DOI:10.16016/j.1000-5404.201410091

论著

谷胱甘肽S-转移酶基因多态性与特发性男性不育症精子线粒体膜电位的相关性

唐开发[1],张 洋[1],赵伊立[1],王新阳[2],邹铁军[3],孙 发[1],邢俊平[2] (550004 贵阳,贵州医科大学附属医院泌尿外科[1];710061 西安,西安交通大学医学院第一附属医院泌尿外科[2];710068 西安,陕西省人民医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 该研究旨在探讨谷胱甘肽S-转移酶基因M1、T1及P1(GSTM1、T1及P1)基因多态性与特发性男性不育症患者精子线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)的相关性。**方法** 该研究包括246例特发性少弱精子性男性不育症患者。采用聚合酶链反应(PCR),聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法分别对GSTM1、T1和P1基因进行分型。采用5,5′,6,6′-四氯-1,1′,3,3′-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物(JC-1)染色剂标记流式细胞仪检测精子线粒体膜电位(MMP)进行检测分析。**结果** GSTM1及T1基因缺失型组特发性少弱精子性男性不育症患者正常MMP精子百分比显著低于野生型组($P<0.01$);且二者间具有协同效应。GSTP1基因突变型组正常MMP精子百分比与GSTP1基因野生型组想比较,无统计学差异($P=0.085$)。**结论** GSTM1、T1基因缺失型是特发性男性不育症精子MMP的危险因素。

[关键词] 男性不育症;谷胱甘肽S-转移酶;基因多态性;线粒体膜电位
[中图法分类号] R329.24; R394.3; R698.2 [文献标志码] A

Correlation of glutathione S-transferase polymorphisms with sperm mitochondrial membrane potential in idiopathic male infertility

Tang Kaifa[1], Zhang Yang[1], Zhao Yili[1], Wang Xinyang[2], Zou Tiejun[3], Sun Fa[1], Xing Junping[2] ([1]Department of Urology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [2]Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University; [3]Department of Urology, Shaanxi People's Hospital, Shaanxi Province, Xi'an, 710068, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 gene (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) polymorphisms with sperm mitochondrial membrane potential (MMP) in idiopathic male infertility. **Methods** A total of 246 patients with idiopathic male infertile admitted in the First Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University from September 2008 to June 2012 were enrdled in this study. Polymerase chain reaction (PCR) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) were used to identify the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genotypes in the sperm. Then flow cytometry using 5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine (JC-1) as staining agent was employed to detect the sperm MMP. **Results** The percentage of normal sperm MMP was significantly lower in the GSTM1 and GSTT1 deletion groups than the wild type group in idiopathic male

[基金项目] 国家自然科学基金(81300541);贵州省度科学技术基金计划项目(黔科合J字[2013]2051号);贵阳医学院附属医院博士基金(C-2012-6)

[通信作者] 邢俊平,E-mail:xingjpcn@gmail.com
孙 发,E-mail:sfguizhou@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1549.001.html(2014-12-04)

infertile patients ($P<0.01$), and the 2 type of gene detection had synergistic effect. However, there was no significant difference in the percentage of normal sperm MMP between the GSTP1 mutation type group and the wild type group ($P=0.085$). **Conclusion** GSTM1 and GSTT1 deletions are risk factors for the sperm MMP in the idiopathic male infertile patients.

[**Key words**] male infertility; glutathione S-transferase; gene polymorphism; mitochondrial membrane potential

Supported by the National Natural Science Fund of China (81300541), the Project of Science and Technology Foundation of Guizhou Province [QKHJZ[2013]2051] and the Doctoral Fund of Affiliated Hospital of Guiyang Medical College (C-2012-6). Corresponding author: Xing Junping, E-mail: xingjpcn@gmail.com; Sun Fa, E-mail: sfguizhou@163.com

