

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.13.009

文章编号: 1005-8982(2016)13-0048-04

论著

人鱼精蛋白 1 多态性与汉族男性生育力的相关性分析*

李俊, 刘芳, 宋亚曼, 谭宇哲, 杨雪梅, 冯艳萍

(河北医科大学第一医院 生殖医学科, 河北 石家庄 050031)

摘要:目的 研究人类鱼精蛋白 1(*PRM1*)C321A 多态性与汉族男性生育力的相关性。**方法** 选取 174 例原发不育男性患者为观察组,172 例生育男性为对照组,分别分析两组常规精液参数,采用限制性酶切及 DNA 测序技术对 *PRM1* C321A 位点进行基因分型。**结果** 不育患者 *PRM1* C321A 位点 AA 基因型频率(8.05%)显著高于生育男性(2.33%)($P < 0.01$),分析显示 AA 基因型与男性不育的遗传易感性明显相关[OR=4.24(95%CI: 1.33, 13.51)]。AA 基因型可使精子前向运动能力及正常形态比例等参数明显下降,可能是其导致男性不育的主要因素。**结论** *PRM1* C321A 多态性改变与汉族男性生育力相关。

关键词: 人鱼精蛋白 1;单核苷酸多态性;男性不育;遗传易感性

中图分类号: R698.2

文献标识码: A

Association of *PRM1* gene polymorphism with male infertility in Chinese Han population*

Jun Li, Fang Liu, Ya-man Song, Yu-zhe Tan, Xue-mei Yang, Yan-ping Feng

(Department of Reproductive Medicine, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

Abstract: Objective To determine the association of single nucleotide polymorphism (SNP) locus C321A in human protamine 1 (*PRM1*) with male infertility in Chinese Han population. **Methods** A total of 174 infertile men were recruited as the observation group and 172 fertile men were recruited as the control group. Routine semen analysis was performed. Restricted enzyme digestion and DNA direct sequencing of C321A in *PRM1* gene of the infertile and fertile men were conducted to identify the genotype of C321A SNP locus. **Results** The frequency of AA genotype of *PRM1* C321A was significantly different between the infertile men (8.05%) and the fertile men (2.33%, $P < 0.01$) and it was associated with increased risk of male infertility (OR = 4.24; 95% CI: 1.33, 13.51). Moreover, it was discovered that sperm progressive motility as well as normal morphology rate of AA genotype were dramatically decreased compared with that of CC genotype ($P < 0.05$), which would probably lead to infertility. **Conclusions** *PRM1* C321A polymorphism is associated with male infertility as well as routine semen characteristics in Chinese Han population.

Keywords: *PRM1*; single nucleotide polymorphism; male infertility; genetic susceptibility

在精子发生的圆形精子细胞期组蛋白被过渡蛋白替换,在随后的长形精子细胞期鱼精蛋白取代过渡蛋白与精子 DNA 紧密结合。人鱼精蛋白 1(Protamine 1, *PRM1*)、人鱼精蛋白 2(Protamine 2, *PRM2*)

分别由位于 16p13.3 的 *PRM1*、*PRM2* 基因编码,鱼精蛋白在精子 DNA 凝聚及包装中发挥重要作用,是主要的 DNA 结合蛋白^[1]。研究发现,小鼠敲除鱼精蛋白基因可导致鱼精蛋白表达量减少、精子 DNA 损伤

收稿日期:2015-12-01

* 基金项目:河北省人口和计划生育委员会基金(No:2013-A08)

[通信作者] 杨雪梅, E-mail: meicherrymissyou@163.com

及功能下降。基因敲除小鼠虽可产生精子,但精子形态异常、活力下降,影响其受精能力^[2]。

鉴于鱼精蛋白在精子细胞分化中发挥重要作用,推测其基因序列的改变可导致男性不育。研究发现 *PRM2* C248T 多态性改变与日本男性生育力相关^[3],10%的美国男性不育患者可检测出 *PRM1* G197T 位点的多态性改变^[4]。但也有研究指出 *PRM* 基因多态性位点与男性生育力无明显相关性。TANAKA 等^[3]发现,*PRM* 基因存在 8 个多态性位点,其中 7 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)位点(*PRM1* 中的 A133G、C160A、G320A、C321A、A431G;*PRM2* 基因中的 G398C 及 A473C)在日本生育及不育男性中的分布频率无差异,研究指出 *PRM1* C321A 及 *PRM2* C248T 位点多态性改变与伊朗男性生育力无相关性^[1]。

