

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.018

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190102.1420.004.html(2019-01-03)

贵州非阻塞性无精症与易感基因多态性的相关研究*

王婵娟^{1,2}, 何燕^{1,2}, 张婷^{1,2}, 单可人^{1,2}, 禹文峰^{1,2}, 官志忠^{1,2}, 安宇^{3△}

(1. 贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵阳 550004; 3. 贵州省人民医院中心实验室, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 探讨贵州人群非阻塞性无精症(NOA)与相关易感基因(PRMT6、PEX10/MMEL1、SOX5、LOC100289473/SIRPA/SIRPG)的4个单核苷酸多态性(SNP)位点的关联。**方法** 选取贵州地区临床确诊的NOA患者(疾病组)及男性健康体检汉族人群(对照组)为研究对象,其中NOA患者已排除其他泌尿生殖系统疾患,无特殊病史及家族史,对所有研究人群采用TaqMan-MGB探针实时荧光聚合酶链反应SNP分型技术分析rs12097821(G/T)、rs2477686(G/C)、rs10842262(G/C)及rs6080550(C/T)4个SNP位点的多态性,并采用SPSS17.0软件进行统计学分析。**结果** rs12097821、rs2477686及rs6080550基因型频率分布在疾病组与对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。疾病组rs2477686多态性位点C等位基因显著频率高于对照组($P < 0.05$),疾病组rs12097821和rs6080550多态性位点T等位基因频率也分别显著高于对照组($P < 0.05$)。而rs10842262位点基因型及等位基因频率分布在疾病组与对照组中的分布差异无统计学意义。**结论** rs2477686、rs12097821及rs6080550位点多态性与贵州人群NOA可能存在一定的相关性。

[关键词] 无精子症;贵州;非阻塞性无精症;基因多态性**[中图分类号]** R394.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1697-04

Association investigation of susceptibility gene polymorphism and non-obstructive azoospermia in Guizhou region*

WANG Chanjuan^{1,2}, HE Yan^{1,2}, ZHANG Ting^{1,2}, SHAN Keren^{1,2},
YU Wenfeng^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2}, AN Yu^{3△}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education in Endemic and Ethnic Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Key Laboratory of Guizhou in Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Central Laboratory, Guizhou People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association of non-obstructive azoospermia (NOA) in Guizhou region with 4 single nucleotide polymorphism (SNP) of related susceptibility genes (PRMT6, PEX10/MMEL1, SOX5, LOC10028947/SIRPA/SIRPG). **Methods** NOA patients with clinical diagnosis (the disease group) and healthy Han population (the control group) from Guizhou region were selected. NOA patients have been excluded from other urogenital diseases without special medical history or family history. Allelic frequencies of 4 SNP [rs12097821 (G/T), rs2477686 (G/C), rs10842262 (G/C) and rs6080550 (C/T)] were identified by Taqman-MGB probe SNP-test. SPSS17.0 software was conducted for statistical analysis. **Results** The differences in genotype frequency distributions of rs12097821, rs2477686 and rs6080550 between the disease group and the control group were statistically significant ($P < 0.05$). The frequency of C allele at polymorphic site rs2477686 in the disease group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the frequencies of T allele at polymorphic site rs12097821 and rs6080550 in the disease group were also significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). But there was no significant relationship between the disease group and the control group in rs10842262 SNP. **Conclusion** Rs12097821, rs2477686 and rs6080550 SNP may have correlation with NOA in Guizhou.

[Key words] azoospermia; Guizhou; non-obstructive azoospermia; gene polymorphism

* 基金项目:贵州省卫生和计划生育委员会科学技术基金项目(gzwwkj2014-1-002);贵州省科技厅科学技术基金(黔科合J字[2013]2040号,黔科合J字[2013]2177号);贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合KY字(2012)072号);贵州省科技厅国际合作项目(黔科合G字[2011]7038号);贵州省科技厅科技创新人才团队建设项目(黔科合平台人才[2016]5612);贵州省卫生厅基金项目(gzwwkj2012-1-006)。作者简介:王婵娟(1982-),副教授,硕士,主要从事医学分子生物学。△ 通信作者, E-mail: matrix_ay@hotmail.com。

