DOI:10.16016/j.1000-5404.202104129

弱精症精子 SOD2 和 PRDX6 的表达变化及其与精子运动能力的相关性分析

杨梓涵[1,2],郝小玲[1,2],王 虹[2],叶 柳[1],黄 润[1],孟江萍[1] 400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院生殖医学中心[1],检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 探究活性氧(reactive oxygen species,ROS)对精子的损伤作用,分析抗氧化蛋白超氧化物歧化酶 2(SOD2)和过氧化物酶 6(PRDX6)在弱精症患者精子中的表达变化,并分析其与精子运动能力的相关性。**方法** 选取 2020 年 1-11 月我中心收集的弱精症患者精液标本(PR<32%,PR+NP<40%,精子密度≥15×10^6/mL)84 例,正常精液标本(PR≥32%,PR+NP≥40%,精子密度≥15×10^6/mL)55 例。通过精液计算机辅助分析系统(computer-aided sperm analysis,CASA)检测精液常规参数及精子运动参数;不同浓度 H_2O_2 处理正常精子后通过 CASA 检测精子活力和运动参数变化,伊红染色检测精子存活率变化,Western blot 检测精子 SOD2 和 PRDX6 表达变化;运用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和 Western blot 同时对弱精症组精子和正常组精子 SOD2 和 PRDX6 表达进行定量检测,进一步统计分析 SOD2 和 PRDX6 的表达变化及其与精液参数的相关性。**结果** CASA 检测结果显示精子活力在 0.10、0.35、1.00 mmol/L H_2O_2 处理后显著降低;精子运动参数中曲线速率(VCL)、直线速率(VSL)、平均路径速率(VAP)和平均角位移(MAD)在 0.05、0.10、0.35 mmol/L H_2O_2 处理后剂量依赖式降低,侧摆幅度(ALH)、直线性(LIN)、摆动性(WOB)和前向性(STR)在 0.10、0.35 mmol/L H_2O_2 处理后降低;伊红染色结果显示精子存活率在 0.35、1.00 mmol/L H_2O_2 处理后降低,而 Western blot 检测结果显示精子 SOD2 和 PRDX6 表达呈 H_2O_2(0.10、0.35 和 1.00 mmol/L)剂量依赖式增高。RT-qPCR 检测结果显示弱精症组精子 SOD2[(0.297±0.038)*vs*(0.895±0.140),P<0.01]与 PRDX6[(0.743±0.107)*vs*(1.416±0.163),P<0.01]mRNA 相对表达量低于正常组。Western blot 结果显示弱精症组精子 SOD2[(0.689±0.147)*vs*(1.466±0.212),P<0.01]与 PRDX6[(0.726±0.084) *vs* (1.183±0.100),P<0.01]蛋白相对表达量低于正常组。相关性分析结果显示精子 SOD2 mRNA 相对表达量与前向运动精子百分率(r=0.267,P<0.01)和总活力(r=0.329,P<0.01)呈正相关;PRDX6 mRNA 相对表达量与前向运动精子百分率(r=0.453,P<0.01)、总活力(r=0.476,P<0.01)、STR(r=0.270,P<0.01)、VCL(r=0.313,P<0.01)、VSL(r=0.349,P<0.01)、VAP(r=0.410,P<0.01)呈正相关。**结论** ROS 可降低精子活力、运动能力和存活率并上调精子 SOD2 和 PRDX6 表达;弱精症患者精子 SOD2 和 PRDX6 表达下调且其表达与精子运动能力正相关。

[**关键词**] 弱精症;精子运动能力;ROS;SOD2;PRDX6
[**中图法分类号**] R321.1; R345; R698.202 [**文献标志码**] A

Expression changes of superoxide dismutase 2 and peroxiredoxin 6 in asthenospermia and their correlation with sperm motility

YANG Zihan[1,2], HAO Xiaoling[1,2], WANG Hong[2], YE Liu[1], HUANG Run[1], MENG Jiangping[1] [1]Center for Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the damaging effects of reactive oxygen species (ROS) on spermatozoa, and investigate the expression changes of superoxide dismutase 2 (SOD2) and peroxiredoxin 6 (PRDX6) in spermatozoa of asthenospermia patients, so as to analyze their correlation with sperm motility.

[**通信作者**] 孟江萍,E-mail:mjlily2000@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Methods A total of 84 semen samples from asthenospermia patients [progressive motility (PR) <32%, PR + non-progressive (NP) <40%, sperm density ≥15×10^6/mL] and 55 normal semen samples (PR ≥32%, PR+NP≥40%, sperm density ≥15×10^6/mL) were collected in our center from January to November 2020. The normal semen parameters were detected using a computer-aided sperm analysis (CASA) system. After the samples were treated with different concentrations of H_2O_2, and the altered parameters were measured by CASA. The changes in sperm survival rate were determined by eosin staining, and the expression changes of SOD2 and PRDX6 were evaluated by Western blotting. Finally, RT-qPCR and Western blotting were adopted to compare the levels of SOD2 and PRDX6 in spermatozoa between the asthenospermia patients and normal controls, and the correlation of the levels with semen parameters were further analyzed. **Results** CASA results showed that sperm motility was significantly restrained after 0.10, 0.35 and 1.00 mmol/L H_2O_2 treatment; and the motility parameters like curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP) and mean angular displacement (MAD) were decreased in a dose-dependent manner with the increase of H_2O_2 concentration, while the amplitude of lateral head displacement (ALH), linearity (LIN), wobble (WOB) and straightness (STR) were reduced at concentrations of 0.10 and 0.35 mmol/L. Eosin staining indicated that the sperm survival rate was decreased after 0.35 and 1.00 mmol/L H_2O_2 treatment, and Western blotting showed the expression of SOD2 and PRDX6 in spermatozoa was up-regulated at a dose-dependent manner with the increase of H_2O_2 concentration. In addition, both the mRNA levels of SOD2 (0.297±0.038 *vs* 0.895±0.140, $P<0.01$) and PRDX6 (0.743±0.107 *vs* 1.416±0.163, $P<0.01$) in spermatozoa were significantly lower in the asthenospermia patients than the normal controls, and so were their protein levels (SOD: 20.689±0.147 *vs* 1.466±0.212, $P<0.01$; PRDX6: 0.726±0.084 *vs* 1.183±0.100, $P<0.01$). Moreover, the mRNA expression level of SOD2 was positively correlated with the sperm progressive motility ($r=0.267$, $P<0.01$) and total motility ($r=0.329$, $P<0.01$), and that of PRDX6 was positively with sperm progressive motility ($r=0.453$, $P<0.01$), total motility ($r=0.476$, $P<0.01$), STR ($r=0.270$, $P<0.01$), VCL ($r=0.313$, $P<0.01$), VSL ($r=0.349$, $P<0.01$) and VAP ($r=0.410$, $P<0.01$). **Conclusion** ROS reduces sperm motility and survival rate, and up-regulates the expression of SOD2 and PRDX6. The down-regulated levels of SOD2 and PRDX6 are positively correlated with sperm motility in asthenospermia patients.