目前尚未见 *PRM1* C321A 位点多态性与汉族男性生育力的相关性研究,为探明该多态性位点对汉族男性生育力的影响,本研究分析 *PRM1* C321A 基因型在生育及不育组男性中的分布频率及不同基因型对常规精液参数的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 8 月 -2014 年 12 月于河北医科大学第一医院生殖医学科就诊患者为研究对象。不育组为排除女方因素,未避孕 ≥ 1 年未育的男性患者,已知临床因素(如精索静脉曲张、输精管梗阻等)和遗传因素(如染色体异常、Y 染色体微缺失等)导致不育的患者除外。生育组(对照组)男性为未借助辅助生殖技术的已育查体患者。实验包括 174 例不育患者,172 例男性对照组患者。

1.2 方法

1.2.1 精液分析 患者禁欲 2~7 d 手淫法无菌采集精液,按世界卫生组织标准^[5]称量精液体积,分析精子形态,精子浓度及前向运动精子比例采用计算机辅助分析方法。

1.2.2 *PRM1* C321A 位点基因型分析 应用 DNA 提取试剂盒由精液标本分离 DNA(北京康为世纪生物科技有限公司),正向引物:5'-CAGAGTTCCACCTGCTCACA-3',反向引物:5'-TCCCCTCTCAAGAACAAGGA-3',建立 25 μ l 聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)体系,包括 2 μ l 模板 DNA,12.5 μ l 高保真 2 \times Gold Star Taq Master Mix (北京

康为世纪生物科技有限公司),正、反向引物各 1 μ l,双蒸水 8.5 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min。扩增产物为 514 bp,将扩增得到的 PCR 产物纯化(北京天根生化科技有限公司凝胶纯化试剂盒)后双向测序(上海英潍捷基公司)及酶切(*Bst* UI 酶 60 $^{\circ}$ C 消化过夜),酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, χ^2 检验用来检测 SNP 位点在检测人群中的分布是否符合哈迪 - 温伯格定律并检测基因型在不育组及对照组中的分布频率、关联比值比(odds ratio,OR)及 95% 置信区间(confidence interval,CI),单因素方差分析用于比较不同基因型对常规精子参数的影响, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *PRM1* 基因 C321A 位点基因型分析

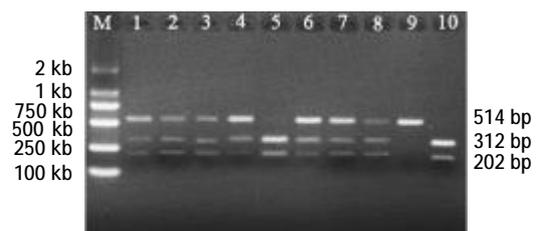
生育及不育男性组均可检测到 CC、CA、AA 3 种基因型,限制性酶切及 DNA 测序结果分别见图 1、2。

2.2 *PRM1* 基因 C321A 位点多态性与汉族男性生育力的相关性分析

经检测,*PRM1* 基因 C321A 位点基因型频率在检测标本中符合哈迪 - 温伯格平衡定律。不育组男性 AA 基因型频率为 8.05%,高于生育组(2.33%)($P < 0.01$),分析表明 AA 基因型可增加男性不育症的发病风险[OR=4.24(95%CI:1.33,13.51)]。见表 1。

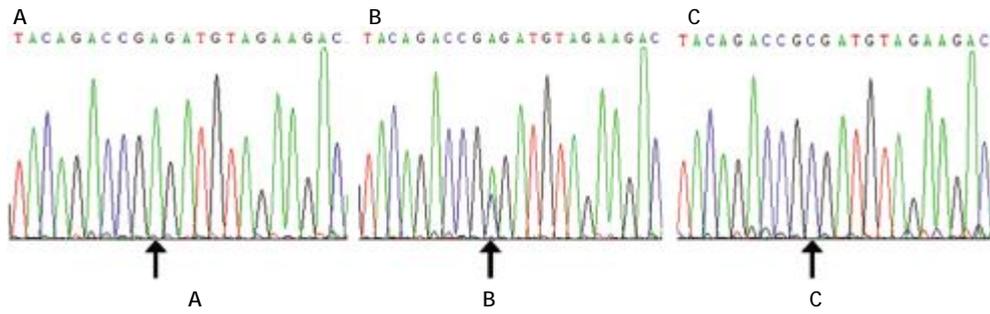
2.3 *PRM1* 基因 C321A 位点多态性对常规精液参数的影响

PRM1 基因 C321A 位点多态性对常规精液参数的影响见表 2。AA 基因型的前向运动精子比例低于 CC 基因型($P=0.023$),正常精子形态比例亦低于 CC



