动物学杂志 *Chinese Journal of Zoology* 2018, 53(5): 781 ~ 787

PRM 谱特征作为分子标签评估精子质量的研究

黄卫红

中国科学院遗传与发育生物学研究所分子发育生物学国家重点实验室 北京 100101

摘要：不孕不育症已成为严重的健康问题，全世界约有 15%的育龄夫妇患有这一疾病。辅助生殖技术（ART）和精准医疗是解决这一问题的关键，评估人类精子质量是其中的一个重要环节，但是现行世界卫生组织（WHO）标准诊断手册（第 5 版）具有不确定性。为了提高评估精子质量的精准性，在本研究中，基于精蛋白（PRM）谱特征和 PRM 值的评估人类精子质量的新方法，对临床上的病例进行了检测。分析结果表明，运用新方法的精子评估结果与临床结局相一致，优于 WHO 标准（第 5 版）的检测结果。这一前瞻性的研究工作对于 ART 和精准医疗有实际意义：能够在临床应用中提高其成功率和增强其安全性。

关键词：辅助生殖；精蛋白谱特征；男性不育；精子；精蛋白值

中图分类号：Q492 **文献标识码：**A **文章编号：**0250-3263（2018）05-781-07

The Study on Protamine Pattern as a Molecular Marker of Sperm Quality

HUANG Wei-Hong

State Key Laboratory of Molecular Developmental Biology, *Institute of Genetics and Developmental Biology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100101, *China*

Abstract: Infertility is a serious reproductive health problem affecting family well-being and harmonious development in our country; globally, around 15% of heterosexual couples are unable to conceive their children without assistance. Assisted reproductive technology (ART) and precision medicine are key to resolve this problem, in which evaluation of sperm quality is necessary and important. However, the world health organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen (fifth edition, 5th) just provides a rough analysis to evaluate human sperm, which brings inconsistency in clinic. How to precisely evaluate human sperm is an imminent and very challenging problem. In this study, a method in terms of protamine (PRM) pattern and value to evaluate human sperm was established. The primary result obtained by using of this new method is consistent with clinical outcome and better than that obtained by

基金项目 国家重大科学研究计划项目（No. 2012CB944900）；

第一作者介绍 黄卫红，男，副研究员；研究方向：发育生物学；E-mail: hwh1216@126.com。

收稿日期：2018-07-04，修回日期：2018-08-03 DOI: 10.13859/j.cjz.201805013

using WHO standard manual (5th). Thus, this study is valuable to ART and precision medicine, which can improve ART success rate and safety in clinic.

Key words: Assisted reproductive technology; Protamine (PRM) pattern; Male infertility; Sperm；Protamine (PRM) value

不孕不育症已成为困扰我国育龄人群的严重健康问题，影响家庭幸福与和谐发展。全世界约有 15%的育龄夫妇患有不孕不育症（Winters et al. 2014，Agarwal et al. 2015，Jiang et al. 2015，European IVF-Monitoring Consortium (EIM) et al. 2016a，b）。中国人口协会发布的调查结果显示，中国不孕不育患者数已超过 4 000 万人，占到了育龄人口的 12.5%。其中，由男性引起的因素约占到 40% ~ 50%，不育男性大约占到了男性总人数的 7%（中国人口协会 2009）。另外，耶路撒冷希伯来大学的科学家们从 1973 年至 2011 年共开展了 185 次调研，分析了来自北美洲、欧洲、澳大利亚和新西兰的 4.3 万名男性精子数据，发现男性精子数量在上述 40 年间减少了约 60%。主要研究人哈加伊•莱文称，这一结果为人类“敲响了警钟”。哈利街新医学集团创立者史蒂芬·赫梅利克说，如果按照现在的精子衰减速度，我们人类在约 50 年之内便会失去自然生育能力，得依靠辅助生殖技术（assisted reproductive technology，ART：指一系列围绕人类不孕不育的医学方法，包括试管婴儿、人工受精、诱导排卵、体外胚胎培养等技术）来繁衍后代（Levine et al. 2017，新浪科技 2018）。在如此严峻的形势下，关于精子的科学研究受到了更加密切的关注，基于 ART 的临床操作（简称为 ART 操作）的成功率和安全性的研究也急需进一步加强。这对于未来满足人类繁衍后代的基本生存需求，十分重要。

