

贵州地区非阻塞性无精症与 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 多态性的相关性*

王婵娟^{1,2}, 何 燕^{1,2}, 张 婷^{1,2}, 王治海^{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, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州省人民医院 中心实验室, 贵州 贵阳 550002)

[摘 要] 目的: 研究贵州地区非阻塞性无精症患者与正常男性健康对照人群 *SIRPA-SIRPG* 基因单核苷酸多态性(SNP)位点 rs6080550 基因分型,探讨该位点的基因多态性与非阻塞性无精症的相关性。方法:以贵州地区临床确诊的非阻塞性无精症患者(病例组)及男性健康体检人群(对照组)为研究对象,酚氯仿抽提法提取全血基因组 DNA, TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 对 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 位点基因分型,比较两组受检者 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 位点基因型及等位基因频率,同时分析该位点的多态性与贵州地区非阻塞性无精症的相关性。结果:疾病组 TT 基因型及 T 等位基因频率均显著高于对照组($P < 0.05$),携带 rs6080550 TT 基因型可能增加人群中非阻塞性无精症的患病风险($OR = 13.52, P < 0.05$)。结论:rs6080550 位点多态性与贵州人群非阻塞无精症可能相关,携带 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 位点 TT 基因型可能增加非阻塞性无精症的患病风险。

[关键词] 无精子症; 信号调节蛋白; 基因; 多态性,单核苷酸; 贵州

[中图分类号] R34; R698+.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)02-0169-04

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.02.009

Correlation Between Non-obstructive Azoospermia and *SIRPA-SIRPG* Gene rs6080550 Polymorphism in Guizhou Population

WANG Chanjuan^{1,2}, HE Yan^{1,2}, ZHANG Ting^{1,2}, WANG Zhihai^{1,2},
YU Wenfeng^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2}, AN Yu³

(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

3. Central Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the single nucleotide polymorphism (SNP) locus rs6080550 genotyping of *SIRPA-SIRPG* gene in non-obstructive azoospermia patients and healthy controls in Guizhou area, and to explore the relationship between rs6080550 polymorphism and non-obstructive azoospermia. **Methods:** Patients with non-obstructive azoospermia (case group) and healthy men (control group) were selected as subjects. The phenol-chloroform extraction method was used to extract the whole blood genomic DNA, and TaqMan-MGB probe real-time fluorescence quantitative PCR was used to type the rs6080550 locus of *SIRPA-SIRPG* gene. The genotype and allelic frequency of rs6080550 locus of *SIRPA-SIRPG* gene were compared between the two groups. At the same time, the relationship between the polymorphism of this locus and non-obstructive azoospermia in Guizhou popu-

*[基金项目]贵州省卫生计生委科学技术基金资助项目(gzwlkj2014-1-002);贵州省科技厅科学技术基金资助项目[黔科合J字(2013)2040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];贵州省科技厅科学技术基金资助项目[黔科合J字(2013)2177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]

**通信作者 E-mail:matrix_ay@hotmail.com

网络出版时间:2019-02-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190228.2130.009.html>

lation was analyzed. **Results:** The frequency of TT genotype and T allele in the case group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). Carrying rs6080550 TT genotype may increase the risk of non-obstructive azoospermia ($OR = 13.52, P < 0.05$). **Conclusion:** Rs6080550 polymorphism may be associated with non-obstructive azoospermia in Guizhou population. The TT genotype carrying rs6080550 locus of SIRPA-SIRPG gene may increase the risk of non-obstructive azoospermia. [**Key words**] non-obstructive azoospermia; signal regulatory protein; Gene; polymorphism, mononucleotide; Guizhou

我国孕龄期夫妻不孕不育的发生率大约为 15% ~ 20%, 因男方因素导致的不孕不育约为 50%, 其中无精症是造成男子不育的重要原因之一, 约占不育男性的 15%^[1]。无精症可分为阻塞性无精症 (obstructive azoospermic, OA) 和非阻塞性无精症 (non-obstructive azoospermic, NOA), 其中非阻塞性无精症是指男性睾丸生精细胞发生萎缩退化不能产生精子^[2]。已有研究显示男性非阻塞性无精症中精子的生成障碍与 Y 染色体微缺失、X 染色体与常染色体的基因突变以及减数分裂遗传重组缺陷有关^[3-4], 随着芯片技术的发展, 全基因组关联研究 (Genome-wide association study, GWAS) 成为一种有效的研究复杂疾病发病基因及其位点的手段, 它主要通过对大样本人群 DNA 样本进行全基因组高密度单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点分型, 从而揭示与疾病发生相关的遗传位点^[5]。目前已有少数研究通过 GWAS 找到了一些可能与非阻塞性无精症相关的基因区域, 并在后续相关的 SNP 与非阻塞性无精症的相关研究中探讨这些 SNP 与无精症的关联^[6], 信号调节蛋白 α (SIRPA) 和信号调节蛋白 γ (SIRPG) 蛋白编码区则是其中之一, 已有的研究表明 SIRPA 和 SIRPG 蛋白编码区的突变和无精症风险性相关, rs6080550 (C/T) 则是其中一个多态位点; SIRP 是信号调节蛋白家族, 是受体膜上的糖蛋白, 参与了负向调节受体酪氨酸激酶的级联过程, 但其基因在精子生成中的作用目前尚未见报道。本研究选取 rs6080550 作为研究靶点, 以贵州地区非阻塞性无精症患者和正常男性健康对照人群为研究对象, 探讨该位点的多态性与贵州非阻塞性无精症的相关性, 以期对贵州人群非阻塞性无精症的诊断及预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 对象

