

• 论 著 •

男性不育症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平变化及临床意义*

卞玉莹^{1,2}, 王 成², 顾万建³, 倪吴花⁴, 张春妮^{2△}

(1. 江苏大学医学院, 江苏镇江 212013; 2. 中国人民解放军东部战区总医院临床检验科, 江苏南京 210002; 3. 江苏省中医院检验科, 江苏南京 210029; 4. 温州医科大学附属第一医院生殖医学中心, 浙江温州 325000)

摘 要:目的 探讨男性不育症患者精浆外泌体微小 RNA-202-5p(miR-202-5p)水平变化及其在男性生殖中的临床意义。方法 选取于解放军东部战区总医院、江苏省中医院及温州医科大学附属第一医院就诊的男性不育症患者 107 例为研究对象, 其中无精症患者 53 例, 弱精症患者 54 例; 另选取同期招募的 53 例正常生育的健康男性为对照组。采用实时荧光定量 PCR 技术检测精浆外泌体 miR-202-5p 水平, 分析其在男性不育症中的诊断价值及与精液参数的相关性, 采用生物信息学分析软件预测其靶基因、相关通路及靶蛋白相互作用网络。**结果** 与对照组比较, 弱精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平明显增加($P<0.05$), 无精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平明显降低($P<0.05$); 无精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平较弱精症患者明显降低($P<0.05$)。受试者工作特征曲线分析结果显示, 精浆外泌体 miR-202-5p 诊断弱精症的曲线下面积(AUC) 为 0.664, 诊断无精症的 AUC 为 0.785, 对弱精症和无精症鉴别诊断的 AUC 为 0.878。弱精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平与 a+b 级前向运动精子比例呈负相关($r=-0.312, P<0.05$), 与不动精子比例呈正相关($r=0.308, P<0.05$)。精浆外泌体 miR-202-5p 是弱精症和无精症发生的危险因素($P<0.05$)。生物信息学分析发现, miR-202-5p 的靶基因明显富集于生殖和精子功能密切相关的蛋白调控通路。**结论** 男性不育症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平与正常生育的健康男性存在明显差异, 且与精子活力密切相关, 可能参与了男性不育症的发生、发展过程。

关键词:微小 RNA-202-5p; 男性不育症; 精浆外泌体; 弱精症; 无精症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.12.003 **中图法分类号:**R698+.2

文章编号:1673-4130(2020)12-1418-05 **文献标识码:**A

Changes of seminal plasma exosome miR-202-5p level in male infertility patients and its clinical significance*

BIAN Yuying^{1,2}, WANG Cheng², GU Wanjian³, NI Wuhua⁴, ZHANG Chunni^{2△}

(1. Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China;

2. Department of Clinical Laboratory, PLA General Hospital of the Eastern Theater,

Nanjing, Jiangsu 210002, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Province

Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 4. Reproductive Medicine

Center, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes of seminal plasma exosome microRNA-202-5p (miR-202-5p) in male infertility patients and its clinical significance in male reproduction. **Methods** A total of 107 male infertility patients who treated in the PLA General Hospital of the Eastern Theater, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine and The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University were selected as the research subjects, including 53 azoospermia patients and 54 asthenospermia patients. In addition, 53 healthy normal fertile men recruited during the same period were selected as the control group. The level of seminal plasma exosome miR-202-5p was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, the diagnostic value of miR-202-5p in male infertility and its correlation with semen parameters were analyzed, the target genes, related pathways and target protein interaction network were predicted by bioinformatics analysis software. **Results** Compared with the control group, the level of seminal plasma exosome miR-202-5p was significantly increased in asthenospermia patients ($P<0.05$), and significantly decreased in azoospermia patients

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81401257, 81672102); 江苏省“科教强卫工程”青年医学人才项目(QNRC2016893)。

作者简介: 卞玉莹, 女, 技师, 主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者, E-mail: zchunni27@hotmail.com。

本文引用格式: 卞玉莹, 王成, 顾万建, 等. 男性不育症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平变化及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(12): 1418-1421.

