

mt ND2 基因多态性与弱精子症的相关性分析

郑九嘉¹ 黄学锋² 杨宗¹ 杨旭² 张李雅² 吕建新¹ 金龙金^{1*}

¹温州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温州医学院附属第一医院生殖医学中心, 温州 325000

摘要 为了探讨线粒体 ND2(mt ND2)基因多态性与弱精子症的相关性, 按 WHO 标准收集了 134 例弱精子症和 112 例精子活力正常的精液标本, PCR 测序或双向等位基因 PCR(Bi-PASA)技术分析 ND2 基因多态性, 统计 ND2 基因 4 个位点多态性在两组间的差异。应用变性高效液相色谱 (DHPLC)分析 m.5442T>C 和 m.5466A>G 多态性变异的异质性。结果发现了 34 个变异位点, 其中 6 个位点未曾报道; ND2 基因 m.5351A>G、m.5460G>A 和 m.5466A>G 变异率弱精子症组显著高于对照组($P<0.05$), m.5442T>C 变异率对照组显著高于弱精子症组($P<0.05$); 进一步分析 m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变阳性标本精子活力显著低于突变阴性标本($P<0.001$), m.5442T>C 突变阳性标本精子活力显著高于突变阴性标本($P<0.001$)。提示: ND2 基因一些核苷酸变异(m.5351A>G、m.5460G>A 和 m.5466A>G)可能与弱精子症有关, m.5460G>A 和 m.5466A>G 错义突变可能是精子活力的有害因素, 而 m.5442T>C 多态性可能对精子活力具有一定的帮助。

关键词 弱精子症; ND2 基因; 点突变; 基因变异

近年来不孕症呈逐年增长趋势, 据 1995 年世界卫生组织人类生殖特别规划署(WHO/HRP)的统计显示, 全球不孕夫妇已达 6 000~8 000 万对。仅在美国, 1995 年就有 670 万妇女寻求生育服务, 而由于男性因素引起的不育几乎占了一半^[1], 其多半是精子质量异常或功能障碍引起。作为细胞能量主要来源的线粒体(mitochondrion, mt), 同时也是精子能量的主要来源, 其功能的正常与否直接影响精子的活力。

NADH 脱氢酶亚单位 2(NADH dehydrogenase 2, ND2)基因是 mt DNA 编码 NADH 脱氢酶的一个亚基。NADH 脱氢酶是呼吸链复合体 I 的主要组成, 其在呼吸链中直接参与氢与电子传递并通过氧化磷酸化产生 ATP。近年来的研究显示线粒体基因的点突变和片段缺失、拷贝数的变化都与精子活力低下具有相关性。Panloup 等^[2]发现在活力正常精子中 mt DNA 拷贝数低于活力低下精子。Kao 等^[3,4]通过研究发现在活力低下精子发生大片段缺失的概率显著高于正常活力精子, 这些缺失区域包括 ND2、ND3、ATPase6 等编码基因及一些 tRNA 基因, 我室^[5]已往研究显示 ATPase6 基因突变与弱精子症(Asthenospermia, AST)可能有相关性。Selvi 等^[6]研究认为 ND4 基因的 m.11994C>T 变异与弱精子症有密切关系。迄今为止, 对线粒体基因的研究已陆续发现 ND2 基因突变与许多疾病相关, 而 ND2 基因的

点突变与弱精子症相关性研究国内外尚无相关报道。为了解 ND2 基因变异与弱精子症的相关性, 本文在 ND2 基因序列分析检测到基因变异的基础上, 利用双向等位基因 PCR 方法, 通过增加样本进一步检测可疑的变异位点, 进而探讨弱精子症男性不育患者与 ND2 基因变异之间的关系, 为进一步分析线粒体基因变异与弱精子症的相关性提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

弱精子症和正常对照精液标本于 2009 年 2 月~2009 年 11 月收集于温州医学院附属第一医院生殖医学中心, 弱精子症患者的诊断参照世界卫生组织(WHO)修订标准^[7], 选取精子活动力低下(a 级<25% 且 a+b 级<50%)病人 134 例, 平均年龄为 32.10 ± 5.2 岁, a 级和 a+b 级精子百分率分别是 16.23 ± 14.54 和 26.60 ± 16.36 。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过孕或者经试管婴儿(*in vitro* fertilization, IVF)成功怀孕的男性(男方

收稿日期: 2010-04-14 接受日期: 2010-07-29

浙江省自然科学基金(No. Y206582)和温州市科技合作项目(No. H20090063)资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86689780, E-mail: jl20050101@yahoo.com.cn

