

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.017

PRM2 G398C 多态性与 386 例汉族男性生育力的相关性研究*

李俊, 刘芳, 杨雪梅[△], 宋亚曼, 冯艳萍, 谭宇哲
(河北医科大学第一医院生殖医学科 050031)

[摘要] 目的 研究鱼精蛋白 2(PRM2)基因 G398C 多态性与汉族男性生育力的相关性。方法 选取 386 例原发不育男性患者为观察组, 255 例生育男性为对照组, 分别分析两组常规精液参数及 DNA 完整性、核蛋白成熟度等精子功能参数, 采用 DNA 测序技术对 PRM2 G398C 位点进行基因分型, 统计该多态性位点与男性不育发病率的关系。结果 不育患者 PRM2 G398C 位点 CC 基因型频率(11.92%)高于生育男性(6.67%), 分析显示 CC 基因型与男性不育的遗传易感性明显相关($OR=2.002, 95\% CI=1.097\sim 3.653, P<0.05$)。CC 基因型可使精子 DNA 完整性、核蛋白成熟度等精子功能参数明显下降, 可能是其导致男性不育的主要因素。结论 PRM2 G398C 多态性改变与汉族男性生育力相关。

[关键词] 鱼精蛋白 2; 多态性, 单核苷酸; 不育, 男(雄)性; 遗传易感性

[中图分类号] R698+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)16-2215-02

Association study of PRM2 gene polymorphism with male infertility in the 386 Chinese Han population*

Li Jun, Liu Fang, Yang Xuemei[△], Song Yaman, Feng Yanping, Tan Yuzhe
(Department of Reproductive Medicine, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

[Abstract] **Objective** To determine the association of one single nucleotide polymorphism loci G398C in PRM2 with male infertility in Chinese Han population. **Methods** A total of 386 infertile men were recruited as the observation group and 255 fertile men were recruited as the control group. Routine semen analysis as well as sperm functional parameters such as DNA integrity and nucleoprotein maturity rates were analyzed. Direct sequencing of G398C in PRM2 gene of infertile and fertile men was also conducted to evaluate the association of G398C SNP loci with male infertility. **Results** Statistical analysis showed that the frequencies of CC genotype of PRM2 G398C was significantly different between the infertile (11.92%) and fertile men (6.67%) and it was associated with increased risk of male infertility ($OR=2.002, 95\% CI=1.097\sim 3.653, P<0.05$). Moreover, it was discovered that sperm DNA integrity as well as nucleoprotein maturity rate of CC genotype were dramatically decreased compared with other genotypes ($P<0.05$), which would probably lead to infertility. **Conclusion** Our results gave the first evidence that PRM2 G398C polymorphism was associated with male infertility in Chinese Han population.

[Key words] protamine 2; polymorphism, single nucleotide; infertility, male; genetic susceptibility

国外不孕不育患者约占已婚夫妇的 10%~15%, 其中, 由男性因素导致的不育比例达 50%^[1]。鱼精蛋白 1(promatine1, PRM1)及鱼精蛋白 2(promatine2, PRM2)是人类两种主要的鱼精蛋白, 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^[2]。小鼠敲除 PRM1 或 PRM2 基因可导致单倍剂量不足、染色质凝聚异常、精子损伤及雄性不育^[3]。报道指出鱼精蛋白基因编码区、非编码区的微小改变可导致其表达的完全异常^[4], 进而影响男性生育力。G398C SNP 位点位于 PRM2 基因的内含子区, 目前尚未见其多态性改变与汉族男性生育力的相关性研究, 本研究旨在分析 PRM2 G398C 多态性改变对汉族男性生育力的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 8 月至 2014 年 8 月, 于本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, 未避孕大于或等于 1 年未育的男性患者, 除外染色体异常及 Y 染色体微缺失患者。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 255 例。观察组包括 386 例不育患者。观察组与对照组精子浓度、活力、前向运动比例、精子形态等常规精液参数比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比

性, 见表 1。

表 1 不育与生育组男性常规精液参数比较($\bar{x}\pm s$)

