

MiR-429 及其目标基因 HSPA4L 在弱精症低活力精子中的表达

陈正勤, 何丽霞[△], 刘升学

桂林医学院附属医院 妇产科(桂林 541004)

【摘要】 目的 探讨 *miR-429* 及其目标基因热休克蛋白 A4L(*HSPA4L*)在弱精症患者低活力精子中的表达。**方法** 收集 20 份成年健康生育能力的精液标本和 20 份弱精症患者精液标本,按照 WHO 第五版规定的精液分级标准,对液化后的精液进行常规参数分析;利用 qRT-PCR 检测精子中 *miR-429* 的表达水平;通过生物信息学手法预测 *miR-429* 的靶点;构建 *HSPA4L* 3'UTR 双萤光素酶报告载体,采用双萤光素酶报告实验验证 *miR-429* 的靶基因;利用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 *HSPA4L* mRNA 和蛋白的表达水平。**结果** 弱精症精子活力低于健康对照组,同时 *miR-429* 在弱精症精子中表达上调。通过生物信息学手法、双萤光素酶报告基因基检测以及转染实验发现 *miR-429* 通过作用于 *HSPA4L* 3'UTR 来抑制 *HSPA4L* mRNA 和蛋白的表达。进一步的 qRT-PCR 分析发现弱精症组的 *HSPA4L* mRNA 和蛋白的表达水平下调,并且 *HSPA4L* mRNA 表达水平与 *miR-429* 的表达水平呈负相关($r = -0.725, P < 0.05$)。**结论** *MiR-429* 在低活力精子中的表达上调,可能通过调控 *HSPA4L* 基因来影响精子的活力。

【关键词】 *MiR-429* HSPA4L 弱精症 精子 精子活力 精子活性

Expression of *MiR-429* and Its Target Gene *HSPA4L* in Sperms from Asthenospermia Patients CHEN Zheng-qin, HE Li-xia[△], LIU Sheng-xue. Department of Obstetrics and Gynaecology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, China

[△] Corresponding author, E-mail: helixia3245@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of *miR-429* and its target gene heat shock protein A4L (*HSPA4L*) in sperms from asthenospermia patients. **Methods** Twenty semen samples from healthy and fertile adults and 20 semen samples from asthenospermia patients were collected, and normal sperm parameters were defined according to World Health Organization criteria. The expression levels of *miR-429* and *HSPA4L* mRNA were determined by qRT-PCR, and the bioinformatics tool (Targetscan) was used to predict the target of *miR-429*. Luciferase reporter assay and transfection study were performed to confirm target gene of *miR-429*. The expression levels of *HSPA4L* mRNA and protein were further determined by qRT-CPR and Western blot, respectively. **Results** The motility and viability of sperms from asthenospermia patients were lower than that in control group, and *miR-429* was up-regulated in sperms from asthenospermia patients. Bioinformatics analysis revealed that *HSPA4L* was a target of *miR-429*. Luciferase reporter assay and transfection study further confirmed that *miR-429* suppresses the expressions of *HSPA4L* mRNA and protein via directly targeting *HSPA4L* 3'UTR. Results from clinical samples also demonstrated that *HSPA4L* mRNA and protein were down-regulated in sperms from asthenospermia patients and the expression level of *miR-429* was inversely correlated with the expression level of *HSPA4L* mRNA ($r = -0.725, P < 0.05$). **Conclusion** *MiR-429* is up-regulated in sperms from asthenospermia patients, and it may modulate the motility and viability of sperms via suppressing the expression of *HSPA4L*.

【Key words】 *MiR-429* HSPA4L Asthenospermia Sperm Motility Viability

弱精症是指精液中前向运动(PR)的精子百分率低于 32% 的病症,这种病症是男子不育的主要原因之一^[1-4]。精子是高度分化的细胞,但是近年来研究发现精子中含有一定量的非编码 RNA,这些 RNA 在精子的运动、获能、受精和胚胎发育等过程

中起着非常重要的作用^[5-6]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种内源性的小分子单链 RNA,长度为 22~25 个碱基对。MiRNA 能够识别特定的目标 mRNA 并在转录后水平通过促进靶 mRNA 的降解和(或)抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的作用^[7]。MiRNA 在肿瘤以及胚胎发育中的作用已经有了广泛的研究^[8],但是对于 miRNA