Table 1 Bi-PASA primers used for detecting the polymorphism in ND2

		nt 5442 primers (from 5' to 3')		nt 5466 primers (from 5' to 3')	
Forward	Mutation	<u>gcc</u> <u>ggg</u> <u>ccc</u> <u>gGA</u> TGA GTG TGG GGA GGA <u>G</u>	Mutation	<u>ggc</u> <u>ccc</u> <u>gcg</u> <u>gAG</u> GTA GGA GTA GCG TGG <u>C</u>	
	Normal	<u>ggc</u> <u>ggc</u> <u>cgg</u> <u>gAT</u> ACA AAA CCC ACC CCA T	Normal	<u>ggc</u> <u>cgg</u> <u>cgg</u> <u>gCA</u> CAC TCA TCG CCC TTA	
Reverse	Mutation	<u>ggc</u> <u>ggc</u> <u>cgg</u> <u>gAT</u> ACA AAA CCC ACC CCA <u>C</u>	Mutation	<u>ggc</u> <u>cgg</u> <u>cgg</u> <u>gCA</u> CAC TCA TCG CCC <u>TTG</u>	
	Normal	<u>gcc</u> <u>ggg</u> <u>ccc</u> <u>gGA</u> TGA GTG TGG GGA GGA A	Normal	<u>ggc</u> <u>ccc</u> <u>gcg</u> <u>gAG</u> GTA GGA GTA GCG TGG T	

The underline alphabets are the mismatches which at the 3' end of the Bi-PASA primers, the lowercase are 10-nucleotide G+C-rich 5' tail.

生殖系统各项检查和精液常规检查均正常)。我们收集了112例正常精液标本(a级>25%且a+b>50%)作为对照,平均年龄为33.62±4.2岁,a级和a+b级精子百分率分别是54.54±8.71和68.98±8.30。弱精子症和正常对照标本精子活力通过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℃ 20min~30 min完全液化后进行分析。

1.2 主要试剂

PCR扩增引物依据文献^[8]合成,分别用3对引物扩增目的片段,引物及扩增片段长度如下,Mit-6F: 5'-TGG CTC CTT TAA CCT CTC CA-3'(3'起始位点3796),Mit-6R: 5'-AAG GAT TAT GGA TGC GGT TG-3'(3'起始位点4654),扩增片段长度898 bp; Mit-7F: 5'-ACT AAT TAA TCC CCT GGC CC-3'(3'起始位点4485),Mit-7R: 5'-CCT GGG GTG GGT TTT GTA TG-3'(3'起始位点5420),扩增片段长度975 bp; Mit-8F: 5'-CTA ACC GGC TTT TTG CCC-3'(3'起始位点5255),Mit-8R: 5'-ACC TAG AAG GTT GCC TGG CT-3'(3'起始位点6031),扩增片段长度814 bp; Bi-PASA方法正向扩增引物和反向验证引物应用Primer5.0软件自行设计(表1); DHPLC检测引物应用Primer5.0软件自行设计,上游引物序列: 5'-CCT CAA TCA CAC TAC TCC CCA TAT C-3'(3'起始位点5368),下游引物序列: 5'-AGT TGA TTA GGG TGC TTA-3'(3'起始位点5653),扩增片段长度306 bp。所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR聚合酶试剂、DNA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;Tris-饱和酚(pH 8.0)为上海生工生物工程技术有限公司产品;DHPLC分析用洗脱缓冲液A(成分为0.1mol/L乙三胺,TEAA)为Transgenomic公司产品,缓冲液B(成分为0.1mol/L TEAA +25%乙腈)为DHPLC分析所要求的纯度级。

1.3 方法

1.3.1 精子全基因组DNA的提取 精子标本用PBS洗涤2~3次,沉淀加200~500 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℃消化过夜,常规酚-氯仿法抽提精子基因组DNA, TE溶解。

1.3.2 PCR反应和产物鉴定 引物Mit-6、7、8配对的PCR反应: 2.0 μl DNA模板,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dd H₂O至22.0 μl。反应体系在94℃预变性5 min,按94℃变性30 s,60℃退火45 s,72℃延伸1 min程序共循环35次,最后72℃终末延伸6 min,扩增产物用1.6%琼脂糖电泳鉴定。

Bi-PASA扩增反应: 2.0 μl DNA模板, Mit-8F引物、Mit-8R引物和等位基因特异引物(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dd H₂O至22.0 μl。反应体系在94℃预变性5 min,按94℃变性30 s,59℃退火45 s,72℃延伸1 min程序循环3次,再按94℃变性30 s,62℃退火45 s,72℃延伸1 min程序循环32次,最后72℃终末延伸6 min,扩增产物用1.6%琼脂糖电泳鉴定。

1.3.3 PCR产物的纯化和序列测定 按宝生物工程(大连)有限公司DNA片段纯化试剂盒说明书操作纯化PCR产物,纯化产物送上海生工生物技术有限公司进行正向测序。Bi-PASA扩增筛查出有突变的阳性样本,经Mit-8F和Mit-8R引物重新PCR扩增,产物经纯化后送上海生工生物技术有限公司进行正向测序,将结果与剑桥序列进行比对,并观察测序峰图是否出现突变。

