

人精子线粒体基因突变与弱精症的相关性研究

黄文波^{1*} 范舒舒^{1,2} 马占忠² 汪成¹ 李文丽¹ 张思¹

(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院 生殖医学中心, 广东 韶关 512026; 2. 汕头大学医学院附属粤北人民医院 检验科、产前诊断中心, 广东 韶关 512026)

【摘要】 目的 探讨精子线粒体 DNA 突变与弱精症的相关性, 为弱精症的临床诊疗提供科学依据。**方法** 采用高通量基因测序技术对 46 例弱精症患者和 40 例健康男性进行精子线粒体基因组测序, 测序结果与剑桥版线粒体基因组数据库(rCRS NC_012920)比对, 分析其突变情况。**结果** 研究组检出 5 例线粒体 DNA 突变, 包括 TP 基因(m. 15995G>A)突变 2 例, ND4 基因(m. 11981C>T)、CYB 基因(m. 15002G>A)和 TF 基因(m. 586G>A)突变各 1 例。其中 ND4 基因(m. 11981C>T)和 CYB 基因(m. 15002G>A)2 个变异位点国内外尚未见报道。对照组检出 TF 基因(m. 586G>A)突变 1 例。两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 精子线粒体 ND4 基因(m. 11981C>T)、CYB 基因(m. 15002G>A)、TP 基因(m. 15995G>A)和 TF 基因(m. 586G>A)突变与弱精子症无相关性, 但仍需要进一步的研究。

【关键词】 弱精症; 线粒体 DNA; 突变

【中图分类号】 R394.3 **【文献标识码】** A

Study on the relationship between human sperm mitochondrial gene mutation and asthenospermia

Huang Wenbo^{1*}, Fan Shushu^{1,2}, Ma Zhanzhong², Wang Cheng¹, Li Wenli¹, Zhang Si¹

1. Reproductive Medicine Center, Yuebei People's Hospital Affiliated to Shantou University Medical College, Shaoguan 512026, China; 2. Clinical Laboratory, Prenatal Diagnosis Center, Yuebei People's Hospital Affiliated to Shantou University Medical College, Shaoguan 512026, China

* Corresponding author: Huang Wenbo, E-mail: hbobo3456@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationships between sperm mitochondrial DNA mutations and asthenospermia, hoping to provide a scientific basis for the clinical diagnosis and treatment of asthenospermia. **Methods** Sperm mitochondrial genome sequencing was performed on 46 cases of asthenospermia patients and 40 healthy men using high-throughput gene sequencing technology. Mitochondrial DNA variants were yielded by comparing sequencing results of the complete mitochondrial genome with the Cambridge sequence (rCRS) GenBank number NC_012920. **Results** The experimental group detected 5 cases of mutations, including 2 cases of TP gene (m. 15995G>A) mutation, ND4 gene (m. 11981C>T), CYB gene (m. 15002G>A) and TF gene (m. 15995G>A). 586G>A mutations in 1 case each. Among them, two mutation sites in ND4 gene (m. 11981C>T) and CYB gene (m. 15002G>A) have not been reported in local and overseas. One case of mutation in TF gene (m. 586G>A) was detected in the control group. There was no significant difference between the two groups ($P>0.05$).

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.02.007

基金项目: 韶关市科技计划项目(200812114531622); 韶关市卫生健康科研项目(Y20196)

* 通信作者: 黄文波, E-mail: hbobo3456@163.com

Conclusions Mutations in the mitochondrial ND4 gene (m. 11981C>T), CYB gene (m. 15002G>A), TP gene (m. 15995G>A) and TF gene (m. 586G>A) are not associated with asthenospermia, However, future research in this area is needed.

【Key words】 Asthenospermia; Mitochondrial DNA; Mutation

不孕不育严重影响人类的生殖健康和家庭、社会的稳定,成为全球关注的问题。据统计,大约20%的育龄夫妇患有生育障碍,其中男方因素占50%,而弱精症是影响男性生育力的常见病因^[1]。精子活力是衡量精液质量和男性生育力的重要指标。根据WHO诊断标准,将精子活力分为3个等级:PR为前向运动精子,NP为非前向运动精子,IM为静止精子。若 $PR+NP<40\%$ 或 $PR<32\%$ 诊断为弱精症^[2]。从分子水平分析,精子活力与线粒体有关,因为线粒体作为细胞的“能量工厂”,通过氧化磷酸化产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),为精子的生成、分化和运动提供能量,一旦精子线粒体基因突变就有可能使精子活力下降,导致男性不育^[3]。本研究采用高通量基因测序技术对弱精症患者的精子进行线粒体基因组测序,探讨线粒体基因突变与弱精症的相关性,为弱精症的基因诊断和选择辅助生殖方式提供新的途径和方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2019年3月至2020年10月在粤北人民医院生殖医学中心就诊的46例弱精症患者和精液常规正常的健康男性40例。弱精症患者排除性腺功能低下、睾丸炎史、输精管梗阻、精索静脉曲张后,根据WHO关于弱精症的诊断标准,经CASA软件分析, $PR+NP<40\%$ 或 $PR<32\%$ 的弱精症患者为研究组,平均年龄(33.07 ± 6.14)岁;精液参数正常的40名健康男性为对照组,平均年龄(32.33 ± 6.00)岁。两组年龄差异无统计学意义。本试验经本院伦理委员会讨论通过,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 仪器 CFT-9201 CASA精子分析系统(江苏瑞祺生命科学仪器有限公司)、德国IMPLEN N50 Touch超微量分光光度仪、GeneTouch TC-EA

