

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.014

男性不育症和 Galntl5 基因突变位点的相关性*

张国铸 黄灿华 周 鹏 黄文城 万 强[△]

(广州君赫生物科技有限公司 广东 广州 510300)

摘要 目的:探讨男性不育症患者 Galntl5 基因的一个突变位点与男性不育症的关系及意义。**方法:**运用聚合酶链反应(PCR)结合琼脂糖凝胶电泳和基因序列分析等方法,对 119 例原发性男性不育症患者以及 135 名已生育的正常男性进行 Galntl5 基因筛查。**结果:**与精子形成相关的关键基因 GALNTL5 中 1 个突变位点 G323A 和男性不育症存在一定相关性。因此 Galntl5 基因蛋白质编码序列区 G323A 可能是特发性少精症无精症的诱发因素之一。临床上对原发性不孕不育患者进行 GALNTL5 基因突变筛查是十分必要。

关键词:原发性不孕不育;Galntl5;无精症;少精症

中图分类号:R698.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1253-03

Correlation between Male Infertility and Galntl5 Gene Mutation*

ZHANG Guo-zhu, HUANG Can-hua, ZHOU Peng, HUANG Wen-cheng, WAN Qiang[△]

(Guangzhou Geneheal Biotechnology Co.Ltd, Guangzhou, Guangdong, 510300, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship and significance between male infertility and Galntl5 gene mutation in patients with male infertility. **Methods:** The Galntl5 gene were detected by PCR technique combined with agarose gel electrophoresis and gene sequence analysis in 119 primary infertile patients and 135 normal subjects who had offsprings. **Results:** G323A, one gene mutation site of Galntl5 gene, which is the essential gene for sperm development, was found to be candidate gene for male asthenozoospermia. The study demonstrates that G323A, in the coding region of GALNTL5 gene, may be one of the causative factors of oligospermia and azoospermia and can result in male infertility. Clinically, it is necessary to perform a screening examination for G323A gene in male patients with primary infertility.

Key words: Primary infertility; Galntl5; Azoospermia; Oligospermia

Chinese Library Classification(CLC): R698.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2015)07-1253-03

前言

男性不育症(Male Infertility)是指男子在规律性生活且双方没有采取任何避孕措施的情况下,12个月内未使健康配偶妊娠^[1-3]。导致男性不育的原因很多,涉及激素调节、生殖系统功能、遗传免疫等诸多方面^[4-6]。其中相当一部分涉及到染色体数量的异常和(或)精子发生发育相关基因的突变等^[7]。近期日本的研究小组发现一种特殊基因 Galntl5,它对人类制造正常精子不可或缺,而在因精子无力症导致不育的患者体内,这一基因存在异常^[8]。培育出体内这种基因出现缺损的实验鼠后发现,实验鼠出现了与人类精子无力症相似的症状,也变得不育了^[9]。实验结果显示,该基因不工作的老鼠的精子,与正常的精子相比活性降低 8 成,并且运动和受精所必须的蛋白质的量也显著减少^[10]。本研究运用 PCR 技术对 119 例原发性男性不育症和 135 例正常生育男性的 Galntl5 基因进行分析,探讨其与精子发生的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

选择 2011 年 6 月-2012 年 9 月间 119 名原发性不育症男性和 135 名正常生育的男性和外周血标本。其中正常生育男性作为对照组,精液常规检查精子数均 $> 40 \times 10^6/\text{mL}$ 。而特发性不育男性年龄 27-39 岁,平均 32 岁,平均不育年限 5.5 年,其中连续 2 次精液分析并经离心沉淀均未发现精子者为无精子症,共 56 例;;精子密度 $< 5 \times 10^6/\text{mL}$ 者为严重少精子症,共 63 例。所有参与的人员均通过临床检查排除精索静脉曲张、内分泌紊乱、生殖道梗阻、隐睾、附睾损伤等其他泌尿生殖系统疾患,且无特殊病史及家族史。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 外周血基因组 DNA 的提取 外周血细胞 DNA 模板制备:使用德国 Qiagen 公司的全血 DNA 提取试剂盒,(1) 每个患者分别取 EDTA 抗凝全血 1 mL,加入到 1.5 mL 的 EP 管中,加入 20 μL 蛋白酶 K 和 Buffer AL,充分混匀并且振荡 15 sec。

