

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01159

· 短篇论著 ·

# 无精子症患者外周血和睾丸组织睾酮、雄激素受体、热休克蛋白 90 水平的变化

王莹, 刘永杰\*, 刘芳, 白刚, 唐大伟, 金锐, 包俊华

银川市妇幼保健院生殖医学中心, 银川 750001

**[摘要]** **目的** 探讨无精子症患者外周血及睾丸组织睾酮(T)、雄激素受体(AR)、热休克蛋白 90(HSP90)水平的关联性。**方法** 选择 45 例无精子症患者, 测量其静脉血促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、T、AR、HSP90 水平; 行睾丸穿刺, 获取生精小管观察有无精子, 之后磨碎、离心后获取上清液, 测量上清液 T、AR、HSP90 的含量。按睾丸穿刺结果和血 FSH 值分为 A(睾丸穿刺有精子, FSH<8 IU/L)、B(睾丸穿刺无精子, FSH<8 IU/L)、C(睾丸穿刺无精子, FSH>8 IU/L) 3 组, 比较 3 组间外周血和睾丸组织 T、AR、HSP90 水平, 分析 FSH、LH、T、AR、HSP90 间的相关性。**结果** 3 组间比较, 外周血 AR ( $P=0.026$ )、HSP90 ( $P=0.019$ ), 睾丸组织 T ( $P=0.006$ )、AR ( $P=0.047$ ) 差异有统计学意义, 而外周血 T 和睾丸组织 HSP90 水平差异无统计学意义。相关性分析表明: FSH 与外周血 HSP90 ( $r=0.729, P=0.001$ )、睾丸组织 T ( $r=0.722, P=0.002$ ) 正相关; LH 与外周血 ( $r=0.629, P=0.012$ ) 和睾丸组织 ( $r=0.610, P=0.016$ ) T 均正相关; 外周血 T 与外周血 AR ( $r=-0.665, P=0.005$ ) 负相关, 而睾丸组织 T 与睾丸组织 AR ( $r=0.544, P=0.029$ ) 正相关; 外周血 ( $r=0.559, P=0.042$ ) 和睾丸组织 ( $r=0.803, P=0.000$ ) AR 与其相应的 HSP90 正相关。**结论** 睾丸体积正常的无精子症患者外周血 HSP90、AR 浓度升高, 反馈作用于 FSH 和 LH, 睾丸内 T 和 AR 逐渐升高, HSP90 变化不明显。

**[关键词]** 无精子症; 睾丸; 睾酮; 雄激素受体; 热休克蛋白 90

**[中图分类号]** R 691.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1159-04

## Contents of testosterone, testosterone receptor, and heat shock protein 90 in the peripheral blood and testicular tissue of azoospermia patients

WANG Ying, LIU Yong-jie\*, LIU Fang, BAI Gang, TANG Da-wei, JIN Rui, BAO Jun-hua

Reproductive Medical Center, Yinchuan Women and Children Health Care Hospital, Yinchuan 750001, Ningxia, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the association of testosterone (T), testosterone receptor (AR), and heat shock protein 90 (HSP90) levels in the peripheral blood with those in the testicular tissue of azoospermia patients. **Methods** A total of 45 azoospermia patients were selected in this study. Their blood levels of luteotropic hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), T, AR, and HSP90 were measured. The testicular tissues were biopsied to observe the presence of sperm under microscope. Then the biopsied tissues were ground, centrifuged to obtain the supernatant, which was then subjected to detection of T, AR, and HSP90 levels. According to the biopsied results and FSH value, the patients were divided into three groups: group A (had sperm, FSH<8 IU/L), B (no sperm, FSH<8 IU/L), and C (no sperm, FSH>8 IU/L). The blood and testicular levels of T, AR, and HSP90 were compared between the three groups, and the relationship between FSH, LH, T, AR, and HSP90 levels was analyzed. **Results** There were significant differences between the three groups regarding the levels of AR ( $F=5.478, P=0.026$ ) and HSP90 ( $F=5.972, P=0.019$ ) in the blood samples, and levels of T ( $F=6.757, P=0.006$ ) and AR ( $F=4.988, P=0.047$ ) in the testis tissue samples. We also found that FSH level was positively correlated with blood HSP90 level ( $r=0.729, P=0.001$ ) and testicular T level ( $r=0.722, P=0.002$ ); LH level was positively correlated with blood ( $r=0.629, P=0.012$ ) level and testicular T levels ( $r=0.610, P=0.016$ ); blood T level was negatively correlated with blood AR level ( $r=-0.665, P=0.005$ ) while testicular T level was positively correlated with testicular AR level ( $r=0.544, P=0.029$ ); and blood ( $r=0.559, P=0.042$ ) and testicular ( $r=0.803, P=0.000$ ) AR levels were positively correlated with their corresponding HSP90 levels. **Conclusion** Azoospermia patients with normal testicular volume have increased blood HSP90 and

**[收稿日期]** 2014-07-25 **[接受日期]** 2014-09-28

**[基金项目]** 宁夏自然科学基金(NZ1294, NZ14252). Supported by Natural Science Foundation of Ningxia, China (NZ1294, NZ14252).

**[作者简介]** 王莹, 主任医师. E-mail: yingwang99@yahoo.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0951-6882075, E-mail: lyj1722006@aliyun.com

AR levels, and it has a feedback effect upon FSH and LH levels, with gradually increased testicular T and AR levels and unchanged HSP90 level.

