DOI:10.16016/j.2097-0927.202212134

73 名重庆市大学生精子 DNA 甲基化水平与精液质量的相关分析

王立宏[1,2],何世军[2],陈 卿[2],凌 曦[2],孙 磊[2],杨 桓[2],刘晋祎[2],曹 佳[2],敖 琳[2],黄毅娜[1],邹 鹏[2]
610041 成都,四川大学华西公共卫生学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所[2]

[**摘要**] **目的** 探讨人精子 DNA 甲基化水平与精液常规参数和精子染色质结构完整性的关系。**方法** 纳入 2014 年重庆市大学生男性生殖健康(male reproductive health in Chongqing college students,MARHCS)队列的 73 名志愿者,分别采用计算机辅助精子分析系统(computer-aided sperm analysis,CASA)和精子染色质结构分析(sperm chromatin structure assay,SCSA)系统检测分析精液常规参数和精子染色质结构完整性指标。通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测精子 DNA 5mC 含量,反映精子 DNA 甲基化水平。同时采用调查问卷收集志愿者的年龄、BMI、禁欲时间及生活方式等数据。多元线性回归模型分析精子 DNA 5mC 含量与精液参数和精子染色质结构完整性的相关性,同时比较高水平和低水平精子 DNA 5mC 组(按照 5mC%中位数二分类)志愿者各级精子百分率的差异。**结果** 志愿者各项精液常规参数(中位数):精液体积为 4.18 mL,精子密度为 55.60×10^6/mL,精子总数为 246.93×10^6,精子活力为 57.00%;染色质结构完整性:精子 DNA 碎片化指数(DNA fragmentation index,DFI)和高 DNA 着色性(high DNA stainability,HDS)指标的中位数分别是 10.99%和 3.39%;精子 DNA 5mC 水平的中位数为 2.63%。校正混杂因素后,多元线性回归结果显示精子 DNA 5mC 与精子密度(β = −0.22,95%*CI*:−0.36~−0.06,*P*=0.008)和精子总数(β = −0.20,95%*CI*:−0.33~−0.05,*P*=0.015)负相关,与精子 DFI 和 HDS 指标的相关性分析无统计学意义(*P*>0.05)。与低水平精子 DNA 5mC 组相比,高水平精子 DNA 5mC 组各级精子百分率差异无统计学意义(*P*>0.05)。**结论** 精子 DNA 甲基化水平升高可能是精子密度和精子总数下降的标志,而与精子染色质结构完整性指标无关。

[**关键词**] 精子 DNA 5mC;精液常规参数;精子染色质结构完整性;相关分析
[**中图法分类号**] R195.1; R321.1; R394.1 [**文献标志码**] A

Correlation between sperm DNA methylation level and semen quality among 73 college students in Chongqing, China

WANG Lihong[1,2], HE Shijun[2], CHEN Qing[2], LING Xi[2], SUN Lei[2], YANG Huan[2], LIU Jinyi[2], CAO Jia[2], AO Lin[2], HUANG Yina[1], ZOU Peng[2] [1]West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the association of sperm DNA methylation level with routine semen parameters and sperm chromatin integrity. **Methods** A total of 73 male individuals who were sampled from our previously established cohort of the male reproductive health in Chongqing college students (MARHCS) study were recruited in this study. The routine semen parameters (semen volume, sperm density, total sperm count and sperm motility) and indicators of sperm chromatin integrity were detected and

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(82003429)
[**通信作者**] 邹 鹏,E-mail:julinlaotou@163.com
黄毅娜,E-mail:10925766@qq.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

