

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.010

非阻塞性无精症患者血清 miRNA 表达谱分析研究*

赵文忠¹, 罗招凡^{2△}, 傅文婷¹, 吴瑞珊¹, 钟安¹, 周雨¹

(1. 广东省计划生育科学技术研究所国家卫计委男性生殖与遗传重点实验室, 广州 510600;

2. 中山大学附属第七医院检验科, 广东深圳 518017)

[摘要] **目的** 分析非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清 miRNA 的表达水平。**方法** 采用 miRNA 表达谱芯片分析非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清 miRNA, 应用 GenePix proV6.0 软件进行数据处理与分析, 寻找差异表达的 miRNA, 并采用实时定量 PCR 进行验证。确认的 miRNA 通过生物信息学软件进行靶基因预测。**结果** 非阻塞性无精症患者和正常捐精者比较共有 71 个 miRNAs 表达有差异。血清中升高的 miRNAs 有 47 个, 降低的 miRNAs 有 24 个。实时定量 PCR 验证了芯片的准确性, 生物信息学软件靶基因预测表明, 这些差异 miRNA 的潜在靶基因均参与精子发生。**结论** 非阻塞性无精症血清 miRNA 存在特异性 miRNA, 有助于精子发生的分子机制研究。

[关键词] 非阻塞性无精症; 血清; 微 RNAs; 表达谱**[中图分类号]** R698+.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)15-2011-05**Analysis study of serum miRNA expression profile in patients with non-obstructive azoospermia***ZHAO Wenzhong¹, LUO Zhao fan^{2△}, FU Wenting¹, WU Ruishan¹, ZHONG An¹, ZHOU Yu¹

(1. Family Planning Research Institute of Guangdong Province, Guangzhou,

Guangdong 510600, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Seventh

Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong 518017, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the serum miRNA expression levels in non-obstructive azoospermia (NOA) patients and healthy sperm donors. **Methods** Serum miRNA levels in NOA patients and healthy sperm donors were analyzed by adopting the miRNA expression profiles chip. The data were processed and analyzed by using the GenePix proV6.0 software to find out the differentially expressed miRNA, then the difference was verified by RQ-PCR, finally the bioinformatic software was utilized to predict the miRNA target gene. **Results** Compared to healthy sperm donors, 71 cases of NOA had miRNAs expression difference, miRNA expression were increased in 47 cases and miRNAs expression was decreased in 24 cases. Moreover, Real-time PCR analysis verified the chip accuracy. The bioinformatic software target gene prediction showed that the potential target gene of these differential miRNA were involved in spermatogenesis. **Conclusion** The specific miRNA exists in serum miRNA of NOA, which helps to study the molecular mechanism of spermatogenesis.

[Key words] non-obstructive azoospermia; serum; microRNAs; expression profile

全世界约 15% 的育龄夫妇存在不育问题, 其中男性因素导致的不育约占 50%^[1]。非阻塞性无精症是最常见的男性不育症类型, 成年男性发病率约为 1%。在各种影响男性不育的因素中, 遗传因素是导致不育的重要原因, 有 15%~30% 的男性不育症是由遗传性因素引起的。目前研究较多的包括染色体异常、Y 染色体微缺失及不育相关基因的突变和遗传多态性^[2]。表观遗传学是研究 DNA 序列未发生变化但表型却发生可遗传改变的一门学科, 其主要包括 DNA 甲基化、

组蛋白修饰、非编码 RNA 调控等几个方面, 表观遗传修饰在精子发生及受精过程中都起着非常重要的作用^[3]。miRNA 是一类可调节基因表达、调节生长发育、维持机体正常生理功能的重要非编码 RNA。越来越多的研究表明, miRNA 对于正常精子发生是必要的^[4]。在本研究中, 笔者选用 miRNA 表达谱的寡核苷酸芯片, 利用其快速、平行、高通量的检测特点, 对比分析了非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清 miRNA 的表达水平, 为进一步研究 miRNA 在非阻

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2014A030313721); 广东省医学科研基金资助项目(A2017612)。 作者简介: 赵文忠(1971-), 副主任技师, 博士, 主要从事临床分子诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: luozhaofan@qq.com。