[Key words] azoospermia; testis; testosterone; testosterone receptor; heat shock protein 90

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10): 1159-1162]

无精子症是男性不育症中最难诊治的疾病之一,病因复杂,治疗效果不确切,是目前研究的难点。精子的发生依赖于下丘脑-垂体-睾丸内分泌轴的稳态,任何引起生殖内分泌轴紊乱或不平衡的因素都有可能影响精子发生,甚至导致生精阻滞,特别是睾丸内的激素水平会直接影响精子发生<sup>[1-3]</sup>。睾酮(T)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)等的波动会影响机体内分泌的平衡状态<sup>[1]</sup>。雄激素受体(AR)蛋白的结构和功能的改变可能导致机体对雄性激素的不敏感或不能被利用<sup>[2]</sup>,AR 存在于支持细胞、间质细胞、肌样细胞和血管壁<sup>[3]</sup>。而热休克蛋白 90(HSP90)在精子发生的各个时期均有一定的表达量。本研究通过检测外周血和睾丸组织 T、AR 和 HSP90 的含量,旨在探讨雄激素及其与受体结合过程在外周血和睾丸内对精子发生的可能影响,为后续研究奠定基础。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择我院生殖中心男科门诊于 2011 年 1 月至 2012 年 10 月接诊的无精子症患者 45 例,要求按 WHO 第 5 版<sup>[4]</sup>标准行精液检查,至少 3 次以上离心沉淀没有发现精子,睾丸体积 12~25 mL,常规询问病史、进行生殖系统体检,排除患有染色体异常、隐睾、精索静脉曲张、生殖系统感染等疾病者。年龄 26~35 岁,平均(30.25±2.95)岁,不育年限 1~8 年,平均(3.66±2.15)年。

1.2 睾丸体积测量 在室温下,患者取站立位,采用伟力睾丸体积测量器(北京伟力新世纪科技发展有限公司)进行双侧睾丸体积测量。

1.3 FSH、LH、T、AR、HSP90 的检测

1.3.1 标本采集与处理 外周静脉血于上午 9:00~11:00 抽取;睾丸组织采用输精管分离钳钝性分离技术获取<sup>[5]</sup>,取得的睾丸生精小管在显微镜下观察后,用滤纸吸去培养液、电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,上海,AL104)称质量、投入液氮,次日晨取出磨碎,加入 1 000 倍质量的 PBS,混匀,200×g 离心,-80℃冰箱保存,备用。

1.3.2 各指标的测定 FSH、LH、T 采用电化学发光法检测,按试剂盒说明书操作,设备和试剂均购自 Roche Diagnostics GmbH 公司(德国);AR、HSP90 采用 ELISA 法检测,按试剂盒说明书操作(美国 ADCAM 公司),用 MK3 型酶标仪(热点上海仪器有限公司)测量。

1.4 观察指标 按无精子症的轻重程度,根据睾丸穿刺有无精子和 FSH 值分为 A(睾丸穿刺有精子,FSH≤8 IU/L)、B(睾丸穿刺无精子,FSH≤8 IU/L)、C(睾丸穿刺无精子,FSH>8 IU/L) 3 组,比较 3 组间外周血和睾丸组织 T、AR、HSP90 的差异性,分析 FSH、LH、T、AR、HSP90 之间的相关性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件行直线相关分析和 F 检验,两组间的比较采用 t 检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

2 结果

2.1 患者外周血和睾丸组织 T、AR、HSP90 的水平 结果(表 1)表明:3 组患者外周血 AR( $P=0.026$ )和 HSP90( $P=0.019$ )、睾丸组织 T( $P=0.006$ )和 AR( $P=0.047$ )差异有统计学意义,而外周血 T 和睾丸组织 HSP90 差异无统计学意义。