analyzed with computer-aided sperm analysis system (CASA) and sperm chromatin structure analysis (SCSA), respectively. ELISA was used to detect the sperm DNA 5mC content, which reflected the methylation level of sperm DNA. Meanwhile, age, BMI, abstinence time and lifestyle of the volunteers were collected through questionnaire survey. Multiple linear regression model was applied to explore the correlation of sperm DNA 5mC content with routine semen parameters and sperm chromatin integrity. The differences in percentages of different grade of sperm were compared in the high and low 5mC% groups (binary classification according to the median value of 5mC%). **Results** The semen routine parameters (median value) of the volunteers were as follows: semen volume was 4.18 mL, sperm density was 55.60×10^6/mL, total sperm count was 246.93×10^6, and sperm motility was 57.00%; Sperm chromatin was in structural integrity, with a median value of sperm DNA fragmentation index (DFI) and high DNA stainablity (HDS) of 10.99% and 3.39%, respectively. The median value of sperm DNA 5mC level was 2.63%. After adjustment for confounding factors, multiple linear regression analysis showed that sperm DNA 5mC level was negatively correlated with sperm density ($\beta=-0.22$, 95%*CI*: $-0.36\sim-0.06$, $P=0.008$) and total sperm count ($\beta=-0.20$, 95%*CI*: $-0.33\sim-0.05$, $P=0.015$), but no statistical correlations were observed in sperm DNA 5mC level with DFI and HDS ($P>0.05$). Meanwhile, there were no significant differences in the percentages of different grade of sperm (grade A ~ D) in the high 5mC group than the low 5mC group ($P>0.05$). **Conclusion** Elevated sperm DNA methylation level may be a biomarker for the decrease of sperm density and total sperm count, while is not correlated with indicators of sperm chromatin integrity.

[**Key words**] sperm DNA 5mC; routine semen parameters; sperm chromatin integrity; correlation analysis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82003429). Corresponding author: ZOU Peng, E-mail: julinlaotou@163.com; HUANG Yina, E-mail: 10925766@qq.com

男性生殖健康是当今医疗保健领域较为关心的问题之一。精液质量是男性生育能力的预测指标,受到遗传、生理、病理和环境等多种因素的影响[1]。据统计,在美国和其他发达国家,70%的夫妇不育可归因于男性伴侣[1-2]。已经有研究证实,男性精液质量下降与精子能量代谢紊乱、精子结构或运动能力异常以及精子 DNA 损伤等多种因素有关[3],其潜在的生理生化因素及相关分子机制仍需进一步研究。表观遗传学是在不改变 DNA 序列的情况下,通过改变 DNA 或组蛋白结构对基因表达进行的修饰[4],它可能解释许多疾病的病因,揭示暴露与疾病之间的中间环节。DNA 甲基化(DNA methylation)是目前最早发现且研究最为深入的表观遗传修饰[5],是许多生物过程中的重要调节因子,而精子 DNA 甲基化在胚胎发育进程中具有动态调控的模式,且这一过程可能参与精子正常功能的维持、受精以及胚胎发育,精子 DNA 甲基化已成为生殖领域的研究热点[6]。有研究显示,接触抗癌药物以及内分泌干扰物会导致整体 DNA 甲基化水平降低,精子形态改变、精子活力降低和受精能力下降,提示精液参数指标下降可能与异常的精子 DNA 甲基化有关[4]。因此深入理解普通人群中的精子 DNA 甲基化状态及其与精液质量指标的关联,或可为开展相关的调控机制研究提供线索。由于常规的精液分析指标无法全面评估男性生育能力,约有 15%精液参数正常的男性仍然患有不育症[7];而精子染色质结构完整性是精液质量评估的新指标,对男性生育能力的诊断和预测性可能更好,目前已经成为精液常规参数的重要补充。既往研究招募的志愿者大部分为不孕不育人群,大多采用精液常规参数来评估男性生育能力,而针对普通人群开展生殖细胞 DNA 甲基化与精液常规参数和精子染色质结构完整性之间的关联研究还少有报道。因此,为进一步在普通人群中分析精子 DNA 甲基化水平与精液质量指标之间的关联,本研究基于重庆市大学生男性生殖健康(male reproductive health in Chongqing college students,MARHCS)队列数据,以精子中最重要的表观遗传标记 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine,5mC)为甲基化水平的主要指标[8],分析精子 DNA 5mC 水平与精液常规参数、精子 DNA 碎片化指数(DNA fragmentation index,DFI)和高 DNA 着色性(high DNA stainability,HDS)指标的相关性,探索精子 DNA 5mC 水平作为精液质量下降标志物的可能性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

MARHCS为分析普通人群中社会-心理-行为和遗传等因素以及环境低剂量污染物暴露对男性生殖健康潜在影响的队列研究(2013-2015年)。研究对象为2014年MARHCS队列研究中的部分志愿者(n=73)。纳入标准:①在重庆市大学城就读的大学二年级学生;②≥18岁;③禁欲2~7 d。排除标准:①有泌尿生殖系统疾病史;②有喉结突起、乳房异常、阴茎异常、睾丸缺失或精索静脉曲张等情况。MARHCS项目获得了第三军医大学伦理学委员会审查批准(1.0/2013.4-12),并向所有潜在参与者口头解释研究内容并获得知情同意。

