



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103630678 A

(43) 申请公布日 2014.03.12

(21) 申请号 201310112391.1

(22) 申请日 2013.03.29

(71) 申请人 中国科学院城市环境研究所  
地址 361021 福建省厦门市集美区集美大道  
1799 号

(72) 发明人 张洁 申河清 王展林

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

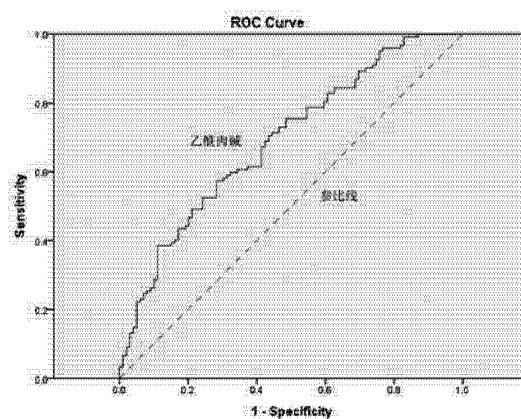
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

### (54) 发明名称

男性不育的生物标志物及其应用

### (57) 摘要

本发明公开了一种用于诊断男性不育的方法,包含指示男性不育的生物标志物,包含鉴定和检测指示男性不育的生物标志物的方法,还包含用于诊断或检测男性不育的试剂盒。本发明结合精液常规检查,可实现对男性不育症的准确诊断。



1. 一种用于诊断男性不育的方法,其特征在于:

(a) 检测受试者体液中至少一种指示男性不育生物标志物的水平,其中至少一种指示男性不育生物标志物选自乙酰肉碱、天冬氨酸、肉碱 C3:1、酮肉碱、亮氨酸脯氨酸、肉碱 C8、甲基黄嘌呤、肉碱 C10:2、肉碱 C10:1、腺嘌呤;

(b) 将所述受试者体液中至少一种指示男性不育生物标志物的水平与参考水平进行比较,其中所述至少一种指示男性不育生物标志物的水平与参考水平的差异指示该受试者患有男性不育。

2. 根据权利要求1所述方法,其中,所述参考水平是未患男性不育的受试者对照群体中对应的所述体液中对应的所述至少一种指示男性不育生物标志物的水平。

3. 根据权利要求1-2任一项所述方法,其中,所述体液选自受试者尿液、血清、血浆、血液、精液、精子、精浆、唾液,尤其是尿液。

4. 根据权利要求1-3任一项所述方法,其中,所述受试者为男性,但不局限于人类,包括其它所有哺乳动物。

5. 根据权利要求1-4任一项所述方法,其中,所述测定通过酶免疫测定或液相色谱-质谱联用方法测定进行。

6. 一种用于鉴定和检测指示男性不育生物标志物的方法,其特征在于:

(a) 测定患有男性不育受试者群体和未患男性不育受试者群体的体液样品中的所有可检测生物标志物的水平;

(b) 将测得的患有男性不育受试者群体和未患男性不育受试者群体的体液样品中的所有可检测生物标志物的水平一一对应进行比较,显示差异的生物标志物被鉴定为指示男性不育的生物标志物。

7. 根据权利要求6所述方法,其中,所述体液选自受试者尿液、血清、血浆、血液、精液、精子、精浆、唾液,尤其是尿液。

8. 根据权利要求6所述方法,其中,所述测定通过液相色谱-质谱联用方法进行。

9. 根据权利要求6和权利要求8所述方法,其中,所述液相色谱-质谱联用方法不局限于指示男性不育生物标志物的鉴定,包括独立用于指示男性不育生物标志物的测定。

10. 一种用于诊断检测男性不育的试剂盒,包括用于检测在权利要求1中所述的指示男性不育生物标志物的存在的介质。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒,其中,用于检测所述生物标志物的存在的所述介质为抗体、抗体片段或抗体衍生物。

12. 根据权利要求11所述的抗体、抗体片段或抗体衍生物可特异性地结合于权利要求1所述的指示男性不育生物标志物或其修饰配体。

13. 根据权利要求10所述的试剂盒,其中,用于检测权利要求1所述的指示男性不育生物标志物的方法为固相酶免疫测定(ELISA)。

14. 根据权利要求10所述的试剂盒,还包括用于使用在权利要求10-14中任一项所述的方法中检测生物标志物的所述介质的试剂和/或说明书。

## 男性不育的生物标志物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物标志物,特别是涉及男性不育的生物标志物,包含用于鉴定筛选男性不育相关生物标志物的方法,包含用于检测男性不育生物标志物的方法,还包含用于诊断或检测男性不育的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 男性不育已经成为世界范围内的重大公共健康问题。传统的精液常规分析(精子数量、存活力、活动率和形态等常规精液分析)是目前判断男性生育力的常用手段,但是仅仅依靠精液常规分析来预测男性生育状况仍是很不准确的。临床上对绝大部分的男性不育患者的真正不育原因仍然不清楚,尤其是临床上大约有近 30% 的男性不育患者的常规精液分析结果均正常和接近正常,因此长期以来临床对男性不育的诊断存在很大的困难,主要原因是精子数量、存活力、活动率和形态等常规精液分析指标只能反映最基本的精液质量,而不能反映所有的精子功能,因此需要发现新的生物标志物并辅助传统的精液常规分析,实现对男性不育症的准确诊断。

### 发明内容

[0003] 为了克服上述现有技术的不足,本发明提供了一种诊断男性不育的方法,一般涉及体液样品的分析性测试。在一些方面中,包含了用于指示男性不育的生物标志物,包含用于鉴定和检测指示男性不育生物标志物的方法,还包含用于诊断或检测男性不育的试剂盒。本发明作为一种辅助诊断方法,可实现对男性不育的准确诊断。