($P < 0.05$). The level of seminal plasma exosome miR-202-5p in azoospermia patients was significantly lower than that in patients with asthenospermia ($P < 0.05$). ROC curve analysis results showed that the area under the curve (AUC) of seminal exosome miR-202-5p in the diagnosis of asthenospermia was 0.664, the AUC in the diagnosis of azoospermia was 0.785, the AUC in the differential diagnosis of asthenospermia and azoospermia was 0.878. The level of seminal plasma exosome miR-202-5p in patients with asthenospermia was negatively correlated with the proportion of a+b grade forward movement sperm ($r = -0.312, P < 0.05$), and positively correlated with the proportion of immobile sperm ($r = 0.308, P < 0.05$). The seminal plasma exosome miR-202-5p was a risk factor for asthenospermia and azoospermia ($P < 0.05$). Bioinformatics analysis found that the target genes of miR-202-5p were significantly enriched in protein regulatory pathways closely related to reproduction and sperm function. **Conclusion** The level of seminal plasma exosome miR-202-5p in male infertility patients is significantly different from that in healthy normal fertile men, and is closely related to sperm motility, which may be involved in the occurrence and development of male infertility.

Key words: microRNA-202-5p; male infertility; seminal plasma exosome; asthenospermia; azoospermia

男性不育症发病率逐年升高,已成为全球性的健康问题。男性不育症发病机制复杂,可由先天或继发性泌尿生殖系统异常、生殖腺感染、内分泌紊乱、精索静脉曲张、线粒体功能障碍或免疫学等因素引起,其中特发性不育症患者约占 40%,其分子机制尚不完全明确^[1]。最新研究表明,精浆含有大量外泌体,来源于男性生殖系统多种细胞,由于精浆外泌体微小 RNA(miRNA)的水平会伴随外泌体起源细胞的变化而改变,因此其能够更精确地反映生殖器官的病理、生理变化,可作为潜在的生物标志物^[2]。有报道显示,微小 RNA-202-5p(miR-202-5p)是一种高表达于成年男性睾丸组织中的 miRNA^[3],在精子发生过程中发挥着重要的生理功能^[4]。目前,关于 miR-202-5p 在男性不育症精浆外泌体中的变化情况未见报道;因此,本研究通过分析 miR-202-5p 在男性不育症患者精浆外泌体中的水平变化,初步预测了其在男性不育症发生、发展过程中潜在的分子机制,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015—2019 年在解放军东部战区总医院、江苏省中医院及温州医科大学附属第一医院就诊的男性不育症患者 107 例为研究对象,年龄 18~44 岁,平均(29.8 ± 6.5)岁。按照 WHO 诊断标准^[5],包括非梗阻性无精症患者 53 例(精液标本经 $1\,500 \times g$ 离心 15 min 后沉淀,镜检无精子 ≥ 2 次),弱精症患者 54 例[精子密度 $> 15 \times 10^6 / \text{mL}$, a+b 级精子 $< 32\%$,总活力 $< 40\%$]。所有不育症患者均为婚后夫妻性生活正常,未行避孕措施 2 年以上而未能生育者。同期募集健康男性 53 例为对照组,年龄 19~53 岁,平均(28.4 ± 6.7)岁,精液常规分析各项指标均在正常范围内,均已正常生育。纳入标准:在采样期间均未服用过任何药物者;对本研究知情同意者。排除标准:泌尿、生殖、造血、内分泌系统疾病及其他慢性疾病和接受过放、化疗者。

1.2 仪器与试剂 计算机辅助精液分析系统(WLJY-9000 精子分析仪,北京伟力公司);B320A 型低速离心机(河北白洋离心机厂);BS60 型恒温水浴箱(北京市医疗设备厂);XW-80A 型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);LightCycler[®] 96 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)仪(瑞士 Roche 公司);2720 型 PCR 仪(美国 ABI 公司);ExoQuick 尿液外泌体分离试剂盒(美国 SBI 公司);磷酸盐缓冲液(美国 Thermo Fisher 公司);Trizol 试剂(美国 Life Technologies 公司);miR-202-5p PCR 引物和 TaqMan 探针(美国 Thermo Fisher 公司);反转录体系和 qRT-PCR 体系所用试剂(AMV 反转录酶、dNTP、rTaq 酶、buffer 及 MgCl_2)均购自 TaKaRa 公司。