与精子活力的研究很少^[9]。近年来研究表明弱精症可能与 miRNA 的表达异常有关^[10-11]。有研究者检测了不育男性的精液中不同 miRNA 的表达量,发现 miR-34b、miR-34c 以及 miR-122 的表达下调,而 miR-429 在不育男性精液中表达上调^[12]。也有研究发现,miR-429 在非阻塞性无精症患者精液中表达上调^[13]。最近研究发现,炔雌醇在损害黄颡鱼精巢发育的同时能够导致 miR-429 表达水平上升,提示 miR-429 可能与雄性的生殖发育有关^[14]。本研究探讨 miR-429 以及靶基因热休克蛋白 A4L (HSPA4L)在低活力精子中的表达情况,并对 miR-429 的功能进行初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293T 细胞株购自上海中科院细胞库;RPMI-1640 培养液和胎牛血清购自 HyClone;Percoll 细胞分离液购于 Solar-bio 公司;miR-429 模拟物 (miR-429 mimics), miR-429 抑制物 (miR-429 inhibitor),无关序列 (mimics control, inhibitor control)以及相关引物均购于广州瑞博生物科技有限公司;High Pure miRNA Isolation Kit 购于罗氏公司;miR-429 cDNA synthesis Kit 和 Lipofectamine 2000 购于广州瑞博生物科技有限公司;miR-429 荧光定量 PCR 试剂盒购于 TaKaRa;pmirGLOVector 质粒购于上海捷瑞生物工程有限公司;双萤光素酶报告基因试剂盒购于 Promega;HSPA4L 抗体、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国 Abcam 公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海 BestBio 公司。

1.2 细胞培养以及转染

HEK293T 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱内常规培养,消化传代。当 6 孔板里每孔细胞数量达 2×10^5 时,用不含双抗的培养液培养 24 h,细胞融合率达 80% 时采用 Lipofectamine 2000 试剂盒进行转染,在转染 miR-429 的实验中,实验分为 miR-429 mimics 组(转染使 miR-429 的表达水平升高),miR-429 inhibitor 组(抑制 miR-429 的表达)以及各自的对照组 (mimic control, inhibitor control;转染后对 miR-429 表达水平没有影响);转染后 24 h 收集细胞进行各项检测。

1.3 收集及处理标本

1.3.1 收集标本及精液分析 20 份成年健康有生

育能力男性的精液标本和 20 份弱精症患者精液标本从桂林医学院附属医院生殖医学研究中心收集。所有的志愿者及患者均签署知情同意书。按照 WHO 第五版规定精液分级标准对液化后的精液进行常规参数分析^[15]。精子活力:射精后 60 min 内,50% 或更多精子前向运动即为 a 级和 b 级。以 a 级和 b 级精子之和占有所有精子的百分比反映精子活力。精子存活率:射精后 60 min 内,精液中活精子的比例。

1.3.2 标本处理 高活力精子分离:将健康有生育能力男性的精液于 37 °C 液化 30 min 后,用标准 SWIM-UP 上游技术获取上层高活力精子。再用 Percoll 细胞分离液做 40%、80% 密度梯度离心,1 000 r/min 离心 25 min。取下层高活力精子,用 Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) 培养液清洗 2 次后,于 -80 °C 保存备用。低活力精子处理:弱精症患者精液于 37 °C 液化 30 min 后,2 000 r/min 离心 8 min 去除精浆,将精子用 BWW 培养液重悬,1 000 r/min 离心 8 min 清洗 2 次,用 Percoll 细胞分离液做 30%、60%、90% 密度梯度离心,1 000 r/min 离心 25 min 后,取第 2 层精子,再做 40%、80% 密度梯度离心,1 000 r/min 离心 25 min,取第 1 层低活力精子,用 BWW 培养液清洗 2 次后,于 -80 °C 保存备用。

1.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 检测 miR-429 以及 HSPA4L mRNA 的表达

