

# 精子端粒长度与特发性男性不育相关

刘舒媛<sup>1</sup>, 张昌军<sup>2</sup>, 彭海英<sup>2</sup>, 黄小琴<sup>1</sup>, 孙浩<sup>1</sup>, 林克勤<sup>1</sup>, 黄铠<sup>1</sup>,  
褚嘉祐<sup>1</sup>, 杨昭庆<sup>1</sup>

1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 昆明 650118;
2. 湖北省十堰市人民医院生殖医学研究中心, 十堰 442000

**摘要:** 端粒是真核生物染色体末端的多功能特异性 DNA-蛋白结构, 覆盖在染色体末端, 保护基因组的稳定性。端粒在减数分裂过程中起到了十分重要的作用, 协助染色体配对、联会、同源重组和分离。精子中的端粒可能在精子的受精能力和胚胎发育中起到重要作用。近年来, 端粒与生殖的相关性研究成为一个新的热点, 但精子端粒与男性不育间的相关性并不明确。本文采用实时荧光定量 PCR 方法检测中国特发性男性不育人群(126 例)和正常可育男性人群(138 例)的精子相对端粒长度, 结果发现, 特发性男性不育病例的精子平均相对端粒长度( $2.894 \pm 0.115$ )低于正常对照组( $4.016 \pm 0.603$ ), 差异具有统计学意义( $P = 5.097 \times 10^{-5}$ ); 并且精子相对端粒长度与精子密度、精子总数和精子活力都有显著的相关性: 精子数量较多和/或精子活力较高, 精子相对端粒长度较长。研究结果提示, 在中国人群中, 精子端粒长度与特发性男性不育具有相关性, 精子的端粒长度可能影响精子发生和精子的功能, 精子端粒的缩短导致精子数目及活力的降低从而导致男性不育。

**关键词:** 端粒长度; 特发性男性不育; 精子数目; 精子活力

## Association study of telomere length with idiopathic male infertility

Shuyuan Liu<sup>1</sup>, Changjun Zhang<sup>2</sup>, Haiying Peng<sup>2</sup>, Xiaoqin Huang<sup>1</sup>, Hao Sun<sup>1</sup>, Kegin Lin<sup>1</sup>,  
Kai Huang<sup>1</sup>, Jiayou Chu<sup>1</sup>, Zhaoqing Yang<sup>1</sup>

1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union of Medical college, Kunming 650118, China;
2. Reproductive of Medical Research Centre of People's Hospital of Shiyan, Shiyan 442000, China

**Abstract:** Telomeres are evolutionary conserved, multifunctional DNA-protein complexes located at the ends of eukaryotic chromosomes. Telomeres maintain chromosome stability and genome integrity and also play an important role in meiosis which aid in synapsis, homologous recombination, and segregation. Sperm telomere has been reported to play an important role in fertilization and embryo development. Nowadays, the association between telomere and reproduction is one of the major areas of interest, however whether sperm telomere associated with male infertility is not clear. In this study, in order to find out the association between Chinese idiopathic infertility and sperm telomere length, we analyzed the difference of sperm telomere length between idiopathic infertile men and normal fertile men, as well as the correlations between sperm telomere length and human semen characteristics. We analyzed 126 Chinese

收稿日期: 2015-06-05; 修回日期: 2015-08-19

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2012AA021802)资助

作者简介: 刘舒媛, 博士, 助理研究员, 研究方向: 疾病的遗传相关性。E-mail: liushuyuan@imbcams.com.cn

通讯作者: 杨昭庆, 博士, 研究员, 研究方向: 疾病的遗传相关性。E-mail: zyang@imbcams.com.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-267

网络出版时间: 2015-8-28 9:25:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150828.0925.004.html>

idiopathic infertile men and 138 normal fertile men for sperm telomere length by using quantitative PCR. We found that the relative sperm mean telomere length of infertile men was significantly shorter than that of fertile men ( $2.894 \pm 0.115$  vs.  $4.016 \pm 0.603$ ,  $P = 5.097 \times 10^{-5}$ ). Both sperm count and semen progressive motility are related with telomere length. Our results suggest that sperm telomere length is associated with idiopathic male infertility of China and we proposed the possibility that shorter telomeres in sperm chromosome will reduce spermatogenesis and sperm functions, which finally affected the fertility of male.