[**Key words**] asthenospermia; sperm motility; reactive oxygen species; superoxide dismutase 2; peroxiredoxin

Corresponding author: MENG Jiangping, E-mail: mjlily2000@163.com

世界卫生组织(WHO)将弱精症定义为精液样本中前向运动精子百分率<32%的病症,研究发现弱精症是导致男性不育的重要因素之一。弱精症的病因复杂多样,但约有50%的弱精症患者没有明确病因[1]。因此,研究弱精症的发生机制以及寻找精子质量的预测指标有着重要的临床意义。活性氧(reactive oxygen species,ROS)是造成男性不育的重要因素,在男性生殖道中,ROS的过量产生会破坏精子及精浆的抗氧化系统,通过攻击富含不饱和脂肪酸的精子膜、破坏精子DNA单双链[2]、损伤线粒体及线粒体DNA[3]等途径对精子的结构和功能造成损伤,大量研究数据已证实弱精症患者精液的ROS水平显著高于正常[4],这提示我们ROS水平异常增高可能与弱精症的发生相关。作为超氧化物歧化酶家族的重要成员之一,SOD2主要位于线粒体中,表达于精子头部的顶体区域及颈部[5],能够清除超氧阴离子自由基[6],从而保护细胞免受ROS损伤。此外,PRDX6是一类非硒依赖性抗氧化蛋白家族成员,具有谷胱甘肽过氧化物酶和磷脂酶A2活性。PRDX6主要表达于精子头部的顶体后区域、赤道段和尾部[7],能够对抗过量ROS产生的氧化应激损伤,对精子起到保护作用[8]。FERNANDE等[9]阐明了PRDX6在人类精子发生氧化应激时对其活力和DNA的保护作用。虽然上述研究证实了SOD2和PRDX6可在精子中发挥重要的抗氧化作用,但仍然缺少临床数据对精子抗氧化蛋白SOD2和PRDX6与弱精症的关系进行阐明,弱精症患者精子中SOD2和PRDX6的表达量对精子运动能力的预测价值尚未被报道。

本研究采用外源性 H_2O_2 刺激正常精子后通过 CASA 检测精子活力和运动参数变化,伊红染色检测精子存活率变化,Western blot 检测精子 SOD2 和 PRDX6 表达变化,探讨 ROS 对精子运动能力的损伤作用及对 SOD2 和 PRDX6 表达的影响;RT-qPCR 和 Western blot 两种方法检测抗氧化蛋白 SOD2 和 PRDX6 在弱精症患者精子中的表达变化并分析其与精子运动能力的相关性,旨在探讨弱精症发生的分子机制,寻找精子运动能力的预测指标。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2020年1-11月于我中心进行精液常规检查的精液标本进行研究。正常组精液样本纳入标准:①连续3次精液常规检查 PR≥32%,PR+NP≥40%,精子密度≥15×10^6/mL;② 睾酮、雌二醇等性激素水平正常;③临床各项检查指标未见明显异常。正常组精液样本排除标准:①精液常规任一参数存在异常;②睾酮、雌二醇等性激素水平异常;③先天性生殖系统异常或后天性生殖系统损伤和疾病等。弱精症组精液样本纳入标准:①连续3次精液常规均提示 PR<32%,PR+NP<40%,精子密度≥15×10^6/mL;②睾酮、雌二醇等性激素水平正常;③泌尿生殖系统体格检查未见异常。弱精症组精液样本排除标准:①精液常规参数中除活力相关的任一参数存在异常;②睾酮、雌二醇等性激素水平异常;③先天性生殖系统异常或后天性生殖系统损伤和疾病等;④伴有遗传因素的弱精症。

检查前受试者均签署知情同意书,本研究通过重庆医科大学附属第一医院临床科研伦理委员会批准(2020-42)。共55例正常组精液标本、84例弱精症组精液标本纳入本项研究。

1.2 检测方法

1.2.1 标本采集和常规参数检测 本研究中接受精液检查者均禁欲3~7 d后,依据 WHO 第5版《人类精液检查与处理的实验室手册》使用手淫法取精后将精液收集于消毒的广口干燥无菌容器中,37 ℃温浴30 min,液化后混匀精液,通过计算机辅助的精液分析(CASA)检测精液常规参数及运动参数;剩余精液使用90%(下层)和45%(上层)percoll液以700×*g*密度梯度离心30 min去除白细胞和死精子后得到精子沉淀,吸取90% percoll液底部的精子沉淀于无菌试管中,将少量精子沉淀涂片后显微镜下观察多个视野未见白细胞为准;使用 PBS(pH=7.4)洗涤精子沉淀2次,每次600×*g*离心5 min;得到的精子沉淀分为两份置于两只1.5 mL离心管中,用于后续实验。精子存活率检测采用伊红染色法:滴加新鲜液化精液或含有不同浓度 H_2O_2 BWW 培养基处理后的重悬精子标本30 μL于洁净载玻片上,滴加伊红染色液1滴,混匀;加置盖玻片后立即于高倍镜(×400)下观察;镜下计数200个精子,计算未染色(活精子)精子占200个精子的百分率得到精子存活率。