1.3.4 针对可能存在异质性突变的DHPLC确证分析 为避免Bi-PASA方法检测到的异质性电泳条带可能是假阳性的干扰,我们针对可疑异质性突变样本再用变性高效液相色谱(DHPLC)确证其异质

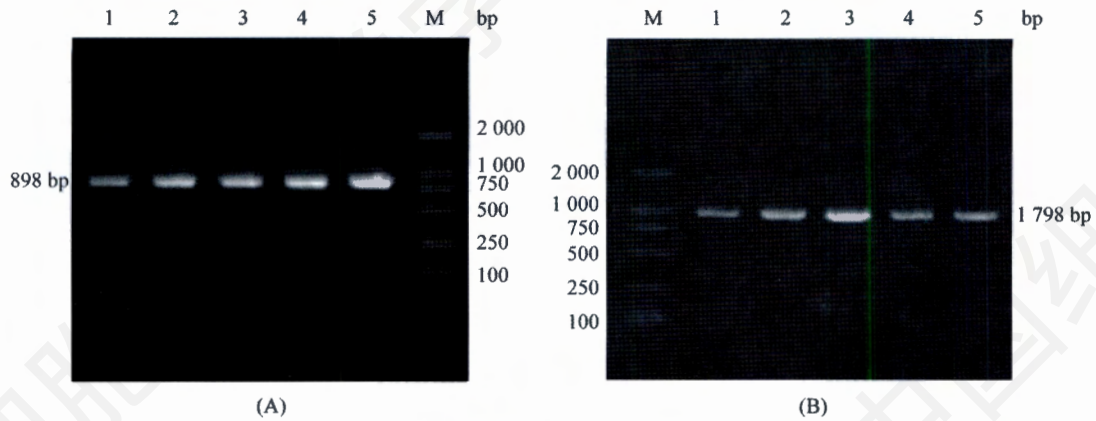


Fig.1 The PCR amplified results of mt DNA

M: DL 2 000 marker; A: the PCR amplified products of 6F/6R, 1~3: AST cases, 4,5: control cases; B: the PCR amplified products of 7F/8R, 1~3: AST cases, 4,5: control cases.

Table 2 ND2 mutation in the Asthenospermia(AST) and controls

Position	Replacement	AST		Control		χ^2 value	P value	Previously reported
		n=74	%	n=60	%			
4491	G→A ^A	2	2.7	0	0	0.321		Y
4670	C→T	1	1.4	1	1.7	0.001		Y
4706	A→G	1	1.4	0	0	0.001		Y
4715	A→G	7	9.5	6	10.0	0.011		Y
4732	A→G ^A	0	0	1	1.7	0.011		Y
4811	A→G	0	0	1	1.7	0.011		N
4820	G→A	2	2.7	2	3.3	0.001		Y
4824	A→G ^A	8	10.8	5	8.3	0.232		Y
4826	C→T	1	1.4	0	0	0.001		N
4833	A→G ^A	1	1.4	1	1.7	0.001		Y
4850	C→T	0	0	4	6.7	3.044		Y
4856	T→C	1	1.4	0	0	0.011		N
4883	C→T	12	16.2	10	16.7	0.005		Y
4884	A→C ^A	0	0	1	1.7	0.001		N
4895	A→G	2	2.7	3	5.0	0.057		Y
4924	G→A ^A	2	2.7	0	0	0.321		Y
4973	T→C	1	1.4	0	0	0.001		Y
5063	T→C	1	1.4	0	0	0.001		Y
5090	T→C	0	0	1	1.7	0.001		Y
5093	T→C	1	1.4	1	1.7	0.001		Y
5100	C→T	0	0	2	3.3	0.750		Y
5108	T→C	2	2.7	1	1.7	0.001		Y
5147	G→A	1	1.4	1	1.7	0.001		Y
5153	A→G	3	4.1	1	1.7	0.088		Y
5178	C→A ^A	10	13.5	10	16.7	0.071		Y
5351	A→G	7*	9.5	0	0	4.230	0.04	Y
5402	A→G	0	0	1	1.7	0.001		N
5417	G→A	4	5.4	4	6.7	0.001		Y
5441	A→G	1	1.4	0	0	0.001		Y
5442	T→C ^A	0	0	4	6.7	3.044		Y
5460	G→A ^A	7*	9.5	0	0	4.230	0.04	Y
5466	A→G ^A	3	4.1	0	0	0.981		Y
5474	A→G	1	1.4	0	0	0.001		Y
5492	T→C	1	1.4	0	0	0.001		N

^APresents missense mutation; *P<0.05.