**Keywords:** telomere length; idiopathic male infertility; sperm count; sperm total motility

全世界已婚孕龄夫妇存在生育困难的比率高达 10%~15%，男女因素各占一半。男性精子发生是一个极为复杂的过程，常染色体或者性染色体上的基因突变均有可能影响精子发生过程，从而导致男性不育<sup>[1, 2]</sup>。目前仍有一些应用现有手段不能找出病因的不育，很大一部分男性不育症患者除精子异常外均正常，且精子异常原因不明，故称为特发性男性不育症，约占男性不育症的 20%~30%<sup>[3]</sup>，包括特发性寡精症(Oligozoospermia)、无精子症(Azoospermia)、弱精子症(Asthenozoospermia)和畸形精子症(Teratozoospermia)4 类。

端粒是真核生物染色体末端的多功能特异性 DNA-蛋白结构，端粒 DNA 是一系列富含 G 的高度保守重复序列(如人的重复序列为 TTAGGG)，端粒的长度和端粒结构都对端粒自身功能有十分重要的作用。端粒覆盖在染色体末端，保护基因组的稳定性。端粒在减数分裂过程中，协助染色体配对、联会、同源重组和分离。在每次细胞分裂过程中，端粒长度将程序性的缩短。这些核蛋白重复序列在精子中位于细胞核外围并与组蛋白相结合，对氧化损伤极为敏感。

研究发现，精子中的端粒在小鼠的生殖能力和胚胎发育中具有重要的作用，端粒缩短与小鼠精子 DNA 损伤以及人类胚胎发育异常有关<sup>[4]</sup>。小鼠精子的染色体具有足够长度的端粒才能正常的受精，敲除端粒酶的小鼠由于缺乏端粒酶维持端粒的长度，精子受精能力受损，并且无论是精子或是卵子的端粒缩短，都将造成受精卵的异常分裂和生长<sup>[5]</sup>。如果人胚胎中的端粒很短，会导致细胞质片段化，生成形态异常的胚泡然后凋亡<sup>[6]</sup>。端粒的长度依靠端粒酶来维持，端粒酶在生殖细胞中高表达，这可能是随着年龄的增加端粒在精子细胞中的长度长于体细胞的原因(人体细胞中端粒约 5~10 kb，而生殖细

胞中的端粒约 10~20 kb)<sup>[7]</sup>。端粒酶活性降低和端粒长度缩短会导致细胞凋亡以及精子数量和受精能力降低<sup>[7]</sup>。

目前已发现许多疾病(如癌症)与端粒长度缩短有关<sup>[8]</sup>。研究发现，男性不育患者精子的平均相对端粒长度( $0.674 \pm 0.028$ )显著低于正常对照精子的平均相对端粒长度( $0.699 \pm 0.030$ ,  $P < 0.005$ )<sup>[9]</sup>，精子端粒长度与精子总数具有相关性，寡精子症的精子平均端粒长度( $0.95 \pm 0.22$ )显著低于正常精子的平均端粒长度( $1.24 \pm 0.25$ ,  $P < 0.0001$ )，且后代精子的端粒长度与父母生育时的年龄有极大的相关性<sup>[10]</sup>。本文旨在分析精子端粒长度在特发性男性不育人群和正常可育男性人群中的差异以及端粒长度与精液常规参数间的相关性，揭示端粒长度与特发性男性不育的相关性。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取 2008~2010 年间在湖北省某医院就诊的特发性男性不育患者 126 例，年龄 23~57 岁，有 3~5 年不育病史，其配偶妇产科检查正常。精液常规检查参考 2010 年《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)相关规定进行，正常精液标准为：精液体积 1.5 mL，精子密度  $15 \times 10^6$  个/mL，精子总数  $39 \times 10^6$  个，精子活力 a+b 32%，精子活动率 58%，正常形态率 4%，白细胞数  $< 1.0 \times 10^6$  个/mL。患者按照精液分析结果分层为：寡精症(精子密度  $< 15 \times 10^6$  / mL 或者精子总数  $< 40 \times 10^6$  个，精子活力 a+b 32%)、寡弱精症(精子密度  $< 15 \times 10^6$  / mL 或者精子总数  $< 40 \times 10^6$  个，精子活力 a+b  $< 32\%$ )及弱精症(精子密度  $15 \times 10^6$  / mL 或者精子总数  $40 \times 10^6$  个，精子活力 a+b  $< 32\%$ )。选取同期在该院就诊的健康已婚男性 138 例作为正常对照，年龄 22~52 岁，精液常规

