

谷胱甘肽 S-转移酶基因多态性与特发性男性不育患者氧化应激水平的关系*

李哲铭^{1**}, 刘冬冬¹, 陈攀¹, 赵伊立¹, 孙发², 邢俊平³, 唐开发^{1***}

(1. 贵州医科大学附院 泌尿外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院, 贵州 贵阳 550004; 3. 西安交通大学医学院第一附属医院 泌尿外科, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 分析特发性男性不育患者谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)基因 *GSTT1*、*GSTM1* 及 *GSTP1* 基因多态性与氧化应激水平及精子 DNA 氧化损伤的关系。方法: 收集 246 例特发性男性不育患者的静脉血, 提取全血基因组 DNA, 采用聚合酶链反应(PCR)对 *GSTT1* 及 *GSTM1* 基因进行分型, 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)对 *GSTP1* 基因进行分型; 采集患者精液, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测精浆中丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平及总抗氧化能力(T-AOC), 同法检测精子 DNA 中 8-羟基脱氧鸟苷(8-OH-dG)水平。结果: *GSTM1*(-)及 *GSTT1*(-)组中精浆 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平分别显著高于 *GSTM1*(+)及 *GSTT1*(+)组($P<0.01$), *GSTM1*/*GSTT1*(-/-)组精浆 MDA、NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平高于 *GSTM1*/*GSTT1*(+/+)组($P<0.05$), 而精浆 T-AOC 低于 *GSTM1*/*GSTT1*(+/+)组($P<0.05$), *GSTP1*(A/G+G/G)组中 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平高于 *GSTP1*(A/A)组($P<0.05$), 而 T-AOC 显著低于 *GSTP1*(A/A)组($P<0.01$)。结论: GSTs 的 *GSTT1*、*GSTM1* 及 *GSTP1* 基因突变可增加特发性男性不育患者精浆氧化应激水平, 降低精浆总抗氧化能力, 导致精子 DNA 氧化损伤。

[关键词] 男性不育症; 谷胱甘肽 S-转移酶; 基因多态性; 氧化应激; 精液; 丙二醛; 一氧化氮; 8-羟基脱氧鸟苷

[中图分类号] R698⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)11-1268-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.11.005

Relationship between Glutathione S-transferase Gene Polymorphism and Oxidative Stress Level in Idiopathic Male Infertility Patients

LI Zheming¹, LIU Dongdong¹, CHEN Pan¹, ZHAO Yili¹, SUN Fa², XING Junping³, TANG Kaifa¹
(1. Department of Urology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
2. Guizhou People's Hospital, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the relationship between glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms including *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* gene, oxidative stress levels and sperm DNA oxidative damage in idiopathic male infertility patients. **Methods:** The venous blood from 246 idiopathic male infertility patients was collected, and whole blood genomic DNA was extracted. *GSTT1* and *GSTM1* genes were genotyped by polymerase chain reaction (PCR). Restriction fragment length polymorphism polymerase chain (PCR-RFLP) was used to classify *GSTP1* gene. The levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and total antioxidant capacity (T-AOC) in seminal plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) levels were detected in sperm DNA. **Results:** The levels of seminal plasma NO and 8-

*[基金项目] 国家自然科学基金(81660263, 81300541); 中国博士后基金(2015M582760XB); 贵州医科大学附院博士基金(C-2012-6)

** 贵州医科大学 2017 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: doc.tangkf@hotmail.com

网络出版时间: 2019-11-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191120.2125.005.html>

OH-dG were significantly higher in GSTM1 (-) and GSTT1 (-) groups than those in GSTM1 (+) and GSTT1 (+) groups, respectively ($P < 0.01$). Seminal plasma MDA, NO and 8-OH-dG were higher in GSTM1/GSTT1 (- / -) group than those in GSTM1/GSTT1 (+ / +) groups ($P < 0.05$), while seminal plasma T-AOC was lower than that in GSTM1/GSTT1 (+ / +) groups ($P < 0.05$). The levels of seminal plasma NO and 8-OH-dG were significantly higher in GSTP1 (A/G + G/G) group than in those in GSTP1 (A/A) group ($P < 0.05$), while T-AOC was significantly lower than that in GSTP1 (A/A) group ($P < 0.01$). **Conclusion:** GSTT1, GSTM1 and GSTP1 gene mutations can increase the level of seminal plasma oxidative stress in idiopathic male infertility patients, reduce the total antioxidant capacity of seminal plasma, leading to oxidative damage of sperm DNA.