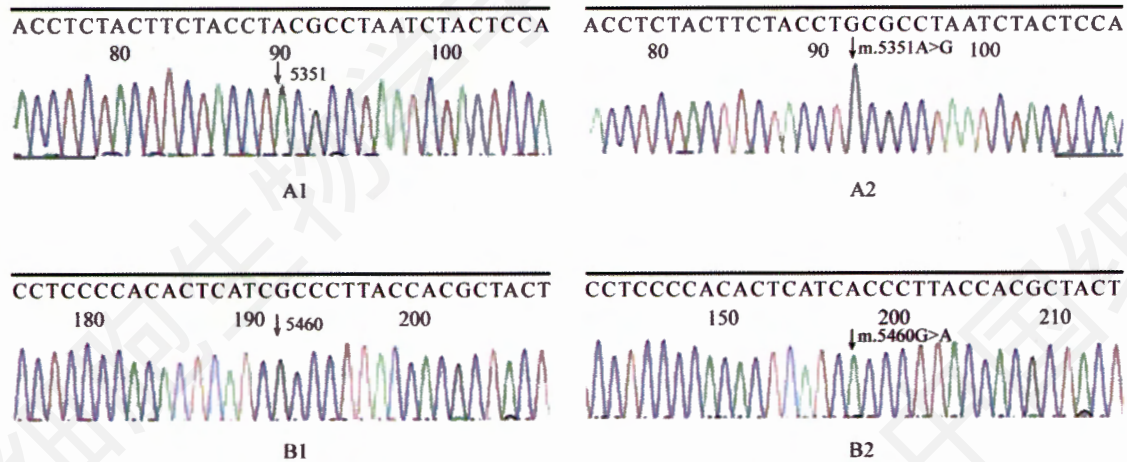


Fig.2 The partial results of sequencing ND2 gene

A1: normal; A2: m.5351A>G mutation; B1: normal; B2: m.5460G>A mutation.

性。检测到的突变阳性标本用 DHPLC 引物重新 PCR 扩增后,产物用于变性高效液相色谱(DHPLC, Transgenomic 公司,型号: WAVE 系统)分析,每次 DHPLC 仪自动加样 5 μ l,以一定的变性温度将样本在 DNA 分离柱(DNA Sep, Transgenomic, USA)中洗脱。洗脱液(由缓冲 A 和 B 组成)所含成分为乙腈和乙三胺,乙腈浓度线性递增通过缓冲液 A 和 B 的比例变化来达到,缓冲液 B 比例以每分钟 2% 的速率增加。缓冲液 A 为 0.1 mol/L 乙三胺,缓冲液 B 为 0.1 mol/L 乙三胺 + 25% 乙腈。不同的洗脱峰通过紫外(260 nm)探测器检测获得。每次运行后以 75% 乙腈清洗分离柱。

1.4 数据分析

1.4.1 序列比对 测序返回结果用 Gentle 软件与 Mitomap 数据库(www.mitomap.org)上提供的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 数据库中检索是否已报道过。

1.4.2 统计学分析 将序列比对结果进行统计分析,组间突变率的比较采用卡方检验,平均突变率和精子活力(均数 \pm 标准误, mean \pm SEM)的比较采用 *t* 检验或近似 *t* 检验,应用 SSPS 13.0 软件进行分析。

1.4.3 氨基酸变异分析 针对筛查到的变异位点,在 Mitomap 数据库中的 Amino Acid Translation Tables 查找氨基酸的相应改变,分析基因变异对应的氨基酸性质的改变。

2 结果

2.1 ND2 基因序列分析结果

2.1.1 PCR 扩增结果 74 例弱精子症和 60 例正常对照精子 DNA 标本经 PCR 反应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 ND2 基因核苷酸变异分析 134 例精子标本(74 例弱精子症和 60 例正常对照)经基因序列分析,结果与剑桥序列比对,共检测到 ND2 基因 34 个位点的碱基变异,其中 10 个为错义突变,24 个为同义突变; m.5351A>G 同义突变和 m.5460G>A 错义突变的变异率弱精子症组显著高于对照组($P < 0.05$);其它位点突变率两组比较无显著性差异($P > 0.05$);所有突变经在 Mitomap 数据库中查找发现 6 个突变位点未见报道过,分别是 m.4811A>G、m.4826C>T、m.4856T>C、m.4884A>G、m.5402A>G、m.5492T>C 突变(表 2,图 2);134 例全部出现 m.4769A>G, nt4769G 可能是中国人的特异性碱基;ND2 基因平均突变率和平均错义突变率弱精子症组均高于对照组,但无显著性差异($P > 0.05$),总突变率和总错义突变率也无显著性差异($P > 0.05$)(图 3,图 4)。

2.2 ND2 基因的 Bi-PASA 扩增

2.2.1 ND2 基因 nt 5442C、nt 5466G 位点 Bi-PASA 扩增检测结果 在 134 例精子标本基因序列分析的基础上,选取突变率最接近显著差异的两个错义突变位点 m.5442T>C($P = 0.081$)和 m.5466A>G($P = 0.322$),采用双向特异等位基因 PCR(Bi-PASA)扩增方法对 60

