

WNT7A 基因 rs139790545 多态性与汉族非梗阻性无精症的关系研究

傅文婷 张欣宗 钟兴明 赵文忠 李铭臻*

(广东省计划生育科学技术研究所、国家卫生健康委员会、男性生殖与遗传重点实验室, 广东 广州 510600)

【摘要】 目的 探讨汉族人群 WNT7A 基因 SNP rs139790545 多态性及其与非梗阻性无精症的关系。**方法** 选择 47 例汉族非梗阻性无精症患者作为非梗阻性无精症组, 同期选择 25 例健康志愿者作为对照组, 采集静脉血, 氯酚仿抽提法提取 DNA, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 WNT7A 基因 SNP rs139790545 位点的基因型和等位基因频率, 分析 SNP rs139790545 位点的多态性及其与汉族非梗阻性无精症的关系。**结果** 健康志愿者 rs139790545 位点基因型和等位基因的观察值和期望值吻合良好, 符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P > 0.05$)。非梗阻性无精症患者 AA 基因型及 A 等位基因频率高于健康志愿者, rs139790545 AA 基因型可能增加汉族男性非梗阻性无精症的风险($OR = 2.842, 95\% CI = 1.776-3.988, P < 0.05$)。**结论** 汉族男性 WNT7A 基因 rs139790545 多态性可能与非梗阻性无精症发病有关, 携带 AA 基因型增加汉族男性患非梗阻性无精症的风险。

【关键词】 WNT7A 基因; 单核苷酸多态性; 非梗阻性无精症; 汉族

【中图分类号】 R394.3 **【文献标识码】** A

Association between WNT7A gene rs139790545 polymorphism and non obstructive azoospermia in Han nationality

Fu Wenting, Zhang Xinzong, Zhong Xingming, Zhao Wenzhong, Li Mingzhen

NHC Key Laboratory of Male Reproduction and Genetics, Family Planning Research Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510600, China.

* Corresponding author; Li Mingzhen, E-mail: bzh777@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the SNP rs139790545 polymorphism in WNT7A gene and its relationship with non obstructive azoospermia in Han population. **Methods** 47 cases of Han patients with non obstructive azoospermia were selected as non obstructive azoospermia group and 25 healthy volunteers were selected as control group. Venous blood samples were collected and DNA was extracted by chlorophenol form extraction. Genotype and allele frequency at SPNrs139790545 in WNT7A gene were detected by real-time quantitative PCR, polymorphism of SNP rs139790545 and its relationship with non obstructive azoospermia in Han nationality were analyzed. **Results** Observed values at rs139790545 genotype had good agreement with expected values, and according to hardy Weinberg equilibrium law ($P > 0.05$). Frequencies of AA genotype and A allele were higher in non obstructive azoospermia patients than in Healthy volunteers. rs139790545 AA genotype may increase risk of non obstructive azoospermia in Han men ($or = 2.842, 95\% CI = 1.776-3.988, P < 0.05$). **Conclusion** Rs139790545 polymorphism in

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2020.04.004

基金项目: 广东省计划生育科学技术研究所科研基金(S2018005)

* 通信作者: 李铭臻, E-mail: bzh777@163.com

WNT7A gene may be associated with the development of non obstructive azoospermia in Han men. AA genotype may increase the risk of non obstructive azoospermia in Han men.

【Key words】 WNT7A gene; Single nucleotide polymorphism; Non obstructive azoospermia; Han nationality

非梗阻性无精症是男性不孕不育的常见原因,目前其确切的原因尚不完全明确。近年来的研究显示,与精子形成、成熟有关的信号通路的功能异常或酶系的表达异常与非梗阻性无精症的发病有关^[1,2]。Wnt 信号通路是一种高度保守的信号通路,在人体发育及维持成人组织稳态中起到非常重要的作用,也是维持睾丸正常功能和精子成熟的重要信号通路^[3,4]。WNT7A 基因定位于 3 号染色体短臂 2 区 5 带,在睾丸组织中具有高表达,其可能参与睾丸正常的生理功能。rs139790545 是 WNT7A 的一个多态性位点,在目前的研究中尚位见到其与男性非梗阻性无精症相关联的研究报道,为进一步明确其在非梗阻性无精症发病中的作用,本文就 rs139790545 多态性与汉族男性非梗阻性无精症患者的发病的相关性进行研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择广东省计划生育科学技术研究所 47 例汉族非梗阻性无精症患者,患者年龄 24~42(32.5±4.2)岁,入选标准:①患者诊断标准符合男性非梗阻性无精症的诊断标准;②患者自愿纳入研究。排除标准:泌尿生殖道感染性疾病、输精管堵塞、精索静脉曲张等。选择同期健康志愿者 25 例作为对照组,年龄 27~43(33.1±4.1)岁,入选标准:①有正常生育史;②无家族性遗传性疾病;③无生殖系统肿瘤或其他疾病。2 组年龄无显著差异,研究内容经研究所医学伦理委员会批准,符合医学伦理学要求。