[**Key words**] male infertility; glutathione S-transferase; polymorphism; oxidative stress; semen; malondialdehyde; nitric oxide; 8-hydroxydeoxyguanosine

引起男性不育的因素有很多,根据生殖环节可分为睾丸前、睾丸、睾丸后三大因素,特发性男性不育是指致病原因不明的不育,可能通过其中的一个或多个因素引起^[1]。活性氧(ROS)是正常生理过程的产物,正常水平的 ROS 有利于维持精子获能及顶体反应等精子生理功能,而高水平 ROS 可通过破坏精子结构引起男性不育^[2-4]。谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)能促进亲电子物质及应激氧化产物与还原型谷胱甘肽结合,维持氧化还原系统的动态平衡^[5-6]。GSTT1、GSTM1 和 GSTP1 基因编码 Theta、Mu 和 Pi 亚型酶,其不同基因型在人群中存在功能差异^[7-8],影响 GSTs 酶活性,进而导致机体氧化应激水平的差异^[9]。本研究分析 GSTT1、GSTM1 及 GSTP1 基因多态性与特发性男性不育患者氧化应激水平及精子 DNA 氧化损伤之间的关系,为临床特发性男性不育症患者的诊疗提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 9 月 - 2012 年 6 月泌尿外科门诊就诊的 246 例特发性男性不育症患者作为受试对象,年龄 21 ~ 34 岁、平均(27.0 ± 3.6)岁。纳入标准:(1)有规律性生活 1 年以上,未采取任何避孕措施女方未受孕;(2)常规进行 2 次或以上精液分析,精子密度小于 $15 \times 10^6/\text{mL}$ 或精子总数小于 39×10^6 ,精子前向活率小于 32%^[10]。排除已知原因如外伤、隐睾症、生殖系统感染、染色体核型异常、输精管道梗阻及血清性激素水平异常等导致的不育。本研究方案经医院伦理委员会批准,所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 GSTT1、GSTM1、GSTP1 基因分型 抽取研究对象外周静脉血 3 mL,严格按照全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。参照文献[11],采用聚合酶链反应(PCR)对 GSTT1、GSTM1 进行基因分型,采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)对 GSTP1 基因进行分型, GSTT1、GSTM1、GSTP1 及 β -actin 基因引物均由上海生物工程公司设计并合成。GSTT1 基因上游引物为 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'、下游引物为 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3', GSTM1 基因上游引物为 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTA-AAGC-3'、下游引物为 5'-GTTGGGCTCAAATAT-ACGGTGG-3', GSTP1 基因上游引物为 5'-AC-CCCAGGGCTCTATGGGAA-3'、下游引物为 5'-TGAGGGCAC AAGAAGCCCCT-3'; β -actin 为内参照,上游引物为 5'-ACTCCCCATCCCAAGAC C-3'、下游引物为 5'-CCTTAATGTCACGCACGAT-3'^[11]。采用 Biomlra 梯度 PCR 仪对目的基因进行扩增,反应体系 25 μL ,反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s (GSTM1 60 $^{\circ}\text{C}$, GSTT1 63 $^{\circ}\text{C}$, GSTP1 58 $^{\circ}\text{C}$, β -action 61 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。采用 BsmAI (ALW26I)限制性内切酶对 GSTP1 基因扩增产物进行处理,扩增产物及酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 精浆及精子 DNA 中氧化应激相关指标检测 精液采集方法按第 4 版《WHO 人类精液及精子 - 宫颈黏液作用实验室检验手册》^[10] 标准执行:禁欲 3 ~ 7 d,用手淫法采集精液置于干燥无菌取精杯中,用 Chelex-100 提取精子总 DNA;将精液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内液化,1 000 r/min 离心获得精浆,采

用 ELISA 法测定精浆中丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、总抗氧化能力 (T-AOC) 水平以及精子 DNA 中 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OH-dG) 水平, 严格参照试剂盒说明书进行操作。