精液参数	对照组($n=255$)	观察组($n=386$)	P
浓度($\times 10^6$ /mL)	133.18 \pm 83.50	144.58 \pm 97.64	0.186
活力(%)	53.05 \pm 19.31	51.36 \pm 21.92	0.388
前向运动比例(%)	41.16 \pm 14.62	40.72 \pm 17.29	0.766
形态(%)	6.07 \pm 3.37	5.97 \pm 3.53	0.768

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 WHO 标准^[5]分析精液常规参数及精子形态, 精子浓度、活力及前向运动精子比例采用计算机辅助分析方法。留取部分精液用于精子 DNA 完整性及核蛋白成熟度分析。精子核 DNA 完整性由染色质扩散实验试剂盒检测(深圳华康生物医学工程有限公司), 苯胺蓝染色法用于分析精子核蛋白成熟度(深圳博锐德生物科技有限公司)。

1.2.2 PRM2 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), 上游引物序

* 基金项目: 河北省人口和计划生育委员会指令课题(2013-A08)。 作者简介: 李俊(1982-), 助理研究员, 博士, 主要从事人类辅助生殖实验室工作。 [△] 通讯作者, Tel: (0311)85917146; E-mail: meicherrymissyou@163.com。

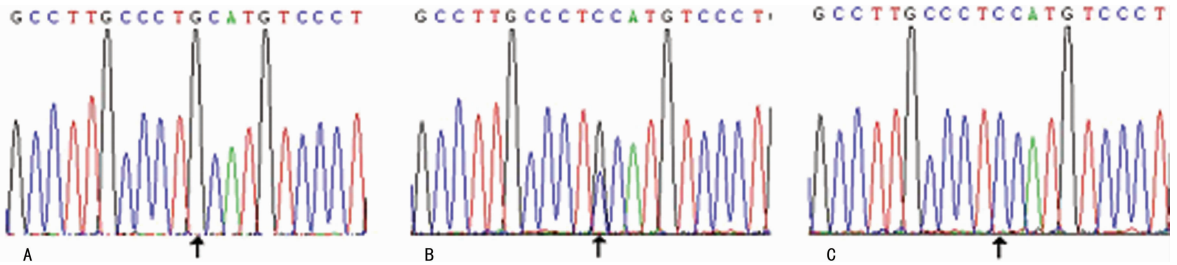
列:5'-CCC ATG GCC AGT CTC ACT AT-3',下游引物序列:5'-CCA GGT TTG TGT GAT TCG TG-3',建立 25.0 μ L PCR 反应体系,包括 2.0 μ L 模板 DNA,12.5 μ L 高保真 2 \times Gold-Star Taq Master Mix(北京康为世纪生物科技有限公司),上、下游引物各 1.0 μ L,双蒸水 8.5 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物为 641 bp,将扩增得到的 PCR 产物纯化(天根生化科技凝胶纯化试剂盒)后双向测序(上海英潍捷基公司)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 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观察组及对照组中的分布频率、关联比值比(OR)及 95%CI,t 检验用于比较观察组及对照组常规精液参数的差异,不同基因型间精子功能参数的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PRM2 G398C 多态性与汉族男性生育力的相关性分析
观察组及对照组男性中均可检测到 3 种基因型(图 1),且均符合哈迪-温伯格平衡定律。CC 基因型在观察男性中的分布频率为 11.92%(表 2),与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);数据分析表明,CC 基因型可增加男性不育症的发病风险(OR=2.002,95%CI:1.097~3.653, $P < 0.05$)。



A:GG 纯合型;B:GC 杂合型;C:CC 纯合型。

图 1 PRM2 G398C 基因型

表 2 两组男性 PRM2 G398C 基因型频率分布[n(%)]

PRM2 G398C 基因型	对照组	观察组	P	OR	95%CI
GG*	128 (50.20)	173 (44.82)			
GC	110 (43.14)	167 (43.26)	0.492	1.123	0.806~1.565
CC	17 (6.67)	46 (11.92)	0.022	2.002	1.097~3.653