1.2 主要试剂及仪器 TaqMan Genotyping Master Mix, SNPrs139790545G/A 位点探针试剂盒,实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司),分光光度计(美国梅特勒-托利多集团公司)。

1.3 基因组 DNA 提取及定量 非梗阻性无精症患者及健康志愿者入选后,提取外周血 DNA(酚/氯

仿抽提法),分别采集静脉血 2ml,EDTA 抗凝,双蒸水裂解红细胞,1700r/min 离心,沉淀加入 DNA 裂解液重悬,加入蛋白酶温育 30min,苯酚/氯仿/戊乙醇抽提,反复洗涤,去离子水重悬至 20 μ L,分光光度计测量 DNA 的浓度及纯度。

1.4 WNT7A 基因 SNP rs139790545 位点基因分型 样本采用人基因组 rs139790545 (C/A)多态性位点 TaqMan 探针分型试剂盒对多态性位点的基因型进行检测,ABI Stepone Plus RT PCR 仪进行 PCR 扩增,反应体积 10 μ l(DNA 模板 1.5 μ l,40 (TaqMan SNP Genotyping AssayMix 0.25 μ l,2 (TaqMan GenotypingMaster Mix5 μ l, DDH₂O 3.25 μ l),热变性温度 95 $^{\circ}$ C,时间 10min,92 $^{\circ}$ C,时间 15s,退火温度 60 $^{\circ}$ C,时间 1min,反应 30 个循环。StepOneSoftware v2.2 软件分析荧光信号,通过散点图分析基因型。

1.5 统计学方法 数据分析采用 SPSS22.0 统计学软件,基因型及等位基因频率为计数资料,比较采用 χ^2 检验,计算 OR 值及 95%CI,HWE 软件进行 Hardy-Wenber 平衡检验, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 WNT7A 基因 rs139790545 位点等位基因及基因型 对照组 25 名志愿者基因型分布符合 Hardy-Wein-berg 平衡($P=1.0$)。非梗阻性无精症患者与健康志愿者之间 rs139790545 位点等位基因及基因型分布存在显著差异($P<0.05$),非梗阻性无精症患者 A 等位基因及 AA 基因型的发生频率高于健康志愿组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 WNT7A 基因 rs139790545 位点基因型与非梗阻性无精症的患病风险 WNT7A 基因 rs139790545 位点基因型分析结果显示,基因型 AA

增加非梗阻性无精症的患病风险($OR=2.842, 95\% CI=1.776-3.988$), GG、GA 基因型不增加非梗阻性无精症的患病风险($P>0.05$), 见表 2。

表 1 梗阻性无精症患者和健康志愿者 rs139790545 位点等位基因及基因型分布

rs139790545	非梗阻性无精症 (n=47)	健康志愿者 (n=25)	χ^2	P
基因型				
GG	17	15	7.347	0.025
GA	14	8		
AA	16	2		
等位基因				
G	48	38	8.437	0.004
A	46	12		

表 2 WNT7A 基因 rs139790545 位点基因型与非梗阻性无精症的患病风险

rs139790545	非梗阻性无精症	健康志愿者	OR	95%CI	P
基因型					
GG	17	15	1		
GA	14	8	0.862	0.612-1.112	0.174
AA	16	2	2.842	1.776-3.908	0.004

3 讨论

非梗阻性无精症是男性不育的原因之一,其根本原因是精子的形成或成熟障碍。在精子的形成和成熟过程中,有超过 2000 个基因参与,其中部分基因的多态性与精子的形成和成熟有关,其中任何基因发生突变,均可能导致精子的成熟障碍,最终导致男性不育症的发生。WNT 基因家族是高度保守的序列,在不同物种上保持高度的同源性,主要通过和膜蛋白受体结合调控下游信号通路的活性,进而将细胞外信号传导到细胞内。其信号传递通过多种经典的信号通路完成,如 WNT/ β -catenin 信号通、平面细胞极性通路、WNT/Ca⁺ 通路、PLC 通路和 PKC 通路等,参与肿瘤细胞的增殖,精原细胞的分化及成熟等过程^[5-7]。

