

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.21.008

雌激素受体 α rs3798759 位点多态性与壮族男性生育力的相关性分析*

李洁¹, 陈文成^{2△}, 元辉雄¹, 韦玉霞², 王俊利²

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西百色 533000; 2. 右江民族医学院附属医院生殖中心, 广西百色 533000)

[摘要] **目的** 研究雌激素受体 α (ESR α) 多态性与壮族男性生育力的相关性。**方法** 选取 87 例原发不育男性患者为观察组, 73 例生育男性为对照组, 分别分析两组血清中 E2 和 ESR α 的水平, 采用限制性酶切及 DNA 测序技术对 ESR α rs3798759 位点进行基因分型。**结果** 不育患者 ESR α rs3798759 位点等位基因 G 频率 (28.2%) 显著低于等位基因 T (71.8%) ($P < 0.01$), 分析显示等位基因 G 基可降低男性不育症的发病风险 ($OR = 0.930, 95\% CI: 0.441 \sim 1.963$); 观察组的血清 E2、ESR α 水平均比对照组高, 两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** ESR α 基因 rs3798759 多态性改变可能与壮族男性生育情况相关, 可能与血清 E2 和 ESR α 水平存在一定关系。

[关键词] 雌激素受体 α ; 单核苷酸多态性; 男性不育; 遗传易感性

[中图分类号] R698+.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)21-2796-03

Analysis on correlation between estrogen receptor α rs3798759 locus polymorphism with fertility in Zhuang males*

LI Jie¹, CHEN Wencheng^{2△}, YUAN Huixiong¹, WEI Yuxia², WANG Junli²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China;

2. Reproductive Center, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between estrogen receptor α (ESR α) gene single nucleotide polymorphism (SNP) with fertility in Zhuang males. **Methods** A total of 87 primary infertile males were recruited as the observation group and 73 fertile males were recruited as the control group. Serum E2 and ESR α levels in these two groups were analyzed. The restricted enzyme digestion and DNA direct sequencing techniques were adopted to conduct the genotype on ESR α rs3798759 locus. **Results** The frequency of allele G at ESR α rs3798759 locus in the infertile men was significantly lower than that of allele T (28.2% vs. 71.8%, $P < 0.01$), the analysis showed that allele G could reduce the onset risk of male infertility ($OR = 0.930, 95\% CI: 0.441 \sim 1.963$); moreover, the serum levels of E2 and ESR α in the observation group were higher than those in the control group, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** rs3798759 polymorphism change of ESR α gene may be correlated with fertility in Zhuang males and may have a certain relation with the concentration of serum E2 and ESR α .

[Key words] ESR α ; single nucleotide polymorphism; male infertility; genetic susceptibility

根据世界卫生组织 (WHO) 的标准, 男性因素在降低人类生育能力中起着至关重要的作用^[1]。近年来研究发现, 雌激素受体 α (ESR α) 大量存在于人类生殖组织, 其基因多态性与各种疾病, 在基因型和人类生殖行为之间表现出复杂的相互作用^[2]。造成男性不育的因素包括遗传和环境因素, 其中相关基因突变是一个很重要的因素。因此, 研究参与男性精子发生基因的多态性成为该领域的研究热点。有文献报道, ESR α 基因上的 SNP 位点 rs3798759 与乳腺癌密切相关^[3]; 而与壮族男性生育力的相关性研究报道较少

见。为探明该多态性位点对壮族男性生育力的影响, 本研究分析 ESR α rs3798759 位点等位基因和基因型在生育及不育组男性中的分布频率及血清 E2 和 ESR α 水平对男性生殖的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 10 月至 2017 年 3 月于右江民族医学院附属医院生殖医学科就诊患者为研究对象。观察组 87 例, 为排除女方因素, 未避孕 1 年以上未育的壮族男性患者, 已知临床因素 (如精索静脉曲张、输精管梗阻等) 和遗传因素 (如染色体异常、Y

