

- lectin Siglec-9[J]. *Nature Immunol*, 2016, 17(11): 1273-1281.
- [13] OLOU A A, KING R J, YU F, et al. MUC1 oncoprotein mitigates ER stress via CDA-mediated reprogramming of pyrimidine metabolism [J]. *Oncogene*, 2020, 39 (16): 3381-3395.
- [14] HASEGAWA M, TAKAHASHI H, RAJABI H, et al. Functional interactions of the cystine/glutamate antiporter, CD44v and MUC1-C oncoprotein in triple-negative breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 11756.
- [15] MATSUMOTO K, TAKEDA Y, HARADA K, et al. Effect of pancreatic juice cytology and/or endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for pancreatic tumor [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29 (1): 223-227.
- [16] YAMAGUCHI T, SHIRAI Y, NAKAMURA N, et al. Usefulness of brush cytology combined with pancreatic juice cytology in the diagnosis of pancreatic cancer: significance of pancreatic juice cytology after brushing[J]. *Pancreas*, 2012, 41(8): 1225-1229.
- (收稿日期: 2021-09-02 修回日期: 2022-07-14)

• 短篇论著 •

精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 联合检测对男性不育症的诊断价值

陈雨晴¹, 李 剑², 靖小珍¹, 姚文瑛^{1△}

上海交通大学医学院附属第九人民医院: 1. 检验科; 2. 实验中心, 上海 201901

摘要:目的 探讨男性不育症患者精液中 miRNA 表达水平的差异, 分析相关 miRNA 的表达水平对男性不育症的诊断价值。方法 纳入 2019 年 4 月至 2021 年 4 月该院收治的 168 例男性不育症患者, 其中 20 例通过高通量测序分析其精液中 miRNA 表达水平, 另外 148 例作为研究组; 同时纳入 168 例男性健康志愿者, 其中 20 例通过高通量测序分析其精液中 miRNA 表达水平, 另外 148 例作为对照组。检测并比较两组受试者精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 的相对表达量。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 检测对男性不育症的诊断价值。结果 高通量测序发现, 20 例健康志愿者与 20 例男性不育症患者精液中多种 miRNA 的表达水平具有差异, 其中表达上调的 miRNA 有 58 个, 表达下调的 miRNA 有 22 个。选取表达差异最大的 3 个 miRNA(miR-34b、miR-122、miR-429)进行表达水平的验证和诊断价值的分析。实时荧光定量 PCR 发现, 两组精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 的相对表达量比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, miR-34b、miR-122、miR-429 诊断男性不育症的灵敏度分别为 91.89%、93.92%、92.57%, 特异度分别为 93.24%、94.59%、93.24%; 精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 联合检测诊断男性不育症的灵敏度为 96.62%, 特异度为 91.22%, 准确度为 93.92%。结论 精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 可作为男性不育症的潜在生物标志物。

关键词: 精液; miR-34b; miR-122; miR-429; 男性; 不孕不育

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.16.028

中图法分类号: R698+.2

文章编号: 1673-4130(2022)16-2046-03

文献标志码: A

有研究显示, 大约 15% 的夫妇在无保护措施性交 1 年后无法受孕^[1]。在 20% 的不孕夫妇中, 男性因素是唯一的原因, 在另外 30%~40% 的不孕夫妇中, 男性因素是促成因素^[2]。基本的男性不育症评估需要全面的病史和精液分析, 仅其中一项不能准确区分不明原因的男性不育症, 因此, 分子无创检测可以为医生提供有价值的信息, 进一步对不明原因的男性不育症进行评估和诊断^[3]。此外, 仅通过组织学工作评估睾丸组织标本的传统测试, 在检测和分类精子生成障碍方面的准确性和敏感性都不高^[4]。miRNA 是一类短(20~23 个核苷酸)的单链非编码核苷酸, 能够通过 mRNA 降解或翻译抑制来调节基因表达^[5]。miRNA 参与了各种生物过程, 如增殖、分化、发育和凋亡^[6]。有报道显示, miRNA 表达模式的改变与不同

的人类睾丸组织病理学模式、生精功能障碍有关^[7]。因此, 精液 miRNA 可以作为评估人类男性生育状况的特定生物标志物。基于此, 本研究通过高通量测序检测精液中 miRNA 表达水平, 探讨精液中 miRNA 表达水平对男性不育症的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入 2019 年 4 月至 2021 年 4 月本院收治的 168 例男性不育症患者, 其中 20 例通过高通量测序分析其精液中 miRNA 表达水平, 年龄 23~39 岁, 平均(32.45±6.23)岁; 另外 148 例为研究组, 年龄 22~41 岁, 平均(32.54±5.29)岁。排除标准: (1)采集精液前接受任何治疗的患者; (2)肿瘤患者; (3)全身性自身免疫性疾病患者; (4)严重心、肝、肾功能损害者; (5)长期使用皮质类固醇激素及免疫抑制