塞性无精症中的作用机制提供了坚实的基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 非阻塞性无精症患者血清样品来源于广东省计划生育专科医院,经男科确诊为非阻塞性无精症患者;对照组为广东省人类精子库捐精且符合供精条件的健康男性血清标本。非阻塞性无精症诊断标准为在排除输精管道梗阻因素外,精液常规分析两次未发现精子的无精症。标本采集前经广东省计划生育专科伦理委员会同意,患者知情同意后进行。

1.2 试剂 总 RNA 提取试剂为 ThermoFisher 公司的 TRIzol;RNA 纯化试剂为 QIAGEN 公司的 miR-Neasy mini kit;miRNA 标记试剂为 Exiqon 公司的 miRCURYTM Array Power Labeling kit;miRNA 表达谱的寡核苷酸芯片为 Exiqon 公司的 miRCURYTM Array。

1.3 方法

1.3.1 血清采集 采集 2 mL 空腹外周血置于无抗凝剂试管中,室温放置 30~60 min,使血液凝固,将上层血清小心转移到收集管中,置-80 °C 保存备用。

1.3.2 RNA 提取 取 2 例非阻塞性无精症患者血清和 2 例正常捐精者血清,采用试剂 TRIzol 提取血清总 RNA,按照试剂 miRNeasy mini kit 说明书纯化 RNA。然后,采用分光光度计 NanoDrop ND-1000 检测 RNA 的量和纯度。

1.3.3 miRNA 标记 采用 Exiqon 公司的 miRCURYTM Array PowerLabeling kit,按照操作说明书进行标记。

1.3.4 miRNA 芯片杂交 采用 miRCURYTM Array (16.0)试剂盒进行杂交,于 56 °C 杂交 16~20 h,芯片在室温条件下晾干,分别用不同的缓冲液清洗 2 min,1 000 r/min 离心 5 min,待芯片干燥后立即扫描。

1.3.5 miRNA 芯片图像采集和分析 采用 Axon GenePix 4000B microarray scanner 扫描, GenePix proV6.0 处理原始图像。用原始信号值减去该点的前景值得到每个探针的修正值,选取本次实验中在芯片修正值均大于或等于 50 的非对照探针,将这部分探针的修正值统计处理后,取其中值作为基准,对整张芯片的点做标准化处理。以 Fold change 不低于 1.5, P 值不低于 0.05 的标准来筛选差异表达的 miRNA,并进行聚类分析。

1.3.6 实时定量 PCR 验证 根据 miRNA 微阵列芯片结果,选取 5 个 Fold change 较高的 miRNA,采用 Mir-X™ miRNA qRT-PCR SYBR® Kit 进行实时定量 PCR 验证。取 1.3.2 提取 RNA 2 μg,采用 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 进行逆转录,逆

录引物为 5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG-3';以 5S rRNA 为内参基因。其他按照试剂盒说明进行。本试验所采用的上游引物 hsa-miR-483-3p: 5'-ACT CCT CTC CTC CCG TCT T-3'; hsa-miR-194-3p: 5'-AGT GGG GCT GCT GTT ATC TG-3'; hsa-miR-4275: 5'-GCC CCA ATT ACC ACT TCT TTA-3'; hsa-miR-221-5p: 5'-ACC TGG CAT ACA ATG TAG ATT T-3'; hsa-miR-1263: 5'-TAC CCT GGC ATA CTG AGT AAA-3'; 5S rRNA: 5'-GTC TAC GGC CAT ACC ACC CTG AAC-3'。下游引物采用试剂盒中的 3'引物: 5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AA-3'。反应在 96 孔 STEPONEPLUS(美国 ABI)荧光 PCR 仪上进行扩增,每组设 3 个复孔。反应条件为:94 °C 预变性 10 s;94 °C 20 s,60 °C 20 s,共 40 个循环。反应结束由计算机自动计算得到各反应管循环阈值(threshold cycle, Ct),采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因表达进行相对定量分析。

1.3.7 靶基因预测 采用 3 种在线软件(miRBase Targets、TargetScan、DIANA-microT)对相应的 miRNA 靶基因进行预测。