* 基金项目: 广西壮族自治区教育厅高校科学技术研究重点项目 (ZD2014099)。作者简介: 李洁 (1990—), 技师, 在读硕士, 主要从事医学检验的研究。△ 通信作者, E-mail: chwch3268@sina.com。

表 1 观察组和对照组的各项基本资料($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄(岁)	pH 值	禁欲时间(d)	精液体积(mL)	精子水平($\times 10^6$ /mL)	前向运动精子百分比(%)	正常精子形态百分比(%)	E2(pg/mL)	ESR α (pg/mL)
对照组	87	32.60 \pm 6.32	7.15 \pm 0.34	4.75 \pm 2.26	3.18 \pm 1.14	73.54 \pm 38.24	51.36 \pm 11.90	5.87 \pm 1.80	147.83 \pm 81.46	1.56 \pm 0.90
观察组	73	31.05 \pm 5.82	7.17 \pm 0.41	4.45 \pm 1.88	3.08 \pm 1.55	39.13 \pm 32.25	30.73 \pm 18.02	2.83 \pm 1.79	155.95 \pm 8.44	3.87 \pm 2.21
P		0.096	0.391	0.304	0.634	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

染色体微缺失等)导致不育的患者除外。对照组 73 例,为未借助辅助生殖技术的已婚壮族男性。

1.2 方法

1.2.1 精液分析 所有检测对象标本采集时使用手淫取精法,取精前禁欲 2~7 d,收集于带刻度的、清洁干燥试管内,所有标本均于右江民族医学院附属医院生殖中心取精室内采取,确保送检时间的可控性和及时性。接收时立即放入 37 °C 恒温箱内,并记录标本采集时间。精液常规检测采用西班牙 SCA 全自动精液分析系统,光学显微镜为 OLYMPUS(日本,CX41-32C02),完成常规检测后标本进行 Diff-Quik 快速染色(参照《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版诊断标准)^[4]。

1.2.2 ESR α 位点基因型分析 应用 DNA 提取试剂盒分离外周血 DNA(天根生化科技有限公司),正向引物:5'-TTG AGA AAA AGA TGA GAG GG-3',反向引物:5'-ACT CCC TGA TGT GTG AAC TG-3',由宝生物工程(大连)有限公司合成。建立 20 μ L 聚合酶链反应(PCR)体系,包括 1 μ L 模板 DNA,10 μ L 高保真 2 \times Gold Star Taq Master Mix(大连 TaKaRa),正、反向引物各 1 μ L,双蒸水 7 μ L。反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 继续延伸 10 min。扩增产物为 342 bp,将扩增得到的 PCR 产物用于酶切(北京 NEB)(TrsRI 酶 37 °C 消化 30 min,65 °C 失活 5 min),酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 血清激素水平测定 本实验用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中 E2 和 ESR α 的水平,仪器为 RT-6000(Rayto),试剂由武汉华美生物工程有限公司提供(批号:C9682310141、101013373);测定步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,SNP 位点在检测人群中的分布比较采用 χ^2 检验,检测基因型在不育组及对照组中的分布频率、关联比值比(OR)及 95% 置信区间(95% CI),两组血清 E2 和 ESR α 水平间的关系比较采用 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 调查对象基本情况 两组中调查对象的年龄、pH 值、禁欲时间及精液体积差异均没有统计学意义(P > 0.05),观察组男性的精子水平、前向运动精子百分比及正常精子形态百分比均低于对照组,差异均有

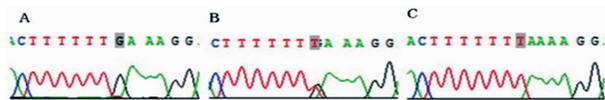
统计学意义(P < 0.05)。观察组的血清 E2、ESR α 水平均比对照组高,两者之间差异有统计学意义(P < 0.05),见表 1。

2.2 ESR α 基因 rs3798759 位点基因型分析 对照组只检测出杂合型 GT,不育男性组均可检测到 GG、GT、TT 3 种基因型,限制性酶切及 DNA 测序结果分别见图 1、2。



M:相对分子质量;GG 纯合型:1,11;TT 野生型:4,15;GT 杂合型:2,5,6,7,8,9,10,12,13,14;GG:342 bp;GT:69/273/342 bp;TT:69/273 bp

