

*POLG1*外显子1、3、4、7突变与弱精子症的相关性 及其对mtDNA和4 977 bp缺失的影响

李平^{1#} 洪丹^{1#} 缪霜¹ 郑九嘉² 楼哲丰¹ 黄学锋² 金龙金^{1*}

(¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035;

²温州医科大学附属第一医院生殖医学中心, 温州 325000)

摘要 为了探索*POLG1*外显子1、3、4、7突变与弱精子症的相关性及对mtDNA序列突变和4 977 bp缺失的影响, 按WHO标准收集了120例弱精子症和101例精子活力正常的精液标本, 经PCR测序分析*POLG1*外显子1、3、4、7突变, 继而测序检测9例外显子4 c.948 G>A突变的弱精子症标本、9例无c.948 G>A突变的弱精子症标本和9例正常对照标本的mtDNA全序列, 利用巢式PCR技术分析9例c.948 G>A突变标本、9例无c.948 G>A突变的弱精子症标本和9例对照标本的4 977 bp缺失。结果显示: 在120例弱精子症中发现*POLG1*外显子4 c.948 G>A突变9例(7.5%), 显著高于对照组(0%, $P<0.05$)。c.948 G>A突变组mtDNA全序中突变率与对照组比无统计学差异($P>0.05$)。作者关注的两组中, 突变数有差异的位点累积突变频次突变组显著高于对照组($P<0.05$), 但与无c.948 G>A突变的弱精子症标本的累积突变频次比较无统计学意义; 突变组mtDNA 4 977 bp缺失率(7/9, 77.8%)显著高于对照组(2/9, 22.2%, $P<0.05$)和无c.948 G>A突变的弱精子症组(2/9, 22.2%, $P<0.05$)。以上结果提示, 弱精子症的发生可能与*POLG1* c.948 G>A突变有相关性, 弱精子症线粒体DNA某些位点的累积突变率增高, 但可能不是*POLG1* c.948 G>A突变引起; c.948 G>A突变可能会增加mtDNA 4 977 bp缺失, 从而影响精子线粒体功能, 导致精子活动力下降。

关键词 弱精子症; *POLG1*; mtDNA; 4 977 bp缺失

Mutations in Exons 1, 3, 4, and 7 of Polymerase Gamma-1: Its Correlation with Asthenospermia and Its Effects on mtDNA Mutation and 4 977 bp Deletion

Li Ping^{1#}, Hong Dan^{1#}, Miao Shuang¹, Zheng Jiujia², Lou Zhefeng¹, Huang Xuefeng², Jin Longjin^{1*}

(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory for Medical Genetics, School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the correlation between mutations in exons 1, 3, 4, and 7 of polymerase gamma-1 and asthenospermia and to study the effect of *POLG1* mutations on mtDNA mutation and 4 977 bp deletion. We collected 120 semen samples from patients with asthenospermia and 101 normal semen samples from the healthy donors based on WHO criteria. The mutations of *POLG1* exon 1, 3, 4, and 7 in these samples

收稿日期: 2013-12-02 接受日期: 2014-01-13

温州市科技合作项目(批准号: H20090063)和浙江省教育厅科研项目(批准号: Y201223693)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86689780, E-mail: 1304071636@qq.com

Received: December 2, 2013 Accepted: January 13, 2014

This work was supported by Wenzhou Science and Technology Cooperation Project (Grant No.H20090063) and Scientific Research Project in Zhejiang Education Department (Grant No.Y201223693)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689780, E-mail: 1304071636@qq.com