2 结果

2.1 RNA 纯度与质量 分离的血清 RNA OD260/280>1.7,质量大于 10 ng,符合芯片分析的要求,纯度与质量分析见表 1。

表 1 NanoDrop ND-1000 测定 RNA 质量

样本	OD260/280	OD260/230	浓度(ng/μL)	量(μL)	质量(ng)
C1	2.02	1.85	8.32	10	83.20
C2	2.08	1.88	9.14	10	91.40
S1	1.79	1.91	11.22	10	112.20
S2	2.05	1.87	8.30	10	83.00

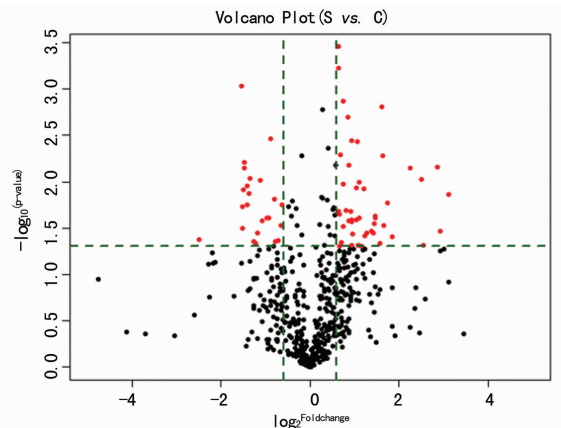


图 1 非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清中 miRNA 差异表达

2.2 非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清中差异

表达的 miRNA 非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清 miRNAs 表达微阵列经扫描和数据分析,共筛选出