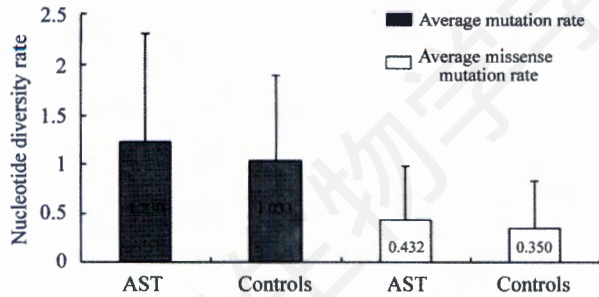


Fig.3 Comparison of ND2 gene average mutation rate and average missense mutation rate in the AST and controls

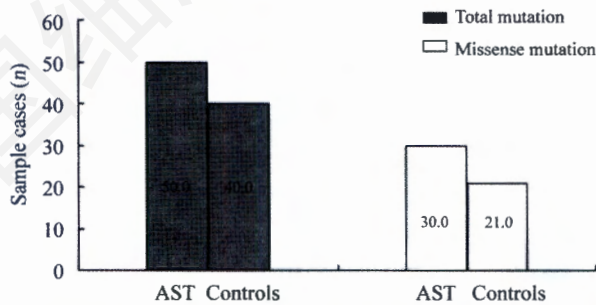


Fig.4 Comparison of ND2 gene total mutation and total missense mutation in the AST and controls

例弱精子症和 52 例正常对照进行突变筛查。ND2 基因 m.5442T>C 和 m.5466A>G 变异位点的 Bi-PASA 扩增产物电泳结果见图 5 和图 6。

2.2.2 nt 5442C 和 nt 5466G 位点的变异率分析 经 Bi-PASA 方法检测 ND2 基因 nt 5442C 和 nt 5466G 位点变异, 在 60 例弱精子组中检测到 m.5466A>G 变异

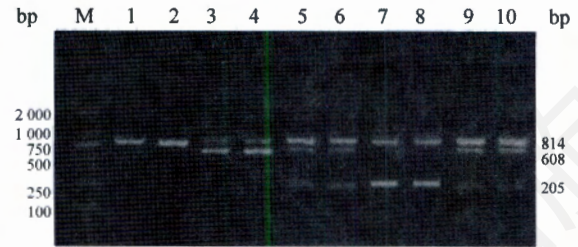


Fig.5 Detection of m.5442T>C missense mutation by Bi-PASA M: DL 2 000 marker; 1, 2: the PCR amplified products of Mit-8F and Mit-8R primers; 3, 4: nt 5422 negative samples(forward direction primers); 5, 6: nt 5442 positive sample(forward direction primers, 205bp); 7, 8: nt 5422 negative samples(reverse primers); 9, 10: nt 5442 positive sample(reverse primers, 608bp).

4 例, 52 例对照组中检测到 m.5442T>C 变异 2 例。结合 134 例的测序结果, 在总共 134 例弱精子症标本和 112 例正常对照标本中检测到 m.5442T>C 和 m.5466A>G 的突变率(表 3), 统计两组间的差异, 结果均具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2.3 阳性标本的测序验证 Bi-PASA 方法检测到的突变阳性标本重新用 Mit-8F 和 Mit-8R 引物扩增, 正向测序, 测序结果与 Bi-PASA 扩增结果一致(图 7 和图 8)。图中同时附上正常标本测序图作为对照, 与正常峰图的比对, 分析突变位点。

2.2.4 m.5442 T>C、m.5466 A>G 异质性突变的 DHPLC 分析 在测序验证突变的同时也针对 m.5442T>C 和 m.5466A>G 突变标本进行 DHPLC 分析, 结果和正常阴性标本比较出现了两个洗脱峰, 即

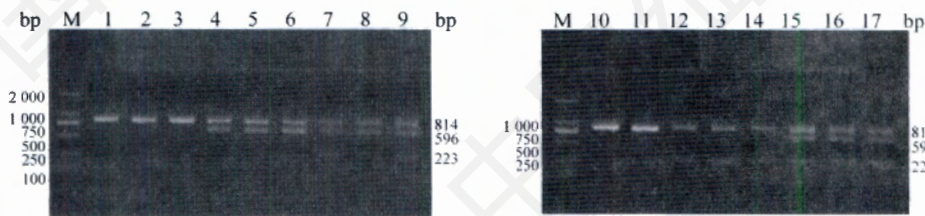


Fig.6 Detection of m.5466A>G missense mutation by Bi-PASA

M: DL 2 000 marker; 1~3,10,11: the PCR amplified products of Mit-8F and Mit-8R primers; 4~6: nt 5466 negative samples(forward direction primers); 7~9: nt 5466 positive sample(forward direction primers, 223bp); 12~14: nt5466 negative samples(reverse primers); 15~17: nt 5466 positive sample(reverse primers, 596bp).

