

男性不育症患者精浆中 miR-145 的表达水平及其临床意义

林 彤, 廖贤平 (广州东仁医院生殖医学科, 广州 510440)

摘要: 目的 探讨男性不育症患者精浆中 miR-145 的表达水平及其临床意义。方法 招募 2017 年 1 月~2018 年 9 月男性不育症患者 130 例和同期体检正常的生育男性 50 例为正常对照组。采用实时荧光定量 PCR 检测精浆中 miR-145 的表达水平, 精液常规参数采用 WLJY-9000 伟力彩色精子检测系统进行分析。应用 ROC 曲线分析 miR-145 对男性不育症的诊断价值, 采用 Pearson 相关分析精浆中 miR-145 表达水平与精液参数的相关性。**结果** 男性不育症组精浆中 miR-145 表达水平明显高于对照组 (3.92 ± 0.86 vs 1.16 ± 0.35), 而男性不育症组精子浓度 (70.24 ± 28.60 vs 112.50 ± 46.35) $\times 10^6/\text{mL}$ 、精子存活率 (38.40 ± 7.60 vs 73.84 ± 5.82)%、前向运动精子百分率 (17.52 ± 9.73 vs 46.20 ± 5.30)% 及正常精子形态百分率 (2.60 ± 1.42 vs 9.25 ± 1.70)% 明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ($t=4.852\sim 11.238$, 均 $P<0.01$)。ROC 曲线分析显示, 精浆中 miR-145 表达水平诊断男性不育症的曲线下面积 (AUC) 为 0.864 (95%CI: 0.807~0.925), 其最佳诊断截断值为 2.15, 敏感度和特异度分别为 92.8% 和 75.0%。相关分析显示, 男性不育症患者精浆中 miR-145 表达水平与精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率均呈正相关 ($r=0.427, 0.604, 0.538$, 均 $P<0.01$)。**结论** 精浆中 miR-145 表达水平在男性不育症患者中明显上调, 且精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率呈正相关, 有望作为男性不育症的辅助诊断指标。

关键词: 男性不育症; 微小核糖核酸 -145

中图分类号: R698.2; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 03-039-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.03.009

Expression of miR-145 in Seminal Plasma of Male Infertility Patients and Its Clinical Significance

LIN Tong, LIAO Xian-ping

(Department of Reproductive Medicine, Guangzhou Dongren Hospital, Guangzhou 510440, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-145 in seminal plasma of male infertility patients and its clinical significance. **Methods** 130 male infertility patients and 50 fertile males with normal physical examination as normal control group from January 2017 to September 2018 were recruited. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miR-145 in seminal plasma. The conventional parameters of semen were analyzed by WLJY-9000 Weili color sperm detection system. ROC curve was used to analyze the diagnostic value of miR-145 in male infertility. Pearson correlation was used to analyze the correlation between miR-145 expression level in seminal plasma and semen parameters. **Results** The expression level of miR-145 in seminal plasma of male infertility group was significantly higher than that of control group (3.92 ± 0.86 vs 1.16 ± 0.35). The sperm concentration (70.24 ± 28.60 vs 112.50 ± 46.35) $\times 10^6/\text{ml}$, sperm survival rate (38.40 ± 7.60 vs 73.84 ± 5.82)%, forward motility sperm percentage (17.52 ± 9.73 vs 46.20 ± 5.30)% and normal sperm morphology percentage (2.60 ± 1.42 vs 9.25 ± 1.70)% in male infertility group were significantly lower than those in control group, the differences were not statistically significant ($t=4.852\sim 11.238$, all $P<0.01$). ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of seminal plasma miR-145 expression level in diagnosis of male infertility was 0.864 (95% CI: 0.807~0.925). The best diagnostic truncation value was 2.15, and the sensitivity and specificity were 92.8% and 75.0%, respectively. The correlation analysis showed that the expression level of miR-145 in seminal plasma of male infertility patients was positively correlated with sperm concentration, sperm survival rate and forward motile sperm percentage ($r=0.427, 0.604, 0.538$, all $P<0.01$). **Conclusion** The expression of miR-145 in seminal plasma was significantly up-regulated in male infertility patients, and there was a positive correlation among sperm concentration, sperm survival rate and percentage of forward motile sperm, which was expected to be used as an auxiliary diagnostic index for male infertility.