男性不育症(male infertility)是指夫妇同居1年以上,未采取任何避孕措施,由于男性方面的原因导致女方不能受孕[1]。30%的男性不育症患者未发现明确的致病原因,包括发病机制及病理生理过程均不清楚,称之为特发性男性不育症(idiopathic oligoasthezoonspermia)[2]。精液质量是评价男性不育生殖能力的基础,其对男性不育的诊断、治疗及预后提供重要的辅助信息,其中精子活力是衡量男性生育能力的一个重要指标。研究[3]认为,线粒体是精子细胞能量的供应中心,其功能状况直接决定了精子的运动能力,精子线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的高低与精子的运动能力密切相关。MMP的变化与多种因素存在相关性,如活性氧(ROS)堆积、遗传因素等[4-5]。谷胱甘肽S-转移酶(Glutathione S-transferases, GSTs)是一组具有解毒功能的蛋白超基因家族,属于机体Ⅱ相解毒酶系统,其中编码Mu、Theta和Pi亚型酶的GSTM1、GSTT1和GSTP1基因在人群中存在功能性基因遗传多态性[6]。本研究探讨谷胱甘肽S-转移酶基因GSTM1、T1及P1基因多态性与特发性男性不育症患者精子MMP相关性,以期为谷胱甘肽S-转移酶基因多态性与特发性男性不育相关性研究提供实验基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2008年9月至2012年6月就诊于西安交通大学医学院第一附属医院泌尿外科门诊的特发性男性不育患者共246例,患者年龄21~34(27.0±3.6)岁,不育年限1.2~8.5(3.6±1.1)年。患者均无明确致病因素。其配偶均无明确不育因素。特发性男性不育症患者基本资料标准:按WHO第4版[7]标准,常规进行2次及以上精液分析,符合以下标准:睾丸体积在中国成人睾丸正常体积范围(15~25 mL);精液量≥2.0 mL,精子密度$<20\times10^6$/mL且$>5\times10^6$/mL,A级精子百分比<25%且(A+B)级精子百分比<50%;血清性激素水平在正常范围内;有规律性生活1年以上,未采取任何避孕措施女方未受孕。排除患者性生活异常,以及可能影响精液分析参数的因素。共246例患者纳入研究。

1.2 主要试剂及仪器

全血基因组提取试剂盒(美国Axygen biosciences公司),2×PCR Mixture(立陶宛MBI公司),Biomltra梯度PCR仪(德国Sigma公司),凝胶成像分析系统(美国BioRad公司),流式细胞仪(美国BD公司),线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1,凯基公司)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计和合成 根据基因序列,PCR扩增引物GSTM1:上游5′-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3′,下游5′-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3′,扩增产物长度219 bp;GSTT1:上游5′-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3′,下游5′-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3′,扩增产物长度480 bp;GSTP1上游5′-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3′,下游5′-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3′,扩增产物长度177 bp;β-actin为内参照,引物序列:上游5′-ACTCCCCATCCCAAGACC-3′,下游5′-CCTTAATGTCACGCACGAT-3′,扩增产物长度为400 bp[8]。引物由上海生物工程公司合成。

1.3.2 外周血标本采集和基因组DNA提取 所有研究对象采取外周静脉血3 mL并以乙二胺四乙酸二钠(EDTA)作为抗凝剂混匀为抗凝血液,放置于-80 ℃低温冰箱备用。基因组DNA提取按照外周血微量基因组DNA提取试剂盒说明书操作,所提取DNA放置于-20 ℃冰箱备用。

1.3.3 精液标本的收集及处理 所有研究对象禁欲3~5 d,用手淫、取精仪或体外排精法收集1次排精的全部精液,留于清洁收集器皿内,标明具体采集时

间,置 37 ℃培养箱内,待液化后分离精子及精浆,所有样本检测 3 次。

1.3.4 GSTs 基因型 PCR 扩增 采用 Biomltra 梯度 PCR 仪对所有 DNA 标本进行 GSTM1、T1 及 P1 基因型检测,并以此将患者分成各基因型亚组。反应体系为 25 μL(2 × PCR Mixture 12.5 μL,双蒸水 8.5 μL,各引物量为 0.5 μL,浓度 1.0 μmol/L,DNA 模板 2 μL,浓度为 100 μg/μL)。GSTP1 基因 PCR 扩增产物采用 BsmAI(ALW26)限制性内切酶进行处理。

