

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.009

FKBP6 基因单核苷酸多态性与原发性无精症相关研究 *

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:对 Fkbp6 基因的编码外显子进行突变和多态性分析,初步探讨其与原发性无精症相关性。**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 65 例原发性男性不育患者以及 96 名已生育的正常男性进行了 Fkbp6 基因的外显子区域序列分析。**结果:**基因 FKBP6 中 1 个突变位点 T141G 在无精症患者和正常生育男性中的基因多态性可能是特发性少精无精症的诱发因素之一。因此临床上对原发性不孕不育患者进行 FKBP6 基因突变筛查是十分必要的。

关键词:原发性不孕不育;Fkbp6;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)09-1640-03

Investigation of Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs) in Gene FKBP6 and its Association with Idiopathic Azoospermia*

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

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

ABSTRACT Objective: To explore the mutation and polymorphisms in gene fkbp6, and preliminarily investigate these polymorphisms' association with male asthenozoospermia. **Methods:** Fkbp6 gene of 65 primary infertile patients and 96 normal subjects with offsprings were detected by PCR techniques, in combination with agarose gel electrophoresis and gene sequence analysis. **Results:** T141G, an important disease-causing gene mutation site of Fkbp6 gene which is essential for sperm development was found to be the candidate gene for male asthenozoospermia. The study demonstrates that T141G, in the coding region of FKBP6 gene, may be one of the causative factors of oligospermia and azoospermia, resulting in male infertility. Clinically, it is necessary to perform a screening examination for FKBP6 within the male primary infertile patients.

Key words: Primary infertility; Fkbp6; Oligospermia; Azoospermia

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

Article ID: 1673-6273(2015)09-1640-03

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^[1,2]。据有关调查显示,夫妇不能生育近一半是由于男方的原因所致^[3]。其中相当一部分男性不育的病症伴有无精症或寡精症,目前已陆续被发现了一系列原发无精症相关基因,提示其人类同源基因也可能与人类男性原发无精症相关^[4,6]。FKBP 是一类具有肽基脯氨酸顺反异构酶活性的蛋白质,是免疫抑制剂 FK506 手提蛋白^[7,8]。研究发现 Fkbp6 蛋白为联合复合体(synaptonemal complex, SC)的组成部分,该基因在男性生殖细胞发育过程中发挥着十分重要的作用^[9-11]。本研究运用 PCR 技术对 96 例正常生育男性和 65 例原发性男性不育症的 Fkbp6 基因进行多态性分析,探讨其与不孕症发生的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

选择 2013 年 7 月-2013 年 11 月间 96 名正常生育的男性和 65 不育男性的外周血标本。其中正常生育男性作为对照组,均有 1 个以上子女,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 26-37 岁,平均 31 岁,平均不育年限 4.6 年,经精液检查,确诊为原发无精症。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 的抽提 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。(2) 56 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育 10 min。(3) 加入 200 μL 的无水乙醇, 充分混匀冰振荡 15 sec。(4) 将样品

* 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, 从事疾病分子诊断, 分子诊断试剂盒研发方面的研究, E-mail: zhangguoz125@sina.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的方面研究

(收稿日期: 2014-10-27 接受日期: 2014-11-25)

转入 QIAamp spin column 离心柱管中,8000 r/min 离心 1 min。
(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 FKBP6 基因来扩增,选择 FKBP6 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

引物名称 Name of primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
Fkbex1-F	CAG CTA GGA CAT GGG GG
Fkbex1-R	CAC CTG GCC GGG GGC G
Fkbex2-F	GAG GCC TGG CTT TCA TTC
Fkbex2-R	CCG CCC CAG GGC GTA C
Fkbex3-F	TGG CGT GGG TGT TTT TGG
Fkbex3-R	TGG CGT GGG TGT TTT TGG
Fkbex4-F	TGA GCA GGA TAC TGA GCA
Fkbex4-R	GCT GAC ATC TGT GCT CTG
Fkbex5-F	TTA CTG CTT TTG GTT TCC TT
Fkbex5-R	TTC AGG ATC TAA ACT TAC AC
Fkbex6-F	TGT TAC TCC TCT TGA CCA T
Fkbex6-R	TTC CCA AGT CAC TGG CTT
Fkbex7-F	CAA ATG ATA TCT TTT CTA ACTG
Fkbex7-R	GAG TCA CAA CCC CAC CC
Fkbex8-F	TCC AAA CAC AGA CCT CCT
Fkbex8-R	TCC AAA CAC AGA CCT CCT

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 100ng、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 1U。扩增条件为 95℃ 预变性 3 min、95℃ 30 s、55℃ 30 s,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 30 min,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)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 100 mg 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

Fkbp6 基因的 PCR 扩增产物送生工公司测序,结果显示一共 13 例不孕不育症男性患者中发现 Fkbp6 基因第 2 个外显子存在 T-A 的点突变(位于编码区的 141 位),另有 1 例为第 7 个外显子存在突变。96 例正常生育的男性中没有发现 Fkbp6 基因中有突变的情况。

表 2 FKBP6 基因测序检测结果
Table 2 Gene sequencing detection results of FKBP6

FKBP6 编码区 The FKBP6 coding region	原发性不孕不育组例数 The number of Primary infertility group	正常生育对照组例数 The number of normal birth control group
Exon1	0	0
Exon2	13	0
Exon3	0	0
Exon4	0	0
Exon5	0	0
Exon6	0	0
Exon7	1	0
Exon8	0	0

