

· 论 著 ·

RNF8 基因遗传变异与吸烟饮酒的交互作用对精子 DNA 碎片率和原发性男性不育的影响*

马 强¹, 刘春莲², 李元杰¹, 景万红², 徐 仙², 焦海燕^{1,3△}(宁夏医科大学:1. 医学遗传学与细胞生物学系;2. 总医院生殖医学中心;
3. 生育力保持教育部重点实验室,宁夏银川 750004)

摘要:目的 探讨环指蛋白 8(RNF8)基因 SNPs 与吸烟、饮酒的交互作用对精子 DNA 碎片率(DFI)和原发性男性不育的影响。方法 采用病例-对照研究设计,运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 332 例原发性男性不育(无精子症不育 87 例,少弱精症不育 166 例,精液参数正常不育 79 例)和 329 例对照人群 rs761737 和 rs2269058 位点基因型。运用精子染色质扩散(SCD)实验检测精子 DFI。结果 RNF8 基因 rs761737、rs2269058 的基因型、等位基因频率在原发性男性不育组和对照组中的分布差异无统计学意义($P>0.05$);不育组男性精子 DFI(46.2 ± 22.3)% 高于生育男性(21.4 ± 9.2)% ($P<0.05$),少弱精症不育组精子 DFI(50.0 ± 22.1)% 高于精液参数正常不育组(38.2 ± 20.7)%;少弱精症不育组和精液参数正常不育组中,携带 rs761737 和 rs2269058 三种不同基因型的个体精子 DFI 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);RNF8 rs2269058 与吸烟存在交互作用($OR=2.37, 95\%CI 1.06\sim 5.27, P<0.05$)。结论 RNF8 基因 rs761737 和 rs2269058 可能与原发性男性不育及精子 DFI 无关,但吸烟会加重携带 rs2269058 AC+AA 基因型的个体患原发性男性不育的风险。精子 DFI 可作为精液常规分析的重要补充,对揭示原发性男性不育的病因及指导临床治疗具有重要的意义。

关键词:环指蛋白 8;原发性男性不育;精子 DNA 碎片率;吸烟;饮酒

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)33-3983-03

Affect of RNF8 genetic variants and interactions with cigarettes smoking and alcohol consumption on sperm DNA fragment index and primary male infertility*

Ma Qiang¹, Liu Chunlian², Li Yuanjie¹, Jing Wanhong², Xu Xian², Jiao Haiyan^{1,3△}

(1. Department of Medical Genetics and Cell Biology;2. Center for Reproductive Medicine of General Hospital;3. Ministry of Education Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of two polymorphisms(rs761737 and rs2269058) of RNF8 and the interactions with cigarette smoking and alcohol consumption on sperm DNA fragment index(DFI) and primary male infertility. **Methods** Based on case-control design, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) technology was used to detect the genotype of rs761737 and rs2269058 in RNF8 between 332 primary male infertile patients (composed by 87 patients of azoospermia, 166 patients of oligoasthenozoospermia and 79 patients of normozoospermia) and 329 controls, and Sperm Chromatin Dispersion(SCD) assay was used to assess sperm DNA fragment index(DFI). **Results** Genotype and allele frequencies distribution of rs761737 and rs2269058 between cases and controls had no statistically significant difference($P>0.05$). Sperm DFI in infertile group (46.2 ± 22.3)% was significantly higher than that of control group (21.4 ± 9.2)% ($P<0.05$), stratified analysis suggested that Sperm DFI in oligoasthenozoospermia group (50.0 ± 22.1)% was also significantly higher than that of normozoospermia group (38.2 ± 20.7)%. The statistic differences of Sperm DFI in individuals who carried different genotypes of rs761737 and rs2269058 in oligoasthenozoospermia group and normozoospermia group had no statistically significant difference($P>0.05$). There was an interaction between RNF8 rs2269058 and Cigarettes smoking($P<0.05, OR=2.37, 95\%CI 1.06-5.27$). **Conclusion** Although RNF8 rs761737 and rs2269058 have no effects on primary male infertility and sperm DFI, cigarettes smoking increase the risk of primary male infertility in individuals who carry RNF8 rs2269058 AC+AA genotype. Sperm DFI is an important test to assess sperm quality, it is vital to reveal the etiology of primary male infertility and provide therapy guidance to clinicians.