Table 3 m.5442T>C and m.5466A>G missense mutation in the AST and controls

Position	Replacement	AST		Control		χ^2 value	P value
		n=134	%	n=112	%		
5442	T→X	0	0	6	5.5	5.275	0.022($P<0.05$)
5466	A→G	7	5.2	0	0	4.281	0.038($P<0.05$)

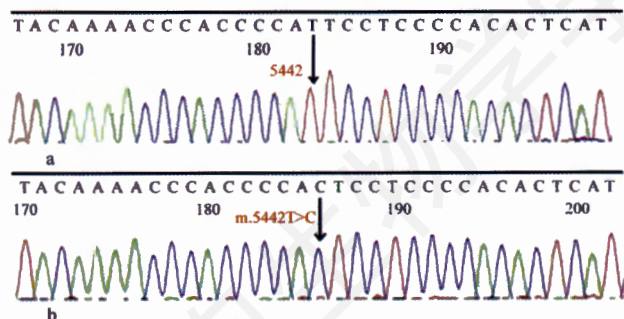


Fig.7 The results of sequencing m.5442T>C missense mutation a: normal sample, arrow denotes T base; b: mutation sample, arrow denotes C base.

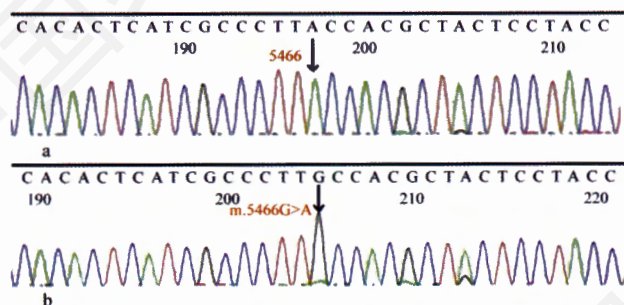


Fig.8 The results of sequencing m.5466A>G missense mutation a: normal sample, arrow denotes A base; b: mutation sample, arrow denotes G base.

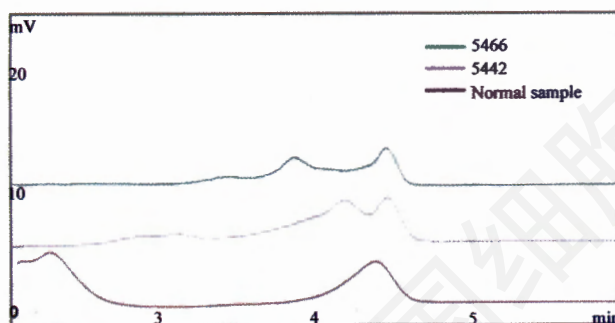


Fig.9 DHPLC analysis of m.5442T>C and m.5466A>G heteroplasmic mutation

m.5442T>C and m.5466A>G mutation sample with two peaks; normal sample with only one peak.

组($P<0.001$); 而 m.5442T>C 突变阳性组的 a 级精子百分率和 a+b 级精子百分率均显著高于突变阴性组 ($P<0.001$)。

2.4 ND2 基因错义突变位点氨基酸性质分析

在 ND2 基因中发现的 10 个错义突变, 其中 4 个错义突变(m.4491G>A、m.4924G>A、m.5460G>A、m.5466A>G)仅存在于弱精子症中。有 5 个突变(m.4824A>G、m.4833A>G、m.5178C>A、m.5460G>A 和 m.5466A>G)导致了编码氨基酸极性的改变, 其中 m.4824A>G、m.4833A>G、m.5466A>G 使极性亲水性氨基酸(苏氨酸)变为非极性疏水性氨基酸(丙氨酸), m.5178C>A、m.5460G>A 使非极性疏水性氨基酸(亮氨酸、丙氨酸)变为极性亲水性氨基酸(甲硫氨酸、苏氨酸)(表 4)。

显示突变标本为异质性突变(图 9), 这与 Bi-PASA 方法检测结果完全一致。

2.3 ND2 基因错义突变与精子活动力的分析

我们将筛查的精子标本分成突变阳性组和突变阴性组并比较两组精子活动力的差异(图 10), 结果显示, m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变阳性组的 a 级精子百分率和 a+b 级精子百分率均显著低于突变阴性

