

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.05.005

弱精子症精子中 miRNAs 特异表达及潜在致病靶点的分析 *

汤 莹[#] 唐敏英[#] 张湧波 郑美玉 林炎鸿 吴丹红 路 君[△]

(联勤保障部队第九〇〇医院基础医学实验室 福建省移植生物学重点实验室 福建 福州 350025)

摘要 目的:弱精子症可见于 40% 的不育男性,其特征是精子活力低下。微小 RNA(MicroRNAs, miRNAs)在精子发生中发挥重要作用,但关于精子中 miRNAs 在弱精子症中的作用知之甚少。本研究试图初探 miRNAs 在弱精子症的分子机制。**方法:**收集了重度弱精子症患者和健康男性的精子样本,采用高通量序列技术来识别差异表达的 miRNAs,并对差异显著的 miRNAs 进行生物信息学分析。通过 qRT-PCR 证实了 2 个特异性改变的 miRNA 及其靶基因表达情况。**结果:**重度弱精子症患者与正常男性相比,共有 146 个 miRNAs ($P < 0.05$; $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$) 发生改变,其中表达上调的 52 个,下调的 94 个;预测上下调幅度最显著的前 10 个 miRNAs 的靶基因,同时在 miRDB 和 TargetScan 数据库存在的靶基因共有 1407 个。富集分析结果显示,miRNAs 的靶基因富集于精子细胞的生物过程,还参与精子细胞的氧化代谢、刺激反应、增殖和分化以及凋亡等生物过程。通路分析显示,靶基因可能参与细胞自噬、细胞衰老、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、mTOR 信号通路等。其中,在弱精子症精子中特异性上调的 hsa-miR-371a-5p 和 hsa-miR-2355-5p, 预测靶基因分别为自噬效应蛋白 *Beclin1* 和线粒体内膜蛋白抑素 2 (prohibitin2, *PHB2*), 二者直接参与线粒体自噬过程。qRT-PCR 结果显示随着精子活力的降低,精子中 hsa-miR-371a-5p 和 hsa-miR-2355-5p 的表达量升高。**结论:**本研究发现弱精子症患者精子中特异性失调的 miRNAs 及其靶基因,为后续深入研究低活力精子中 miRNAs 参与调控线粒体自噬功能的机制提供新思路 and 理论依据。

关键词:弱精子症;高通量测序;miRNA;生物信息学分析;线粒体自噬

中图分类号:R697;R394.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)05-828-08

Differentially Expressed Key miRNAs and Potential Targets Analysis in Asthenozoospermia*

TANG Ying[#], TANG Min-Ying[#], ZHANG Yong-bo, ZHENG Mei-yu, LIN Yan-hong, WU Dan-hong, LU Jun[△]

(Laboratory of Basic Medicine, Fujian Provincial Key Laboratory of Transplant Biology, 900th Hospital of Joint Logistics Support Force, Fuzhou, Fujian, 350025, China)

ABSTRACT Objective: Asthenozoospermia, a condition observed in 40% of infertile males, is characterized by reduced sperm motility. MicroRNAs (miRNAs) play a pivotal role in spermatogenesis, yet their involvement in asthenozoospermia remains poorly understood. This study aims to elucidate the molecular mechanisms of miRNAs in asthenozoospermia. **Method (s):** Sperm samples were collected from individuals with severe asthenozoospermia and healthy males. High-throughput sequencing was employed to identify differentially expressed miRNAs, followed by bioinformatics analysis of these significant miRNAs. The altered expression of two specific miRNAs and their target genes was confirmed using qRT-PCR. **Result(s):** When comparing severe asthenozoospermia patients to healthy males, 146 miRNAs exhibited significant alterations ($P < 0.05$; $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$), with 52 upregulated and 94 downregulated miRNAs. The ten most significantly upregulated and downregulated miRNAs were subjected to target gene prediction through the miRDB and TargetScan databases, a total of 1407 target genes were found to be supported by both databases. Enrichment analysis revealed that miRNA target genes were enriched in sperm cell processes, and they were involved in oxidative metabolism, stimulus response, proliferation, differentiation, and apoptosis in sperm cells. Pathway analysis indicated that target genes might participate in processes such as autophagy, cellular senescence, the PI3K-Akt signaling pathway, the MAPK signaling pathway, the HIF-1 signaling pathway, and the mTOR signaling pathway. Notably, among the specifically upregulated miRNAs in asthenozoospermia, hsa-miR-371a-5p and hsa-miR-2355-5p were identified, with their respective target genes being the autophagy effector protein *Beclin1* and mitochondrial inner membrane protein prohibitin2 (*PHB2*), both directly involved in mitochondrial autophagy. qRT-PCR results demonstrated an increased expression of hsa-miR-371a-5p and hsa-miR-2355-5p in sperm as motility declined. **Conclusion(s):** This study identified miRNAs with specific dysregulation in the sperm of asthenozoospermia patients and their target genes, offering new insights

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2023J011351);第九〇〇医院院立课题项目(2021MS03)

[#] 为共同第一作者

作者简介:汤莹(1986-),女,硕士研究生,主管药师,主要研究方向:男科遗传学与男科不育,E-mail: katyking@126.com;

唐敏英(1982-),女,主管技师,主要研究方向:移植免疫,E-mail: tminying@163.com

[△] 通讯作者:路君(1964-),女,硕士生导师,教授,主要研究方向:移植免疫和肿瘤免疫,E-mail: junlu.heather@xmu.edu.cn

(收稿日期:2023-09-23 接受日期:2023-10-18)

and a theoretical basis for further investigation into the mechanisms by which miRNAs regulate mitochondrial autophagic functions in low motility sperm.

