

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.12.1586

人精浆中胎盘生长因子表达与少弱精子症临床相关性分析

鄢桃飞^{1*}, 张文辉², 叶誉胜², 许亚军¹, 洪毅¹, 朱亚庆¹, 王越², 颜宏利¹, 张慧琴¹, 孙方臻¹

1. 第二军医大学长海医院生殖医学中心, 上海 200433

2. 第二军医大学基础医学部组织胚胎学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探究人精浆中胎盘生长因子(PIGF)的表达水平及其与精子质量的相关性, 以及其在少弱精子症和无精子症中的临床意义。**方法** 选择2014年9月至11月于第二军医大学长海医院生殖医学中心行精液检测的88例患者, 根据检测结果分为3组: 10例精液正常者、68例少弱精子症患者以及10例无精子症患者。对其中5例精液正常者和5例少弱精子症患者的精浆样本进行细胞因子相关蛋白芯片检测。利用ELISA法检测精浆中PIGF的含量, 运用Pearson相关性分析研究精浆中PIGF含量与精液中精子浓度和活力、患者年龄的相关性。**结果** 精液正常组患者精浆中PIGF含量高于少弱精子症组和无精子症组($P < 0.05$)。精浆中PIGF含量与精子的浓度和活力均存在相关性($r = 0.362, 0.253, P$ 均 < 0.05), 与患者的年龄无明显相关性。**结论** 精浆中PIGF含量与精子的浓度存在相关性, 临床上可为少弱精子症和无精症的诊断和治疗提供参考。

[关键词] 少精子症; 弱精子症; 无精子症; 精浆; 胎盘生长因子; 精子发生

[中图分类号] R 715.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)12-1586-04

Clinical correlation analysis of placenta growth factor expression in human seminal plasma and oligoasthenospermia

YAN Tao-fei^{1*}, ZHANG Wen-hui², YE Yu-sheng², XU Ya-jun¹, HONG Yi¹, ZHU Ya-qing¹, WANG Yue², YAN Hong-li¹, ZHANG Hui-qin¹, SUN Fang-zhen¹

1. Department of Reproductive Medicine Center, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between placental growth factor (PIGF) expression and sperm quality in seminal plasma, and to evaluate its clinical significance in patients with oligoasthenospermia and azoospermia. **Methods** A total of 88 patients undergoing seminal fluid detection were enrolled from the Department of Reproductive Medicine Center of Changhai Hospital of Second Military Medical University from Sep. 2014 to Nov. 2014. The patients were divided into three groups according to the test results: ten cases with normal semen (normal group), 68 cases with oligoasthenospermia (oligoasthenospermia group), and ten cases with azoospermia (azoospermia group). Semen samples from five patients with normal semen and 5 patients with oligoasthenospermia were collected and assayed for cytokine-related protein microarray. The contents of PIGF in seminal plasma were detected by ELISA. The correlations between PIGF concentration and the sperm concentration and activity in seminal plasma and the age of patients were analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** The contents of PIGF in seminal plasma in the normal group were significantly higher than that in the oligoasthenospermia and azoospermia groups ($P < 0.05$). The level of PIGF in seminal plasma was related to the concentration and activity of sperm ($r = 0.362, 0.253; P < 0.05$), but not to the age of patients. **Conclusion** The level of PIGF in seminal plasma is correlated with the sperm concentration, providing reference for diagnosis and treatment of oligoasthenospermia and azoospermia in clinic.

[Key words] oligospermia; asthenospermia; azoospermia; seminal plasma; placental growth factor; spermatogenesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(12): 1586-1589]

[收稿日期] 2017-05-19 [接受日期] 2017-09-06

[作者简介] 鄢桃飞, 硕士, 主治医师。

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162048, E-mail: 191482037@qq.com

