

男性不育患者精浆 miR-551b 水平变化及其临床价值*

朱媛媛^{1a}, 顾万建^{1b}, 徐 天^{1b}, 邵 永^{2a}, 王 成^{2b}, 张春妮^{2b} (1. 江苏省中医院 a. 科技处;
b. 检验科, 南京 210029; 2. 南京总医院 a. 生殖医学中心; b. 检验科, 南京 210002)

摘要:目的 检测和分析男性不育症患者精浆 miR-551b 水平变化, 探讨其作为男性不育症辅助分子标志物的可能性。方法 选取 2008 年 11 月~2015 年 3 月在南京总医院生殖医学中心和江苏省中医院男科门诊确诊的 92 例男性不育症患者及同期招募的 34 例年龄匹配正常生育男性精液标本, 记录患者及对照临床资料, 测定患者及对照精液参数包括精子密度、精子活率、a 级精子比例、a+b 级精子比例及部分精浆生化指标 α -糖苷、酸性磷酸酶、肉毒碱、果糖水平。实时荧光定量 PCR 技术 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测和比较弱精症、非梗阻性无精症患者及正常生育男性精浆中 miR-551b 含量变化, 统计分析精浆 miR-551b 临床价值及与精液参数、精浆生化指标相关性。结果 qRT-PCR 结果显示, 正常生育组精浆 miR-551b 水平为 20.63(9.59, 37.83) fmol/L, 弱精症患者为 62.29(25.22, 101.43) fmol/L, 较正常生育组显著升高 ($U=297.00$); 无精症患者精浆 miR-551b 水平为 4.70(2.41, 13.71) fmol/L, 较正常生育组明显降低 ($U=356.00$), 差异均具有统计学意义 ($P<0.001$)。受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 分析显示, 精浆 miR-551b 区分弱精症、无精症患者与正常生育组的 ROC 曲线下面积 (AUC ROC) 分别为 0.810(95%CI 0.718~0.902) 和 0.772(95%CI 0.667~0.878); 鉴别弱精症和无精症患者的 AUC ROC 为 0.932(95%CI 0.885~0.979)。Spearman 秩相关性分析显示, 男性不育患者精浆 miR-551b 水平与精子密度 ($r=0.735$)、精子活率 ($r=0.643$)、a 级精子比例 ($r=0.672$)、a+b 级精子比例 ($r=0.682$) 及 α -糖苷 ($r=0.375$) 呈正相关, 差异均具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。逐步多元线性回归结果显示, 男性不育症患者精浆 miR-551b 水平与精子密度呈显著独立相关 ($\beta=0.618$, $P<0.001$, 校正 $r^2=0.368$)。逻辑回归分析显示, 精浆 miR-551b 是弱精症 [OR = 24.889(95%CI 5.302~116.843), $P<0.001$] 和无精症 [OR = 6.303(95%CI 1.316~30.179), $P=0.021$] 的潜在危险因素。结论 男性不育症患者精浆 miR-551b 水平与正常生育男性存在明显差异, 且与精子密度和活力密切相关, 有潜力成为男性不育患者辅助诊断和鉴别诊断的新型分子标志物。

关键词:微小核糖核酸-551b; 男性不育症; 精浆; 弱精症; 无精症; 分子标志物

中图分类号: R698.2; R446.19 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)06-001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.001

Clinical Value of Seminal Plasma miR-551b in the Diagnosis of Male Infertility

ZHU Yuan-yuan^{1a}, GU Wan-jian^{1b}, XU Tian^{1b}, SHAO Yong^{2a}, WANG Cheng^{2b}, ZHANG Chun-ni^{2b}

(1a. Department of Science and Technology; 1b. Department of Clinical Laboratory,

Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China; 2a. Reproductive Medical Center;
2b. Department of Clinical Laboratory, Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To investigate the alteration pattern of seminal plasma miR-551b in infertile men and further evaluate the diagnostic potential of seminal plasma miR-551b as an auxiliary molecular marker for male infertility. **Methods** Semen samples were collected from 92 infertile men and 34 age-matched fertile controls in Nanjing General Hospital and Jiangsu Province Hospital of TCM between November 2008 and March 2015. Semen parameters including sperm density, motility rate, the ratio of grade a spermatozoon and grade a+b spermatozoon, as well as seminal plasma biochemical indexes such as alpha-glucosidase, acid phosphatase, carnitine and fructose were assessed. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) assays were used to determine the concentrations of seminal plasma miR-551b in the patients with asthenozoospermia, non-obstructive azoospermia and fertile controls. Statistical analyses were performed to evaluate the clinical value of seminal plasma miR-551b for male infertility as well as to assess the clinical association between the levels of seminal plasma miR-551b and other semen and seminal plasma parameters. **Results** The seminal plasma levels of miR-551b in the asthenozoospermia group [62.29 (25.22, 101.43) fmol/L] were significantly higher than that in the fertile control [20.63 (9.59, 37.83) fmol/L] ($U=297.00$, $P<0.001$), but with markedly lower concentration in the non-obstructive azoospermia group [4.70 (2.41, 13.71) fmol/L] as compared with the controls ($U=356.00$, $P<0.001$). ROC curve analysis showed that AUCs of miR-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81401257); 江苏省中医院院级创新发展基金 (Y2018CX07)。

作者简介: 朱媛媛 (1989—), 女, 在读硕士研究生, 实习研究员, 从事微小核糖核酸临床价值及功能研究, E-mail: zyta1010@126.com。

通讯作者: 王 成 (1985—), 男, 博士, 主管技师, E-mail: wangchengnju@163.com。

张春妮 (1963—), 女, 博士, 主任技师, 博士生导师, E-mail: zchunni27@hotmail.com。

551b for discriminating asthenozoospermia and non-obstructive azoospermia were 0.810 (95%CI 0.718~0.902) and 0.772 (95% CI 0.667~0.878), respectively, and that the AUCs for differentiating asthenozoospermia and non-obstructive azoospermia was 0.932 (95%CI 0.885~0.979). Spearman rank correlations analyses showed that the levels of seminal plasma miR-551b were significantly associated with sperm density ($r=0.735$), motility rate ($r=0.643$), the ratio of grade a spermatozoon ($r=0.672$), the ratio of grade a+b spermatozoon ($r=0.682$) and alpha-glucosidase ($r=0.375$), all with statistical significance (all $P<0.05$) in male infertility. Multiple linear regression analyses revealed that seminal plasma miR-551b was independently associated with sperm density ($\beta=0.618$, $P<0.001$, adjusted ($r^2=0.368$) after adjust other co-factors. Furthermore, logistic regression analyses demonstrated that seminal plasma miR-551b was a potential risk factor for asthenozoospermia [OR=24.889 (95%CI 5.302~116.843), $P<0.001$] and non-obstructive azoospermia [OR=6.303 (95% CI 1.316~30.179), $P=0.021$]. **Conclusion** The levels of seminal plasma miR-551b in patients with male infertility were significantly different from that in fertile men, and closely associated with sperm density and motility, which indicating that miR-551b may be a novel auxiliary molecular marker for diagnosing and differentiating male infertility.

Keywords: miR-551b; male infertility; seminal plasma; asthenozoospermia; azoospermia; biomarker

