

· 论 著 ·

精子DNA碎片与HSP90AA1基因多态性的相关性研究

薛亚梅 金建远 李坤

[摘要] 目的 探讨热休克蛋白(HSP)90AA1基因多态性与精子DNA碎片的相关性。方法 采用精子染色质扩散(SCD)方法检测精子DNA碎片率,应用Sequenom Massarray平台检测HSP90AA1基因rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560和rs7145597位点基因型。根据精子DNA碎片指数(DFI)将患者分为两组:DFI>22.75%组和DFI≤22.75%组。比较两组精液体积、精子密度、活率、正常形态率。比较不同DFI水平下HSP90AA1基因多态性位点基因型及等位基因频率。结果 DFI≤22.75%组患者的精液体积明显低于DFI>22.75%组($t=-2.06, P<0.05$),但DFI≤22.75%组患者的精子密度、活率和正常形态率明显高于DFI>22.75%组(t 分别=-5.33、-7.47、-5.21, P 均<0.05)。HSP90AA1基因五个多态性位点rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560和rs7145597基因型的频数分布均符合Hardy-Weinberg平衡,但基因型分布和等位基因频率分布比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.74、0.52、0.32、0.35、0.28; 0.47、0.21、0.34、0.14、0.45, P 均>0.05)。采用Haploview软件进行连锁不平衡和单倍型分析,发现一个包括三个多态性位点(rs10133307、rs7145597和rs10873531)的单体域($D'=0.96 \sim 1.00$)。单体域有三个单倍型,分别是H1(AGA)、H2(GAG)、H3(AGG)。其H1频率为74.42%,H2频率为18.46%,H3频率为6.43%。结论 HSP90AA1基因rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560和rs7145597五个位点多态性对精子DNA碎片率无明显影响。

[关键词] 热休克蛋白; 多态性; 精子; DNA碎片; 活率; 男性不育

Association analysis between sperm DNA fragmentation and HSP90AA1 polymorphism XUE Yamei, JIN Jianyuan, LI Kun. Department of Obstetrics and Gynecology, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the association between sperm DNA fragmentation and HSP90AA1 gene polymorphism. **Methods** The sperm chromatin dispersion (SCD) method was used to detect sperm DNA fragmentation index (DFI). Five selected SNPs in HSP90AA1 gene (rs10133307, rs10873531, rs11547523, rs11621560, and rs7145597) were genotyped using the Sequenom Massarray assay. According to sperm DFI, patients were divided into two groups: DFI>22.75% group and DFI≤22.75% group. The semen volume, sperm concentration, motility, and morphology were compared. The genotype and allele frequencies between different DFI were compared. **Results** The semen volume of DFI≤22.75% group was significantly smaller than that of DFI>22.75% group ($t=-2.06, P<0.05$). However, the sperm concentration, motility and morphology in DFI≤22.75% group were significantly higher than those in DFI>22.75% group ($t=-5.33, -7.47, -5.21, P<0.05$). No significant differences of genotype and allele frequencies between DFI>

22.75% group and DFI≤22.75% group were found ($\chi^2=0.74, 0.52, 0.32, 0.35, 0.28; 0.47, 0.21, 0.34, 0.14, 0.45, P>0.05$). The three of the SNPs (rs10133307, rs7145597, and rs10873531) in HSPAA1 formed a haplotype block ($D'=0.96 \sim 1.00$). There were three haplotypes (H1: AGA, H2: GAG, and H3: AGG) in this haplotype block with the frequencies of 74.42%, 18.46%, and 6.43%, respectively. **Conclusion** The present study suggests that HSP90AA1 five SNPs (rs10133307, rs10873531,

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.09.004

基金项目:浙江省自然科学基金(LY17H040002);浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY363);浙江省属院所扶持专项(C11920D-04);浙江省卫生高层次创新人才培养项目。

作者单位:310016 浙江杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院妇产科生殖医学中心(薛亚梅);温州医科大学附属第一医院生殖医学中心(金建远);浙江省医学科学院生殖生理实验室(李坤)

通讯作者:李坤, Email:likun_email@126.com

rs11547523,rs11621560,and rs7145597) may not be associated with sperm DNA fragmentation.