Key words: Asthenozoospermia; High-throughput Sequencing; miRNAs; Bioinformatics analysis; Mitophagy

Chinese Library Classification(CLC): R697; R394.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)05-828-08

前言

不孕不育已成为全球生殖健康的重要问题。全球约有 10%~15%的育龄夫妇患有不孕症,其中男性占 50%^[1]。在 40%的不育男性中发现弱精子症,其主要特征是精子活力低下^[2]。弱精子症(Asthenozoospermia, AZS)是指禁欲 2~7 d 后取精,前向运动精子百分率<32%或前向运动+非前向运动精子百分率<40%^[3]。精子活力低下是弱精子症的主要特征,与精子活力器官异常、精子能量代谢受损和细胞信号传导受阻有关^[4]。然而,弱精子症病因较为复杂,早期的研究结果认为其包括微生物感染、精液凝固及液化异常、免疫性不育、内分泌紊乱、精子本身结构异常、染色体异常及精索静脉曲张等原因^[5-6]。明确 AZS 的发病机制是有效恢复精子活力的关键。

基础研究资料提示,不同信号通路的多个基因表达异常可能与弱精子症的发生有关。虽然精子是高度分化的细胞,但它们含有一定量的 RNA,主要是 mRNA 和 miRNA^[7]。精子 RNA 在精子运动、获能、受精和胚胎发育中发挥着非常重要的作用^[8-10]。越来越多的证据表明,非编码小 RNA,特别是 miRNAs 和 piRNAs,可能显著调控生殖细胞的发育和精子发生^[11]。研究表明,miR-525-3p 表达降低可调控 SEMG1 表达增加,与弱精子症和男性不育相关^[12];hsa-miR-206 靶向的 mRNA 可能在精子运动中发挥重要作用^[13];miR-27a 的高表达介导 CRISP2 蛋白的低表达与精子形态异常、精子活力低下和不育有关^[12],这些研究结果表明,miRNAs 参与了精子发生中的基因表达调控。

本研究应用下一代测序技术比较了重度弱精子症和健康男性精子之间的 miRNAs 表达谱。基于生物信息学分析结果,我们选择了一些 miRNAs 作为弱精子症的候选分子靶点,对差异表达的 miRNA 及其预测的靶基因进行筛选和验证,试图初探在弱精子症中 miRNAs 的分子角色,为弱精子症的靶向治疗、临床诊断和分子分型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究经联勤保障部队第九〇〇医院医学伦理委员会批准(SC-2018-024, 2021-020),所有参与对象均签署了知情同意书。样本于 2020 年 1 月至 2022 年 1 月在联勤保障部队第九〇〇医院采集。精液分析按照世界卫生组织第 6 版标准执行^[14]。精子活力正常对照组(精子浓度 $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$,前向运动精子百分率 $\text{PR} \geq 32\%$,精子形态正常 $\geq 4\%$),弱精子症组仅以 $\text{PR} < 32\%$ 为特征。根据上述标准选取 30 例弱精子症样本和 30 例对照样本(表 1),弱精子症组分为轻中度弱精子症组($10\% \leq \text{PR} < 40\%$)和重度弱精子症组($0 < \text{PR} < 10\%$),正常对照组分高活力组($\text{PR} \geq 60\%$)和中等活力组($40\% \leq \text{PR} < 60\%$),精液其它各项参数检查均正常。选取 5 例重度弱精子症男性(ZR001-005)和 3 例健康男性(ZC001-003)的精液样本,采用高通量测序技术。弱精子症样本和正常对照样本每组选取 3 份精液样本进行验证。

表 1 弱精子症患者和正常生育男性精子样本的临床资料

Table 1 Clinical features of the asthenospermia patients and healthy people with different vitality

Variables	Normal(High motility)	Normal(Moderate motility)	Asthenospermia(Mild to moderate)	Asthenospermia (Severe)	P-value
Number	15	15	15	15	ns
Average age, years	31 $\pm$ 3.35	31 $\pm$ 4.58	33 $\pm$ 2.37	32 $\pm$ 8.98	ns
Sexual abstinence time, days	4	4	4	4	ns
Sperm concentration 10 ⁶ /mL	110.83 $\pm$ 22.01	108.90 $\pm$ 9.27	115 $\pm$ 8.45	103 $\pm$ 19.23	ns
Total volume, mL	4.54 $\pm$ 8.52	4.27 $\pm$ 4.16	4.15 $\pm$ 7.58	4.12 $\pm$ 3.38	ns
Progressive motility	78.46 $\pm$ 11.88	57.78 $\pm$ 9.56*	23.28 $\pm$ 7.84*	3.76 $\pm$ 9.35*	P<0.05

Note: ns, No significant difference. *P<0.05, the control group was the high motility normal group.

1.2 方法

1.2.1 从精子样本中分离总 RNA (包括 miRNA) 取精液 300 μL , 3000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 收集精子。使用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)提取精子总 RNA, 加入异丙醇后, 每个样品需要 1 μg 糖原, 混合物在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜, 沉淀小 RNA。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 测定纯度和浓度。

1.2.2 miRNA 测序及差异表达分析 将提取好的 5 例重度弱

精子症组和 3 例对照组的精子总 RNA 外送至康城生物有限公司采用 Illumina Hiseq 2500 测序平台筛查收集样品精子中 miRNA 表达谱。miRNA 的表达定量由软件 mirdeep2 通过比对结果到已知的基因组并统计得到。miRNA 表达量阈值为每个组中 CPM (Counts per million reads) 均值超过 ≥ 1 的 miRNA 视为在分组中表达并进行统计分析。使用 edgeR 进行组间 miRNAs 的差异表达分析。设定阈值 1.5 倍差异, $P\text{-value} \leq 0.05$

且组内 CPM 均值 ≥ 1 来筛选差异表达 miRNA。当 $|\log FC| > 1$ 且 $FDR < 0.01$ 时, 一个 miRNA 被定义为差异表达。 $\log FC > 1$ 的 miRNAs 是上调的, 而 $\log FC < -1$ 的 miRNAs 被认为是下调的。