网络出版时间: 2014-03-25 16:55 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0399.html>

have been analyzed by sequencing. MtDNA sequences and 4 977 bp deletions have been analyzed in nine asthenospermia samples with c.948 G>A mutation, nine asthenospermia samples without c.948 G>A mutation, and in nine healthy semen. samples. The *POLG1* exon 4 c.948 G>A mutation was found in 9 (7.5%) of 120 asthenospermia samples, which was significantly higher than that of the control group. The accumulated mutation frequency at the mutation sites with different mutation number was significantly higher in the asthenospermia group with c.948 G>A mutations than that of the control group, but not significantly different from the asthenospermia group without c.948 G>A mutations. The mtDNA 4 977 bp deletion rate was significantly higher in the asthenospermia group with c.948 G>A mutations (7/9, 77.8%) than that of the control group (2/9, 22.2%), or of the asthenospermia group without c.948 G>A mutations (2/9, 22.2%). The accumulated mutation rate of mtDNA at some sites was increased in the asthenospermia samples, which was not caused by *POLG1* c.948 G>A mutation. The c.948 G>A mutation increases mtDNA 4 977 bp deletion, thus affecting sperm mitochondrial function and leading to decreased sperm motility.

Key words asthenospermia; *POLG1*; mtDNA; 4 977 bp deletion

近年来,随着工业的发展以及环境污染的加剧,不孕不育症患者呈逐年增长趋势,已经成为一个全球关注的重要话题。男性因素引起的不育约占不孕不育的一半,其中又有约50%是精子质量异常或性功能障碍引起^[1]。精子质量异常分为精子密度、形态、活力异常等,其中精子活力是衡量精子质量及决定精子受精能力的一项重要指标。根据WHO标准^[2],将精子活力分为a~d 4个等级,若a级<25%且a+b<50%可诊断为弱精子症(asthenospermia, AST)。目前,弱精子症的病因尚未明确,可能涉及遗传、激素、免疫、环境等多种因素。细胞能量的主要来源于线粒体,同时也是精子获能后能量的主要来源。Kao等^[3]、Panoup等^[4]、郑九嘉等^[5]和Selvi等^[6]研究显示,线粒体基因的点突变和片段缺失、拷贝数的变化与精子活力低下具有相关性。DNA聚合酶 γ 是目前已知的唯一一个参与mtDNA复制和校正修复的DNA聚合酶^[7]。DNA聚合酶 γ 全酶是一个异质三联体,由一个催化亚基和两个相同的附属亚基组成^[8]。编码DNA聚合酶 γ 的催化亚基(Pol γ A)的POLG基因位于人类15q25染色体上,命名为*POLG1*基因,该基因共有23个外显子,其中在第1个外显子存在CAG三核苷酸重复序列,第2~23外显子具有编码mtDNA聚合酶的功能。研究证明,成熟的催化亚基(Pol γ A)由C末端的聚合酶结构域和N末端的3'→5'核酸外切酶结构域组成,分别具有5'→3' DNA聚合酶活性和3'→5'核酸外切酶校正活性以及5'端dRP裂解酶活性,其中N末端的核酸外切酶结构域能够通过提高酶的校正活性来提高mtDNA复制的保真度^[9]。据相关报道,已经对DNA聚合酶 γ 在生化水平和分子遗传学水

平上做过相关的研究分析,证明其在mtDNA复制和校正修复中起着至关重要的作用^[10-11]。但*POLG1*基因突变在弱精子症中的作用及其对mtDNA突变和缺失的作用尚未明确,报道较少见。

1 材料与方法

1.1 研究对象

弱精子症患者、正常对照者精液标本来自温州医科大学附属第一医院生殖医学中心。弱精子症患者的诊断参照WHO(第四版)标准^[2]。选取120例精子活力低下(a级<25%且a+b<50%)的患者,平均年龄32±6岁,a级和a+b级精子百分率分别是14.60±8.41和23.08±10.97。正常对照精液标本来自经询问病史后确认夫妻结婚后女方先前已怀孕过或者经试管婴儿(IVF)成功怀孕的男性(男方生殖系统各项检查和精液常规检查均正常)。我们收集了101例正常精液标本(a级>25%且a+b>50%)作对照组,平均年龄31±5岁,a级和a+b级精子百分率分别是55.09±8.04和71.07±8.83。弱精子症和正常对照组标本精子经计算机辅助精液分析系统(CASA)分析,所有精液标本在采集前禁欲3~5天,手淫法收集精液标本,在37℃水浴20~30 min,完全液化后进行分析。