1.3 检测方法

1.3.1 标本采集 所有研究对象标本采集前禁欲 3~7 d,自慰法取精液于干燥消毒的无菌容器中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 30 min,液化后进行精液常规检查。精液在取样 2 h 内, $1\,500 \times g$ 离心 10 min 去除精子细胞得到精浆, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3.2 精浆外泌体提取 将精浆标本在 $4\text{ }^\circ\text{C}$, $3\,000 \times g$ 离心 15 min,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 上清液溶于 $150\text{ }\mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液,根据外泌体提取试剂盒说明书加入 $63\text{ }\mu\text{L}$ ExoQuick 试剂,混匀后离心提取外泌体。

1.3.3 精浆外泌体总 RNA 提取 按本课题组前期建立的方法^[6],用 Trizol 法提取外泌体中的总 RNA,每个精浆标本均在提取过程中加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 外源性参照(人工合成源自植物金银花的 miR-2911 成熟体,序列为 $5'\text{-GGC CGG GGG ACG GGC UGG GA-3'}$)用于校正 RNA 提取效率和误差,提取后的总 RNA 溶于 $25\text{ }\mu\text{L}$ 不含 RNA 酶的焦碳酸二乙酯(DEPC)水,保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 待用。

1.3.4 qRT-PCR 检测 采用基于 TaqMan 探针的 qRT-PCR^[7] 检测精浆外泌体 miR-202-5p 水平。反转录 PCR 反应体系 $10\text{ }\mu\text{L}$:DEPC 水 $3.5\text{ }\mu\text{L}$, $5 \times$ 反转录

缓冲液 2.0 μL , 10 mmol/L dNTP 1.0 μL , AMV 反转录酶 0.5 μL , miR-202-5p 反转录引物 1.0 μL , RNA 标本 2.0 μL 。反应条件为 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。qRT-PCR 反应体系为 20 μL : ddH₂O 14.77 μL , 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.0 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL , 10 mmol/L dNTP 0.4 μL , rTaq 酶 0.3 μL , miR-202-5p 上、下游引物和 TaqMan 探针 0.33 μL , cDNA 1.0 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。数据处理采用相对定量 2^{- ΔCt} 法, 通过仪器配套的 LightCycler[®] 96 分析软件对检测结果设定统一的阈值, 分析获得的 Ct 值(表示每个 PCR 管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数), 其中 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{miR-202-5p}) - \text{Ct}(\text{miR-2911})$ 。每个 Ct 值均为相应标本重复检测 3 次后所得均值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 和 GraphPad Prism 5 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验; 采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 miR-202-5p 诊断男性不育症的效能; 相关性分析采用 Spearman 相关; 危险因素分析采用 Logistic 回归分析。通过生物信息学软件 TargetScan、miRDB、miR-PathDB 和 Metascape^[8] 预测 miR-202-5p 调控的靶基因、相关通路和靶蛋白间相互作用网络, 初步探究 miR-202-5p 参与男性不育症发生、发展的潜在分子机制。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精浆外泌体 miR-202-5p 水平比较 qRT-PCR 结果显示, 与对照组 miR-202-5p 水平[0.027(0.011, 0.056)]比较, 弱精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平[0.048(0.023, 0.137)]明显增加($P < 0.05$), 无精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平[0.008(0.004, 0.014)]明显降低($P < 0.05$); 无精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平较弱精症患者明显降低($P < 0.05$)。

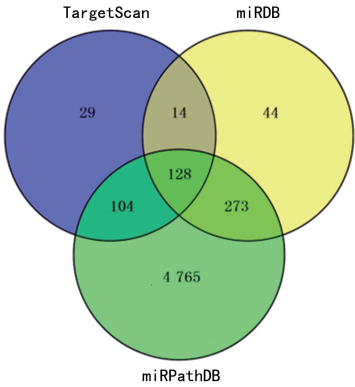
2.2 ROC 曲线分析 ROC 曲线分析结果显示, 精浆外泌体 miR-202-5p 诊断弱精症的曲线下面积(AUC)为 0.664(95% CI : 0.562~0.766), 诊断无精症的 AUC 为 0.785(95% CI : 0.698~0.872), 对弱精症和无精症患者鉴别诊断的 AUC 为 0.878(95% CI : 0.816~0.940)。