1.2.3 miRNAs 靶基因预测及其 GO 功能注释和 KEGG 途径富集分析 基于 TargetScan Human 和 miRDB (<https://mirtarbase.cuhk.edu.cn>) 2 个靶基因数据库, 分别对上调幅度和下调幅度最显著的前 10 个 miRNA 进行潜在靶基因预测。利用 String 数据库和 Cytoscape 软件的 "NetworkAnalyzer" 工具进行可视化处理, 构建 PPI 网络图。Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org>) 功能分析和 Fisher 算法可以提供基因功能的分子功能 (Molecular Function)、细胞成分 (Cellular Component) 和参与的生物过程 (Biological Process) 三个方面信息。利用 KEGG 数据库对差异 miRNA 靶基因进行通路富集分析, $P <$

0.05 代表富集结果显著。最后利用 R 语言绘制 GO 和 KEGG 富集分析气泡图。

1.2.4 qRT-PCR 使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒 (FastKing) 合成 cDNA。使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix (+Dye II) 在 ABI 7900 Real-Time PCR 系统中进行 qRT-PCR。总反应体系为 10 μ L [SuperMix 5 μ L、Primer1 (10 μ mol / L) 0.25 μ L、Primer2 (10 μ mol / L) 0.25 μ L、Template cDNA 1 μ L、ddH₂O 3.5 μ L]。反应条件: 94 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环, 设置 3 个复孔。所有的反应都进行了 3 次重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的表达量。U6 作为内源性正常化对照来评估 miRNAs 的相对基因表达水平。熔融曲线分析来控制 qRT-PCR 产物的特异性。相应引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

miRNA name	miRNA-specific primer	Universal primers
hsa-miR-2355-5p	CCGATCCCCAGATACAATGGACAA	GATCGCCCTTCTACGTCGTAT
hsa-miR-371a-5p	ACTCAAAGTGTGGGGGCACT	GATCGCCCTTCTACGTCGTAT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.3 统计学分析

所有数据均以至少 3 个独立实验的均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式呈现, 两组间比较采用 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验。采用 SPSS 软件进行统计分析。采用非参数 Mann-Whitney U 检验对数据进行显著性检验。 $P < 0.05$ 被认为是显著的。

2 结果

2.1 重度弱精子症男性和正常男性精子中差异表达的 miRNAs

成功测序了 5 个重度弱精子症和 3 个正常精子标本的文库。经过生物信息学分析, 共有 1055 个 miRNAs 被注释, 这些被认为是已知的 miRNAs。以 $|\log FC| > 1$ 和 $FDR < 0.01$ 为标准, 重度弱精子症患者与健康男性相比, 共有 146 个 miRNAs 表达水平出现显著差异, 包括 52 个上调的 miRNAs 和 94 个下调的 miRNAs (图 1A)。经过滤分析后, 其中上调幅度最大的 10 个 miRNAs 和下调幅度最大的 10 个 miRNAs 均已列出 (图 1B、表 3)。miR-448 和 hsa-miR-302a-3p 上调和下调的幅度最大, 之前研究中发现的一些差异表达的 miRNAs, 如 miR-34、miR-34、miR-146、miR-449, 在本研究中均存在特异性的下调, 与之前的报道一致^[24] (表 4)。

2.2 差异表达 miRNAs 靶基因的预测

对显著差异上、下调前 10 的 miRNA 进行靶基因筛选, miRDB 数据库中分别有 2805 和 4140 个独立靶基因; TargetScan Human 数据库中分别有 1842 和 1939 个独立靶基因。其中两个数据库同时存在的靶基因有 526 和 881。对两个数据库同时存在的靶基因分别建立了上调差异表达 miRNA - 靶基因网络和下调差异表达 miRNA - 靶基因网络 (图 2 A、图 2 C) 和每个差异表达 miRNA 靶基因数量 (图 2 B、图 2 D)。上调差异表达的 hsa-miR-2355-5p 在两个数据库同时存在的靶基

因数最多, 有 132 个; 下调差异表达的 hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p 和 hsa-miR-302d-3p 在 miRDB 数据库和在 TargetScan Human 数据库以及两个数据库同时存在的靶基因数量和对应的靶基因完全一致, 有 161 个; hsa-miR-483-3p 在两个数据库没有同时存在的靶基因。

2.3 差异表达 miRNAs 靶基因的 GO 功能注释和 KEGG 途径富集分析

GO 分析包括生物过程、细胞成分和分子功能, 研究目的基因的功能和注释。在这三个领域中最显著富集的 10 个功能如图 3 所示。涉及的主要生物过程在细胞周期的调节、刺激反应、氮化物代谢过程的调控、细胞代谢过程的正向调节、细胞内信号转导、RNA 生物合成和代谢过程的调控等。与差异表达基因相关性最强的细胞成分主要是细胞质、核质、膜、膜细胞器、细胞外围、质膜、内膜系统、胞质溶胶、膜结合的细胞器、染色体等。差异表达基因与以下分子功能密切相关: 蛋白质结合、RNA 结合、催化活性、碳水化合物衍生物结合、酶结合、转录调节活性、DNA 结合转录激活剂活性、RNA 聚合酶 II 特异性等方面。

我们绘制散点图来直观地说明 KEGG 分析结果。图 4 显示了 30 条 P 值较小的路径。值得注意的是, 显著富集的路径主要与细胞自噬、细胞衰老和内分泌抵抗等有关。分析表明, 具有显著相关性的信号通路包括 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路 mTOR 信号通路等。

2.4 差异表达 miRNAs 及其靶基因的 qRT-PCR 验证

依据弱精子症的主要特征为精子活力低下, 关注 KEGG Pathway 分析结果中线粒体自噬通路 (Mitophagy-animal, $P = 0.027$, $P < 0.05$)。其中, 在重度弱精子症精子中特异性上调的 hsa-miR-371a-5p 和 hsa-miR-2355-5p, TargetScan 和 miRDB 两个数据库均预测靶基因分别为自噬效应蛋白 *Beclin1* 和线粒体

