

血清维生素D水平与男性不育症之间的关系： 一项两样本孟德尔随机化研究

李 硕*, 赵姣雅, 李瑞林#

西安医学院研工部, 陕西 西安

收稿日期: 2024年5月26日; 录用日期: 2024年6月21日; 发布日期: 2024年6月27日

摘 要

目的: 由于异质性和混杂因素, 维生素D (VD)与男性不育症之间的因果关系尚未达成共识, 即使在随机对照试验(RCT)中也是如此。本研究旨在通过孟德尔随机化(MR)探究血清VD (25-OH-D)水平与男性不育症之间的因果关系, 并为未来RCT的优化提供补充信息。方法: 从GAWS数据库中提取了VD和MFI的单核苷酸多态性(SNP), 进行两样本孟德尔随机化研究, 采用逆方差加权法(Inverse Variance Weighted, IVW)、Egger回归法(MR-Egger)、中位数加权法(Weighted Median)等评估VD与MFI之间的因果关联, 同时采用异质性检验(Heterogeneity Test)、水平多效性检验(Horizontal pleiotropy Test)、逐个剔除检验(Leave-one-out sensitivity Test)进行敏感性分析, 评估MR分析的可靠性和稳定性。结果: 共纳入84个与VD密切相关的SNP, 遗传预测的VD水平与MFI的风险无关(OR: 0.728, 95% CI: 0.445~1.191; P = 0.207), 这在三种敏感性分析(MR-Egger法, Weighted median法和Weighted mode法)中都是一致的。结论: 遗传预测的血清维生素D水平与男性不育症的风险无关, 服用VD补充剂可能无法对男性不育症有益。

关键词

不育症, 孟德尔随机化, 维生素D

Association between Serum Vitamin D Levels and Male Infertility: A Two-Sample Mendelian Randomization Study

Shuo Li*, Jiaoya Zhao, Ruilin Li#

Postgraduate Office of Xi'an Medical University, Xi'an Shaanxi

Received: May 26th, 2024; accepted: Jun. 21st, 2024; published: Jun. 27th, 2024

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 李硕, 赵姣雅, 李瑞林. 血清维生素 D 水平与男性不育症之间的关系: 一项两样本孟德尔随机化研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(6): 940-946. DOI: 10.12677/acm.2024.1461864

Abstract

Objective: Due to heterogeneity and confounding factors, there is no consensus on the causal relationship between vitamin D (VD) and male infertility, even in randomized controlled trials (RCTs). This study aims to explore the causal relationship between serum VD (25-OH-D) levels and male infertility through Mendelian randomization (MR) and to provide complementary information for future optimization of RCT. **Methods:** Single nucleotide polymorphisms (SNP) of VD and MFI were extracted from GAWs database, and two-sample Mendelian randomization study was carried out. Inverse Variance Weighted (IVW), Egger Regression (MR-Egger), Weighted Median (Weighted Median) were used to evaluate the causal association between VD and MFI. Heterogeneity Test, Horizontal pleiotropy Test and Leave-one-out Sensitivity test were used to conduct sensitivity analysis to evaluate the reliability and stability of MR analysis. **Results:** A total of 84 SNPs closely related to VD were included, and the level of genetically predicted VD was not associated with the risk of MFI (OR: 0.728, 95% CI: 0.445~1.191; $P = 0.207$), which was consistent with the three sensitivity analyses (MR-Egger, Weighted median and Weighted mode). After excluding SNPs, the conclusion still holds. **Conclusion:** Genetically predicted serum vitamin D levels are not associated with the risk of male infertility, and taking VD supplements may not be beneficial to male infertility.

