

· 短篇及病例报道 ·

壮族人群少精不育患者精子 CYP1A2 基因多态性研究*

陈秉朴, 黄瑞雅, 韦叶生, 凌雁武, 解继胜, 邓树嵩
(右江民族医学院人体解剖教研室, 广西百色 533000)

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.046

文献标识码:C

文章编号:1671-8348(2011)15-1555-02

根据世界卫生组织估计,全球有近 6 000 万人罹患不孕症,约占育龄人口的 10%。其中近 50% 由男性因素所致,称为男性不育^[1],导致男性不育的原因很多,其中相关基因的突变是一个重要的因素。大量的研究表明,人体内特别是生殖腺内的毒性物质对精子的成熟和精液的质量有很大影响,而体内很多酶与这些有毒物质的代谢有关,如细胞色素 P450(Cytochrome P450, CYP) 酶^[2]。CYP 酶的表达受 CYP 基因的控制并存在多态性,其基因的缺失或者突变与人体对毒性物质的解毒能力相关,从而影响男性生殖健康。本文运用限制性内切酶消化法对 105 例壮族少精不育患者精子 CYP1A2 基因进行多态性分析,探讨壮族人群中该基因对少精症的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验组:105 例均为少精症(精子密度小于 $20 \times 10^9/L$ 且精子形态正常为 45% 以下,活率为 30%~60%),年龄 25~40 岁,平均 32 岁,婚后不育年限 2~8 年,平均 3.5 年。所有患者性功能正常,无生殖系统器质性病变及炎症、阻塞等,检测前抽静脉血检查染色体核型(G 显带技术)、抗精子抗体(ELISA)及血清激素水平,异常者不列入研究对象。对照组:140 例为已生育且精液正常(精子密度大于或等于 $20 \times 10^9/L$,A 级精子大于 25% 或 A+B 级精子大于 50%)的健康男性,年龄 25~40 岁,平均 32.5 岁。研究对象禁性生活 3 d 后,取精液检查,连续 2 次异常予以确诊。精液标本均来自右江民族医学院附属医院检验科,研究对象均为壮族人。

1.2 方法 精液 DNA 提取:吸取精液 200 μL ,加 1 mL 灭菌生理盐水混匀,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 STE 缓冲液直至加到溶液均匀、不混浊,37 $^{\circ}C$ 水浴 1 h,加蛋白酶 K(终浓度 100 $\mu g/mL$),55 $^{\circ}C$ 水浴 3 h,加等体积酚/氯仿,12 000 r/min 离心 5 min,吸上清液于另一管中,加 2 倍体积无水乙醇。置 -20 $^{\circ}C$ 沉淀 30 min,12 000 r/min 离心 15 min。弃上清液,自然干燥,加 TE 缓冲液 10 μL ,混匀,4 $^{\circ}C$ 保存待用。引物设计参照文献^[3]的报道,由上海生工生物工程技术有限公司合成。CYP1A2 Bsp 120 I 引物:(1)5'-CTA CTC CAG CCC CAG AAG TG'-3;(2)5'-GAA GGG AAC AGA CTG GGA CA-3'。反应体积为 25 μL ,PCR 循环:94 $^{\circ}C$ 60 s,59 $^{\circ}C$ 30 s,72 $^{\circ}C$ 80 s,共 33 个循环。扩增产物用内切酶 Bsp 120 I(A/C) 酶切:总体积 20 μL 中,扩增产物 10 μL ,Bsp 120 I 内切酶 1 μL (10 U),10 \times Buffer 2 μL ,无菌注射用水 7 μL 。酶切后取 8 μL 酶切产物点样,用 3% 琼脂糖凝胶进行电泳分析,电泳后,在紫外光透射仪上观察,摄片记录结果。

1.3 统计学处理 用 SPSS14.0 软件包进行分析,实验组和对照组的基因(型)频率比较分析用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结果判断 CYP1A2 野生基因型 A/A(wild type)为 318

bp 1 个片段,纯合子基因型 C/C(homozygotes)为 125 和 193 bp 2 个片段,杂合子基因型 A/C(heterozygotes)为 125、193 和 318 bp 3 个片段。

2.2 实验组与对照组 CYP1A2 基因多态性进行比较 实验组的突变型基因(C/C+A/C=66.7%)高于对照组(C/C+A/C=37.1%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

