

VDAC2 基因多态性与原发性不育症男性精液质量的相关性分析

章 轶^{1,2}, 赵 丹^{1,3}, 徐 璞⁴, 吴 炜^{1,5}, 王增军^{1,2*}, 王心如^{1,5}

(¹南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学附属南京妇幼保健院泌尿外科, ⁴妇科, 江苏 南京 210029; ⁵南京医科大学现代毒理学教育部重点实验室, 卫生毒理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨 VDAC2 基因多态性与原发性不育症男性精液质量的相关性。方法: 收集 523 例原发性不育男性患者的精液和血液, 分别应用计算机辅助精液分析系统 (CASA) 行精液质量分析和应用 TaqMan SNP 基因分型技术对 VDAC2 基因位点 rs2804535、rs7896741、rs11001334 和 rs1259503 行基因分型, 分析 VDAC2 基因多态性与精液质量的相关性。结果: 没有发现 rs2804535 和 rs7896741 各基因型与精液质量相关, 但是 rs11001334 中, TT 基因型与 CC 基因型比较, 精子浓度显著降低 ($P = 0.045$)。CT 基因型和 CT+TT 基因型分别与 CC 基因型比较, 精子活力显著增加 ($P = 0.026$, $P = 0.037$); rs1259503 的 GC+CC 基因型与 GG 基因型比较, 精液量显著降低 ($P = 0.039$)。结论: VDAC2 基因多态性与原发性不育症男性精液质量相关。

[关键词] VDAC; 基因多态性; 男性不育; 精液

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1087-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20140817

Association of the VDAC2 gene polymorphism with semen quality in Han-Chinese population with idiopathic male infertility

Zhang Yi^{1,2}, Zhao Dan^{1,3}, Xu Pu⁴, Wu Wei^{1,5}, Wang Zengjun^{1,2*}, Wang Xinru^{1,5}

(¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Urology, ⁴Department of Gynaecology, Nanjing Metering Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004; ⁵Key Laboratory of Modern Toxicology of Education Ministry, Department of Toxicology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the possible association between VDAC2 gene polymorphism and sperm quality of idiopathic male infertility. **Methods:** A genetic typing of VDAC2 gene locuses (rs2804535, rs7896741, rs11001334 and rs1259503) by TaqMan SNP genotyping technique and a semen analysis by computer-assisted semen analysis (CASA) were respectively performed in 523 Han-Chinese males with idiopathic infertility in order to analyze the correlation between gene polymorphism and sperm quality. **Results:** No significant association between genotypes and semen quality was found at locuses rs2804535 and rs7896741. However, at rs11001334, it was found that the TT genotype showed a significant lower sperm concentration compared with the CC genotype ($P = 0.045$). Moreover, compare with CC genotype, the sperm motility of CT genotype had a significant increase ($P = 0.026$); meanwhile, the same trend was found in the combination of CT and TT genotypes ($P = 0.037$). However, at rs1259503, the combination of GC and CC genotypes had a remarkable reduction of semen volume than GG genotype ($P = 0.039$). **Conclusion:** These findings indicate that the gene polymorphism in the VDAC2 gene may be associated with semen quality.

[Key words] voltage-dependent anion channel; genotyping; male infertility; semen

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1087-1091]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (30872575, 30973199)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zengjunwang@njmu.edu.cn

电压依赖性阴离子通道 (VDAC) 是一种最早在 1976 年于双核草履虫线粒体外膜上发现的孔道样蛋白, 分子量在 28 000~36 000^[1]。哺乳动物含有 3 种不同的 VDAC 基因亚型 (VDAC1, VDAC2 和

VDAC3), 同源性 75%~94%, 其编码的蛋白质均具有通道样结构特点, 参与多种生理和病理机制, 如能量代谢和细胞凋亡等。

尽管 VDAC 在体细胞中被广泛研究, 但在人的生殖组织和细胞中的研究很少有报道。近年来在动物实验研究表明, 在睾丸中 VDAC1 主要分布在支持细胞, VDAC2 和 VDAC3 存在于生殖细胞^[2-4]。VDAC3 在睾丸间质细胞中表达丰富^[2]。在成熟的精子中, 还发现 VDAC2 和 VDAC3 丰富存在于牛精子鞭毛的外周致密带 (ODF) 中^[5]。另外, VDAC2 还分布在精子头部的顶体膜上^[6]。功能上 VDAC2 和 VDAC3 与精子的发生和精子的功能有关^[6-7]。最近, 多个研究表明在人的精子存在 VDAC 并且还可能参与顶体反应^[8-9]。