临床调查显示世界范围内约有 5% 的夫妇受到不孕的困扰,其中有 50% 是由于男性不育而造成^[1],其中非阻塞性无精症(non-obstructive azoospermia, NOA)是最常见的男性不育症类型之一,其发病率在成年男性中高达 1%,该病的发病机制并不十分清楚,目前尚无十分有效的防治手段,给家庭社会带来的危害巨大^[2]。越来越多的研究显示遗传因素如影响精子发育的基因与 NOA 相关^[3-11]。近年来,对 NOA 全基因组关联分析的研究发现了一些潜在的易感基因位点,分别是位于 1p13.30、1p36.32、12p12.10 及 20p13.00 的 4 个单核苷酸多态性(SNP)位点,它们分别对应了 PRMT6、PEX10/MMEL1、SOX5 和 LOC100289473/SIRPA/SIRPG 几个相关基因^[12]。目前这些位点与无精症之间的相关性并不十分明确,本研究对贵州人群 NOA 患者及正常健康对照人群中上述易感基因的 4 个单核苷酸多态性(SNP)位点进行了多态性分析,得到其基因型频率的分布状况,并探讨易感基因的 SNP 与 NOA 的关联,以期为早期诊断和干预提供一定的依据和线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究在知情同意的原则下随机抽取贵州省人民医院临床确诊的 NOA 患者病例(疾病组)以及正常健康体检人群(对照组)为研究对象,研究对象均为汉族人群,样本总量 319 例,其中对照组 174 例,年龄(48.3±12.9)岁,疾病组 145 例,年龄(46.5±20.2)岁。入选的疾病组人群平均不育年限(4.5±1.2)年,临床检查已排除精索静脉曲张、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,经精液检查,均确诊为 NOA。研究对象组间年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 (1)试剂:人基因组 rs12097821(G/T)、rs2477686(G/C)、rs10842262(G/C)及 rs6080550(C/T)SNP 位点 TaqMan 探针分型试剂盒[TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, 英潍捷基(上海)贸易有限公司]。(2)仪器:DU 640 蛋白质核酸定量分析仪购自美国 Beckman 公司。ABI StepOne Plus 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)仪购自美国应用生物系统公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取与定量 对研究人群全血采用酚/氯仿抽提法抽提基因组 DNA,后 TE(Tris 和乙二胺四乙酸缓冲液)溶解,DU640 核酸蛋白分析仪测定计算 DNA 的含量,同时检测 DNA 样品的纯度,将每个标本稀释成 20 ng/ μ L 的应用液。

1.3.2 SNP 位点的 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 分析 采用人基因组 rs12097821(G/T)、rs2477686(G/C)、rs10842262(G/C)及 rs6080550(C/T)SNP 位点 TaqMan 探针分型试剂盒进行基因分

型,PCR 扩增体系为 10.00 μ L,含 DNA 模板 1.50 μ L、 $2\times$ TaqMan Genotyping Master Mix 5.00 μ L、 $40\times$ TaqMan SNP Genotyping Assay Mix 0.25 μ L、ddH₂O 3.25 μ L。ABI StepOne Plus RT-PCR 仪进行 PCR 扩增,每 96 孔板设置 3 个空白对照(NTC),反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;92 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,共 40 个循环。ABI StepOne Plus RT-PCR 仪在上述 PCR 基础上进行等位基因识别分析,两个位点均设置 FAM、VIC 探针和样品孔、3 个 NTC 空白对照,运用 StepOne Software v2.1 软件,读取荧光信号,通过 X、Y 轴散点图分析各样本的基因型。根据 StepOne Software v2.1 软件分析结果,对每种基因型随机选取样本进行测序验证,每个基因型选取 2~3 个样本,而对 StepOne Software v2.1 软件未能直接分型的样本,则直接测序。

1.4 统计学处理 根据 StepOne Software v2.1 软件分析和测序结果确定样本的基因型,基因型频率和等位基因频率用直接计数法计算。应用 SPSS17.0 统计软件处理数据。组间基因型频率和等位基因频率比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SNPstats 软件对 SNP 位点进行连锁不平衡分析,SHESis 软件构建 SNP 单倍型并统计其频率分布。