3 讨论

自 1988 年 Wallace 等^[9]首次提出 Leber 遗传性视

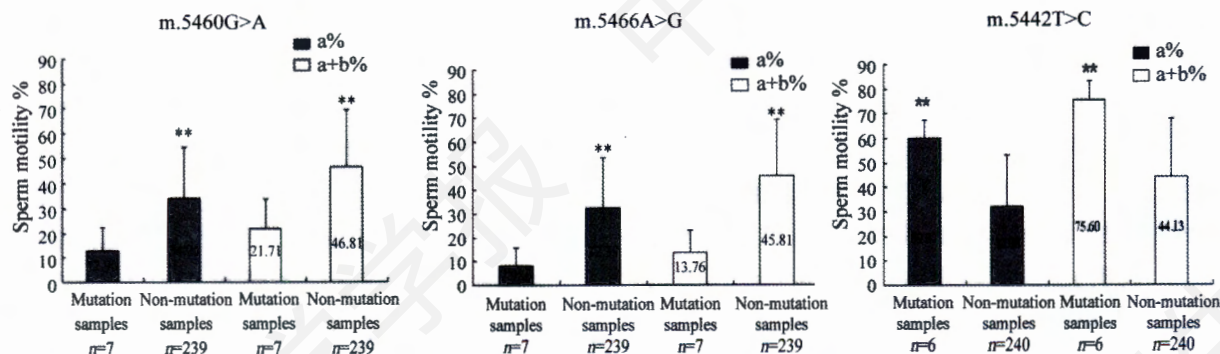


Fig.10 Comparison of sperm motility in mutation and non-mutation group

**Compared with mutation samples, $P<0.01$.

Table 4 The transition of amino acid polarity of 10 missense mutations in ND2

Nucleotide variance	Amino acid change	Amino acid polar change
m.4491G>A	Val→Ile	NP→NP
m.4732A>G	Asn→Ser	NP→NP
m.4824A>G	Thr→Ala	P→NP
m.4833A>G	Thr→Ala	P→NP
m.4884A>G	Ile→Leu	NP→NP
m.4924G>A	Ser→Asn	NP→NP
m.5178C>A	Leu→Met	NP→P
m.5442T>C	Phe→Leu	NP→NP
m.5460G>A	Ala→Thr	NP→P
m.5466A>G	Thr→Ala	P→NP

P: presents polar amino acid, NP: presents non-polar amino acid.

神经眼病是由 mtDNA 突变引起以来, 已有上百种疾病被证实或推测与 mtDNA 突变有关。近年来随着对线粒体疾病研究的深入, 发现线粒体基因缺失、突变与男性不育症, 尤其是与精子活动力低下有着密切的联系, 且很多研究均表明线粒体基因多态性变异与人群的种族、地域及气候环境等也有很大的联系^[10]。据目前的相关研究, ND2 基因突变与多种人类疾病的发生相关, 其中比较明确的是 nt 5460A 位点突变与早期老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)和帕金森病(Parkinson's disease, PD)的相关性^[11]; 此外是 nt 5466A 位点突变可能与心肌病(Cardiomypathy)和睡眠呼吸暂停综合征(Sleep apnea syndrome)存在一定的联系^[12], 但与其它疾病包括弱精子症以及 ND2 基因其它位点的突变与疾病发生的关系都还未见相关的研究报道。我们研究发现精子 ND2 基因发生核苷酸变异的频率较高, 共检测出 34 个变异位点。在 134 例弱精子症中观察到 m.5351A>G、m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变率均显著高于对照组($P<0.05$), 并在对 m.5460G>A 和 m.5466A>G 这两个错义突变阳性标本与突变阴性标本精子活动力的比较中发现, m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变阳性标本 a 级和 a+b 级精子百分率显著低于突变阴性标本($P<0.001$); 再分析 ND2 基因 m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变前后这两个位点上氨基酸的变化情况, nt 5460A 突变后其编码的氨基酸从疏水性的丙氨酸变成亲水性的苏氨酸, 而 nt 5466G 突变后其编码的氨基酸从亲水性的苏氨酸变成疏水性的丙氨酸。从以上统计结果和氨基酸极性的改变推测 m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变可能会改变相关酶的正常活性, 从而造成精子线粒体能量代谢异常, 影响精子活力。Sakaue 等^[12]检测患有心肌

病和睡眠呼吸暂停综合征患者的 mt DNA 发现存在 m.5466A>G 异质性突变, 认为该位点突变后其编码的氨基酸极性发生改变, 导致 NADH 脱氢酶亚单位 -2 二级结构的改变, 影响该酶正常的生物学特性。随后, 在我们研究结果中观察到在对照组精子标本中 m.5442T>C 变异率显著高于弱精子症组, 且 m.5442T>C 突变阳性标本的 a 级精子和 a+b 级精子百分率显著高于突变阴性标本($P<0.001$), 这一现象提示 ND2 基因的这一多态性位点 nt 5442C 对精子活动力可能是一个有益因素。据 Canter 等^[13]对美籍非裔人群浸润性乳腺癌和前列腺癌的研究认为线粒体基因的某些多态性位点对疾病的发生可能是一个保护性因子, 如 nt 10398G。Walt 等^[14]在帕金森病的研究中也有类似的发现。日本学者最初发现 ND2 基因 nt 5178A 基因型在长寿人群中比例普遍较高^[15], 随后又发现 nt 5178A 基因型在糖尿病人中有抗动脉粥样硬化作用^[16], 最近国外学者研究表明 nt 5178A 基因型的个体心肌梗死的发病率较低^[17], nt 5178A 位点的多态性可能会消除一些对机体不利的变异。这些结果、论点和我们的结果都支持 ND2 基因 nt 5442C 可能是精子活力的一个有益因子。