*:野生型。

2.2 G398C 基因型对精子功能参数的影响 精子 DNA 完整性及核蛋白成熟度的检测,3 种基因型精子 DNA 完整性及核蛋白成熟度的比较,CC 基因型精子 DNA 完整性及核蛋白成熟度比例均显著低于 GG 及 GC 基因型,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 PRM2 G398C 基因型与精子功能参数的相关性分析($\bar{x} \pm s, \%$)

精子功能参数	基因型		
	GG	GC	CC
DNA 完整性	74.07 \pm 13.89	72.31 \pm 15.43	64.05 \pm 15.25
核蛋白成熟度	66.44 \pm 16.13	63.96 \pm 17.32	57.78 \pm 18.40

3 讨论

尽管男性不育诊断取得很大进步,仍不清楚 30% 原发性不育患者的病因及发病机制。研究指出遗传学异常是男性不育的主要因素^[6]。近年来多项研究探讨了鱼精蛋白基因多态性改变与男性不育的相关性,结果发现,不同 SNP 位点在不同种族人群中与不育的相关性不同。本文首次报道了 PRM2 G398C 多态性位点与汉族男性生育力的相关性,结果显示出 CC 基因型与男性不育患病率相关,与国外报道^[7]不一致,可能是入选对象标准及人群遗传背景差异造成的。相关报道也显示,不同研究人群中 PRM 基因多态性与男性不育的相关性结

果存在很大差异^[8-10],遗传背景差异可能是导致这一现象的最为重要的原因。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被其他尚未发现的致病因素所掩盖^[1]。

精子发生过程中,核组蛋白由过渡蛋白取代,而后过渡蛋白又被鱼精蛋白取代,鱼精蛋白通过分子内及分子间的二硫键与小沟 DNA 紧密结合,使 DNA 包裹程度增加,染色质凝聚水平可达体细胞的 6 倍。人类精子表达两种类型的鱼精蛋白,即 P1 和 P2,二者比例近似 1:1,其比例升高或降低均与男性不育相关。研究发现 PRM1 及 PRM2 基因及其相关调控区域的突变可影响鱼精蛋白表达,鱼精蛋白水平异常可导致染色质的不完全凝聚及父源 DNA 损伤^[11]。由于核蛋白成熟度检测可评估精子染色质致密化,检测与核蛋白相关的染色质缺陷^[12],本实验通过对核蛋白成熟度及精子 DNA 完整性的检测评估 G398C 多态性改变对精子染色质凝聚的影响。

研究结果发现,CC 基因型中精子 DNA 完整性及核蛋白成熟度比例明显降低,与报道指出的鱼精蛋白基因突变可导致精子发生及印迹基因异常,造成染色质损伤及 DNA 断裂的结论一致^[2]。推测 PRM2 G398C 单核苷酸的改变可能导致精子细胞核中鱼精蛋白含量的异常,比例过高的组蛋白可阻碍鱼精蛋白与精子 DNA 的正常结合,影响 DNA 链折叠,降低精子 DNA 稳定性^[13],而精子核 DNA 完整性及核蛋白成熟度等精子功能指标是评估男性生育力的重要参数^[14-15],推测 G398C 多态性可通过改变鱼精蛋白表达,引起核蛋白成熟度及 DNA 完整性下降,造成生育力降低。

综上所述,PRM2 G398C 多态性改变与汉族男性生育力相关。CC 基因型可使精子 DNA 完整性及核蛋白成熟度显著降低,可能是导致男性不育的重要原因。

参考文献

[1] Fang J, Wang S, Wang H, et al. The cytochrome P4501A1 gene polymorphisms and idiopathic male(下转第 2219 页)