表 1 3 组患者外周血和睾丸组织 T、AR、HSP90 的水平

$n=15, \bar{x} \pm s$

组别	睾丸体积 V/mL	外周血			睾丸组织		
		T $\rho_B / (ng \cdot mL^{-1})$	AR $\rho_B / (ng \cdot L^{-1})$	HSP90 $\rho_B / (pg \cdot mL^{-1})$	T $\rho_B / (ng \cdot mL^{-1})$	AR $\rho_B / (ng \cdot L^{-1})$	HSP90 $\rho_B / (pg \cdot mL^{-1})$
A	16.06±4.75	3.84±1.54	503.43±370.08	687.87±475.34	218.89±198.11	37 495.96±24 630.95	192 176.28±137 833.46
B	14.17±1.04	4.11±1.23	683.88±405.19	2 757.67±2 069.64*	581.22±363.80*	55 866.50±47 039.18*	229 388.67±131 905.15
C	14.89±2.97	4.69±1.91	1 403.3±540.48*△	5 011.15±3 526.00*△	608.31±394.79*	69 354.95±48 961.24*△	208 154.59±1 821 696.49

T:睾酮;AR:雄激素受体;HSP90:热休克蛋白 90. \*  $P<0.05$  与 A 组比较;△  $P<0.05$  与 B 组比较

2.2 FSH、LH、T、AR、HSP90 的相关性分析 结果(表 2)表明:FSH 与外周血 HSP90( $P=0.001$ )、睾丸组织 T( $P=0.002$ )正相关; LH 与外周血( $P=0.012$ )和睾丸组织( $P=0.016$ )T 均正相关;外周血

T 与外周血 AR( $P=0.005$ )负相关,而睾丸组织 T 与睾丸组织 AR( $P=0.029$ )正相关;外周血( $P=0.042$ )和睾丸组织( $P=0.000$ )AR 与其相应的 HSP90 正相关。

表 2 患者 FSH、LH、T、AR、HSP90 的相关性分析

$n=45$

部位	指标		外周血			睾丸组织		
			T	AR	HSP90	T	AR	HSP90
外周血	FSH	$r$	0.070	0.145	0.729	0.691	0.078	-0.116
		$P$	0.804	0.592	0.001	0.004	0.774	0.668
	LH	$r$	0.629	0.353	-0.090	0.722	0.279	0.195
		$P$	0.012	0.180	0.740	0.002	0.295	0.468
	T	$r$		-0.665	-0.156	0.319	-0.213	-0.423
		$P$			0.005	0.563	0.229	0.427
	AR	$r$			0.559	-0.151	-0.268	-0.273
		$P$			0.042	0.575	0.316	0.307
	HSP90	$r$				-0.213	-0.262	-0.264
		$P$				0.429	0.316	0.323
	睾丸组织	T	$r$				0.544	0.030
			$P$				0.029	0.913
AR		$r$					0.803	
		$P$					0.000	

FSH:促卵泡激素;LH:促黄体生成素;T:睾酮;AR:雄激素受体;HSP90:热休克蛋白 90

### 3 讨论

男性的雄性激素主要在睾丸内合成,通过体循环和局部旁分泌分布于靶组织器官,与其受体结合后发挥作用。雄激素一方面可以维持男性的第二性征,另一方面对精子的发生起重要作用,而 AR 在睾丸内的分布情况尚存在争议<sup>[6]</sup>。Johnston 等<sup>[7]</sup>认为生殖细胞缺乏 AR 功能,没有 AR 表达;Okuyama 等<sup>[8]</sup>发现 AR 在睾丸的间质细胞和支持细胞中均有表达;而 Vornberger 等<sup>[9]</sup>在Ⅺ期精子细胞中发现了 AR 的阳性表达。此外,AR 在睾丸内的具体含量目前仍鲜有报道。

本研究采用 ELISA 法检测了无精子症患者外周血和睾丸组织 T 和 AR 浓度,分别为外周血 T ( $4.21 \pm 1.58$ )ng/mL、AR( $728.55 \pm 380.87$ )ng/L,睾丸组织 T ( $489.28 \pm 243.99$ )ng/mL、AR ( $47522.82 \pm 2539.71$ )ng/L。3 组间外周血 T 浓

度差异无统计学意义,而外周血 AR、睾丸组织 T 和 AR 差异有统计学意义,即随着睾丸生精功能的下降,睾丸内生成的 T 逐渐增多,AR 表达量增高,而外周血 T 浓度变化不明显。Zhang 等<sup>[10]</sup>发现随着精子数量的下降,精液中睾酮 T 浓度逐渐减少;Lazaros 等<sup>[11]</sup>发现外周血睾酮 T 浓度随着精子数量的下降而减少。由此推测,随着睾丸生精功能降低,睾丸内 T 合成增多,但分泌到外周血和附属性腺中的 T 不变或相对减少,同时外周血和睾丸组织 AR 的表达升高,从而提高 T 的作用水平。