1.2.2 精子 H_2O_2 处理 按照前述方法密度梯度离心处理正常精液标本。将同一精液样本由 percoll 液分离得到的精子沉淀均分为4~5等份;使用37 ℃预热的 PBS(pH=7.4)轻轻吹打洗涤精子沉淀2次,每次600×*g*离心5~8 min以去除 percoll 分离液;用配制好的含有不同浓度 H_2O_2 的 BWW 培养基重悬 PBS 洗涤后的精子沉淀,轻轻吹打混匀后加入12孔板内,置于37 ℃、5%CO_2 培养箱内孵育30 min;孵育结束后600×*g*离心10 min去除上清液,使用37 ℃预热的 PBS(pH=7.4)轻轻吹打洗涤精子沉淀2次,每次600×*g*离心5~8 min以去除含有 H_2O_2 的 BWW 培养基;向精子沉淀中加入适量37 ℃预热的 BWW 培养基重悬,取少量悬液通过 CASA 检测相关参数,其余部分用于精子蛋白提取。

1.2.3 精子总 RNA 提取 PBS 洗涤后的精子沉淀(精子总数>20×10^6)中加入1 mL TRIzol,严格按照试剂说明书提取精子细胞总 RNA 后溶解于 DEPC 水中,储存于-80 ℃以备使用。

1.2.4 精子总蛋白质提取 PBS 液洗涤后的精子沉淀(精子总数>20×10^6)中加入50~100 μL含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液(RIPA∶PMSF=100∶1),冰上震荡裂解30 min(5 min 1次)后继续于冰上使用超声裂解(30%强度5次,每次3 s,避免产热导致蛋白降解),13 000 r/min离心30 min,得到的上清液即为精子总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后加入1/4上清液体积的 Loading Buffer 煮沸6~8 min,储存于-80 ℃以备使用。

1.2.5 RT-qPCR 检测 以1 μg RNA 为模板,20 μL体系进行逆转录反应,再进行 PCR 扩增。每个检测样本设置3个复孔,得到的 Ct 值(3个复孔均值)采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行计算和统计学分析。SOD2 上游引物:5′-GTGGAGAACCCAAAGGGGAGTT-3′,SOD2 下游引物:5′-GTGGAATAAGGCCTGTTGTTCCTT-3′;PRDX6 上游引物:5′-GCATCCGTTTCCACGACT-3′,PRDX6 下游引物:5′-TGCACACTGGGGTAAAGTCC-3′;GAPDH 上游引物:5′-GAAGGGCTCATGACCACAGT-3′,GAPDH 下游引物:5′-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3′。

1.2.6 Western blot 实验 蛋白上样量为20 μg;两步法电泳;Step1:U=90 V,I=100 mA,电泳30 min;Step2:U=120 V,I=100 mA,电泳90 min;湿转法转膜

约 1 h;转膜结束后将 PVDF 膜置于 5%脱脂牛奶中室温封闭 2 h;TBST 洗涤 2 次后加一抗,4 ℃孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后加二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次后显影液覆盖 PVDF 膜显影,结果使用 Image Lab 进行蛋白条带定量分析。

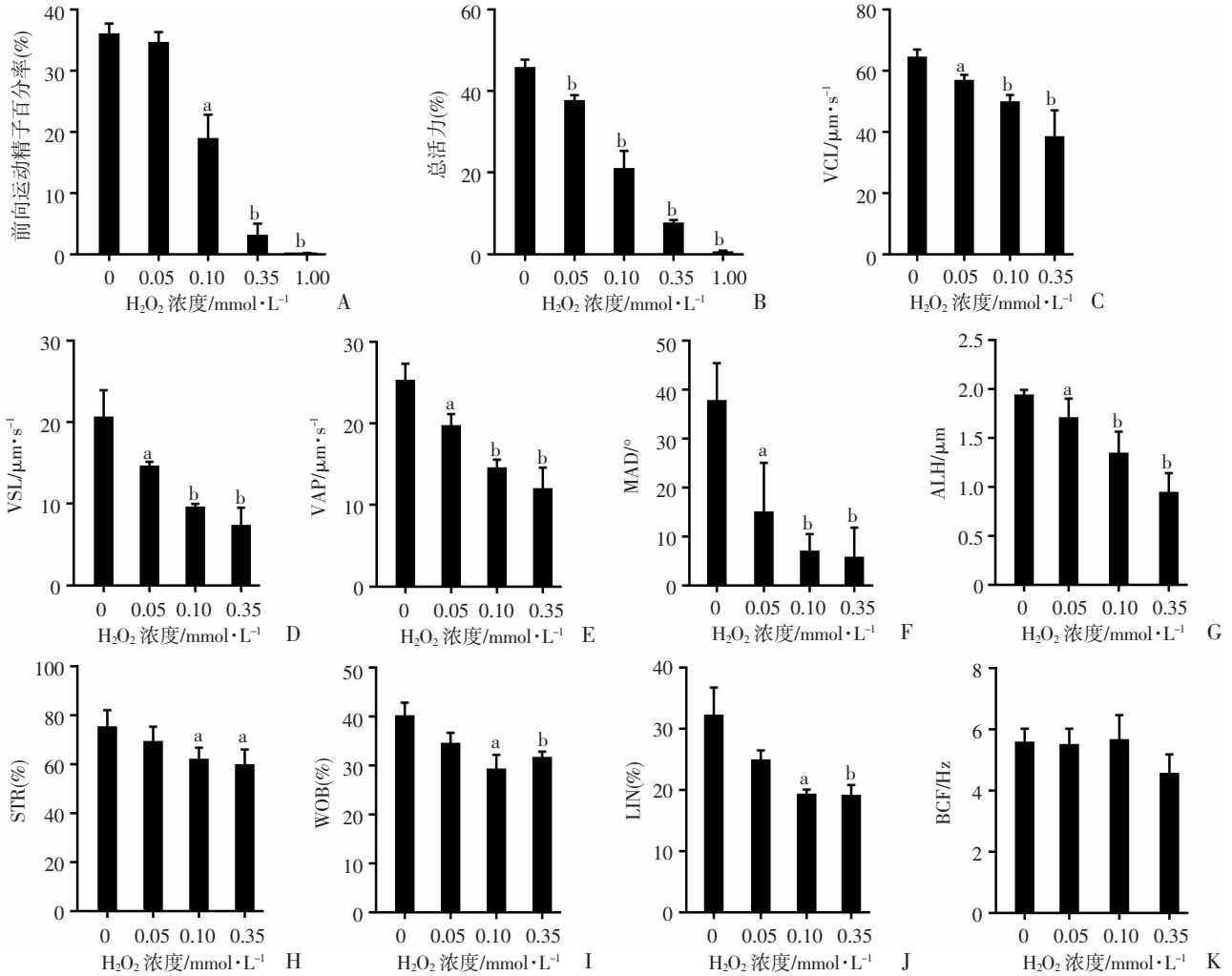
1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 6.0 和 SPSS 25.0 软件进行统计学分析和作图,进行正态性检验后符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,通过 Student's t 检验分析组间差异,不符合正态分布的以中位数(P_{25},P_{75})表示,采用 Mann-Whitney U 检验分析组间差异。使用 Spearman 秩相关进行相关性分析。