使用 High Pure miRNA Isolation Kit 提取总 RNA,以 1 μ g 总 RNA 为模板,分别加入 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP),2 μ L 10 $\times$ RT 缓冲液,1 μ L RT 特异引物 (1 μ mol/L),2 μ L MMLV 反转录酶 (10⁷ U/L),0.3 μ L RNA 酶抑制剂 (4 $\times$ 10⁷ U/L),将 RNA 逆转录成 cDNA。采用荧光定量 PCR 仪扩增检测目的片段。MiR-429 所用的引物 R: 5'-UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU-3', F: 5'-ACGGUUU UACCAGACAGUAUUA-3', 扩增产物长度为 83 bp;内参 U6 的引物 R: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', F: 5'-ACGCTTCACGAATTGCGTGTC-3', 扩增产物长度为 100 bp;HSPA4L 的引物 R: 5'-TTTACATGAAGTGCCTTATCCTGA-3', F: 5'-AATTCCTCTTCTGGA GTGTGTTC-3', 扩增产物长度为 234 bp;内参 GAPDH 的引物 R: 5'-CTGGTAAAGTGGATATGTTGCCAT-3', F: 5'-TGGAATCATATTGGA

ACATGTAAACC-3', 扩增产物长度为 118 bp。扩增条件为: 95 ℃, 5 min; 45 个 PCR 循环 (95 ℃, 10 s; 60 ℃, 20 s; 78 ℃, 20 s)。MiR-429 和 HSPA4L mRNA 的表达水平分别以 U6 和 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。实验重复 3 次。

1.5 双萤光素酶报告基因系统验证 miR-429 对 HSPA4L 的调控作用

通过信息学手段根据 Targetscan (www.targetscan.org) 来预测 miR-429 的潜在靶点, 分析结果发现 HSPA4L mRNA 的 3'UTR 区为 miR-429 的潜在靶基因。将含有 miR-429 结合位点在内的 HSPA4L 3'UTR 区进行 PCR 扩增, 然后将扩增的片段插入到 pmirGLO 载体中, 载体命名为 pmirGLO-HSPA4L-wide type (HSPA4L-3'UTR-WT); 设计针对 HSPA4L 3'UTR “种子区”的突变引物, 插入到 pmirGLO 载体多克隆位点中, 载体命名为 pmirGLO-HSPA4L-mutant (HSPA4L 3'UTR-Mut)。HSPA4L 3'UTR-WT、HSPA4L 3'UTR-Mut 分别与 miR-429 mimics、miR-429 inhibitor, 以及各自的对照 (mimics control、inhibitor control) 两两组合共转染到 HEKT293 细胞中。转染后 48 h, 收集 HEKT293 细胞进行各组细胞萤火虫萤光素信号及海肾萤光素信号的检测。实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 HSPA4L 蛋白表达水平

将提取的精子蛋白或者 HEK293T 细胞蛋白采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测总蛋白浓度。取 30 μg 等量总蛋白上样, 100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干法转移至醋酸纤维素膜, 然后用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 3 次洗涤后与 1:1 000 稀释的 HSPA4L 抗体于 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次; 再用 1:2 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 然后 TBST 洗涤 3 次, 曝光显影, 以 β-actin 作为内参, 用 Image Studio 软件获取图像并进行数据处理。以各条带与条带内参灰度值的比值为蛋白表达量。实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本的 *t* 检验或者单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较。相关分析采用 Pearson 相关。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-429 在弱精症患者中的表达

常规精液参数分析比较对照组和弱精症组的精液特性 (表 1)。结果发现对照组与弱精症组的精液 pH 值差异无统计学意义。在弱精症组中, 精液的密度、精子活力以及精子存活率均低于对照组 (P<0.05)。通过 qRT-PCR 实验进一步检测两组的 miR-429 的表达水平, 结果显示弱精症组 miR-429 的表达水平 (1.31±0.40) 高于对照组 (0.54±0.27, P<0.01)。

表 1 对照组与弱精症组精液常规参数分析
Table 1 Characteristics of semen from control group and ansthenospermia

Characteristic	Control group (n=20)	Ansthenospermia group (n=20)
Age /yr.	29.86±4.67	28.77±3.23
pH	7.37±0.23	7.37±0.22
Density/(10 ⁶ mL ⁻¹)	121.65±50.45	56.89±43.29 *
Motility/%	63.55±10.22	32.11±12.79 **
Vitality/%	82.33±11.34	47.62±20.65 **