在 3 种 VDAC 亚型中, VDAC2 在精母细胞和精子细胞中转录和翻译, 并且分布于成熟精子线粒体鞘和 ODF 上^[5]。前期的研究证实在弱精症的精子中 VDAC2 的 mRNA 是高表达的^[7]。另外, 与抗 VDAC2 抗体共孵育的精子出现 Ca^{2+} 内流减少, 活力下降^[9]。这些都表明 VDAC2 影响男性的生育能力。

VDAC2 基因在体细胞中被广泛研究, 但在男性生殖方面的研究报道还比较少。目前还没有 VDAC2 基因多态性与人类精子质量相关性方面的报道。因此本研究在中国汉族人群中收集了 523 例原发性不育患者的血液和精液, 分析研究 VDAC2 基因的 4 个标志性单核苷酸多态性 (SNP) 的发生频率, 以探讨两者间的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

从 2011 年 3 月~2012 年 6 月, 征集于南京医科大学第一附属医院就诊的 523 例原发性不育患者。根据 WHO 定义这些患者为生育年龄并且在没有采取避孕措施的情况下性生活 12 个月后仍然没有生育, 有发育良好的第二性征和正常的睾丸体积, 并排除了女方因素。在性激素检测中, 血清雄性激素 (T)、黄体生成素 (LH)、卵泡刺激素 (FSH) 浓度水平都在正常范围。睾丸炎、精道梗阻、隐睾症、先天性输精管缺如、细胞遗传学异常、Y 染色体微缺失以及无精子症和抗精子抗体阳性的患者被排除在本实验外^[10]。每个患者都填写了一张调查问卷并完成诸如年龄、吸烟、喝酒习惯和其他的生活方式等相关问题。此外, 还收集每例患者 5 ml 外周血用于基因组 DNA 提取和 1 份精液用于精液分析。本研究经过南

京医科大学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 精液质量分析

根据 WHO 指南, 采用计算机辅助精液质量分析系统 (WLJY-9000; Weili New Century Science and Tech Dev, 北京) 行精液质量分析。用于分析与 VDAC2 基因多态性相关性的数据包括精液质量的 4 个参数: 精液量、精子浓度、精子总数和精子活力。精子数量和活力是估计男性精子受孕能力的可靠参数指标^[11]。参数检测 2 次并取平均值。整个实验执行严格的质量控制。

1.2.2 标志性 SNP (tagSNP) 选择

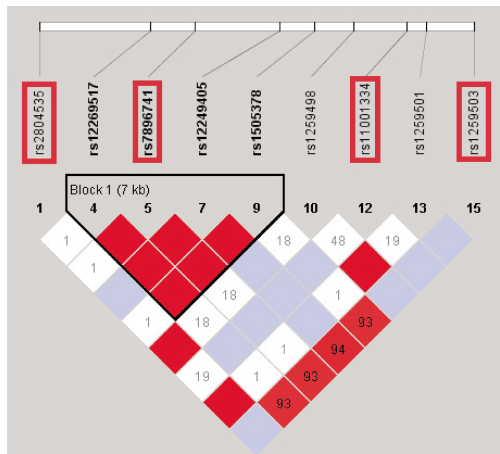
从 HapMap 的北京汉族人群中获取所使用的基因型数据 (HapMap Data Rel 24/phase II nov08, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), 在长度为 20.64 kb 人类 VDAC2 基因中, 上下游各延长 1 500 kb 寻找 SNP。有 9 个最小等位基因频率 (MAF) > 0.05 的 SNP 被选出。按照 r^2 值, 采用 Haploview 4.0 软件形成了这个区域的 SNP 连锁不平衡 (LD) 图。 r^2 值说明了每一个 SNP 能预测另一个 SNP 的能力^[12]。预设参数 $r^2 > 0.80$, 得到 4 个能代表其他 SNP 的 tagSNP (rs2804535, rs7896741, rs11001334, rs1259503), 平均 r^2 值为 0.96, MAF 为最小等位基因频率 (图 1)。

1.2.3 基因分型

使用 DNA 提取试剂盒 (Genomic DNA kit, 北京天根) 从 523 例原发性不育患者的外周血白细胞中提取基因组 DNA。在 ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems, 美国) 中行 TaqMan SNP 基因型分析。PCR 扩增条件为 95°C 60 s, 然后 95°C 15 s 40 个循环, 之后 56°C 10 s, 60°C 60 s, 最后一个循环 60°C × 10 min 结束。随机抽取 10% 基因组 DNA 重复行 TaqMan SNP 基因分型行质量控制以确保基因分型结果的可靠性。最终的结果: 100% 基因分型成功, 10% 基因组 DNA 重复结果 100% 一致。