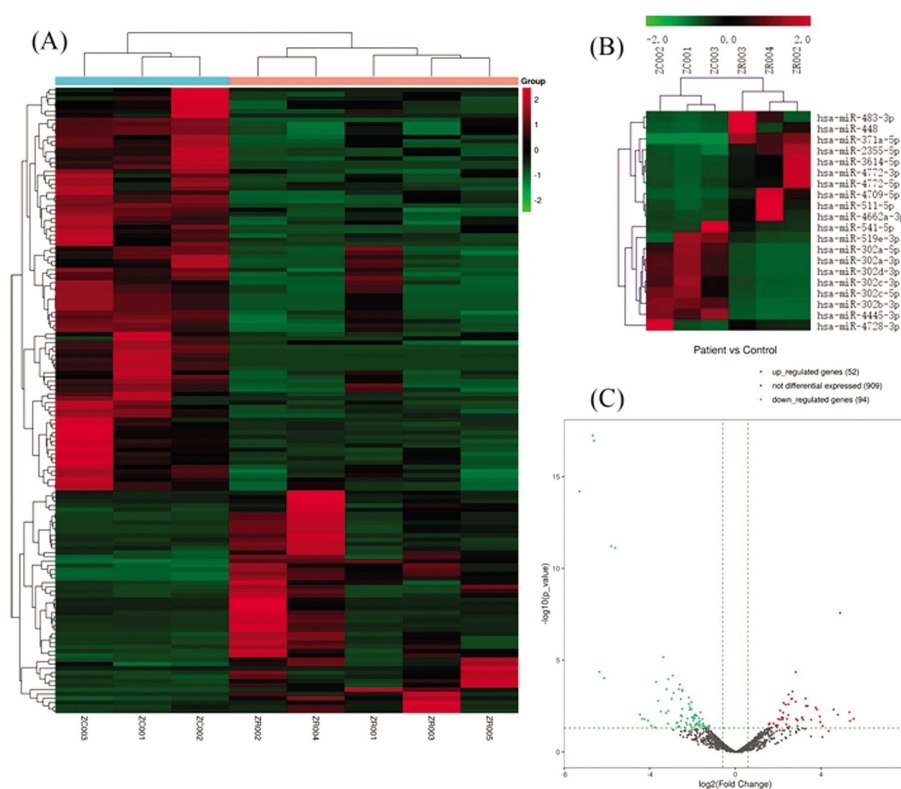


图 1 重度弱精子症男性和正常精子男性精子中 miRNA 差异表达谱热图和火山图

Fig.1 Differentially expressed miRNAs in asthenospermic specimens versus normal sperm

Note: Red indicates high expression, and blue indicates low expression. ZR, asthenozoospermia, ZC, normal control. (A) Heat map based on the differential expression of the 146 altered miRNAs in asthenozoospermia and normal specimens. (B) Heat map based on the top 10 differentially expressed miRNAs in asthenozoospermia and normal specimens. (C) Volcano plot based on all the miRNAs annotated in asthenozoospermia and normal specimens.

内膜蛋白抑素 2(prohibitin2, *PHB2*),二者直接参与线粒体自噬过程。使用 qRT-PCR 来验证这 2 个 miRNAs 和靶基因在不同活力精子中的表达水平。如图 5 所示,miR-371a-5p 的表达量在高活力正常对照组与中等活力正常对照组间无明显差异($P>0.05$);轻中度弱精子症组和重度弱精子症组中 miR-371a-5p 表达水平比高活力正常对照组高($P<0.01$),组间差异大($P<0.0001$)。与高活力正常对照组相比,重度弱精子症组的 miR-2355-5p 表达水平升高($P<0.0001$),其他组别与高活力正常对照组相比,无显著差异($P>0.05$)。*Beclin1* 的 mRNA 表达水平在四组中无显著差异($P>0.05$);与高活力正常对照组相比,*PHB2* 的 mRNA 在中等活力正常对照组和轻中度弱精子症组表达水平升高($P<0.01$, $P<0.001$)。

3 讨论

弱精子症(AZS)是男性不育最常见的原因之一,往往作为辅助生殖技术的重要临床适应症之一,给家庭福祉和社会医疗体系带来沉重负担。miRNA 在男性不育中起着至关重要的作用^[15],已有研究报道弱精子症男性的总精液、精浆和精子中的 miRNAs 发生改变^[16],miRNAs 也可能参与男性不育^[17,18]。

在我们的研究中,发现的一些差异表达的 hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-34b-3p、hsa-miR-146a-3p、hsa-miR-449a、和 hsa-miR-449c-5p,已被报道可用作特发性男性不育的诊断生物标志物以及新的靶向治疗工具^[15]。Abdolmabood 等人发现不育男性精子样本中 miR-34c-5p 显著下调^[19]。Wang 等发现无精子症患者

miR-146b-5p 表达显著降低^[20]。另外,睾丸中 miR-34b-5p 和 miR-449a 可能参与了粗线期精母细胞的损伤,miR-449 失调可能导致精子活力受损,从而出现男性不育^[21]。我们的数据在上述发现的基础上,进一步证实了这些 miRNA 参与了弱精子症分子调控。

有意义的是,除了已经被报道的 miRNAs 外^[22],我们在重度弱精子症患者精子中还发现了显著差异表达的新的 miRNAs。

我们发现 hsa-miR-302 家族在重度弱精子症患者精子中表现为显著差异表达下调,以往的研究表明 miR-302a-3p 可通过靶向 *METTL3* 抑制黑色素瘤细胞的进展^[23],通过靶向 *FOXO3* 抑制线粒体自噬,加重心肌缺血再灌注损伤^[24]。miR-302d-3p 通过调节 *TMBIM6* 介导的 ERK 信号通路调节乳腺癌细胞的活力、迁移和凋亡^[25]。hsa-miR-302 家族是否同样参与精子的线粒体自噬或者细胞的活力、迁移和凋亡,从而导致精子活力的下降,还需进一步探讨。

有趣的是,我们研究发现的重度弱精子症患者精子中显著差异表达上调的 miRNAs,大部分已被报道与细胞自噬或者线粒体自噬相关,给本课题以后的研究内容指引了方向。其中,研究表明 hsa-miR-448 可以调节癌细胞的进展和焦亡,可作为肿瘤预后的标记物^[26];hsa-miR-4772-5p 可能与新的细胞自噬标记物存在关联^[27];另外,在晚期肝细胞癌(HCC)中,miR-371a-5p 对自噬相关因子 *BECN1* 的 mRNA 翻译有直接抑制作用,而且 miR-371a-5p 的表达与 *BECN1* 蛋白表达呈负相关,miR-371a-5p

