

论著·临床研究

男性不育患者精子鱼精蛋白表达的研究*

孙昌瑞¹, 冯林²

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院检验科, 四川成都 610072;

2. 四川省妇幼保健院检验科, 四川成都 610091)

摘要: **目的** 采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测成都地区男性不育患者精子鱼精蛋白 1 (PRM1)和鱼精蛋白 2 (PRM2)的 mRNA 表达水平,探讨鱼精蛋白的表达对男性不育症的影响。 **方法** 以 GAPDH 为内对照,采用 FQ-PCR 检测 30 例体检健康组、83 例少精子症组、61 例畸形精子症组患者的精子 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达水平。 **结果** 少精子症组的 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达水平显著低于体检健康组和畸形精子症组,差异有统计学意义($P<0.05$);畸形精子症组与体检健康组的 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。联合检测 PRM1 和 PRM2,可提高对少精子症诊断的灵敏度和阴性预测值。 **结论** FQ-PCR 检测精子 PRM1 和 PRM2 的 mRNA 表达水平,具有操作简便、价格便宜、标本来源容易等优点,联合检测 PRM1 和 PRM2,可提高对少精子症诊断的灵敏度和阴性预测值,成都地区少精子症 PRM1 和 PRM2 的 mRNA 表达量降低,提示与精子发生存在密切关系,有助于临床对男性不育患者进行基因检测、诊断和个体化治疗,以及进行较大规模的流行病学调查。

关键词: 鱼精蛋白; 少精子症; 男性不育; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.07.006

中图法分类号:R698.2

文章编号:1673-4130(2019)07-0791-03

文献标识码:A

Study on the expression of sperm protamines in the male infertility patients*

SUN Changrui¹, FENG Lin²

(1. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610091, China)

Abstract: **Objective** To detect the express of PRM1 and PRM2 in sperm of the male infertility patients in Chengdu area by fluorescence quantitative polymerase chain reaction and to investigate the correlation between mRNA transcription level of protamines (PRM1 and PRM2) and the male infertility patients. **Methods** Using GAPDH as internal control, the expression levels of PRM1 and PRM2 in sperm of 30 healthy subjects, 83 oligospermia patients and 61 malformed spermatozoa patients were detected by FQ-PCR. **Results** The express of PRM1 and PRM2 in oligospermia group was significantly lower than physical health group and teratozoospermia group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no difference in the express of PRM1 and PRM2 between teratozoospermia group and physical health group ($P>0.05$). The sensitivity and negative predictive value were improved by combined detection of PRM1 and PRM2 to the diagnosis of oligozoospermia. **Conclusion** The sensitivity and negative predictive value were improved by combined detection of PRM1 and PRM2 to the diagnosis of oligozoospermia. It also can be effective in diagnosis of oligozoospermia though the advantages of simple operation, low price and easy sample source. There are low expression of PRM1 and PRM2 in oligozoospermia in Chengdu, suggesting a close relationship with spermatogenesis, which is helpful for clinical detection, diagnosis and individualized treatment of male infertility patients, as well as large-scale epidemiology survey.

Key words: protamines; oligozoospermia; male infertility; fluorescence quantitative polymerase chain reaction

* 基金项目:四川省卫生厅基金资助项目(16PJ471)。

作者简介:孙昌瑞,男,主管技师,主要从事医学分子生物学研究。

本文引用格式:孙昌瑞,冯林. 男性不育患者精子鱼精蛋白表达的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(7): 791-793.

全世界 15% 的育龄夫妇不孕不育,而男性因素占 30%~40%,其中精子异常占了 14%~15%^[1-3]。越来越多的研究表明,鱼精蛋白的表达与精子的形成、活力和染色体有密切相关性^[4-5],鱼精蛋白的组成成分缺失、含量过低或过高温,都会导致精子 DNA 断裂或组成比例异常,使得精子 DNA 损伤加剧^[6-8]。研究发现在成都地区男性不育的调查报告,未见有关于鱼精蛋白 1 (PRM1) 和鱼精蛋白 2 (PRM2) 的 mRNA 表达的报道,因此,本研究采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)方法,检测了男性体检健康者 30 例、少精子症 83 例、畸形精子症 61 例的不育患者的精子 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达情况,用基因分析方法探讨成都地区男性不育患者少精子症与鱼精蛋白基因表达的相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取年龄 24~36 岁的男性体检健康者 30 例作为体检健康组,年龄 24~35 岁的 83 例少精子不育症患者作为少精子症组,年龄 23~36 岁的畸形精子不育症患者 61 例作为畸形精子症组。不育症患者均来自本院生殖辅助研究中心,采集标本前研究对象禁欲 3~5 d,采集后在 37℃、20~30 min 液化完全后,采用计算机精液分析系统和巴氏改良染色法进行检测,不育症患者均符合世界卫生组织(WHO)第 5 版不育症临床诊断标准,同时排除由染色体核型异常、Y 染色体微缺失、隐睾、生殖系统感染、阻塞性无精子症、性腺发育不良、免疫或内分泌疾病等引起的不育患者。所有标本均需本人签署医学伦理知情同意书。