1.2 主要试剂

*POLG1*基因PCR扩增引物依据文献[12]设计(表1),线粒体基因24对PCR扩增引物依据文献[13]设计,巢式PCR扩增检测4 977 bp缺失内外侧引物是利用Primer Primer 5.0软件自行设计的,引物具体信息及扩增产物大小见表1。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR聚合酶试剂、DNA

表1 PCR扩增引物
Table 1 PCR primers used in this study

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度	备注
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Product length	Remarks
<i>POLG1</i>	CCA GCT CCG TCC CCG CGT CCG A	CTC TCG AGA GCA TCT GGA TGT CCA ATT G	165 bp	Exon 1
	TTT GGT CTC ACT TGT GTC CC	GCA ACA GAG ACA CGT GCC	429 bp	Exon 3
	TCC ACA CCA CCA AGC AGT GGT	GGA ACC AGA GCA AGG GAC AT	357 bp	Exon 4
	TGA GCT GTG CCA TGT CAG TG	TAC AGA GCC AGT CCA CTA GG	396 bp	Exon 7
mtDNA	AAC CAC AGT TTC ATG CCC ATC	TGT TAG TAA GGG TGG GGA AGC	495 bp	nested PCR
	ACC CTA TTG CAC CCC CTC TAC	CTT GTC AGG GAG GTA GCG ATG	358 bp	nested PCR

片段纯化试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;琼脂糖、Tris试剂为Promega公司进口分装;蛋白酶K为Merk公司的产品。

1.3 方法

1.3.1 精子全基因组DNA的提取 精液标本液化后用PBS洗涤2~3次,精子沉淀加300~500 μL消化液(200 mmol/L Tris-HCl, 400 mg/L蛋白酶K, 15 μmol/L DTT, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA), 56 °C消化10~12 h,之后加入1 μL 10 mg/mL RNase, 37 °C消化,去除RNA。1:1加入3 mol/L KAc溶液沉淀蛋白质2次,异丙醇沉淀DNA,再用75%乙醇洗涤DNA沉淀1次,TE溶解。

1.3.2 PCR反应和产物鉴定 *POLG1*外显子扩增和mtDNA 24对引物扩增的反应体系: 2.0 μL DNA模版,上游引物和下游引物(20 μmol/L)各0.1 μL, 2.0 μL dNTP(2.5 mmol/L), 1.5 μL MgCl₂(25 mmol/L), 2.0 μL 10×PCR缓冲液, 0.1 μL Ex Taq酶,补充ddH₂O至25.0 μL。*POLG1*外显子PCR反应条件如下: 96 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C~61 °C退火45~48 s, 72 °C延伸1 min, 39个循环;最后72 °C延伸10 min。mtDNA PCR反应条件为: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性10 s, 59 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 39个循环;最后72 °C延伸10 min。

1.3.3 4 977 bp缺失的检测 4 977 bp缺失的检测采用巢式PCR,扩增体系同上,在95 °C预变性5 min; 95 °C变性20 s, 55 °C或57 °C退火20 s, 72 °C延伸20 s, 39个循环;最后72 °C延伸60 s。以上扩增产物用1.5%琼脂糖电泳鉴定。巢式PCR扩增阴性的标本通过3次重复结果均为阴性,并用mtDNA扩增引物12F12R^[13](12F位于缺失区外,12R位于缺失区内)扩增mtDNA显示阳性以验证DNA模板的可信度。

1.3.4 PCR产物的纯化和测序 按照宝生物工程(大连)有限公司DNA片段纯化试剂盒说明书纯化

PCR产物,纯化产物送上海华大基因有限公司进行正向测序。

1.4 数据分析

1.4.1 序列比对 测序返回结果用Gentle软件与NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)及Mitomap数据库(www.mitomap.org)上提供的*POLG1*基因和人类线粒体剑桥序列进行比对,发现可疑的变异位点后用ChormasPro软件读取测序结果峰图,进一步确认。将序列比对所发现的所有变异位点在Mitomap和NIEHS(<http://tools.niehs.nih.gov/polg/index.cfm/polg/view>)数据库中检索是否已经报道过。