2 结果

2.1 各个 SNP 位点基因型和等位基因频率统计分析 在对照人群中 4 个 SNP 位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.064、0.170、1.000、1.000$),见表 1、2。在检测的 4 个 SNPs 多态性位点中,rs2477686(G/C)、rs12097821(G/T)及 rs6080550(C/T)基因型频率分布在疾病组与对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。疾病组 rs2477686 多态性位点 C 等位基因频率显著高于对照组($P<0.05$),疾病组 rs12097821 和 rs6080550 多态性位点的 T 等位基因频率也分别显著高于对照组($P<0.05$),而 rs10842262 位点基因型及等位基因频率分布在疾病组与对照组中的分布差异无统计学意义。另一方面,基因型频率结果显示 rs2477686(C/C)、rs12097821(T/T)及 rs6080550(A/A)分别增加人群中的 NOA 患病风险,OR 值分别为 2.64、2.61 及 13.52,且差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 1 SNP 位点基因型分布[n(%)]

SNP	基因型 1	基因型 2	基因型 3	χ^2	P
rs2477686	GG	GC	CC	13.800	0.001
	疾病组	84(57.9)	29(20.0)		
rs12097821	GG	GT	TT	9.923	0.007
	疾病组	76(52.4)	39(26.9)		
rs6080550	AA	AG	GG	13.52	0.001
	疾病组	99(56.9)	60(34.5)		

续表 1 SNP 位点基因型分布[n(%)]

SNP	基因型 1	基因型 2	基因型 3	χ^2	P
rs10842262	GG	GC	CC	0.684	0.710
疾病组	53(36.6)	70(48.3)	22(15.2)		
对照组	57(32.8)	86(49.4)	31(17.8)		
rs6080550	CC	CT	CC	26.430	<0.001
疾病组	84(57.9)	35(24.1)	26(17.9)		
对照组	131(75.3)	40(23.0)	3(1.7)		

表 2 SNP 位点等位基因频率分布[n(%)]

SNP	等位基因 1	等位基因 2	χ^2	P
rs2477686	G	C	4.594	0.032
疾病组	197(67.9)	93(32.1)		
对照组	263(75.6)	85(24.4)		
rs12097821	G	T	5.197	0.023
疾病组	191(65.9)	99(34.1)		
对照组	255(73.3)	93(26.7)		
rs10842262	G	C	0.677	0.411
疾病组	176(60.7)	114(39.3)		
对照组	200(57.5)	148(42.5)		
rs6080550	C	T	27.00	<0.001
疾病组	203(70.0)	87(30.0)		
对照组	302(86.8)	46(13.2)		

2.2 连锁不平衡分析与单倍型分析 由于 rs2477686(G/C)、rs12097821(G/T)分别位于 1 号染色体短臂的 3 区 6 带和 1 区 3 带,故采用 SNPstats 软

件对疾病组与对照组的上述 2 个 SNPs 位点进行连锁不平衡分析。结果显示,疾病组与对照组各位点之间存在连锁不平衡现象,且具有较强的连锁程度($D' = 0.052, D' > 0.05$)。应用 SHEsis 软件对上述 2 个连锁不平衡的 SNP 位点构建单倍型并统计其在疾病组与对照组中的频率分布。结果 rs2477686 与 rs12097821 构建的 C-T 单倍型频率分布在疾病组及对照组中差异具有统计学意义($P < 0.001$),OR 值为 2.972,95%CI(1.645~5.372)。见表 4。

表 3 4 个 SNP 位点基因型频率患病风险 OR 值[n(%)]

SNP	对照组	疾病组	OR(95%CI)	P
rs2477686				<0.001
G/G	104(59.8)	84(57.9)	1	
G/C	55(31.6)	29(20.0)	0.65(0.38~1.11)	
C/C	15(8.6)	32(22.1)	2.64(1.34~5.20)	
rs12097821				0.007
G/G	99(56.9)	76(52.4)	1	
G/T	60(34.5)	39(26.9)	0.85(0.51~1.40)	
T/T	15(8.6)	30(20.7)	2.61(1.31~5.18)	
rs10842262				0.710
G/G	57(32.8)	53(36.6)	1	
G/C	86(49.4)	70(48.3)	0.88(0.54~1.43)	
C/C	31(17.8)	22(15.2)	0.76(0.39~1.48)	
rs6080550				<0.001
G/G	131(75.3)	84(57.9)	1	
G/A	40(23.0)	35(24.1)	1.36(0.80~2.32)	
A/A	3(1.7)	26(17.9)	13.52(3.97~46.06)	