Keywords: male infertility; miR-145

男性不育症是指未采取任何避孕措施, 夫妇同居一年以上由于男性方面的原因导致女方不能受孕者。随着社会的快速发展, 生活节奏的不断变

化, 不育症患病率近年来呈明显上升的趋势, 影响了世界范围内大约 15% 的育龄夫妇, 其中男性不育症占 20%^[1-2]。近年来研究发现, 微小核糖核酸

(microRNA, miR) 参与细胞周期、凋亡的调控, 在精子形成和早期胚胎发育等过程中发挥着重要作用, 其中 miR-145 与精子的发生、凋亡关系密切相关^[3-4]。本研究通过检测男性不育症患者精浆 miR-145 表达水平, 分析 miR-145 诊断男性不育症的价值, 旨在为男性不育症的诊断及靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 1 月 ~ 2018 年 9 月深圳市龙华区妇幼保健院收治的男性不育症患者 130 例, 年龄 25 ~ 46 (34.20 ± 5.35) 岁。纳入标准: ①符合世界卫生组织《人类精液检查与处理实验室手册》中的诊断标准; ②婚后性生活正常, 未避孕 1 年以上因男方原因不育者。另招募同期体检正常的生育男性 50 例为正常对照组, 年龄 24 ~ 43 (32.80 ± 4.90) 岁。

1.2 主要仪器及试剂 WLJY-9000 伟力彩色精子检测系统 (北京伟力公司)。TaqMan MicroRNA Reverse Transcription 逆转录试剂盒, TaqMan miRNA qPCR 试剂盒, TaqMan small RNA 引物 (5 ×), Taq Man small RNA 引物 (20 ×), ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪均购自美国 ABI 有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集: 采集精液前禁欲 3 ~ 7 天, 自慰法收集精液于干燥消毒的无菌容器中, 置 37℃ 恒温箱中温育 30 min, 液化后先行精液常规检查, 然后 1 500 r/min 离心 10 min, 再以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 (精浆) 保存于 -80℃ 待检。

1.3.2 精浆 RNA 提取: 取 200 μl 预处理的精浆加入 1 ml TRIzol 中充分均匀, 将匀浆液倒入 1.5 ml 离心管中, 再依次加入氯仿、异丙醇及 95 ml/dl 乙醇, 提取总 RNA。

1.3.3 miR-145 检测: 在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量聚合酶链反应。反应体系为 20 μl: TaqMan MicroRNA Assay 1.00 μl, cDNA 1.33 μl, TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix 10.00 μl, ddH₂O 7.67 μl, 混合后离心放入定量 PCR 仪。扩增条件为: 95℃ 预变性 10 min、95℃ 变性 15 s、60℃ 复性 60 s 进行 45 个循环, 实验重复 3 次。以 U6 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-145 的相对表达水平, 其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{U6}$ 。

1.4 统计学分析 采用 SPSS20.0 统计软件分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用成组 *t* 检验。绘制受试者工作特征曲线 (ROC) 分析 miR-145 对男性不育症的诊断价值。相关性分析采用 Pearson 相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 男性不育症组和对照组精液常规主要参数及精浆中 miR-145 表达水平比较 见表 1。男性不育症组精浆中 miR-145 表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 男性不育症组精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率及正常精子形态百分率明显低于对照组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05)。