71 个差异表达的 miRNAs(图 1、2),包括 47 个表达上调的 miRNAs 和 24 个表达下调的 miRNAs,见表 3、4。

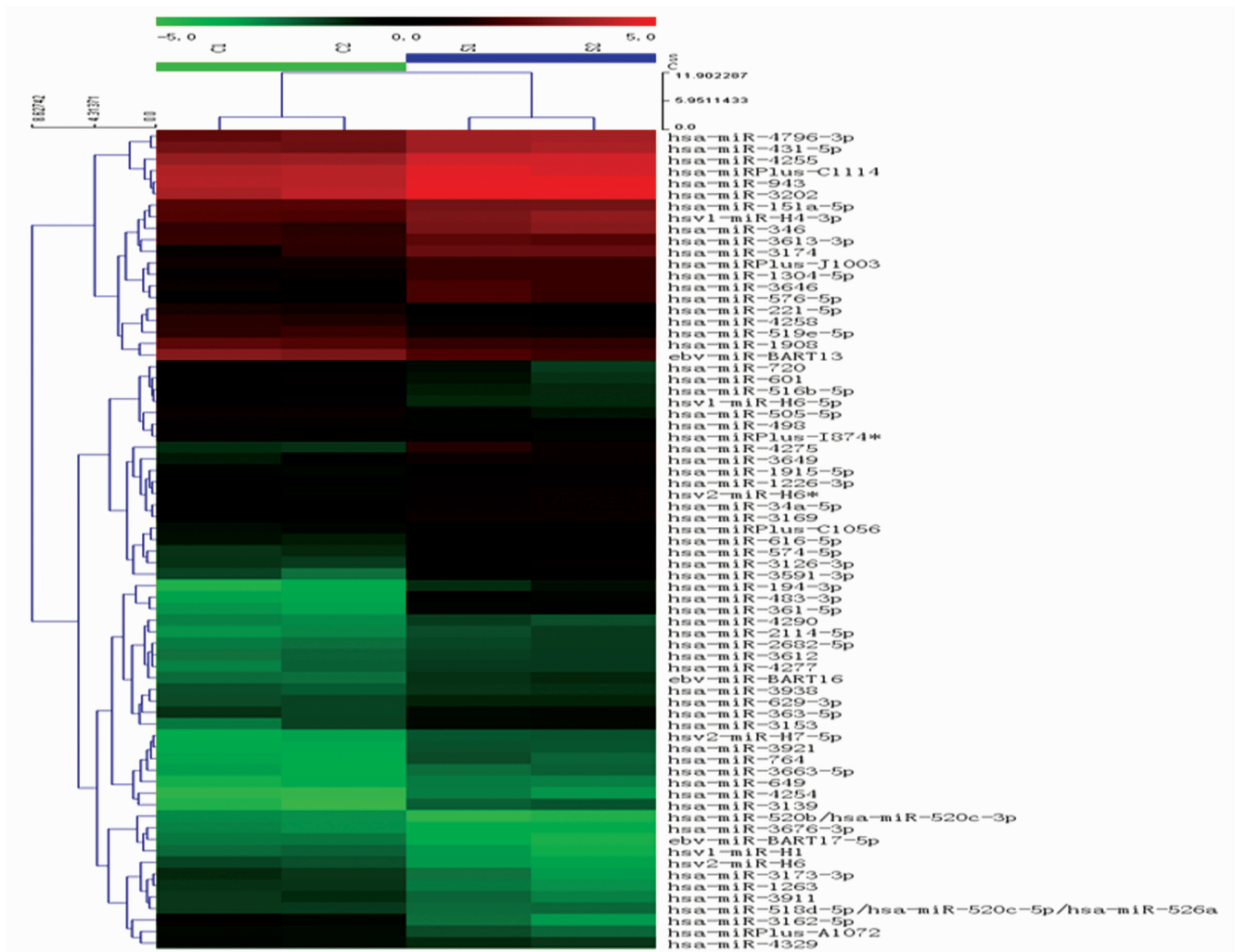


图 2 非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清中 miRNA 表达谱聚类分析结果

表 3 上调的 miRNAs

ID	名称	差异倍数	ID	名称	差异倍数
42696	hsa-miR-943	1.788424031	42446	hsa-miR-576-5p	3.141600673
147900	hsv2-miR-H6	2.054329936	46479	hsa-miR-1304-5p	2.08217286
148493	hsa-miR-3613-3p	1.56287743	146096	hsa-miR-764	2.969258988
11260	hsa-miR-151a-5p	1.543682658	148597	hsa-miR-3663-5p	2.357632565
17289	hsa-miR-616-5p	1.822142616	147915	hsa-miR-3174	2.751212606
146124	hsa-miR-4796-3p	2.063935051	30908	hsa-miRPlus-C1056	1.674330718
17358	ebv-miR-BART16	2.29586619	17566	hsa-miR-629-3p	1.594538533
14301	hsa-miR-361-5p	7.278690277	147920	hsa-miR-4290	2.199127468
27740	hsa-miR-574-5p	2.161862253	147556	hsa-miR-4254	3.563802173
147706	hsa-miR-4255	1.901529813	147975	hsa-miRPlus-J1003	1.550063511
147821	hsa-miR-3169	1.664542042	148481	hsa-miR-3646	2.588754939
147836	hsv2-miR-H7-5p	3.079757465	148349	hsa-miR-3938	1.567970741
148682	hsa-miR-483-3p	8.660841172	27544	hsa-miR-363-5p	1.829682245
15619	hsa-miR-649	2.146745882	148307	hsa-miR-3612	1.741334801

续表 3 上调的 miRNAs

ID	名称	差异倍数	ID	名称	差异倍数
145705	hsa-miR-431-5p	1.931139762	146074	hsa-miR-2114-5p	2.412917307
147666	hsa-miR-4277	1.913784857	146069	hsa-miR-1915-5p	1.90889215
147743	hsa-miR-4275	5.846572662	27217	hsa-miR-34a-5p	1.673396105
148080	hsa-miR-3921	3.051858806	30209	hsa-miRPlus-C1114	1.571263944
148215	hsa-miR-3591-3p	4.725134607	46309	hsa-miR-1226-3p	1.630143355
145732	hsa-miR-346	2.749414717	146159	hsv1-miR-H4-3p	2.115705905
147826	hsa-miR-3153	2.687980443	147905	hsa-miR-3139	5.660591178
148241	hsa-miR-3649	2.720011046	42570	hsa-miR-194-3p	7.578560101
147602	hsa-miR-2682-5p	1.909711495	147916	hsa-miR-3126-3p	3.315706948
146158	hsa-miR-3202	1.891787066			