检查正常,精子密度  $15\times10^6/\text{mL}$ ,活动力 a+b 32%。根据知情同意原则,分别收集病例和对照的精液样本。

1.2 精液样本的收集和检测

所有研究对象都经过男科学基本检查,包括精液常规检测、体格检查、激素检查、既往疾病史询问、以及核型分析、Y-染色体微缺失检测。精液常规检测参照 2010 年《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》(第五版)<sup>[11]</sup>。精液样本均在禁欲 3~5 天后,手淫法留取,收集精液标本后置于 50 mL 洁净烧杯中,37℃ 恒温水浴箱内 30 分钟内液化待检。

液化精液经 Tris·HCl(pH6.8)洗涤后,置于-80℃ 冻存,临用前取出。

1.3 精子全基因组 DNA 提取

收集精液样本,用酚-氯仿法提取精子全基因组 DNA,紫外分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分别进行 DNA 定量和定性检测。

1.4 实时荧光定量 PCR 方法测定精子基因组端粒长度

根据文献<sup>[12, 13]</sup>,采用实时荧光定量 PCR 方法测定基因组的端粒长度。运用样本 DNA 端粒拷贝数(T)与单拷贝数内参基因 36B4 拷贝数(S)的比值,即相对端粒长度(T/S 比值)来评估各检测样本的端粒长度。实时定量 PCR 反应采用标准曲线法,将细胞系 HEK293T 的基因组 DNA 进行倍比稀释成:100 ng/μL、10 ng/μL、1 ng/μL、0.1 ng/μL 和 0.01 ng/μL 作为标准品。标准品和样本基因组 DNA(20 ng),均做 3 个平行复孔,使用 BIO-RAD CFX-96 荧光定量 PCR 仪(Hercules, CA, USA)进行扩增,扩增体系总体积

20 μL,PCR 反应体系如下:SYBR Green Master(北京康维生物),样本 DNA,引物 5 pmol。端粒 DNA 的扩增引物为:TelF 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGG-GTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3', TelR 5'-TCCC-GACTATCCCTATCCCTTCCCTATCCCTATCCCTA-3';内参单拷贝基因 36B4 的扩增引物:36B4F 5'-CAGC-AAGTGGGAAGGTGTAATCC-3', 36B4R 5'-CCCAT-TCTATCATCAACGGGTACAA-3',引物由 Invitrogen 公司合成。定量 PCR 反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s,56℃ 1 min,40 个循环,65~95℃ 熔解曲线 5 s。

用 BIO-RAD CFX Manager 3.1 直接获得样本端粒 DNA 和内参基因的 CT 值。

1.5 统计分析

特发性男性不育病例和正常对照间的相对端粒长度差异用 Student's *t* 检验,精子相对端粒长度与精液常规参数间的相关性用 Pearson 相关(Pearson correlation,  $r_p$ )检验。数据统计分析用 SPSS17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)软件进行。