1.2 方法

1.2.1 调查问卷信息及精液样本的采集 采用问卷的方式调查志愿者的年龄、禁欲时间和生活方式信息。吸烟行为采用如下问题记录,"您吸烟(平均每天至少一支,持续半年或以上)吗?",选项包括"从不吸烟、吸烟和已戒烟";饮酒/喝茶行为分别采用如下问题记录,"您是否饮酒/喝茶?",选项包括"不饮酒/从不喝、饮酒/喝、已戒酒/曾喝";喝可乐/喝咖啡行为分别采用如下问题记录,"您喝可乐/咖啡吗?",选项包括"不喝、<3瓶(杯)/周、3~6瓶(杯)/周和>6瓶(杯)/周";具体见前期研究[9]。用已称量过的一次性无菌塑料采精杯收集精液样本。研究对象在经项目工作者指导后,按照WHO推荐的手淫法采集精液样本,具体方法见前期研究[10-11]。工作人员需详细记录每个志愿者的采集样本时间以及禁欲时长,并将采集的精液样本迅速放置于37 ℃孵箱中孵育,直至所有样本液化,充分混匀,上样分析。

1.2.2 精液常规参数的检测 根据WHO推荐的称量法检测各精液样本的体积。将采集的精液样本放置于调零的电子天平上称量,减去预先称量过的杯质量,即得样本的质量,精液样本的体积用所得的精液质量除以精液密度(根据世界卫生组织标准,统一视为1 g/mL)。充分混匀后的精液样本分别吸取10 μL,加入已提前在37 ℃预热板上加热的人精子检测专用玻片,放置于显微镜下,找准视野,调整好焦距,通过计算机辅助精子分析系统(CASA)自动检测和分析精子密度和精子活动力等参数。精子总数为所得的精子密度与精液量的乘积。

1.2.3 精子染色质结构完整性的检测 采用精子染色质结构分析(SCSA)检测反映精子DNA损伤和精子染色质成熟度的两个指标:精子DFI、精子HDS。基本原理是用荧光染料吖啶橙(AO;Invitrogen,Carlsbad,USA)对处理后的精液样本进行染色,然后用流式细胞仪检测10 000个精子的荧光信号;双链DNA精子发出绿色荧光,单链DNA精子发出红色荧光;精子DFI为红色荧光与总荧光强度的比值,精子HDS是指具有高绿色荧光的精子所占的百分比。具体操作方法和步骤见前期研究[12]。

1.2.4 精子DNA 5mC含量的检测 采用全基因组DNA提取试剂盒(Omega Bio-tek;Inc,E.Z.N.A,USA)提取精子DNA,具体操作步骤如下:①精液样本裂解;②核酸分离、纯化;③沉淀或吸附核酸,去除杂质;④核酸溶解。所有操作按照试剂盒说明书进行。检测各样本DNA浓度,并稀释到20 ng/μL,-80 ℃长期保存。采用DNA甲基化定量检测试剂盒(Epigentek;Farmingdale,NY,USA)检测精子DNA样本的甲基化水平。根据ELISA试剂盒说明书配置各稀释液和进行实验,具体操作步骤如下:①制备1×的洗涤缓冲液;②制备不同浓度梯度的稀释阳性标准溶液;③DNA结合:将阴性对照、稀释阳性标准溶液、精子DNA样本分别加入相应的孔中,每个孔再分别加等量的PBS,于37 ℃孵箱中孵育90 min;④DNA甲基化反应:分别在各时间点加一抗、二抗和增敏剂于各孔中,依次在室温下孵育60、30、30 min,每次孵育结束用1×的洗涤缓冲液清洗各孔;⑤DNA甲基化检测:加入显色液,当样本孔颜色变为中蓝色时,加终止液终止反应,在450 nm波长处检测各孔的光密度。