* P<0.05, ** P<0.01, vs. control group

2.2 MiR-429 靶向作用对 HSPA4L mRNA 及蛋白表达的影响

见图 1。通过生物信息学手法, 预测发现 HSPA4L 3'UTR 很有可能是 miR-429 的一个调控靶点 (图 1A)。采用双萤光素酶报告基因基检测各组萤光信号的变化, 结果发现, miR-429 mimics 和 HSPA4L 3'UTR-WT 共转染 HEK293T 细胞后, 细胞的萤光信号与对照组相比明显受到抑制; miR-429 inhibitor 和 HSPA4L 3'UTR-WT 共转染细胞

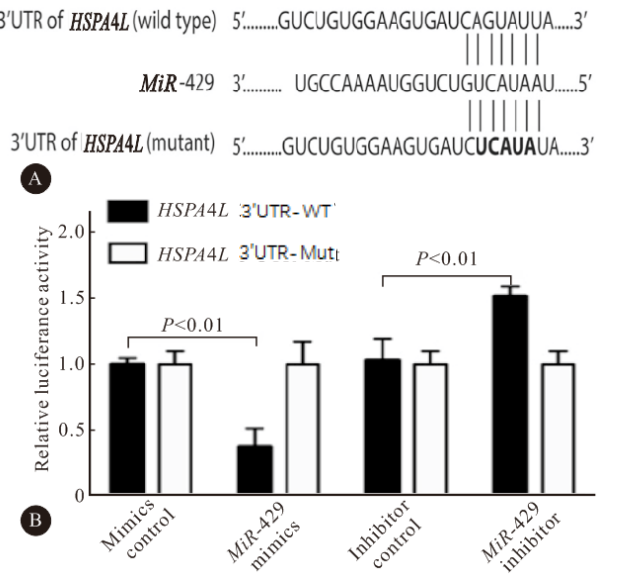


图 1 MiR-429 对 HEK293T 细胞中 HSPA4L 基因表达的靶向抑制
Fig 1 MiR-429 suppressed the HSPA4L expression via targeting HSPA4L 3'UTR

A: MiR-429-binding sequences in the 3'UTR of HSPA4L; B: Luciferase reporter assay

后,细胞的荧光信号与对照组相比明显升高(图 1B, $P < 0.05$)。而 *miR-429* mimics 或者 *miR-429* inhibitor 和 *HSPA4L* 3'UTR-Mut 共转染细胞后,荧光信号与对照组相比没有变化($P > 0.05$)。进一步转染实验结果发现,*miR-429* mimics 的转染可以下调 *HSPA4L* mRNA 以及蛋白的表达水平,而 *miR-429* inhibitor 的转染可以上调 *HSPA4L* mRNA 以及蛋白的表达水平,结果与对照组相比差异有统计学意义(图 2, $P < 0.05$)。

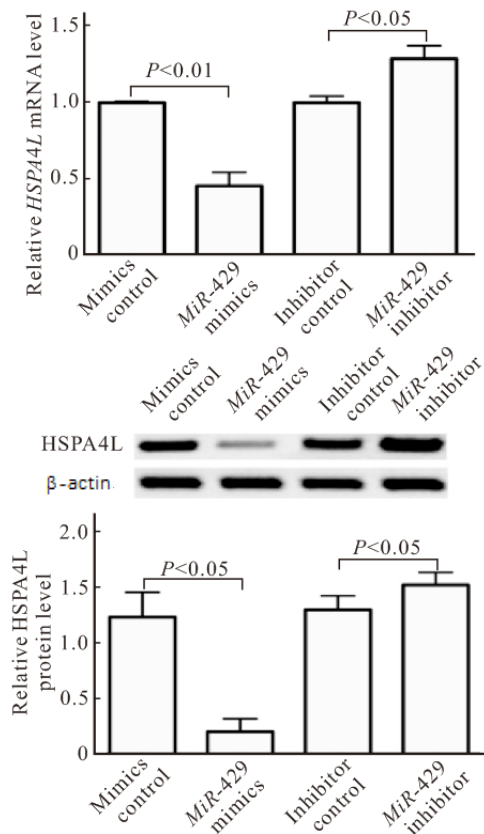


图 2 转染 *miR-429* 对 HEK293T 细胞中 *HSPA4L* 基因和蛋白表达的影响

Fig 2 Expression levels of *HSPA4L* mRNA and protein in HEK293T cells by transfection with *miR-429*