Keywords

Sinfertility, Mendelian Randomization, Vitamin D

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 介绍

男性因素不育症(MFI)是指男性在无保护后至少 12 个月内无法使有生育能力的女性怀孕,在美国,这一比例至少为 12%,给社会和经济进步带来了巨大障碍[1]。此外,由于 COVID-19 在一定程度上降低了生育能力,甚至导致一些康复男性的不育,因此寻找男性不育的潜在有效预防方法更为重要[2]。

在过去的几十年中,关于维生素 D (VD)对人类健康的保护作用的研究较为广泛[3]。VD 被认为与 MFI 密切相关,但临床观察结果仍有争议[4]。尽管观察性研究显示血清 VD 水平对参数和妊娠结局有积极影响[5],但目前使用 VD 补充剂的随机对照试验(Randomized Controlled Trials, RCTs)存在研究人群、补充剂剂量和潜在混杂因素的显著异质性,因此对 VD 与男性因素生育力之间的因果关系尚无共识[6]。

从理论上讲,随机对照试验是回答通过补充剂增加 VD 状态是否会改善 MFI 的金标准,但现实中,由于一些外界因素,可能无法开展大型的随机对照试验[7]。孟德尔随机化(Mendelian Randomization, MR)被认为是一种天然的随机对照试验[8]。MR 将与目标暴露相关的遗传变异作为工具变量,可以避免观察性研究中未测量的混杂因素,并研究潜在可改变的危险因素与健康结局之间的因果关系[9]。因此,MR 可以为随机对照试验提供补充信息。

本研究的目的是通过对普通人群进行双样本 MR 分析,评估血清 VD (25-OH-D)水平(通常用于评估体内 VD 状态)对男性生育能力的因果影响,并为未来 RCT 的优化提供参考。

2. 材料与方法

双样本 MR 分析是按照 STROBE-MR 检查表的说明进行的。在指南下进行敏感性分析和单核苷酸多态性(SNP)筛选[10]。

2.1. 数据来源

VD 与 MFI 的遗传变异是从全基因组关联研究(Genome Wide Association Study, GWAS)获得, 其中 VD 共计 418,691 个样本, 共计 4,225,238 个 SNP 位点。MFI 共计 73,479 个样本, 共计 16,377,329 个 SNP 位点(表 1)。

Table 1. Summary of GWAS data from two-sample Mendelian randomization analysis

表 1. 两样本孟德尔随机化分析的 GWAS 数据汇总

变量	样本量	SNP 个数	年份	血统	数据库来源	PMID	统计学效能
VD	418,691	4,225,238	2021	欧洲	IEU 数据库	34,226,706	100%
MFI	73,479	16,377,329	2021	欧洲	IEU 数据库	/	100%

2.2. 工具变量的选择和孟德尔随机化假设

MR 分析应满足三个核心假设以获得无偏倚的结果: 1) 变异与暴露显著相关; 2)变异与暴露 - 结果关联的任何混杂因素无关; 3) 变异不影响结局, 除非暴露可能通过其他生物学途径(即水平多效性效应)[10]。为了保证 MR 分析的稳健性,我们应用 SNP 作为遗传工具变量。为了确保提取的 SNP 与血清 25OHD 水平有力相关(假设 1), 我们仅包括全基因组显著相关 $P < 5 \times 10^{-8}$, F 统计量 > 10 的 SNP, 以最大限度地减少弱工具变量偏倚的可能性。其次, 我们用 $r^2 \geq 0.001$ 和 LD 距离 $< 10,000$ kb 去除了潜在连锁不平衡。

2.3. 孟德尔随机化分析的统计方法

采用目前最常用的四种 MR 方法进行分析, 包括本研究最主要的逆方差加权法(Inverse Variance-Weighted method, IVW)和辅助的 MR-Egger 法, Weighted median 法和 Weighted mode 法。为衡量 MR 分析的可靠性和稳定性, 还进行了多种敏感性分析, 例如: 异质性检验(Heterogeneity Test): 检测来源于不同 GWAS 数据的 SNP 是否存在异质性。水平多效性检验(Horizontal pleiotropy Test): 如果 SNP 与暴露因素和结局都直接相关, 那么就存在水平多效性, MR 分析的结果就不可信。逐个剔除检验(Leave-one-out sensitivity Test): 通过逐个剔除 SNP 后计算剩余 SNP 的 MR 结果, 若剔除某个 SNP 后其它 SNP 估计出来的 MR 结果和总结果差异很大, 则说明 MR 结果对该 SNP 是敏感的。