图 1 目的片段限制性酶切产物电泳结果



A:GG 突变型;B:GT 杂合型;C:TT 野生型

图 2 目的片段 ESR α 位点 DNA 测序结果

2.3 ESR α 基因 rs3798759 位点多态性与壮族男性生育力的相关性分析 不育组男性等位基因 G 频率为 28.2%,低于生育组(50.0%),差异有统计学意义($\chi^2 = 16.05, P < 0.01$),等位基因 G 可降低男性不育症的发病风险 [OR = 0.930, 95% CI (0.441~1.963)]。见表 2。

表 2 两组 ESR α SNP(rs3798759)基因型和等位基因频率

项目	观察组[n(%)]	对照组[n(%)]
TT	47(45.4)	0
GT	31(34.2)	73(100.0)
GG	9(6.4)	0
T	125(72.7)	73(50.0)
G	49(27.3)	73(50.0)

表 3 ESR α 基因 rs3798759 多态位点基因型与精液常规参数的关联分析($\bar{x} \pm s$)

项目	n	精子水平($\times 10^6$ /mL)	前向运动精子百分比(%)
TT	47	70.64 \pm 33.23	52.26 \pm 20.46
GT	31	71.70 \pm 42.91 ^a	57.29 \pm 2.10 ^a
GG	9	90.49 \pm 45.50 ^a	48.37 \pm 24.05 ^a

^a: P > 0.05,与 TT 比较

2.4 ESR α 基因 rs3798759 多态与精液质量的关联

分析 单因素方差分析(One-way ANOVA)结果显示 ESR α 基因 rs3798759 多态性与精子水平、前向运动精子百分比之间不存在显著关联,见表 3。

3 讨 论

近年来多项研究探讨雌激素受体基因多态性与男性不育的相关性,结果因研究对象遗传背景差异而不同。随着现在生活成本增高,生活、经济压力增大,不育症发病率增高,壮族男性的生育能力也受到影响。关于壮族男性生育情况的研究涉及的有 GSTT1 和 GSTM1 基因多态性、雌激素 β 受体基因 Rsa I 多态性、CYP1A2 基因多态性分析等方面的研究^[5-7]。本文分析 ESR α rs3798759 位点与壮族男性生育力的关系。研究对象在年龄、pH 值、禁欲时间及精液体积差异均没有统计学意义($P>0.05$),观察组男性的精子水平、前向运动精子百分比及正常精子形态百分比均低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。本研究发现等位基因 G 可以降低壮族男性不育的易感性,其不育症的发病风险为等位基因 T 基因型的 0.93 倍,但是不同基因型与精液常规参数之间不存在相关性。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为其他尚未发现的致病因素所掩盖^[8]。

遗传因素是男性不育众多病因中不可忽略的一种,全世界约 15% 的男性不育是由基因突变引起的^[9]。雌激素通过 ESR α 调节转录过程,包括核转录、结合特殊的效应原件和目的基因的表达进行调控,核雌激素受体是调节雌激素复合物功能的转录因子,即使没有直接结合到靶基因的 DNA 上也可以通过其他类蛋白质相互作用,从而调控基因表达^[10]。雌激素对人类生殖系统的分化、成熟和功能发挥着重要的作用,对促性腺激素具有负反馈作用,通过雌激素受体会对生殖参数产生不利的影响^[11]。有报道表明 ESR 基因多态性改变可影响常规精液参数^[12]。