2.3 弱精症患者中 *miR-429* 的表达水平与 *HSPA4L* mRNA 的表达水平的相关性

见图 3。在 qRT-PCR 结果中,弱精症组的 *HSPA4L* mRNA (2.05 ± 1.01) 低于对照组的表达水平 (3.50 ± 1.68 , $P < 0.01$);进一步的 Western blot 实验结果显示弱精症组 *HSPA4L* 蛋白 (0.42 ± 0.40) 的表达水平低于对照组 (0.97 ± 0.83) ($P < 0.05$)。Pearson 相关性分析结果显示,在弱精症患者中 *miR-429* 的表达水平与 *HSPA4L* 的表达水平呈负相关性 ($r = -0.725$, $P < 0.05$)。

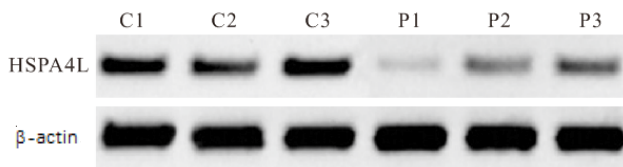


图 3 在弱精症患者中 *HSPA4L* 蛋白的表达水平

Fig 3 *HSPA4L* protein expression in sperms from asthenospermia patients

C: Healthy volunteer from control group; P: Patients from asthenospermia group

3 讨论

不孕不育是一个全球性的医学问题,根据世界卫生组织统计,全球存在不孕不育的育龄夫妻的比例大约为 20%,其中因男性原因导致的不育占一半左右,同时研究发现精子活力低下导致的弱精症是男子不育的主要原因之一^[16]。本研究首先利用常规分析发现弱精症患者的精液密度、活力以及存活率都低于健康对照组。我们通过 qRT-PCR 检测出 *miR-429* 在弱精症患者中表达下调,通过生物信息学手法、双萤光素酶报告基因检测以及转染实验发现 *miR-429* 通过作用于 *HSPA4L* 3'UTR 来抑制 *HSPA4L* mRNA 的表达。进一步的 qRT-PCR 分析发现弱精症组的 *HSPA4L* mRNA 的表达水平明显下调并且与 *miR-429* 的表达水平呈负相关性。我们推测 *miR-429* 水平可能与精子活力相关,并且 *miR-429* 影响精子的活力可能是通过抑制 *HSPA4L* 基因的表达来实现的。

有研究发现 *miR-429* 在不育男性精液中表达上调^[12]。本研究进一步研究了弱精症男性患者中的 *miR-429* 的表达,qRT-PCR 的结果显示 *miR-429* 在弱精症患者的表达上调,这一发现与前期观察不育男性精液中 *miR-429* 表达水平的结果一致,提示 *miR-429* 的低表达可能与精子活力的下降有关并且可能影响到男性的生育能力。由于弱精症往往是因为睾丸生精功能异常造成的,所以我们在精子中检测到的 *miR-429* 变化也很可能是睾丸生精功能异常的反映。因此后续的研究可以进一步观察 *miR-429* 在睾丸生精功能异常患者身上的变化。

热休克蛋白(HSP)在男性生殖中存在重要作用。研究发现在雄性小鼠中带有 *HSP70-2* 突变基因的生精细胞会因为受阻于减数分裂前期而凋亡,导致精子缺乏,发生不育^[17]。实验同时观察到 *HSPA2* 作为 HSP 家族的成员在成熟障碍的睾丸