2 结果

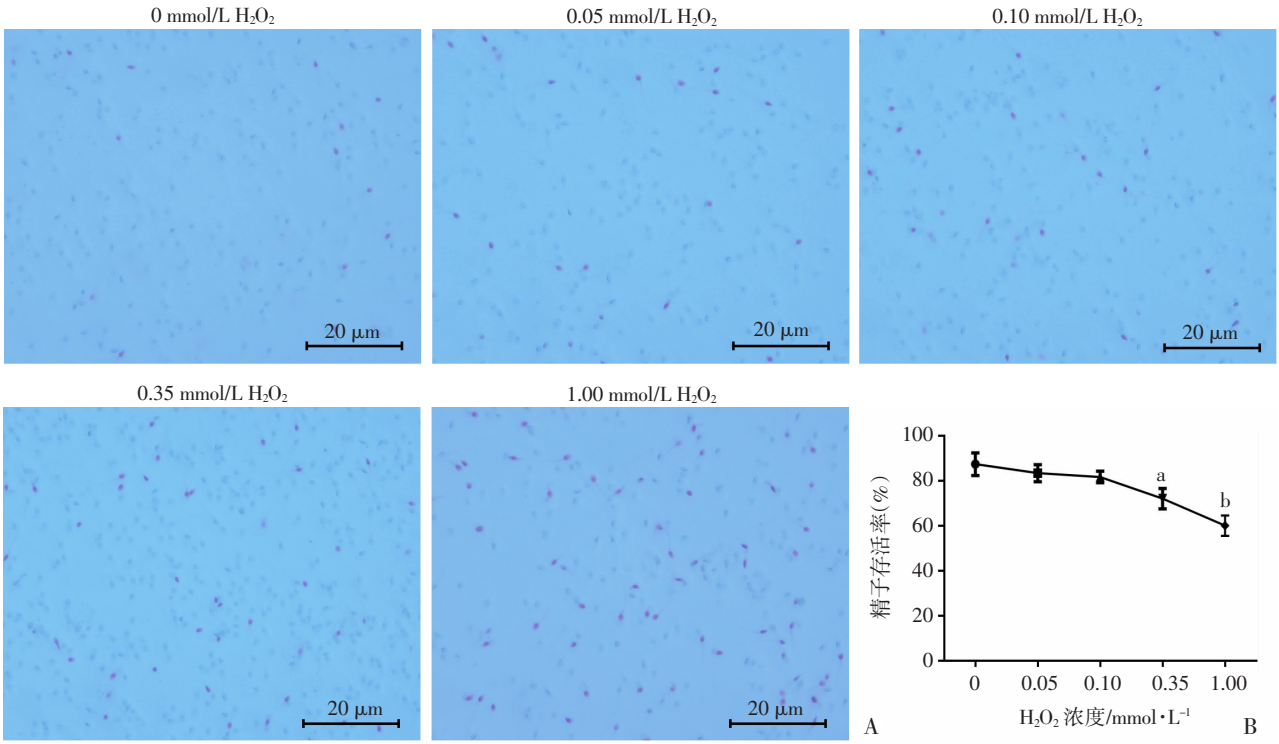
2.1 ROS 损伤正常精子的运动能力

为了证实 ROS 对精子运动能力的影响,我们使用不同浓度 H_2O_2(0.05、0.10、0.35、1.00 mmol/L)处理正常精子细胞,在 37 ℃孵育 30 min 后,CASA 检测结果显示精子的前向运动百分率和总活力在浓度大于 0.10 mmol/L 的处理组中显著降低($P<0.05$),在 1.00 mmol/L H_2O_2 处理组中几乎降低为 0($P<0.01$,图 1A、B)。由于 1.00 mmol/L H_2O_2 处理正常精子后精子几乎丧失了活力,所以我们后续使用 0.05、0.10、0.35 mmol/L H_2O_2 处理正常精子细胞 30 min 后 CASA 检测精子运动参数,结果显示曲线速率(VCL)、直线速率(VSL)、平均路径速率(VAP)和平均角位移(MAD)呈 H_2O_2 剂量依赖式降低($P<0.05$, 图 1C~F),侧摆幅度(ALH)、前向性(STR)、摆动性(WOB)和有线性(LIN)在较高浓度(0.10、0.35 mmol/L)的 H_2O_2 处理后显著降低($P<0.05$, 图 1G~J),但反叉频率(BCF)无显著变化(图 1K)。此外,精子的存活率在 0.35 mmol/L 和 1.00 mmol/L H_2O_2 处理组中显著降低($P<0.05$, 图 2)。