工具变量的强度通过统计量 F 计算, 其公式为 $F = R^2 \times (N - k - 1) / (1 - R^2) \times k$ 。其中 R^2 代表工具变量解释的变异比例, N 为暴露样本的样本量, k 为工具变量的数量, 而 $R^2 = (2 \times \text{EAF} \times (1 - \text{EAF}) \times \text{beta}^2) / (N \times \text{SE}^2)$, EAF 为次要等位基因频率, beta 为等位基因效应值, SE 为标准误差。MR 估计值的功效通过 MRnd (<https://shiny.cnsgenomics.com/mRnd/>)在线网站计算。所有统计分析均使用 R 软件(4.0.3 版本)进行。使用 Two sample MR 包(0.5.5 版本)进行 MR 分析。

3. 结果

TSMR 结果提示 VD 与 MFI 的发生风险风管。IVW 法提供了主要的因果证据(OR: 0.728, 95% CI: 0.445~1.191; $P = 0.207$), 四种 MR 统计方法的结果见图 1。Weighted median 法(OR = 0.944, 95% CI:

0.432~2.061, $P = 0.885$)、Weighted mode 法($OR = 0.874$, 95% CI: 0.446~1.713, $P = 0.696$)支持了 IVW 法的结果。因此可知 VD 与 MFI 无因果关系,TSMR 分析的漏斗图见图 2。异质性检验结果 $Q = 2.487$, $P = 0.647$, 表明纳入的 SNPs 无明显异质性。对于水平多效性检验, MR-Egger 法截距值为 0.059 ($P = 0.599$), 表明纳入的 SNPs 无明显水平多效性, 说明工具变量并不通过暴露以外的途径影响结局。逐个剔除检验显示去除任意 SNP 后结果存在轻微不稳定(图 3)。