雌激素在调节精子的发生中起着直接的作用,影响生殖细胞的增殖、分化和凋亡^[13],也是由于在精子发生过程中广泛存在的雌激素受体^[14]。研究表明,雌激素可以调节睾丸支持细胞的核转录,维持睾丸的正常发育,影响生殖功能^[15-16]。雌激素对生殖细胞的死亡和凋亡的信号机制具有调控作用,诱导精子的激活,通过其受体信号通路调控男性精子生成^[17]。E2 通过结合经典的细胞内雌激素受体或者膜雌激素受体触发基因组和非基因组信号转导通路,影响和作用于睾丸细胞、生殖细胞及成熟精子^[18]。LUCAS 等^[19]研究发现,E2 激活 ESR α 基因可参与未成熟支持细胞的增殖,这表明雌激素作用可能是调节精子发生和生育的关键步骤。ESR α 基因敲除雄鼠出生后睾丸正常,青春期后睾丸开始变性,成年期睾丸萎缩,精子发生障碍和精子密度显著降低,并出现不育^[20-21],进一

步说明由 ESR α 介导的雌激素对精子发生具有重要作用。本研究的结果显示观察组血清 E2、ESR α 水平均明显高于对照组,血清 E2、ESR α 水平相与男性生殖具有一定的相关性,推测 ESR α 基因变异对男性不育的影响是通过介导 E2 和 ESR α 水平改变实现的。宋明哲等^[22]研究中也发现血清 E2 水平升高提示精子数目减少,可能是因为 E2 通过多种途径调控或干扰精子的生成所致。虽然上述等位基因频率在观察组与对照组的分布频率之间差异有统计学意义,但要确定血浆 E 与 ESR α 水平和各基因型之间关系还需要加大样本量再进行研究。

综上所述,基因 ESR α rs3798759 位点的变异可能与壮族男性不育存在关联性,但研究结果仍需通过大规模研究进行证实。

参考文献

- [1] COOPER T G, NOONAN E, VON ECKARDSTEIN S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics[J]. Hum Reprod Update, 2010, 16 (3):231-245.
- [2] CORBO R M, ULIZZI L, PIOMBO L, et al. Estrogen receptor alpha polymorphisms and fertility in populations with different reproductive patterns[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(8):537-540.
- [3] 徐迎春,张凤春,王红霞,等. ESR1 基因单核苷酸多态性与乳腺癌内分泌治疗疗效的关系[J]. 上海交通大学学报(医学版),2008(8):925-929.
- [4] ORGANISATION W H. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed[M]. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [5] 陈文成,康熙雄,韦叶生,等. 壮族人群少精不育患者精细胞 GSTT1 和 GSTM1 基因研究[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(5):425-427.
- [6] 陈文成,康熙雄,周亚莉,等. 壮族人群少精不育患者雌激素 β 受体基因 Rsa I 多态性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18(2):103-105.
- [7] 陈秉朴,黄瑞雅,韦叶生,等. 壮族人群少精不育患者精子 CYP1A2 基因多态性研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(15): 1555-1556.
- [8] 李俊,刘芳,宋亚曼,等. 人鱼精蛋白 1 多态性与汉族男性生育力的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26 (13):48-51.
- [9] KRAUSZ C, ESCAMILLA A R, CHIANESE C. Genetics of male infertility: from research to clinic[J]. Reproduction, 2015, 150(5):R159-174.
- [10] 吴艳,卞慧敏. 雌激素受体信号转导途径和功能[J]. 安徽医药, 2012, 16(2):242-244.
- [11] DUMASIA K, KUMAR A, KADAM L, et al. Effect of estrogen receptor-subtype-specific ligands on fertility in adult male rats[J]. J Endoc, 2015, 225(3):169-180.
- [12] SAFARINEJAD M R, SHAFIEI N, SAFARINEJAD S. Association of polymorphisms in the(下转第 2803 页)