M:2 kb Marker;1、2、3、4、6、7、8:CA 杂合型;5、10:CC 纯合型;9:AA 纯合型

图 1 目的片段限制性酶切产物电泳结果



A:AA 纯合型;B:CA 杂合型;C:CC 纯合型;箭头示 C321A 多态性位点(C>A)

图 2 目的片段 PRM1 C321A 位点 DNA 测序结果

表 1 生育组及不育组男性 PRM1 C321A 基因型频率分布例(%)

组别	CC [†]	CA	AA
生育组	80(46.51)	88(51.16)	4(2.33)
不育组	66(37.93)	94(54.02)	14(8.05)
P 值		0.246	0.009
OR		1.30	4.24
95%CI(下限,上限)		(0.84,2.00)	(1.33,13.51)

注:† 野生型

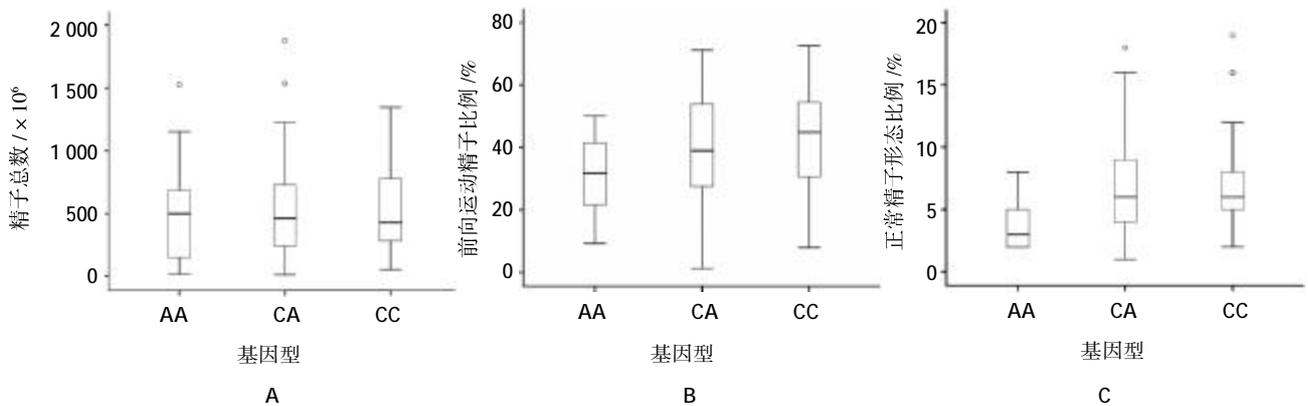
基因型($P=0.017$),而精子总数在基因型间无差异。

箱线图分析亦表明 CC 基因型前向运动精子比例及正常精子形态比例中位数均高于 AA 基因型(见图 3)。

表 2 不同 PRM1 C321A 基因型对常规精液参数的影响($\bar{x} \pm s$)

PRM1 C321A 基因型	精子总数 / $\times 10^6$ 个	前向运动精子比例 / %	正常精子形态比例 / %
CC	532.41 \pm 333.00	43.18 \pm 15.11	6.57 \pm 3.24
CA	541.65 \pm 360.91	40.35 \pm 16.32	6.65 \pm 3.40
AA	554.80 \pm 501.53	30.44 \pm 15.10 [†]	3.78 \pm 2.11 [†]

注:† 与 CC 比较, $P < 0.05$



A:基因型与精子总数间的箱线图;B:基因型与前向运动精子比例间的箱线图;C:基因型与正常精子形态比例间的箱线图

图 3 PRM1 C321A 基因型与常规精液参数间的箱线图分析

3 讨论

据报道不孕不育患者占已婚夫妇的 10% ~ 15%,男性因素造成的不育达 50%^[6],遗传异常是男性不育的主要因素^[7]。鱼精蛋白是精子核中主要的 DNA 结合蛋白,其基因突变可致精子发生异常、印迹缺陷,诱导精子染色质损伤及 DNA 断裂,与男性不育密切相关^[8]。近年来多项研究探讨鱼精蛋白基因多态性与男性不育的相关性,结果因研究对象