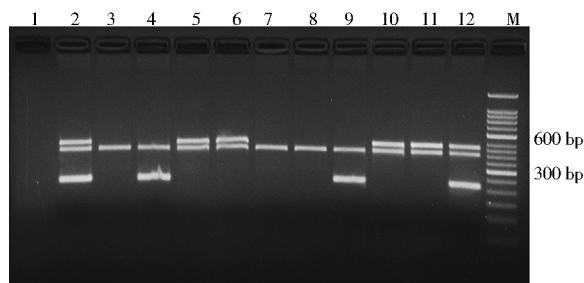
1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行数据处理, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *GSTT1*、*GSTM1*、*GSTP1* 基因多态性

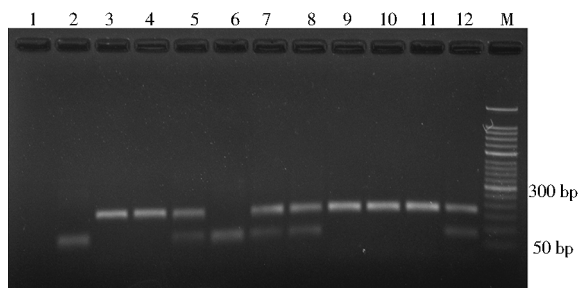
如图 1、图 2 所示, *GSTT1* 基因扩增产物长度为 480 bp, *GSTM1* 基因扩增产物长度为 219 bp, *GSTP1* 基因扩增产物长度为 177 bp; 经 BsmAI (ALW26I) 限制性内切酶酶切后, 野生型 (A/A) 产物长度为 177 bp, 突变纯合型 (G/G) 产物长度为 87 bp 及 90 bp, 突变杂合型 (A/G) 产物长度为 177 bp、87 bp 及 90 bp, β -actin 内参照扩增产物长度为 400 bp。246 例特发性男性不育患者中, *GSTM1* (+) 及 *GSTM1* (-) 患者分别为 97、149 例, *GSTT1* (+) 及 *GSTT1* (-) 患者分别为 92、154 例, *GSTM1*/*GSTT1* (+/+)、*GSTM1*/*GSTT1* (+/-)、*GSTM1*/*GSTT1* (-/+) 及 *GSTM1*/*GSTT1* (-/-) 患者分别为 38、59、54 及 95 例, *GSTP1* (A/A) *GSTP1* (A/G + G/G) 及患者分别为 167、79 例。



注: 泳道 1 为阴性对照, 泳道 2、12 为 *GSTT1*/*GSTT1* (+/+), 泳道 3、7、8 为 *GSTM1*/*GSTT1* (-/-), 泳道 4、9 为 *GSTM1*/*GSTT1* (+/-), 泳道 5、6、10、11 为 *GSTM1*/*GSTT1* (-/+), M 为 50 bp DNA maker。

图 1 GSTs 酶 *GSTT1* 及 *GSTM1* 基因扩增产物凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis for glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms



注: 泳道 1 为阴性对照, 泳道 2、6 为突变纯合型 (G/G), 泳道 3、4、9、11 为野生型 (A/A), 泳道 5、7、8、12 为突变杂合型 (A/G), M 为 50 bp DNA maker。

图 2 GSTs 酶 *GSTP1* 基因扩增产物经 BsmAI (ALW26I) 酶切后凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis for *GSTP1* gene amplification products digestion by BsmAI enzyme

2.2 *GSTT1*、*GSTM1*、*GSTP1* 基因多态性与精液氧化应激水平

GSTM1 (-) 组精浆 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平显著高于 *GSTM1* (+) 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); *GSTT1* (-) 组精浆 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平显著高于 *GSTT1* (+) 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); *GSTM1*/*GSTT1* (-/-) 组精浆 MDA、NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平高于 *GSTM1*/*GSTT1* (+/+) 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 精浆 T-AOC 水平低于 *GSTM1*/*GSTT1* (+/+) 组, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$); *GSTP1* (A/G + G/G) 组精浆 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平高于 *GSTP1* (A/A) 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 精浆 T-AOC 水平明显低于 *GSTP1* (A/A) 组, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

