生的激素信号。足细胞能分泌多种对精子发生起重要作用的蛋白质,Tf 就是睾丸足细胞产生和分泌的,Tf 是由 β1 球蛋白与血中细胞生长的基本因子—铁离子结合的一种复合体,是通过足细胞膜上 Tf 受体,以 Tf 的形式将铁储存于足细胞内,足细胞以顶端分泌的形式将铁传递给曲精管生殖上皮上的不同发育时期的生精细胞,以促进生殖细胞的生长发育、成熟及释放过程起关键性的作用^[6-8]。精液中 80% 的 Tf 是由足细胞分泌,Tf 的主要功能为铁的转运载体,睾丸足细胞功能缺陷都会影响 Tf 的分泌导致精子的发生障碍,而影响生育能力,Tf 水平的高低是反应足细胞功能的特定性标志^[4]。当精液中 Tf 水平减少可直接影响精子细胞的形成和释放。Tf 水平和精子总数呈正相关^[9-10]。本研究显示,精液 Tf 水平与精子密度、活动率存在相关性,不育各组精液 Tf 水平随精子密度及活动率减低而下降,与正常生育组比较差异有统计学意义(*P* < 0.01),这说明精液 Tf 对精子的生长、发育、排放发挥着重要的作用。正常生育大鼠足细胞培养上清液 Tf 水平明显高于不育组(*P* < 0.01),这也说明了 Tf 水平测定对男性不育症有重要的诊断价值。

精子的顺利产生必须以足细胞功能正常为前提,而足细胞的功能则通过它所表达或分泌的各类蛋白来执行,蛋白的数量、构象发生改变会影响足细胞的功能。Tf 水平是反映睾丸足细胞功能的指标之一,是评价曲细精管生精状态的一种特异性指标。精子的生成、成熟、运输及附性腺异常导致的精液和精子异常是男性不育症的最常见原因。临床上少精子症与弱精子症导致的男性不育症约占 70%,精子数量、质量的变化是判断男性生育力的重要依据。由于 Tf 水平与精子密度、数量、质量呈正相关,所以检测精液中 Tf 水平对男性不育症的诊断和治疗具有一定的指导意义。

参考文献

[1] Nel-Themaat L, Jang CW, Stewart MD, et al. Sertoli cell behaviors in developing testis cords and postnatal seminiferous tubules of the mouse[J]. Biol Reprod, 2011, 84(2): 342-350.
 [2] 刘民, 罗兰. 睾丸支持细胞功能的研究进展[J]. 实验动物科学, 2012, 29(1): 52-56.
 [3] 杨麦贵, 张竹映, 郑善奎, 等. 一氧化氮与白细胞精子症不育的关系探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 634-636.
 [4] 杨润军, 李青旺, 许尚忠, 等. 小鼠睾丸支持细胞分离培养及生物学特性鉴定[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(9): 17-20.
 [5] 俞铮铮, 冯磊. 腺嘌呤用于制作雄性大鼠不育症模型理想剂量和时效关系的研究[J]. 浙江医学, 2008, 30(12): 1316-1318. (下转第 340 页)

与 PBF 之间的差异可能主要是由种族差异造成^[15]。本研究表明,汉族和维吾尔族 BMI 无明显差异,但是汉族 PBF 均值却大于维吾尔族,BMI 与 PBF 之间存在不平衡性。使用分层分析消除性别对结果的影响,结果提示无论男女均表现为汉族 PBF 高于维吾尔族。另有研究表明,亚洲人在各年龄段均具有低 BMI,高 PBF 的特征,而且在相同 BMI 水平下,亚洲人比白种人患糖尿病、心血管疾病的危险性更高^[16-17]。相关研究指出,新疆汉族男性代谢综合征发病率高于维吾尔族男性^[18]。

对于 BMI 和 PBF 两指标诊断肥胖的一致性,使用 BMI 切点为诊断肥胖的金标准,考虑指标受多种因素影响,故按不同民族、性别分别计算 PBF 诊断肥胖症的灵敏度、特异度及 K 值。分组计算的 K 值提示维吾尔族男性的 PBF 可以成为诊断肥胖症的指标。PBF 用于肥胖诊断,两个民族人群中均有良好的灵敏度。其实 PBF 作为直接测量出的一项客观指标,其准确度较 BMI 更高,结果中 PBF 诊断肥胖的低特异度,可以理解为受到 BMI 指标本身的影响。PBF 诊断汉族女性的特异度最低,假阳性率最高,即 PBF 检测提示肥胖的,大多数经 BMI 检测属于正常范围。国内多以 WHO 推荐指标 BMI ≥ 28.0 kg/m² 为诊断肥胖的金标准,但国外一项荟萃分析是以 PBF 男性大于或等于 25%,女性大于或等于 30% 为诊断肥胖的金标准,BMI 在肥胖症的诊断中体现出高特异度及低灵敏度,提出 BMI 指标漏诊了近一半由 PBF 诊断肥胖的人群^[4,7,9],国外类似研究较多,其得出的结果基本一致。因此,对于肥胖症的诊断,通过联合 BMI 和 PBF 综合评估可能更全面。