1.3 统计学分析

采用SPSS 26.0统计软件进行数据处理与分析。采用Shapiro-Wilk检验检测连续变量的正态性,结果显示所有连续变量数据(年龄、BMI、禁欲时间)不服从正态分布,故连续变量和分类变量分别以中位数$M(P_{25},P_{75})$和百分率呈现。采用多元线性回归模型分析年龄、BMI、禁欲时间和喝咖啡等混杂因素校正前后精子DNA 5mC含量与精液常规参数和精子染色质结构完整性指标的相关性,同时采用Mann-Whitney U检验分析不同精子DNA 5mC水平各级精子百分率的差异。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的特征描述

73名重庆大学生志愿者年龄为21(21,22)岁,体质量指数(BMI)为20.81(19.48,22.77)kg/m^2,禁欲时长为5(3,6)d,其中有吸烟、饮酒、喝茶、喝可乐和喝咖啡习惯的大学生比例分别为20.50%、82.20%、

15.10%、72.60%和38.40%。研究对象的精液体积、精子密度、精子总数和精子活力指标分别为:4.18(3.07,5.36)mL、55.60(37.20,83.85)×10^6/mL、246.93(130.69,348.58)×10^6、57.00(47.90,67.30)%。

2.2 精液常规参数、精子DFI、精子HDS和精子DNA 5mC的数据分布

73名志愿者精液常规参数、精子DFI、精子HDS和精子DNA 5mC的分布结果见表1。同时参考WHO第5版精液常规参数标准,精子活力≥40%,精子密度≥15×10^6/mL,精子总数≥39×10^6/份精液样本,精液量≥1.5 mL的样本属于精液参数合格的样本。73名志愿者精液体积、精子密度、精子总数和精子活力的合格率分别为:100.00%、95.89%、98.63%和84.93%,所有指标均达标的志愿者比例为82.19%。

表1 精液常规参数、精子DFI、HDS和DNA 5mC的数据分布情况

变量	最小值	最大值	$M(P_{25}, P_{75})$
精液体积/mL	1.55	8.58	4.18(3.07, 5.36)
精子密度/10^6·mL^{-1}	10.60	505.00	55.60(37.20, 83.85)
精子总数/10^6	38.61	1116.05	246.93(130.69, 348.58)
精子活力(%)	14.90	87.40	57.00(47.90, 67.30)
DFI(%)	1.76	53.19	10.99(7.03, 19.55)
HDS(%)	1.50	14.10	3.39(2.41, 4.79)
5mC(%)	0.85	5.18	2.63(2.12, 3.17)

2.3 精子DNA总甲基化水平(5mC%)与精液常规参数和精子染色质结构完整性指标的相关性

多元线性回归分析结果显示(表2):①未校正混杂因素时(模型Ⅰ),精子DNA 5mC水平与精子密度(β=-0.24,95%*CI*:-0.37~-0.09,*P*<0.001)、精子总数(β=-0.22,95%*CI*:-0.36~-0.06,*P*=0.010)和精子DFI(β=0.23,95%*CI*:0.01~0.50,*P*=0.040)均显著相关;精子DNA 5mC水平与精液体积、精子活力、精子HDS指标的相关性无统计学意义;②校正年龄、BMI和禁欲时间后(模型Ⅱ),精子DNA 5mC水平与精子密度(β=-0.22,95%*CI*:-0.35~-0.07,*P*=0.010)和精子总数(β=-0.19,95%*CI*:-0.32~-0.04,*P*=0.020)的相关性仍然具有统计学意义,与精液体积、精子活力、精子DFI和精子HDS指标均无相关性;③校正年龄、BMI、禁欲时间、吸烟、饮酒、喝茶、喝可乐和喝咖啡后(模型Ⅲ):精子DNA 5mC水平与精子密度(β=-0.22,95%*CI*:-0.36~-0.06,*P*=0.008)和精子总数(β=-0.20,95%*CI*:-0.33~-0.05,*P*=0.015)均呈显著的负相关,精子DNA 5mC%每增加一个标准差,精子总数相应减少0.17×10^6,精子密度相应下降0.18×10^6/mL;精子DNA 5mC水平与精液体积、精子活力、精子DFI和精子HDS指标的相关性无统计学意义。