近年来的研究显示,WNT7A 基因在动物的性成熟、精子的形成以及胚胎发育中具有重要的作用。有研究显示^[8],多氯联苯能通过抑制女性生殖道中的 WNT7A 信号通路发挥雌激素效应,调节生殖道的发育,其中 WNT7A 信号通路的活性发挥着关键的作用。而且在精原细胞分化程度的过程中,也有

WNT/ β 信号传导通路的调控作用^[7]。在非梗阻性无精症的发病过程中,相关基因的多态性发挥着重要的作用,孙亚丽等人研究显示^[9],HLA-A 抗原基因多态性与非梗阻性无精症的发病有关,其中携带 HLA.26 比 01 型基因增加发病的风险。王婵娟等^[10]认为 SRPA-IRPG 基因 rs6080550 位点的多态性与发病有关,其中携带 TT 基因型的男性非梗阻性无精症的发病风险明显升高。也提示基因多态性在梗阻性无精症发病中的重要作用。研究显示^[11],在非梗阻性无精症患者中,睾丸 WNT/ β -Catenin 信号通路异常,在非梗阻性无精子症男性间质细胞 β -Catenin 异常聚集,其可能与精子成熟障碍有关。另外一项研究显示,DKK3 能够通过影响 WNT/ β -CATENIN 信号通路的活性对精元细胞的发生过程进行调控。也说明 WNT 信号传导通路可能在非梗阻性无精症的发病中具有重要的作用。其中存在着对精子发生及成熟过程的基因位点,其对精子发生、成熟过程的调控,可能有基因多态性因素的参与。

rs139790545 定位于 WNT7A 基因,通过研究发现,其第二外显子上存在基因多态性位点,通过基因分型发现,在梗阻性无精症患者和健康志愿者之间,其 AA 基因型表达频率存在明显差异,进一步的分析发现,WNT7A 基因 rs139790545 位点的基因多态性与非梗阻性无精症存在关联,rs139790545 位点携带 AA 基因型增加非梗阻性无精症的风险。

综上所述,WNT7A 基因 rs139790545 位点多态性与非梗阻性无精症有关,AA 基因型增加非梗阻性无精症的风险,其位点的基因多态性及基因突变可能是非梗阻性无精症的原因之一,由于结果仅为小样本研究,尚存在一定的局限性,尚需要在后续的研究中增加样本量,进一步证实研究结果的可靠性。

参 考 文 献

- [1] PARNAZ BB, MARJAN S, MEHDI T, et al. Expression analysis of genes encoding TEX11, TEX12, TEX14 and TEX15 in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia[J]. JBRA, 2018, 22(3):185-192.

- [2] ZEEBA K, SARA P, MONA AB, et al. HIWI2 rs508485 Polymorphism Is Associated with Non-obstructive Azoospermia in Iranian Patients[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2017,5(2): 108-111.
- [3] CHENG I N, TANG J X, Li J, et al. Role of WNT signaling in epididymal sperm maturation[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(2): 229-236.
- [4] TANWAR PS, ZHANG L, TANAKA Y, et al. Focal Mullerian duct retention in male mice with constitutively activated beta-catenin expression in the Mullerian duct mesenchyme[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(37): 16142-16147.
- [5] MARYAM K. MOHAMMED, SHAO C, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance[J]. Genes Dis, 2016, 3(1): 11-40.
- [6] LI FANG NG, PRAMEET K, NAWAT B, et al. WNT Signaling in Disease[J]. Cells, 2019, 8(8): 826.
- [7] TAKASE HM, NUSSE R. Paracrine Wnt/ β -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(11): E1489-E1497.
- [8] MA R, SASSOON DA. PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(6): 898-904.
- [9] 孙亚丽,雷建园,吕莱琦,等. HLA-A 基因多态性与陕西地区回族非梗阻性无精症的相关性研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2018,23(9):659-662.
- [10] 王婵娟,何燕,张婷,等. 贵州地区非阻塞性无精症与 SIRPA—SIRPG 基因 rs6080550 多态性的相关性[J]. 贵州医科大学学报,2019,44(2):169-172.
- [11] MAREFAT GN, REZA M, HAMID N. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling pathway in testis of azoospermic men? [J]. Adv Pharm Bull, 2015,5(3): 373-377.
- [12] DEEPIKA SD, NEERJA W, NEETU K, et al. Dickkopf homolog 3 (DKK3) plays a crucial role upstream of WNT/ β -CATENIN signaling for Sertoli cell mediated regulation of spermatogenesis [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63603.

(收稿日期:2020-10-28)

编辑:宋文颖