面对 ART 的普及和全球精液检测标准化的需求，世界卫生组织（the world health organization，WHO）制定了人类精液实验室操作手册，到目前为止共 5 个版本。现行的 WHO 标准（第 5 版，2010 年发布）诊断手册中，对精子质量的评估主要采用对精子的数量、活力、形态特征、生化指标等的分析，包括精液体积、精子总数、精子浓度、总活动率、前向活动率、存活率、精子形态学、pH、过氧化物酶阳性白细胞、MAR 测试（附着粒上的活动精子）、免疫珠测试、精浆锌、精浆果糖、精浆中性葡糖苷酶等（World Health Organization 2010）。然而，在临床上 WHO 标准（第 5 版）方法具有不确定性：不同医院、不同实验室的软硬件、检查方法、质控标准等也会有不同，因此判断精子是否正常，往往不能仅仅依据 WHO 第 5 版标准；同时，通过了 WHO 标准（第 5 版）方法筛选出的精子在体外受精时，其受精率呈现显著的差异；看上去形态正常而充满活力的精子也会致胚胎发育终止；或者被分级为不育的精子也能够生育子女（Aoki et al. 2006，Menkveld 2010，Chang et al. 2017，Zedan et al. 2018）。由于人类精子的高度异质性（heterogeneous），导致对精子质量的精准评估十分复杂和困难（Aoki et al. 2006，Chang et al. 2017）。同时，对男性精子质量的评估是生殖疾病诊断中十分重要的内容，而 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版（World Health Organization 2010）只是提供了检测指标的参考值，导致在临床上如何精准评估精子质量至今还没有统一的标准。随着辅助生殖技术在治疗不孕不育症中的普及和精准医疗的蓬勃发展，临床上对精准评估精子质量的要求十分迫切。由于传统检测指标的不确定性，导致目前在这一问题上还没有完全确定的解决方案。发现新的精准评估精子质量的检测靶位点，有助于 ART 操作和精准医疗中降低男性精子诊断误差、提高 ART 操作和精准医疗的成功率和安全性，是当前一个十分重要和具有高度挑战

性的问题。

精蛋白（protamine，PRM）是受精前精子染色质中与基因组 DNA 结合的主要蛋白，也是人类及其他许多物种精子中含量最丰富的核蛋白，在精子生成、受精和染色质重塑过程中具有独特而必须的功能（De Yebra et al. 1993）。在先前的研究中，通过 PRM 免疫荧光实验，发现 PRM 在精子上的分布具有一定的规律性（Aoki et al. 2006，Flores et al. 2008）。在本文中，将这一 PRM 在精子上的规律性分布，简称为 PRM 谱特征（或者称为 PRM 谱、P 谱）；同时，对 PRM 谱特征作为评估精子质量的分子标签的可行性进行了探索性研究。

1　材料与方法

1.1　实验材料

2012 年 1 月至 2017 年 2 月，来自北京人类精子库的志愿者捐助的精子，这些精子已经在北京人类精子库通过 WHO 标准（第 5 版）精子分级方法进行分级。送往生殖医院的可生育子女的精子为可育组；而粗筛中，基本无活性和正常形态精子的样本为不育组。志愿者的实际生育情况也明确记录。

1.2　实验方法

1.2.1　PRM 谱特征的检测　精子样品在 PBS 缓冲液（所有 PBS 均为 1 × PBS，137 mmol/L NaCl，10 mmol/L phosphate（磷酸盐），2.7 mmol/L KCl，pH 为 7.4）中清洗干净后，涂布于玻片上，自然干燥。用 2% Tx-100 溶液（2% Tx-100，100 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris，pH 8.0）进行去除细胞膜和用 0.1%地高辛结合 CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）对核膜进行穿孔和去除核膜。PBS 充分清洗后，加入 CF®568 荧光标记（CF®568 SE Protein Labeling Kit，Biotium，USA）的 PRM1 抗体[protamine 1 antibody (M-51)，OM211055，OmnimAbs，USA]或者 PRM2 抗体（protamine 2 antibody (M-107)，OM205296，OmnimAbs，USA），4 ℃过夜或者室温下孵育 60 ~ 90 min，再用 PBS + 0.1% Tween20 充分清洗。用防淬灭液覆盖，加上盖玻片，封片。但是，这两种抗体的信噪比较低，后期联系生物技术公司[经雅（北京）生物医学科技有限公司]定制了精蛋白 2（PRM2）的人源化抗体，实践中发现，其在人的 PRM 谱特征的检测中具有最高的信噪比。在荧光显微镜下，通过激发 CF®568，红色的荧光信号可见分布于精子的表面。可育精子上的红色信号为规律性的后端分布，呈现为环形，为典型的 PRM 谱特征；不育精子上的信号为不规则分布，无 PRM 谱特征。

1.2.2　激光共聚焦显微镜和超分辨显微镜的观察和分析　精子样品粘附在经 4%多聚赖氨酸预处理的盖玻片上，用预冷的 PBS 冲洗 3 次后，3% BSA + PBS 封闭 1 h；一抗孵育，于 4 ℃过夜；PBS 冲洗 3 次后，用防淬灭液覆盖，加上盖玻片，封片。激光共聚焦显微镜（Leica TCS SP8）和超分辨显微镜（OMX，GE）下观察记录。获得的图像进行重叠分析，通过将蓝色的核染色（DAPI 染色）信号图与红色的 PRM 免疫荧光信号图进行重叠，形成重合的图像（图 1）。本文中图 2 中出现的图像均是这两者的重合图像。