1.4.2 统计学分析 将序列比对结果进行统计学分析,组间突变率的比较采用卡方检验,应用SPSS 19.0软件进行分析。

2 结果

2.1 *POLG1*外显子1、3、4、7序列分析结果

2.1.1 PCR扩增结果 120例弱精子症和101例正常对照组精子DNA标本经PCR反应后全部扩增出特异性条带,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示与预期产物片段大小一致(图1)。

2.1.2 *POLG1*外显子1、3、4、7变异分析 221例精子标本(120例弱精子症和101例正常对照)经基因序列分析,结果与NCBI数据库中*POLG1*基因序列比对,共检测到3个位点的杂合突变(图2、表2),其中2个为错义突变,1个为同义突变。c.948 G>A同义突变的频率弱精子症组显著高于正常对照组($P<0.05$),其他位点突变率两组间比较无显著性差异($P>0.05$);所有突变在NCBI和NIEHS(<http://tools.niehs.nih.gov/polg/index.cfm/polg/view>)数据库中查找,发现c.1370 G>A突变未见报道过。c.128 A>G突变导致CAG三核苷酸重复数的变化,即CAG三核苷酸重复数从10

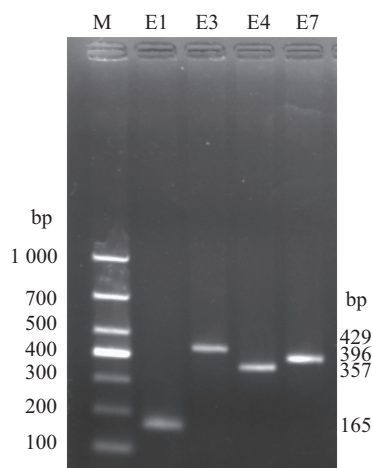


图1 精子标本*POLG1*外显子1(E1)、3(E3)、4(E4)、7(E7) PCR扩增结果电泳图(M:DL1000)

Fig.1 Electrophoretogram for PCR products of *POLG1* exon 1 (E1), 3 (E3), 4 (E4) and 7 (E7) in semen samples (M:DL1000)

变为not10(表3)。

2.1.3 CAG三核苷酸重复序列长度多态性在正常组和弱精子症组中的分布 CAG三核苷酸重复基因分型的结果显示, CAG三核苷酸不同重复数的等位基因在正常对照组和弱精子症患者组中的分布见表3所示。可见, 对照组和弱精子症组中最常见的基因型为10/10基因型, 出现率分别是99%和98.3%; 其次为10/not10杂合基因型, 出现率分别为1%和1.7%, 两

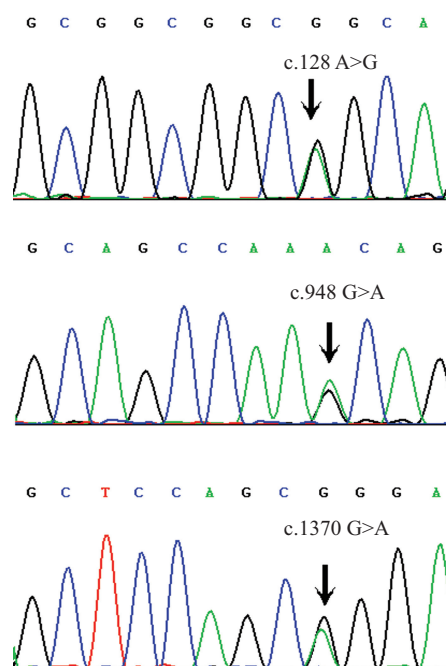


图2 *POLG1*测序结果部分峰图(示突变点)