2.4 不同精子DNA 5mC水平与各级精子百分率的关联性分析

根据精子DNA 5mC水平的中位数(2.63%),将73名志愿者分为两类:低水平精子DNA 5mC组(5mC%<2.63%)和高水平精子DNA 5mC组(5mC%≥2.63%)。结果显示,高水平精子DNA 5mC组精子密度显著低于低水平精子DNA 5mC组(*P*=0.039,表3)。同时分析发现,两组间各级精子密度的百分率差异无统计学意义,见表3。

表2 精子DNA总甲基化水平(5mC%)与精液常规参数、DFI和HDS的线性回归分析

自变量	精液体积/mL		精子密度/10^6·mL^{-1}		精子总数/10^6		精子活力(%)		DFI(%)		HDS(%)	
	β(95%*CI*)[a]	*P*值	β(95%*CI*)[a]	*P*值	β(95%*CI*)[a]	*P*值	β(95%*CI*)[a]	*P*值	β(95%*CI*)[a]	*P*值	β(95%*CI*)[a]	*P*值
模型Ⅰ[b]												
5mC%	0.03 (-0.08~0.15)	0.598	-0.24 (-0.37~-0.09)	<0.001	-0.22 (-0.36~-0.06)	0.010	0.01 (-0.08~0.10)	0.881	0.23 (0.01~0.50)	0.040	0.01 (-0.11 ~0.15)	0.869
模型Ⅱ[c]												
5mC%	0.04 (-0.08~0.16)	0.526	-0.22 (-0.35~-0.07)	0.010	-0.19 (-0.32~-0.04)	0.020	0.00 (-0.09~0.09)	0.919	0.22 (0.00~0.49)	0.051	0.02 (-0.11~0.16)	0.820
模型Ⅲ[d]												
5mC%	0.03 (-0.08~0.16)	0.607	-0.22 (-0.36~-0.06)	0.008	-0.20 (-0.33~-0.05)	0.015	0.01 (-0.07~0.03)	0.400	0.15 (-0.06~0.40)	0.176	0.00 (-0.14~0.14)	0.936

a:回归分析时对所有因变量进行log10对数转换,呈现的β(95%*CI*)数值已行反函数逆转换;b:模型Ⅰ未校正混杂因素;c:模型Ⅱ校正的混杂因素包括:年龄、BMI和禁欲时间;d:模型Ⅲ校正的混杂因素包括:年龄、BMI、禁欲时间、吸烟、饮酒、喝茶、喝可乐和喝咖啡

表 3 不同精子 DNA 总甲基化水平(5mC%)与各级精子(A~D 级)百分率的关联

变量	低 5mC%组[a](n=39)	高 5mC%组[a](n=34)	统计量 Z	P 值
精子密度/10^6 · mL^{-1}	67.90(40.10, 92.70)	47.15(34.75, 67.43)	-2.063	0.039
A 级精子百分率[b](%)	16.90(12.00, 20.00)	17.30(10.40, 22.93)	-0.017	0.987
B 级精子百分率[b](%)	38.80(34.00, 45.00)	37.35(31.35, 48.18)	-0.100	0.921
C 级精子百分率[b](%)	33.20(25.80, 36.20)	31.55(26.15, 35.53)	-0.669	0.503
D 级精子百分率[b](%)	9.10(6.10, 15.90)	10.75(4.83, 19.53)	-0.111	0.912

a:按照 5mC%中位数(2.63%)二分类:低 5mC% < 2.63%,高 5mC% ≥ 2.63 %;b:参考第 5 版《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》的划分标准将精子活力划分为 A、B、C、D 4 个等级:A 级为快速向前运动的精子,B 级为缓慢向前运动的精子,C 级为原地运动的精子,D 级为不动的精子

3 讨论

近年来,国内外诸多研究开始从表观遗传学角度探索男性生殖健康的影响因素及相关的分子机制。DNA 甲基化作为最重要的表观遗传标记,是许多疾病诊断和治疗的靶点,但其与男性生殖健康表型之间的关联尚未得到证实[13]。本研究分析精子 DNA 5mC 水平与精液常规参数和精子染色质结构完整性的相关性,结果显示精子 DNA 5mC 水平与精子密度和精子总数存在显著负相关,与精子染色质结构完整性指标精子 DFI 和精子 HDS 的相关性均无统计学意义,同时分析发现不同精子 DNA 5mC 水平与各级精子百分率无相关性。