1.2.3　PRM 值分析　PRM 值（或者称为 P 值）为具有 PRM 谱特征的精子数与计数的总精子数的比值。PRM 值如果为零，表明样本为不育；反之，PRM 值大于零，表示样本为可育；PRM 值越大，则可育性越强。

2　结果

2.1　可育男性精子的 PRM 谱特征分析

针对 PRM 谱特征可能在不育男性和可育男性的精子上有不同的分布，我们首先对可育男性的精子进行了分析。从来自北京人类精子库的志愿者中挑选出了 3 位可育男性，其年龄接近，分别为 26、27 和 28 岁，并且已经生育儿女。将其冷冻保存的精子在 37 ℃的水浴槽中进行快速解冻后，立刻按照前面所叙的方法进行精子样本的制片和抗体孵育，清洗后封片，

PRM谱特征分析
The analysis of PRM patterns

	精子数 Sperm count	具有PRM谱特征的精子数 Sperm count with PRM pattern	PRM值 Protamine (PRM) value
样本1 Sample 1			
正常精子 Normal sperm	32	12	
畸形精子 Abnormal sperm	10	0	
合计 Total	42	12	0.286
样本2 Sample 2			
正常精子 Normal sperm	46	18	
畸形精子 Abnormal sperm	9	0	
合计 Total	55	18	0.327
样本3 Sample 3			
正常精子 Normal sperm	36	26	
畸形精子 Abnormal sperm	11	0	
合计 Total	47	26	0.553

图 1　在已育人群（已经育有儿女）的 3 个样本中检测到明显的 PRM 谱特征

Fig. 1　PRM patterns in three fertile males having daughters or sons

代表性 PRM 信号图。正常精子为细胞核形态接近 WHO 标准（第 5 版）中正常精子形态的精子；畸形精子为细胞核畸形的精子。蓝色为细胞核 DAPI 染色，红色为 PRM 信号（使用 PRM2 抗体来检测）。SIM 超微显微镜拍照的实验结果。

Representative PRM patterns. Normal sperm has a standard morphology in terms of the WHO standard (fifth edition); Abnormal sperm has a deformed cell nucleus; Blue signal comes from DAPI staining for nucleus and red signal comes from PRM antibody labelled by CF®568. Structured illumination microscopy (SIM) was used for observation.

PRM值分析
The analysis of protamine (PRM) value

样本 Sample	总精子数 Total of sperm	具有PRM谱特征的精子数 Sperm count with PRM pattern	PRM值 PRM value
1	24	0	0
2	34	0	0
3	31	0	0
4	36	0	0
5	28	0	0
6	52	1	0.019

图 2　在不育人群中的 6 个样本中基本检测不到 PRM 谱特征

Fig. 2　PRM patterns in six infertile males

代表性 PRM 信号图。正常精子为细胞核形态接近 WHO 标准（第 5 版）中正常精子形态的精子；畸形精子为细胞核畸形的精子。蓝色为细胞核 DAPI 染色，红色为 PRM 信号（使用 PRM2 抗体来检测）。SIM 超微显微镜拍照的实验结果。

Representative PRM patterns. Normal sperm has a standard morphology in terms of the WHO standard (5th); Abnormal sperm has a deformed cell nucleus; Blue signal comes from DAPI staining for nucleus and red signal comes from PRM antibody labelled by CF®568. Structured illumination microscopy (SIM) was used for observation.

对所有样本进行了普通荧光显微镜的筛选。挑选出染色较深，信噪比高的片子进行超微显微镜的分析。其结果见图 1，分析表明，可育男性的精子中具有明显的 PRM 谱特征，且 PRM 值均大于零，分别为 0.286、0.327 和 0.553。这一结果暗示：如果 PRM 值大于零，该样本应认为可育。

2.2　不育男性精子的 PRM 谱特征分析

由于针对可育男性精子的 PRM 谱特征的分析表明，PRM 谱特征在可育男性的精子上具

有规律性的分布，因此相应地对不育男性的精子进行了分析。同样的，从来自北京人类精子库的志愿者中挑选出 6 位潜在的不育男性，其年龄也接近，分别为 36、38、38、39、39 和 40 岁。精子的处理按照前面所叙述的方法进行，并将信噪比高的片子进行超微显微镜的分析。其结果见图 2，分析表明，这些志愿者的精子中基本不具有明显的 PRM 谱特征，且 PRM 值均接近为零，分别为 0、0、0、0、0 和 0.019。这一结果暗示：如果 PRM 值为零，该样本应认为不育。基于现行的精子诊断标准，第六位志愿者被判断为不育，但是按照本研究提出的新方法，其 PRM 值大于零，应该认定为可育。