2 结果与分析

2.1 病例和对照组间各项参数的比较

比较病例组和对照组患者的年龄、不育年限、禁欲时间以及精液常规参数(精液体积、精子密度、总精子数、精子活力和精子正常形态率)间的差异,发现精子密度、总精子数和精子活力在病例组和正常对照组间的差异具有统计学意义( $P<0.001$  或  $P<0.05$ ),其他参数在病例组和对照组间无差异(表 1)。

表 1 病例和对照间参数的比较

	病例组				对照组( <i>n</i> =138)
	寡弱精症( <i>n</i> =19)	寡精症( <i>n</i> =15)	弱精症( <i>n</i> =92)	总病例( <i>n</i> =126)	
年龄(岁)	32.333±6.598	32.667±5.640	33.703±6.038	33.379±6.051	33.470±5.098
不育年限(年)	6.750±4.856	8.000±2.828	7.214±5.250	7.204±4.931	6.926±4.085
禁欲时间(天)	3.714±1.603	4.800±3.564	5.478±3.591	5.029±3.285	6.892±7.574
精液参数					
体积(mL)	2.442±0.857	2.120±0.985	2.730±1.225	2.614±1.162	2.687±1.181
总精子数( $\times10^6$ )	22.368±13.151**	27.00±12.598**	175.006±124.815*	134.044±126.010**	217.157±132.726
精子密度( $\times10^6/\text{mL}$ )	9.421±4.488**	13.400±5.692**	67.066±45.635*	51.864±46.289**	86.445±50.644
精子活力(a+b 级精子%)	20.181±11.456**	46.200±13.176*	21.271±9.913**	24.103±13.285**	53.181±12.852
正常形态率 (%)	63.167±28.463	58.000±19.613	58.750±24.891	59.533±24.267	51.533±27.552
pH	7.140±0.353	7.183±0.160	7.100±0.155	7.117±0.204	7.089±0.1569

注:所有数据均用均数±标准差(mean±SD)表示。\*\* $P<0.001$ , \* $P<0.05$ 。

## 2.2 病例和对照间精子平均相对端粒长度差异

特发性男性不育病例组(126 例)的精子平均相对端粒长度(T/S)( $2.894 \pm 0.115$ )低于正常对照组(138 例)( $4.016 \pm 1.603$ ), 差异具有统计学意义( $P=6.744 \times 10^{-10}$ )。将特发性男性不育病例进行分层, 各亚层分别与对照组进行比较, 发现弱精症和寡弱精症患者的精子平均相对端粒长度(T/S)( $3.022 \pm 0.119$  和  $2.088 \pm 0.717$ )均显著低于正常对照组( $4.016 \pm 1.603$ ), 差异具有统计学意义( $P=1.030 \times 10^{-6}$  和  $P=1.072 \times 10^{-6}$ ), 寡精症的精子平均相对端粒长度(T/S)( $3.136 \pm 0.885$ )也低于正常对照的精子平均相对端粒长度( $4.016 \pm 1.603$ ,  $P=0.042$ )(图 1)。

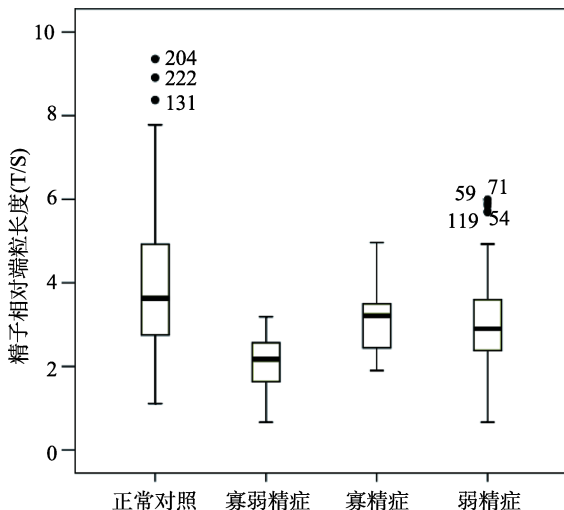


图 1 精子平均相对端粒长度(T/S)在特发性男性不育病例组与正常对照组间的比较

箱中粗线表示中位数, 箱子的高度下四分位数(P25)和上四分位数(P75), 上下两条端线分别显示了各组的最小值和最大值。图中黑色圆点的数字为大于 1.5 倍四分位数间距的异常值。