不育症影响了世界范围内大约15%的育龄夫妇,其中男性因素导致不育约占一半^[1]。现有男性不育的诊断方法主要有精液常规检查、内分泌和基因分析、睾丸活检或穿刺,但对于准确区分不育男性价值仍然有限^[2]。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类在人和哺乳动物中进化高度保守的小分子非编码RNA,可通过与靶基因信使RNA 3'端非翻译序列完全或不完全碱基配对,在转录后水平调节靶基因蛋白表达。研究显示,miRNA广泛参与睾丸发育、精子发生等生理过程,其表达异常与男性不育密切相关^[3]。近年来研究发现,哺乳动物和人精浆中也含有丰富、稳定表达miRNA,且男性不育患者精浆miRNA表达谱与正常生育男性存在明显差异,一些精浆miRNA在患者中呈现出显著、稳定的变化,具备作为男性不育新型生物标志物潜能^[4]。miR-551b是人第3号染色体编码的一种与细胞增殖和凋亡相关的miRNA,在多种肿瘤中都具有重要的调控作用^[5,6]。最新研究显示,miR-551b基因单核苷酸多态性和精子运动能力相关^[7],提示其可能参与了雄性生殖系统发育及精子活力调节,但其在不育男性精浆中表达变化趋势及与男性不育关系目前尚未见报道。因此,本研究拟通过测定男性不育症患者精浆miR-551b水平,探讨其水平变化与男性不育的关系及作为男性不育新型辅助分子标志物的潜能。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取2008年11月~2015年3月在江苏省中医院男科门诊和南京总医院生殖医学中心就诊的男性不育症患者92例,其中非梗阻性无精症患者46例,弱精症患者46例,年龄19~41岁,平均年龄 29.12 ± 4.46 岁,入组标准为:夫妻性生活正常且未行避孕措施2年以上而未能生育者;排除标准为:患精索静脉曲张、感染、内分泌系统及其他慢性疾病。同期招募已育有1个及以上小孩的正常生育男性34例,年龄22~47岁,平

均年龄 30 ± 4.89 岁,精液参数均在正常范围内。患者及对照在样本采集期间均未服用过任何药物。采集精液前禁欲3~7天,洗净双手,利用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1 500 r/min离心10 min,再以12 000 r/min离心5 min,取上清(精浆)冻存于-80℃待用。

1.2 主要试剂及仪器 水饱和酚(pH=4.3,美国Sigma-Aldrich公司),去RNA酶的DEPC水(美国Sigma-Aldrich公司),分析纯级别氯仿、异丙醇、无水乙醇(上海国药化学试剂公司),dNTP、AMV逆转录酶、5×AMV buffer缓冲液、10×PCR buffer缓冲液、25 mmol/L MgCl₂、耐热的rTaq DNA聚合酶(均购自TaKaRa公司);hsa-miR-551b逆转录引物、qRT-PCR引物及探针组合试剂盒(美国ABI公司);人工合成hsa-miR-551b成熟体(上海Invitrogen公司);2720型普通PCR仪、7300型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司);常温低速离心机(B320A型,河北白洋离心机厂);5418型高速冷冻离心机(Eppendorf公司)计算机辅助精液分析系统(CASA, WLJY-9000精子分析仪,北京伟力公司);BS60型恒温水浴箱(北京市医疗设备厂);SAS67120型超纯水机(Millipore)公司;Vortex-Genie2涡旋混合器(美国Scientific Industries公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 精浆RNA提取:按课题组前期建立的方法^[8],采用酸性水饱和酚-氯仿法进行抽提精浆总RNA,所得RNA沉淀经75 ml/dl无水乙醇洗涤、晾干后溶于20 μl DEPC水并保存于-80℃用于后续miRNA测定。

1.3.2 miR-551b逆转录及实时荧光定量PCR:
①cDNA的合成:精浆miR-551b逆转录PCR反应总体积为10 μl,包括10 mmol/L dNTP 1.0 μl,去RNA酶DEPC H₂O 3.5 μl,5×AMV酶缓冲液

2.0 μl , AMV 逆转录酶 0.5 μl , RNA 样品 2.0 μl , miR-551b 逆转录引物 1.0 μl 。逆转录反应条件及程序参数为: 16 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 每个反应均为 1 个循环。②实时荧光定量 PCR 检测 miR-551b 水平: qRT-PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer 2.0 μl , 10 mmol/L dNTP 0.4 μl , 25 mmol/L MgCl_2 1.2 μl 、耐热的 Taq DNA 聚合酶 0.3 μl , cDNA 1.0 μl , miR-551 上、下游引物及 TaqMan 探针 0.33 μl , 最后加 ddH₂O 补足总反应体积为 20 μl 。qRT-PCR 反应条件及程序参数为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环。精浆 miR-551b 表达量的计算按课题组前期建立方法^[8], 采用标准曲线及待测样本的 C_t 值计算。每个样本 miR-551b 检测过程中设三复孔, 同时以 DEPC H₂O 阴性对照。