* 基金项目:广东省科技计划项目(2012B010900044)

作者简介:张国铸(1989-),男,本科,研发骨干,从事疾病分子诊断、分子诊断试剂盒研发方面的研究,E-mail:zhangguotao777@126.com

[△] 通讯作者:万强(1980-),男,博士,技术总监,从事疾病分子诊断、分子诊断试剂盒研发方面的研究

(收稿日期:2014-08-13 接受日期:2014-09-09)

(2)56℃ 条件下温育 10 min。(3)加入 200 μ L 的无水乙醇,充分混匀冰振荡 15 sec。(4)将样品转入 QIAamp spin column 离心柱管中,8000 r/min 离心 1min。(5)去除离心柱下的滤液,加入 500 μ L 的 Buffer AW1, 8000 r/min 离心 1 min。(6)去滤液,加入 500 μ L 的 Buffer AW2,14000 r/min 离心 3 min。(7)将 QIAamp spin column 离心柱放入 1.5 mL 的 EP 管中,在 QIAamp spin column 膜中部加入 50 μ L 的超纯水,室温静置 2 min,8000 r/min 离心 1 min,将 DNA 洗脱下来。(8)取适量的产物进行 DNA 定量,4℃ 保存备用。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR)引物设计 采用 GALNTL5 基因来扩增,选择 GALNTL5 基因所含的外显子基因,引物由上海生工公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Name of primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
GAexon1-F	GTG ATT ATC AGT AGA AGC TT
GAexon1-R	AAC ACA TTT TGT CCC ACG A
GAexon2-F	TTC TGA TTT AGG AAA TTG AAT T
GAexon2-R	TGT TGT ACA TTT TCC CCT TC
GAexon3-F	TGC CTG CAG GTG TCT TC
GAexon3-R	CAA AGT AGA TGA GAT AAT GA
GAexon4-F	CAT GTG TTG AAT ATT TTT CCA
GAexon4-R	AAG GGA AGA TCT CTG AGA C
GAexon5-F	TTT TTT CAG CTA TGT GGA CTA
GAexon5-R	GAA GAA ATC TCA CCG GAT T
GAexon6-F	AGA ATG ACT TTC TCT GTG AA
GAexon6-R	TAT AGC TAT TTT AAA AAT GAA AT
GAexon7-F	TAT AGC TAT TTT AAA AAT GAA AT
GAexon7-R	ATA CAT TTT CCA AGT CAA GG
GAexon8-F	ACT CTA TAT TTT CAT TTA GGA G
GAexon8-R	TGA TTT GTT TTC CTT TCA CAG

1.3 PCR 扩增和检测

PCR 反应体系总体积为 25 μ L,包括 DNA 模板约 100 ng、

10 $\times$ buffer 2.5 μ L、dNTP 终浓度 200 μ mol/L、10 pmol/L 引物各 0.5 μ L、DNA 聚合酶 1 U。扩增条件为 95℃ 预变性 3 min、95℃ 30 s、55℃ 30s,共 35 个循环,72℃ 延伸 5 min,最后置 4℃ 保存。PCR 扩增产物检测经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,60V 恒压电泳 30min,溴乙锭染色后在凝胶成像系统观察结果。PCR 反应中均设有正常生育男性对照。