表 4 1 号染色体单倍型频率分布分析

rs2477686-rs12097821	对照组[n(%)]	疾病组[n(%)]	χ^2	P	OR(95%CI)
C-G	67.86(19.5)	54.29(18.7)	0.062	0.804	0.951(0.640,1.414)
C-T	17.14(4.9)	38.71(13.3)	14.041	<0.001	2.972(1.645,5.372)
G-G	190.14(54.6)	136.71(47.1)	3.561	0.059	0.740(0.542,1.012)
G-T	72.86(20.9)	60.29(20.8)	0.002	0.964	0.991(0.675,1.455)

3 讨论

无精症的原因复杂多样,一般分为阻塞性无精症(obstructive azoospermia,OA)和 NOA。综合各文献报道结果,NOA 患者占男性不育者 6%~26%。NOA 是特发性男性不育的重要原因之一,其发病机制到目前为止不十分清楚,除去睾丸缺乏生精细胞外,大多无精症睾丸病理表现为生精停滞^[13]。基于此,临床和科研人员投入大量的精力去研究无精症患者中精子发生相关基因的是否异常,以期找到发病的原因,从而达到干预治疗无精症的目的^[14]。尽管早期研究发现 Y 染色体的微缺失可以直接导致 NOA,然而越来越多的临床实践表明 Y 染色体的微缺失只是原因之一,其他许多遗传因素如影响精子发育的基因也与之相关^[3-11]。

近年来,研究发现了许多与 NOA 相关联的基因如 SPO11、EIF5A2、NR5A1、ART3、ZNF230、COX10、MTHFR 等,但研究都存在样本规模较小的问题,研究数据具有一定局限性,且所研究的基因与疾病的关联程度判断的主观因素大,存在很大的片面性^[15-16]。目前这些研究的不足之处可以采用全基因组关联研究技术进行弥补。SNP 作为人类可遗传变异中最常见的一种,占有已知多态性的 90%以上,位于基因调控区和精氨酸编码区可影响基因表达、引起蛋白结构改变、造成个体差异,已成为多基因疾病关联研究的热点。在一项 NOA 全基因组关联分析研究中,通过 GWAS 分析揭示了 4 种全新的中国人群 NOA 易感基因位点,该研究收集了中国男性人群 2 927 例 NOA 患者和 5 734 例健康对照,并且从 906703 个 SNP 位点

中筛选确定分别位于染色体 1p13.30、1p36.32、12p12.10 和 20p13.00 的 4 个 SNP 位点,上述位点在 NOA 和正常群体存在显著性变异;该研究认为这些区域是导致 NOA 发生的遗传易感因素,而在这些区域中 PRMT6、PEX10/MMEL1、SOX5 和 LOC100289473 等相关基因可能与 NOA 关联最紧密^[12]。但这些位点与无精症之间的相关性还不是十分明确,各个位点间的关联也不十分清晰。

本研究对贵州人群 NOA 与正常人群进行了上述相关的位点多态性研究,在检测的 4 个 SNPs 多态性位点中,rs2477686(G/C)、rs12097821(G/T)及 rs6080550(C/T)基因型频率分布在贵州人群疾病组与对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。疾病组 rs2477686 多态性位点 C 等位基因显著高于对照组($P < 0.05$),疾病组 rs12097821 和 rs6080550 多态性位点的 T 等位基因和 A 等位基因也分别显著高于对照组($P < 0.05$),而 rs10842262 位点基因型及等位基因频率分布在疾病组与对照组中的分布无统计学差异。研究结果提示 rs2477686、rs12097821 及 rs6080550 位点多态性与贵州人群 NOA 可能存在一定的相关性,携带 rs2477686 C 等位基因、rs12097821 T 等位基因及 rs6080550 T 等位基因者可能使 NOA 发病风险增加。