1.4 统计学分析 数据统计采用 SPSS 16.0 统计软件和 Graphpad 6.0 软件。精浆 miR-551b 含量以中位数(四分位数)[M (P_{25} , P_{75})]表示, 并采用非参数 Mann-Whitney U 检验分析、比较三组间精浆 miR-551b 水平的统计学差异。运用 ROC 曲线分析 miR-551b 对男性不育患者的辅助诊断价值。采用 Spearman 秩相关性分析精浆 miR-551b 与其他指标间相关性。精浆 miR-551b 与男性不育症的关系采用逻辑回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

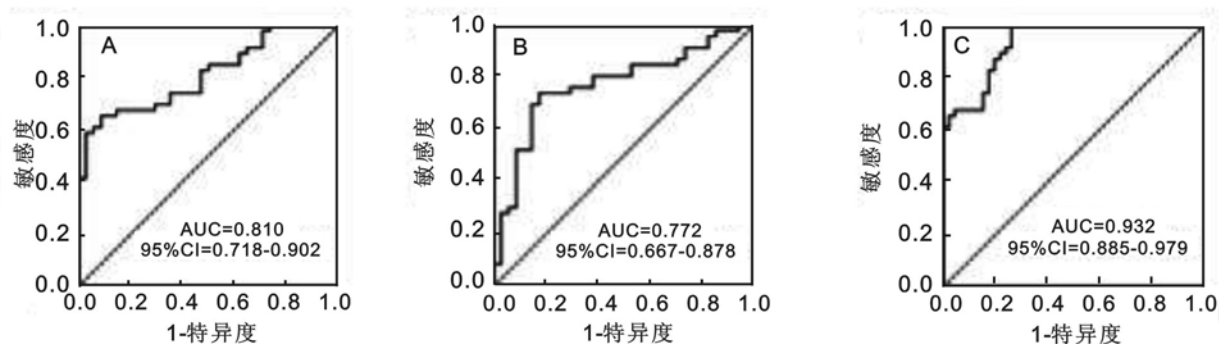
2 结果

2.1 精液参数及精浆常规生化指标测定结果 与

正常生育组相比, 弱精症患者精子密度差异无统计学意义, 精子活力降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 无精症患者精子密度和活力均为零。弱精症、无精症患者精液常规生化标志物除 α -糖苷之外, 其他指标如酸性磷酸酶、肉毒碱、果糖水平与对照相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 精浆 miR-551b 水平检测 与正常生育组 [20.63 (9.59, 37.83) fmol/L] 相比, 弱精症患者精浆中 miR-551b 含量 [62.29 (25.22, 101.43) fmol/L] 显著增加 ($U = 297$, $P < 0.001$), 无精症患者精浆中 miR-551b 含量 [4.70 (2.41, 13.71) fmol/L] 显著降低 ($U = 356$, $P < 0.001$), 无精症患者精浆 miR-551b 含量较弱精症患者亦明显降低 ($U = 144$, $P < 0.001$), 差异均具有统计学意义。

2.3 ROC 曲线分析 运用 ROC 曲线分析精浆 miR-551b 水平对于男性不育患者区分的临床价值, 结果见图 1。精浆 miR-551b 区分弱精症患者与正常对照组的 AUC ROC 为 0.810 (95% CI 0.718~0.902), 最佳诊断截点为 49.44 fmol/L, 其特异度和敏感度分别为 91.2% 和 65.2%; 区分无精症患者与正常对照组的 AUC ROC 为 0.772 (95% CI 0.667~0.878), 最佳诊断截点为 8.09 fmol/L, 其特异度和敏感度分别为 82.4% 和 73.9%; 鉴别弱精症患者和无精症患者的 AUC ROC 为 0.932 (95% CI 0.885~0.979), 最佳诊断截点为 9.02 fmol/L, 其特异度和敏感度分别为 73.9% 和 100%。