Key words: ring finger 8; primary male infertility; sperm DNA fragment index; cigarette smoking; alcohol consumption

精子的发生是多步骤、多阶段的过程,其不仅受睾丸内大量活性氧的损害,也会受到环境因素如吸烟、饮酒的影响^[1,2],从而导致 DNA 损伤。研究发现,原发性男性不育患者精子 DNA 碎片率(DFI)高于生育男性^[3],并且高精子 DFI 可导致复发性流产^[4],提示精子 DNA 损伤可能会导致男性生育力下

降。精子 DNA 损伤包括单链断裂和双链断裂,其中双链断裂最为严重。环指蛋白 8(ring finger 8, RNF8)基因介导的泛素化作用参与 DNA 双链断裂的修复,且敲除 RNF8 的小鼠不能产生精子,表现为雄性不育^[5]。因此,本研究探讨 RNF8 基因 2 个标签 SNPs 及其与吸烟、饮酒的交互作用与原发性男性不

表 1 RNF8 SNPs 基因型分析基本信息

SNPs	引物	产物(bp)	限制性内切酶	酶切产物(bp)
rs761737	F:5'-ATGTGATGCCTGTTTGCT-3'	485	bsl I	TT:356,129
	R:5'-GGGAATTACATCTGAGTTTAGG-3'			CT:356,47,82,129 CC:356,47,82
rs2269058	F:5'-TTTTACATCCTTCCCTGCACT-3'	484	bsr I	CC:484
	R:5'-GGGATTACAGATATGCACCAC-3'			AC:484,280,204 AA:280,204

表 2 RNF8 SNPs 基因型和等位基因频率在各组中的分布

组别	n	rs761737					rs2269058						
		基因型				等位基因	基因型				等位基因		
		TT	CT	CC	CT+CC	T	C	CC	AC	AA	AC+AA	C	A
无精子症不育组	87	19	26	42	68	64	110	12	34	41	75	58	116
少弱精症不育组	166	22	69	75	144	113	219	23	66	77	143	112	220
精液参数正常不育组	79	18	27	34	61	63	95	13	38	28	66	64	94
对照组	329	44	135	150	285	223	435	36	158	135	293	230	428

育及精子 DFI 的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 12 月至 2012 年 12 月在宁夏医科大学总医院生殖医学中心确诊的原发性男性不育 332 例,诊断标准按《WHO 人类精液检查与处理实验室手册(第五版)》进行,并排除了染色体异常、梗阻性无精子症、激素异常和 Y 染色体微缺失者。其中无精子症不育 87 例、少弱精症不育 166 例、精液参数正常不育 79 例,平均年龄(30.8±5.3)岁;收集同期在宁夏医科大学总医院体检且有生育史的健康男性 329 例为对照组,平均年龄(51.0±15.5)岁。收集所有研究对象吸烟和饮酒情况,其中吸烟定义为:每天吸烟大于或等于 1 支,持续 1 年,或总量大于或等于 18 包。饮酒定义为:每周饮酒大于或等于 2 次,白酒每次大于或等于 50 g 或者其他酒类每次大于或等于 500 mL,达不到此标准认定为不吸烟和不饮酒。所有研究对象提供 2 mL 静脉血,收集少弱精症、精液参数正常不育患者精液标本,另外收集 67 例有生育史的健康男性的精液标本作为 SCD 实验对照。本研究得到了宁夏医科大学医学伦理委员会批准并获得所有研究对象的知情同意。

1.2 SNPs 基因型分析

1.2.1 DNA 提取 用 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取外周血基因组 DNA, -80 °C 保存备用。

1.2.2 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP) 进行 SNPs 分型 采用 Oligo7 软件分别设计 rs761737 和 rs2269058 引物,由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 12.5 μL,其中 2×Master Mix 6.25 μL,DNA 聚合酶 0.125 μL,上、下游引物各 0.25 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 4.625 μL。扩增条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,62.8 °C/65.5 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 30 s,循环 35 次,72 °C 总延伸 10 min。采用 bsl I 和 bsr I 限制性内切酶(NEB 公司)分别对 rs761737 和 rs2269058 PCR 产物进行酶切,酶切产物电泳后在凝胶成像仪上通过条带分布来判断基因型。每种基因型各挑选 2 例进行测序验证,以确保基因分型的准确性。见

表 1。

1.3 SCD 实验^[6] 运用 SCD 实验检测少弱精症不育组、精液参数正常不育组和对照组精子 DNA 损伤程度。计数 300 个精子,观察精子光晕大小,根据光晕与精子头部横径的比例,分为大、中、小和无光晕 4 个等级:小光晕精子头横径小于或等于 1/3,中光晕精子头横径为大于 1/3~2/3,大光晕精子头横径大于 2/3。大和中光晕表示精子 DNA 完整无碎片,小和无光晕表示精子 DNA 断裂为碎片。精子 DNA 损伤程度用精子 DFI 表示,DFI=(小光晕精子数+无光晕精子数)/总数×100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,计数资料用 χ^2 检验,计量资料用 *F* 分析或 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验 拟合优度 χ^2 检验结果显示,RNF8 rs761737、rs2269058 基因型在对照组中的频数分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(*P*>0.05),说明本研究所选样本具有群体代表性。

2.2 RNF8 SNPs 与原发男性不育的相关性 RNF8 rs761737、rs2269058 基因型和等位基因频率在病例组和对照组中差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.3 RNF8 SNPs 与疾病各亚组的相关性 RNF8 rs761737 和 rs2269058 基因型和等位基因频率在无精子症不育组、少弱精症不育组、精液参数正常不育组与对照组中的差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