DNA 甲基化是一种共价生化修饰,可调节基因表达和基因组稳定性等多种生物过程。现有研究主要关注 DNA 甲基化在肿瘤、癌症和精神障碍等难治性疾病中的应用前景[14-16],在男性生殖健康领域,目前与 DNA 甲基化有关的研究结果主要体现在甲基化水平异常与精液常规参数下降和胚胎发育的关联性上。前期有诸多研究者已发现 DNA 甲基化与精子密度和精子活力均呈负相关[17-19]。与上述研究结果一致,本研究也发现精子 DNA 5mC 水平与精子密度和精子总数负相关。虽然精子 DNA 甲基化是否介导精液质量下降及其可能的分子机制尚不明确,但已有学者提出一些印记或非印记基因的异常甲基化可能通过影响细胞分裂、成熟和组织分化等生物学过程对生育能力、胚胎发育和妊娠结果产生负面影响[20]。例如,研究人员发现印记基因 IGF2 表达的胰岛素样生长因子 2 可诱导不同组织中细胞的生长和分裂,H19 基因对细胞增殖起着负调节的作用,当精子 DNA 链中 IGF2-H19 的 CTCF 结合位点 6(CTCF6)调节区域出现 H19 基因的异常甲基化,就会导致精子细胞 IGF2 双等位基因失活的风险增加,从而抑制精子发生,导致精液质量下降[21-22];此外,亚甲基四氢叶酸还原酶(5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)的活性异常也可能损害精子发生过程。MTHFR 是一种参与叶酸代谢以及 DNA 合成和甲基化的关键调节酶,其在睾丸中的活性是其他器官的 5 倍,当精子细胞中的 MTHFR 基因发生异常甲基化,会引起 MTHFR 酶活性减弱,从而降低印记基因(H19、MEST 等)甲基化水平,继而导致精子发生停滞、受精受损等[23],且 MTHFR 缺失对子代的影响更加显著。然而甲基化水平升高导致精子密度下降是“无差别攻击”,还是对各级精子(根据 WHO 划分标准可分为 A、B、C、D 4 个等级)的影响存在差异性,目前还没有研究证实。本研究分析了不同精子 DNA 总甲基化水平与各级精子百分率的关联,结果显示各级精子百分率在高 DNA 5mC 组和低 DNA 5mC 组间的分布没有差异,提示精子 DNA 5mC 水平升高不会导致某一特定分级的精子显著减少。

另一方面,有部分学者也发现精子 DNA 甲基化水平异常与精子染色质结构完整性相关。例如,RAHIMINIA 等[24]对少精子症男性的研究发现:精子 DNA 甲基化水平显著升高,并且与精子染色质结构完整性测试的异常结果具有显著相关性;也有研究结果显示精子 DFI 与精子中印记基因 IGF2 甲基化水平呈负相关,与 KCNQ1 基因的甲基化水平呈正相关[25]。这些结果提示精子 DNA 甲基化异常可能会导致精子染色质构型发生变化,其机制尚不清楚,但已有研究提出了几种可能的理论:一项对精索静脉曲张男性的研究表明 DNA 甲基化水平降低与较短的端粒长度有关,而端粒长度变化可影响减数分裂过程中精母细胞同源染色体的重组,其缩短会导致精子 DNA 碎片增加,当精子细胞亚端粒区域的整体甲基化水平降低就可能会导致端粒缩短,从而失去维持染色质结构稳定性的能力,继而导致男性生育能力下降[26];也有证据表明印记基因甲基化水平降低会促进染色体重排[27],从而导致精子发生过程中细胞凋亡异常,致使精子 DNA 受

损;另外一种可能的机制是印记基因启动子区域甲基化水平改变会使基因沉默,同时刺激氧化应激,诱发精子 DNA 损伤,导致精子染色质完整性受损[28]。在校正禁欲时间和生活方式等混杂因素后,本研究并未发现精子 DNA 5mC 水平与精子 DFI 和 HDS 指标相关,与上述研究的结果存在差异,原因可能是:①研究对象的选择存在偏倚,上述研究纳入的是患有男性不育症的群体,一些生殖相关疾病、慢性病、药物使用等,可能是影响精液质量的高度危险因素;而本研究采用严格的纳入和排除标准,选择普通青年人群,避免了男性不育患者存在的缺陷,研究结果可能对于一般人群更有参考价值;②DNA 甲基化检测方法不同,灵敏度会有差异,从而导致研究结果的不可比性。