2.3　基于 PRM 谱特征的精子分级与基于 WHO 标准（第 5 版）精子分级的对比

在基于 WHO 标准（第 5 版）分级方法，6 位志愿者被诊断为男性不育（图 2），但是，通过追踪调查，最终第六位志愿者（PRM 值为 0.019）生育后代。基于本研究提出的 PRM 谱分析，发现第六位志愿者的精子中含有一定量具有 PRM 谱的精子（PRM 值大于零），表明这位患者其实是可育的，且实际情况与基于 PRM 谱的判断结果相一致。其他 5 位志愿者的诊断结果与 WHO 标准（第 5 版）分级结果一致，也与实际情况一致。这一初步结果表明，基于 PRM 谱的精子分级可能优于现行的基于 WHO 标准（第 5 版）精子分级方法。

3　讨论

整体而言，围绕如何精准评估人类精子质量这一关键科学问题，在本研究中初步验证了 PRM 谱特征作为分子标签评估人类精子质量的可行性。临床上，WHO 标准（第 5 版）的精子分析是最主要的评估精子质量的方法。然而，在基础和临床研究中，也发现这一分析方法与实际的临床结局有很大的出入（Zhu et al. 2016，Sharma et al. 2017）。临床上常见的现象是，患者在拿到精液常规报告时，发现各种畸形的精子比例相加超过 100%，就会咨询医生，自己能否生育，医生则告诉患者，精子质量低于 WHO 标准的正常值并不等于不育，可以尝试生育。这种不确定性，不仅给患者和医生带来了时间和经济的损失，而且延误了患者的最佳治疗时间。因此，如何进一步提高 WHO 标准（第 5 版）诊断男性精子的精准性是一个迫切的科学问题。在本研究中，对临床上少量病例的分析结果表明，基于 PRM 谱特征的精子质量评估是精准的，优于现行的 WHO 标准（第 5 版）。

因此，对 PRM 谱的检测进行扩大样本、对比依据 WHO 标准（第 5 版）的检测结果和临床结局等进行深入的研究，可以为其普遍应用于临床检验提供依据，从而优化和补充现行的国际通用 WHO 标准（第 5 版）的精子质量分析标准或者独立地成为一个新的精子质量检测方法。

参　考　文　献

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, et al. 2015. A unique view on male infertility around the globe. Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E, 13(1): 37.

Aoki V W, Emery B R, Liu L, et al. 2006. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. Journal of Andrology, 27(6): 890–898.

Chang V, Heutte L, Petitjean C, et al. 2017. Automatic classification of human sperm head morphology. Computers in Biology and Medicine, 84: 205–216.

De Yebra L, Ballesca J L, Vanrell J A, et al. 1993. Complete selective absence of protamine P2 in humans. The Journal of Biological Chemistry, 268(14): 10553–10557.

European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Calhaz-Jorge C, de Geyter C, et al. 2016a. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. Human Reproduction, 31(8): 1638–1652.

European IVF-Monitoring Consortium (EIM), European Society of

Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Kupka M S, et al. 2016b. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. Human Reproduction, 31(2): 233–248.

Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell J M, et al. 2008. Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. Theriogenology, 69(9): 1083–1094.

Jiang W, Sun H, Zhang J, et al. 2015. Polymorphisms in Protamine 1 and Protamine 2 predict the risk of male infertility: a meta-analysis. Scientific Reports, 5: 15300.

Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, et al. 2017. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. Human Reproduction Update, 23(6): 646–659.

Menkveld R. 2010. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Asian Journal of Andrology, 12(1): 47–58.

Sharma R, Esteves S, Harlev A, et al. 2017. The effect of BMI on semen quality with an assessment of the new 2010 WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen-a meta-analysis. Human Reproduction, 32: 144–144.

Winters B R, Walsh T J. 2014. The epidemiology of male infertility. The Urologic Clinics of North America, 41(1): 195–204.

World Health Organization. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization.

Zedan H, Ismail S, Gomaa A, et al. 2018. Evaluation of reference values of standard semen parameters in fertile Egyptian men. Andrologia, 50: e12942.

Zhu Q X, Gao E S, Pathak N, et al. 2016. Single or double semen samples: the dilemma in epidemiological studies on semen quality. Human reproduction, 31(3): 511–517.

新浪科技. 2018. 人类正面临“精子末日”或将在 50 年内失去生育能力. [N/OL] [2018-06-20]. http://tech.sina.com.cn/d/f/2018-02-06/doc-ifyrhcqy9949103.shtml.

中国人口协会. 2009. 中国人口不孕不育现状调研报告. [N/OL] [2009-10-16]. http://news.sina.com.cn/h/2009-10-16/100918843500.shtml.