男性不育是全球性的生殖健康难题,由少弱精子症引起的男性不育逐渐受到越来越多的关注^[1-2]。少弱精子症的发病机制多种多样,其中常见原因有精液液化异常、精索静脉曲张、吸烟、饮酒以及自身免疫因素等^[3-4]。精子的发生主要在生精小管中进行,其大部分微环境因素只能通过精浆成分来体现^[5]。精浆不仅是精子运输和存活的媒介,其还包括如免疫球蛋白、炎性趋化因子、细胞因子等许多关键调节因子。有文献报道,精子的发生过程与多种细胞因子的分泌和作用有关^[5]。因此精液中细胞因子的种类和表达水平可能可以直接反映精子发生微环境的改变,具有重要的研究价值^[6]。本研究通过蛋白质芯片技术筛选出并分析精浆中胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)的含量,探讨 PIGF 在精浆中的表达水平及其与精子质量的相关性,为临床诊断和治疗少弱精子症及无精子症提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究资料 收集 2014 年 9 月至 11 月于第二军医大学长海医院生殖医学中心行精液检测的 88 例患者的病例资料,排除明显血精症、菌精症、畸精子症等患者。根据精液检测结果将患者分为 3 组:精液正常组、少弱精子症组和无精子症组。所有患者的精液样本均由患者禁性生活 5 d 后手淫法 1 h 内射精所得。待精液液化后,严格按照《世界卫生组织(WHO)人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)的精子正常与少弱精子症的 2 个参数[精子浓度($\times 10^6/\text{mL}$)和精子活力(%)]标准分析精子质量,且至少分析 3 次。本研究通过第二军医大学长海医院伦理委员会审核批准,患者均自愿参加本次研究

并签署知情同意书。

1.2 蛋白质芯片分析 随机挑选出 5 例精液正常者和 5 例少弱精子症者精浆样本进行蛋白质芯片分析。统计结果并进行 Student *t* 检验分析,筛选出精液正常组和少弱精子症组间比较变化倍数最为显著的细胞因子,然后对其进行进一步验证和分析。

1.3 ELISA 法检测精浆中 PIGF 的含量 将收集的精液 4 ℃ 1 500 $\times g$ 离心 15 min,收集上清液。利用 ELISA 法检测精浆中 PIGF 的含量。ELISA 检测委托上海西唐生物科技有限公司进行,所用试剂盒为 PIGF ELISA 试剂-96T-3000 进口分装。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 Student *t* 检验,3 组间比较采用单因素方差分析。少弱精子症者精浆中 PIGF 含量与精子浓度、活力和患者年龄之间的相关性分析采用 Pearson 相关性分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 3 组患者精液参数的比较 共 88 例患者纳入本研究,其中精液正常组 10 例,年龄 27~40 岁,平均年龄(32.3 \pm 4.0)岁;少弱精子症组 68 例,年龄 24~44 岁,平均年龄(30.9 \pm 4.7)岁;无精子症组 10 例,年龄 23~35 岁,平均年龄(31.3 \pm 5.0)岁;3 组患者年龄差异无统计学意义($F=0.746$, $P>0.05$)。少弱精子症组患者的精子浓度、前向运动(A 级和 B 级)精子率与精液正常组相比差异均无统计学意义(P 均 >0.05),无精子症组精液检测未查到精子。

表 1 3 组患者精液参数的比较

组别	<i>n</i>	精子浓度 ($\text{mL}^{-1}, \times 10^6$)	前向运动精子率(%)	
			A 级	B 级
精液正常组	10	86.887 \pm 76.550	36.518 \pm 9.247	25.164 \pm 5.421
少弱精子症组	68	30.314 \pm 36.785	12.391 \pm 7.861	13.169 \pm 6.517
无精子症组	10	0.000	0.000	0.000

2.2 蛋白质芯片筛选差异表达的细胞因子 使用蛋白质芯片分析技术检测 5 例精液正常者和 5 例少弱精子症者的精浆样本。结果(图 1)显示,精液正常组和少弱精子症组患者精浆的 PIGF 表

达水平组间比较变化倍数最为显著,平均值比值为 0.80,差异有统计学意义($t=0.022$, $P<0.05$)。

2.3 ELISA 法检测精浆中 PIGF 的含量 采用

ELISA 试剂盒检测所有入组患者精浆中 PIGF 的含量,结果(图 2)显示,精液正常组患者精浆 PIGF 含量高于少弱精子症组($t=1.828, P<0.05$)和无精子症组($t=2.369, P<0.05$)。