在知情同意的原则下随机选取临床确诊的非

阻塞性无精症患者 145 例 [(46.5 ± 20.2) 岁] 及正常男性健康体检人群 174 例 [(48.3 ± 12.9) 岁], 分为疾病组及对照组。疾病组平均不育年限 4.5 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, 均确诊为非阻塞性无精症。

1.2 试剂与仪器

人基因组 rs6080550 (C/T) SNP 位点 TaqMan 探针分型试剂盒 (TaqMan SNP Genotyping Assays, 美国应用生物系统公司), TaqMan Genotyping Master Mix (美国应用生物系统公司), NanoDrop™ Lite 分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司), ABI StepOne Plus Real-time PCR 仪 (美国应用生物系统公司)。

1.3 基因组 DNA 提取及定量

对研究人群全血采用酚/氯仿抽提法抽提基因组 DNA, NanoDrop™ Lite 分光光度计测量 DNA 的浓度及纯度, 将每个 DNA 样本统一稀释成浓度为 20 $\mu\text{g/L}$ 的应用液。

1.4 SIRPA-SIRPG 基因 rs6080550 (C/T) SNP 位点基因分型

对研究人群采用人基因组 rs6080550 (C/T) SNP 位点 TaqMan 探针分型试剂盒进行基因分型, ABI StepOne Plus Real-time PCR 仪进行 PCR 扩增。PCR 扩增总体积 10 μL , 包含 2 \times TaqMan Genotyping Master Mix 5 μL , 40 \times TaqMan SNP Genotyping Assay Mix 0.25 μL , DNA 模板 1.5 μL , ddH₂O 3.25 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min, 92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 共 30 个循环。使用 StepOne Software v2.1 软件, 读取荧光信号, 通过 X、Y 轴散点图分析及测序结果确定样本的基因型。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据, 直接计数法统计位点的基因型频率和等位基因频率, 组间基因型频率和等位基因频率比较采用 χ^2 检验, 设定 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 位点基因型及等位基因频率

对照组人群基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P = 1.0$)。疾病组及对照组基因型与等位基因频率分布的卡方检验结果如表 1 所示。rs6080550 (C/T) 基因型及等位基因频率分布,在疾病组与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。疾病组 TT 基因型及 T 等位基因频率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 基因型和等位基因频率分布 ($n, \%$)
Tab.1 Frequency distribution of rs6080550 genotypes and alleles in *SIRPA-SIRPG* gene

<i>SIRPA-SIRPG</i> 基因	疾病组	对照组	χ^2	P
基因型				
CC	131 (75.3)	84 (57.9)	26.43	<0.000 1
CT	35 (24.1)	40 (23.0)		
TT	26 (17.9)	3 (1.7)		
等位基因				
C	203 (70.0)	302 (86.8)	27.00	<0.000 1
T	87 (30.0)	46 (13.2)		

2.2 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 位点基因型频率与非阻塞性无精症的患病风险

SIRPA-SIRPG 基因 rs6080550 位点基因型频率与非阻塞性无精症的相关性分析见表 2。基因型频率结果显示 rs6080550 (T/T) 增加人群中的非阻塞性无精症患病风险, $OR = 13.52, P < 0.05$ 。

表 2 rs6080550 基因型频率与非阻塞性无精症患病风险的关系
Tab.2 Relationship between rs6080550 genotype frequency and risk of non-obstructive azoospermia

rs 6080550	基因型频率 ($n, \%$)		OR (95% CI)	P
基因型	对照组	疾病组		
C/C	131 (75.3)	84 (57.9)	1	
C/T	40 (23.0)	35 (24.1)	1.36 (0.80 ~ 2.32)	
T/T	3 (1.7)	26 (17.9)	13.52 (3.97 ~ 46.06)	<0.01

3 讨论

男性非阻塞性无精症的主要原因是精子生成障碍,精子发生是精原细胞相继分化成初级精母细

胞、次级精母细胞及精子细胞,并最终形成成熟精子的过程,任何一个环节出现异常都可能导致精子发生停滞,从而导致无精症。目前已有的研究显示男性非阻塞性无精症中精子的生成障碍与 Y 染色体微缺失、Y 染色体 gr/gr 缺失、X 染色体与常染色体的基因突变以及减数分裂遗传重组缺陷有关^[3-4]。