[Key words] heat shock protein; polymorphism; sperm; DNA fragmentation; sperm motility; male infertility

精子DNA碎片(sperm DNA fragmentation, SDF)检测已成为评价男性不育的一项重要指标,研究表明,SDF水平与精子质量之间存在明显的负相关^[1,2]。而氧化应激被认为是导致精子DNA碎片的主要原因,高水平的活性氧会导致不育男性精子中常见的DNA断裂^[3]。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)作为一类生物进化上高度保守的伴侣蛋白分子,在细胞的氧化应激损伤中发挥着重要的保护性反应^[4]。目前国内外未见HSP90AA1基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)与精子DNA碎片相关性的报道,本次研究旨在探讨精子DNA碎片与HSP90AA1基因多态性之间是否存在相关性,为进一步研究男性不育的机制提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2013年10月至2014年10月来温州医科大学附属第一医院生殖医学门诊进行精液检查的汉族人群患者,年龄23~46岁,平均年龄(32.82±5.37)岁。本次研究排除了已知不育原因的受试者,包括Y染色体微缺失、隐睾史、睾丸炎、精索静脉曲张、传染病、系统性疾病和异常核型。按照知情同意原则,签署知情同意书自愿参与研究。

1.2 精液检查 所有患者在禁欲3~5 d后手淫方法取精。根据WHO精液分析手册进行常规检查,分别测定精液体积、密度和活力,使用Tygerberg的严格形态标准评估精子形态^[5]。

1.3 精子DNA损伤检测 采用精子染色质扩散方法检测精子DNA碎片。步骤简述如下:新鲜精液用磷酸盐缓冲溶液稀释至精子密度 $10 \times 10^6/\text{ml}$,取18 μl 稀释精液与30 μl 溶解的琼脂糖混合。将20 μl 琼脂糖混合液置于预处理的载玻片上,盖上盖

玻片。将载玻片放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中5 min。移走盖玻片,放入酸性DNA变性液中7 min,然后放入裂解液中25 min。将玻片用蒸馏水洗涤,然后在不同浓度的乙醇溶液中脱水,在空气中干燥。200倍光镜下观察,比较精子核和核周围晕轮大小。正常的精子形态表现为大晕环或中晕环;有碎片的异常精子形态表现为小晕环、无晕环或退化。精子DNA碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)=DNA碎片精子数/计数精子总数 $\times 100\%$ 。根据已发表的文献,DFI指数分为两类, $>22.75\%$ 则预示着低生育力, $\leq 22.75\%$ 则预示着高生育力^[6]。

1.4 基因分型 通过公共数据库选择HSP90AA1基因多态性位点,最终rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560和rs7145597纳入本研究。采用Tiangen[®]Tianamp血液DNA试剂盒提取外周血DNA。基因分析采用Sequenom Massarray平台(Sequenom iPLEX assay, San Diego, CA, USA)。根据HSP90AA1的cDNA序列设计了5对引物(表1)。按如下条件进行PCR扩增:反应体系包括10 ng DNA,0.5 μl 10 \times PCR缓冲液,0.4 μl 25 mmol/L MgCl₂,0.1 μl 25 mmol/L dNTPs, 1 μl 0.5 $\mu\text{mol/L}$ primer Mix和0.2 μl 5 U/ μl Hot Star Taq polymerase。扩增条件如下:反应在94 $^{\circ}\text{C}$ 下进行15 min,随后在94 $^{\circ}\text{C}$ 下进行45个循环,持续20 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 持续30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 持续1 min,最终在72 $^{\circ}\text{C}$ 下培养3 min。延伸反应在94 $^{\circ}\text{C}$ 下进行30 s,然后在94 $^{\circ}\text{C}$ 持续5 s,随后在52 $^{\circ}\text{C}$ 持续5 s,5个循环,80 $^{\circ}\text{C}$ 持续5 s,最终在72 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育5 s。利用4.0版的Massarray Typer软件对基因分型结果进行了分析。所有多态性位点分型的call rates $>94\%$ 。

表1 HSP90AA1基因5个多态性位点引物设计

| 基因 | 上游引物(5'-3') | 下游引物(5'-3') | 扩增子大小/bp |
|------------|---------------------------------|--------------------------------|----------|
| rs10133307 | ACGTTGGATGTTACGCCCCACATTCTGAC | ACGTTGGATGGAAGTGGCCAGATGAAAACG | 200 |
| rs10873531 | ACGTTGGATGTGCAGATCCTTGTAGAGGTG | ACGTTGGATGACCTGTTAACTGGTACCAAG | 200 |
| rs11547523 | ACGTTGGATGGAGTATTACCCTAATAGCTGG | ACGTTGGATGAGCAGCACTGGTATCATCAG | 129 |
| rs11621560 | ACGTTGGATGGTAACAAGCCAAGATCGCAC | ACGTTGGATGTCTCCTTCAGAGTACAGACC | 223 |
| rs7145597 | ACGTTGGATGCTGTATGCTTTGGAGTGCTG | ACGTTGGATGAAACTGATGTGTCCCAGTCC | 174 |