本研究也存在一定的局限性:①本研究样本量有限,数据仅来自重庆市部分男性大学生,可能限制了研究结果的普遍性,结果外推到其他男性群体存在不确定性,将来需要大样本的独立研究加以验证。②研究表明精子 DNA 甲基化和精液参数受环境、生活方式等多种因素的影响,本研究参照同类研究方法,在回归分析时对年龄、BMI、吸烟、饮酒等混杂因素进行了校正。但由于本研究的样本量有限,仍不能完全排除上述及其他未知混杂因素对本研究结果的影响。③本研究属于观察性研究,无法探究精子 DNA 5mC 水平与精液常规参数和染色质结构完整性的确切因果关系,需要证据强度更高的研究类型进一步验证目前发现的精子 DNA 甲基化对精子密度的效应。④本研究只检测了样本精子 DNA 的总甲基化水平,而目前的研究一般描述的是特定基因的 DNA 甲基化水平与精液质量的关联,缺乏可比性,建议进一步研究多关注与男性生殖有关的特定基因簇。

综上所述,本研究证实精子 DNA 5mC 水平与精子密度和精子总数负相关,提示精子 DNA 甲基化异常可能是导致精液质量下降的重要原因,精子 DNA 5mC 水平可作为精液常规的必要补充。本研究结果为进一步研究表观遗传改变与男性生殖健康表型之间的关联奠定了基础,也为男性不育症的诊断、相关分子机制的深入研究和改善男性不育表型提供了参考依据和新思路。

参考文献:

[1] CISNEROS F J. DNA methylation and male infertility[J]. Front Biosci, 2004, 9: 1189-1200. DOI: 10.2741/1332.

[2] ILACQUA A, IZZO G, EMERENZIANI G P, *et al*. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 115. DOI: 10.1186/s12958-018-0436-9.

[3] MONTJEAN D, ZINI A, RAVEL C, *et al*. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity[J]. Andrology, 2015, 3(2): 235-240. DOI: 10.1111/andr.12001.

[4] RAJENDER S, AVERY K, AGARWAL A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility[J]. Mutat Res Mutat Res, 2011, 727(3): 62-71. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.04.002.

[5] 刘晶莹, 陈秀娟, 戴柏, 等. DNA 甲基化与哺乳动物生殖的研究进展[J]. 中国计划生育和妇产科, 2022, 14(5): 54-57. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4020.2022.05.16.
LIU J Y, CHEN X J, DAI B, *et al*. Research progress of DNA methylation and mammalian reproduction[J]. Chin J Fam Plan Gynecotokol, 2022, 14(5): 54-57. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4020.2022.05.16.

[6] IQBAL K, TRAN D A, LI A X, *et al*. Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian germline by epigenome reprogramming[J]. Genome Biol, 2015, 16(1): 59. DOI: 10.1186/s13059-015-0619-z.

[7] 刘太秀, 崔志鸿, 曹佳. 重庆市大学生精液常规参数与精子 DNA 损伤的关联性分析[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(11): 1325-1330. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201603024.
LIU T X, CUI Z H, CAO J. Association analysis between routine semen parameters and sperm DNA damage in Chongqing college students[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(11): 1325-1330. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201603024.

[8] JENKINS T G, ASTON K I, CAIRNS B R, *et al*. Paternal aging and associated intraindividual alterations of global sperm 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine levels[J]. Fertil Steril, 2013, 100(4): 945-951.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.05.039.

[9] YANG B W, ZOU P, CHEN Q, *et al*. Lifestyle-related risk factors correlated with mental health problems: a longitudinal observational study among 686 male college students in Chongqing, China[J]. Front Public Health, 2022, 10: 1040410. DOI: 10.3389/fpubh.2022.1040410.

[10] YANG H, CHEN Q, ZHOU N Y, *et al*. Lifestyles associated with human semen quality: results from MARHCS cohort study in Chongqing, China[J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(28): e1166. DOI: 10.1097/MD.0000000000001166.

[11] ZHOU N Y, JIANG C T, CHEN Q, *et al*. Exposures to atmospheric PM_{10} and $PM_{10-2.5}$ affect male semen quality: results of MARHCS study[J]. Environ Sci Technol, 2018, 52(3): 1571-1581. DOI: 10.1021/acs.est.7b05206.