表 3 重度弱精子症男性和正常精子男性精子中差异表达 miRNAs 上和下调前 10 位

Table 3 The top 10 differentially expressed miRNAs ($|\log_2FC| > 1$ and $FDR < 0.01$) in asthenospermic specimens versus normal sperm defined by high-throughput sequencing

Mature_ID	$\log_2FC$	Fold_Change	P_value	$q_value(FDR)$	DGE
hsa-miR-448	5.53E+00	4.61E+01	1.59E-02	2.13E-01	Up-regulated
hsa-miR-4709-5p	5.36E+00	4.10E+01	2.02E-02	2.39E-01	Up-regulated
hsa-miR-483-3p	5.33E+00	4.02E+01	6.85E-03	1.47E-01	Up-regulated
hsa-miR-371a-5p	4.89E+00	2.97E+01	2.63E-08	4.63E-06	Up-regulated
hsa-miR-4772-5p	4.79E+00	2.77E+01	9.32E-03	1.79E-01	Up-regulated
hsa-miR-4772-3p	4.59E+00	2.41E+01	4.91E-03	1.18E-01	Up-regulated
hsa-miR-3614-5p	4.08E+00	1.70E+01	3.84E-02	3.20E-01	Up-regulated
hsa-miR-4662a-3p	3.97E+00	1.57E+01	2.35E-02	2.66E-01	Up-regulated
hsa-miR-2355-5p	3.94E+00	1.54E+01	1.17E-02	1.93E-01	Up-regulated
hsa-miR-511-5p	3.81E+00	1.40E+01	4.99E-03	1.18E-01	Up-regulated
hsa-miR-302a-3p	-7.28E+00	6.44E-03	6.31E-15	2.22E-12	Down-regulated
hsa-miR-302b-3p	-6.66E+00	9.89E-03	5.65E-18	5.76E-15	Down-regulated
hsa-miR-302a-5p	-6.60E+00	1.03E-02	1.09E-17	5.76E-15	Down-regulated
hsa-miR-302c-5p	-6.35E+00	1.22E-02	4.36E-05	5.26E-03	Down-regulated
hsa-miR-4445-3p	-6.12E+00	1.43E-02	9.40E-05	9.02E-03	Down-regulated
hsa-miR-302c-3p	-5.80E+00	1.80E-02	6.19E-12	1.59E-09	Down-regulated
hsa-miR-302d-3p	-5.61E+00	2.04E-02	7.52E-12	1.59E-09	Down-regulated
hsa-miR-519e-3p	-4.46E+00	4.56E-02	9.22E-03	1.79E-01	Down-regulated
hsa-miR-541-5p	-4.35E+00	4.89E-02	1.59E-02	2.13E-01	Down-regulated
hsa-miR-4728-3p	-4.24E+00	5.28E-02	1.66E-02	2.16E-01	Down-regulated

Note: compared with the normal group, $P < 0.05$.

表 4 诊断弱精子症的 miRNA 生物标志物的差异表达

Table 4 Differential expression of miRNA biomarkers for diagnosis of asthenospermia

Mature_ID	$\log_2FC$	Fold_Change	P_value	$q_value(FDR)$	DGE
hsa-miR-146a-3p	-3.21E+00	1.08E-01	3.81E-04	2.52E-02	Down-regulated
hsa-miR-449c-5p	-2.14E+00	2.28E-01	5.02E-03	1.18E-01	Down-regulated
hsa-miR-34c-3p	-1.51E+00	3.51E-01	3.17E-02	2.99E-01	Down-regulated
hsa-miR-34b-3p	-1.51E+00	3.52E-01	2.80E-02	2.81E-01	Down-regulated
hsa-miR-449a	-1.40E+00	3.78E-01	4.46E-02	3.46E-01	Down-regulated

Note: compared with the normal group, $P < 0.05$.

可以通过靶向抑制 *BECN1* 依赖性自噬途径来增强药物治疗反应^[28]。值得注意,已有研究报道 miR-37a-5p 靶基因的功能生物信息学分析显示在自噬途径中的富集,miR-371a-5p 过表达抑制自噬相关表型,反之亦然^[29]。另外,全转录组测序及生信分析发现,hsa-miR-2355-5p 可能被视为结核病的潜在诊断生物标志物^[30]。miR-2355-5p 靶向 *CBX5* 加剧乳腺癌中的细胞增殖和迁移,靶向负调控 *ERRFI1* 抑制髓核的增殖和炎症,同时,靶向调节 *ATG5* 来加速癌症细胞的自噬和进展^[31-33]。

在功能富集结果中,发现了重要的生物学过程和途径,我们发现这些在重度弱精子症患者精子中差异表达的 miRNAs

与线粒体自噬通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、mTOR 信号通路和 FoxO 信号通路显著相关。研究表明,miRNAs 可参与多种细胞过程,包括分化、凋亡和发育,表达特异改变的 miRNAs 可通过各种机制对弱精子症产生影响^[15]。目前研究认为,失调的 miRNAs 可能是开发新的和增强的弱精子症诊断和预后技术的关键,并且还可能个性化医学领域提供新的治疗可能性^[34]。

在我们的研究中,在重度弱精子症患者精子中,不管高通量测序以及 RT-qPCR 的验证结果均显示 miR-371a-5p 和 miR-2355-5p 高表达。依据生物信息学方法对 miRNAs 靶基因