注: A. 区分弱精症患者和正常生育对照 ROC 曲线; B. 区分无精症患者和正常生育对照 ROC 曲线; C. 鉴别弱精症患者和无精症患者 ROC 曲线

图 1 精浆 miR-551b 区分男性不育症的 ROC 曲线分析

2.4 男性不育症患者精浆 miR-551b 与其他指标的相关性 Spearman 秩相关性分析结果显示, 全部不育症患者精浆 miR-551b 水平与精子密度 ($r = 0.735$)、精子活率 ($r = 0.643$)、a 级精子比例 ($r = 0.672$)、a+b 级精子比例 ($r = 0.682$) 及 α -糖苷 ($r = 0.375$) 呈显著正相关 (均 $P < 0.05$), 而与酸性磷酸酶 ($r = -0.078$), 肉毒碱 ($r = 0.067$) 及果糖 ($r = -0.25$) 均无相关性 (均 $P > 0.05$)。进一步的逐步多元线性回归分析显示, 在校正其他相关因素的

影响下, 不育症患者精浆 miR-551b 水平则与精子密度呈显著独立相关 ($\beta = 0.618$, $P < 0.001$, 校正 $r^2 = 0.368$)。

2.5 逻辑回归分析 运用逻辑回归分析精浆 miR-551b 与男性不育症的关系及其临床价值结果显示, 当以正常生育对照为二分类参考变量时, miR-551b 是弱精症患者 [$OR = 24.889$ (95% CI 5.302 ~ 116.843), $P < 0.001$] 和无精症患者 [$OR = 6.303$ (95% CI 1.316 ~ 30.179), $P = 0.021$] 的

危险因素。

3 讨论 目前尚缺乏可靠的分子标志物用于男性不育的辅助诊断,WHO推荐常规精液分析(包括精子密度、活力、形态等)作为男性不育的主要诊断方法,但研究显示仅有40%~60%的男性不育患者表现出精液参数异常,且部分患者精液异常并不能排除正常生育的可能性。精液常规生化标志物,如酸性磷酸酶、肉毒碱、果糖和 α -糖苷等,其诊断特异度和敏感度都较差。另有研究显示,精液脱落细胞检测对无精子症具备一定诊断和参考价值,可部分代替睾丸活检,但其临床价值尚需进一步验证^[9],故睾丸活检仍是无精子症患者诊断和治疗的重要手段,但睾丸活检具有侵入性,因此迫切需要新的非侵入性分子标志物用于评价男性不育^[10]。最新研究发现,miRNA在睾丸组织和细胞中特异高表达,并在睾丸发育和精子发生过程中发挥重要作用^[3]。睾丸生精功能障碍时,miRNA的特异变化能够在精浆中体现,可作为男性不育新的潜在分子标志物。

本研究发现男性不育患者和正常生育对照精浆miR-551b含量显著不同,相较于正常生育对照,弱精症患者精浆miR-551b含量显著增加,而无精症患者精浆miR-551b含量显著降低,提示精浆miR-551b有潜力成为男性不育症的诊断指标。由于无精症患者精子数目明显下降,猜测精浆miR-551b可能来源于精子细胞,而弱精症患者由于精子功能发生改变导致凋亡增加,因此精子细胞中miR-551b释放增多导致精浆中含量增加可能是其精浆miR-551b升高的潜在机制。ROC曲线结果分析显示miR-551b对弱精症和无精症具有较高的诊断价值。同时,对弱精症和无精症鉴别诊断的敏感度达100%,表明精浆miR-551b还有望成为男性不育鉴别诊断的分子标志物。相关性分析显示,miR-551b和精子密度、活率、前向运动(a/a+b级)精子比例密切相关,结合逻辑回归的结果显示miR-551b是弱精症和无精症的危险因素,提示miR-551b可能参与了精子发生和精子运动。事实上,Fernandez等^[7]报道miR-551b单核苷酸多态性和公牛精子前向运动相关,进一步佐证了miR-551b参与了精子活动能力的调节。另有研究指出,miR-551b可调节参与TGF- β 通路、细胞增殖和凋亡相关的靶基因表达^[11],而TGF- β 转录因子基因家族在睾丸发育和精子发生中有重要的调节作用^[12],因此推测miR-551b可能通过参与TGF- β 通路调节在精子发生中发挥重要作用。