SNP 是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性,它是人类可遗传的变异中最常见的一种。据研究揭示,与精子发生相关的基因大约有 2 300 多个^[7],而基因异常通常被认为是非阻塞性无精症的一个主要风险因素^[8],一直以来关于精子发生相关的基因如 *FKBP6*、蛋白质精氨酸甲基转移酶 (*PRMT6*)、过氧化体生物合成因子 10 (*PEX10*)、转录因子 *SOX5* (*SOX5*)、芳香化酶 19 (*CYP19*) 等基因的 SNP 多态性与非阻塞性无精症相关的研究报道层出不穷^[9-13]。大量研究致力于通过现代测序技术和大规模的基因芯片技术寻找导致非阻塞性无精症新的易感基因,但是,超过 50% 的无精症的致病因素仍未可知^[14]。

近年来, GWAS 为非阻塞性无精症与易感基因 SNP 多态性的研究提供了更好的依据,南京医科大学胡志斌教授团队在 *Nature Genetics* 上发表了一篇在中国人群中和非梗阻性无精症相关的 GWAS 研究文章,研究中选取 1 000 例无精症病人和 1 703 例对照对 906 703 SNPs 进行了分析,锁定了一些与非阻塞性无精症可能关联的基因区域和位点^[6], *SIRPA-SIRPG* 基因 6080550 (C/T) 即是其中之一。本次研究选择贵州地区人群,在贵州非阻塞性无精症患者和正常男性健康体检人群共 319 例样本中对 GWAS 报道的 *SIRPA-SIRPG* 基因 rs6080550 (C/T) 进行了进一步的验证分析,探讨该位点的多态性与非阻塞性无精症的相关性,为贵州人群非阻塞性无精症的诊断及预防干预提供一定的理论依据。

本次结果显示 rs6080550 基因型分布在非阻塞性无精症疾病组和对照组中差异有统计学意义,疾病组 rs6080550 (TT) 基因型频率显著高于对照组,该位点 T 等位基因频率在疾病组中的分布也明显高于对照组。同时,对该位点 3 种基因型患病风险 OR 值的评估中,rs6080550 (TT) 基因型 OR 值为 13.52,远大于 1 ($P < 0.05$),结果显示携带 TT 基因型可能增加非阻塞性无精症的患病风险,可能是疾病的危险因素。对比目前国内外对该位点的

研究,日本曾对 490 例非阻塞性无精症患者及对照进行了基因分型分析,所得结果显示 rs6080550 位点基因的多态性与无阻塞性无精症并没有显著相关性,rs6080550 位点多态性并非无精症的危险因素($OR = 0.96$)^[15];国内上海交通大学医学院也对胡志斌教授团队报道的位点进行了验证实验,也未得到 *SIRPA-SIRPG* 基因 6080550 (C/T) 位点与非阻塞性无精症相关的结果^[16]。而本次对贵州人群的研究得到的结果与 GWAS 研究结果一致,rs6080550 基因多态与非阻塞性无精症相关。鉴于目前对该位点研究结果存在的争议,可能需要更大的独立集合的病例对照样本进行进一步研究,对结果的确定可能还需要更大的人群样本作为分析基础。

4 参考文献

- [1] RAJENDER S, AVERY K, AGARWAL A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility [J]. *Mutat Res*, 2011, 727(3): 62–71.
- [2] CLARK A T. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(7): 727–739.
- [3] 曹云霞,高明. 精子发生障碍的遗传学研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2014, 33(3): 182–185.
- [4] HOLSTEIN A F, SCHULZE W, DAVIDOFF M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1(1): 107.
- [5] 王小芳,韩水平,周党侠,等. SPO11 基因单核苷酸多态性与陕西回族人群非梗阻性无精症相关性研究[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2012, 17(3): 290–293.
- [6] HU Z B, XIA Y K, GUO X J, et al. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia [J]. *Nature Genetics*, 2014, 44(2): 183–186.
- [7] DIETERICH K, SOTORIFO R, FAURE A K, et al. Homozygous mutation of *AURKC* yields large-headed poly ploid spermatozoa and causes male infertility [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 661–665.
- [8] ALHALABI M, KENJ M, MONEM F, et al. High prevalence of genetic abnormalities in Middle Eastern patients with idiopathic non-obstructive azoospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(6): 799–805.
- [9] EISENBERG M L, BETTS P, HERDER D, et al. Increased risk of cancer among azoospermic men [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(3): 681–685.
- [10] 张国铸,黄灿华,周鹏,等. FKBP6 基因单核苷酸多态性与原发性无精症相关研究[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(9): 1640–1642.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 张健,吕荣琦,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.
- [14] EGHBAI M, SADEGHI M R, LAKPOUR N, et al. Molecular analysis of testis biopsy and semen pellet as complementary methods with histopathological analysis of testis in non-obstructive azoospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(6): 707–715.
- [15] SATO Y, JINAM T, IWAMOTO T, et al. Replication study and Meta-analysis of human nonobstructive azoospermia in Japanese populations [J]. *Biology of Reproduction*. 2013, 88(4): 87–92.
- [16] ZOU S, LI Z, WANG Y, et al. association study between polymorphisms of *prmt6*, *pex10*, *sox5*, and nonobstructive azoospermia in the Han Chinese population [J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(5): 470–479.

(2018-12-07 收稿, 2019-02-12 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 雷 妍