

• 论 著 •

m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 与弱精症的相关性研究*

夏 维¹, 胡 玲², 刘 东³, 刘 琴⁴, 胡红兵^{4△}
华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院/武汉市妇幼保健院
1. 血液肿瘤科; 2. 急诊科; 3. 手术室; 4. 输血科, 湖北武汉 430015

摘 要:目的 探究 N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)去甲基化酶 ALKBH5 与弱精症的相关性。方法 收集精液标本 30 份, 包括弱精症患者与健康者精液标本各 15 份, 密度梯度离心纯化精子, 使用液相色谱与质谱联用(LC-MS/MS)检测精子 RNA 的 m⁶A 水平, 使用实时荧光定量 PCR 法检测 ALKBH5 相对表达水平。结果 弱精症患者 m⁶A 水平明显高于健康者, ALKBH5 相对表达水平低于健康者, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。精子活动度参数相关性分析结果显示, ALKBH5 相对表达水平与前向运动精子数和非前向运动精子数呈正相关($r=0.512, 0.377, P<0.05$), 与不动精子数呈负相关($r=-0.497, P<0.05$); m⁶A 与前向运动精子数和非前向运动精子数呈负相关($r=-0.442, -0.425, P<0.05$), 与不动精子数呈正相关($r=0.528, P<0.05$)。结论 在弱精症患者中, m⁶A 及其去甲基化酶 ALKBH5 与精子活动度具有相关性。

关键词:ALKBH5; N⁶-甲基腺嘌呤; 弱精症; 精子活动度
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.06.014 **中图法分类号:**R446.19
文章编号:1673-4130(2021)06-0700-04 **文献标志码:**A

Correlation between ALKBH5 and asthenozoospermia*

XIA Wei¹, HU Ling², LIU Dong³, LIU Qin⁴, HU Hongbin^{4△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Emergency; 3. Operating Room; 4. Department of Blood Transfusion, Wuhan Children's Hospital/Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei 430015, China
Abstract: **Objective** To investigate the correlation between N⁶-methyladenosine (m⁶A) demethylase ALKBH5, and asthenozoospermia. **Methods** Semen samples from 15 asthenozoospermia patients and 15 healthy controls were collected. The sperm was purified by density gradient centrifugation. m⁶A contents in sperm RNA was detected by Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (LC-MS/MS), and mRNA expression of ALKBH5 was determined by qPCR. **Results** m⁶A level in asthenozoospermia patients was significantly higher than that of healthy controls, and the mRNA level of ALKBH5 was significantly higher than that of healthy controls, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). ALKBH5 was positively correlated with progressive motility and non-progressive motility ($r=0.512, 0.377, P<0.05$), and was negatively correlated with immotility ($r=-0.497, P<0.05$). m⁶A was negatively correlated with progressive motility and non-progressive motility ($r=-0.422, -0.425, P<0.05$) and was positively correlated with immotility ($r=0.528, P<0.05$). **Conclusion** The results suggest that m⁶A and demethylase ALKBH5 are correlate with sperm motility.

Key words:ALKBH5; N⁶-methyladenosine; asthenozoospermia; sperm motility

不孕不育影响着全世界大约 15% 的育龄期夫妇, 超过 50% 的不孕病例是由男性不育造成。男性不育与诸多因素有关, 如遗传因素、环境因素、生殖道感染、精索静脉曲张等^[1-2]。精子活力降低, 也被称为弱精症, 是一种常见的导致不孕的原因, 约占男性不育症病例的 18%^[3]。目前, 临床实验室的精液检测报告

仍以精子数量、形态、动力学内容为主, 远远不能满足临床诊断和治疗的需求, 更不可能为预防不孕不育提供指导。

RNA 修饰是生物体内普遍存在的一种现象, 极大地影响着 RNA 的生理功能。N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)是 mRNA 上最为常见的修饰^[4]。与 DNA 中胞嘧啶甲基

* 基金项目: 武汉市临床医学科研项目(WX15C22)。
作者简介: 夏维, 男, 主任技师, 主要从事医学检验方向的研究。 △ 通信作者, E-mail: 18971319110@163.com。
本文引用格式: 夏维, 胡玲, 刘东, 等. m⁶A 去甲基化酶 ALKBH5 与弱精症的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(6): 700-703.