HSP90 是一种高度保守的分子伴侣,在细胞中含量很高,非应急状态下约占总蛋白的 1%~2%。Grad 等<sup>[12]</sup>的实验证明,精子的发生必须有 HSP90 的表达,如果没有 HSP90,减数分裂就会停滞。Kajiwara 等<sup>[13]</sup>研究发现,HSP90 $\alpha$  敲除小鼠睾丸体积减小,精子生成阻滞,生精细胞凋亡增加。FSH 主要作用于支持细胞产生雄性激素结合蛋白,LH 主

要作用于间质细胞产生 T, 雄性激素结合蛋白与 T 的结合直接影响精子的发生<sup>[14]</sup>。

本研究检测的无精子症患者外周血和睾丸组织中 HSP90 的浓度分别为 (2 426. 98 ± 1 612. 63)、(204 178. 07 ± 142 122. 55) pg/mL, 且 3 组间比较, 外周血 HSP90 差异有统计学意义, 而睾丸组织 HSP90 差异无统计学意义; FSH 与外周血 HSP90 正相关, 有统计学意义; 外周血和睾丸组织 AR 与其对应的 HSP90 正相关。结果提示随着睾丸生精功能的下降, 外周血中 HSP90 可能伴随着 AR 表达的增高而增加, 有助于进一步提高 T 的利用水平, FSH 可能具有促进 HSP90 生成的作用, 有待进一步研究证实。

处于医学科研伦理的考虑, 本研究未纳入正常精子患者作为对照组, 且本研究所接诊的患者睾丸体积均大于 12 mL、睾丸活检有精子且 FSH > 8 IU/L 的很少, 导致本研究不够完整, 相关结论仍有一定的局限性, 值得进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 刘永杰, 常青, 白刚, 刘芳, 唐大伟, 金锐, 等. 无精子症患者 FSH、LH 与外周血和睾丸组织 T、E2、T/E2 相关性的研究[J]. 中国男科学杂志, 2014, 28: 23-26.

[2] Zhang Q X, Zhang X Y, Zhang Z M, Lu W, Liu L, Li G, et al. Identification of testosterone-/androgen receptor-regulated genes in mouse Sertoli cells[J]. Asian J Androl, 2012, 14: 294-300.

[3] Ricotti L, Tesei A, De Paola F, Ulivi P, Frassinetti G L, Milandri C, et al. *In vitro* schedule-dependent interaction between docetaxel and gemcitabine in human gastric cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 900-905.

[4] World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and Processing of human semen [M]. 5<sup>th</sup> ed. New York: WHO Press, 2010: 45.

[5] 刘永杰, 王莹, 白刚. 输精管分离钳钝性分离在睾丸活检中的应用[J]. 宁夏医学杂志, 2013, 35: 858-859.

[6] O' Hara L, Smith L B. Androgen receptor signalling in vascular endothelial cells is dispensable for spermatogenesis and male fertility[J]. BMC Res Notes, 2012, 5: 16.

[7] Johnston D S, Russell L D, Friel P J, Griswold M D. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation[J]. Endocrinology, 2001, 142: 2405-2408.

[8] Okuyama M W, Shimozuru M, Yanagawa Y, Tsubota T. Changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes and the androgen receptor in raccoon (*Procyon lotor*) testes in association with the seasons and spermatogenesis[J]. J Reprod Dev, 2014, 60: 155-161.

[9] Vornberger W, Prins G, Musto N A, Suarez-Quian C A. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis [J]. Endocrinology, 1994, 134: 2307-2316.

[10] Zhang Q, Bai Q, Yuan Y, Liu P, Qiao J. Assessment of seminal estradiol and testosterone levels as predictors of human spermatogenesis[J]. J Androl, 2010, 31: 215-220.

[11] Lazaros L, Xita N, Takenaka A, Sofikitis N, Makrydimas G, Stefos T, et al. Semen quality is influenced by androgen receptor and aromatase gene synergism[J]. Hum Reprod, 2012, 27: 3385-3392.

[12] Grad I, Cederroth C R, Walicki J, Grey C, Barluenga S, Winssinger N, et al. The molecular chaperone Hsp90 $\alpha$  is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse[J]. PLoS One, 2010, 5: e15770.

[13] Kajiwara C, Kondo S, Uda S, Dai L, Ichiyangi T, Chiba T, et al. Spermatogenesis arrest caused by conditional deletion of Hsp90 $\alpha$  in adult mice[J]. Biol Open, 2012, 1: 977-982.

[14] 刘永杰, 白刚, 金锐, 王莹, 包俊华, 刘丽丽. 精子形态与外周血性激素水平的关系[J]. 中华男科学杂志, 2010, 16: 468-469.

[15] 刘永杰, 杨勇, 金锐, 白刚, 唐大伟, 刘芳, 等. 睾丸体积、激素水平在诊断无精子症患者睾丸中精子活性的研究[J]. 宁夏医学杂志, 2014, 36: 19-20.

[本文编辑] 贾泽军