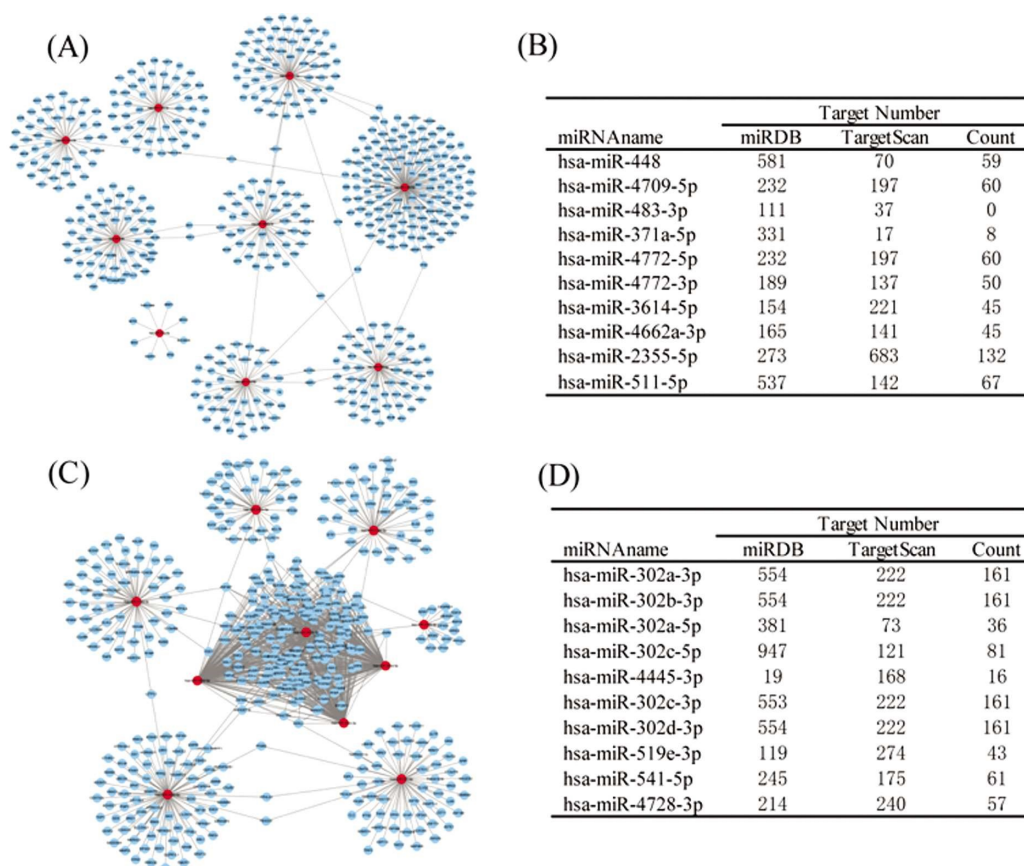


图 2 显著差异上、下调的前 10 个 miRNA 在 miRDB 和 TargetScan Human 数据库预测的潜在靶基因

Fig. 2 Potential target genes of the top 10 differentially expressed miRNAs predicted by miRDB and TargetScan Human databases

Note: (A) the network of the top 10 upregulated miRNAs target genes constructed by miRDB and TargetScan;

(B) the count of the top 10 upregulated miRNAs target genes; (C) the network of the top 10 downregulated miRNAs target genes constructed by miRDB and TargetScan; (D) the count of the top 10 downregulated miRNAs target genes.

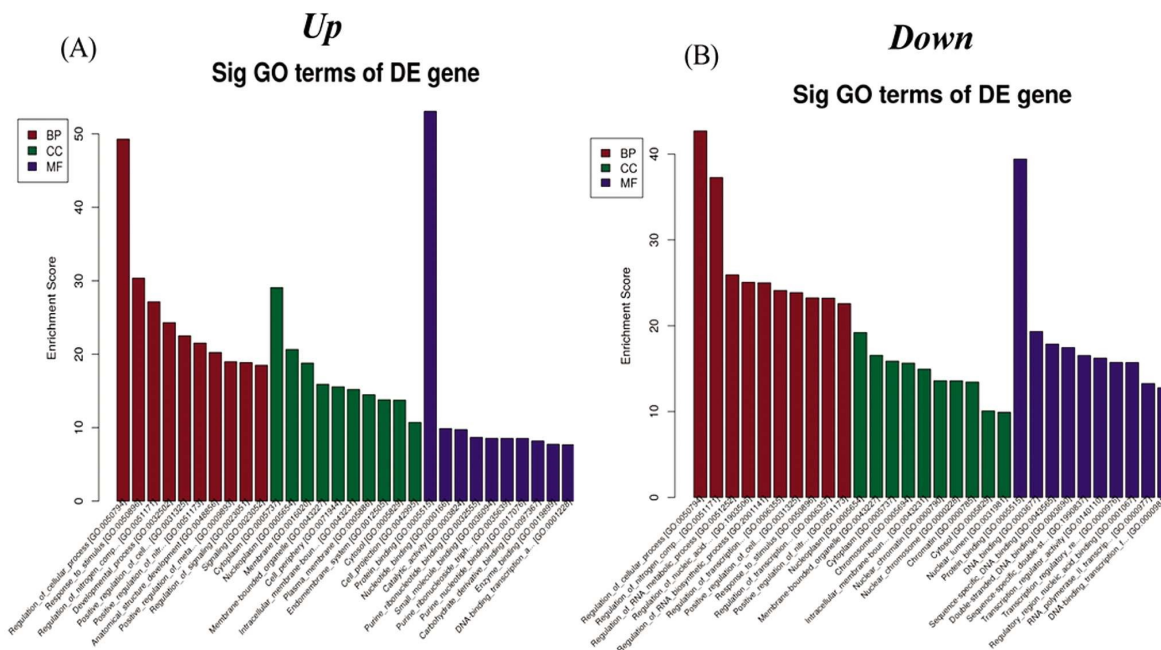


图 3 显著差异表达 miRNAs 靶基因的 GO 分析 (BP,CC,MF) 结果

Fig. 3 GO enrichment of target genes of differentially expressed miRNAs

Note: (A) Upregulated differentially expressed miRNAs; (B) Downregulated differentially expressed miRNAs. The bar graph of the 10 GO items with the most significant differences in the results of GO analysis (BP, CC, MF). Red indicates Biological Process, BP; green indicates Cellular Component, CC; blue indicates Molecular Function, MF. Arranged by *P*-value from low to high, the ordinate represents *P*-value (-log₁₀ transformation).