除了年龄、性别、种族对 BMI 产生影响,民族对 BMI 也有一定的影响。如条件允许,BMI 联合 PBF 诊断肥胖将会更加准确。除此之外,本研究也存在一定不足,研究中维吾尔族与汉族人数比例不足 1 : 3,主要由于乌鲁木齐市维吾尔族较汉族少,本市市民中维吾尔族和汉族的比例约为 1 : 6,如条件允许可招募南疆各地维吾尔族体检者进一步进行研究。此外,由于地方医院仪器条件的限制,PBF 不能广泛用于所有地区肥胖症的初筛,在临床研究中也如 BMI 经济方便。由此可见,PBF 的应用还需建立在更多临床数据的支持及相应医疗设备配置的基础之上。

参考文献

[1] 王增武,郝光,王馨,等.我国中年人群超重/肥胖现状及心血管病危险因素聚集分析[J].中华流行病学杂志,2014,35(4):354-358.
 [2] Flegal KM, Kit BK, Orpana H, et al. Association of All-Cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories a systematic review and meta-analysis[J]. J Am Med Assoc, 2013, 309(1): 71-82.
 [3] 赵辉,刘颖,冷松,等.健康体检者体质指数及体脂肪含量与代谢

综合征各组分的关系[J].中华健康管理学杂志,2010,4(5):294-295.

[4] Habib SS. Body mass index and body fat percentage in assessment of obesity prevalence in saudi adults[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(2): 94-99.
 [5] 陈春明,孔灵芝,中华人民共和国卫生部疾病控制司.中国成人超重和肥胖症预防控制指南[M].北京:人民卫生出版社,2006:21-22.
 [6] 陶晔璇,蔡威,汤庆娅,等.不同方法评估人群营养状况作用比较[J].中国临床营养杂志,2003,11(1):24-27.
 [7] Okorodudu DO, Jumean MF, Montori VM, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Obes (Lond), 2010, 34(5): 791-799.
 [8] 张荣欣,薛长勇,郑子新,等.成人 BMI 与体脂含量和脂肪分布的关系[J].营养学报,2002,24(2):144-148.
 [9] Carpenter CL, Yan E, Chen S, et al. Body Fat and Body-Mass Index among a Multiethnic Sample of College-Age Men and Women [J]. J Obes, 2013, 2013(1): 790654.
 [10] Liu PJ, Ma F, Lou HP, et al. The utility of fat mass index vs. body mass index and percentage of body fat in the screening of metabolic syndrome[J]. BMC Public Health, 2013, 13(1): 629.
 [11] Anjos LA, Teixeira Fda C, Wahrlich V, et al. Body fat percentage and body mass index in a probability sample of an adult urban population in Brazil[J]. Cad Saude Publica, 2013, 29(1): 73-81.
 [12] 李香兰,赵广才,张晓文.广州市 20~59 岁非体力劳动者体重指数与体脂百分比的相关性分析研究[J].医学研究杂志,2011,40(2):73-76.
 [13] 晁爱军,朱珊,胡玮,等.不同性别体重指数与身体成份构成及脂肪分布的关系[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2009,2(1): 24-27.
 [14] 沈阳,詹晓晴.淮南市市区成人脂肪百分比与 BMI 关系初探[J].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(18):5350-5354.
 [15] Flegal KM, Shepherd JA, Looker AC, et al. Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(2): 500-508.
 [16] Navder KP, He Q, Zhang XJ, et al. Relationship between body mass index and adiposity in prepubertal children: ethnic and geographic comparisons between New York City and Jinan City (China)[J]. J Appl Physiol, 2009, 107(2): 488-493.
 [17] 钟菁,朱世伟,李映明,等.体质量指数与体脂含量诊断肥胖的对比分析[J].中国误诊学杂志,2006,6(12):2253-2254.
 [18] 杨天,马依彤,杨毅宁,等.新疆地区汉族、维吾尔族成年人代谢综合征流行病学调查[J].新疆医科大学学报,2011,34(2):129-132.

(收稿日期:2014-11-15)

(上接第 337 页)

[6] 闫玉华,张永良.人精浆中蛋白质检测进展[J].中国优生与遗传杂志,2003,11(3):13-14.
 [7] Barthelemy C, Khalfoun B, Guillaumin JM, et al. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men[J]. J Reprod Fertil, 1998, 82(1): 113-118.
 [8] Rato L, Socorro S, Cavaco JE, et al. Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells[J]. J Membr Biol, 2010, 236(2): 215-224.

[9] Orlando C, Caldini AL, Barni T, et al. Ceruloplasmin and transferrin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubular function[J]. Fertil Steril, 1995, 43(2): 290-294.
 [10] Liu DY, Cooper EJ, Baker HW. Seminal transferrin, an index of Sertoli cell function: is it of clinical value[J]. Clin Reprod Fertil, 1986, 4(3): 191-197.

(收稿日期:2013-11-18)