化(5mC)的去甲基化类似,两种 m⁶A 的去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 相继被发现,表明 m⁶A 修饰是动态的,且在调控基因表达中起重要作用^[5-6]。在对 ALKBH5 催化 m⁶A 去甲基化的研究中,ZHENG 等^[7]发现 ALKBH5 的去甲基化作用与小鼠的生殖能力相关。由此,本研究通过检测弱精症患者 m⁶A 水平和 ALKBH5 的相对表达水平,探究 m⁶A 和 ALKBH5 对男性不育的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集武汉儿童医院 15 例弱精症患者(弱精症组)和 15 例健康者(对照组)的 30 份精液标本,所有标本均为禁欲 2~7 d,手淫方式获得。新鲜精液标本在 37℃ 液化 30 min 后进一步处理。分组标准:前向运动精子数(PR)+非前向运动精子数(NP)<40% 为弱精症组,PR+NP≥40% 或者 PR≥32% 为对照组。弱精症组年龄(32.67±4.59)岁,对照组年龄(32.33±6.00)岁,两组年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。笔者利用以往临床诊疗中获得的病历或生物标本进行实验室研究,经武汉儿童医院伦理委员会批准,并免除受试者知情同意。

1.2 仪器与试剂 Percoll 分离液(美国 Pharmacia 公司),逆转录试剂盒(FSQ-301,日本 TOYOBO 公司),TRIzol(美国 Invitrogen),2×iTaQ SYBR GREEN Supermixes(美国 Bio-Rad 公司),标准品(rA,rU,rC,rG,dA,T,dC,dG,中国西格玛奥尔德里奇公司),标准品(m⁶A,中国汉虹化工公司),S1 核酸酶(中国宝生生物公司),碱性磷酸酶(中国宝生生物公司)、磷酸二酯酶(中国西格玛奥尔德里奇公司),氯仿(国药集团化学试剂有限公司),无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);NanoDrop(ND2000)超微量分光光度计(美国 Thermo 公司),实时荧光定量 PCR 仪(qPCR 美国 Bio-Rad 公司),低温离心机(美国 Beckman 公司),LC-20AD 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),AB 3200 QTRAP 质谱仪(美国 Life Technology 公司),Hisep C18-T 色谱柱(150.0 mm×2.1 mm×5.0 μm,中国韦泰公司)。

1.3 精子的纯化 参照第五版世界卫生组织(WHO)人类精液处理与实验室手册^[8],采用密度梯度法纯化精子。取 2 mL 精液加入 6 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS),颠倒混匀数次后 4℃ 300×g 离心 15 min,弃上清液,1 mL PBS 重悬精子沉淀,缓慢加入密度梯度液[下层为 1 mL 80%(v/v)Percoll 分离液、上层为 1 mL 40%(v/v)Percoll 分离液]上方,避免打破密度梯度液的分层界面,4℃ 400×g 离心 20 min,弃上清液,2 mL PBS 重悬沉淀,取 1 滴精子重悬液滴于载玻片上,显微镜 400 倍视野下观察,比较纯化前后精子中的上皮细胞的数量,确认精子的纯度。

1.4 RNA 提取 将 2 mL 精子重悬液,400×g 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL TRIzol,0.2 mL 氯仿,大

力摇管 15 s,室温孵育 2~3 min,4℃,12 000×g 离心 15 min。将上层水相转移到一个新管,1:1 加入异丙醇,室温孵育 2~3 min,4℃,12 000×g 离心 10 min。弃上清液,加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀,涡旋混合。4℃,7 500×g 离心 5 min。40 μL RNase-Free ddH₂O 溶解沉淀,用 NanoDrop 检测 RNA 的浓度与纯度。

1.5 LC-MS/MS 检测 m⁶A 水平 利用核酸酶 S1、碱性磷酸酶、磷酸二酯酶酶解精子 RNA。液相色谱与质谱联用系统,检测方式为多反应监测(MRM)模式,监测离子对(母离子→子离子)分别为:m⁶A(282.2→150.1)、rA(268.4→136.2)、rU(245.4→113.1)、rC(244.4→112.2)、rG(284.5→152.2)、dA(252.4→136.2)、T(243.3→127.2)、dC(228.4→112.2)、dG(268.4→152.4)。

1.6 qPCR 法检测 ALKBH5 相对表达水平 反转录试剂盒将精子 RNA 反转录为 cDNA,qPCR 仪检测 ALKBH5 的相对表达水平,利用内参基因 β-ACTIN 和 GAPDH 标化,引物如下(5'→3'):ALKBH5 上游引物 5'-AGGGGAAGCGTGACTGTGC-3',下游引物 5'-GGGTGCATCTAATCTTGTCTTCC-3';GAPDH 上游引物 5'-TCTATAAATTGAGCCCGCAGC-3',下游引物 5'-CCAATACGACCAAATCCGTTG-3';β-ACTIN 上游引物 5'-CCAGCTCCTCCCTGGAGAAG-3',下游引物 5'-ACAGGACTCCATGCCAGG-3'。