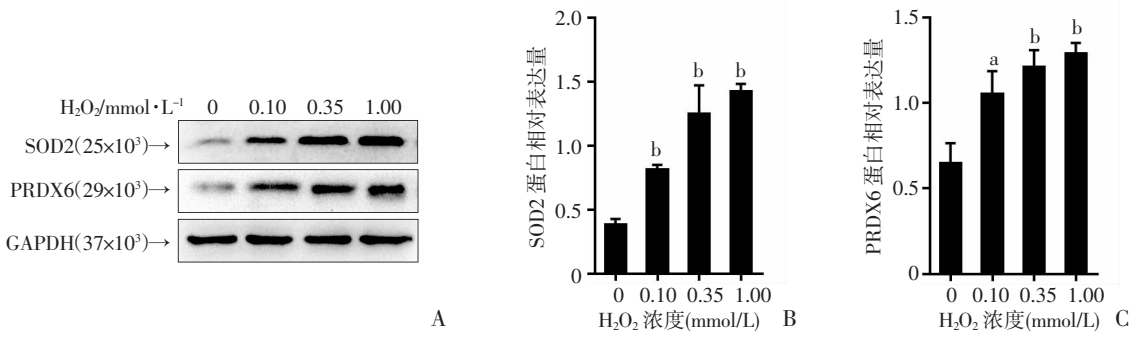
A~K:CASA 检测 H_2O_2 处理后正常精子前向运动精子百分率、总活力、VCL、VSL、VAP、MAD、ALH、STR、WOB、LIN、BCF 的变化
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 mmol/L 比较

图 1 H_2O_2 处理正常精子后精子活力和运动参数变化 ($n=3$)



A:0.05~1.00 mmol/L H_2O_2 处理正常精子后 HE 染色观察精子存活率变化;B:精子存活率定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 mmol/L 比较

图 2 H_2O_2 处理正常精子后精子存活率变化形态学观察及定量分析 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测 H_2O_2 处理后正常精子中 SOD2 和 PRDX6 的表达;B、C:蛋白表达半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 mmol/L 比较

图 3 H_2O_2 处理上调正常精子 SOD2 和 PRDX6 的表达 ($n=3$)

2.2 ROS 可上调正常精子 SOD2 和 PRDX6 的表达

Western blot 检测结果显示 H_2O_2 处理正常精子后,精子抗氧化蛋白 SOD2 和 PRDX6 的表达以剂量依赖性方式显著增加($P<0.05$,$P<0.01$,图 3)。

2.3 正常组与弱精症组一般资料比较

两组被试前向运动百分率、总活力、STR、VCL、VSL、VAP 显著低于正常组($P<0.05$),患者年龄、精液体积、pH 值、浓度、LIN、WOB、ALH、BCF 和 MAD 等指标数据见表 1。

2.4 正常组与弱精症组精子 SOD2、PRDX6 mRNA 表达水平比较

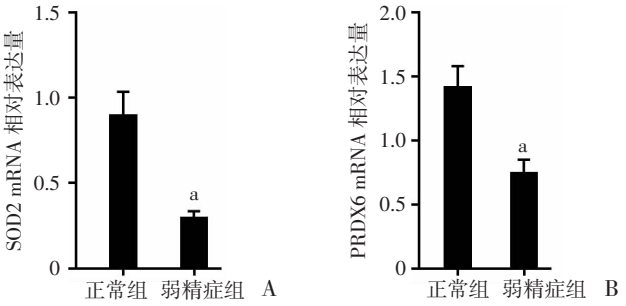
RT-qPCR 检测结果显示弱精症组精子 SOD2 与 PRDX6 相对表达量显著低于正常组($P<0.01$, 图 4)。

2.5 正常组与弱精症组精子 SOD2、PRDX6 蛋白表达水平比较

Western blot 检测结果显示弱精症组精子 SOD2 和 PRDX6 蛋白相对表达量均低于正常组($P<0.01$, 图 5)。

表 1 正常组与弱精症组一般资料比较（$\bar{x}\pm s$）

项目	正常组（n=55）	弱精症组（n=84）	P
年龄/岁	30.89±4.30	31.63±4.87	0.361
精液体积/mL	3.39±1.58	3.26 ± 1.52	0.641
精液 pH 值	7.47±0.10	7.45±0.14	0.272
精液密度/10^6 · mL^{-1}	127.60±93.68	102.40 ±74.58	0.081
前向运动精子百分率(%)	45.70±10.26	17.38±7.72	<0.001
总活力(%)	53.70±10.67	23.23±8.80	<0.001
STR(%)	87.23±3.72	84.25±8.32	0.014
LIN(%)	59.48±9.31	57.57±9.78	0.253
WOB(%)	65.79±8.86	64.87±10.16	0.584
VCL/μm · s^{-1}	67.73±24.02	49.22±17.79	<0.001
VSL/μm · s^{-1}	41.27±13.15	28.82±8.22	<0.001
VAP/μm · s^{-1}	44.82±13.28	31.65±8.56	<0.001
ALH/μm	2.84±0.66	2.78±0.89	0.667
BCF/t · s^{-1}	5.74±0.69	5.58±1.02	0.293
MAD/°	52.24±17.36	48.17±17.44	0.180