2.4 各组精子 DFI 比较 与对照组相比,原发性男性不育组精子 DFI(46.2±22.3)% 高于对照组(21.4±9.2)% (*P*<0.05)。少弱精症不育组、精液参数正常不育组与对照组相比,精子 DFI 差异有统计学意义(*P*<0.05),少弱精症不育组精子 DFI(50.0±22.1)% 高于精液参数正常不育组(38.2±20.7)%。

2.5 RNF8 rs761737 和 rs2269058 三种基因型个体精子 DFI

比较 少弱精症不育组和精液参数正常不育组中,携带 rs761737 和 rs2269058 三种不同基因型个体精子 DFI 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 RNF8 rs761737、rs2269058 与吸烟、饮酒的交互作用
rs761737 与吸烟、饮酒不存在交互作用($P>0.05$);rs2269058 与吸烟存在交互作用($OR=2.37,95\%CI 1.06\sim 5.27,P<0.05$),而与饮酒不存在交互作用($P>0.05$)。

3 讨 论

精子染色质是由 DNA 双链和鱼精蛋白结合而形成的 高度浓缩的结构,其形成过程包括组蛋白向鱼精蛋白转换、二硫键交联等,并且容易受到环境、药物以及吸烟等因素的损伤^[7]。在不同类型的损伤中,以 DNA 双链断裂最为严重。人类 RNF8 基因位于 6p23.1,由 8 个外显子和 7 个内含子组成,编码一条由 485 个氨基酸组成的多肽链,广泛分布于人体各种细胞中^[8]。RNF8 不仅参与双链 DNA 损伤的修复^[9-10],同时,RNF8 依赖的组蛋白泛素化在组蛋白向鱼精蛋白转变过程中也起重要作用,RNF8 缺陷小鼠睾丸组织化学分析显示,睾丸内缺乏成熟的精子,进一步的研究证实,精子成熟受阻是由于小鼠睾丸中鱼精蛋白的水平严重降低所致^[11]。RNF8 基因在 DNA 双链断裂修复和精子发生过程中均有重要作用,故推测其遗传变异可能会影响其功能。

本研究显示,RNF8 rs761737 和 rs2269058 与原发性男性不育及精子 DFI 均无关,提示 RNF8 rs761737 和 rs2269058 可能不是原发性男性不育的分子标志。但本研究发现,吸烟会增加携带 rs2269058 AC+AA 基因型的个体患原发性男性不育的风险,同时,吸烟本身也会导致精子活力降低^[12-13],故对于这类人群应该加强教育,及早戒烟以保存生育力。SCD 实验结果表明,原发性男性不育患者精子 DFI 高于生育男性,提示精子 DFI 增加是原发性男性不育的原因之一。精子 DNA 损伤不仅会影响精子的活力^[12],还会降低接受辅助生殖技术治疗的受精率和优质胚胎率^[14]。临床医师给予抗氧化治疗(每天口服维生素 C 和 E 各 1 g,连续 2 个月)可显著降低不育患者的精子 DFI^[15],从而提高 ICSI 的临床妊娠率和胚胎种植率^[16]。

本研究发现,精子 DNA 碎片是原发性男性不育的原因之一,其可作为独立于精液参数分析以外的评价精子质量的重要指标,对揭示原发性男性不育病因以及辅助生殖技术治疗均有重要的意义。此外,本研究首次发现 RNF8 SNPs 与原发性男性不育和精子 DFI 无相关性,但尚需在不同地区与民族间进行验证,以进一步阐明 RNF8 基因变异与原发性男性不育的关系。

参考文献:

[1] Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, et al. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men[J]. *Urology*, 2012, 80(4): 822-825.

[2] Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, et al. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat[J]. *Alcohol*,

2011, 45(4): 403-409.

- [3] 邱毅,张丽红,王磊光,等.精子染色质扩散试验检测男性不育患者精子 DNA 碎片[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2008, 27(6): 387-389.
- [4] Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(10): 2908-2917.
- [5] Lu LY, Wu J, Ye L, et al. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis[J]. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 371-384.
- [6] Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation[J]. *J Androl*, 2003, 24(1): 59-66.
- [7] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome[J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(1): 174-179.
- [8] Seki N, Hattori A, Sugano S, et al. Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of a novel human gene which encodes a protein with RING finger motif[J]. *J Hum Genet*, 1998, 43(4): 272-274.
- [9] Van Attikum H, Gasser SM. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(5): 207-217.
- [10] Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, et al. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis[J]. *Dev Cell*, 2003, 4(4): 497-508.
- [11] Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, et al. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids[J]. *Mol Reprod Dev*, 1992, 31(2): 170-181.
- [12] 刘俊茹,陈明强,文陶非,等.吸烟对精子 DNA 完整性、精子参数的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(33): 4717-4718.
- [13] 陈泯燕,黄国宁,王亚平,等.精子 DNA 碎片与体外受精结局的关系[J]. *生殖与避孕*, 2010, 30(11): 732-737.
- [14] Simon L, Castillo J, Oliva R, et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes[J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(6): 724-734.
- [15] Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment[J]. *J Androl*, 2005, 26(3): 349-353.
- [16] Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(9): 2590-2594.