

精浆人附睾分泌蛋白 4 在精索静脉曲张的表达 及其与精子质量的相关性研究^{*}

覃天资¹ 黄敏玉¹ 黄群¹

[摘要] 目的:探讨精浆人附睾分泌蛋白 4(HE4)在精索静脉曲张(VC)的表达及其与精子质量的相关性。方法选取 2018 年 1 月~2019 年 6 月在我院住院的 68 例 VC 男性患者作为观察组,另取 25 例健康男性为对照组。分别留取精液进行精液质量分析,检测精子密度、精子总活力、前向运动精子水平,同时应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测两组精浆中 HE4 水平。研究精浆 HE4 在 VC 的表达及其与精液质量的相关性。将 68 例 VC 患者根据精子密度、精子活力及精子形态分为正常精子组、畸形精子组、无精子组、少精子组、弱精子组、少弱畸形精子组,比较各组中精浆 HE4 表达的差异。结果 VC 患者精子密度、精子总活力、前向运动精子水平均低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);VC 患者精浆中 HE4 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);精浆 HE4 水平与精子密度、精子总活力、前向运动精子水平呈负相关,差异有统计学意义($P<0.01$)。正常精子组、畸形精子组、无精子组、少精子组、弱精子组、少弱畸形精子组中精浆 HE4 表达差异有统计学意义($P<0.01$),两两比较畸形精子组和少弱畸形精子组精浆 HE4 表达明显高于正常精子组,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 VC 患者精液质量低于正常男性,与其精浆中 HE4 的高表达有关,并且 VC 患者畸形精子数偏高时,精浆中 HE4 高表达。检测精浆 HE4 水平能反映 VC 患者精液质量水平,精浆 HE4 的高表达能否反映 VC 的致畸作用值得深入研究,这有助于进一步明确 VC 导致不育的机制,为临床诊疗及疗效评估提供帮助。

[关键词] 人附睾分泌蛋白 4;精索静脉曲张;精液质量

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.12.012

[中图分类号] R698 **[文献标志码]** A

Expression of seminal plasma HE4 in varicocele and its correlation with sperm quality

QIN Tianzi HUANG Minyu HUANG Qun

(Department of Urology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, 533000, China)

Corresponding author: HUANG Minyu, E-mail: 21161019@qq.com

Abstract Objective: To investigate the expression of seminal plasma human epididymal secretory protein 4 (HE4) in varicocele (VC) and its correlation with sperm quality. **Method:** From January 2018 to June 2019, 68 male patients with VC hospitalized in our hospital were selected as observation group and 25 healthy men as control group. Semen quality was analyzed, sperm density, total sperm motility and forward motile sperm level were measured, and HE4 levels in seminal plasma of the two groups were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa). The expression of seminal plasma HE4 in VC and its correlation with semen quality were studied. These 68 VC patients were divided into normozoospermia group, asthenoteratozoospermia group, azoospermia group, oligozoospermia group, asthenozoospermia group and oligoasthenoteratozoospermia group according to sperm density, sperm motility and sperm morphology, and the difference of seminal plasma HE4 expression among groups was compared. **Result:** The sperm density, total sperm motility and forward motile sperm level in patients with VC were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$), and the level of HE4 in seminal plasma of patients with VC was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$), and the level of HE4 in seminal plasma was negatively correlated with sperm density, total sperm motility and forward motile sperm level ($P<0.01$). Difference in the expression of seminal plasma HE4 in normozoospermia group, asthenoteratozoospermia group, azoospermia group, oligozoospermia group, asthenozoospermia group and oligoasthenoteratozoospermia group was statistically significant ($P<0.01$). Expression of seminal plasma HE4 in asthenoteratozoospermia group and oligoteratozoospermia group was significantly higher than that in normozoospermia group ($P<0.01$). **Conclusion:** The semen quality of VC patients is lower than that of normal men, which is related to the high expression of HE4 in seminal plasma. When the number of abnormal sperm in VC patients is on the

^{*}基金项目:2018 年度广西医药卫生自筹经费科研课题(No:Z20180215)

¹右江民族医学院附属医院泌尿外科(广西百色,533000)

通信作者:黄敏玉, E-mail: 21161019@qq.com

high level, HE4 is high expression in seminal plasma. The detection of seminal plasma HE4 level can reflect the semen quality level of VC patients. However, whether the high expression of seminal plasma HE4 can respond to the teratogenic effect of VC deserves further study to further clarify the mechanism leading to infertility, and to provide help for clinical diagnosis and treatment and evaluation of curative effect.