[0004] 在本发明的一个方面中,本文提供了一种诊断男性不育的方法,包括:

(a) 提供男性受试者体液样品,体液样品选自受试者尿液、血清、血浆、血液、精液、精子、精浆、唾液,尤其是尿液;

(b) 体液样品经过必要的前处理,包括使其保持液体状态,稀释,离心或过滤去除沉淀;

(c) 通过酶免疫测定或液相色谱-质谱联用技术方法测定受试者体液中乙酰肉碱、天冬氨酸、肉碱 C3:1、酮肉碱、亮氨酸、亮氨酸、肉碱 C8、甲基黄嘌呤、肉碱 C10:2、肉碱 C10:1、腺嘌呤的一种或两种或多种任意组合的指示男性不育生物标志物的水平,并与所对应的参考水平进行比较,其中所述至少一种指示男性不育生物标志物的水平与参考水平的差异指示该受试者患有男性不育。

[0005] 在一个实施方案中,参考水平是指未患男性不育的受试者对照群体中对应的所述体液中对应的所述至少一种指示男性不育生物标志物的水平。

[0006] 在一个实施方案中,所述男性受试者不局限于人类,还包括所有的哺乳动物。

[0007] 在一个实施方案中,所述酶免疫测定是指固相酶免疫测定(ELISA)。

[0008] 在本发明的另一方面,本文提供了一种用于鉴定和检测指示男性不育生物标志物的方法,该方法包括:

(a) 通过液相色谱 - 质谱联用技术测定患有男性不育受试者群体和未患男性不育受试者群体的体液样品中所有可检测生物标志物的水平；

(b) 将测得的患有男性不育受试者群体和未患男性不育受试者群体的体液样品中所有可检测生物标志物的水平一一对应进行比较, 显著差异的生物标志物被鉴定为指示男性不育的生物标志物。

[0009] 在一个实施方案中, 所述体液选自受试者尿液、血清、血浆、血液、精液、精子、精浆、唾液, 尤其是尿液。

[0010] 在一个实施方案中, 所述液相色谱 - 质谱联用方法并不局限于鉴定指示男性不育生物标志物, 还包括独立用于指示男性不育生物标志物的测定。

[0011] 在本发明的另一方面, 本文提供了一种用于诊断检测男性不育的试剂盒, 其包括:

(a) 所述乙酰肉碱、天冬氨酸、肉碱 C3:1、酮肉碱、亮氨酸、肉碱 C8、甲基黄嘌呤、肉碱 C10:2、肉碱 C10:1、腺嘌呤指示男性不育生物标志物的标准品；

(b) 用于检测所述指示男性不育生物标志物的存在的介质；

(c) 用于检测所述指示男性不育生物标志物的所述介质的试剂和 / 或说明书。

[0012] 在一个实施方案中, 用于检测所述指示男性不育生物标志物的存在的所述介质为抗体、抗体片段或抗体衍生物。

[0013] 在一个实施方案中, 其中所述的抗体、抗体片段或抗体衍生物可特异性地结合于所述指示男性不育生物标志物或其修饰配体。

[0014] 在一个实施方案中, 其中所述试剂盒用于测定来自受试者的体液样品中所述乙酰肉碱、天冬氨酸、肉碱 C3:1、酮肉碱、亮氨酸、肉碱 C8、甲基黄嘌呤、肉碱 C10:2、肉碱 C10:1、腺嘌呤的至少一种指示男性不育生物标志物的水平, 并与所对应的参考水平进行比较, 其中所述至少一种指示男性不育生物标志物的水平与参考水平的差异指示该受试者患有男性不育。

[0015] 在一个实施方案中, 所述参考水平可以通过使用未患男性不育的受试者对照群体来确定, 对于人类受试者, 一种更常见的测定是来自多个正常个体的结果的统计学组合。

[0016] 在一个实施方案中, 所述测定通过固相酶免疫测定 (ELISA) 进行。

[0017] 与现有技术相比, 本发明的有益效果是: (1) 检测所需样品为体液, 获取方便, 避免了机体损伤、射线成像等有害复杂的过程; (2) 作为一种辅助诊断方法, 结合常规精液检查, 可实现对不育症, 尤其是对常规精液检查正常而被认为不明原因的不育症的准确诊断。

#### 附图说明

[0018] 图 1 为: 肉碱 C8 的 ROC 分析。实线是肉碱 C8 风险因子的 ROC 分析 ( $AUC=0.65$ ,  $P=4.06E-04$ ); 虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0019] 图 2 为: 肉碱 C10:1 的 ROC 分析。实线是肉碱 C10:1 风险因子的 ROC 分析 ( $AUC=0.62$ ,  $P=1.71E-03$ ); 虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0020] 图 3 为: 肉碱 C10:2 的 ROC 分析。实线是肉碱 C10:2 风险因子的 ROC 分析 ( $AUC=0.64$ ,  $P=2.30E-04$ ); 虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0021] 图 4 为: 酮肉碱的 ROC 分析。实线是酮肉碱风险因子的 ROC 分析 ( $AUC=0.66$ ,