表 1 男性不育症组和对照组精液常规主要参数及精浆中 miR-145 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=50)	男性不育症组 (n=130)	t	P
精子浓度 (× 10 ⁶ /ml)	112.50 ± 46.35	70.24 ± 28.60	4.852	0.012
精子存活率 (%)	73.84 ± 5.82	38.40 ± 7.60	11.238	<0.001
前向运动精子百分率 (%)	46.20 ± 5.30	17.52 ± 9.73	10.816	<0.001
正常精子形态百分率 (%)	9.25 ± 1.70	2.60 ± 1.42	8.913	<0.001
miR-145	1.16 ± 0.35	3.92 ± 0.86	7.540	<0.001

2.2 精浆 miR-145 表达水平对男性不育症的诊断价值 见图 1。精浆中 miR-145 表达水平诊断男性不育症的曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.864 (95%CI: 0.807 ~ 0.925), 当 miR-145 取最佳诊断截断值为 2.15 时, 其敏感度和特异度分别为 92.8% 和 75.0%。

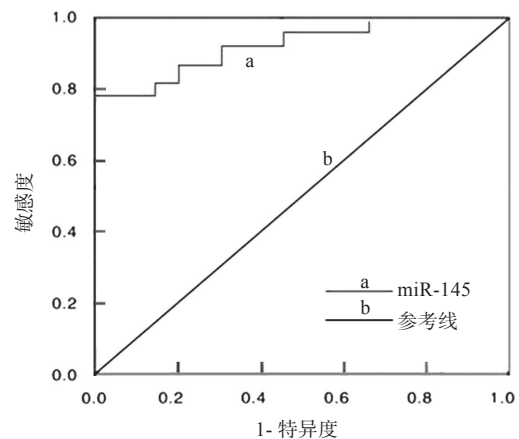


图 1 精浆 miR-145 表达水平诊断男性不育症的 ROC 曲线

2.3 精浆中 miR-145 表达水平与精液参数的相关性分析 见图 2。Pearson 相关分析显示, 男性不育症患者精浆中 miR-145 表达水平与精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率均呈正相关 ($r=0.427, 0.604, 0.538, P<0.01$), 与正常精子形态百分率无相关性 ($r=0.121, P>0.05$)。对照组精浆中 miR-145 表达水平与精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率及正常精子形态百分率均无明显相关性 ($r=0.153, 0.106, 0.117, 0.096, P>0.05$)。

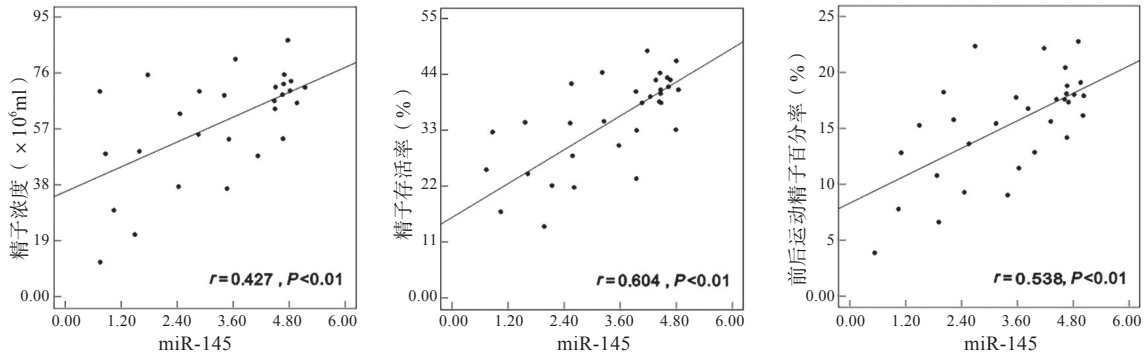


图2 男性不育症患者精浆中 miR-145 表达水平与精液参数的相关性

3 讨论

男性不育症是多因素相互作用而引起的疾病，其发病机制包括遗传因素和环境因素的相互作用，其中遗传因素被认为是导致人类生精功能损伤的重要因素^[5]。microRNA 是一类长度为 21~ 25 nt 的内源性单链非编码 RNA 小分子，可调节细胞的增殖、凋亡、迁移及分化等过程，在激素、内分泌干扰素和营养状况等多种因素作用下发生特异性变化^[6-7]。有研究表明，microRNA 在男性不育、精囊腺及前列腺疾病中异常表达，与精子发生、发育和成熟的过程关系密切^[8-9]。CHEN 等^[10]使用 RT-PCR 技术分析了猪类精液中 microRNA 的表达情况，发现精子参数异常的精液中 microRNA 的表达序列与正常对照组相比存在差异。