能。而在黄芪的近代药理学研究中,其改善心功能作用的主要有效成分是黄芪皂苷,主要机制与调控细胞内钙转运有关^[12],黄芪皂苷作为比较好的抗氧化剂能清除自由基,保护缺氧、缺血的心肌细胞,从而增强心肌收缩力,提高 LVEF^[13]。由于黄芪皂苷的正性肌力作用是通过改善心肌细胞的营养环境而非直接刺激心肌细胞收缩产生,因此无心率增快、增加心肌耗能、致心律失常等不良反应。

本研究结果显示,低温可调钠透析能够有效改善透析过程中的收缩压水平,减少低血压症状的出现,也能在一定程度上提高 LVEF,但联合黄芪注射液静点能更好提高 LVEF,从而进一步改善了透析患者的左心室功能,大大增加了患者对低血压的耐受性,效果较好,临床值得推广。

参考文献

- [1] 王志刚. 血液净化学[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2003:144.
- [2] Song JH, Park GH, Lee SY, et al. Effect of sodium balance and the combination of ultrafiltration profile during sodium profiling hemodialysis on the maintenance of quality of dialysis and sodium and fluid balances[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005(16):237-246.
- [3] 陈香美. 现代慢性肾衰治疗学[M]. 北京:人民军医出版社, 2001:152.
- [4] 刘虹, 刘伏友, 彭佑铭, 等. 可调钠血液透析对透析低血压的预防作用[J]. *中国血液净化*, 2002, 1(8):21-23.
- [5] 王志刚. 血液净化学[M]. 2 版. 北京:北京科学技术出版社, 2003:177-179.
- [7] Sarnak J, Levey S. Epidemiology of cardiac disease in dialysis patients[J]. *Sermin Dial*, 1999(12):118-123.
- [8] Serby M, Lambie H, Camic G, et al. Occurrence of regional left ventricular dysfunction in patients undergoing standard and biofeedback dialysis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2006(47):830-841.
- [9] Harnet D, Foley N, Kent M, et al. Congestive heart failure in dialysis patients: Prevalence prognosis and risk factors[J]. *Kidney Int*, 1995(47):884-890.
- [10] Wijns W, Vatner F, Camici G. Hibernating myocardium [J]. *N Engl J Med*, 1998(339):173-181.
- [11] Milel D, Jain P, Kiay D, et al. Value and limitation of transesophageal echocardiography in determination of left ventricular volumes and ejection fraction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1992(19):1213-1216.
- [12] 梁天明. 生脉注射液联合黄芪注射液治疗慢性心力衰竭疗效观察[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 7(12):1465.
- [13] 张萌, 高俊虹, 王玉敏, 等. 黄芪极其有效成分治疗心功能衰竭机制的研究[J]. *中医杂志*, 2011, 52(4):349.

(收稿日期:2015-11-22 修回日期:2016-01-25)

(上接第 2216 页)

- infertility risk: a meta-analysis[J]. *Gene*, 2014, 535(2):93-96.
- [2] 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.
- [3] Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(1):211-217.
- [4] He XJ, Ruan J, Du WD, et al. PRM1 variant rs35576928 (Arg>Ser) is associated with defective spermatogenesis in the Chinese Han population[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(6):627-634.
- [5] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[S]. Geneva: WHO, 2010.
- [6] Ge YZ, Xu LW, Jia RP, 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.
- [7] 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.
- [8] Tüttelmann F, Krenková P, R mer 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.
- [9] Jodar M, Oriola J, Mestre G, et al. Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(5 Pt 1):470-485.
- [10] Venkatesh S, Kumar R, Deka D, et al. Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2011, 57(3):124-132.
- [11] 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.
- [12] Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, et al. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility[J]. *Adv Urol*, 2013(2013):578631.
- [13] Sati L, Huszar G. Methodology of aniline blue staining of chromatin and the assessment of the associated nuclear and cytoplasmic attributes in human sperm[J]. *Methods Mol Biol*, 2013(927):425-436.
- [14] Utsuno H, Miyamoto T, Oka K, et al. Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(11):2374-2381.
- [15] Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, et al. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions[J]. *Andrologia*, 2014, 46(2):126-130.

(收稿日期:2015-12-23 修回日期:2016-02-25)