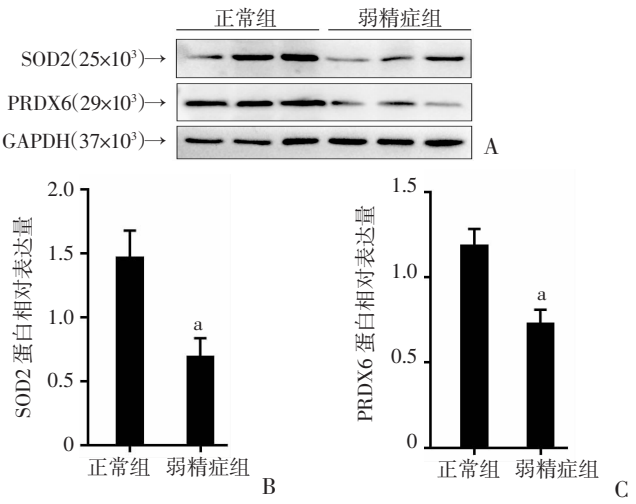


A:SOD2 mRNA 表达; B:PRDX6 mRNA 表达 a:P<0.01,与正常组比较

图 4 RT-qPCR 检测正常组与弱精症组精子 SOD2、PRDX6 mRNA 表达

2.6 SOD2、PRDX6 mRNA 相对表达量与精液常规参数及精子运动参数的相关性分析

相关分析结果显示 SOD2 mRNA 相对表达量与前向运动精子百分率(r=0.267,P<0.01)和总活力(r=0.329, P<0.01)呈正相关,与其余精液常规参数及精子运动参数无相关性;PRDX6 mRNA 相对表达量与前向运动精子百分率(r=0.453,P<0.01)、总活力(r=0.476,P<0.01)、STR(r=0.270,P<0.01)、VCL(r=0.313, P<0.01)、VSL(r=0.349,P<0.01)、VAP(r=0.410,P<0.01)呈正相关,与其余精液常规参数及精子运动参数无相关性(表 2)。



A:Western blot 检测正常组与弱精症组精子 SOD2 和 PRDX6 表达;B、C:蛋白表达半定量分析 a:P<0.01,与正常组比较

图 5 正常组与弱精症组精子 SOD2、PRDX6 蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

表 2 PRDX6、SOD2 mRNA 表达量与精液及精子运动参数的相关性分析

变量	PRDX6 mRNA 表达		SOD2 mRNA 表达	
	r	P	r	P
年龄/岁	−0.045	0.644	−0.123	0.201
精液体积/mL	−0.087	0.366	−0.006	0.953
精液 pH 值	−0.095	0.326	0.057	0.557
精液密度/10^6 · mL^{-1}	0.003	0.976	0.145	0.130
前向运动精子百分率(%)	0.453	<0.001	0.267	0.005
总活力(%)	0.476	<0.001	0.329	<0.001
STR(%)	0.270	0.004	0.173	0.071
LIN(%)	0.151	0.116	0.114	0.236
WOB(%)	0.023	0.814	0.166	0.084
VCL/μm · s^{-1}	0.313	<0.001	−0.050	0.605
VSL/μm · s^{-1}	0.349	<0.001	0.052	0.586
VAP/μm · s^{-1}	0.410	<0.001	0.051	0.594
ALH/μm	0.046	0.636	0.096	0.317
BCF/t · s^{-1}	−0.052	0.589	−0.096	0.317
MAD/°	0.006	0.953	−0.002	0.985

3 讨论

3.1 ROS 与精子运动能力

ROS 是导致男性不育的重要因素之一,研究发现弱精症患者精液的 ROS 水平异常增高[4],而总抗氧化能力(T-AOC)显著低于正常[10],这表明 ROS 水平增

高可能与精子活力降低有关。H_2O_2 是一种可转变成如氧自由基和羟基自由基等其他类型 ROS 的非自由基 ROS[6],这些类型的 ROS 与体内环境中精子细胞产生的 ROS 类型是相同的,且具备破坏蛋白质、脂质和核酸[11]的能力。目前 H_2O_2 处理是体外条件诱导细胞发生氧化应激最有效且最常见的方法,研究表明 H_2O_2 处理可引起精子细胞内源性 ROS 异常累积,从而导致线粒体膜电位下降和 DNA 断裂等一系列损伤,而这些变化与体内氧化应激发生时精子细胞的变化是一致的[12-13],且目前国内外研究没有明确指出 H_2O_2 体外模拟 ROS 环境和构建氧化应激模型的明显弊端,故本研究使用不同浓度的 H_2O_2 处理后检测 ROS 对精子运动能力和存活率的影响。研究表明 0.1 mmol/L 的 H_2O_2 刺激精子 0.5 h 后可以显著降低精子的活力和存活率[14-15],也有研究发现 0.3 mmol/L 的 H_2O_2 能够在 0.5 h 的孵育后将精子的活力降低至约 5%,而 0.6 mmol/L H_2O_2 在 0.5 h 的孵育后可将精子的存活率降低约 50%[16]。在本研究中,我们发现 0.10 mmol/L H_2O_2 处理精子 0.5 h 后,精子活力和前向运动百分率均显著降低,0.35 mmol/L 处理组精子活力和前向运动百分率降低至 10% 以下,精子存活率也显著降低,而 1 mmol/L H_2O_2 处理 0.5 h 后精子活力几乎完全丧失,这与上述研究的结果基本一致。也有研究认为 0.5 mmol/L H_2O_2 处理 0.5 h 对精子存活率没有显著影响,当 H_2O_2 处理浓度增加至 3 mmol/L 时才能降低精子存活率[17]。我们认为这可能是精子优选过程中使用的方法不同导致的,使用上游法优选精子时得到的精子活力更好,运动能力更强,这样高质量的精子可能对 H_2O_2 损伤的抵抗作用更强,而本研究使用密度梯度离心法优选精子,精子回收率更高但精子回收质量不及上游法。目前尚未有研究对 H_2O_2 处理后精子运动参数的变化进行报道,本研究发现 0.05 mmol/L H_2O_2 处理即可显著降低精子的 VCL、VSL、VAP 和 MAD,H_2O_2 浓度增加至 0.35 mmol/L 和 1 mmol/L 时,ALH、STR、WOB 和 LIN 显著下降,而 BCF 没有显著变化,我们推测较低浓度的 H_2O_2 对精子运动能力造成的影响主要是通过损伤精子膜导致的,ROS 可使精子膜发生脂质过氧化,导致其产生具有高细胞毒性的亲电子脂质醛,增加电子在电子传输链中的流动[18],改变膜的流动性、渗透性和功能,最终导致精子运动能力的丧失[14]。而当 H_2O_2 浓度达到 3 mmol/L 时,精子的线粒体膜电位降低更为显著[17],在这种情况下线粒体功能受损明显,精子的 BCF 才会产生显著的变化。