$P=1.67E-04$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0022] 图 5 为 :乙酰肉碱的 ROC 分析。实线是乙酰肉碱风险因子的 ROC 分析( $AUC=0.69$ ,  $P=2.11E-03$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0023] 图 6 为 :甲基黄嘌呤的 ROC 分析。实线是甲基黄嘌呤风险因子的 ROC 分析( $AUC=0.65$ ,  $P=8.77E-04$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0024] 图 7 为 :亮氨酸脯氨酸的 ROC 分析。实线是亮氨酸脯氨酸风险因子的 ROC 分析( $AUC=0.66$ ,  $P=2.64E-04$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0025] 图 8 为 :肉碱 C3:1 的 ROC 分析。实线是肉碱 C3:1 风险因子的 ROC 分析( $AUC=0.68$ ,  $P=2.19E-06$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0026] 图 9 为 :腺嘌呤的 ROC 分析。实线是腺嘌呤风险因子的 ROC 分析( $AUC=0.61$ ,  $P=9.63E-04$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

[0027] 图 10 为 :天冬氨酸的 ROC 分析。实线是天冬氨酸风险因子的 ROC 分析( $AUC=0.68$ ,  $P=5.22E-05$ );虚线是参比线并且表示 0.5 的 AUC (即无差别)。

## 具体实施方式

[0028] 通过借助以下实施例将更详细说明本发明。以下实施例仅是说明性的,本发明并不受这些实施例的限制。

## 实施例

### [0029] 样品收集

尿液样品来自 135 名不育症男性患者和 158 名正常健康男性对照。本文中男性不育症患者为与其配偶经过一年以上没采取避孕措施的正常性生活仍然不育,但其配偶经临床检查被评估为生育功能正常。正常对照为与其配偶一年内正常生育的男性。男性不育患者的平均年龄为  $29.45 \pm 4.47$ , 年龄范围为 24-34 岁;正常对照男性平均年龄为  $29.11 \pm 5.07$ , 年龄范围为 24-34 岁。全部尿液样品均在南京医科大学附属医院收集,所有受试者均签署书面知情同意书。

### [0030] 尿液制备

分析前,在室温下溶解尿液样品。将  $300 \mu\text{L}$  去离子水加入  $300 \mu\text{L}$  尿液中,在  $4^\circ\text{C}$  下,  $12000 \times g$  离心 10 分钟。在进行液相色谱-质谱(LC/MS)分析前,用注射过滤器使样品离心后上清液通过孔径  $0.22 \mu\text{m}$  的滤膜过滤。

### [0031] LC/QTOF-MS 条件

尿液代谢图谱通过 Ultimate-3000 液相色谱仪(美国戴安公司)与 MicrOTOF-Q II-四级杆飞行时间质谱(Bruker Daltonics, USA)联用系统获得。反相分离使用的是填料孔径为  $2.1 \times 150 \text{ mm } 2.6 \mu\text{m}$  的 C18 色谱柱(Phenomenex, USA),柱温维持在  $30^\circ\text{C}$ ,进样体积为  $5 \mu\text{L}$ 。流动相为(A) 0.1% 的甲酸水溶液和(B) 0.1% 的甲酸乙腈溶液的混合液,洗脱梯度如下:在 1.5 分钟内,流动相 B 体积分数由 5% 上升到 20%,在 8.5 分钟时流动相 B 上升到 60%,0.1 分钟后流动相 B 上升到 95% 并保持 1.9 分钟,再在 0.1 分钟内下降至 5%,最终流动相 B 体积分数在 5% 维持 3 分钟。流动相流速为  $200 \mu\text{L} / \text{min}$ 。质谱仪在正离子,ESI 扫描模式下运行,扫描范围为 50 到  $1000 \text{ m/z}$ 。数据在 centroid 模式下收集。毛细管电压和端板

偏移电位分别设置为 4500V 和 -500V。喷雾气压设置为 0.6bar,干气流量为 6 L/min,温度为 200° C。利用二级质谱实验进一步潜在的生物标志物。碰撞气为氩气,对于每一个生物标志物,碰撞能范围调整为 10eV 到 35eV。

#### [0032] 数据分析

对所有采集到的色谱图进行峰对齐、背景噪音去除和保留时间 - 分子量离子对的提取,经过归一化和 pareto 模式化后,导入 SIMCA-P v12 软件进行多元数据分析。利用正交偏最小方差判别分析(OPLS-DA)对不育患者和可育的对照样本进行区别并筛选生物标志物。在训练集中,基于对变化的显著贡献各种代谢物被鉴定为潜在的生物标志物。基于从 OPLS-DA 模型中构建的变量重要性投影(VIP)图和 S 图,筛选出潜在的生物标志物,并用 Wilcoxon-Mann-Whitney 非参数检验法进一步证实。P 值小于 0.005 则认为具有统计学上的差异显著性。

#### [0033] 生物标志物鉴定

等量混合所有样本制备一个混合的尿液样本,分析该混合样本以获得目标生物标志物的精确分子量信息和同位素模式。使用辅助软件 DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, USA) 计算拟合筛选到的代谢物的可能的分子式,筛选出的尿液生物标志物的结构信息提交用于数据库检索,使用的数据库为 Human Urine Metabolome Database (HMDB, <http://www.urinemetabolome.ca/>) 和 Metabolite and Tandem MS Database (METLIN, <http://metlin.scripps.edu/>),并对候选标志物进行二级质谱分析,最终通过与商品化的标准品进行比较,确认鉴定出的特异代谢物。

#### [0034] 统计分析

使用 SPSS Statistics 18 软件 (SPSS Inc.) 进行统计分析。采用 Mann-Whitney 非参数 U 检验法比较病例组和对照组之间的生物标志物水平, p 值小于 0.05 指示差异显著性。采用 SPSS Statistics 18 软件 (SPSS Inc.) 进行受试者操作特征 (Receiver Operating Characteristic Curve, ROC) 曲线分析,以评估这些生物标志物区分不育个体和可育对照个体的预测能力。通过 ROC 曲线计算曲线下面积(AUC)。对区分不育个体具有最强的预测力的是具有最大的 ROC 曲线下面积的每一个生物标志物或标志物组合。通过检索那些同时具有最高灵敏度和特异性的生物标志物,确定每个生物标志物的最佳截点。