1.4 外显子 PCR 扩增产物序列测定

1.4.1 PCR 产物的凝胶回收 用 Qiagen 公司的凝胶回收试剂盒从凝胶中回收 DNA 样品,方法如下^[1]:

(1)在紫外灯下用刀片切下含有预期条带的凝胶块。

(2) 将切下的凝胶块,放入 EP 管中,每 100mg 凝胶倒入 600 μ L Buffer QG 缓冲液,55℃ 水浴 10 min,在此期间每隔 1-2 min 中轻摇 EP 管,使凝胶完全溶解。

(3)加入 100 μ L 异丙醇并振荡混匀。

(4) 将样品转移到 Qiaquick spin column 柱中,13000 r/min 离心 1 min。

(5) 弃去离心柱底部的液体,加入 0.5 mL 的 Buffer QG,13000 r/min 离心 1 min。

(6) 弃去离心柱底部的液体,加入 0.75 mL 的 Buffer PE,13000 r/min 离心 1 min。

(7)弃去离心柱底部的液体,再次 13000 r/min 离心 1 min。

(8) 将 Qiaquick column 中的过滤柱放入一支空的 1.5 mL EP 管中,往柱中过滤膜上加入 25 μ L 超纯水,室温下静置 2 min,13000 r/min 离心 1 min,收集管中离心液。

(9) 取适量的回收产物分别进行 DNA 定量和电泳鉴定回收效果。

1.4.2 序列测定 PCR 扩增产物纯化后,以相应引物,委托上海生工公司进行 DNA 序列测定。

2 结果

Galntl5 基因的 PCR 扩增产物送生工公司测序,结果显示不育症男性患者中发现 11 例 Galntl5 基因 GAexon2 外显子区 323 位碱基发生了 G-A 的杂合突变,1 例为 GAexon5 区突变,1 例为 GAexon7 区存在突变。正常生育的男性中没有发现 Galntl5 基因中有突变的情况。

表 2 原发性男性不孕不育患者 GALNTL5 基因测序检测结果

Table 2 The detection results of GALNTL5 gene sequencing In Patients with idiopathic male infertility

FKBP6 编码区 The FKBP6 coding region	原发性不孕不育组例数 Cases of mutation in Primary infertility group	正常生育对照组例数 Cases of mutation in normal birth control group
GAexon1	0	0
GAexon2	11	0
GAexon3	0	0
GAexon4	0	0
GAexon5	1	0
GAexon6	0	0
GAexon7	2	0
GAexon8	0	0

3 讨论

无精症和少精症是男性不育的主要原因之一,而无精和少精与遗传因素有密切的关系。有研究表明,育龄夫妇约 15%不能生育,其中男性因素占 50%^[12-14]。导致男性不育的因素很多,如染色体异常、输精管道梗阻、生殖道感染、精子结构异常和精浆异常等等^[15]。近年来,分子生物学方法已经深入到男性不育症研究当中,发现了一大批涉及男性不育的染色体畸形和多效性单基因遗传病^[16-18]。

Galnt15 基因对人类制造正常精子不可或缺,而在因精子无力症导致不育的患者体内,这一基因存在异常,为检测 Galnt15 基因中是否存在基因突变导致男性不孕不育症的诱发原因,本研究对比了 119 例子少精子症和无精子症男性与 135 例正常生育力男性外周血 Galnt15 基因蛋白质编码序列,确定了少精子症和无精子症男性患者 Galnt15 基因单核苷酸多态性突变位点, Galnt15 基因共有 8 个外显子, 其中在 11 例患者中发现位于 Galnt15 基因中的 GAexon2 编码区的点突变位点。GAexon2 位于 3799-3919 之间, 编码 Thr84-Lys122 氨基酸,测序结果显示改位点位于编码区域的 323 碱基位, 为 G-A 的杂合突变。由于该位点的突变率明显高于在不育症患者中 Galnt15 基因另外两个蛋白编码区域位点的突变率,在调查患有不孕不育症的男性的精子时发现, 有部分患者的该基因突变,无法正常工作,因此,确认了该基因与人类男性的不孕不育症有关。因此该位点的突变存在很有可能导致蛋白质结构的破坏和疾病诱发的可能性,从而导致少精子症和无精子症^[19,20]。