3 讨论

无精症和少精症是男性不育的主要原因之一,男性不育的病因复杂,是一种多因子疾病,严重影响现代男性健康和家庭幸福。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,但仍有部分原因不明,这种病因无法确定的不育称为原发性男性不育^[12-14]。除了从精子数量及活力方面寻找原发性男性不育的病因外,精子 DNA 缺陷等遗传方面的因素也被发现与男性不育相关^[15-17]。

fkbp6 是睾丸组织特异性表达基因,位于人类 7 号染色体长臂,其仅在生殖细胞中表达。联合复合体(Synaptonemal Complex,SC)是在减数分裂 I 中起重要作用的一种超分子,FKBP6 是其中的一种,其直接参与减数分裂过程中同源染色体的联会。作为联合复合体蛋白,FKBP6 是哺乳动物精子发生减数分裂联合复合体形成必需的,由此可见联合复合体蛋白 FKBP6 在精子发生中起着十分重要的作用,其基因异常可能导致无精症和男性不育。作为一种新鉴定的基因,目前对联会

复合体蛋白 FKBP 基因的研究仅限于小鼠模型及基因多态性方面,尚未在大规模人群中的研究报道,因此在人群中对 fkbp6 多态性和突变展开研究从而探讨其与无精症的关系,是一个值得研究的课题^[18-20]。

为检测 Fkbp6 基因中的突变是否是导致男性不孕不育症的诱发原因,本研究对比了 65 例子少精子症和无精子症男性与 96 例正常生育力男性的外周血 Fkbp6 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 Fkbp6 基因中的单核苷酸多态性突变位点,Fkbp6 基因共有 8 个外显子,其中在 13 例患者中发现位于 Fkbp6 基因中的第 2 个外显子存在编码区的点突变位点,测序结果显示改位点位于编码区域的 141 位,为 T-A 的点突变。由于该位点的突变率明显高于在不育症患者中 Fkbp6 基因另外一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。

总之,男性少精子症和无精子症是多发因素性疾病,FKBP6 蛋白质编码序列区的 SNPs 可能是其诱发因素之一,在临床上治疗不孕不育症使用体外受精进行筛选精子的时候,该基因能够成为一个有效的分子标记。

参考文献(References)

- [1] De Krester D M. Male infertility [J]. The lancet, 1997, 349(9054): 787-790
- [2] Malik B, Patil S, Boricha BG, et al. A comparative study of the efficacy of sonosalpingography and hysterosalpingogram to test the tubal patency in all women with primary and secondary infertility[J]. Ultrasound Q, 2014, 30(2): 139-143
- [3] Akyü z A, Sahiner G, Seven M, et al. The Effect of Marital Violence on Infertility Distress among A Sample of Turkish Women [J]. Int J Fertil Steril, 2014, 8(1): 67-76
- [4] 李创, 丁显平, 付莉, 等. GSTM1、GSTT1 缺失和 GSTP1 基因多态性与原发无精症的相关性研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 102-105
- [5] 禄婷婷, 徐克前. 四引物扩增受阻突变体系分析少精、无精症患者白细胞 MLH3 基因 C2531T 突变 [J]. 基础医学与临床, 2009, 29(11): 1189-1193
- [6] 宗义君. 雄激素受体基因突变与无精症、少精症关系的临床研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2009, 17(4): 225-227
- [7] Zong Yi-jun. Clinical Study On the Relationship between Gene Mutation of Androgen Receptor and Azoospermia as well as Oligozoospermia [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2009, 17(4): 225-227
- [8] Schalk JA, Dietrich AJ, Vink AC, et al. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat [J]. Chromosoma, 1998, 107: 540-548
- [9] Schalk JA, Offenbergh HH, Peters E, et al. Isolation and characterization of the human SCP2 cDNA and chromosomal localization of the gene [J]. Mamm Genome, 1999, 10: 642-644
- [10] Meng X, Lu X, Morris C A, et al. A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome [J]. Genomics, 1998, 52: 130-137
- [11] Pelttari J, Hoja M R, Yuan L, et al. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapses in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(16): 5667-5677
- [12] Noguchi J, Kobayashi E, Akiyama K, et al. Fine mapping of a region of rat chromosome 12 chose to the aspermia(as) locus and comparison with the human orthologous regions [J]. Exp Anim, 2004, 53(5): 429-435
- [13] Aboutaleb HA, Elsherif EA, Omar MK, et al. Testicular Biopsy Histopathology as an Indicator of Successful Restoration of Spermatogenesis after Varicocelelectomy in Non-obstructive Azoospermia[J]. World J Mens Health, 2014, 32(1): 43-9
- [14] Bouzouita A, Kerkeni W, Abouda H, et al. Seminal vesicle agenesis: An uncommon cause of azoospermia [J]. Can Urol Assoc J, 2014, 8(3-4): E266-269
- [15] Ambulkar PS, Sigh R, Reddy M, et al. Genetic Risk of Azoospermia Factor (AZF) Microdeletions in Idiopathic Cases of Azoospermia and Oligozoospermia in Central Indian Population [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(3): 88-91
- [16] Milone M, Musella M, Fernandez ME, et al. Varicocele repair in severe oligozoospermia: A case report of post-operative azoospermia [J]. World J Clin Cases, 2014, 2(4): 94-96
- [17] Dai L, Shi Y, Li H. Progress in research on azoospermia factor and male infertility[J]. Chinese Joutal of Medical Genetics, 2014, 31(2): 174-179
- [18] Niederberger C. Re: The Wilms tumor gene, Wt1, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans [J]. J Urol, 2014, 191(4): 1081
- [19] Kovac JR, Lehmann KJ, Fischer MA. A single-center study examining the outcomes of percutaneous epididymal sperm aspiration in the treatment of obstructive azoospermia [J]. Urol Ann, 2014, 6(1): 41-45
- [20] Yuan L, Pelttari J, Brundell E, et al. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo [J]. J Cell Biol, 1998, 142(2): 331-339
- [21] Liebe B, Alsheimer M, Hoog C, et al. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements [J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(2): 827-837