3 讨论

既往研究认为氧化应激 (OS) 是影响生殖能力的重要因素之一, 精子像其他细胞一样会产生自由基和活性氧物质^[12]。OS 是机体产生的 ROS 水平和机体抗氧化水平之间失去平衡后导致的结果。低水平的 ROS 被认为是精子的受精、顶体反应及获能过程所必须, 同时低水平的 ROS 引起脂质过氧化, 导致细胞膜的改变, 从而促进精子和卵母细胞的交互融合^[13-14]。正常生育男性精液中 ROS 与抗氧化系统处于平衡状态, 当某些病理因素导致该平衡被打破后, 过量的 ROS 可诱发精子 DNA 损

表 1 特发性男性不育患者 *GSTT1*、*GSTM1*、*GSTP1* 基因多态性与精液氧化应激水平的关系($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The oxidative stress levels in GST genotype groups

组别	<i>n</i>	MDA(μmol/L)	NO(μmol/L)	T-AOC(U/mL)	8-OH-dG(ng/L)
<i>GSTM1</i>					
(+)	97	23.29 ± 8.68	29.36 ± 7.82	16.77 ± 5.53	128.06 ± 24.09
(-)	149	25.03 ± 8.19	34.48 ± 8.36 ⁽²⁾	15.22 ± 6.37	154.79 ± 26.67 ⁽²⁾
<i>GSTT1</i>					
(+)	92	22.88 ± 7.23	29.81 ± 8.66	16.75 ± 5.76	131.26 ± 24.46
(-)	154	25.22 ± 8.95	34.05 ± 8.04 ⁽²⁾	15.28 ± 6.23	151.94 ± 28.48 ⁽²⁾
<i>GSTM1/GSTT1</i>					
(+ / +)	38	21.60 ± 6.72	26.45 ± 9.06	17.85 ± 6.18	116.47 ± 19.45
(+ / -)	59	24.46 ± 9.54	31.24 ± 6.30	15.90 ± 5.28	135.52 ± 23.98
(- / +)	54	23.87 ± 7.39	32.18 ± 7.60	15.77 ± 5.66	141.85 ± 22.18
(- / -)	95	25.58 ± 8.64 ⁽¹⁾	35.79 ± 8.53 ⁽²⁾	14.90 ± 6.75 ⁽¹⁾	162.14 ± 26.29 ⁽²⁾
<i>GSTP1</i>					
(A/A)	167	23.29 ± 9.85	30.70 ± 10.10	16.75 ± 5.92	140.51 ± 24.83
(A/G + G/G)	79	25.21 ± 8.13	34.05 ± 7.56 ⁽²⁾	14.33 ± 6.51 ⁽²⁾	148.04 ± 22.89 ⁽¹⁾

注:与野生型(+、+ / +或A/A)比较,⁽¹⁾*P* < 0.05,⁽²⁾*P* < 0.01。

伤、精子线粒体膜受损、精子活力下降、畸形精子增多及精子细胞凋亡等,从而导致男性不育^[2,15]。

GSTs 属于机体Ⅱ相解毒酶系统,是人体抗氧化系统最重要的成员之一,其可以催化外源性化学物质和内源性 ROS 及其代谢产物与还原性谷胱甘肽结合,进而促进这些有毒物质的代谢与灭活,减少对细胞的损害^[16-17]。既往研究发现 GSTs 的基因多态性可影响其酶分子结构,从而影响酶的活性^[18]。前期通过对精索静脉曲张患者 GSTs 基因分型及精液氧化应激水平测定,发现 *GSTM1* 及 *GSTT1* 基因缺失型的精索静脉曲张患者对氧化应激的敏感性较基因野生型患者明显增高^[11]。另外,有研究发现在特发性男性不育症患者中,*GSTM1* 及 *GSTT1* 基因多态性影响精子对氧化损伤的易感性^[19-20]。

本研究采用 ELISA 方法对 246 名特发性男性不育症患者的精浆 MDA、NO、T-AOC 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平进行检测,同时对这些患者进行 GSTs 基因多态性测定。通过对相关数据进行统计学分析后发现,在特发性男性不育患者中 *GSTM1* (-) 及 *GSTT1* (-) 组中精浆 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平分别显著高于 *GSTM1* (+) 及 *GSTT1* (+) 组(*P* < 0.01),而 *GSTM1/GSTT1* (- / -) 组精浆 MDA、NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 水平高于 *GSTM1/GSTT1* (+ / +) 组(*P* < 0.05),而精浆 T-AOC 低于 *GSTM1/GSTT1* (+ / +) 组(*P* < 0.05),这就表明 *GSTT1* (+) 及 *GSTM1* (+) 患者精液氧化应