Key words human epididymis secretory protein; varicocele; semen quality

精索静脉曲张(varicocele, VC)是一种好发于育龄期男性的疾病,与男性不育密切相关,全世界范围内约有 11.7%~15% 的发病率,在精液异常的男性中约有 25.4% 患有 VC^[1]。近年来不育症的病因研究中,VC 是研究的重点,虽然目前外科手术在治疗 VC 导致的不育症取得了一定的疗效,但 VC 导致不育的机制尚未完全明确,研究发现可能与炎症、氧化应激、凋亡、自身免疫、内环境变化、肾上腺代谢产物回流、相关分子表达异常等密切相关^[2]。人附睾上皮分泌蛋白 4(human epididymis protein 4, HE4)是一种糖蛋白,最初于人附睾上皮远端细胞中被发现,有研究发现其在附睾中的表达影响着精子的运动及成熟^[3]。本研究收集 VC 患者及正常男性的精液标本,测定精子质量及精浆中 HE4 水平,探讨 HE4 在 VC 患者精浆中的表达及其与精子质量的相关性,旨在为 VC 相关性不育症的诊疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

病例组收集 2018 年 1 月~2019 年 6 月在我院就诊的 VC 患者 68 例,年龄 18~46 岁,平均(27.90±5.61)岁,经彩色多普勒超声检查确诊为原发性精索静脉曲张。按照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版将 68 例 VC 患者进行分组,正常精液组:精子总数 $\geq 40 \times 10^6$ /每份精液或精子密度 $\geq 20 \times 10^6$ /mL,前向运动精子 $\geq 32\%$,精子形态学检测正常精子数 $\geq 4\%$;无精子组:精液中无精子;畸形精子组:正常精子数 $< 4\%$;弱精子组:前向运动精子 $< 32\%$;少精子组:精子总数 $< 40 \times 10^6$ /每份精液或精子密度 $< 20 \times 10^6$ /mL;少弱畸精子组:精子总数 $< 40 \times 10^6$ /每份精液或精子密度 $< 20 \times 10^6$ /mL,前向运动精子 $< 32\%$,正常精子数 $< 4\%$ 。无生殖系外伤、生殖系畸形、家族遗传性疾病、性功能障碍病史,排除泌尿生殖系

感染、长期接触有害物质及抽烟、酗酒等不良嗜好。正常对照组 25 例,均为来院体检的健康男性,年龄 15~39 岁,平均(28.16±6.24)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 严格按照《世界卫生组织人类精液检查和处理实验室手册》第 5 版标准进行。经 2~7d 禁欲时间后,患者手淫留取精液标本于广口杯中,置 37℃ 恒温液化后取 20 μ L 进行精液常规分析。另取部分精液高速离心,分离后将精浆保存于一 70℃ 备用。

1.2.2 精液常规分析 采用 SHA 精子密度/活动力自动分析系统检测精子密度、精子总活力、前向运动精子。

1.2.3 精浆 HE4 测定 采用 ELISA 法检测精浆中 HE4 水平,仪器为 AT-6000 酶标仪,HE4 试剂盒为武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司生产。

1.3 统计学方法

采用 IBM SPSS 22.0 软件,资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,VC 组与对照组比较采用独立样本的 t 检验。HE4 与精液分析各参数的相关性采用 Pearson 直线相关分析。HE4 在多样本中比较采用单因素 ANOVA 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VC 组与对照组精液分析结果、精浆 HE4 比较