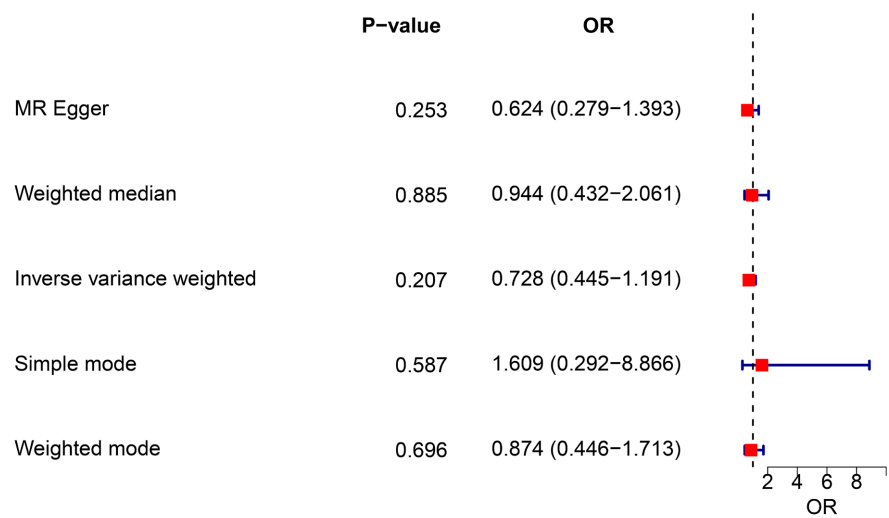


Figure 1. Forest map of MR analysis results
图 1. MR 分析结果森林图

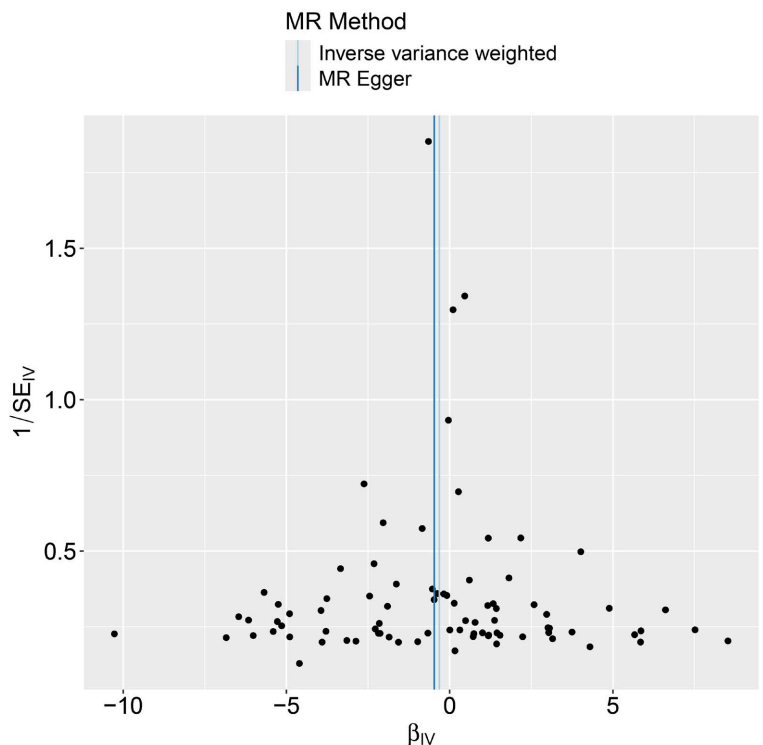


Figure 2. Funnel plot of MR analysis results
图 2. MR 分析结果漏斗图

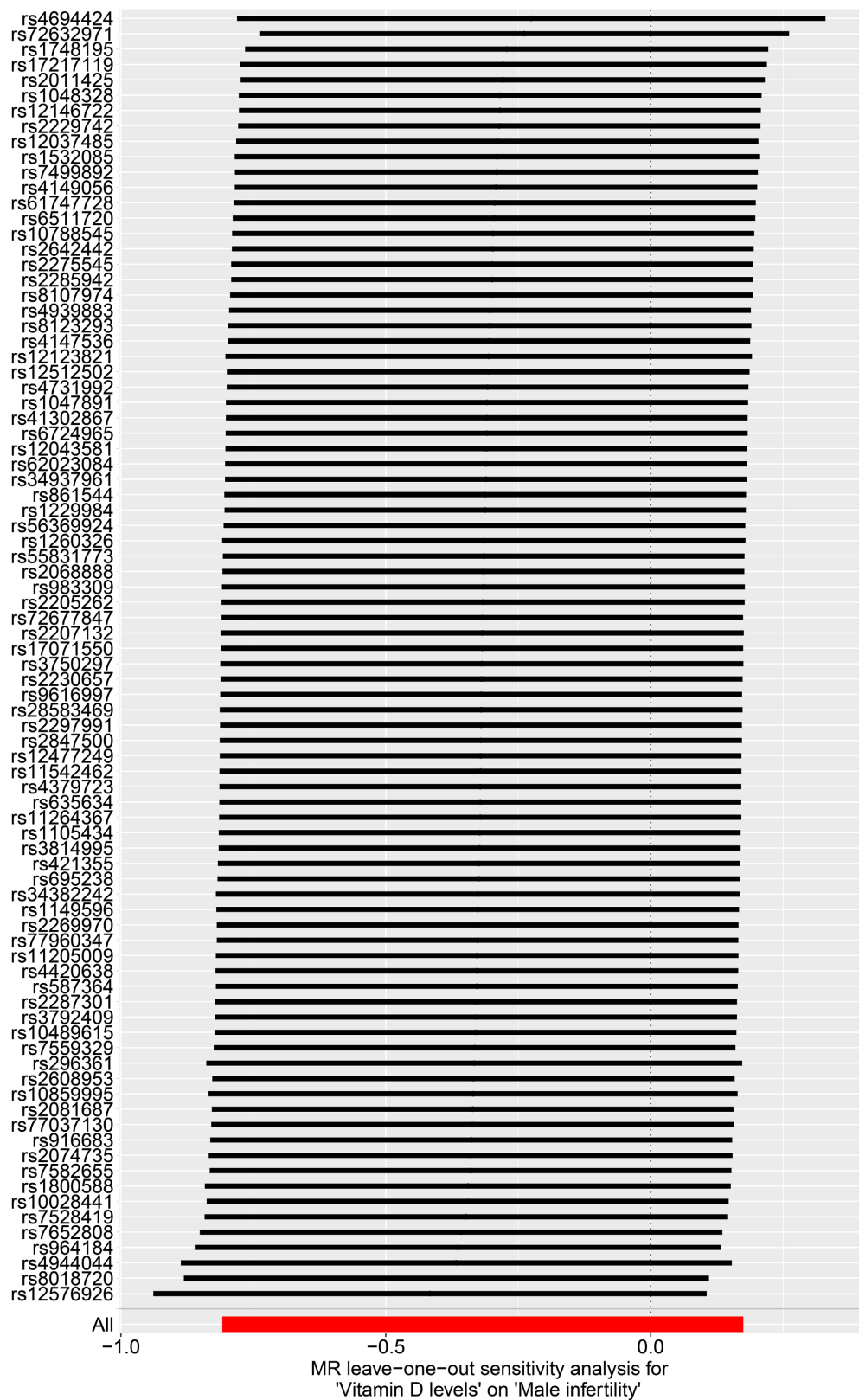


Figure 3. Rejection test results one by one
图 3. 逐个剔除检验结果

4. 讨论

这项 MR 研究的结果不支持 VD 在 MFI 中的保护作用。Blomberg Jensen 的研究小组发现,在接受 VD 治疗的 VD 缺陷男性(<25 nmol/L, n = 66)中,精子参数没有显著改善[11]。尽管总体治疗组的自然妊娠和活产率往往较高(n = 269),但没有统计学意义。另一项研究表明,VD 干预 3 个月可改善弱精子症和血清 25OHD < 30 ng/mL (n = 86)男性的精子活力,但未见妊娠结局的报道[12]。