1.2 精液纯化和提取 RNA 将液化后的精液标本离心后弃上清,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)反复混匀,离心,弃上清,重复 2~3 次。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取 RNA,检测 RNA 浓度、纯度及完整性。

1.3 FQ-PCR 引物 采用 PE 公司 Primer Express

软件设计 PRM1、PRM2 和 GAPDH 引物序列,由广州达安基因生物公司合成。PRM1 的序列如下,F: CAG CCC ACA GAG TTC CAC CT,R: GCA CCT CAT GGC TCT CCT C; PRM2 的序列, F: GCA AGA GCA AGG ACA CCA C,R: AGC CTC TGC GAT GCC TCC T; GAPDH 的序列, F: GCC AGT GGA CTC CAC GAC,R: CAA CTA CAT GGT TTA CAT GTT C。

1.4 cDNA 合成 FQ-PCR 反应体系(美国 Invitrogen 公司)20 μL:总 RNA 1 μg,反转录酶 20 U,随机引物 200 ng,5×反应缓冲液 4 μL,42℃反应 50 min。

1.5 FQ-PCR 反应 扩增 PRM1、PRM2 和 GAPDH,循环条件:50℃ 2 min,95℃预变性 10 min,95℃变性 30 s,60℃退火 40 s,循环 40 次,72℃末次延伸 5 min。标准曲线的制备:采用 BIECHE 的标准曲线制备方法,在每次扩增均使用标准品制备标准曲线,范围为 10²~10⁶ copy/mL^[9]。定量分析:根据标准曲线,仪器自动计算出标本中 PRM1、PRM2 和 GAPDH 的每毫升拷贝数,以 PRM1、PRM2 和 GAPDH 比值作为 PRM1 和 PRM2 的 mRNA 表达水平。

1.6 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行两组比较, χ^2 检验进行率的比较,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PRM1 和 PRM2 在精液中的表达 以 GAPDH 为内参基因,分别计算体检健康组、少精子症组和畸形精子症组 PRM1 和 PRM2 mRNA 相对表达水平,精液中 PRM1 和 PRM2 在少精子症组精液中表达率显著低于体检健康组和畸形精子症组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);体检健康组和畸形精子症组 PRM1 和 PRM2 表达率比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 各组 PRM1 和 PRM2 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GAPDH	PRM1	PRM1/GAPDH	PRM2	PRM2/GAPDH
		(×10 ⁵ copy/mL)	(×10 ² copy/mL)	(×10 ⁻³)	(×10 ² copy/mL)	(×10 ⁻³)
体检健康组	30	3.2±0.1	17.6±4.3	5.6±1.1	19.1±6.2	5.9±1.4
畸形精子症组	83	3.1±0.1	16.1±3.1	5.1±1.2	18.6±5.3	5.7±1.3
少精子症组	61	3.2±0.1	5.4±1.3	1.6±0.3*#	7.1±2.4	1.8±0.6*#

注:与体检健康组比较,**P* < 0.05;与畸形精子症组比较,#*P* < 0.05

表 2 PRM1 和 PRM2 单独及联合检测用于少精子症诊断的效能(%)

基因	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
PRM1	63.9	73.6	68.8	69.1
PRM2	66.3	70.3	67.1	69.6
PRM1+PRM2	80.7	64.8	67.7	78.7

2.2 PRM1 和 PRM2 检测用于诊断少精子症的灵敏度和特异度 结果初步显示,将 PRM1 和 PRM2 联合检测,可提高对少精子症诊断的灵敏度和阴性预测值,见表 2。

3 讨 论

随着分子生物学的不断发展,人们更多地从遗传学角度对男性不育进行分析,比如染色体畸变、单基

因突变、Y 染色体微缺失、遗传多态性等^[10-11]，其中将鱼精蛋白的核酸和蛋白质进行分析研究，成为特发性男性不育的一大热点，鱼精蛋白广泛存在于人类及其他许多物种精子中，是含有丰富精氨酸的碱性蛋白质，1874 年有研究者发现并成功的将其从精子中分离出来，编码 PRM1 和 PRM2 的基因位于 16p13.3 (16 号染色体短臂)，相对分子质量大约 $4 \times 10^3 \sim 7 \times 10^3$ ，鱼精蛋白与精子生成、染色质结构、受精卵发育等紧密相关^[12]。