1.5 统计学方法 采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较

采用 t 检验;基因多态性数据为计数资料,以百分比的形式表示,组间比较采用 χ^2 检验。基于拟合优度

χ^2 检验,对单核苷酸多态性进行了 Hardy-Weinberg equilibrium(HWE)检验。用 Haploview 软件(4.2 版本)进行连锁不平衡和单倍型分析。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精子 DFI>22.75% 组与 DFI≤22.75% 组的精液常规参数见表 2

表 2 不同 DFI 水平的精液参数比较

| 精液参数 | DFI≤22.75%组 | DFI>22.75%组 |
|-------|-----------------|---------------|
| 精液体积 | 2.64 ± 1.21* | 3.07 ± 1.49 |
| 精子密度 | 102.09 ± 62.29* | 64.14 ± 77.68 |
| 精子活率 | 62.63 ± 16.20* | 42.28 ± 18.48 |
| 正常形态率 | 4.67 ± 2.84* | 3.08 ± 3.06 |

注:*,与 DFI>22.75%组比较, $P < 0.05$ 。

由表 2 可见,DFI≤22.75%组患者的精液体积明显低于 DFI>22.75%组,差异有统计学意义($t = -2.06, P < 0.05$),但 DFI≤22.75%组患者的精子密度、活率和正常形态率明显高于 DFI>22.75%组(t 分别=-5.33、-7.47、-5.21, P 均<0.05)。

2.2 HSP90AA1 基因多态性位点基因型及等位基因频率比较见表 3

表 3 不同 DFI 水平的 HSP90AA1 多态性位点基因型及等位基因频率比较

| 位点 | 基因型 | DFI≤22.75%组 (n = 175) | | DFI>22.75%组 (n = 76) | |
|------------|-----|--------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | | 数量 | 频率 | 数量 | 频率 |
| rs10133307 | AA | 116 | 66.29 | 52 | 68.42 |
| | AG | 51 | 29.14 | 23 | 30.26 |
| | GG | 8 | 4.57 | 1 | 1.32 |
| rs10873531 | AA | 103 | 58.86 | 48 | 63.16 |
| | GA | 57 | 32.57 | 26 | 34.21 |
| | GG | 15 | 8.57 | 2 | 2.63 |
| rs11547523 | AA | 158 | 90.29 | 72 | 94.74 |
| | AG | 17 | 9.71 | 4 | 5.26 |
| | GG | 0 | 0 | 0 | 0 |
| rs11621560 | AA | 121 | 69.14 | 57 | 75.00 |
| | CA | 43 | 24.57 | 18 | 23.68 |
| | CC | 11 | 6.29 | 1 | 1.32 |
| rs7145597 | AA | 8 | 4.57 | 1 | 1.32 |
| | AG | 49 | 28.00 | 22 | 28.95 |
| | GG | 118 | 67.43 | 53 | 69.73 |

由表 3 可见,HSP90AA1 基因五个多态性位点

rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560 和 rs7145597 基因型的频数分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。精子 DFI>22.75%组与 DFI≤22.75%组相比较,HSP90AA1 基因 rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560 和 rs7145597 的基因型分布和等位基因频率分布比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.74、0.52、0.32、0.35、0.28; 0.47、0.21、0.34、0.14、0.45, P 均>0.05)。

2.3 Haploview 软件进行连锁不平衡和单倍型分析 发现了一个包括三个多态性位点(rs10133307、rs7145597 和 rs10873531)的单体域($D' = 0.96 \sim 1.00$)。单体域有三个单体型,分别是 H1(AGA)、H2(GAG)、H3(AGG)。其 H1 频率为 74.42%,H2 频率为 18.46%,H3 频率为 6.43%。

3 讨论

氧自由基作为细胞呼吸的代谢产物,可对蛋白质、酯类和核酸造成损伤,从而影响细胞功能。核酸是氧自由基攻击的最重要目标。在精液中,氧自由基主要由白细胞和精子本身产生,高水平的氧自由基可导致精子 DNA 损伤,从而影响精子密度、活率、形态等参数^[7,8]。本次研究结果表明,随着精子碎片率升高,常规精液检查指标中精子密度、活率及正常形态率存在明显下降。