#### [0035] 病例的尿液代谢组学研究

采用有监督的 OPLS-DA 最大化不育病人和可育的对照个体之间的代谢图谱差异。选择对两组之间的分类贡献最大的变量作为潜在的生物标志物用于不育症的诊断。首先,采用变量的 VIP 得分作为筛选潜在生物标志物的扩展集的一个重要因素。VIP 得分大于 3.0 的变量在此步骤中被选中。其次,从候选名单中移除 jack-knifing 置信区间小于 0 的变量。然后,采用从 OPLS-DA 模型中建立的 S-plot 进一步排除不合适的变量。挑选 S-plot 中绝对 p 值大于 0.04 和相对 p(corr) 值大于 0.02 的变量。由于对模型分类贡献微弱,位于矩阵点中心附近的变量被移除。采用 Wilcoxon-Mann-Whitney 非参数检验作为最终程序,排除 p 值大于 0.005 的变量。最后,结合 VIP 和 S-plot 以及显著性检验的结果,最初的 56 个变量中的 17 个被选定为生物标志物并进行进一步的结构鉴定。

[0036] 17 个潜在生物标志物中的 10 个被鉴定出来并列于表 1,包括六种脂酰肉碱,腺嘌呤,天冬氨酸,亮氨酰脯氨酸和甲基黄嘌呤。

[0037] 表 1 从不育患者和健康对照个体中获得的尿液差异代谢物

代谢物	VIP <sup>a</sup>	p[1]	p(corr)[1]	P <sup>b</sup>	趋势	变化倍数 <sup>c</sup>
肉碱 C8	16.71	0.30	0.31	4.06E-04	↓	0.73
肉碱 C10:1	6.89	0.14	0.27	1.71E-03	↓	0.76
肉碱 C10:2	5.75	0.10	0.27	2.30E-04	↓	0.78
酮肉碱	5.38	0.09	0.31	1.67E-04	↓	0.81
乙酰肉碱	4.26	0.07	0.37	2.11E-03	↓	0.73
甲基黄嘌呤	3.49	-0.07	-0.30	8.77E-04	↑	1.36
亮氨酸脯氨酸	3.23	0.06	0.32	2.64E-04	↓	0.78
肉碱 C3:1	3.17	0.04	0.25	2.19E-06	↓	0.64
腺嘌呤	3.09	-0.06	-0.21	9.63E-04	↑	1.15
天冬氨酸	3.07	0.05	0.33	5.22E-05	↓	0.65

<sup>a</sup> VIP 来自于 OPLS-DA 模型, 阈值为 3.0; <sup>b</sup> P 值和变化倍数通过 Wilcoxon-Mann-Whitney 非参数检验计算得到; <sup>c</sup> 变化倍数大于 1 指示该标志物在不育患者中的浓度相对较高, 而小于 1 指示该标志物浓度相对较低于健康对照个体。

## [0038] 生物标志物的 ROC 分析

ROC 分析广泛应用于临床化学。生物标志物的鉴定经过 ROC 分析来评估诊断的精确性。训练集中的样本被用于 ROC 分析。AUC 是评价生物标志物总体敏感性和特异性的度量标准。敏感性 (Sensitivity) 对应于真实的阳性率, 而 1-特异性 (1-Specificity) 对应于假阳性率。AUC 为 0.5 说明模型预测到的是偶然性; AUC 大于 0.5, 代表具有对疾病的识别能力。ROC 曲线越靠近左上角, 试验的准确性就越高。在实施例中鉴定的 10 个生物标志物的 ROC 曲线: 肉碱 C8 (AUC=0.65, P=4.06E-04) (图 1); 肉碱 C10:1 (AUC=0.62, P=1.71E-03) (图 2); 肉碱 C10:2 (AUC=0.64, P=2.30E-04) (图 3); 酮肉碱 (AUC=0.66, P=1.67E-04) (图 4); 乙酰肉碱 (AUC=0.69, P=2.11E-03) (图 5); 甲基黄嘌呤 (AUC=0.65, P=8.77E-04) (图 6); 亮氨酸脯氨酸 (AUC=0.66, P=2.64E-04) (图 7); 肉碱 C3:1 (AUC=0.68, P=2.19E-06) (图 8); 腺嘌呤 (AUC=0.61, P=9.63E-04) (图 9); 天冬氨酸 (AUC=0.68, P=5.22E-05) (图 10)。表 2 中前三种生物标志物的各种组合被用于考察男性不育, 任意两种生物标志物组合模式的 AUC 值提高到了 0.7 以上 (表 2)。而且, 通过采用前三种生物标志物——乙酰肉碱, 肉碱 C3:1 和天冬氨酸的组合模式, 得到了最高 AUC 值 (0.73), 敏感性和 1-特异性也分别提升了 65% 和 71%。