表 4 下调的 miRNAs

ID	名称	差异倍数	ID	名称	差异倍数
46747	hsa-miR-1263	0.360056827	147682	hsv1-miR-H6-5p	0.343962722
147845	hsa-miR-3173-3p	0.3463121	42442	hsa-miR-498	0.57040443
147712	hsv1-miR-H1	0.418179786	148504	hsa-miRPlus-I874	0.641076965
148687	hsa-miR-1908	0.633960214	42490	hsa-miR-505-5p	0.348504138
148679	hsa-miR-720	0.429284076	147631	hsa-miR-4258	0.507082392
13132	hsa-miR-519e-5p	0.583230906	148361	hsa-miR-3911	0.441255975
46818	ebv-miR-BART17-5p	0.385025307	17498	hsa-miR-601	0.377839263
27537	ebv-miR-BART13	0.476058457	11151	hsa-miR-516b-5p	0.392744408
146136	hsa-miR-518d-5p	0.540213382	42475	hsa-miR-221-5p	0.458336157
147816	hsa-miR-3162-5p	0.178035482	11166	hsa-miR-520b	0.356669899
42793	hsa-miRPlus-A1072	0.37632581	147926	hsa-miR-4329	0.608952289
148410	hsa-miR-3676-3p	0.528497005	147662	hsv2-miR-H6	0.353909513

表 5 受 miRN 调节的潜在靶基因

miRNA	差异倍数	Transcript ID	基因名称
hsa-miR-1263	0.360056827	ENST00000374507.4	TXNDC8, thioredoxin domain containing 8 (spermatzoa)
hsa-miR-221-5p	0.458336157	ENST00000334325.1	SPATA12, spermatogenesis associated 12
hsa-miR-483-3p	8.660841172	ENST00000370536.2	SOX3, SRY (sex determining region Y)-box 3
hsa-miR-4275	5.846572662	ENST00000374507.4	TXNDC8, thioredoxin domain containing 8 (spermatzoa)
hsa-miR-194-3p	7.578560101	ENST00000382290.3	DAZ4, deleted in azoospermia 4

2.3 差异表达 miRNA 的实时定量 PCR 验证结果

将芯片结果与实时定量 PCR 结果进行比较,结果显示在非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清中 hsa-miR-483-3p、hsa-miR-194-3p、hsa-miR-4275 表达增加,而 hsa-miR-221-5p、hsa-miR-1263 表达降低,芯片与实时定量 PCR 检测到的差异 miRNA 表达一致,说明本研究芯片结果真实可靠,见图 3。

2.4 靶基因预测结果 采用 3 种在线软件(miRBase Targets、TargetScan、DIANA-microT)对相应的 miRNA 靶基因进行预测,可能的靶基因均与生精功能有关,见表 5。