Fig.2 Peaks (mutational sites) of *POLG1* sequencing results

者差异无显著性; 未发现not10/not10基因型。

2.1.4 错义突变位点氨基酸性质的改变 c.1370 G>A错义突变导致编码氨基酸的酸碱性的改变, 使碱性氨基酸(精氨酸)变为极性中性氨基酸(谷氨酰胺), c.128 A>G突变氨基酸的性质改变则刚好相反,

表2 *POLG1*突变位点在弱精子症组和对照组中的分布

Table 2 Distribution of *POLG1* mutation sites in the asthenospermia and control group

外显子 Exon	突变位点 Mutation sites	碱基改变 Base substitution	氨基酸改变 Amino acid change	对照组(n=101) Control group (n=101)	弱精子症组(n=120) Asthenospermia group (n=120)	P值 P value	是否报道 Reported
1	c.128	A>G	Q43R	1	2	>0.05	Y
4	c.948	G>A	K316K	0	9 ^a	<0.05	Y
7	c.1370	G>A	R457Q	0	1	>0.05	N

a: $P < 0.05$, 与对照组比; “N”表示没有报道过, “Y”表示有报道过。

a: $P < 0.05$ compared with control group; N: not reported; Y: reported.

表3 CAG三核苷酸重复序列长度多态性在对照组和弱精子症组中的分布

Table 3 Distribution of the length polymorphism of CAG trinucleotide repeats in the asthenospermia and control group

基因型 Genotype	对照组(n=101) Control group (n=101)	弱精子症组(n=120) Asthenospermia group (n=120)	合计 Total
10/10	100	118	218
10/not10	1	2	3
not10/not10	0	0	0
Total	101	120	221

表4 9例c.948 G>A突变组标本与9例对照组标本mtDNA全序总突变频次的比较

Table 4 Mutation frequency of mitochondrial sequence in nine c.948 G>A mutation samples and nine control samples

	c.948 G>A突变组(<i>n</i> =9) Asthenospermia group with c.948 G>A mutation (<i>n</i> =9)	对照组(<i>n</i> =9) Control group (<i>n</i> =9)	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
Accumulated mutation frequency	342	315	>0.05

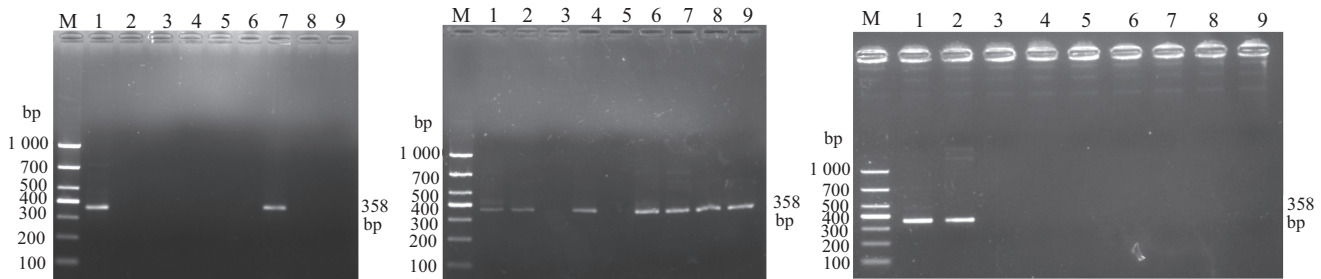
表5 mtDNA突变位点在c.948 G>A突变组和对照组分布

Table 5 Distribution of mitochondria variation sites in the c.948 G>A mutation and control groups