[0039] 因此, 实施例中这 10 种生物标志物对于男性不育的诊断是特别有用的。

## [0040] 表 2 ROC 分析结果

生物标志物	AUC 面积	95% 渐进置信区间下限	95% 渐进置信区间上限	敏感性 <sup>a</sup>	特异性 <sup>a</sup>
乙酰肉碱 (A)	0.69	0.62	0.76	57%	72%
天冬氨酸 (B)	0.68	0.61	0.75	48%	81%
肉碱 C3:1 (C)	0.68	0.61	0.75	66%	67%
酮肉碱	0.66	0.59	0.73	63%	63%
亮氨酸脯氨酸	0.66	0.59	0.73	84%	40%
肉碱 C8	0.65	0.58	0.72	70%	53%
甲基黄嘌呤	0.65	0.58	0.72	85%	45%
肉碱 C10:2	0.64	0.57	0.72	64%	63%
肉碱 C10:1	0.62	0.54	0.69	78%	41%
腺嘌呤	0.61	0.54	0.69	72%	48%
A+B	0.71	0.65	0.78	70%	64%
A+C	0.72	0.65	0.78	45%	90%
B+C	0.71	0.64	0.77	58%	78%
A+B+C	0.73	0.66	0.79	65%	71%

<sup>a</sup> 敏感性和特异性在它们的最佳截点处计算。

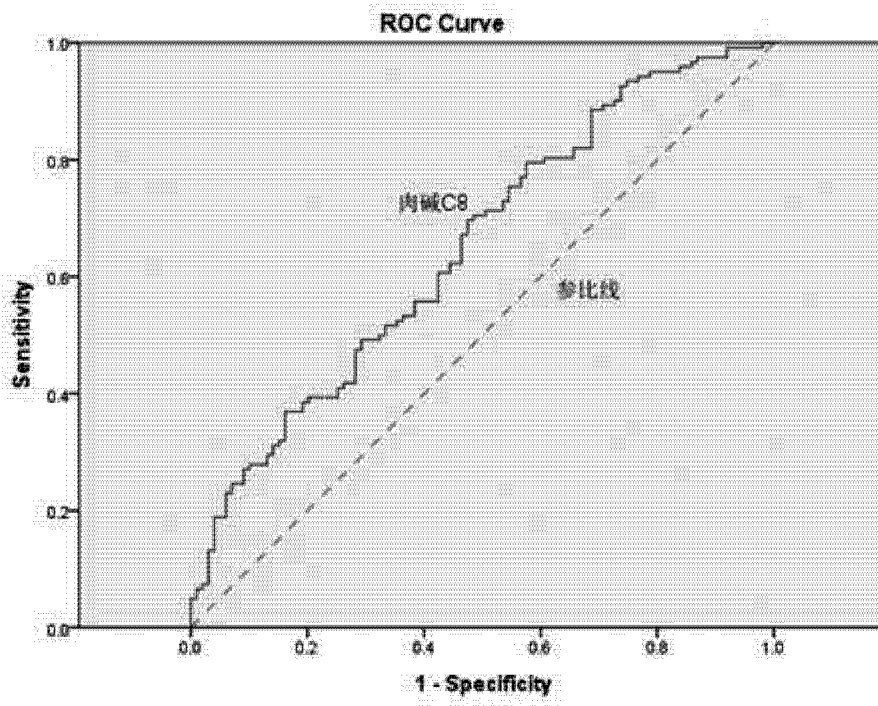


图 1

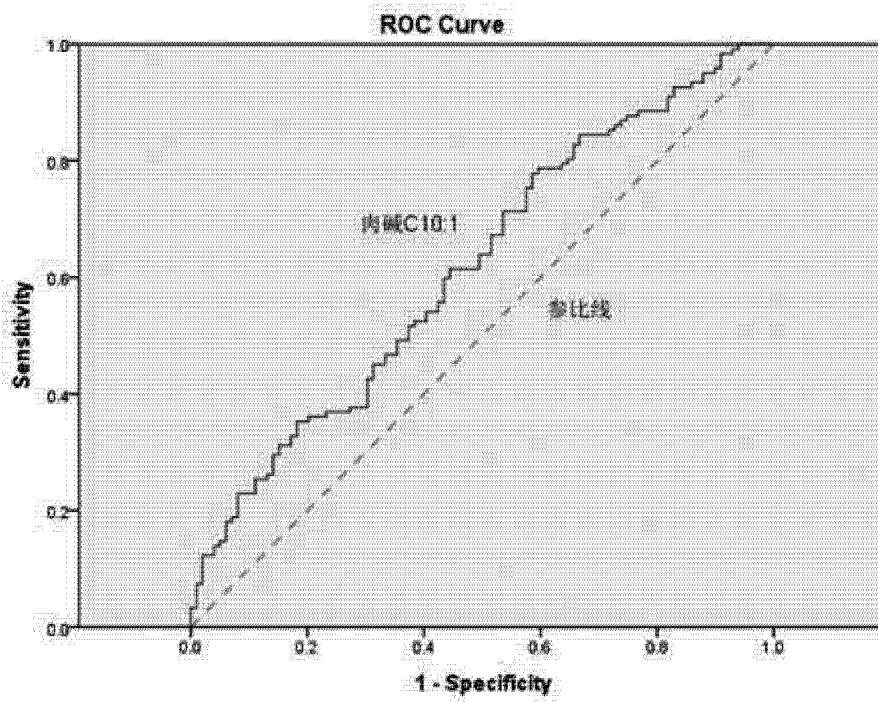


图 2

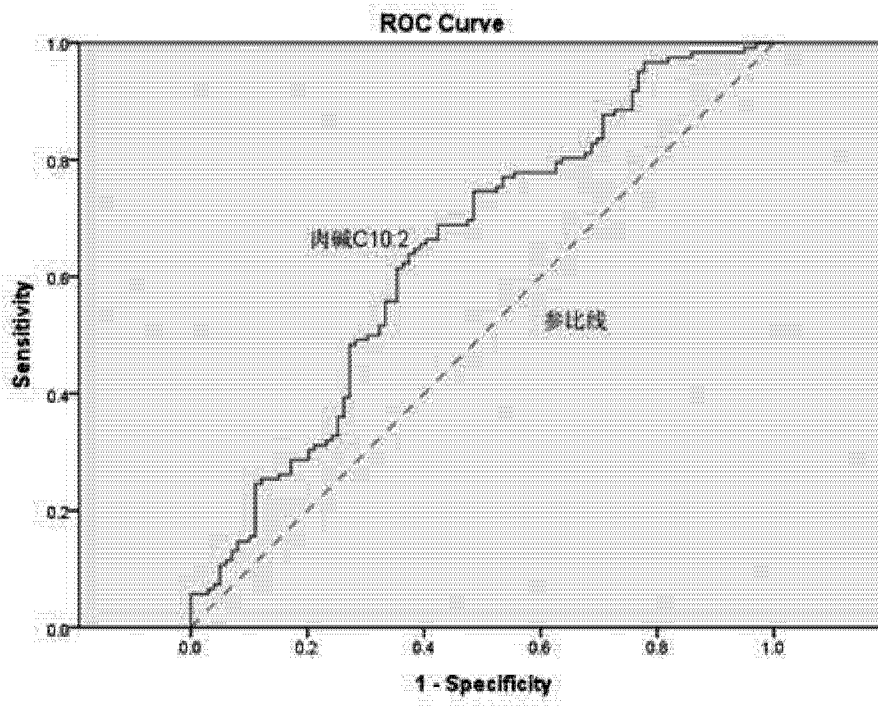


图 3

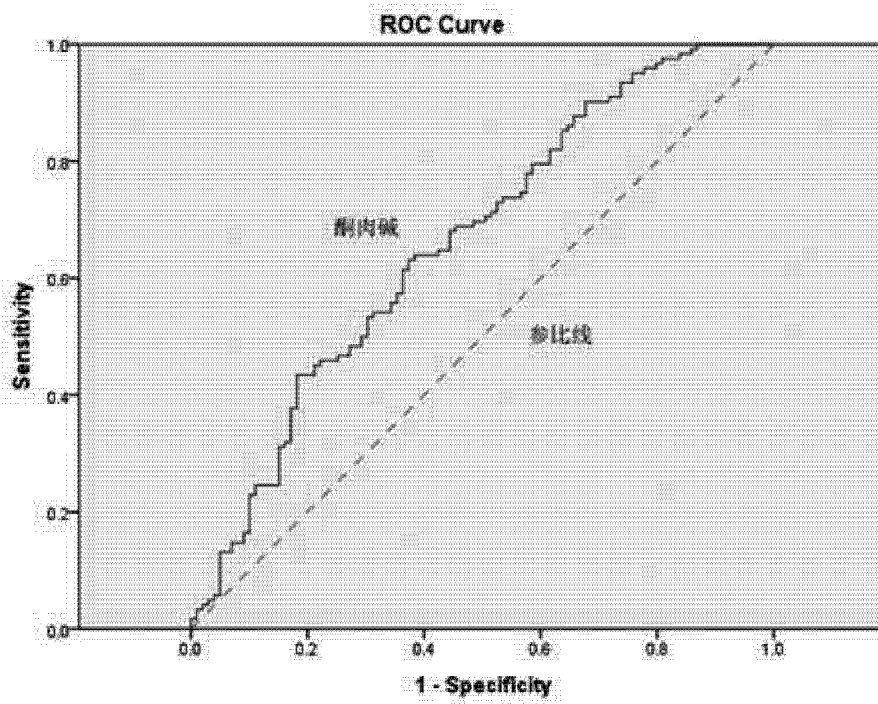


图 4

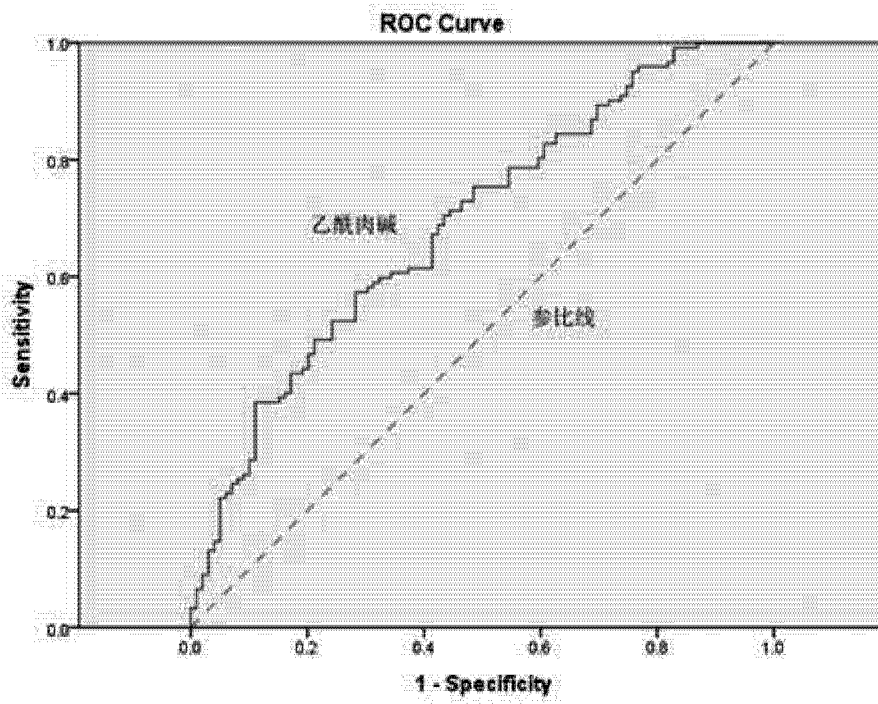


图 5

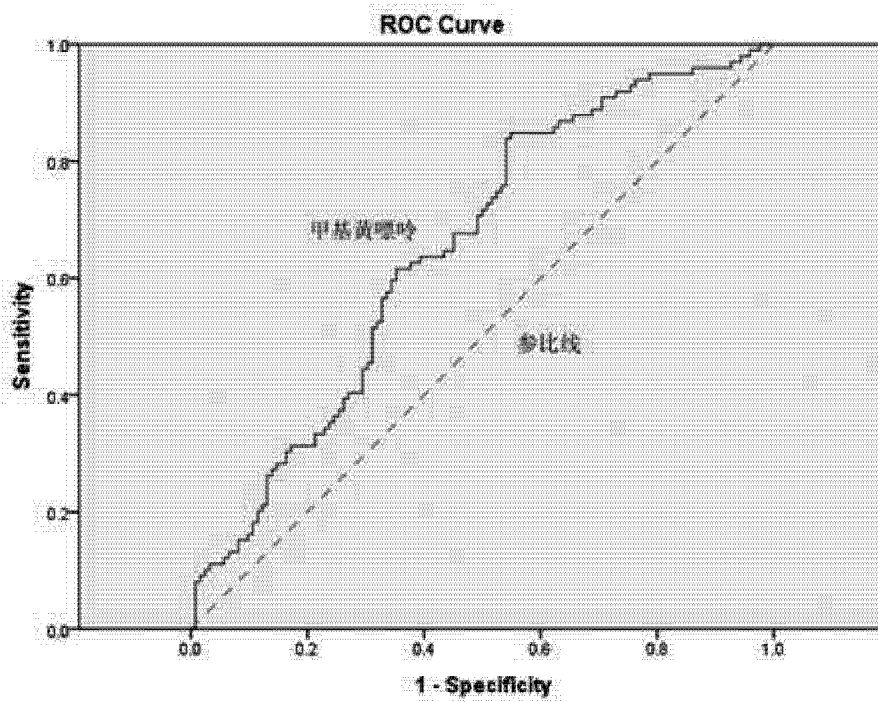