中的表达受到抑制^[18]。CEDENHO 等^[19]的研究发现 HSPA2 的类似物(HSP70-2)的基因敲除会导致大鼠初级精母细胞发育停滞于有丝分裂 I 期。最近的研究发现,在精索静脉曲张的患者身上, HSPA1B 基因的表达上调,这种上调与 miR-15a 作用于 HSPA1B 3' UTR 的区域有关^[20]。HSPA4L 作为 HSP 中的一员,与精子活力的关系研究较少。最近有研究表明 HSPA4L 基因敲除的小鼠有着更高不育率^[21],提示 HSPA4L 可能与雄性不育有关。本研究通过生物信息学手法,双萤光素酶报告基因基检测以及转染实验发现 miR-429 通过作用于 HSPA4L 3' UTR 来抑制 HSPA4L mRNA 的表达。本研究还发现弱精症组的 HSPA4L mRNA 的表达水平下调并且与 miR-429 的表达水平呈负相关。这些结果提示 miR-429 过表达可能降低精子活力,这种作用可能是通过抑制 HSPA4L 基因表达实现的。

本研究初步发现了 miR-429 与弱精症患者精子活力有关,而 miR-429 与精子活性相关性可能是通过调控 HSPA4L 基因的表达来实现。将来需要进一步进行功能性的实验来确定 miR-429 如何调控精子活力。

参 考 文 献

- [1] LUCONI M, FORTI G, BALDI E. Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci*, 2006(11):1433-1447[2016-01-12]. <http://www.bioscience.org/2006/v11/af/1894/list.htm>. <http://dx.doi.org/10.2741/1894>.
- [2] MOBBERLEY MA. Electron microscopy in the investigation of asthenozoospermia. *Br J Biomed Sci*, 2010, 67(2):92-100.
- [3] ORTEGA C, VERHEYEN G, RAICK D, *et al*. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Hum Reprod Update*, 2011, 17(5):684-692.
- [4] POONGOTHAI J, GOPENATH TS, MANONAYAKI S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*, 2009, 50(4):336-347.
- [5] DE MATEO S, SASSONE-CORSI P. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs; role of the germ granule. *Semin Cell Dev Biol*, 2014(29):84-92[2016-01-12]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952114000925>. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.021.
- [6] KOTAJA N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril*, 2014, 101(6):1552-1562.
- [7] MOSS EG. MicroRNAs; hidden in the genome. *Curr Biol*, 2002, 12(4):R138-R140.
- [8] MCMANUS MT. MicroRNAs and cancer. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(4):253-258.
- [9] 冉茂良, 陈 斌, 尹 杰, 等. 睾丸发育和精子生成相关 miRNA 研究进展. *遗传*, 2014, 36(7):646-654.
- [10] 江 雯, 刘能辉. 体外受精患者精子 miRNA-21, miRNA-34c, miRNA-140, miRNA-375 与胚胎质量的相关性研究. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(8):864-871.
- [11] WU Y, ZHONG A, ZHENG H, *et al*. Expression of flotilin-2 and acrosome biogenesis are regulated by miR-124 during spermatogenesis. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0136671. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136671>.
- [12] ABU-HALIMA M, HAMMADEH M, BACKES C, *et al*. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril*, 2014, 102(4):989-997[2016-01-12]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.001>.
- [13] WU W, QIN Y, LI Z, *et al*. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia; significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod*, 2013, 28(7):1827-1836.
- [14] JING J, WU J, LIU W, *et al*. Sex-biased miRNAs in gonad and their potential roles for testis development in yellow catfish. *PLoS One*, 2014, 9(9):e107946 [2016-01-12]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107946>.
- [15] WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, WHO Press, 2010.
- [16] SCHILL WB. Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility—a review. *Andrologia*, 1979, 11(2):77-107.
- [17] SASAKI T, MARCON E, MCQUIRE T, *et al*. Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *J Cell Biol*, 2008, 182(3):449-458.
- [18] NIXON B, BROMFIELD EG, DUN MD, *et al*. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition. *Asian J Androl*, 2015, 17(4):568-573.
- [19] CEDENHO AP, LIMA SB, CENEDEZE MA, *et al*. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*, 2006, 21(7):1791-1794.
- [20] JI Z, LU R, MOU L, *et al*. Expressions of miR-15a and its target gene HSPA1B in the spermatozoa of patients with varicocele. *Reproduction*, 2014, 147(5):693-701.
- [21] HELD T, PAPROTTA I, KHULAN J, *et al*. Hspa4l-deficient mice display increased incidence of male infertility and hydronephrosis development. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(21):8099-8108.

(2016-04-03 收稿, 2016-09-12 修回)

编辑 吕 熙