PRM1 有 50 个氨基酸残基，在 N 末端有 1 个高度保守区，和 4 个高度保守的精氨酸组成的中央核心区，PRM2 富有的精氨酸和组氨酸残基，临床研究表明，PRM1 表达量与精子的产生有密切的关联，当它的表达量异常时，会出现精子发育失调导致精子数量减少，而 PRM2 表达异常会改变精子负电荷量，降低精子染色质的凝聚稳定性，造成 DNA 的损伤^[13-14]。MILLER 等^[15]研究报道，PRM 可以保护精子 DNA，使其免受损伤，这是受精成功的关键因素之一。李俊等^[16]采用限制性酶切及 DNA 测序技术对 PRM1 C321A 位点进行基因分型，发现不育患者 PRM1 C321A 位点 AA 基因型频率显著高于生育男性，导致精子前向运动能力及正常形态比例等参数明显下降，可能是男性不育的主要因素。

目前对成都地区男性不育的流行病学调查中，尚未见关于鱼精蛋白基因表达和少精子症相关性的报道，本研究分别检测了体检健康组、少精子症组和畸形精子症组 PRM1 和 PRM2 mRNA 的表达量，发现 PRM1 和 PRM2 在少精子症组的表达率显著低于体检健康组和畸形精子症组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；而在体检健康组和畸形精子症组表达率比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达水平降低极可能是造成精子数量减少而不是精子形态异常的原因，这一结果，与国内学者洪丹等^[17]的报道是一致的，即 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达量减少可能影响精子染色质包装，使得精子形成过程异常，从而导致成熟精子数量减少。另一方面，联合检测 PRM1 和 PRM2，可提高对少精子症诊断的灵敏度和阴性预测值。

4 结 论

采用 FQ-PCR 检测精液中 PRM1 和 PRM2 mRNA 表达，方法简便易行，价格便宜，标本来源容易，不会给患者带来痛苦，为个体化治疗提供遗传性依据，同时，也可以进行较大规模的流行病学调查，探究遗传异常发生类型及分布特点，较为全面的评估无精子症、少精子症患者的遗传学缺陷，为辅助生殖患者提供治疗前的遗传咨询，为临床治疗方案的选择夯实基础。

参考文献

[1] BACH P V, SCHLEGEL P N. Sperm DNA damage and

its role in IVF and ICSI[J]. Basic Clin Androl, 2016, 26 (1): 15.

[2] 杨洋, 王树玉. 男性不育影响因素的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(10): 131-132.

[3] JIANG W J, SUN H, ZHANG J, et al. Polymorphisms in protamine 1 and protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 153-154.

[4] 蒋卫军, 张静, 夏欣一, 等. 鱼精蛋白基因多态性与男性不育相关性研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2015, 21(12): 1134-1137.

[5] BRUNNER A M, NANNI P, MANSUY I M. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines [J]. Epigenetics Chromatin, 2014, 7(1): 2.

[6] BAO J Q, BEDFORD M T. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis [J]. Reproduction, 2016, 151(5): 55-70.

[7] 黄悦悦, 薛林涛, 何冰. 精子 DNA 损伤在辅助生殖中的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2016, 9(3): 261-265.

[8] HA N L, MOZDARANI H, PELLESTOR F. Impact of DNA damage on the frequency of sperm chromosomal aneuploidy in normal and subfertile men[J]. Iran Biomed J, 2011, 15(4): 122-129.

[9] 邓君, 刘蔚, 洪华, 等. MUC1 基因表达与其他肿瘤标志物在乳腺癌诊断中的应用[J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13 (6): 23-25.

[10] 王健, 任华英, 丁显平, 等. 多重荧光 PCR 在 Y 染色体微缺失检测中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23 (8): 5-7.

[11] 倪梦霞, 郅慧杰, 刘帅妹等. TP53 基因 rs1042522 单核苷酸多态性与男性不育相关性研究[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(2): 142-146.

[12] OLIVA R. Protamines and male infertility[J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(4): 417-435.

[13] 刘小霞, 焦海燕. 鱼精蛋白与特发性男性不育的研究进展[J]. 宁夏医学杂志, 2013, 35(9): 874-875.

[14] 张亚亚, 覃琼玉, 林冲, 等. 亚慢性苯吸入暴露抑制小鼠单倍体精子核蛋白基因的表达[J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(4): 249-253.

[15] MILLER D, BRINKWORTH M, LLES D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics[J]. Reproduction, 2010, 139(2): 287-301.

[16] 李俊, 刘芳, 宋亚曼, 等. 人鱼精蛋白 1 多态性与汉族男性生育力的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26 (13): 48-51.

[17] 洪丹, 楼哲丰, 郑九嘉, 等. 少精子症患者精子鱼精蛋白表达及染色质包装质量[J]. 温州医科大学学报, 2018, 48 (4): 271-274.

(收稿日期: 2018-09-24 修回日期: 2018-12-21)