2.3 男性不育症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平与精液参数的相关性 Spearman 相关分析结果显示, 弱精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平与 a+b 级前向运动精子比例呈负相关($r = -0.312, P < 0.05$), 与不动精子比例呈正相关($r = 0.308, P < 0.05$), 而与精子浓度无相关性($r = 0.102, P > 0.05$)。

2.4 Logistic 回归分析 Logistic 回归分析结果显

示, 当以对照组为参考变量时, 精浆外泌体 miR-202-5p 是弱精症($OR = 2.728, 95\% CI: 1.224 \sim 6.080, P < 0.05$)和无精症($OR = 5.417, 95\% CI: 2.148 \sim 13.660, P < 0.05$)发生的危险因素。

2.5 miR-202-5p 靶基因预测 3 种生物信息学分析软件共同预测了 128 种 miR-202-5p 潜在的靶基因, 见图 1。通过 Metascape^[8] 进行靶基因功能注释和富集通路分析, 发现 miR-202-5p 靶基因明显富集于胚胎发育、组蛋白修饰、细胞分化、信号转导等与生殖和精子功能密切相关的蛋白调控通路, 见图 2。miR-202-5p 预测靶蛋白间相互作用网络分析见图 3。



注: 图中数字为靶基因种类, 3 种生物信息学软件共同预测了 128 种靶基因。

图 1 miR-202-5p 靶基因的生物信息学预测

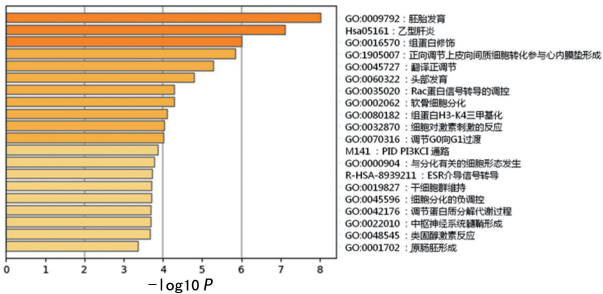
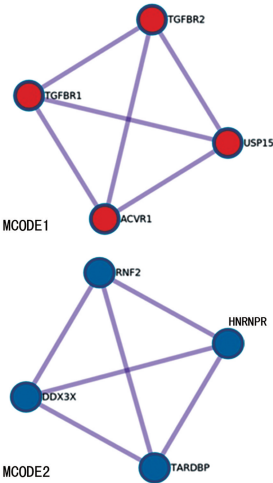


图 2 miR-202-5p 富集通路分析



注: MCODE1 为蛋白 TGFBR2、TGFBR1、USP15、ACVR1 相互作用网络; MCODE2 为蛋白 RNF2、DDX3X、TARDBP、HNRNPR 相互作用网络。

图 3 miR202-5p 预测靶蛋白间相互作用网络

3 讨 论

外泌体可由多种不同类型细胞分泌并稳定存在于几乎人体所有体液中,包括血浆、血清、唾液、母乳、脑脊液、尿液和精液^[9],其可被特定靶细胞吸收,从而在细胞间通讯和信息交流过程中发挥重要作用^[2]。还有研究发现,外泌体中富含大量 miRNA,能保护其不被水解^[10]。目前,男性不育症患者精浆外泌体 miRNA 成为研究的热点。VOJTECH 等^[2]率先发现精浆外泌体含有大量 miRNA,并显示出独特的 miRNA 表达谱。ABU-HALIMA 等^[11]研究发现,在弱精症患者精浆外泌体中 miR-765 和 miR-1275 的表达水平明显升高,而 miR-15a 的表达水平明显降低。此外,BARCELO 等^[12]比较了不同病理类型无精症患者间精浆外泌体 miRNA 表达谱的差异,发现 5 种 miRNA (miR-182-3p、miR-205-5p、miR-31-5p、miR-539-5p 和 miR-941)可作为分泌型无精症患者潜在的生物标志物。上述研究均提示,精浆外泌体 miRNA 表达改变将有助于男性不育症分子标志物的开发及分子机制研究。