3.2 精子抗氧化蛋白 SOD2 和 PRDX6 与弱精症

SOD2 是超氧化物歧化酶家族在精子中表达最多的同工酶,研究证实白藜芦醇可通过激活 Nrf2 促进 SOD2 的表达降低 H_2O_2 刺激,从而引起的大鼠肝原代细胞的氧化应激损伤[19]。PRDX6 是过氧化物酶家族的重要成员之一,研究表明 PRDX6 是精子最为重要的抗氧化酶之一,发生氧化应激时,PRDX6 能够起到保持精子活力和维持精子 DNA 完整性的作用[9]。O'FLAHERTY 等[20]研究发现精子 PRDX6 在 0.05~5 mmol/L H_2O_2 处理后剂量依赖式上调。在本研究中,我们发现在 0.05~1.00 mmol/L H_2O_2 处理后精子 PRDX6 剂量依赖式上调,与上述研究结果相符。目前尚未有研究报道精子 SOD2 在 H_2O_2 处理后的表达变化,本研究结果证实了精子 SOD2 在 0.05~1.00 mmol/L H_2O_2 处理后呈现与 PRDX6 相同的剂量依赖式上调,这提示正常精子中 SOD2 和 PRDX6 可被高水平的 ROS 上调而发挥抗氧化效应。基于 ROS 对精子运动能力和活力的损伤作用以及 SOD2 和 PRDX6 重要的抗氧化作用,我们提出假设:弱精症患者精子 SOD2 和 PRDX6 的表达是否相较正常存在改变,使精子抵抗 ROS 损伤的能力减弱,从而对精子的运动能力和活力造成影响,引发弱精症?

人的精子中含有大量的 RNA,这些 RNA 来源于睾丸,是精子发生、发育过程中的残留物,其在精子的运动、获能、受精和胚胎发育的过程中发挥重要作用[21]。OSTERMEIER 等[22]发现在睾丸和附睾中检测到的 mRNA 与在精子细胞中检测到的 mRNA 是一致的,可见精子 mRNA 对推测精子发生和阐释精子功能的重要作用。本研究同时检测了精子中抗氧化蛋白 SOD2、PRDX6 mRNA 和蛋白的表达水平,探究 SOD2 和 PRDX6 在弱精症患者精子中的表达变化及其与精子运动能力的相关性。

研究表明弱精症患者精液 ROS 水平更高[4],基于本研究结果提示,精子 SOD2 和 PRDX6 在高水平 ROS 环境下应该较正常表达更高以对抗 ROS 造成的损伤,而本研究 RT-qPCR 和 Western blot 检测结果却显示弱精症组精子 SOD2 和 PRDX6 mRNA 与蛋白相对表达量较正常组均降低。研究发现 SOD2 和 PRDX6 共同的上游调控分子 Nrf2 在弱精症患者精子中表达下调[23],这可能是 SOD2 和 PRDX6 表达降低的原因,而 CHEN 等[23]的研究发现 SOD2 mRNA 相对表达量在弱精症患者精子中表达虽然有下降趋势,但与正常没有显著差异,这可能与样本数差异和地域差异有关。目

前尚未有临床研究对弱精症患者精子SOD2与PRDX6的蛋白表达变化和PRDX6 mRNA表达变化进行报道。我们推测正是这两者内源性的表达降低使精子在处于高水平的ROS环境时更容易发生氧化应激,ROS更容易使精子膜中的脂质过氧化,改变膜的完整性和蛋白质组成来破坏精子的运动能力,导致精子活力和运动参数的下降,成为弱精症发生的潜在分子机制。

相关性分析的结果也佐证了我们的推测。结果显示SOD2 mRNA相对表达量与前向运动精子百分率和总活力呈正相关;PRDX6 mRNA相对表达量与前向运动精子百分率、总活力、VCL、VSL、VAP呈正相关。这表明当SOD2和PRDX6表达量较高时,精子的抗氧化能力更强,更能有效抵抗ROS对精子运动能力造成的损伤,所以精子的活力和运动参数都位于正常水平;而当SOD2和PRDX6表达量较低时,精子的抗氧化能力较弱,精子更容易受到ROS对运动能力造成的损伤,使精子活力和运动参数明显下降,导致弱精症的发生。并且我们发现PRDX6 mRNA相对表达量与精子活力和运动参数相关性较高,这提示PRDX6具有预测精子运动能力的潜能。

本研究局限在于完成蛋白水平验证的标本量较少,仍需要进一步扩大标本量;另一方面对弱精症患者精子SOD2、PRDX6 mRNA和蛋白水平下调的机制未进行实验探讨。

综上,本研究验证了ROS对精子运动能力的损伤作用和对精子抗氧化蛋白SOD2及PRDX6的上调作用。同时发现弱精症患者精子SOD2和PRDX6 mRNA和蛋白表达水平显著降低,且PRDX6 mRNA与精子活力和运动速率有较好相关性,提示PRDX6具有预测精子运动能力的潜能。本研究基于精子SOD2和PRDX6的mRNA和蛋白水平检测,对寻找精子运动能力的预测分子及阐释弱精症发生的分子机制提供了新的实验数据和理论依据。

参考文献:

[1] GILANY K, MOAZENI-POURASIL R S, JAFARZADEH N, *et al*. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients[J]. Mol Reprod Dev, 2014, 81(1): 84-86. DOI: 10.1002/mrd.22284.