基因 Gene	突变位点 Mutation sites	碱基改变 Base substitution	氨基酸改变 Amino acid change	c.948 G>A 突变组(<i>n</i> =9) Asthenospermia group with c.948 G>A mutation (<i>n</i> =9)	无c.948 G>A 弱精子症组(<i>n</i> =9) Asthenospermia group without c.948 G>A mutation (<i>n</i> =9)	对照组(<i>n</i> =9) Control group (<i>n</i> =9)	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
D-LOOP	489	T>C		5 ^a	6	1	
16S	3010	G>A		3 ^a	3	0	
ND2	4883	C>T	P>P	3 ^a	3	0	
	5178	C>A	L>M	3 ^a	3	0	
ATP8	8414	C>T	L>F	3 ^a	2	0	
ATP6	8701	A>G	T>A	6 ^a	6	2	
CO3	9540	T>C	L>L	5 ^a	6	2	
ND3	10398	A>G	T>A	5 ^a	7	2	
	10400	C>T	T>T	5 ^a	6	2	
ND4	10873	T>C	P>P	5 ^a	6	2	
	10998	G>A	A>N	3 ^a	1	0	
ND5	12705	C>T	I>I	5 ^a	6	2	
ND6	14668	C>T	M>M	4 ^a	2	0	
CytB	14783	T>C	L>L	5 ^a	6	2	
	15043	G>A	G>G	5 ^a	6	2	
	15301	G>A	L>L	5 ^a	5	2	
D-LOOP	16182	A>C		2 ^a	0	0	
	16223	C>T		4 ^a	6	2	
	16261	C>T		2 ^a	0	0	
	16299	A>G		3 ^a	0	0	
	16311	T>C		2 ^a	2	0	
	16362	T>C		4 ^a	3	1	
16S	1937	A>G		0	0	2 ^b	
ND1	3970	C>T	L>L	2	3	4 ^b	
CO1	6392	T>C	N>N	2	2	4 ^b	
	6960	C>T	L>L	0	0	2 ^b	
ND3	10310	G>A	L>L	2	3	4 ^b	
D-LOOP	16136	T>C		0	0	2 ^b	
	16140	T>C		0	0	2 ^b	
	16304	T>C		2	2	4 ^b	
Accumulated mutation frequency				95**	95 ^{ΔΔ}	46	<0.01

a: c.948 G>A突变组中, mtDNA突变位点的突变例数多于对照组; b: 对照组中, mtDNA突变位点的突变例数多于c.948 G>A突变组; ***P*<0.01, 与对照组比较; ^{ΔΔ}*P*<0.01, 与对照组比较。

a: numbers of mitochondrial point mutations were larger in the c.948 G>A group than the control group; b: numbers of mitochondrial point mutations were smaller in the c.948 G>A group than the control group; ***P*<0.01 compared with control group; ^{ΔΔ}*P*<0.01 compared with control group.



A: 对照组; B: 突变组; C: 无突变弱精子症组; M: DL1000。

A: normal semen samples; B: asthenospermia samples with c.948 G>A mutation; C: asthenospermia samples without c.948 G>A mutation; M: DL1000.

图3 巢式PCR扩增4 977 bp缺失片段电泳图

Fig.3 Electrophoretogram for 4 977 bp deletion segments amplified by nested PCR

使极性中性氨基酸变为碱性氨基酸。

2.2 mtDNA全序测序分析结果

经PCR扩增18例标本(9例c.948G>A突变的弱精子症标本和9例对照组标本)mtDNA全序。测序结果与修正后剑桥序列(rCRS)进行对比, 两组总的突变频次比较无统计学差异(表4, $P>0.05$)。我们重点分析这些突变位点中突变例数在两组中差异 ≥ 2 的位点: 有22个突变位点c.948 G>A突变组的突变例数比对照组多2例以上, 其中5个为错义突变; 有8个突变位点对对照组的突变例数比c.948 G>A突变组多2例以上, 均为同义突变或16sRNA和D-LOOP区突变。这30个突变位点的累积突变频次c.948 G>A突变组(95)显著高于对照组(46)($P<0.01$)。进一步对这30个位点在9例无c.948 G>A突变的弱精子症精子中的突变情况进行分析, 结果突变情况与突变组相近, 累积突变频次95, 与突变组比较无统计学意义(表5, $P>0.05$)。