多种途径可以影响男性生育力,包括精液中离子成分、酶、蛋白质,以及精液中白细胞及其分泌物、代谢产物、氧化应激作用等。

日常生活中有许多对人体有影响的外源性化合物,尤其是环境致癌物、化学毒物与药物。这些外源物进入机体后绝大多数要经 CYP 代谢转化。因此,CYP 酶在解毒功能上起着重要作用,是参与代谢外源性和内源性化学物质的重要酶系,与人体生殖健康和疾病有着密切的关系^[4]。Lambard 等^[5]发现同一份标本中无运动能力的精子 P450 mRNA 水平比有运动能力的精子低 30%,认为 P450 酶可能与精子运动能力的获得有关,或许可以作为精子运动能力的标志物。P450 家族包括 CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 三种同工酶蛋白,大多数化学致癌物都是 CYP1A2 的底物,其催化外源性物质的代谢具有范围广、结构差别大、催化底物有交叉重叠性的特点。CYP1A2 广泛分布于卵巢、睾丸和肾上腺、胎盘及脑等肝外组织,参与烃类致癌物的代谢,CYP1A2 的表达受基因的控制和环境因素的诱导,并存在种族和个体的差异。CYP1A2 基因位于染色体 15q22~q24,包含 7 个外显子和 6 个内含子,报道的 CYP1A2 的突变体大约有 23 种。其 3'端非翻译区的 C163A 置换产生一个 Bsp120 I 酶切位点。包括 3 种基因型:(1)无基因突变的野生型基因纯合子(A/A);(2)有一个基因突变的杂合子型基因(A/C);(3)等位基因均发生突变的突变型纯合子型基因(C/C)。

本研究发现,实验组与对照组 CYP1A2 基因多态性进行比较,实验组的缺失型基因高于对照组($P < 0.05$)。精液主要由精子和精浆两部分组成,而精浆约占精液的 95% 以上,是运送精子的载体,也是营养精子、激发精子活力的重要物质。精浆中主要含有大量维持精子生命活动的物质,如果糖、酸性磷酸酶、5-核苷酸酶、精胺以及无机盐等。研究发现,精液中的代谢产物如氧自由基、二氧化碳、组胺等会影响到精子的成熟及运动^[6]。而 CYP 酶则是参与代谢外源性和内源性化学物质的重要酶系,当其缺乏时,精液中的代谢物的转化将受影响,从而影响到精子的成熟与质量。大量的研究表明,精液内存在大量有毒代谢产物可以使睾丸的精子发生减退,并能够明显地损害精子的活动能力和存活率,引起精子凝集^[7]。其活性产物(蛋白酶、细胞因子)等改变了精液的成分,通过精子膜过氧化等机制对精子的形态结构和功能造成损害而影响生育力,例如畸形精子比例增加、尖头精子和尾部畸形精子显著增加。郑洁等^[8]

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(0542121)。

认为,精子中 P450 含量可能不仅反映了精子发生与成熟过程的正常与否,与射出精子的功能活动也有一定关系。P450 虽然不能作为男性不育的一个独立诊断依据,但在某些不育患者精子中的异常表达与各种遗传、环境因素以及一些尚不明白的因素一起共同作用,可能是造成男性不育的重要原因之一。正是由于 CYP 酶在体内物质代谢中有很重要的作用,当 CYP 基因发生突变或缺失时,体内的有毒物质代谢将受影响,与生殖系统相关的一些有毒物质将得不到及时的降解和排出,在体内蓄积到一定程度后即可直接危害男性生殖器官的功能,影响生精过程,使精子数目下降、畸形率上升、精子活动力下降、卵子受精率下降等,从而引起不育。

由本研究结果可以看出,精子 CYP1A2 基因多态性与男性少精症有着较为密切的联系。但由于人类生殖的复杂性,尽管对男性不育的研究已经有了大量的临床和实验基础的积累,人类对自身生殖的了解仍然非常有限,人类生殖还有很多未解之谜。相信随着分子生物学、分子遗传学和人类辅助生殖技术的发展,很多谜底都将被揭开,特别是随着人类基因组测序的完成和功能基因组计划的开展,男性不育的机制和诊治终将会得到圆满的解决。

参考文献:

- [1] 汤召兵,陈在贤. 8 例男性原发不育的染色体分析[J]. 重庆医学,2004,33(10):1557-1558.
- [2] Shao J,Gu M,Zhang Z,et al. Genetic variants of the cyto-

chrome P450 and glutathione S-transferase associated with risk of bladder cancer in a south-eastern Chinese population[J]. Int J Uro,2008,15(3):216-221.