基因扩增仪、BIORAD CFX96 荧光定量PCR仪、Nextseq 500 测序仪(Illumina)、DYY-8C电泳仪(北京六一仪器厂)和Q800R超声破碎仪(Qsonica)等。

1.2.2 样本采集 受检者禁欲3~7d,通过手淫法采集精液样本不少于1.5ml,用无菌杯收集,送检过程保持容器温度 $20^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ 。样本 37°C 水浴60min内液化后进行检测。

1.2.3 提取精子线粒体DNA 将液化后的精液缓慢加入45%和90%的SpermGrad(vitilife公司)梯度分离液中,300g离心20min;弃上清,精子沉淀用3ml SpermRinse洗涤,300g离心5min,弃上清液;将精子沉淀物用德国QIAamp DNA Mini Kit试剂提取精子线粒体DNA;用德国IMPLEN N50 Touch超微量分光光度仪测定DNA浓度。

1.2.4 构建文库、高通量基因测序 将提取的线粒体DNA经过长片段扩增后得到16.6kb PCR产物;用Q800R超声破碎仪进行打断,电泳质检峰值在350bp左右;然后进行末端修复,3'端加A,两端加上特定序列的接头,不同样本连接不同序列的barcode;经PCR扩增构建文库,Qubit 3.0测定文库的浓度,琼脂糖凝胶电泳测定文库的大小,荧光定量PCR测定文库的质量。质检通过后文库稀释至上机测序浓度,使用Illumina Nextseq 500测序仪进行测序分析,测序平均覆盖深度 $5000\times$ 以上。

1.2.5 测序结果分析 测序结果经生物信息学方法进行数据分析。高通量测序原始数据注释范围为:线粒体基因组每个变异以及变异的突变比例。变异类型包括错义、无义、同义、移码、倒位、单重缺失、多重缺失等。检索HmtDB、mitomap等人群数据库,标注单核苷酸多态性和低频良性变异。应用HmtVar等软件对变异的保守性/致病性进行预测。检索mitomap、pubmed等数据库,检索变异相关文献,分析文献内容。参考美国医学遗传学和基因组学会(American College of Medical Genetics and

Genomics, ACMG)分类指南以及《Interpretation of mitochondrial tRNA variants》文献,对变异进行分类。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,符合正态分布且方差齐的计量资料($\bar{x} \pm s$)采用 t 检验,计数资料(%)采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

研究组共检出 5 例线粒体 DNA 突变,包括 *TP* 基因(m. 15995G>A)突变 2 例,*ND4* 基因(m. 11981C>T)、*CYB* 基因(m. 15002G>A)和 *TF* 基因(m. 586G>A)突变各 1 例。对照组检出 *TF* 基因(m. 586G>A)突变 1 例。两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 研究组和对照组中线粒体 DNA 变异位点比较

基因名称	HG19 位置	核苷酸改变	合子状态(%)	氨基酸改变	研究组($n=46$)		对照组($n=40$)		P
					阳性	频率(%)	阳性	频率(%)	
<i>ND4</i>	11981	C>T	99.4	p. L408F	1	2.17	0	0	0.348
<i>TF</i>	586	G>A	3.3	Syn	1	2.17	1	2.5	0.920
<i>TP</i>	15995	G>A	2.9	Syn	2	4.35	0	0	0.182
<i>CYB</i>	15002	G>A	7.3	P. G86S	1	2.17	0	0	0.348