△ 通信作者, E-mail: ynjafnmusf@163.com。

剂者;(6)有明确的生殖器外伤史、感染史者。同时纳入在本院体检的 168 例男性健康志愿者,其中 20 例用于高通量测序分析 miRNA 表达水平,年龄 22~39 岁,平均(33.26 ± 8.01)岁;另外 148 例作为对照组,年龄 21~42 岁,平均(32.69 ± 5.31)岁。各组年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。本研究获得受试者知情同意及本院伦理委员会批准。

1.2 方法 所有受试者收集精液前禁欲 2~7 d,手淫法采集第一次射出的精液作为标本。使用 Trizol 法抽取 168 例男性不育症患者和 168 例男性健康志愿者精液中的 miRNA,其中 20 例健康志愿者与 20 例男性不育症患者精液用于 miRNA 高通量测序(北京诺禾致源科技股份有限公司),148 例健康志愿者 148 例男性不育症患者精液用于本研究其他分析。miR-34b、miR-122、miR-429 引物由北京擎科生物技术有限公司合成。miR-34b 的引物序列:上游引物为 5'-TGCGGTCAATCACTAACTCC-3',下游引物为 5'-CGTGCAGGGTCCGAGGT-3';miR-122 的引物序列:上游引物为 5'-GCCGTGGAGTGTGACAATGGT-3',下游引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';miR-429 的引物序列:上游引物为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTG-3',下游引物为 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'。采用北京拜尔迪生物技术有限公司实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒(货号:DEM202-200T)和 ABI7500 仪器进行 qPCR。参考说明书设置反应条件:95 ℃ 15 min(预变性),然后 94 ℃ 15 s(变性),55 ℃ 30 s(退火),70 ℃ 30 s(延伸),共 40 个循环,绘制最终熔解曲线。miRNA 的相对表达水平由公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 LSD-*t* 检验;方差不齐者采用 Tamhane'*T*2 法比较。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 检测对男性不育症的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 20 例健康志愿者与 20 例男性不育症患者精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 的表达水平 高通量测序发现,20 例健康志愿者与 20 例男性不育症患者精液中多种 miRNA 的表达水平有一定差异,其中表达上调的 miRNA 有 58 个、表达下调的 miRNA 有 22 个,见图 1。选取测序结果表达水平差异最大的 10 个 miRNA,并且使用 qPCR 进行验证,结果发现两组受试者精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 的相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

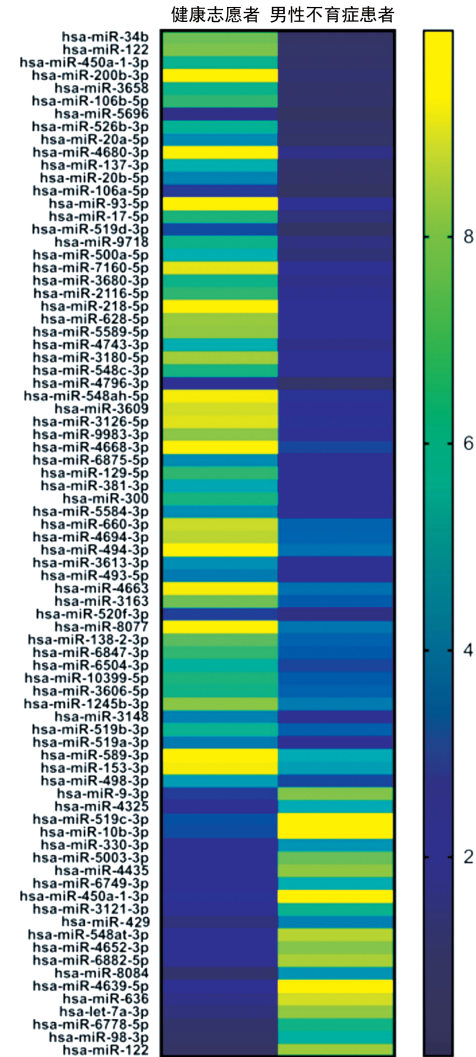


图 1 20 例健康志愿者与 20 例男性不育症患者精液中多种 miRNA 的表达情况

表 1 两组受试者精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 相对表达水平比较

组别	<i>n</i>	miR-34b	miR-122	miR-429
对照组	148	1.34 ± 0.49	1.69 ± 0.62	0.11 ± 0.05
研究组	148	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03	2.06 ± 0.89
<i>t</i>		32.00	31.75	26.61
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 检测对男性不育症的诊断价值 ROC 曲线分析显示,miR-34b、miR-122、miR-429 单独诊断男性不育症的灵敏度和特异度见表 2。

表 2 精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 诊断男性不育症的 ROC 曲线相关参数

指标	灵敏度 (%)	特异度 (%)	约登指数	AUC(95%CI)	<i>P</i>
miR-34b	91.89	93.24	0.851 3	0.919 1(0.881 3~0.956 9)	<0.001
miR-122	93.92	94.59	0.885 1	0.949 7(0.923 5~0.976 0)	<0.001
miR-429	92.57	93.24	0.858 1	0.936 7(0.904 3~0.969 0)	<0.001