图 6

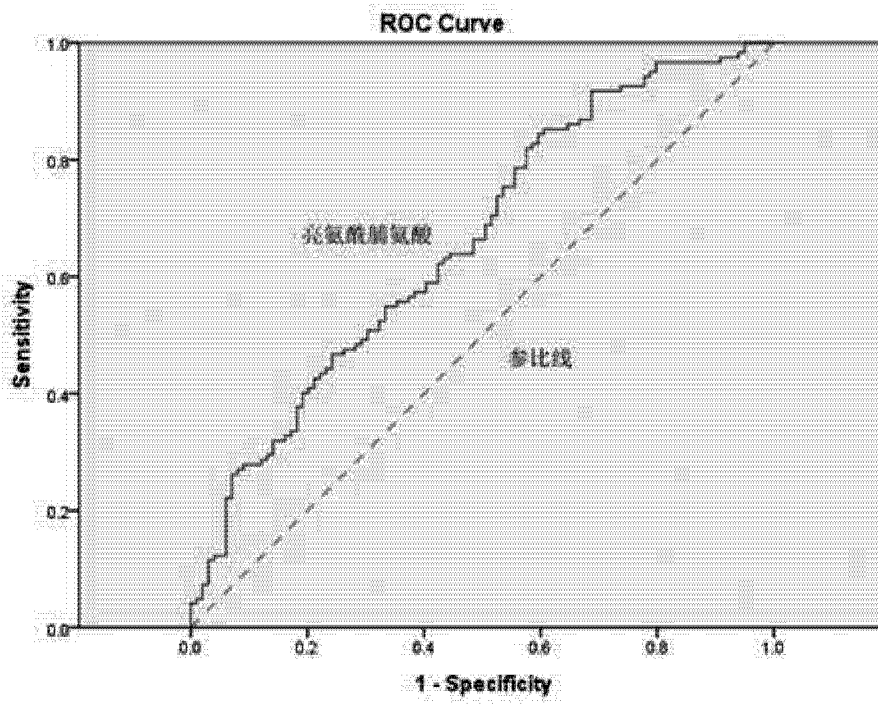


图 7

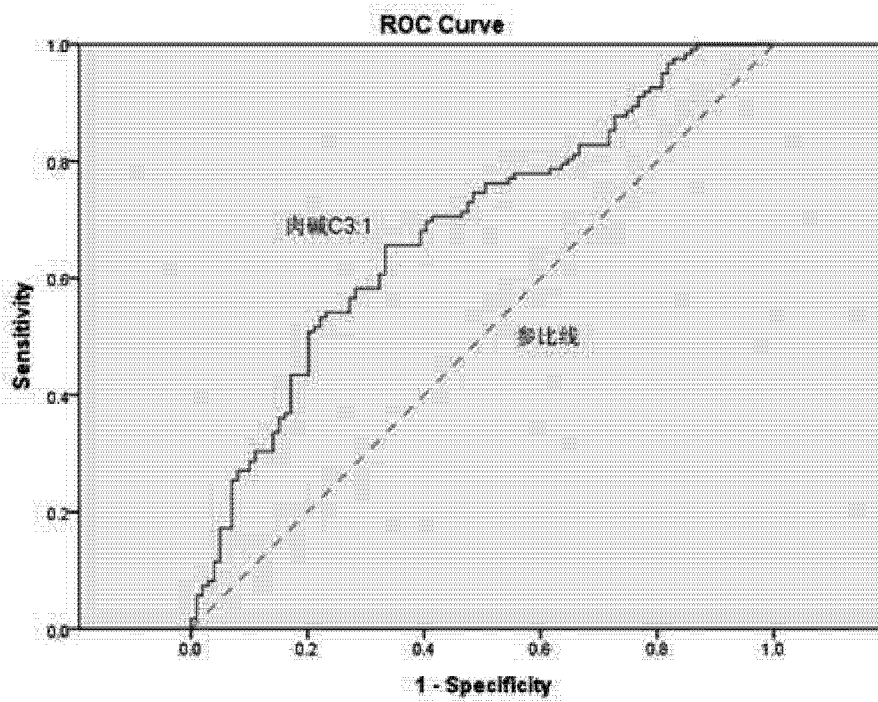


图 8

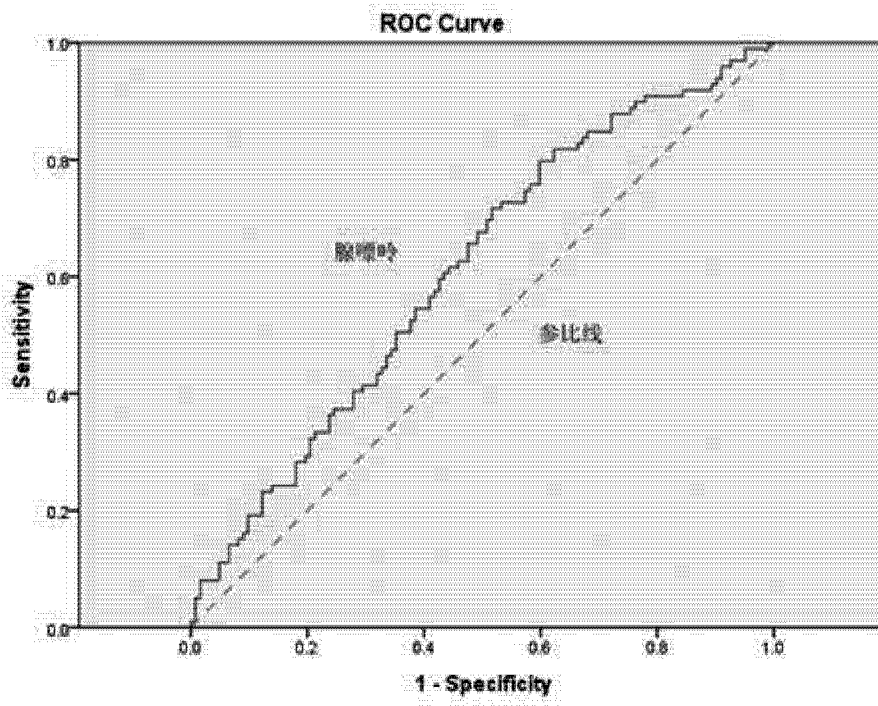


图 9

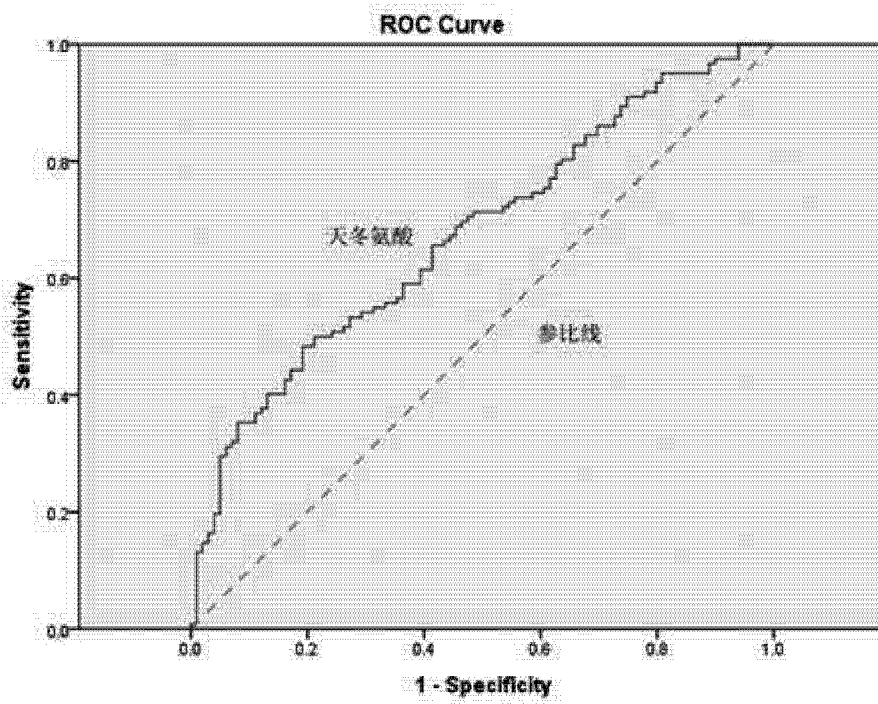


图 10

专利名称(译)	男性不育的生物标志物及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103630678A</a>	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201310112391.1	申请日	2013-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院城市环境研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院城市环境研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院城市环境研究所		
[标]发明人	张洁 申河清 王展林		
发明人	张洁 申河清 王展林		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/02		
CPC分类号	G01N33/53 G01N30/02 G01N2030/027 G01N2800/367		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种用于诊断男性不育的方法，包含指示男性不育的生物标志物，包含鉴定和检测指示男性不育的生物标志物的方法，还包含用于诊断或检测男性不育的试剂盒。本发明结合精液常规检查，可实现对男性不育症的准确诊断。