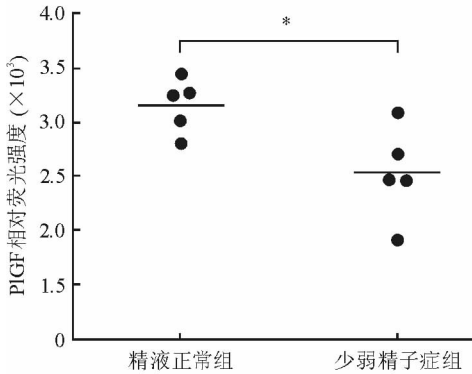


图 1 蛋白质芯片技术分析精液正常者和少弱精子症患者精浆中的胎盘生长因子(PIGF) Student *t* 检验. * $P<0.05$. $n=5$

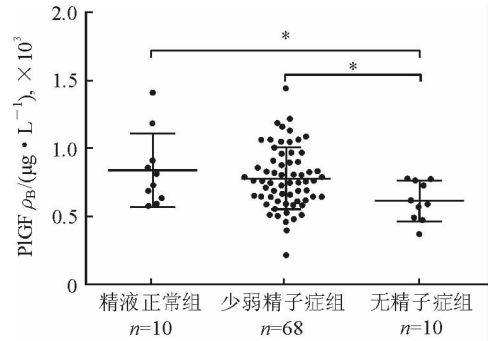


图 2 ELISA 法检测不同精浆样本中胎盘生长因子(PIGF)的表达水平 Student *t* 检验. * $P<0.05$

2.4 精浆中 PIGF 含量与精子质量参数的相关性分析 由图 3 所示,少弱精子症者精浆中 PIGF 含量与精子浓度呈中度相关($r=0.362, P<0.05$),与精子活力(A 级+B 级)呈弱相关($r=0.253, P<0.05$),与患者年龄无明显相关性。

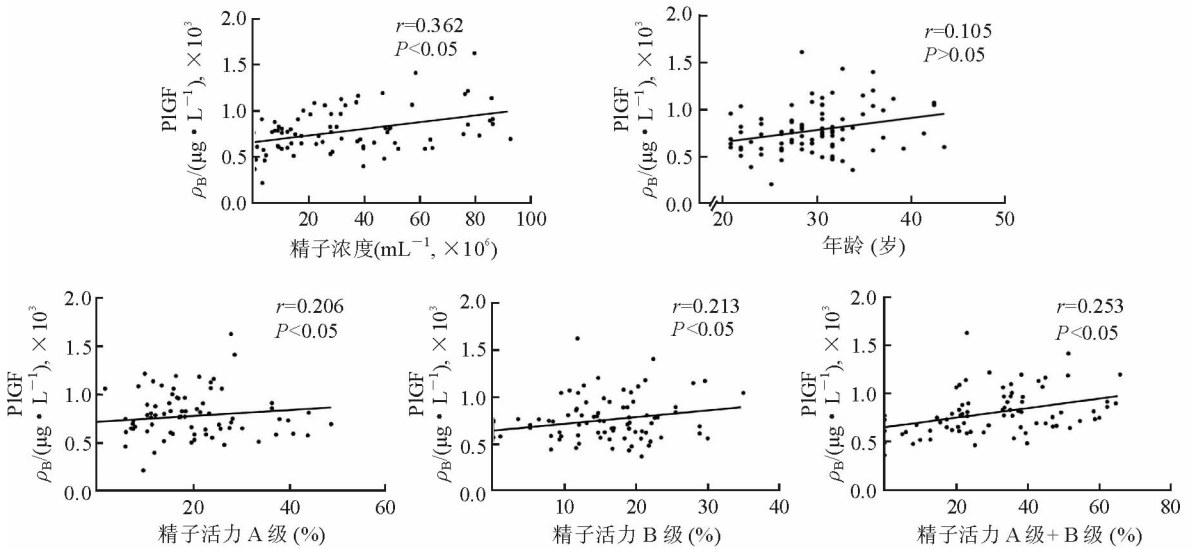


图 3 精浆中胎盘生长因子(PIGF)表达水平与临床精子质量参数相关性分析 Pearson 相关性分析. $n=68$

3 讨论

精浆细胞因子主要由睾丸间质细胞分泌,影响睾丸内细胞的发育和成熟,直接或间接影响精子的发生及功能。研究发现,精子的发生过程与多种细胞因子有关,如不育症患者精浆中白介素(IL)-2、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平均与精子活力呈负相关^[7-10]。本研究运用蛋白质芯片技术检测发现少弱精子症患者精浆中 PIGF 含量减少,因此进一步验证其与精子浓度、活力和患者年龄的相关性,以期少弱精子症及无精子症患者的临床诊断和治疗提供参考。