## 2.3 相对端粒长度与精液参数间的相关性

精子相对端粒长度(T/S)与男性年龄、精子密度、精子总数、精子活力间的相关性用 Pearson 相关 (Pearson correlation,  $r_p$ ) 进行统计分析, 发现精子相对端粒长度(T/S)与精子密度、精子总数和精子活力都有显著的相关性, 精子数量较多, 精子相对端粒长度较长; 精子活力较高, 精子相对端粒长度较长 (表 2, 图 2)。

## 3 讨论

端粒对于保持基因组的稳定性和完整性具有重要的作用, 目前发现许多疾病都与端粒长度缩短有关联。近年来端粒与生殖间的关联性受到关注, 端粒异常可能会导致生育障碍<sup>[14]</sup>。通常精子中的端粒很长(10~20 kb), 而体细胞中的端粒长 5~10 kb<sup>[7]</sup>, 并且端粒的长度可以遗传到后代中。端粒的长度依靠端粒酶来维持, 端粒酶在生殖细胞中高表达。端粒酶缺失的精子( $TR^{-/-}$ )与正常卵子受精后, 胚囊难以形成, 胚胎分裂受阻甚至凋亡<sup>[5]</sup>。Ferlin 等<sup>[15]</sup>提出, 精子端粒长度可作为研究精子发生和男性不育的一

表 2 精子相对端粒长度(T/S)与精液参数间的相关性

精液参数	Pearson 相关性	P 值
年龄	0.014	0.820
pH	0.070	0.472
体积	0.035	0.571
精子总数	0.462	$3.116 \times 10^{-15}$
精子密度	0.481	$1.339 \times 10^{-16}$
精子活力	0.330	$3.885 \times 10^{-8}$
正常形态率	0.055	0.721