我们的研究仍存在一定局限性。首先,研究样本量相对较少,后续的研究中应需扩大样本量;第

二,我们仍需对miR-551b的靶基因及其在精子发生和运动中的功能进行研究,以期揭示其在男性不育症中的参与机制;另外,精浆miR-551b的具体来源、存在形式及是否具备一定的生理病理功能目前尚不清楚。最新研究显示,精浆miRNA可包裹于微囊泡如外泌体(exosome)中,特定细胞通过主动分泌exosome并以其为天然生物载体携带miRNA进入受体细胞发挥生理病理功能^[13,14]。因此,对精浆miR-551b的可能来源、存在形式及可能去向进行深入研究可为揭示精浆miRNA生理功能、男性不育发生潜在分子机制提供新的方向。

综上所述,精浆miR-551b在弱精症患者中含量增加,在无精症患者中含量降低,并与精子密度、活率、前向运动密切相关,且miR-551b是弱精症和无精症的危险因素,表明精浆miR-551b有潜力成为新的男性不育诊断和鉴别诊断分子标志物,同时,上述结果为男性不育的分子机制研究提供了新的思路和理论依据。

参考文献:

- [1] Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, et al. A unique view on male infertility around the globe[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13(1): 37.
- [2] Boissière A, Gala A, Ferrières-Hoa A, et al. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility[J]. *Basic Clin Androl*, 2017, 27(1): 7.
- [3] Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis[J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(6): 1552-1562.
- [4] Abu-Halima M, Ludwig N, Hart M, et al. Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia[J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(5): 1061-1069. e3.
- [5] Wei Z, Liu Y, Wang Y, et al. Downregulation of Foxo3 and TRIM31 by miR-551b in side population promotes cell proliferation, invasion, and drug resistance of ovarian cancer[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(11): 126.
- [6] Song GY, Zhang HC, Chen CL, et al. miR-551b regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer by inhibiting ERBB4 expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45725-45735.
- [7] Fernández ME, Prando A, Rogberg-Muñoz A, et al. Association of a region of bovine chromosome 1 (BTA1) with age at puberty in Angus bulls[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2016, 28(10): 1618-1621.
- [8] Wang C, Hu JC, Lu ML, et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7610.
- [9] 袁长巍, 曹兴午. 精液脱落细胞检测在无精子症中的应用价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(6): 1-7, 9.
- [10] Yuan CW, Cao XW. Application value of detection of sperm cells exfoliated in the absence (下转8页)

(上接4页)

- of sperm[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(6): 1-7, 9.
- [10] Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility[J]. Fertil Steril, 2014, 102(4): 989-997, e1.
- [11] Kubo E, Hasanova N, Sasaki H, et al. Dynamic and differential regulation in the microRNA expression in the developing and mature cataractous rat lens[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(9): 1146-1159.
- [12] Pierucci-Alves F, Midura-Kiela MT, Fleming SD, et al. Transforming growth factor beta signaling in dendritic cells is required for immunotolerance to sperm in the epididymis[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1882.
- [13] 蒲双双, 李金星. 外泌体在疾病实验诊断和临床治疗中的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(4): 160-164.
- Pu SS, Li JX. Research progress of exosome in the laboratory diagnosis and clinic treatment of disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(4): 160-164.
- [14] Barceló M, Mata A, Bassas L, et al. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue[J]. Hum Reprod, 2018, 33(6): 1087-1098.

收稿日期: 2018-09-21

修回日期: 2018-09-29