1.3 统计学方法

采用 STATA9.0 统计软件进行分析。精子的浓度进行对数转换以实现方差的同质性和残差的正态分布。除此以外, 其他参数没有进行对数转换。统计分析中采用多元线性回归分析 VDAC2 基因多态性与精液参数的相关性。年龄、吸烟、喝酒、体质指数 (BMI) 和禁欲天数是潜在的混杂因素。采用 χ^2 检验评估吸烟、喝酒的变量差异, 而年龄、BMI 等连续变



TaqSNP	r ² 值	alleles	MAF
rs2804535		C/T	0.078
rs1259498	0.864		
rs1259501	1.000		
rs7896741		G/C	0.356
rs12269517	1.000		
rs12249405	0.828		
rs1505378	1.000		
rs11001334	1.000	C/T	0.078
rs1259503	1.000	C/G	0.467

r² = 0.965 777 78。VDAC2 基因的 4 个 tagSNP 在包括 VDAC2 基因以及上下游各 1 500 bp 长度的区域内的位置。4 个 tagSNP 被红色框出。

图 1 VDAC2 基因中 tagSNP 的选择

Figure 1 Selection of tagSNP in VDAC2 gene

表 1 523 例原发性不育患者的个人特征与精液质量的关系

Table 1 The relationship between personal characteristic and sperm quality in 523 patients with idiopathic infertility (x̄ ± s)

	n (%)	精液量(ml)	精子浓度 ^a	精子总数 ^a	精子活力(%)
年龄(岁)					
≤29	183(34.99)	3.27 ± 1.35	3.49 ± 1.28	4.63 ± 1.41	43.70 ± 26.32
29~33	183(34.99)	3.39 ± 1.41	3.80 ± 1.17	4.97 ± 1.21	49.72 ± 26.04
> 33	157(30.02)	3.39 ± 1.27	3.95 ± 0.95	5.11 ± 1.02	49.65 ± 21.98
吸烟					
是	260(49.71)	3.31 ± 1.22	3.71 ± 1.16	4.87 ± 1.21	48.12 ± 24.45
否	263(50.29)	3.38 ± 1.47	3.79 ± 1.16	4.94 ± 1.26	47.07 ± 25.78
饮酒					
是	207(39.58)	3.30 ± 1.36	3.66 ± 1.25	4.81 ± 1.33	45.32 ± 26.20
否	316(60.42)	3.37 ± 1.34	3.80 ± 1.09	4.97 ± 1.18	49.08 ± 24.30
BMI					
< 20	49(9.37)	3.25 ± 1.22	3.46 ± 1.24	4.58 ± 1.28	44.70 ± 27.61
20~25	293(56.02)	3.33 ± 1.36	3.70 ± 1.19	4.85 ± 1.30	46.98 ± 24.53
≥25	181(34.61)	3.40 ± 1.37	3.90 ± 1.07	5.07 ± 1.10	49.37 ± 25.35
禁欲天数(d)					
< 4	190(36.33)	2.88 ± 1.10	3.63 ± 1.13	4.65 ± 1.18	49.50 ± 25.74
4~7	203(38.81)	3.49 ± 1.34	3.76 ± 1.10	4.97 ± 1.22	48.26 ± 24.36
≥7	130(24.86)	3.81 ± 1.49	3.91 ± 1.28	5.18 ± 1.29	43.77 ± 25.12

a: 经过对数转换后的数值。

量参数则用方差分析。所有数据以均数 ± 标准差(x̄ ± s)表示。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

523 例原发性不育患者平均年龄(31.75 ± 5.47)岁。平均禁欲天数(4.88 ± 2.66)d,根据世界 WHO 标准,少精 162 例,弱精 298 例,合并少弱精 129 例,精液参数正常 63 例。所选择的生活因素各分层与精液参数之间的关系见表 1。在 4 种精液参数中,尚没有发现各分层之间有统计学上的差异性。

表 2 显示基因型频率和精液参数变量之间的关系。可以看到,rs11001334 的 TT 基因型与 CC 基因型比较,精子浓度降低,具有统计学意义(P = 0.045)。CT 基因型和 CT+TT 基因型分别与 CC 基因型比较,精子活力增加,具有统计学意义(P = 0.026, P = 0.037)。在 rs1259503 中,GC+CC 基因型与 GG 基因型比较,精液量降低,具有统计学意义(P = 0.039)。没有发现 rs2804535 和 rs7896741 各基因型与精液质量相关。