PIGF 是一种分泌型同型二聚体糖蛋白,属于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族。PIGF 最初在人类胎盘中被发现,且在体内分布广泛^[11],是多效的细胞因子,具有刺激血管形成和刺激内皮细胞生长、迁移等功能,同时其还可以促进白细胞浸润、肿瘤生长、基质细胞迁移、缺血组织血管再通等^[12],其作用机制主要是和 VEGF 特异性受体结合后被磷酸化,然后通过酪氨酸蛋白激酶激活途径将信号传入细胞质进而发挥效应^[13]。PIGF 表达水平降低后可导致胎盘功能不全,从而影响正常妊娠过程,因此已被用于评估胎盘功能,以及预测和监测胎盘功能不全引起的子痫

前期^[14]。

本研究发现,精液正常组患者精浆中 PIGF 的含量高于少弱精子症组和无精子症组,且在精子发生过程中,精浆中 PIGF 含量与精子浓度呈中度相关,与精子活力(A 级和 B 级)呈弱相关,表明 PIGF 可能通过促进精子发生的数量,即影响精浆中的精子浓度来影响精子质量,但其机制是否也与 VEGF 特异性受体相关仍需进一步证实。

[参考文献]

- [1] NYBOE ANDERSEN A, CARLSEN E, LOFT A. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14: 593-604.
- [2] SKAKKEBAEK N E, RAJPERT-DE MEYTS E, BUCK LOUIS G M, TOPPARI J, ANDERSSON A M, EISENBERG M L, et al. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility [J]. Physiol Rev, 2016, 96: 55-97.
- [3] PIZZOL D, BERTOLDO A, FORESTA C. Male infertility: biomolecular aspects[J]. Biomol Concepts, 2014, 5: 449-456.
- [4] GASKINS A J, MENDIOLA J, AFEICHE M, JORGENSEN N, SWAN S H, CHAVARRO J E. Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men[J]. Br J Sports Med, 2015, 49: 265-270.
- [5] MARTINETS P, PROVERBIO F, CAMEJO M I. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines[J]. Asian J Androl, 2007, 9: 102-107.
- [6] OLIVEIRA P F, ALVES M G, RATO L, LAURENTINO S, SILVA J, SÁ R, et al. Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of *in vitro* cultured human Sertoli cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820: 84-89.
- [7] HEDGER M P, MEINHARDT A. Cytokines and the immune-testicular axis[J]. J Reprod Immunol, 2003, 58: 1-26.
- [8] LAFLAMME J, AKOUM A, LECLERC P. Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6 [J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11: 141-150.
- [9] FURUYA Y, AKASHI T, FUSE H. Soluble Fas and interleukin-6 and interleukin-8 levels in seminal plasma of infertile men[J]. Arch Androl, 2003, 49: 449-452.
- [10] LI M W, XIA W, MRUK D D, WANG C Q, YAN H H, SIU M K, et al. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes[J]. J Endocrinol, 2006, 190: 313-329.
- [11] IYER S, LEONIDAS D D, SWAMINATHAN G J, MAGLIONE D, BATTISTI M, TUCCI M, et al. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 12153-12161.
- [12] YANG W, AHN H, HINRICHS M, TORRY R J, TORRY D S. Evidence of a novel isoform of placental growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells [J]. J Reprod Immunol, 2003, 60: 53-60.
- [13] DE FALCO S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity[J]. Exp Mol Med, 2012, 44: 1-9.
- [14] FISCHER C, JONCKX B, MAZZONE M, ZACCHIGNA S, LORGES S, PATTARINI L, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF (R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels[J]. Cell, 2007, 131: 463-475.

[本文编辑] 杨亚红