- 的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(3): 354-357.
- [10] 全天一, 徐学虎, 伍尚标, 等. 血液中 miRNA 用于结直肠癌早期诊断的前期研究[J]. 临床军医杂志, 2013, 41(4): 355-356.
- [11] 郑建建, 俞富军, 董培红, 等. 结直肠癌患者血浆中的 miR-106a 表达及其与预后的关系[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(9): 2071-2073.
- [12] 吕望, 袁小帅, 汪路明, 等. miR-106a 在食管鳞癌中的表达及对耐药基因的调控作用[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(5): 582-587.
- [13] 李敏, 张向宁, 魏媛, 等. microRNA-106a 促进上皮性卵巢癌细胞系迁移和侵袭的研究[J]. 现代妇产科进展, 2015, 24(11): 809-813.
- [14] 夏丽琴, 冯忠明, 陈旭, 等. 网络筛选乳腺癌相关 miRNAs 及 miR-106a-5p 对乳腺癌细胞侵袭迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(2): 130-136.
- [15] YUE B, SUN B, LIU C, et al. Long non-coding RNA Fer-1-like protein 4 suppresses oncogenesis and exhibits prognostic value by associating with miR-106a-5p in colon cancer[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(10): 1323-1332.
- [16] XIA T, LIAO Q, JIANG X, et al. Long noncoding RNA associated-competing endogenous RNAs in gastric cancer[J]. *Sci Rep*, 2014(4): 6088.
- [17] 方唯意, 江庆萍, 刘真, 等. TGFBR2 表达下调可能是鼻咽癌的恶性生物标志[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(24): 3588-3591.
- [18] FENG B, DONG T T, WANG L L, et al. Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43452.
- [19] ZHI F, ZHOU G X, SHAO N Y, et al. miR-106a-5p inhibits the proliferation and migration of astrocytoma cells and promotes apoptosis by targeting FASTK[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72390.
- [20] 黄许森, 王宇, 黄海舸, 等. PTEN 基因在结肠癌患者不同组织中表达的意义[J]. 结直肠肛门外科, 2016, 35(2): 113-115.
- [21] WANG Z, HOU X, QU B, et al. Pten regulates development and lactation in the mammary glands of dairy cows [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102118.
- [22] 鲍欣, 杨艳明, 刘念, 等. miR-21 在结肠癌与癌旁组织中的表达及其临床意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2013, 39(2): 318-321.
- [23] 李秋娟, 王晓华, 魏亚明, 等. miR-106a 和 miR-24-1 在结肠癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(3): 303-306.
- [24] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [25] HE Y Z, WANG G Q, ZHANG L, et al. Biological effects and clinical characteristics of microRNA-106a in human colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1, B): 830-836.
- [26] HOFSLI E, SJURSEN W, PRESTVIK W S, et al. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(8): 1712-1719.

(收稿日期: 2017-12-25 修回日期: 2018-02-26)

(上接第 2798 页)

- estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 122(4): 193-203.
- [13] CHIMENTO A, SIRIANNI R, CASABURI I, et al. Role of estrogen receptors and g protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014(5): 1.
- [14] CARREAU S, BOURAIMA-LELONG H, DELALANDE C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis[J]. *Adv Med Sci*, 2012, 57(1): 31-36.
- [15] FILIPIAK E, SULIBORSKA D, LASZCZYNSKA M A, et al. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012, 50(3): 340-345.
- [16] ROYER C, LUCAS T F, LAZARI M F, et al. 17 Beta-Estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat sertoli cells[J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(4): 108.
- [17] CORREIA S, CARDOSO H J, CAVACO J E, et al. Oestrogens as apoptosis regulators in mammalian testis; angels or devils? [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2015(17): e2.
- [18] DOSTALOVA P, ZATECKA E, DVORAKOVA-HORTOVA K. Of oestrogens and sperm; a review of the roles of oestrogens and oestrogen receptors in male reproduction[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): E904.
- [19] LUCAS T F, SIU E R, ESTEVES C A, et al. 17 beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells[J]. *Biol Reprod*, 2008, 78(1): 101-114.
- [20] 李江源. 精子发生的内分泌激素调节[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(9): 697-702.
- [21] 李冬梅, 韩晓冬. 雌激素对雄性生殖功能的影响[J]. 中华男科学, 2004, 10(3): 211-214.
- [22] 宋明哲, 叶丽君, 尹彪, 等. 精浆和血清生殖激素与精液质量的关系[J]. 生殖医学杂志, 2016, 25(4): 341-346.

(收稿日期: 2017-10-06 修回日期: 2018-01-11)