2.3 精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 对男性不育症的联合诊断 患有男性不育症的为真阳性,未患男性不育症的为真阴性。miR-34b 的阳性临界值为 0.460 5,miR-122 的阳性临界值为 0.586 6,miR-429 的阳性临界值为 0.667 7,以三者之一阳性为联合诊断阳性,反之则为联合诊断阴性。精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 联合对男性不育症的诊断的灵敏度为 96.62% (143/148),特异度为 91.22% (135/148),准确度为 93.92% (278/296)。

3 讨论

目前,精液中还没有可靠的分子标志物用于男性不育症的伴随诊断^[8],在睾丸活检评估中也缺乏用于常规组织学诊断的标志物^[9],而具有不同精液和组织病理学损伤的患者中 miRNA 表达谱的改变可能为诊断提供新的生物标志物^[10]。本研究旨在分析临床上可用于评估男性生育状态的 miRNA 生物标志物。除了作为生物标志物的潜力外,miRNA 在精子发生过程中的生物学作用也越来越得到认可。有研究已在雄性生殖细胞和支持细胞中鉴定出许多睾丸特异性 miRNA,其中一些 miRNA 在精子发生的减数分裂后期高度表达^[11]。本研究发现,男性不育症患者与健康志愿者精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 单向诊断男性不育不孕的灵敏度分别为 91.89%、93.92%、92.57%,特异度分别为 93.24%、94.59%、93.24%。与青春前期睾丸相比,miR-34b 在成人睾丸中高度表达,表明其在雄性生殖细胞分化中的潜在作用^[12-13]。类似地,miR-122 主要在减数分裂后的生殖细胞中表达并抑制过渡蛋白 2 的转录。过渡蛋白 2 是一种睾丸特异性蛋白,参与精子发生过程中的染色质重塑^[14-15]。这些研究表明,鉴定出的 miRNA 不仅可以作为潜在的生物标志物,而且其可能在精子发生过程中发挥关键作用。更好地了解已鉴定的 miRNA 的生物学作用将有助于提高其作为生物标志物的价值。除了 miR-34b、miR-122、miR-429,本研究发现的与健康志愿者与男性不育症患者精液中其他差异 miRNA 在男性不育症中的作用值得进一步探索。

综上所述,精液中 miR-34b、miR-122、miR-429 可作为男性不育症的潜在生物标志物。

参考文献

- [1] VASHISHT A,GAHLAY G K. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges[J]. Mol Hum Reprod,2020,26(4):199-214.
- [2] TYC K M,WONG A,SCOTT R T, et al. Analysis of DNA variants in miRNAs and miRNA 3' UTR binding sites in female infertility patients[J]. Lab Invest, 2021,

- 101(4):503-512.
- [3] CITO G,COCCIA M E,SALVIANTI F, et al. Blood plasma miR-20a-5p expression as a potential non-invasive diagnostic biomarker of male infertility: a pilot study[J]. Andrology,2020,8(5):1256-1264.
- [4] FOROUHARI S, MAHMOUDI E, SAFDARIAN E, et al. MicroRNA: a potential diagnosis for male infertility[J]. Mini Rev Med Chem,2021,21(10):1226-1236.
- [5] ALIAKBARI F, ESHGHIFAR N, MIRFAKHRAIE R, et al. Coding and non-coding RNAs, as male fertility and infertility biomarkers[J]. Int J Fertil Steril,2021,15(3):158-166.
- [6] DOROSTGHOAL M,GALEHDARI H,MORAMEZI F, et al. Sperm miR-26a-5p and its target PTEN transcripts content in men with unexplained infertility[J]. Andrology,2020,8(5):1167-1173.
- [7] 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.
- [8] SABETIAN S,CASTIGLIONI I,JAHRONI B N, et al. In silico identification of miRNA-lncRNA interactions in male reproductive disorder associated with COVID-19 infection[J]. Cells,2021,10(6):1480.
- [9] BARBU M G, THOMPSON D C, SUCIU N, et al. The roles of microRNAs in male infertility[J]. Int J Mol Sci, 2021,22(6):2910.
- [10] DE MARTINO M,CHIEFFI P,ESPOSITO F. miRNAs and biomarkers in testicular germ cell tumors: an update [J]. Int J Mol Sci,2021,22(3):1380.
- [11] MOKÁNSZKI A,MOLNÁR Z,VARGA T E, et al. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males[J]. Hum Fertil (Camb), 2020, 23(4):246-255.
- [12] MOMENI A,NAJAFIPOUR R,HAMTA A, et al. Expression and methylation pattern of hsa-miR-34 family in sperm samples of infertile men[J]. Reprod Sci,2020,27(1):301-308.
- [13] EIKMANS M,D D H,BLIJLEVEN L, et al. Optimization of microRNA acquirement from seminal plasma and identification of diminished seminal microRNA-34b as indicator of low semen concentration[J]. Int J Mol Sci,2020,21(11):4089.
- [14] RAHBAR S,PASHAIASL M,EZZATI M, et al. MicroRNA-based regulatory circuit involved in sperm infertility[J]. Andrologia,2020,52(1):e13453.
- [15] LIU L M,ZHU M Y,LIU X L, et al. miR-122-5p regulates the tight junction of the blood-testis barrier of mice via occludin[J]. Basic Clin Androl,2021,31(1):7.