3 讨论

人类线粒体 DNA 突变已被证实与多种疾病密切相关。线粒体的遗传物质改变将直接影响线粒体参与氧化磷酸化的功能。近些年,有学者对男性弱精症与线粒体 DNA 变异的相关性进行研究, Holyoake 等^[4]发现严重少弱精患者中存在线粒体 *ATPase 6* 基因 T8821A 位点变异。弱精症的病因复杂,包括染色体异常、线粒体基因突变、微生物感染和内分泌紊乱等因素^[5]。精子的运动主要依靠尾部鞭毛的摆动,位于尾部中段的线粒体产生 ATP 为精子运动提供能量^[6]。人类线粒体 DNA 具有排列紧密、复制速度快、缺少组蛋白保护及有效修复机制的特点,因此,线粒体基因变异率约为核基因变异率的 20 倍^[7]。受精过程中精子只有获得足够的能量才能到达输卵管受精,线粒体 DNA 上基因突变会使 ATP 生成减少,男性精子活力减弱,从而导致受精失败。

本研究中发现 *ND4* 基因(m. 11981C>T)和 *CYB* 基因(m. 15002G>A)两个变异类型在 HmtDB、mitomap、pubmed 和中国知网等数据库均未见报道。其中线粒体基因组 *ND4* 基因 11981 位点 C>T 突变,密码子由亮氨酸变为苯丙氨酸;*CYB* 基因 15002 位点 G>A 突变,密码子由甘氨酸变为丝氨酸。对氨基酸的变化进行了进化保守性和计算

机辅助的预测,但不能基于这些算法来决定或预测临床的相关性。我们发现的两处罕见变异均导致了氨基酸的改变,有可能使翻译出蛋白质的空间结构及其功能发生损害,使精子的受精能力受损,虽然线粒体基因组数据库(<http://www.mitomap.org>)里已收录了线粒体基因多态性和突变位点与疾病相关性的报道,但与弱精症的报道较少,因此,我们现在仍无足够数据确定这些变异与临床表现是否相关。

此外,线粒体 *TF* 基因 586 位点 G>A 突变,突变负荷为 3.3%。*TP* 基因 15995 位点 G>A 突变,突变负荷为 2.9%。以上两个变异均为同义突变。线粒体基因变异只有少数会引起编码氨基酸的改变,进而影响蛋白质的结构和功能,更为常见的是同义突变^[8]。虽然同义突变不改变氨基酸的序列,但并不表示同义突变是完全“沉默”的,它有可能会影响 mRNA 的结构及稳定性,进一步影响到蛋白质的翻译过程^[9]。同义突变可能会通过改变基因的密码子使用偏性、翻译效率、mRNA 二级结构的稳定性等,调节翻译效率,改变质子通道的数量,从而影响精子发生、精子形成及精子的受精能力。而且,转录过程中,转录相关蛋白相结合时,基因突变可能会引起相关蛋白的结合能力或效率降低^[10]。

目前,我们对碱基改变的解读认识有限,随着深入研究,我们会获得更多关于这些基因的信息,解读更精准。另外,高通量测序覆盖深度在 5000×左

右,检测突变负荷的敏感度大于 2%,还有低突变负荷和大片段的缺失重复可能存在漏检的风险。加上本研究收集的病例数较少,尚不能明确线粒体 DNA 突变和弱精症的相关性,仍需要更多样本进行进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 李维娜,朱文兵,唐章明,等. 16835 例中国不育男性的精液质量分析[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(2):157-160.
- [2] 张国晖,梁高照. 弱精子症分子遗传学的研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2019, 24(12): 1054-1058.
- [3] 王巧刚,陈黎亚,盛礼建. 精子线粒体与男性不育的相关性研究进展[J]. 中国现代医生, 2017, 55(04):160-163.
- [4] HOLYOAKE AJ, SIN IL, BENNY PS, et al. Association of a novel human mtDNA ATPase 6 mutation with immature sperm cells[J]. Andrologia, 1999, 31(6):339-345.
- [5] 姜梦琦,黄金花,梁梦晨,等. 弱精子症发病机制的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2018, 37(6):498-503.
- [6] FABIANA F, TANIA CARLINI, GIULIA COLTRINARI, et al. Human sperm motility: a molecular study of mitochondrial DNA, mitochondrial transcription factor A gene and DNA fragmentation [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(4):4113-4121.
- [7] INOUE T, YONEZAWA Y, SUGIMOTO H, et al. Percentage of motile spermatozoa at 22 hours after swim-up procedure: An indicator for intracytoplasmic sperm injection? [J]. Clin Exp Reprod Med, 2016, 43(3):157-163.
- [8] MAILLOUX RJ, JIN X, WILLMORE WG. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions [J]. Redox Biol, 2014, 2:123-139.
- [9] 韦文青. 影响转录后调控的体细胞同义突变在癌症发生中的作用[D]. 北京:中国科学院大学, 2019.
- [10] ZHANG S C, XU L, YU M Y, et al. Hypomethylation of the DAZ3 promoter in idiopathic asthenospermia: a screening tool for liquid biopsy [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1):17996.

(收稿日期:2021-01-05)

编辑:宋文颖