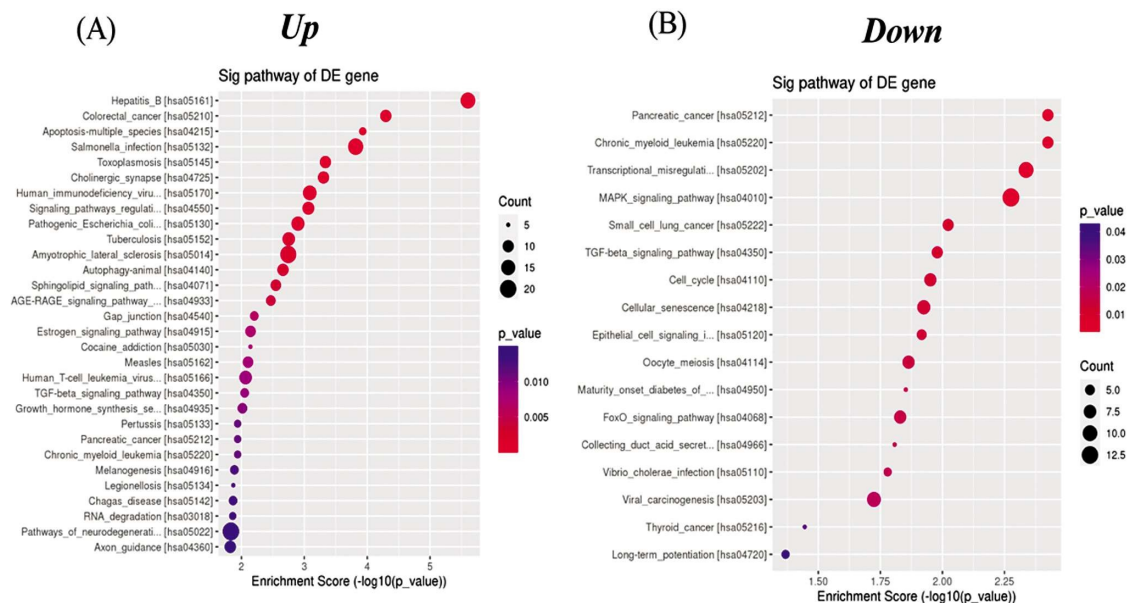


图4 显著差异表达 miRNAs 靶基因的 KEGG 途径条目

Fig. 4 Scatter plot of KEGG pathways

Note: (A) Upregulated differentially expressed miRNAs; (B) Downregulated differentially expressed miRNAs.

The x-axis represents the enriched pathways, and the y-axis represents the rich factor (sample number/background number).

The size of the dots indicates the number of target genes differentially expressed in this pathway. The colour of the dots corresponds to different P-value ranges. Colors from blue to red indicate p-values from low to high, that is, the significance of enrichment is from high to low.

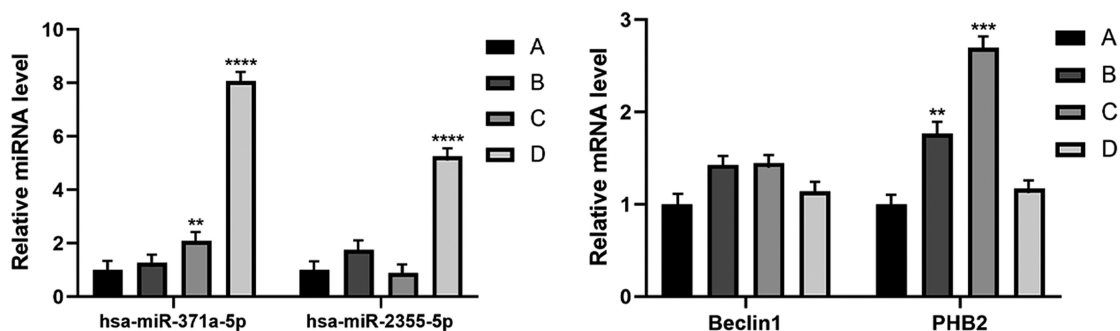


图5 hsa-miR-371a-5p 和 hsa-miR-2355-5p 以及相应预测靶基因 Beclin1 和 PHB2 在不同活力精子中 mRNA 表达量

Fig. 5 The different expression levels of hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-2355-5p and the target genes Beclin1 and PHB2 between asthenozoospermia and normal specimens as determined by qRT-PCR.

Note: A, Normal control group with high sperm motility, B, Normal control group with moderate sperm motility, C, Mild to moderate asthenospermia group, D, Severe asthenospermia group. Abbreviations: The control group is sperm high-activity normal control group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

和参与的 Pathway 预测结果，在两个数据库同时存在 hsa-miR-371a-5p 的目标靶基因 *Beclin1*, hsa-miR-2355-5p 的目标靶基因 *PHB2*，这两个靶基因均参与调节细胞自噬和线粒体自噬并占据着重要的角色^[35]。疑惑的是，RT-qPCR 检测不同活力精子组中 *Beclin1* 和 *PHB2* 的 mRNA 的表达量时，未发现 miR-371a-5p 与 *Beclin1*, miR-2355-5p 和 *PHB2* 之间的存在直接关联性，但不排除两者间存在其他的间接影响靶向关系，为后期研究弱精子症中是否存在线粒体自噬异常从而导致精子活力的下降提供了基础。

综上，我们探讨了重度弱精子症患者精子中的 microRNA 特异表达特征和参与致病机制的可能途径，发现了特异性失调的 miRNAs 及其靶基因，为后续深入研究活力低下精子中

miRNAs 参与调控线粒体自噬功能的机制提供新思路 and 理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, et al. Male infertility[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9(1): 49.
- [2] Jungwirth, A, Diemer, T, Kopa, Z, et al. EAU Guidelines on Male Infertility[J]. Eur Urol, 2017, 48(5): 703-11.
- [3] Chambers GM, Dyer S, Zegers-Hochschild F, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014[J]. Hum Reprod, 2021, 36(11): 2921-2934.
- [4] DeJong J. Basic mechanisms for the control of germ cell gene expression[J]. Gene, 2006, 366(1): 39-50.