2.3 4 977 bp缺失结果

利用巢式PCR技术扩增27例标本(9例c.948 G>A突变的弱精子症标本、9例无c.948 G>A突变的弱精子症标本和9例对照组标本)4 977 bp缺失, 发现9例c.948 G>A突变标本中有7例发生4 977 bp缺失, 9例无c.948 G>A突变的弱精子症标本和9例对照标本中各有2例发生4 977 bp缺失(图3), c.948 G>A突变组的缺失率显著高于其他两组($P<0.05$)。

3 讨论

1996年, Ropp等^[14]首次克隆到了人类的POLG1基因, 并确定其定位于染色体的15q25。POLG1基因是一个编码POLG催化亚基的核基因, 共有23个外显子。POLG是催化mtDNA复制功能唯一的聚合酶,

对维持线粒体正常功能有着重要的作用。POLG1基因敲除的纯合子小鼠在胚胎发育的第8天即死亡, 并表现出严重的mtDNA缺乏和组织细胞环氧化酶活性丧失^[15]。据相关报道, 已经对DNA聚合酶 γ 在生化水平和分子遗传学水平上做过相关的研究分析, 证明其在mtDNA复制和校正修复中起着至关重要的作用^[10-11]。

CAG三核苷酸重复序列编码N末端的多聚谷氨酰胺^[14]。CAG三核苷酸重复数目的遗传改变是人类的一种突变类型, 在通过生殖细胞传递时, 有可能是不稳定的。CAG三核苷酸重复多态性和许多疾病相关, 包括Huntington病、肌强直性营养不良以及多种脊髓和小脑的萎缩等^[16]。有学者认为, CAG三核苷酸重复数多态性与男性不育相关^[17]; 但也有研究认为, 不能肯定POLG1基因CAG三核苷酸重复多态性与男性不育的相关性^[7]。本研究在弱精子症组中检出2例、对照组中检出1例CAG重复数10/not10杂合型多态性, 其余均为CAG重复数10/10等位基因, 不能推测CAG三核苷酸重复数目多态性与弱精子症是否相关。

Kao等^[3]和Gashti等^[18]对生育和不育的男性mtDNA 4 977 bp缺失进行研究, 发现4 977 bp缺失与精子活力和男性不育相关, 在弱精子症、少精子症和原发不育患者中4 977 bp缺失发生率高, Ieremiadou等^[19]的研究也证实了这一结果。然而, mtDNA 4 977 bp缺失与POLG1基因突变是否相关呢? van Goethem等^[20]对那些已知有mtDNA缺失的进行性眼外肌麻痹患者的POLG1基因进行检测, 发现那些患者大多携带有POLG1基因杂合突变; Graziewicz等^[21]研究发现, 带有POLG1基因Y955C突变的小鼠模型增加mtDNA损伤的风险。我们分析了9例带

有 *POLG1* c.948G>A 突变的弱精子症患者, 其中有 7 例存在 mtDNA 4 977 bp 缺失(7/9), 缺失率显著高于未携带 *POLG1* c.948G>A 突变的正常对照组(2/9, $P<0.05$), 而且也显著高于未携带 *POLG1* c.948G>A 突变的弱精子症组(2/9, $P<0.05$)。因此, 我们推测 *POLG1* c.948G>A 突变可能与导致 mtDNA 4 977 bp 缺失和弱精子症的产生相关。虽然 c.948 G>A 为同义突变, 但其变异并不都是无义的。例如, Wilm's 肿瘤基因 *WT1* 的同义突变就可使其 mRNA 高表达, 进而增加小儿白血病发生的风险^[22]。同义突变之所以能引起病变, 可能是因为它改变了蛋白质翻译的效率、mRNA 稳定性或影响了基因的拼接^[23]。在本研究中, c.948G>A 突变组使 mtDNA 4 977 bp 缺失率增加, 推测 c.948G>A 同义突变有可能通过上述途径影响蛋白质的活性或功能, 但有待于深入研究。