相反,Amini 等[13]进行的研究表明,VD 补充剂与 MFI 之间没有关联,但他们纳入的受试者较少(n = 62),不包括短期干预(12 周)的无精子症患者。毕竟,干预研究在干预期、VD 补充剂剂量、治疗后血清 25OHD 水平升高、研究人群和主要结局方面存在显著异质性,导致对 VD 在男性生殖中的作用没有达成共识。在患有 VD 缺乏症的特发性不育男性中,VDR 基因的甲基化显著升高,这与精子浓度和进行性运动呈负相关[14]。此外,另一项研究表明,与 1,25(OH)₂D 孵育 30 分钟可以增强精子活力,可能是通过 cAMP/PKA 途径促进三磷酸腺苷的合成[15]。近年来,氧化应激标志物在 VD 和 MFI 中的作用受到广泛关注[16]。精子由于其固有的抗氧化防御和 DNA 修复机制降低而容易受到氧化应激的影响,而 VD 作为膜抗氧化剂具有潜在的清除能力。Shahid 及其同事发现,当精子参数改变时,4-羟基壬烯醛(一种氧化应激标志物)显著升高,并且在一项横断面研究与 VD 呈负相关[16]。作为活性氧的第二信使,4-羟基壬烯醛也与精子活力和形态呈强负相关,但在其他出版物中用 VD 处理时会降低[17]。