两组精液分析结果比较,VC 患者精子密度、精子总活力、前向运动精子水平均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),而液化时间、精液量在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。VC 组及对照组精浆中 HE4 表达分别为 781.09 ± 160.02 、 580.31 ± 147.26 ,VC 组精浆 HE4 表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。而 VC 组及对照组间精液液化时间及精液量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 VC 组与对照组精液分析结果、精浆 HE4 表达比较

组别	精子密度/ ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	精子总 活力/%	前向运动 精子/%	液化时间 /min	精液量 /mL	HE4 / ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
VC 组($n=68$)	20.42 ± 13.94	38.78 ± 21.58	21.10 ± 14.09	20.92 ± 5.21	2.95 ± 0.82	781.09 ± 160.02
对照组($n=25$)	52.63 ± 18.87	73.28 ± 18.46	44.12 ± 12.97	19.24 ± 5.99	2.88 ± 1.01	580.31 ± 147.26
t	-8.944	-7.092	-7.132	1.320	0.381	5.476
P	0.000	0.000	0.000	0.190	0.704	0.000

2.2 精浆 HE4 水平与精液质量相关性

精浆中 HE4 水平与精子密度、精子总活力、前向运动精子水平呈负相关($r = -0.850$ 、 $r = -0.896$ 、 $r = -0.874$, $P < 0.01$);精浆中 HE4 水平与液化时间、精液量无相关性($r = -0.157$ 、 $r = 0.085$, $P > 0.05$)。见表 2、图 1。