激水平较 *GSTT1* (-) 及 *GSTM1* (-) 患者处于相对较低水平。*GSTP1* (A/G + G/G) 组中 NO 及精子 DNA 中 8-OH-dG 高于 *GSTP1* (A/A) 组(*P* < 0.05),而精浆 T-AOC 水平显著低于 *GSTP1* (A/A) 组(*P* < 0.01),意味着基因型为 *GSTP1* (A/G) 和 *GSTP1* (G/G) 的患者比基因型为 *GSTP1* (A/A) 的患者精液氧化应激水平更高。

综上所述,GSTs 基因多态性可以影响特发性男性不育患者精浆氧化水平和精子 DNA 氧化损伤。由于引起特发性男性不育的机制较为复杂,同时影响机体氧化应激水平的因素有很多,本研究的样本量较少,且存在地域局限性,有待大样本、多中心进一步研究。

4 参考文献

[1] 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.

[2] BISHT S, DADA R. Oxidative stress; major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies[J]. Front Biosci, 2017,9:420-447.

[3] WRIGHT C, MILNE S, LEESON H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress; modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2014,28(6):684-703.

[4] AGARWAL A, VIRK G, ONG C, et al. Effect of oxida-

- tive stress on male reproduction [J]. World J Mens Health, 2014,32(1):1-17.
- [5] RUBES J, SELEVAN S G, SRAM R J, et al. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2007, 625(1-2):20-28.
- [6] DUSINSKA M, FICEK A, HORSKA A, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans [J]. Mutat Res, 2001, 482(1-2):47-55.
- [7] 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.
- [8] ROMERO A, MARTIN M, OLIVA B, et al. Glutathione S-transferase P1 c.313A>G polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patients[J]. Annals of Oncology, 2012, 23(7):1750-1756.
- [9] HAYES J D, FLANAGAN J U, JOWSEY I R. Glutathione transferases. [J]. Arabidopsis Book, 2005, 8(45):e0131.
- [10] LAMB D J. World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction[J]. Journal of Andrology, 2000, 21(1):32-32.
- [11] 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.
- [12] AITKEN R J, SMITH T B, JOBLING M S, et al. Oxidative stress and male reproductive health[J]. Asian J Androl, 2014,16(1):31-38.
- [13] OPUWARI C S, HENKEL R R. An update on oxidative damage to spermatozoa and oocytes[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016:9540142.
- [14] NISHIHARA T, MATSUMOTO K, HOSOI Y, et al. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome[J]. Reprod Med Biol, 2018,17(4):481-486.
- [15] 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.
- [16] BOARD P G, MENON D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology [J]. Biochim Biophys Acta, 2013,1830(5):3267-3288.
- [17] MARTOS-MALDONADO M C, CASAS-SOLVAS J M, VARGAS-BERENGUEL A, et al. Electrochemical detection of glutathione S-transferase: an important enzyme in the cell protective mechanism against oxidative stress [J]. Methods Mol Biol, 2015,1208:123-138.
- [18] WEICH N, ROISMAN A, CERLIANI B, et al. Gene polymorphism profiles of drug-metabolising enzymes GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in an Argentinian population [J]. Ann Hum Biol, 2017,44(4):379-383.
- [19] ROSHDY O H, HUSSEIN T M, ZAKARIA N H, et al. Glutathione S-transferase Mu-1 gene polymorphism in Egyptian patients with idiopathic male infertility[J]. Andrologia, 2015,47(5):587-593.
- [20] POLONIKOV A V, YAROSH S L, KOKHTENKO E V, et al. The functional genotype of glutathione S-transferase T1 gene is strongly associated with increased risk of idiopathic infertility in Russian men[J]. Fertil Steril, 2010, 94(3):1144-1147.

(2019-09-03 收稿,2019-10-26 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:张启芳