另一方面,连锁不平衡分析与单倍型分析结果显示:rs2477686 与 rs12097821 构建的 C-T 单倍型频率分布在疾病组及对照组中差异具有统计学意义,提示单倍型 C-T 具有增加 NOA 的发病风险。而其他的单倍型频率组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示与疾病患病风险关联性较小。

本研究提示 rs2477686、rs12097821 及 rs6080550 位点多态性与贵州人群 NOA 可能存在一定的相关性,携带 rs2477686 C 等位基因、rs12097821 T 等位基因及 rs6080550 T 等位基因者可能使 NOA 发病风险增加。rs12097821 位点与 PRMT6 基因有关,而 LUO 等^[17]最近发现 PRMT6 能够被雄激素受体下调,并且调控生精细胞的迁移以及凋亡,从而推测出其能在精子发生过程中扮演者重要的角色。rs2477686 与基因 PEX10 关联,CHEN 等^[18]发现果蝇 PEX2 与 PEX10 在果蝇的雄性生育中发挥至关重要的作用。rs6080550 与基因 SIRPA/SIRPG 相关,LU 等^[19]发现 SIRPA/SIRPG 的蛋白编码区的突变与 NOA 有关。

综上所述,上述这些 3 个 SNP 相关位点周围存在着与 NOA 发病相关的基因,提示和 NOA 的发病密切相关,但是确切的关系和发病机制仍有待于进一步的研究,而且 SNP 位点附近是否存在其他新的基因或者表达调控元件都值得进一步探索。这些研究

的结果将为早期诊断和干预提供一定的依据和线索,以期最终达到减少不孕不育、提高人口素质的目标,具有重要的临床意义和社会意义。

参考文献

- [1] HIRSH A. Male subfertility[J]. Br Med J, 2003, 327(7416): 669-672.
- [2] MADURO M R, LAMB D J. Understanding new genetics of male infertility[J]. J Urol, 2003, 168(5): 2197-2205.
- [3] O'FLYNN O'BRIEN K L, VARGHESE A C, AGARWAL A. The genetic causes of male factor infertility: a review[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1): 1-12.
- [4] 于佳, 杨梦怡, 王海菲, 等. 宁夏地区 GRTH 基因多态性与特发性无精症的关联研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(5): 3-4.
- [5] 周生辉, 孙秀芹, 牛学英, 等. 济宁地区汉族人群 MTHFR 基因的 SNP 与非梗阻性无精子症和重度少弱精子症相关性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2018, 26(5): 111-113.
- [6] 刘芳, 刘永杰, 包俊华, 等. PRMT6、PEX10、SOX5 和 CYP19 基因多态性与生精障碍相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39(2): 97-100.
- [7] 马芳芳, 谭振军, 王厚照. 厦门地区 MTHFR 基因 C677T 多态性与男性不育的相关性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(8): 16-17.
- [8] 张健, 吕莱琦, 洪慧慧, 等. XRCC1 基因 rs25487 位点多态性与陕西回族男性人群非梗阻性无精症的相关性[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(2): 256-259.
- [9] 宋平平, 邹沙沙, 杨娟娟, 等. 中国汉族人群 HLA-DRA 基因 rs7194 位点多态性与非梗阻性无精症易感性的关联性分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(1): 65-69.
- [10] HAJL EBRAHIM ZAKGAR H, MOHSENI MEYBODI A, SABB AGHZAN M, et al. Association of two polymorphisms in H2B. W gene with azoospermia and severe oligozoospermia in an iranian population[J]. Int J Fertil Steril, 2015, 9(2): 205-214.
- [11] WEEDIN J, KHERA M, LIPSHULTZ L I. Varicocele repair in patients with nonobstructive azoospermia: a meta analysis[J]. J Urol, 2010, 183(6): 2309-2315.
- [12] HU Z B, XIA Y A, GUO X E, et al. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia[J]. Nat Genet, 2012, 44(2): 183-186.
- [13] ZHANG J, QIU S D, LI S B, et al. Novel mutations in ubiquitin-specific protease 26 gene might cause spermatogenesis impairment and male infertility[J]. Asian J Androl, 2007, 9(6): 809-814.
- [14] EDDY E M. Male germ cell gene expression[J]. Recent Prog Horm Res, 2002, 57(1): 103-128.
- [15] BASHAMBOO A, FERRAZ-DE-SOUZA B, LOURENCO D, et al. Human male infertility (下转第 1704 页)