本研究中 mtDNA 全序的突变率数据分析结果可见, 弱精子症(不管是否携带 c.948G>A 突变)总的突变率与对照组比无统计学差异, 而部分位点(30 个突变位点)弱精子症中的累积突变频次显著高于对照组, 提示 mtDNA 全序中部分突变可能与弱精子症相关, 但 c.948 G>A 突变并没有使这些位点的突变率进一步增加, 提示该突变可能不影响 mtDNA 序列的突变率。

参考文献 (References)

- 1 Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000; 15(7): 1431-4.
- 2 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (fourth edition). New York: Cambridge University Press, 1999.
- 3 Kao SH, Chao HT, Liu HW, Liao TL, Wei YH. Sperm mitochondrial DNA depletion in men with asthenospermia. *Fertil Steril* 2004; 82(1): 66-73.
- 4 May-Panloup P, Chrétien MF, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malthiery Y, *et al.* Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum Reprod* 2003; 18(3): 550-6.
- 5 郑九嘉, 黄学锋, 杨宗, 杨旭, 张李雅, 等. mt ND2 基因多态性与弱精子症的相关性分析. *中国细胞生物学学报* (Zheng Jiujia, Huang Xuefeng, Yang Zong, Yang Xu, Zhang Liya, *et al.* Analysis of the ND2 gene polymorphisms associated with asthenospermia patients. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(4): 546-54.
- 6 Selvi Rani D, Vanniarajan A, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. A novel missense mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene as a cause of low sperm motility in the Indian subcontinent. *Fertil Steril* 2006; 86(6): 1783-5.
- 7 Akinin-Seifer IE, Touraine RL, Lejeune H, Jimenez C, Chouteau J, Siffroi JP, *et al.* Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multicentre French study. *Hum Reprod* 2005; 20(3): 736-40.
- 8 Longley MJ, Ropp PA, Lim SE, Copeland WC. Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase gamma: identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. *Biochemistry* 1998; 37(29): 10529-39.
- 9 Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, *et al.* Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* 2002; 52(2): 211-9.
- 10 Kaguni LS. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 293-320.
- 11 Copeland WC, Longley MJ. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *ScientificWorldJournal* 2003; 3: 34-44.
- 12 Blok MJ, Bosch BJ, Jongen E, Hendrickx A, Die-Smulders CE, Hoogendijk JE, *et al.* The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *J Med Genet* 2009; 46(11): 776-85.
- 13 Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: Analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(4): 967-73.
- 14 Ropp PA, Copeland WC. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* 1996; 36(3): 449-58.
- 15 Hance N, Ekstrand MI, Trifunovic A. Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14(13): 1775-83.
- 16 Rovio A, Tiranti V, Bednars AL, Suomalainen A, Spelbrink JN, Lecrenier N, *et al.* Analysis of the trinucleotide CAG repeat from the human mitochondrial DNA polymerase gene in healthy and diseased individuals. *Eur J Hum Genet* 1999; 7(2): 140-6.
- 17 Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1585-96.
- 18 Gashti NG, Salehi Z, Madami AH, Dalivandan ST. 4977-bp mitochondrial DNA deletion in infertile patients with varicocele. *Andrologia* 2014; 46(3): 258-62.
- 19 Ieremiadou F, Rodakis GC. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Res Notes* 2009; 2: 18.
- 20 Van Goethem G, Dermout B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001; 28(3): 211-2.
- 21 Graziewicz MA, Bienstock RJ, Copeland WC. The DNA polymerase gamma Y955C disease variant associated with PEO and parkinsonism mediates the incorporation and translesion synthesis opposite 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Hum Mol Genet* 2007; 16(22): 2729-39.
- 22 Ho PA, Kuhn J, Gerbing RB, Pollard JA, Zeng R, Miller KL, *et al.* WT1 synonymous single nucleotide polymorphism rs16754 correlates with higher mRNA expression and predicts significantly improved outcome in favorable-risk pediatric acute myeloid leukemia: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2011; 29(6): 704-11.
- 23 Mah JT, Chia KS. A gentle introduction to SNP analysis: Resources and tools. *J Bioinform Comput Biol* 2007; 5(5): 1123-38.