本研究显示，男性不育症组精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率及正常精子形态百分率明显低于对照组，男性不育症组精浆中 miR-145 表达水平明显高于对照组，提示精浆中 miR-145 在男性不育症患者中呈高表达，其可能参与男性不育症的发生发展。KOTAJA 等^[11]研究发现，精浆中 microRNA 表达水平上调，可能与精子的减少有关，这为了解男性不育症的发病机制提供依据。本研究通过相关分析显示，男性不育症患者精浆中 miR-145 表达水平与精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率均呈正相关。提示 miR-145 的高表达可能影响精子的质量。NOVESKI 等^[12]研究表明，正常的精子发生与生精障碍的 microRNA 具有不同的表达模式，这些差异表达的 microRNA 与男性不育症有关。本研究应用 ROC 曲线分析显示，精浆中 miR-145 表达水平诊断男性不育症的 AUC 为 0.864 (95%CI: 0.807~ 0.925)，当 miR-145 取最佳诊断截断值为 2.15 时，其敏感度和特异度分别为 92.8% 和 75.0%。提示精浆中 miR-145 表达水平可能是评估男性生殖能力的生物学指标，有望为男性不育症提供新的治疗靶点。WANG 等^[13]研究发现，与对照组相比，精浆中 microRNA 在无精子症中显著降

低，但在弱精子症中增加，精浆中 microRNA 的测定为诊断男性不孕症提供了一种新的无创方法。另有研究显示，正常对照者和不育男性中 microRNA 表达存在明显差异，microRNA 有潜力作为新的无创生物学标志物来诊断男性不育症^[14]。

综上所述，精浆中 miR-145 在男性不育症患者中明显上调，且与精子浓度、精子存活率、前向运动精子百分率呈正相关，有望作为男性不育症的辅助诊断指标，同时也为该病的靶向治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] MEHRA B L, SKANDHAN K P, PRASAD B S, et al. Male infertility rate: a retrospective study[J]. Urologia, 2018, 85(1): 22-24.
- [2] YUMURA Y, TSUJIMURA A, IMAMOTO T, et al. Nationwide survey of urological specialists regarding male infertility: results from a 2015 questionnaire in Japan[J]. Reprod Med Biol, 2017, 17(1): 44-51.
- [3] ZHANG L, DING Xian, NIE Shuangshuang, et al. Association of hsa-miR-145 overexpression in human testicular cells with male infertility[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4365-4372.
- [4] PROCÓPIO M S, DE AVELAR G F, COSTA G M J, et al. MicroRNAs in sertoli cells: implications for spermatogenesis and fertility[J]. Cell Tissue Res, 2017, 370(3): 335-346.
- [5] FLANNIGAN R, SCHLEGEL P N. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 44(10): 26-37.
- [6] YU Hianying, SUN Jianying, JIANG Shaochang, et al. MicroRNA-490-3p regulates cell proliferation and apoptosis in gastric cancer via direct targeting of AKT1[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(2): 1330-1336.
- [7] ROBINSON C L, ZHANG Lingna, SCHÜTZ L F, et al. MicroRNA 221 expression in theca and granulosa cells: hormonal regulation and function[J]. J Anim Sci, 2018, 96(2): 641-652.
- [8] LI Cailing, YANG Bo, PAN Peng, et al. MicroRNA-130a inhibits spermatogenesis by directly targeting androgen receptor in mouse Sertoli cells[J]. Mol Reprod Dev, 2018, 85(10): 768-777.

(下转第 46 页)