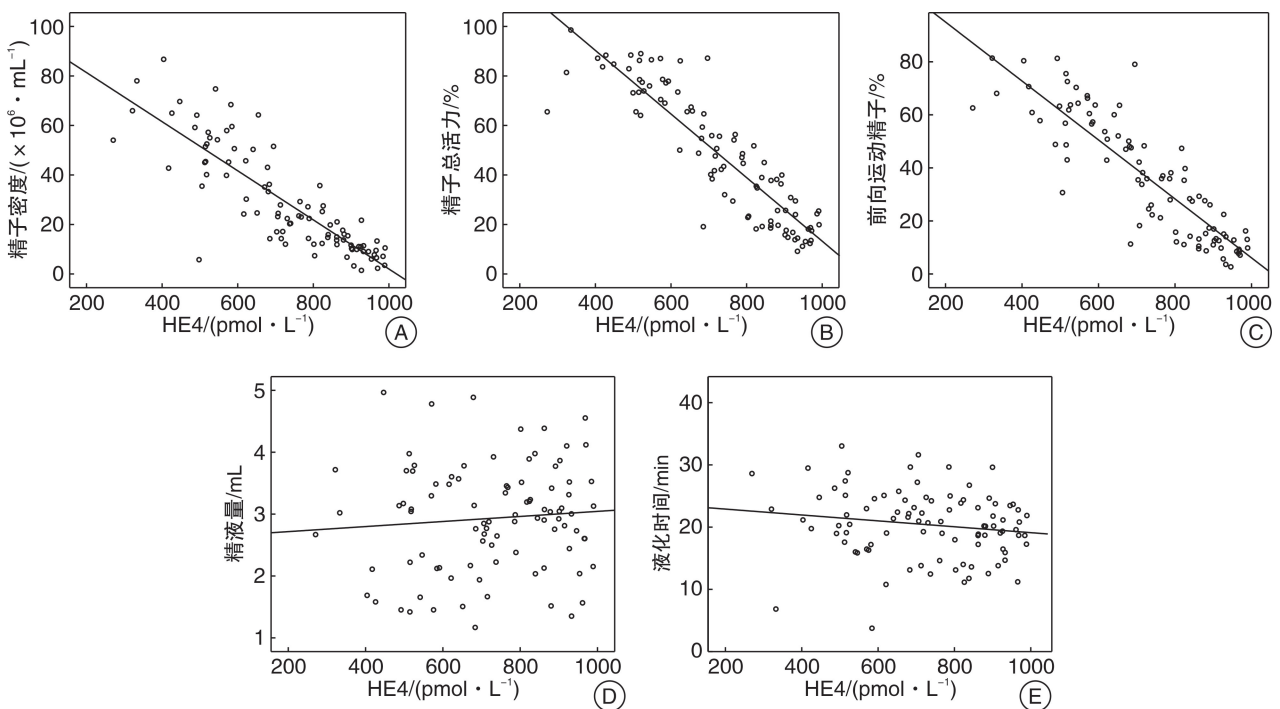
2.3 VC 中各精子组精浆 HE4 比较

68 例 VC 患者中,正常精子组 22 例,畸形精子组 8 例,无精子组 6 例,少精子组 8 例,弱精子组 11 例,少弱畸精子组 13 例。精浆 HE4 在各组中的表达差异有统计学意义($P < 0.01$),两两比较畸形精

子组、少弱畸精子组(954.19 ± 71.82 、 937.07 ± 102.85)明显高于正常精子组(674.68 ± 174.76),差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 HE4 与精子质量相关性

项目	r	P
精子密度	-0.850	0.000
精子总活力	-0.896	0.000
前向运动精子	-0.874	0.000
液化时间	-0.157	0.132
精液量	0.085	0.419



A:精浆 HE4 与精子密度相关性;B:精浆 HE4 与精子总活力相关性;C:精浆 HE4 与前向运动精子相关性;D:精浆 HE4 与精液量相关性;E:精浆 HE4 与液化时间相关性。

图 1 精浆 HE4 水平与精液质量相关性

表 3 VC 中各精子组精浆 HE4 比较

组别	例数	HE4/($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	F	P
正常精子组	22	674.68 ± 174.76		
畸形精子组	8	$954.19 \pm 71.82^{1)}$		
无精子组	6	846.33 ± 110.44	8.052	0.000
少精子组	8	773.92 ± 158.41		
弱精子组	11	778.4 ± 136.05		
少弱畸精子组	13	$937.07 \pm 102.85^{1)}$		

与正常精子组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

VC 是指睾丸乳头状静脉曲张的病理性扩张,以左侧多见,可导致阴囊坠痛、性腺功能减退、同侧睾丸生长发育不良甚至男性不育等严重后果。VC 在青壮年男性发病率逐年上升,应该引起足够的关注

及重视。VC 导致不育的机制尚未完全明确,可能与炎症、氧化应激、微循环障碍、微环境改变、肾上腺代谢物反流、凋亡调控、免疫异常等因素有关^[4-5],VC 很可能是通过多种机制的共同作用下导致精液质量下降,虽然目前外科手术的开展取得了一定的疗效^[6],但仍有相当一部分患者术后精液治疗未能改善或术后复发,其疗效及并发症的发生也存在诸多争议,因此深入探讨 VC 致男性不育的机制对临床诊疗具有重要意义。

正常精液由精浆和精子组成,精子约占精液体积的 5%,其余均为精浆。精浆中除了含有大量水、果糖、蛋白质和多肽外,还含有多种其他糖类、酶类、无机盐和有机小分子,可为精子提供营养和能源^[7]。精子由睾丸产生,在附睾内成熟,通过输

精管道输出,在精浆中糖类和蛋白质等因素的作用下,精子逐渐发育成熟并获得运动能力和受精能力^[8]。到目前为止,在精浆中已经发现了约两千多种蛋白质^[9],其中某些蛋白质表达的异常直接影响精子的动态平衡和功能,导致精子成熟及运动障碍^[10]。因此,使用精液差异蛋白质法有助于寻找精子病理相关的潜在分子机制。