在对 ND2 基因研究的基础上, 我们将继续通过增加病例数, 进一步分析 ND2 基因突变与弱精子症的相关性, 并对可能导致线粒体功能异常的核基因缺陷进行研究; 同时对存在于弱精子症中的 m.5460G>A 和 m.5466A>G 突变的标本, 我们将进一步检测其线粒体基因全序列, 以了解这些错义突变是否与其它突变一起协同作用, 共同影响精子活力; 从而帮助我们逐步了解线粒体基因突变在弱精子症发病中的作用机理。

参考文献(References)

- 1 Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *J Biosci* 2003; 28(2): 163-8.
- 2 Panloup PM, Chretien 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.
- 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 Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(7): 657-66.
- 5 金龙金, 李传连, 费前进, 张春玲, 黄学锋, 楼哲丰, 等. mtATPase6 基因变异与弱精子症的相关分析. *细胞生物学杂志* 2008; 30(5): 660-6.
- 6 Selvi RD, 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 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervicmucus interaction, 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999, 6-10.
- 8 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 Research* 1998, 26: 967-73.
- 9 Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242: 1427-30.
- 10 Yao YG, Kong QP, Bandelt HJ, Kivisild T, Zhang YP. Phylogeographic differentiation of Mitochondrial DNA in Han Chinese. *Am J Hum Genet* 2002; 70(3): 635-51.
- 11 Saxena R, de Bakker PI, Singer K, Mootha V, Burt N, Hirschhorn JN, *et al.* Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *Am J Hum Genet* 2006; 79(1): 54-61.
- 12 Sakaue S, Ohmuro J, Mishina T, Miyazaki H, Yamaguchi E, Nishimura M, *et al.* A case of diabetes, deafness, cardiomyopathy, and central sleep apnea: Novel mitochondrial DNA polymorphisms. *Tohoku J Exp Med* 2002; 196: 203-11.
- 13 Canter JA, Kallianpur AR, Parl FF, Millikan RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. *Cancer Res* 2005; 65(17): 8028-33.
- 14 Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, *et al.* Mitochondrial Polymorphisms Significantly Reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72(4): 804-11.
- 15 Tanaka M, Gong JS, Zhang J. Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet* 1998; 35(9): 185-9.
- 16 Matsunaga H, Tanaka Y, Tanaka M, Gong JS, Zhang J, Nomiya T, *et al.* Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(3): 500-3.
- 17 Takagi K, Yamada Y, Gong JS, Sone T, Yokota M, Tanaka M. Association of A5178C→A(Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis* 2004; 175(1): 281-6.

Analysis of the mt ND2 Gene Polymorphisms Associated with Asthenospermia Patients

Jiu-Jia Zheng¹, Xue-Feng Huang², Zong Yang¹, Xu Yang², Li-Ya Zhang², Jian-Xin Lü¹, Long-Jin Jin^{1*}

(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory for Medical Genetics, School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

²Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325001, China)

Abstract This research attempted to investigate whether there was correlation between mt ND2 gene polymorphisms in sperms and asthenospermia. After 134 asthenospermia cases and 112 control cases were collected under the WHO criterion, the ND2 gene variation of them were detected by using sequencing or bidirectional PCR amplification of specific alleles(Bi-PASA) technology. Consequently, We analyze ND2 gene polymorphisms in the asthenospermia and controls. Heteroplasmic mutation of m.5442T>C and m.5466A>G were detected by DHPLC. Then, a total of 34 nucleotide variations were found in ND2 genes in asthenospermia and controls, six of them were the reported for the first time in this study. The frequencies of single point mutation of m.5351A>G, m.5460G>A and m.5466A>G in asthenospermia were significantly higher than those in the controls ($P<0.05$). However, frequencies of m.5442T>C mutation in the controls was significantly higher than those in the asthenospermia($P<0.05$). The percents of grade a and grade (a+b) sperm in mutation samples(with m.5460G>A or m.5466A>G mutation) were significantly lower than that in non-mutation samples($P<0.001$). However, the percents of grade a and grade (a+b) sperm in m.5442T>C mutation samples were significantly higher than that in non-mutation samples ($P<0.001$). ND2 gene polymorphisms may have some correlation with sperm motility. The m.5460G>A and m.5466A>G mutation may impair sperm motility, whereas the m.5442T>C polymorphisms may have benefit for sperm motility.

Key words asthenospermia; mt ND2 gene; point mutation; genovariation

Received: April 14, 2010 Accepted: July 29, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province(No.Y206582) and Wenzhou Science & Technology Cooperation Program(No.H20090063)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689780, E-mail: jl20050101@yahoo.com.cn