- [3] Yan FU,Chang-he FAN,He-huang DENG,et al. Association of CYP2D6 and CYP1A2 gene polymorphism with tardive dyskinesia in Chinese schizophrenic patients[J]. Acta Pharmacol Sin,2006,27(3):328-332.
- [4] 陈文成,潘尚领,林伟雄,等. 巴马县长寿老年人代谢相关基因及抑癌基因的多态性研究[J]. 中华老年医学杂志,2008,27(4):281-282.
- [5] Lambard S,Galeraud-Denis I,Bouraima H,et al. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa:a putative marker of motility[J]. Mol Hum Reprod,2003,9(3):117-124.
- [6] Aquila S,Sisci D,Gentile M,et al. Towards a physiological role for cytochrome P450 aromatase in ejaculated human sperm[J]. Hum Reprod,2003,18(8):1650-1659.
- [7] 何畏,史常旭,梁志清,等. 多价精子抗原表位多肽-免疫刺激复合物的抗生育作用研究[J]. 重庆医学,2002,31(7):555-556.
- [8] 郑洁,何亚平,张金虎,等. 人精子中芳香化酶表达与精子功能的关系[J]. 生殖与避孕,2005,25(5):284-289.

(收稿日期:2010-02-11 修回日期:2010-11-17)

经导管动脉栓塞治疗术后复发嗜铬细胞瘤 1 例 6 年随访

徐 玲,朱建华,李 佳,徐 勇

(泸州医学院附属医院内分泌代谢科,四川泸州 646000)

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.047

文献标识码:C

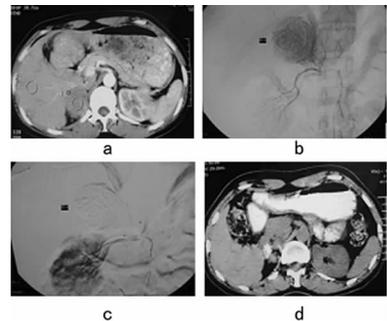
文章编号:1671-8348(2011)15-1556-02

手术切除是治疗嗜铬细胞瘤最有效方法,但麻醉和手术存在较大风险^[1],特别是术后复发者肿瘤与周围组织粘连,再次手术风险大。本院 2004 年对 1 例嗜铬细胞瘤术后复发者采用经动脉导管注入永久栓塞剂栓塞肿瘤血管,并随访 6 年,取得良好疗效,现报道如下。

1 临床资料

患者,女,39 岁。1999 年因心悸头痛、血压高在本院被诊断为嗜铬细胞瘤,并行手术治疗,病理证实为嗜铬细胞瘤。术后情况好,血压正常。2004 年 4 月再次心悸头痛,血压达 180/140 mm Hg 入院。入院后血压 114~225/82~128 mm Hg,空腹血糖 10.1 mmol/L,餐后 2 h 血糖 17.1 mmol/L,腹部 CT 示右肾上腺占位 5 cm×4 cm×3 cm,见图 1a。发射单光子计算机断层扫描(emission computed tomography,ECT)示右肾上腺处¹³¹碘-间碘苯胍(¹³¹I-MIBG)异常浓聚,诊断右肾上腺嗜铬细胞瘤术后原位复发、继发性糖尿病。给予胰岛素降糖、特拉唑嗪等降压后,采用右股动脉穿刺,超选至右肾上腺动脉,数字减影血管造影(digital subtraction angiography,DSA)显示增多、增粗、迂曲的肿瘤血管,血流丰富,见图 1b。注入末梢型永久栓塞剂超液化碘油和聚乙烯醇(微球直径为 200~500 μm)混合剂共 11 mL,再次 DSA 肿瘤血管不再显影,见图 1c。术后第 6 天完全停用酚妥拉明和普奈洛尔,血压心率正常,半年后

血糖恢复正常。以后每年随访 2 次,已随访 6 年,血压、心率及血糖等均正常,复查 CT 示右肾上腺区碘油沉积,见图 1d,其余无异常。



a: 栓塞前 CT 右肾上腺占位; b: 栓塞前 DSA 增多增粗的肿瘤血管; c: 栓塞后 DSA 肿瘤血管不显影; d: 栓塞后 CT 右肾上腺区碘油沉积。

图 1 右肾上腺嗜铬细胞瘤栓塞前后

2 讨论

嗜铬细胞瘤 80%~90% 位于肾上腺,肿瘤血运丰富,手术易出血,且术后可能复发,故需寻找一种安全、有效的治疗方法,特别是对术后复发或不能耐受手术者。经导管动脉栓塞术已常规用于肝癌等实体肿瘤的治疗,技术较成熟,疗效肯定。