3 讨论

不育症 WHO 定义为为一对生育年龄的夫妻在没有采取避孕措施的情况下在 12 个月后仍然没有怀孕。在我国一般推荐 2 年的时间。有 13%~15% 的生

表2 523例原发性不育患者VDAC2基因多态性与精液质量的关系

Table 2 The relationship between VDAC2 gene polymorphism and sperm quality in 523 patients with idiopathic infertility

($\bar{x} \pm s$)

SnP	基因型	n(%)	精液量(ml)	精子浓度 ^a	精子总数 ^a	精子活力(%)
rs2804535	TT	443(84.70)	3.38 ± 1.34	3.76 ± 1.14	4.94 ± 1.21	48.17 ± 25.38
	TC	80(15.30)	3.16 ± 1.37	3.69 ± 1.24	4.73 ± 1.35	44.38 ± 23.48
	CC	0(0.00)				
	TC+CC	80(15.30)	3.16 ± 1.37	3.69 ± 1.24	4.73 ± 1.35	44.38 ± 23.48
rs7896741	GG	300(57.36)	3.36 ± 1.30	3.70 ± 1.23	4.86 ± 1.28	48.12 ± 24.22
	GC	193(36.90)	3.36 ± 1.46	3.81 ± 0.99	4.98 ± 1.14	46.76 ± 25.90
	CC	30(5.74)	3.06 ± 1.10	3.81 ± 1.37	4.88 ± 1.46	47.69 ± 29.20
	GC+CC	223(42.64)	3.32 ± 1.41	3.81 ± 1.04	4.97 ± 1.18	46.89 ± 26.30
rs11001334	CC	453(86.62)	3.34 ± 1.36	3.76 ± 1.15	4.91 ± 1.23	46.70 ± 25.48
	CT	69(13.19)	3.34 ± 1.29	3.72 ± 1.21	4.88 ± 1.25	53.91 ± 21.52*
	TT	1(0.19)	4.20 ± 0.00	1.61 ± 0.00*	3.05 ± 0.00	16.38 ± 0.00
	CT+TT	70(13.38)	3.36 ± 1.29	3.69 ± 1.23	4.85 ± 1.26	53.37 ± 21.83*
rs1259503	GG	194(37.09)	3.49 ± 1.29	3.74 ± 1.13	4.94 ± 1.18	49.88 ± 24.82
	GC	250(47.80)	3.29 ± 1.41	3.79 ± 1.16	4.94 ± 1.24	45.73 ± 24.79
	CC	79(15.11)	3.18 ± 1.28	3.62 ± 1.23	4.69 ± 1.35	47.86 ± 26.64
	GC+CC	329(62.91)	3.26 ± 1.38*	3.75 ± 1.18	4.88 ± 1.27	46.24 ± 25.22

a: 经过对数转换后的数值。与CC基因型比较,* $P < 0.05$;与GG基因型比较,* $P < 0.05$ 。所有 P 值都经过年龄、吸烟、饮酒、BMI和禁欲时间校正。

育年龄的夫妻会遇到这种情况。其中,由于男性方面所造成的原因占到50%。导致男性不育的原因很多,其中精索静脉曲张、内分泌异常、精液中存在抗精子抗体、理化因素、炎症、某些药物的作用以及糖尿病等全身基础性疾病都有可能引起精液质量的异常而引起男性不育。另外,约一半的男性不育经过各项检查仍然找不到原因,这部分被称为原发性不育(也叫特发性男性不育)。

本实验首次探讨了VDAC2基因多态性与原发性男性不育症患者精液质量的关系。试验使用tagSNP方法,选取了4个VDAC2基因的tagSNP(rs2804535,rs7896741,rs11001334 and rs1259503)。在523例原发性不育患者中,用TaqMan基因分型的方法行基因分型,发现rs11001334和rs1259503分别与精子浓度和精液量明显相关,rs11001334还与精子活力明显相关。尽管rs11001334和rs1259503分别与精子浓度和精液量明显相关,但是这2个SNP的各基因型之间的精子总数没有发现显著差异。

在rs11001334中,CT基因型和CT+TT基因型分别与CC基因型比较,精子活力增加($P = 0.026, P = 0.037$)。VDAC2影响精子活力可能与VDAC2的功能和定位有关。通过体细胞的研究发现,VDAC蛋白通道具有电压依赖性门控通道的特性,通过孔径和离子双重选择性调节线粒体膜对离子(如 Na^+, K^+ ,