1.3.5 精子 MMP 检测及 PCR 扩增产物电泳检测

按照线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)说明,对精子细胞进行洗涤、悬浮、混匀、孵育,收集细胞、重新悬浮后,于流式细胞仪进行检测分析,当精子线粒体膜电位正常时,JC-1 染剂进入线粒体基质并形成聚合物可产生红色荧光,反之膜电位较低是其不能进入线粒体基质而单体存在于细胞外可产生绿色荧光。红色荧光精子百分比,即 JC-1$^+$(%),表示正常 MMP 精子的比例。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统进行检测。样本均重复 3 次精子 MMP 检测、PCR 扩增及电泳检测。

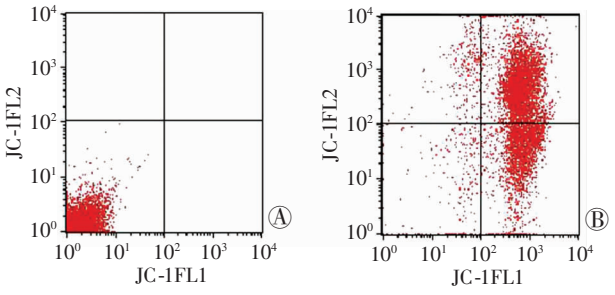
1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行方差分析、t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 精子 MMP 流式细胞仪检测

精子 MMP 检测采用 JC-1 染色后流式细胞仪检测,见图 1。统计分析发现,246 例特发性男性不育患者,通过 GSTs 基因型分组后,在 GSTM1、T1、M1/T1 基因缺失型亚组的正常 MMP 精子百分比与野生型相比,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。



A:阴性对照;B:实验样本(右上象限为正常 MMP 精子的百分比)

图 1 精子 MMP 流式细胞仪检测

2.2 GSTs 基因多态性与精子 MMP 相关性

统计分析发现,GSTM1 基因缺失型组正常 MMP 精子百分比显著低于 GSTM1 基因野生型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);GSTT1 基因缺失型组正常 MMP 精子百分比显著低于 GSTT1 基因野生型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);GSTM1/T1 基因均缺失型组正常 MMP 精子百分比显著低于 GSTM1/T1 基因野生型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);GSTP1 基因突变型组正常 MMP 精子百分比与野生型组比较,差异无统计学意义($P = 0.085$)。见表 1。

表 1 病例组及病例组中 GST 基因型亚组正常 MMP 精子百分比比较

组别	例	JC-1$^+$[($\bar{x} \pm s$)%]
病例组	246	49.38 ± 16.11
GSTM1		
(+)	97	55.07 ± 12.98
(−)	149	45.68 ± 16.89[a]
GSTT1		
(+)	92	54.90 ± 14.43
(−)	154	46.09 ± 16.20[b]
GSTM1/T1		
(+/+)	38	56.80 ± 14.85
(+/−)	59	53.96 ± 11.62
(−/+)	54	53.57 ± 14.12
(−/−)	95	41.19 ± 16.76[c]
GSTP1		
(A/A)	167	51.28 ± 15.98
(A/G + G/G)	79	47.51 ± 16.10

a:$P < 0.01$,与 GSTM1 比较;b:$P < 0.01$,与 GSTT1 比较;c:$P < 0.01$,与 GSTM1/T1(+/−)比较

3 讨论

线粒体的主要功能是产生能量,可为精子运动提供三磷腺苷(adenosine triphosphate,ATP)。一般认为,精子 MMP 的高低与其运动能力有关。而且,MMP 的丧失是精子凋亡的一个普遍特征,发生于多种因素所诱导的精子凋亡过程。因此,检测精子 MMP 对男性不育患者精子的受孕能力的评估具有重要意义。JC-1 是一种碳氰化合物类荧光染料,在细胞内以聚合物和单体两种不同形式存在。在 MMP 较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生橙红色荧光;在 MMP 较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,JC-1 为单体,产生绿色荧光。因为 JC-1 能较特异地与线粒体内膜结合,只在线粒体膜崩解时才释放出来,检测结果可靠,敏感性高。应用流式细胞术可以进行快速、高通量、多参数的定量分析,更加有利于精子 MMP 的检测。