[12] WANG X G, CHEN Q, ZOU P, *et al*. Sleep duration is associated with sperm chromatin integrity among young men in Chongqing, China[J]. J Sleep Res, 2018, 27(4): e12615. DOI: 10.1111/jsr.12615.

[13] CHENG Y T, TANG Q Q, LU Y W, *et al*. Semen quality and sperm DNA methylation in relation to long-term exposure to air pollution in fertile men: a cross-sectional study[J]. Environ Pollut, 2022, 300: 118994. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.118994.

[14] DING W B, CHEN G, SHI T L. Integrative analysis identifies potential DNA methylation biomarkers for pan-cancer diagnosis and prognosis[J]. Epigenetics, 2019, 14(1): 67-80. DOI: 10.1080/15592294.2019.1568178.

[15] MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function[J]. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1): 23-38. DOI: 10.1038/npp.2012.112.

[16] PAN Y B, LIU G H, ZHOU F L, *et al*. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics[J]. Clin Exp Med, 2018, 18(1): 1-14. DOI: 10.1007/s10238-017-0467-0.

[17] NANASSY L, CARRELL D T. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation[J]. Fertil Steril, 2011, 95(7): 2310-2314. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.096.

[18] TIAN M P, BAO H Q, MARTIN F L, *et al*. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human *Semen quality*[J]. Biol Reprod, 2014, 91(4): 101. DOI: 10.1095/biolreprod.114.122465.

[19] POOL K R, RICKARD J P, DE GRAAF S P. Global methylation and protamine deficiency in ram spermatozoa correlate with sperm production and quality but are not influenced by melatonin or season[J]. Animals (Basel), 2020, 10(12): 2302. DOI: 10.3390/ani10122302.

[20] 张耀东, 颜宏利. 精子DNA异常甲基化与男性不育症关系的研究进展[J]. 发育医学电子杂志, 2022, 10(3): 228-234. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5340.2022.03.012.
ZHANG Y D, YAN H L. Research progress on the relationship between abnormal methylation of sperm DNA and male infertility[J]. J Dev Med Electron Version, 2022, 10(3): 228-234. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5340.2022.03.012.

[21] DARBANDI M, DARBANDI S, AGARWAL A, *et al*. Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and *Semen quality*[J]. J Assist Reprod Genet, 2019, 36(2): 241-253. DOI: 10.1007/s10815-018-1350-y.

[22] SANTI D, DE VINCENTIS S, MAGNANI E, *et al*. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study[J]. Andrology, 2017, 5(4): 695-703. DOI: 10.1111/andr.12379.

[23] ROTONDO J C, LANZILLOTTI C, MAZZIOTTA C, *et al*. Epigenetics of male infertility: the role of DNA methylation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 689624. DOI: 10.3389/fcell.2021.689624.

[24] RAHIMINIA T, YAZD E F, FESAHAT F, *et al*. Sperm chromatin and DNA integrity, methyltransferase mRNA levels, and global DNA methylation in oligoasthenoteratozoospermia[J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45(1): 17-24. DOI: 10.5653/cerm.2018.45.1.17.

[25] NI W H, PAN C S, PAN Q Q, *et al*. Methylation levels of IGF_2 and KCNQ1 in spermatozoa from infertile men are associated with sperm DNA damage[J]. Andrologia, 2019, 51(5): e13239. DOI: 10.1111/and.13239.

[26] SANTANA V P, MIRANDA-FURTADO C L, PEDROSO D C C, *et al*. The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases[J]. Syst Biol Reproductive Med, 2019, 65(2): 95-104. DOI: 10.1080/19396368.2018.1557762.

[27] OLSZEWSKA M, BARCISZEWSKA M Z, FRACZEK M, *et al*. Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations[J]. Asian J Androl, 2017, 19(1): 117-124. DOI: 10.4103/1008-682X.168684.

[28] SONG B, CHEN Y J, WANG C, *et al*. Poor semen parameters are associated with abnormal methylation of imprinted genes in sperm DNA[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 155. DOI: 10.1186/s12958-022-01028-8.

(**收稿**:2022-12-21;**修回**:2023-02-25)

(编辑 张 维)