[2] HAMILTON T R D S, ASSUMPÇÃO M E O D. Sperm DNA fragmentation: causes and identification[J]. Zygote, 2020, 28(1): 1-8. DOI: 10.1017/s0967199419000595.

[3] DURAIRAJANAYAGAM D, SINGH D, AGARWAL A, *et al*. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction[J]. Andrologia, 2021, 53(1): e13666. DOI: 10.1111/and.13666.

[4] VATANNEJAD A, TAVILANI H, SADEGHI M R, *et al*. Evaluation of ROS-TAC score and DNA damage in fertile normozoospermic and infertile asthenozoospermic males[J]. Urol J, 2017, 14(1): 2973-2978.

[5] MALIVINDI R, RAGO V, DE ROSE D, *et al*. Influence of all-trans retinoic acid on sperm metabolism and oxidative stress: Its involvement in the physiopathology of varicocele-associated male infertility[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(12): 9526-9537. DOI: 10.1002/jcp.26872.

[6] VILLAVERDE A I S B, NETHERTON J, BAKER M A. From past to present: the link between reactive oxygen species in sperm and male infertility[J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(12): E616. DOI: 10.3390/antiox8120616.

[7] SHI H, LIU J, ZHU P, *et al*. Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H_2O_2-induced damage to spermatozoa[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2018, 56(3): 141-150. DOI: 10.5603/fhc.a2018.0019.

[8] O'FLAHERTY C. Peroxiredoxin 6: the protector of male fertility[J]. Antioxidants (Basel), 2018, 7(12): E173. DOI: 10.3390/antiox7120173.

[9] FERNANDEZ M C, O'FLAHERTY C. Peroxiredoxin 6 is the primary antioxidant enzyme for the maintenance of viability and DNA integrity in human spermatozoa[J]. Hum Reprod, 2018, 33(8): 1394-1407. DOI: 10.1093/humrep/dey221.

[10] MORADI M N, KARIMI J, KHODADADI I, *et al*. Evaluation of the p53 and Thioredoxin reductase in sperm from asthenozoospermic males in comparison to normozoospermic males[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 116: 123-128. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.038.

[11] LI R, JIA Z Q, TRUSH M A. Defining ROS in biology and medicine[J]. React Oxyg Species (Apex), 2016, 1(1): 9-21. DOI: 10.20455/ros.2016.803.

[12] BADER R, IBRAHIM J N, MOUSSA M, *et al*. *In vitro* effect of autologous platelet-rich plasma on H_2O_2-induced oxidative stress in human spermatozoa[J]. Andrology, 2020, 8(1): 191-200. DOI: 10.1111/andr.12648.

[13] DU PLESSIS S S, MCALLISTER D A, LUU A, *et al*. Effects of H(2)O(2) exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels[J]. Andrologia, 2010, 42(3): 206-210. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2009.00980.x.

[14] MAHFOUZ R Z, DU PLESSIS S S, AZIZ N, *et al*. Sperm

viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress[J]. Fertil Steril, 2010, 93(3): 814-821. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.10.068.

[15] FATMA B A, NOZHA C F, INES D, *et al*. Sperm quality improvement after date seed oil *in vitro* supplementation in spontaneous and induced oxidative stress[J]. Asian J Androl, 2009, 11(3): 393-398. DOI: 10.1038/aja.2008.6.

[16] CHAKI S P, MISRO M M. Assessment of human sperm function after hydrogen peroxide exposure. development of a vaginal contraceptive[J]. Contraception, 2002, 66(3): 187-192. DOI: 10.1016/s0010-7824(02)00349-9.

[17] BRAVO A, QUILAQUEO N, JOFRÉ I, *et al*. Overtime expression of plasma membrane and mitochondrial function markers associated with cell death in human spermatozoa exposed to nonphysiological levels of reactive oxygen species[J]. Andrologia, 2021, 53(2): e13907. DOI: 10.1111/and.13907.

[18] AITKEN R J, GIBB Z, MITCHELL L A, *et al*. Sperm motility is lost *in vitro* as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols[J]. Biol Reprod, 2012, 87(5): 110. DOI: 10.1095/biolreprod.112.102020.

[19] RUBIOLO J A, MITHIEUX G, VEGA F V. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 591(1/2/3): 66-72. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.06.067.

[20] O'FLAHERTY C, DE SOUZA A R. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner[J]. Biol Reprod, 2011, 84(2): 238-247. DOI: 10.1095/biolreprod.110.085712.

[21] ZHANG Y F, SHI J C, RASSOULZADEGAN M, *et al*. Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(8): 489-498. DOI: 10.1038/s41574-019-0226-2.

[22] OSTERMEIER G C, DIX D J, MILLER D, *et al*. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men[J]. Lancet, 2002, 360(9335): 772-777. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)09899-9.

[23] CHEN K, MAI Z X, ZHOU Y L, *et al*. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility[J]. Tohoku J Exp Med, 2012, 228(3): 259-266. DOI: 10.1620/tjem.228.259.

(收稿:2021-04-20;修回:2021-05-22)

(编辑 栾 嘉)