HSP90 是一类生物进化上高度保守的细胞内蛋白分子伴侣,具有多种生物学功能,包括细胞保护、抗凋亡和免疫调节等。HSP90 在多种哺乳动物包括人的精子内存在表达。在非精索静脉曲张的少精症患者中 HSP90 mRNA 的表达量增加^[9],文献报道用基因敲除方法证明了 HSP90 的缺失可引起小鼠精子发生过程中的生殖细胞凋亡,导致精子发生停滞和睾丸萎缩^[10,11]。HSP90 位于人精子颈部、中段、尾部区域,在精子获能时表达量增加,在胞内钙稳态以及蛋白酪氨酸磷酸化方面发挥重要作用,氧化应激时精子 HSP90 的表达水平也发生变化^[12,13]。研究表明 HSP90 可在氧化应激条件下保护细胞,可激活一氧化氮合酶,有利于保护精子活力^[14]。因此推测精子 DNA 碎片率升高可能与 HSP90AA1 基因多态性有关。本次研究对 HSP90AA1 基因多态性与精子 DNA 碎片率进行了研究,结果显示在精子 DFI>22.75%组与 DFI≤22.75%组,HSP90AA1 基因 rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560 和 rs7145597 的基因型分布和等位基因频率分布比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05),说明 HSP90AA1 基因多态性对精子 DNA 损伤无明显影响。这也进一步说明 HSP90AA1 基因在

精子发生过程中的高度保守性^[15]。

目前,关于HSP90基因多态性影响男性生育力的机制仍缺乏较好的理论支撑,其相关的研究也不多,且结果存在差异。Yamamoto等^[16]研究了19位不育患者,包括重度少精和无精患者,发现HSP90基因错义突变与无精症及双侧精索静脉曲张的不育密切相关。另一篇文献纳入29位精索静脉曲张导致的无精或少精患者,结果发现了HSP90基因的三个无义突变,但与精索静脉曲张导致的不育没有明显关系^[15]。推测其原因可能在于:虽然精子细胞对氧化应激缺乏保护性的生物分子和修复机制,但精子可通过两种方式来保护自己免受氧化损伤:①精子DNA与鱼精蛋白紧密结合,形成晶体结构,保护其免受氧化损伤^[17];②精液中含有酶和非酶抗氧化剂,降低精液中的活性氧含量^[18]。

本次研究存在一定局限性。首先,纳入的观察对象数量有限,存在一定的样本局限性。其次,主要分析了HSP90AA1基因五个位点多态性与精子DNA损伤率的关系,不能排除其他位点与精子DNA损伤率的关联。因此,后续研究需进行大样本、不同地区、不同种族之间的深入研究和验证,这样结果才更有说服力,才能更好地为男性不育的预防以及治疗提供有效的指导。

综上所述,HSP90AA1基因rs10133307、rs10873531、rs11547523、rs11621560和rs7145597五个位点多态性对精子DNA碎片率无明显影响。

参考文献

- 1 Evgeni E, Lymberopoulos G, Touloupidis S, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men [J]. *Andrologia*, 2015, 47(10): 1166-1174.
- 2 Cho C, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review [J]. *Arab J Urol*, 2018, 16(1): 21-34.
- 3 Agarwal A, Virk G, Ong C, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction [J]. *World J Mens Health*, 2014, 32(1): 11-17.
- 4 Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(7): 515-528.
- 5 Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions [J]. *J Androl*, 2001, 22(2): 192-205.
- 6 Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay [J]. *Andrology*, 2013, 1(5): 715-722.
- 7 Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 719-723.
- 8 Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(6): 1518-1527.
- 9 Ferlin A, Speltra E, Patassini C, et al. Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: relation to oligozoospermia and varicocele [J]. *J Urol*, 2010, 183(3): 1248-1252.
- 10 Kajiwara C, Kondo S, Uda S, et al. Spermatogenesis arrest caused by conditional deletion of Hsp90alpha in adult mice [J]. *Biol Open*, 2012, 1(10): 977-982.
- 11 Grad I, Cederroth CR, Walicki J, et al. The molecular chaperone Hsp90 alpha is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15770.
- 12 Li K, Xue Y, Chen A, et al. Heat shock protein 90 has roles in intracellular calcium homeostasis, protein tyrosine phosphorylation regulation, and progesterone-responsive sperm function in human sperm [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115841.
- 13 谢海锋,李坤,陈爱君,等.热休克蛋白90与人精子氧化应激相关性的初步研究 [J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(7): 59-62.
- 14 Cao WL, Wang YX, Xiang ZQ, et al. Cryopreservation-induced decrease in heat-shock protein 90 in human spermatozoa and its mechanism [J]. *Asian J Androl*, 2003, 5(1): 43-46.
- 15 Hassun Filho PA, Cedenho AP, Lima SB, et al. Single nucleotide polymorphisms of the heat shock protein 90 gene in varicocele-associated infertility [J]. *Int Braz J Urol*, 2005, 31(3): 236-242.
- 16 Yamamoto L, Lima S, Pesquero JB, et al. Mutations analysis of the HSP90 gene in infertile men with idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78: S264-S264.
- 17 Oliva R. Protamines and male infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 417-435.
- 18 Twigg J, Fulton N, Gomez E, et al. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(6): 1429-1436.

(收稿日期 2019-06-13)

(本文编辑 蔡华波)