1.7 统计学处理 所有数据采用 SPSS19.0 进行分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的计量数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用 Student's *t* 检验或非参数检验分析各组间差异,Pearson 相关分析检验两组之间的相关性, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组精液常规参数比较 弱精症组的精子浓度、PR、NP 和正常形态精子数均明显低于对照组,不动精子数(IM)和精子畸形指数(SDI)明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组间精子 pH 值和畸形精子指数(TZI)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 两组精液常规参数比较

指标	弱精症组 (n=15)	对照组 (n=15)	P
pH 值($\bar{x} \pm s$)	7.09±0.17	7.11±0.15	0.821
精子浓度 [$M(P_{25}, P_{75})$, 10 ⁶ /mL]	33.90(23.00,59.25)	83.10(64.75,134.75)	0.002
PR [$M(P_{25}, P_{75})$, %]	6.40(4.25,12.75)	29.70(22.55,37.50)	<0.001
NP($\bar{x} \pm s$, %)	18.61±8.17	45.13±13.39	<0.001
IM [$M(P_{25}, P_{75})$, %]	70.20(63.85,81.45)	20.70(17.8,32.95)	<0.001

续表 1 两组精液常规参数比较

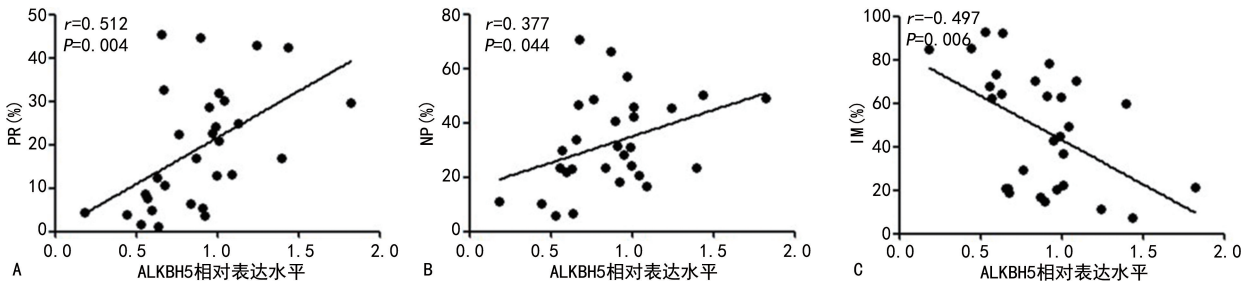
指标	弱精症组 (n=15)	对照组 (n=15)	P
正常形态精子数[M(P ₂₅ , P ₇₅), %]	3.45(2.25, 7.13)	7.80(4.98, 9.73)	0.024
TZI($\bar{x} \pm s$, %)	1.13 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.07	0.221
SDI($\bar{x} \pm s$, %)	1.08 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.09	0.012

2.2 两组 m⁶A 水平比较 弱精症组精子 m⁶A 水平为 0.21 $\pm$ 0.02, 明显高于对照组的(0.14 $\pm$ 0.01), 差异有统计学意义(P=0.005)。

2.3 两组 ALKBH5 相对表达水平比较 弱精症组

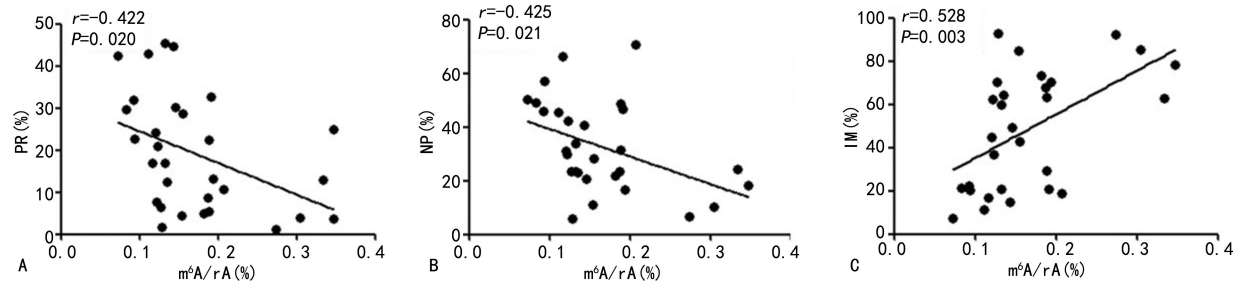
精子 ALKBH5 的相对表达水平为 0.76 $\pm$ 0.08, 低于对照组的(1.00 $\pm$ 0.08), 差异有统计学意义(P=0.047)。