传背景差异而不同。本文首次分析 PRM1 C321A 位点与汉族男性生育力的关系。

C321A 多态性位点位于 PRM1 基因编码区,其主要基因型为 CC 基因型^[9]。本研究发现,AA 基因型是汉族男性不育的易感基因型,其不育症的发病风险为 CC 基因型的 4.24 倍,该结果与先前报道不一致^[1,3],研究对象的选择标准及遗传背景差异可能是导致不同结论的原因。FANG 等^[6]指出由于单一多态

性的低显性遗传效应通常取决于与其他多态性位点的相互作用及包括饮食、生活方式等在内的特定环境因素的综合影响,因此遗传变异的影响可能为其他尚未发现的致病因素所掩盖。

研究指出 >90% 的男性不育是由精液质量差引起的, *PRM* 基因多态性改变可影响常规精液参数。*PRM1* C190A 位点多态性改变与西班牙男性精子头部异常相关^[8], HE 等^[9]指出 *PRM1* rs35576928 位点多态性改变与汉族男性重度少精症相关。研究发现由 *PRM1* 230A>C、*PRM2* 298G>C 及 373C>A 组成的 ACC 单倍型与精子浓度及总数间存在显著连锁不平衡, ACC 单倍型精子浓度、总数为非 ACC 型的 2 倍^[10], 说明 *PRM1/PRM2* 多态性在调控精子发生中发挥作用。本研究分析 *PRM1* C321A 位点多态性改变对常规精液参数的影响, 结果发现各基因型间精子总数无差异, 但 AA 基因型中前向运动精子比例及正常精子形态比例均低于 CC 基因型, 由于前向运动精子及正常形态精子比例是衡量男性生育能力的重要指标^[9], 因此其可能是 AA 基因型男性生育力下降的主要因素。

正常精子发生过程中, 85% ~ 95% 的精子 DNA 与鱼精蛋白相互结合^[11], 鱼精蛋白表达异常与精子形态异常、精子总数及活力下降相关^[12-13], 研究发现, 鱼精蛋白基因编码区及非编码区基因的微小改变可导致鱼精蛋白的表达异常^[9]。由上推断, C321A 位点多态性改变可能引起鱼精蛋白表达量异常, 从而影响精子运动能力及正常形态比例, 造成男性生育力下降。

综上所述, *PRM1* C321A 多态性改变与汉族男性生育力相关。AA 基因型可使精子前向运动能力及正常形态比例显著降低, 可能是导致男性不育的重要原因。

参 考 文 献:

[1] SIASI E, ALEYASIN A, MOWLA J, et al. Association study of

six SNPs in *PRM1*, *PRM2* and *TNP2* genes in iranian infertile men with idiopathic azoospermia[J]. *Iran J Reprod Med*, 2012, 10(4): 329-336.

- [2] CHO C, JUNG H H, WILLIS W D, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(1): 211-217.
- [3] TANAKA H, MIYAGAWA Y, TSUJIMURA A, et al. Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations[J]. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9(2): 69-73.
- [4] IGUCHI N, YANG S, LAMB D J, et al. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility[J]. *J Med Genet*, 2006, 43(4): 382-384.
- [5] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. Cambridge University Press: 5th ed, New York, 2010.
- [6] FANG J, WANG S, WANG H, et al. The Cytochrome P4501A1 gene polymorphisms and idiopathic male infertility risk: a meta-analysis[J]. *Gene*, 2014, 535(2): 93-96.
- [7] GE Y Z, XU L W, JIA R P, et al. Association of polymorphisms in estrogen receptors (ESR1 and ESR2) with male infertility: a meta-analysis and systematic review[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(5): 601-611.
- [8] GAZQUEZ C, ORIOLA J, De MATEO S, et al. A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C->A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients[J]. *J Androl*, 2008, 29(5): 540-548.
- [9] HE X J, RUAN J, DU W D, et al. *PRM1* variant rs35576928 (Arg>Ser) is associated with defective spermatogenesis in the Chinese Han population[J]. *Reprod Bio Med Online*, 2012, 25(6): 627-634.
- [10] TUTTELMANN F, KRENKOVA P, ROMER S, et al. A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts[J]. *Int J Androl*, 2010, 33(1): 240-248.
- [11] BALHORN R. The protamine family of sperm nuclear proteins[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(9): 227.
- [12] UTSUNO H, MIYAMOTO T, OKA K, et al. Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(11): 2374-2381.
- [13] FRANCIS S, YELUMALAI S, JONES C, et al. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment[J]. *Hum Fertil (Camb)*, 2014, 17(2): 80-89.

(申海菊 编辑)