本研究发现,男性不育症患者和对照组精浆外泌体 miR-202-5p 水平存在差异,相较于对照组,弱精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平明显增加,而无精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平明显降低,提示精浆外泌体 miR-202-5p 有望成为男性不育症的辅助诊断指标。YANG 等^[3]通过测序发现,miR-202-5p 在成人睾丸中明显富集;DABAJA 等^[13]研究发现,在睾丸组织中 miR-202-5p 主要定位于支持细胞,当生殖细胞存在时,miR-202-5p 在支持细胞中高表达,这种生殖细胞依赖性表达提示 miR-202-5p 在支持细胞成熟、精子形成中具有调控功能;此外,QIU 等^[4]通过荧光原位杂交发现 miR-202-5p 在精子发生过程中始终存在。本研究推测无精症患者由于精子发生障碍,生殖细胞缺乏,导致精浆外泌体 miR-202-5p 水平下降;而弱精症患者由于精子功能发生改变,导致凋亡增加,从而使睾丸等生殖组织外泌体分泌增加,这可能是其精浆外泌体 miR-202-5p 水平升高的潜在机制。本研究 ROC 曲线分析结果显示,精浆外泌体 miR-202-5p 对弱精症和无精症的鉴别诊断价值 (AUC=0.878)较高,提示精浆外泌体 miR-202-5p 有望成为男性不育症的鉴别诊断指标。相关性分析结果显示,弱精症患者精浆外泌体 miR-202-5p 水平与 a+b 级前向运动精子比例密切相关,结合 Logistic 回归分析的结果,精浆外泌体 miR-202-5p 是弱精症和无精症发生的危险因素,提示其可能参与了精子发生和精子运动。

生物信息学分析结果显示,miR-202-5p 的靶基因明显富集于精子功能及生殖等相关的蛋白调控通路,且参与调控细胞的增殖、分化与凋亡。miR-202-5p 靶基因相互作用网络的几个关键蛋白 (TGFB2、

DDX3X、RNF2、TARDBP)已被报道与不育症密切相关;YUAN 等^[14]研究发现,在隐睾症大鼠模型中通过激活 TGFB2 信号通路诱导精原细胞凋亡,可降低睾丸的生长速度;CHE 等^[15]研究发现,miR-322 的下调通过靶向 DDX3X 能促进小鼠精母细胞的凋亡;MAEZAWA 等^[16]研究发现,在精子发生过程中,大量对男性生育能力至关重要的生殖基因包括 RNF2 被协调激活;VARGHESE 等^[17]研究发现,TARDBP 的异常表达与男性精子生成障碍有关。以上结果均表明精浆外泌体 miR-202-5p 的部分靶基因与男性生殖细胞形成及精子发生的机制密切相关,而本研究筛选出的未被证实的靶基因还有待进一步研究验证。

4 结 论

综上所述,精浆外泌体 miR-202-5p 在弱精症患者中高表达,在无精症患者中低表达,并与精子活力有较高相关性,是弱精症和无精症发生的危险因素;此外,miR-202-5p 对男性不育症的诊断和鉴别具有一定临床价值。miR-202-5p 可能参与了男性生殖的发生、发展,为男性不育症的分子机制研究提供了新的思路 and 理论依据。

参考文献

- [1] 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): 1-7.
- [2] VOJTECH L, WOO S, HUGHES S, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(11): 7290-7304.
- [3] YANG Q, HUA J, WANG L, et al. MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66809.
- [4] QIU W, ZHU Y, WU Y, et al. Identification and expression analysis of microRNAs in medaka gonads[J]. Gene, 2018, 646: 210-216.
- [5] World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010: 271.
- [6] 陈婷婷, 王成, 于汉卿, 等. 特发性肾病综合征患儿尿液外泌体 miR-194-5p 水平及其临床价值[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(5): 321-324.
- [7] WANG C, YANG C, CHEN X, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility[J]. Clin Chem, 2011, 57(12): 1722-1731.
- [8] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.
- [9] YU S, CAO H, SHEN B, et al. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37151-37168.

(下转第 1425 页)

研究进一步证实。

4 结 论

综上所述,CKD3~5 期患者存在 COR 水平的变化,随着 CKD 的进展,COR 水平逐渐升高,进行 COR 检测可为临床 CKD 的诊断、治疗、病情评估提供一定的参考。

参考文献

[1] 王芳,马登艳,刁永书.慢性肾脏病患者肾衰竭风险评估防范的研究进展[J].中国血液净化,2018,17(11):766-768.