2.4 ALKBH5、m⁶A 与精子活动度相关性分析 ALKBH5 与 PR 和 NP 呈正相关(r=0.512、0.377, P<0.05), 与 IM 呈负相关性(r=-0.497, P<0.05), 与 pH 值、精子浓度、正常形态精子数、TZI、SDI 无相关性(P>0.05)。见图 1。此外, m⁶A 与 RP 和 NP 呈负相关(r=-0.422、-0.425, P<0.05), 与 IM 呈正相关(r=0.528, P<0.05), 与 pH 值、精子浓度、正常形态精子数、TZI、SDI 无相关性(P>0.05)。见图 2。



注: A 为 ALKBH5 与 PR 的相关性散点图; B 为 ALKBH5 与 NP 的相关性散点图; C 为 ALKBH5 与 IM 的相关性散点图。

图 1 ALKBH5 与精子活动度相关性分析



注: A 为 m⁶A 与 PR 的相关性散点图; B 为 m⁶A 与 NP 的相关性散点图; C 为 m⁶A 与 IM 的相关性散点图。

图 2 m⁶A 与精子活动度相关性分析

3 讨 论

弱精症是男性不育的重要表征之一, 精子活动度降低是弱精症的主要临床表现^[9]。本研究通过检测弱精症患者 m⁶A 水平和去甲基化酶 ALKBH5 的相对表达水平, 发现弱精症患者较健康者 ALKBH5 相对表达水平降低, m⁶A 水平升高。ALKBH5 是已知的 m⁶A 去甲基化酶^[10], 因此, 笔者认为弱精症患者 m⁶A 水平升高的原因可能是由去甲基化酶 ALKBH5 相对表达水平降低引起的。

m⁶A 与生殖的相关研究可以追溯至 1997 年, BOKAR 等^[11]首次证实, m⁶A 甲基转移酶 METTL3 (MT-A70) 的 mRNA 表达在睾丸中最高。此后又有研究证实, m⁶A 甲基转移酶在配子的生成、胚胎的形成和干细胞的自我更新过程中均发挥重要作用^[12]。METTL3 与配子生成和发育相关, 在酵母^[13]、果蝇^[14]、植物^[15]中敲除 METTL3 的同系物, 会出现配子生成障碍。此外, ALKBH5 的去甲基化作用与小

鼠的生殖能力相关。小鼠所有器官中, 精巢中的 Alkbh5 基因的表达最高, 并且 Alkbh5 基因的缺失会导致小鼠精巢萎缩, 精子数目减少, 形态异常, 运动性降低^[7]。这些结果表明 ALKBH5 可能通过使 mRNA 中 m⁶A 去甲基化调控精子的生成和功能。本研究结果显示, ALKBH5 的相对表达水平与精子活动度指标(RP、NP、IM)具有相关性, 且 m⁶A 也与这些指标相关, 进一步证实 ALKBH5 可能通过使 m⁶A 去甲基化与精子活动功能具有相关性。成熟的精子核中含有多种 RNA^[16], 其中精子 mRNA 的表达与精子活动度及男性生殖密切相关。由此笔者猜想精子 RNA 的 m⁶A 水平改变可能会影响与精子活动度相关基因的 mRNA 稳定表达, 但到底是哪些基因受到影响仍有待于进一步研究。

综上所述, 在弱精症患者中, m⁶A 及其去甲基化酶 ALKBH5 与弱精症具有相关性, 检测男性不育患者精液的 ALKBH5 相对表达水平, 对临床诊断治疗

可能具有一定的指导意义。

参考文献

[1] URDINGUIO R G, BAYON G F, DMITRIJEVA M, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility[J]. Hum Reprod, 2015, 30(5):1014-1028.

[2] FAMUREWA A C, UGWUJA E I. Association of blood and seminal plasma cadmium and lead levels with semen quality in non-occupationally exposed infertile men in Abakaliki, South East Nigeria [J]. J Family Reprod Health, 2017, 11(2):97-103.

[3] DIAO R, FOK K L, CHEN H, et al. Deficient human beta-defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(249):108-121.