HE4 最早是由 Kirchhoff 等^[11]在人类附睾远端上皮细胞中发现的,是一种分泌性糖蛋白,为乳清酸性四硫核心蛋白家族的成员。目前临床上常用与卵巢恶性肿瘤的早期诊断及疗效监测^[12-13]。HE4 在附睾中高度表达,席向红等^[14]研究发现,精子异常精浆中 HE4 含量明显高于正常组,精浆中 HE4 含量与精液各参数显示负相关,提示随着精液 HE4 含量的增高,精子数量和质量明显下降。Kant 等^[15]研究得出了相反的结论,该研究用 ELISA 法测定人精浆样品中 HE4 的浓度,与无精子症和弱精子症相比,正常精子症中 HE4 的表达较高,究其原因,Kant 等^[15]考虑与 HE4 作为一种跨类蛋白酶抑制剂有关,其保护精子免受蛋白水解因子的影响。

本研究结果显示,VC 组精子密度、精子总活力、前向运动精子均低于正常对照组(均 $P < 0.01$),证实了 VC 是导致不育的原因之一,与国内外很多研究结论相一致^[16-17]。本研究中 68 例 VC 患者精浆中 HE4 水平为 $(781.09 \pm 160.02) \text{ pmol/L}$,明显高于对照组水平 $(580.31 \pm 147.26) \text{ pmol/L}$,差异有统计学意义($P < 0.01$),精浆中 HE4 含量与精子密度、精子总活力、前向运动精子结果呈负相关(r 分别为 -0.850 、 -0.896 、 -0.874 ,均 $P < 0.01$),提示随着 VC 患者精浆中 HE4 表达增高,精子质量明显下降。VC 导致 HE4 高表达的原因,可能与炎症、氧化应激、微循环障碍、微环境改变、肾上腺代谢物反流、凋亡调控、免疫异常等多因素的作用有关^[18]。因 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的 α_4 亚基在精子尾部特异性表达,精子的成熟及获能有赖于精浆中的离子平衡,研究发现 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶特异性阻断剂可降低精子活力^[19],而富含二硫键结构的 HE4 同样对离子通道有负性调节作用,其这可能是 VC 导致精子成熟及或能障碍的原因之一。另有研究认为,HE4 有可能是一种蛋白酶抑制剂,其 WAP 结构域中的抑制性环状结构通过与蛋白酶活性结构区结合,抑制其活性^[20]。精子成熟过程中顶体反应与顶体蛋白酶相关,HE4 基因编码的分泌蛋白与顶体蛋白酶抑制剂有很高的同源性,具有抑制顶体蛋白酶的作用,使精子能力下降^[21],因此 HE4 有可能通过抑制顶体蛋白酶活性,导致不育。当前很多研究表明 VC 可以对精子形态产

生影响,尤其是精子头部及尾部^[22],其原因可能是睾丸间质细胞、支持细胞受损,睾丸精原细胞核等超微结构发生改变,导致大头精子、尾部缺陷精子等畸形精子,影响了精子活动力及受精能力,最终导致不育^[23]。本研究结果显示 VC 患者中畸形精子症及少弱畸形精子症者精浆 HE4 高表达,提示 HE4 与 VC 致畸作用之间的关联,通过检测精浆 HE4 水平能够评估 VC 对精子形态的影响。

综上所述,VC 患者精液质量下降,与精浆中 HE4 的高表达密切相关,通过精浆 HE4 表达的变化,能较好反映 VC 患者的精子质量水平及评估 VC 对精子形态的影响,并可用来进行临床疗效评估,深入研究 VC 患者精浆中 HE4 的含量变化,有助于进一步明确 VC 引起精子成熟及获能障碍的机制,并为其为临床诊疗及疗效评估提供帮助。

[参考文献]