[2] 黄玉霞,杨渝伟,唐敏,等.慢性肾脏病早期筛查的临床应用评价[J].华西医学,2018,33(12):1507-1512.

[3] 袁腾飞,李艳,彭锐.人附睾蛋白 4 对慢性肾脏病的诊断价值[J].检验医学与临床,2017,14(5):599-600.

[4] 陈清萍,张丰萍,曹珊,等.慢性肾脏病 4~5 期非透析患者死亡的危险因素分析[J].南昌大学学报(医学版),2013,53(12):53-55.

[5] National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39 (Suppl 1): S1-S266.

[6] AFSAR B. The relationship of serum cortisol levels with depression, cognitive function and sleep disorders in chronic kidney disease and hemodialysis patients[J]. Psychiatry Q, 2014, 85(4): 479-485.

[7] ESTELA M, ALEJANDRO L, DIANNE B, et al. Dynamics of salivary cortisol in chronic kidney disease patients at stages 1 through 4[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2016, 85 (2): 313-319.

[8] POPMA A, DORELEIJERS T A H, JANSEN L M C, et al. The diurnal cortisol cycle in delinquent male adolescents and normal controls[J]. Neuropsychopharmacology, 2007, 32(7): 1622-1628.

[9] 曹保江, 李晓召, 曹向波, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清促肾上腺皮质激素和肾上腺皮质醇水平及其与短期预后相关性分析[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(2): 149-155.

[10] 毛建萍, 张倩, 陈靖. 慢性肾脏病患者甲状旁腺病变发生机制的研究新进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(8): 630-634.

[11] DRECHSLER C, RITZ E, TOMASCHITZ A, et al. Aldosterone and cortisol affect the risk of sudden cardiac death in haemodialysis patients[J]. Eur Heart J, 2013, 34(8): 578-587.

[12] SORIANO-RODRÍGUEZ P, OSINIRI I, GRAU-CABRERA P, et al. Physiological concentrations of serum cortisol are related to vascular risk markers in prepubertal children[J]. Pediatr Res, 2010, 68(5): 452-457.

[13] 林伟仁, 江瑛. 慢性肾脏病心血管疾病的新危险因素[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(1): 173-175.

[14] 曾少勇, 幸丽娅, 吴候柏, 等. 联合检测胱抑素 C、肌酐、尿素、尿酸水平在肾功能损伤中的临床诊断价值[J]. 中国医学创新, 2011, 8(10): 26-27.

[15] 刘蕊. 尿白蛋白检测的临床应用及注意的问题[J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6(3): 129-132.

[16] 余娜. 慢性肾功能不全患者不同时期血清酶变化及其临床意义[J]. 中国临床研究, 2014, 27(9): 1087-1088.

(收稿日期: 2019-08-12 修回日期: 2020-03-17)

(上接第 1421 页)

[10] MACHTINGER R, LAURENT L C, BACCARELLI A A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation[J]. Hum Reprod Update, 2016, 22(2): 182-193.

[11] 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 and Steril, 2016, 106(5): 1061-1069.

[12] BARCELO 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.

[13] DABAJA A A, MIELNIK A, ROBINSON B D, et al. Possible germ cell-sertoli cell interactions are critical for establishing appropriate expression levels for the sertoli cell-specific microRNA, miR-202-5p in human testis[J].

Basic Clinl Androl, 2015, 25(1): 2-8.

[14] YUAN J L, ZHANG Y T, WANG Y. Increased apoptosis of spermatogenic cells in cryptorchidism rat model and its correlation with transforming growth factor beta type II receptor[J]. Urology, 2010, 75(4): 992-998.

[15] CHE Q, WANG W, DUAN P, et al. Downregulation of miR-322 promotes apoptosis of GC-2 cell by targeting DDX3X[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17(1): 63-67.

[16] MAEZAWA S, HASEGAWA K, YUKAWA M, et al. Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis[J]. Genes Dev, 2017, 31(16): 1693-1703.

[17] VARGHESE D S, CHANDRAN U, SOUMYA A, et al. Aberrant expression of TAR DNA binding protein-43 is associated with spermatogenic disorders in men[J]. Reprod Fertil Dev, 2016, 28(6): 713-722.

(收稿日期: 2019-12-02 修回日期: 2020-04-05)