[4] ZHOU J, WAN J, SHU X, et al. N(6)-methyladenosine guides mrna alternative translation during integrated stress response[J]. Mol Cell, 2018, 69(4):636-647.

[5] FU Y, HE C. Nucleic acid modifications with epigenetic significance [J]. Curr Opin Chem Biol, 2012, 16(5/6):516-524.

[6] ZHAO B S, ROUNDTREE I A, HE C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(1):31-42.

[7] ZHENG G, DAHL J A, NIU Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility[J]. Mol Cell, 2013, 49(1):18-29.

[8] World Health Organization. Who laboratory manual for the examination and processing of human semen[M].

5th. Geneva; World Health Organization, 2010;161-168.

[9] INHORN M C, PATRIZIO P. Infertility around the globe; New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century[J]. Human Reprod Update, 2015, 21(4):411-426.

[10] FRY N J, LAW B A, ILKAYEVA O R, et al. N(6)-methyladenosine is required for the hypoxic stabilization of specific mRNAs[J]. RNA, 2017, 23(9):1444-1455.

[11] BOKAR J A, SHAMBAUGH M E, POLAYES D, et al. Purification and cDNA cloning of the adomet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase[J]. RNA, 1997, 3(11):1233-1247.

[12] WANG Y, LI Y, TOTH J I, et al. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(2):191-198.

[13] AGARWALA S D, BLITZBLAU H G, HOCHWAGEN A, et al. RNA methylation by the mis complex regulates a cell fate decision in yeast[J]. PLoS Genet, 2012, 8(6):e1002732.

[14] HONGAY C F, ORR-WEAVER T L. Drosophila inducer of MEiosis 4 (IME4) is required for Notch signaling during oogenesis[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2011, 108(36):14855-14860.

[15] BODI Z, ZHONG S, MEHRA S, et al. Adenosine methylation in arabidopsis mrna is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects[J]. Front Plant Sci, 2012, 3(3):48-51.

[16] HAMATANI T. Human spermatozoal RNAs[J]. Fertil Steril, 2012, 97(2):275-281.

(收稿日期:2020-06-12 修回日期:2020-11-19)

(上接第 699 页)

病杂志编辑委员会,中国心肌病诊断与治疗建议工作组. 心肌病诊断与治疗建议[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(1):5-16.

[6] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2014, 42(24):3-10.

[7] 万征,李洪仕. 2013 版 ACCF/AHA 心力衰竭指南的亮点 [J/CD]. 中华心脏与心律电子杂志, 2014, 2(1):14-20.

[8] 陈竹雨,陈远崇,甄刚,等. 扩张性心肌病患者血清脑钠肽、尿酸及降钙素原水平变化研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(6):681-683.

[9] BONNET D, BERGER F, JOKINEN E, et al. Ivabradine in Children with dilated cardiomyopathy and symptomatic chronic heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(10):1262-1272.

[10] 刘祥红,师志云,刘会玲,等. 不同类型冠心病患者血清同型半胱氨酸水平变化研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(8):920-924.

[11] 朱英杰,李亚蕊. 同型半胱氨酸血症在儿科疾病发生发展中的意义[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(3):234-237.

[12] 李丽琪,张丽中,冯玫,等. 原发性高血压患者血清同型半胱氨酸与左心室几何构型的相关性分析[J]. 中华全科医师杂志, 2018, 17(3):207-209.

[13] 李雷花,孙俊红. 血清 HCY、CysC、NT-proBNP、D-dimer 联合检测在慢性心力衰竭诊断及预后评估中的价值[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(3):427-430.

[14] 余江水,黄子扬. 血浆同型半胱氨酸水平与扩张型心肌病患者慢性心力衰竭的相关性[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(3):278-282.

[15] 张璇,丰宏林. β_2 -微球蛋白与脑血管疾病的相关性研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2018, 18(2):145-148.

[16] 苏军,隋桂琴,李浩,等. 维持性血液透析患者血清 β_2 微球蛋白与左心室结构和功能的关系[J]. 临床肾脏病杂志, 2017, 17(10):610-613.

[17] 杨庆业,王娇,陈宝珍. B 型利钠肽联合胱抑素 C、 β_2 微球蛋白对慢性心力衰竭的诊断价值[J]. 中国医师杂志, 2017, 19(3):442-444.

[18] 鲁广见,王传合,孙志军. 血清 β_2 微球蛋白水平对扩张型心肌病患者预后影响的临床研究[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(8):787-791.

(收稿日期:2020-06-13 修回日期:2020-10-26)