5. 结论

我们的研究提供了遗传证据,不支持普通人群中血清 25OHD 水平升高作为 MFI 的因果保护因素。

参考文献

- [1] Chandra, A., Copen, C.E. and Stephen, E.H. (2013) Infertility and Impaired Fecundity in the United States, 1982-2010: Data from the National Survey of Family Growth. *National Health Statistics Reports*, No. 67, 1-18.
- [2] Ardestani Zadeh, A. and Arab, D. (2021) COVID-19 and Male Reproductive System: Pathogenic Features and Possible Mechanisms. *Journal of Molecular Histology*, 52, 869-878. <https://doi.org/10.1007/s10735-021-10003-3>
- [3] Zhang, Y., Fang, F., Tang, J., Jia, L., Feng, Y., Xu, P., et al. (2019) Association between Vitamin D Supplementation and Mortality: Systematic Review and Meta-analysis. *BMJ*, 366, L4673. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4673>
- [4] Rehman, R., Lalani, S., Baig, M., Nizami, I., Rana, Z. and Gazzaz, Z.J. (2018) Association between Vitamin D, Reproductive Hormones and Sperm Parameters in Infertile Male Subjects. *Frontiers in Endocrinology*, 9, Article 607. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00607>
- [5] Akhavadegan, H. and Karbakhsh, M. (2017) Comparison of Serum Vitamin D between Fertile and Infertile Men in a Vitamin D Deficient Endemic Area: A Case-Control Study. *Urologia Journal*, 84, 218-220. <https://doi.org/10.5301/uj.5000248>
- [6] Maghsoumi-Norouzabad, L., Zare Javid, A., Mansoori, A., Dadfar, M. and Serajian, A. (2021) The Effects of Vitamin D3 Supplementation on Spermatogram and Endocrine Factors in Asthenozoospermia Infertile Men: A Randomized, Triple Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19, Article No. 102. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00789-y>
- [7] Scragg, R. (2018) Limitations of Vitamin D Supplementation Trials: Why Observational Studies Will Continue to Help Determine the Role of Vitamin D in Health. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 177, 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.06.006>
- [8] Ference, B.A., Holmes, M.V. and Smith, G.D. (2021) Using Mendelian Randomization to Improve the Design of Randomized Trials. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11, a040980. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040980>
- [9] Davies, N.M., Holmes, M.V. and Davey Smith, G. (2018) Reading Mendelian Randomisation Studies: A Guide, Glossary, and Checklist for Clinicians. *BMJ*, 362, k601. <https://doi.org/10.1136/bmj.k601>
- [10] Sanderson, E., Glymour, M.M., Holmes, M.V., Kang, H., Morrison, J., Munafò, M.R., et al. (2022) Mendelian randomization. *Nature Reviews Methods Primers*, 2, Article No. 6. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00092-5>
- [11] Blomberg Jensen, M., Lawaetz, J.G., Petersen, J.H., Juul, A. and Jørgensen, N. (2017) Effects of Vitamin D Supple-

- mentation on Semen Quality, Reproductive Hormones, and Live Birth Rate: A Randomized Clinical Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **103**, 870-881. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01656>
- [12] Maghsoumi-Norouzabad, L., Zare Javid, A., Mansoori, A., Dadfar, M. and Serajian, A. (2021) Vitamin D3 Supplementation Effects on Spermatogram and Oxidative Stress Biomarkers in Asthenozoospermia Infertile Men: A Randomized, Triple-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Reproductive Sciences*, **29**, 823-835. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00769-y>
- [13] Amini, L., Mohammadbeigi, R., Vafa, M., Haghani, H., Vahedian-Azimi, A., Karimi, L., *et al.* (2020) Evaluation of the Effect of Vitamin D3 Supplementation on Quantitative and Qualitative Parameters of Spermograms and Hormones in Infertile Men: A Randomized Controlled Trial. *Complementary Therapies in Medicine*, **53**, Article ID: 102529. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102529>
- [14] Hussein, T.M., Eldabah, N., Zayed, H.A. and Genedy, R.M. (2021) Assessment of Serum Vitamin D Level and Seminal Vitamin D Receptor Gene Methylation in a Sample of Egyptian Men with Idiopathic Infertility. *Andrologia*, **53**, e14172. <https://doi.org/10.1111/and.14172>
- [15] Yao, B., Jueraitetibaike, K., Ding, Z., Wang, D., Peng, L., Jing, J., *et al.* (2019) The Effect of Vitamin D on Sperm Motility and the Underlying Mechanism. *Asian Journal of Andrology*, **21**, 400-407. https://doi.org/10.4103/aja.aja_105_18
- [16] Shahid, M., Khan, S., Ashraf, M., Akram Mudassir, H. and Rehman, R. (2021) Male Infertility: Role of Vitamin D and Oxidative Stress Markers. *Andrologia*, **53**, e14147. <https://doi.org/10.1111/and.14147>
- [17] Ke, C., Yang, F., Wu, W., Chung, C., Lee, R., Yang, W., *et al.* (2016) Vitamin D₃ Reduces Tissue Damage and Oxidative Stress Caused by Exhaustive Exercise. *International Journal of Medical Sciences*, **13**, 147-153. <https://doi.org/10.7150/ijms.13746>