- 1 World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics[J]. *Fertil Steril*, 1992, 57(6): 1289-1293.
- 2 朱少明,程帆. 精索静脉曲张致不育机制的研究进展[J]. *安徽医药*, 2017, 21(11): 1945-1949.
- 3 Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(6): 847-853.
- 4 Hassanin AM, Ahmed HH, Kaddah AN. A global view of the pathophysiology of varicocele[J]. *Andrology*, 2018, 6(5): 654-661.
- 5 Pastuszak AW, Wang R. Varicocele and testicular function[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4): 659-667.
- 6 Machen GL, Johnson D, Nissen MA, et al. Time to improvement of semen parameters after microscopic varicocelectomy: When it occurs and its effects on fertility[J]. *Andrologia*, 2020, 52(2): e13500.
- 7 韩丽媛,于和鸣. 附睾特异蛋白与精子功能的研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2011, 30(1): 54-57.
- 8 Druart X, De GS. Seminal plasma proteomes and sperm fertility[J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 194: 33-40.
- 9 Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility[J]. *J Proteomics*, 2017, 162: 125-134.
- 10 Samanta L, Parida R, Dias TR, et al. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 41.
- 11 Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors[J]. *Biol Reprod*, 1991, 45(2): 350-357.

- 12 Lakshmanan M, Kumar V, Chaturvedi A, et al. Role of serum HE4 as a prognostic marker in carcinoma of the ovary[J]. *Indian J Cance*, 2019, 56(3): 216—221.
- 13 胡向丹, 肖静, 翟秋丽, 等. 卵巢癌患者血清 HE4、CA125 水平变化及临床意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(12): 58—60.
- 14 席向红, 苏荣, 贾韶彤, 等. 精浆中人附睾蛋白 4 与男性不育症的相关性[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2016, 54(5): 66—69.
- 15 Kant K, Tomar AK, Sharma P, et al. Human Epididymis Protein 4 Quantification and Interaction Network Analysis in Seminal Plasma [J]. *Protein Pept Lett*, 2019, 26(6): 458—465.
- 16 乔永峰, 李亚丹, 何宝明, 等. 精索静脉曲张对不育患者精液质量的影响[J]. *临床医学研究与实践*, 2019, 4(23): 124—125.
- 17 Damsgaard J, Joensen U, Carlsen E, et al. Varicocele is associated with impaired semen quality and reproductive hormone levels: a study of 7035 healthy young men from six European countries[J]. *Eur Urol*, 2016, 70(6): 1019—1029.
- 18 毛卫林, 刘艳, 刘孝华, 等. 精索静脉曲张患者精浆中 IL-2、IL-6 与 TGF- β 1 表达水平与男性生育的关系[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2017, 32(3): 205—208.
- 19 黄群, 梁朝荣, 韦高猛, 等. 精浆 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及降钙素基因相关肽与男性精子质量相关研究[J]. *右江医学*, 2016, 44(2): 125—128.
- 20 Clauss A, Lilja H, Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein [J]. *Biochem J*, 2002, 368(Pt1): 233—242.
- 21 Lin J, Qin J, Sangvatanakul V. Human epididymis protein 4 for differential diagnosis between benign gynecologic disease and ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 167(1): 81—85.
- 22 陈小均, 张志杰, 贾玉森, 等. 畸形精子症获得性病因及治疗研究进展[J]. *中国性科学*, 2018, 27(2): 107—111.
- 23 张明, 贾晓鹏, 王晓波, 等. 精索静脉曲张对睾丸超微结构和精子形态影响的实验研究[J]. *河北医药*, 2016, 38(22): 3466—3467, 3470.

(收稿日期: 2020-03-18)

优先刊登创新性研究文章

为了推进泌尿外科学技术的发展,本刊将优先刊登重要基金资助或国家重大课题的研究成果(包括阶段性研究成果)、新药物和新设备的临床应用、技术改进、单中心研究、多中心研究等创新性研究文章。创新性研究文章可申请进入绿色通道刊发。投递该类文章时,请附基金课题证明文件,在文章左下角注明基金类型及其编号,并写一份“关于本文创新性研究情况说明”,经所在科室主任签字后与证明材料复印件一并寄往编辑部。编辑部初审通过后,文章进入“审稿绿色通道”处理。经专家审定文章确有创新性,编辑部将安排网络或纸质刊优先出版。

《临床泌尿外科杂志》编辑部