Ca^{2+} 和 Cl^-)和小分子(如ATP、琥珀酸盐)的通透性,调控膜内外离子、ATP及其他代谢物的流向。线粒体是呼吸链电子传递和ATP产生的部位,ATP和ADP在线粒体与胞质间的有效交换保证了呼吸链的正常耦联和细胞呼吸作用正常进行,而ATP、ADP的转运必须通过ANT/VDAC转运蛋白复合体(ANT,即腺嘌呤核苷酸载体,位于线粒体内膜上)。VDAC通过影响ATP、ADP在线粒体与胞质间的转运而参与能量代谢。Hinsch等^[5]推测VDAC2可能与精子鞭毛的ATP传递有关并且因此调节精子的活动能力。本研究前期证实在弱精症患者精子中VDAC2 mRNA表达水平与正常生育组比较是显著升高的^[7],而VDAC mRNA的变化可能也是影响精子活力的重要原因^[13]。同时VDAC2可能参与精子的获能和顶体反应。精子内蛋白质的磷酸化是精子在获能、精卵结合过程中的重要改变之一。蛋白质的磷酸化受cAMP/PKA信号通路调节。在精子获能和精卵结合的过程中,发生磷酸化的蛋白质主要集中在精子鞭毛上,少数蛋白位于精子头部。在既往对小鼠精子的研究中,通过二维电泳和质谱分析发现VDAC蛋白在小鼠精子获能过程中发生磷酸化,故推测精子鞭毛VDAC蛋白磷酸化参与精子获能的过程。 Ca^{2+} 信号通路通常被认为参与精子获能、激活和顶体反应。在体细胞中,VDAC是一种调节线粒体内与胞质 Ca^{2+} 浓度的通道蛋白,同样,在精子顶

体膜和鞭毛鞘膜中的 VDAC 也有着相同的功能,进而影响精子获能、激活和精卵结合的过程。另外,抗 VDAC 抗体可以影响到精子顶体的完整性,可能是由于 VDAC 调节精子顶体区域膜内外 Ca^{2+} 和 Cl^{-} 离子的浓度,从而维持膜内外正常的离子渗透压所致。这些都说明了 VDAC2 基因多态性的变化可能会影响到精子的活力。

随着辅助生殖技术和基因诊断在临床上越来越广泛的应用,对 VDAC 基因多态性的研究可以帮助我们解释男性原发性不育在遗传学方面的部分病因和机制。并且这种基因变异由于可以遗传到下一代,遗传因素对于男性生殖的影响已逐渐被越来越多的研究关注。在以后的研究中,将从表观遗传学的角度去研究 VDAC2 和精子活力的关系。

本研究表明 VDAC2 基因变异、rs11001334 与人类精子活力相关。到目前为止,这是第一次关注和研究 VDAC 基因变异和人类精液质量相关性分析。本研究结果将可能有利于发现更多 VDAC 在男性生殖系统的功能,并且为探索原发性男性不育的原因和机制,以及探索新的诊断和治疗方法提供线索。

[参考文献]

- [1] Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria[J]. *J Membr Biol*, 1976, 30(2):99-120
- [2] Decker WK, Craigen WJ. The tissue-specific, alternatively spliced single ATG exon of the type 3 voltage-dependent anion channel gene does not create a truncated protein isoform in vivo[J]. *Mol Genet Metab*, 2000, 70(1):69-74
- [3] Hinsch KD, Asmarinah H, Hinsch E, et al. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1518(3):329-333
- [4] Sampson MJ, Decker WK, Beaudet AL, et al. Immobile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42):39206-39212
- [5] Hinsch KD, De Pinto V, Aires VA, et al. Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15):15281-15288
- [6] Triphan X, Menzel VA, Petrunikina AM, et al. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa [J]. *Pflugers Arch*, 2008, 455(4):677-686
- [7] Liu B, Wang P, Wang Z, et al. Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(12):719-724
- [8] Menzel VA, Cassara MC, Benz R, et al. Molecular and functional characterization of VDAC2 purified from mammalian spermatozoa[J]. *Biosci Rep*, 2009, 29(6):351-362
- [9] Liu B, Wang P, Wang Z, et al. The use of anti-VDAC2 antibody for the combined assessment of human sperm acrosome integrity and ionophore A23187-induced acrosome reaction[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e16985
- [10] Ji G, Gu A, Xia Y, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms and risk of idiopathic azoospermia in a Chinese population[J]. *Reprod Biomed Online*, 2008, 17(1):36-41
- [11] Larsen L, Scheike T, Jensen TK, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(7):1562-1567
- [12] Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(2):263-265
- [13] 赵丹, 吴炜, 章轶, 王增军, 王心如. Zn 缺乏对精子 VDAC mRNA 的影响 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(4):443-448

[收稿日期] 2014-02-24