总之, GALNTL 蛋白质编码序列区基因 SNPs 可能是诱发男性少精子症和无精子症的因素之一。其发生的综合原因尚有待于在单核苷酸多态性(SNPs)变异分析基础上,通过大样本量,结合多基因筛查、拷贝数变异(CNVs)分析、Y 染色体单倍群分析、表观遗传修饰因子检测等进一步综合研究。因此,在临床上治疗不育症使用体外受精进行筛选精子的时候,该基因能够成为分子标记,并有希望为解明不孕不育的病理做出贡献。

参考文献(References)

- [1] 刘永杰,韩丽,白刚,等.男性不育症患者精浆 α -葡萄糖苷酶与精子相关参数的关系[J].宁夏医科大学学报,2012,34(2):161-162
Liu Yong-jie, Han Li, Bai Gang, et al. Relationship seminal alpha glucosidase and sperm parameters in patients with male infertility [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2012,34(2):161-162
- [2] Kovac JR, Lamb DJ. Male infertility biomarkers and genomic aberrations in azoospermia[J]. Fertil Steril,2014,101(5):e31
- [3] Belloc S, Hazout A, Zini A, et al. How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility [J]. Maturitas, 2014,78(1): 22-29
- [4] 何劲松,梁季鸿.男性不育与 Y 染色体 AZF 基因微缺失研究进展[J].广西医学,2007,29(4):526-528
He Jin-song, Liang Ji-hong. Research progress of male infertility and

- Y chromosome microdeletion of AZF gene[J]. Guangxi Medical Journal, 2007,29(4):526-528
- [5] Matzuk MM, Burns KH, et al. Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline [J]. Annu Rev Physiol, 2012,74(1): 503-528
- [6] Dai L, Shi Y, Li H. Progress in research on azoospermia factor and male infertility[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2014 ,31(2): 174-179
- [7] Akintunde JK, Oboh G, Akindahunsi AA. Testicular membrane lipid damage by complex mixture of leachate from municipal battery recycling site as indication of idiopathic male infertility in rat[J]. Interdiscip Toxicol, 2013,6(4):192-197
- [8] Sontakke BR, Talhar S, Ingole IV, et al. Dermatoglyphic pattern in male infertility[J]. Nepal Med Coll J, 2013,15(2):106-109
- [9] D Vollrath, S Foote, A Hilton, LG Brown, et al. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis [J]. Hum Mol Genet, 1994,3: 1965-1967
- [10] Paracchini V, Garte S, Taioli E. MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction?[J]. Biomarkers, 2006,11(1):53-60
- [11] Pakrashi T, Oehninger S. Lycopene and male infertility: do we know enough?[J]. Asian J Androl, 2014 ,16(3):500
- [12] Agarwal A, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014,12(1):45
- [13] Ghorbel M, Baklouti-Gargouri S, Keskes R, et al. Combined deletion of DAZ2 and DAZ4 copies of Y chromosome DAZ gene is associated with male infertility in Tunisian men[J]. Gene, 2014,547(2):191-194
- [14] Grabar V. Genetic aspects of male infertility[J]. Georgian Med News, 2014,(229):21-25
- [15] Lee J, Lee DR, Lee S. The genetic variation in Monocarboxylic acid transporter 2 (*MCT2*) has functional and clinical relevance with male infertility[J]. Asian J Androl, 2014, 16(5):694-697
- [16] Esteves SC, Sharma RK, Gosálvez J, et al. A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility[J]. Int Urol Nephrol, 2014,46(6):1037-1052
- [17] Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, et al. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014 ,11(3):1120-1125
- [18] Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2014,28(6):684-703
- [19] Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2014,26(3):193-198
- [20] Krausz C, Chianese C. Genetic testing and counselling for male infertility[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2014,21(3):244-250