- [5] Jiang DD, Liu FX, Jiang YM, et al. Molecular mechanisms underlying the pathogenesis of asthenospermia[J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2018, 24(9): 834-838.
- [6] Shahab M, Tohid RT, Mustafa NB, et al. Quantitative proteomics of sperm tail in asthenozoospermic patients: exploring the molecular pathways affecting sperm motility [J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 392(3): 793-810.
- [7] Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development [J]. *Theriogenology*, 2007, 68: S147-S155.
- [8] Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, et al. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: Relationship to sperm motility and capacitation[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2004, 10(7): 535-541.
- [9] Sandler E, Johnson GD, Mao S, et al. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4104-4117.
- [10] Horwich M, Zamore P. Design and delivery of antisense oligonucleotides to block microRNA function in cultured [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3: 1537-1549.
- [11] Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. *Methods Molecular Biology*, 2017, 1509: 1-10.
- [12] Liu L, Li T, Li F, et al. The influence of l-carnitine on the expression of miRNAs in asthenospermia spermatozoa and the network regulation of the associated molecules [J]. *Andrologia*, 2020, 52(1): e13478.
- [13] Zhou R, Zhang Y, Du G, et al. Down-regulated let-7b-5p represses glycolysis metabolism by targeting AURKB in asthenozoospermia[J]. *Gene*, 2018, 663: 83-87.
- [14] Dr. Christina, Wang M. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. sixth edition [J]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [15] Barbu MG, Thompson DC, Suciu N, et al. The roles of microRNAs in male[J]. *Infertility*, 2021, 22(6): 2910.
- [16] Heidary Z, Zaki-Dizaji M, Saliminejad K, et al. MicroRNA profiling in spermatozoa of men with unexplained asthenozoospermia [J]. *Andrologia*, 2019, 51(6): e13284.
- [17] Khazaie Y, Nasr Esfahani MH. MicroRNA and male infertility: A potential for diagnosis[J]. *International Journal of Fertility & Sterility*, 2014, 8(2): 113-118.
- [18] Mohamed JS, Renzon DP, Azfar J, et al. Reduced expression of miR-221 is associated with the pro-apoptotic pathways in spermatozoa of oligospermia men [J]. *J Reprod Immunol*, 2023, 160: 104159.
- [19] Momeni A, Najafipour R, Hamta, A, et al. Expression and methylation pattern of hsa-miR-34 family in sperm samples of infertile men[J]. *Reproductive Sciences*, 2020, 27(1): 301-308.
- [20] Wang C, Yang C, Chen XI, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility [J]. *Clinical Chemistry*, 2011, 57(12): 1722-1731.
- [21] Comazzetto S, di Giacomo M, Rasmussen KD, et al. Oligo asthenoteratozoospermia and Infertility in Mice Deficient for miR-34b/c and miR-449 Loci[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10: e1004597.
- [22] Daneshmandpour Y, Bahmanpour Z, Hamzeiy H, et al. MicroRNAs association with azoospermia, oligospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia: A systematic review [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2020, 37(4): 763-775.
- [23] Chang X, Lin YY, Bai LN, et al. miR-302a-3p suppresses melanoma cell progression via targeting METTL3[J]. *J Chemother*, 2022, 34(1): 55-66.
- [24] Lv W, Jiang J, Li Y, et al. MiR-302a-3p aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing mitophagy via targeting FOXO3[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 117: 104522.
- [25] Liao Y, Qiu Z, Bai L. miR-302d-3p regulates the viability, migration and apoptosis of breast cancer cells through regulating the TMBIM6-mediated ERK signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(6): 853.
- [26] Su F, Duan J, Zhu J, et al. Long non coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 regulates ionizing radiation induced pyroptosis via microRNA 448/gasdermin E in colorectal cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2021, 59(4): 79.
- [27] Chen ZH, Wang X, Li LB, et al. Construction of an autophagy interaction network based on competitive endogenous RNA reveals the key pathways and central genes of SARS-CoV-2 infection in vivo [J]. *Microb Pathog*, 2021, 158: 105051.
- [28] Lv ZB, Qiu X, Jin P, et al. MiR-371a-5p Positively Associates with Hepatocellular Carcinoma Malignancy but Sensitizes Cancer Cells to Oxaliplatin by Suppressing BECN1-Dependent Autophagy [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(10): 1651.
- [29] Wu W, Lu P, Huang Y, et al. Emodin regulates the autophagy via the miR-371a-5p/PTEN axis to inhibit hepatic malignancy [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2022, 619: 1-8.
- [30] Song J, Sun JG, Wang YQ, et al. CeRNA network identified hsa-miR-17-5p, hsa-miR-106a-5p and hsa-miR-2355-5p as potential diagnostic biomarkers for tuberculosis [J]. *Medicine (Baltimore)*. 2023, 102(11): e33117.
- [31] Yu L, Zhang W, Wang P, et al. LncRNA SNHG11 aggravates cell proliferation and migration in triple-negative breast cancer via sponging miR-2355-5p and targeting CBX5[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 892.
- [32] Guo Y, Tian L, Liu X, et al. ERRFI1 Inhibits Proliferation and Inflammation of Nucleus Pulposus and Is Negatively Regulated by miR-2355-5p in Intervertebral Disc Degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2019, 44(15): E873-E881.
- [33] Xu H, Yu X, Yang Z, et al. PAX5-activated lncRNA ARRDC1-AS1 accelerates the autophagy and progression of DLBCL through sponging miR-2355-5p to regulate ATG5 [J]. *Life Sci*, 2021, 286: 119932.
- [34] Liang G, Wang Q, Zhang G, et al. Differentially expressed miRNAs and potential therapeutic targets for asthenospermia [J]. *Andrologia*, 2022, 54(1): e14265.
- [35] Yan CJ, Gong LL, Chen L, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis[J]. *Autophagy*, 2020, 16(4): 419-434.