- na; tailored treatments for patients with early breast cancer. *Ecanermedscience*. 2017, 11; 732.
- [4] HAMMOND M, HAYES D F, DOWSETT M A, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(16): 2784-2795.
- [5] WOLFF A C, HAMMOND M, HICKS D G, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline update[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3997.
- [6] GOLDFHIRSCH A, WINER E P, COATES A S, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9): 2206-2223.
- [7] ELLSWORTH R E, KOSTYNIK P J, CHI L H, et al. Organochlorine pesticide residues in human breast tissue and their relationships with clinical and pathological characteristics of breast cancer[J]. *Environmental Toxicology*, 2018, 33(8): 876-884.
- [8] PEROU C M, SORLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752.
- [9] GOLDFHIRSCH A, WOOD W C, COATES A S, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8): 1736-1747.
- [10] SALHIA B, TAPIA C, ISHAK E A, et al. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology[J]. *BMC Womens Health*, 2011, 11; 44.
- [11] LEONG S P, SHEN Z Z, LIU T J, et al. Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries [J]. *World J Surg*, 2010, 34(10): 2308-2324.
- [12] KIM K J, HUH S J, YANG J H, et al. Treatment results and prognostic factors of early breast cancer treated with a breast conserving operation and radiotherapy[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2005, 35(3): 126-133.
- [13] VALLEJOS C S, GÓMEZ H L, CRUZ W R, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database[J]. *Clin Breast Cancer*, 2010, 10(4): 294-300.
- [14] LI J H, CHEN Z B, SU K A, et al. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7): 8500-8505.
- [15] 李双, 范红敏, 肖菲菲, 等. 不同分子分型及临床病理特征与乳腺癌术后患者预后的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(1): 39-44.
- [16] 马建萍, 马芬兰. 不同分子分型乳腺癌的临床病理特征及预后的关系[J]. *实用癌症杂志*, 2017, 32(12): 2041-2044, 2048.
- [17] FALLAHPOUR S, NAVANEELAN T, DE P, et al. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data[J]. *CMAJ Open*, 2017, 5(3): E734-E739.
- [18] LEHMANN B D, BAUER J A, CHEN X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7): 2750-2767.
- [19] ECHAVARRIA I, LÓPEZ-TARRUELLA S, PICORNELL A, et al. Pathological response in a triple-negative breast cancer cohort treated with neoadjuvant carboplatin and docetaxel according to lehmann's refined classification[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(8): 1845-1852.
- [20] PURUSHOTHAM A, SHAMIL E, CARIATI M, et al. Age at diagnosis and distant metastasis in breast cancer—a surprising inverse relationship[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(10): 1697-1705.
- [21] 李杰宝, 喻晓程, 田野. 乳腺癌分子分型与临床病理参数的关系及预后[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(6): 1027-1029.
- [22] SHARMA B, SINGH R K. Emerging candidates in breast cancer stem cell maintenance, therapy resistance and relapse[J]. *J Carcing*, 2011, 10; 36.

(收稿日期: 2018-10-18 修回日期: 2019-01-23)

(上接第 1700 页)

- associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor1 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(4): 505-512.
- [16] MATZUK M M, LAMB D J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges[J]. *Nat Med*, 2008, 14(11, S): 1197-1213.
- [17] LUO M L, LI Y C, GUO H, et al. Protein arginine methyltransferase 6 involved in germ cell viability during spermatogenesis and down-regulated by the androgen receptor [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29467-29481.
- [18] CHEN H, LIU Z, HUANG X. Drosophila models of peroxisomal biogenesis disorder: peroxins are required for spermatogenesis and very-long-chain fatty acid metabolism[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(3): 494-505.
- [19] LU C C, XU M F, WANG R, et al. Pathogenic variants screening in five non-obstructive azoospermia-associated genes[J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(2): 178-183.

(收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2018-11-23)