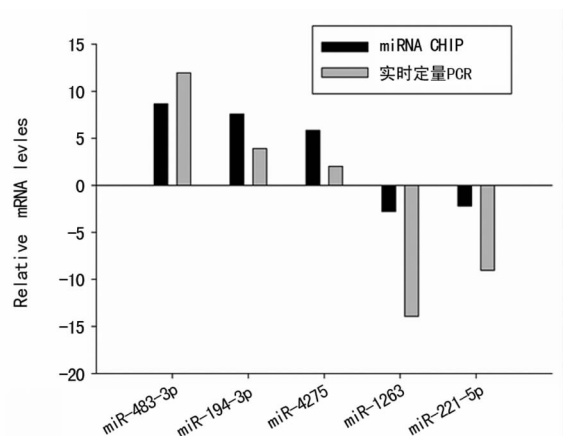


图 3 定量 RQ-PCR 与芯片杂交结果比较

3 讨 论

miRNA 广泛存在于各条染色体中,这些 miRNA 虽然只占人类基因总数的 2%,却调控着人类全基因组中 30%以上基因的表达。在哺乳动物细胞中,大多数 miRNA 是由基因间 DNA 序列编码,也有部分 miRNA 是由位于基因内含子的 DNA 序列编码。每个 miRNA 可能多个靶基因,而多个 miRNAs 可调节同一个基因^[5]。目前在人类细胞发现的 miRNA 共有上千种,人体内不同器官组织都具有各自独特的 miRNA 表达谱,miRNA 在血液和尿液等体液中稳定存在,并与组织中的 miRNA 相关,分析 miRNA 在血液中的表达,能够了解机体组织状况,血清 miRNA 的表达改变能预示疾病的产生和转归^[6]。在本研究中,采用 miRCURYTM Array (v16.0)表达谱芯片,分析非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清 miRNAs,共筛选出 71 个差异表达的 miRNAs,包括 47 个表达上调的 miRNAs 和 24 个表达下调的 miRNAs。目前尚无法预知这些表达差异的 miRNA 中,哪些对精子生成有影响。在后续实验中,笔者将在增加样本量的基础上,进一步检测睾丸组织的 miRNA 表达,阐明这些 miRNA 在精子生成的作用和功能。

已有研究表明,miRNAs 广泛参与精子发生的过程^[4]。BJORK 等^[7]研究表明,miR-18a 可直接作用于热休克因子 2(heat shock factor 2,HSF2),来控制精子发生过程中必需的基因的表达。LIAN 等^[8]研究显示,miR-383 通过 pRb 信号通路使 IRF1 转录增强,导致精子生成受阻。LIU 等^[9]研究表明,miR-122 可以通过调节 TNP2 的表达,从而影响精子正常形态的发育。MORITOKI 等^[10]发现 MiR-135a 有助于维持精原干细胞。YUAN 等^[11]研究表明,两个功能相关的 miR-34b/c 和 miR-449a/b/c 簇对于精子发生是必须的。笔者通过在线分析软件发现,差异性表达的 miRNA 的潜在靶基因都与精子生成有关。hsa-miR-1263 与精子特异的硫氧还蛋白域有关,hsa-miR-194-3p 与 DAZ 基因有关,hsa-miR-221-5p 与精子生成有关;hsa-miR-483-3p 的潜在靶基因是 SRY 基因。

笔者分析了非阻塞性无精症患者和正常捐精者血清中 miRNA 表达,发现了多个存在显著差异性表达的 miRNA,并进行了初步验证及靶基因预测,为进一步研究 miRNA 与非阻塞性无精症发生、发展的关

系提供了新的线索。

参考文献

- [1] THOMA M E, MCLAIN A C, LOUIS J F, et al. Prevalence of infertility in the united states as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(23):1324-1331.
- [2] NETO F T, BACH P V, NAJARI B B, et al. Genetics of Male Infertility[J]. *Curr Urol Rep*, 2016, 17(10):70.
- [3] DADA R, KUMAR M, JESUDASAN R, et al. Epigenetics and its role in male infertility[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(5):213-223.
- [4] LUO L F, HOU C C, YANG W X. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis[J]. *Gene*, 2015, 578(2):141-157.
- [5] KRUTOVSKIKH V A, HERCEG Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers[J]. *Bioessays*, 2010, 32(10):894-904.
- [6] 刘芳腾, 欧阳喜, 张官平, 等. 循环 miRNA 在结直肠癌诊断中的应用价值[J]. *实用医学*, 2016, 32(13):2241-2243.
- [7] BJORK J K, SANDQVIST A, ELSING A N, et al. miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis[J]. *Development*, 2010, 137(35):3177-3184.
- [8] LIAN J, TIAN H, LIU L, et al. Downregulation of microRNA-383 is associated with male infertility and promotes testicular embryonal carcinoma cell proliferation by targeting IRF1[J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1:94.
- [9] LIU T, HUANG Y, LIU J, et al. MicroRNA-122 influences the development of sperm abnormalities from human induced pluripotent stem cells by regulating TNP2 expression[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(12):1839-1850.
- [10] MORITOKI Y, HAYASHI Y, MIZUNO F, et al. Expression proling of microRNA in cryptorchid testes: mir-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1 [J]. *J Urol*, 2014, 191(21):1174-1180.
- [11] YUAN S, TANG C, ZHANG Y, et al. mir-34b/c and mir-449a/b/c are required for spermatogenesis, but not for the frst cleavage division in mice[J]. *Biol Open*, 2015, 4(5):212-223.

(收稿日期:2018-01-02 修回日期:2018-03-08)