既往研究认为 MMP 的丧失是精子凋亡的一个普

遍特征,发生于多种因素所诱导的精子凋亡过程中[9]。随着氧化剂浓度的增加,氧化损伤程度加重,MMP下降,表明氧化应激可导致精子MMP下降[10-11]。因此,精子在氧化应激作用下,精子MMP降低,从而使其运动能力下降甚或凋亡,最终影响精子的受孕能力。

我们既往研究发现GSTs基因多态性可以增加机体内氧化应激水平及对精子的损伤[8]。GSTs是一组具有解毒功能的蛋白超基因家族,属于机体Ⅱ相解毒酶系统,其参与细胞对外源性化学物质以及人工合成有机物质解毒的各个生理阶段,包括ROS以及其代谢产物[12-13]。本研究采用JC-1染色流式细胞仪对246例特发性男性不育患者精子MMP进行检测,同时采用PCR对特发性男性不育患者GSTM1、T1及P1基因多态性进行检测分析,并以此将患者分成各基因型亚组。统计学分析发现,GSTM1、T1及M1/T1均缺失型组精子MMP正常精子百分比均显著低于野生型组。因此,通过增加机体内氧化应激水平及对氧化应激的易感性是GST基因多态性可能影响精子MMP水平的机制之一。

然而,本研究只是通过实验数据分析发现GSTs基因多态性与精子MMP存在相关性的一个现象,没有有直接的实验数据,如氧化应激水平等来进一步证实两者之间存在相关性,同时既往也无相关实验研究表明两者之间存在相关性的研究。本研究还存在样本量相对较小、研究指标单一等局限性。因此,GSTs基因多态性与精子MMP相关性以及与特发性男性不育的相关性的发生机制,有待于多中心、大样本进一步研究。

本研究采用JC-1标记流式细胞仪技术对特发性男性不育患者精子线粒体膜电位进行检测,同时对其GSTs基因多态性进行分型。经过统计学分析后发现GSTM1及T1基因缺失型组患者精子MMP显著低于野生型组,同时两者具有协同作用,GSTP1基因多态性对精子MMP无明显影响。

参考文献:

[1] World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 379-383.

[2] Pasqualotto F F, Pasqualotto E B, Sobreiro B P, *et al*. Clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation in a university hospital[J]. Urol Int, 2006, 76(2): 122-125.

[3] Tantibhedhyangkul J, Hawkins K C, Dai Q, *et al*. Expression of a mitochondrial progesterone receptor in human spermatozoa correlates with a progestin-dependent increase in mitochondrial membrane potential[J]. Andrology, 2014, 2(6): 875-883.

[4] 史孟婧, 王健, 但国蓉, 等. 缺氧对PC12细胞中miR-210的表达及对细胞线粒体功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(10): 979-982.

[5] Shin S M, Kim S, Hong J G, *et al*. IGF-I improves mitochondrial membrane potential during hypothermic storage of canine spermatozoa[J]. J Vet Med Sci, 2014, 76(7): 1065-1067.

[6] Jiang S, Yu L, Cheng J, *et al*. Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde[J]. Mutat Res, 2010, 695(1/2): 9-15.

[7] World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions[M]. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

[8] Tang K, Xue W, Xing Y, *et al*. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1, and the assessment of oxidative damage in infertile men with varicoceles from northwestern China[J]. J Androl, 2012, 33(2): 257-263.

[9] Sharbatoghli M, Valojerdi M R, Amanlou M, *et al*. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(5): 1315-1322.

[10] Ghaleno L R, Valojerdi M R, Janzamin E, *et al*. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study[J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 289(1): 173-180.

[11] 谭迎春, 陈子江, 卢少明, 等. 用荧光探针JC-1检测氧化应激对精子线粒体膜电位的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2006, 44(5): 447-450.

[12] Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R. Glutathione transferases[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45: 51-88.

[13] Ramio-Lluch L, Yeste M, Fernandez-Novell J M, *et al*. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and *in vitro* capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels[J]. Reprod Fertil Dev, 2014, 26(6): 883-897.

(**收稿**:2014-10-17;**修回**:2014-11-08)

(编辑 龙 亮)