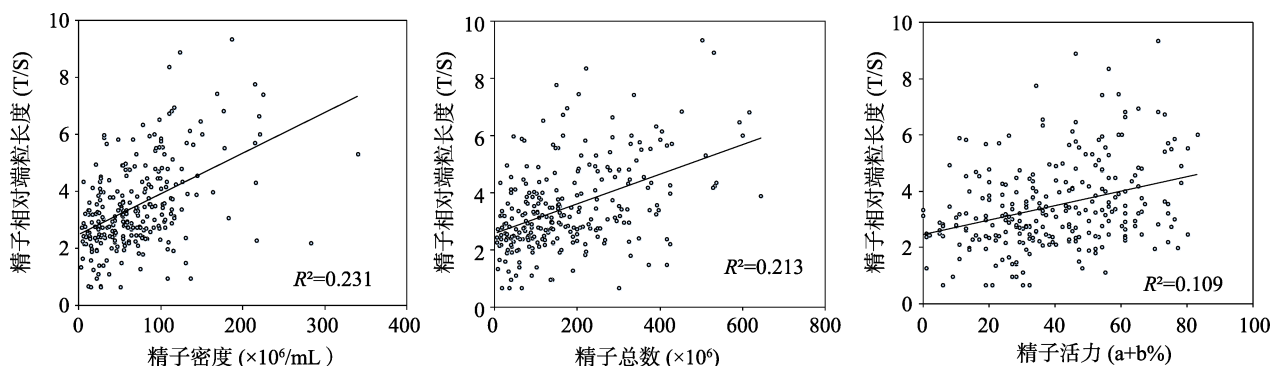


图 2 精子密度、精子总数和精子活力与精子相对端粒长度(T/S)的相关性



个新标记, 精子携带较短的端粒可视为是精子发生 (Spermatogenesis) 障碍的一个标志<sup>[10]</sup>。Thilagavathi 等<sup>[9]</sup>首先发现男性不育患者精子端粒长度显著低于正常男性精子; Ferlin 等<sup>[10]</sup>在 18~19 岁的男性中进行的研究发现, 精子端粒长度与精子数目有相关性, 寡精子症的精子端粒长度显著低于正常精子的端粒长度, 并且后代精子的端粒长度与父母生育时的年龄显著相关<sup>[10]</sup>。本研究的结果显示, 中国人群中特发性男性不育病例(寡弱精症、寡精症、弱精症患者)的精子平均相对端粒长度显著低于正常可育男性的精子平均相对端粒长度; 并且精子相对端粒长度与精液精子总数和精子密度有显著的相关性。本研究结果提示, 端粒可能在精子发生过程中起到重要作用。由于联会复合物配对紊乱将导致精子发生失败<sup>[16]</sup>, 而端粒在减数分裂过程中是协助染色体配对、联会、同源重组和分离的重要元件, 精子端粒的缩短可能导致精子减数分裂过程中联会分离错误, 从而导致精子发生受阻; 或者端粒功能异常导致生殖细胞凋亡, 最终导致精子数量降低。

值得注意的是, 本文研究发现, 精子相对端粒长度的缩短与精子活力降低有相关性, 这在以往的研究并未见类似的结果。端粒在维持精子基因组稳定性和完整性中起到了十分重要的作用, 精子携带较短端粒, 其 DNA 断裂的比例升高<sup>[17]</sup>。精子核基因组的完整性对维持精子正常功能有重要作用, 具有 DNA 损伤的精子势必在结构、精子活力和受精能力等方面有缺陷, 最终导致不孕不育、胚胎发育异常、流产、死产和子代疾病以及影响辅助生殖结局。精子 DNA 损伤与精子密度、活力和精子正常形态率具有相关性<sup>[18]</sup>。精子端粒定位于精子细胞核外围, 与组蛋白相结合, 保护精子基因组的完整性和稳定性。精子端粒的损伤更加剧了精子 DNA 损伤。Thilagavathi 等<sup>[9]</sup>对男性不育人群和正常人群中端粒长度与精子 DNA 片段化和精子 ROS 水平进行检测, 但未发现 ROS 水平、精子 DNA 片段化与精子端粒长度间的相关性。本研究发现, 精子相对端粒长度缩短与精子活力降低有相关性, 这提示精子端粒缩短与精子 DNA 损伤可能存在相关性, 精子端粒缩短可能会造成精子 DNA 损伤, 从而造成精子活力降低和功能下降。但这一推测还需进一步深入研究。

综上所述, 研究表明, 在中国人群中精子端

粒长度与特发性男性不育具有相关性: 特发性男性不育患者精子端粒长度显著低于正常男性精子, 并且精子端粒的长度缩短与精子数量减少和精子活力降低具有相关性, 即精子的端粒长度可能影响精子发生和精子的功能, 精子端粒的缩短导致精子数目及活力的降低从而导致男性不育。同时, 精子发生是一个复杂的过程, 受到遗传因素和环境因素的复杂调控。环境因素如: 毒素、感染、氧化压力、生活习惯(如吸烟酗酒)、肥胖等都会影响精子发生过程和精子功能, 这些因素也是可能导致端粒缩短的因素<sup>[7]</sup>。因此, 环境因素如氧化压力等与端粒间的相互作用以及端粒影响精子发生和精子功能的机制值得深入研究。本研究为男性不育的遗传与环境因素相互作用机制/病理生理意义提供了更多线索, 有待进一步在更多病例和人群中进行验证, 并深入开展功能学方面的研究。

## 参考文献

- [1] Singh K, Jaiswal D. Human male infertility: a complex multifactorial phenotype. *Reprod Sci*, 2011, 18(5): 418–425. [DOI]
- [2] 阮健, 杜卫东. 男性不育与基因缺陷. *遗传*, 2010, 32(5): 411–422. [DOI]
- [3] Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*, 2009, 50(4): 336–347. [DOI]
- [4] Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*, 2005, 84(4): 843–845. [DOI]
- [5] Liu L, Blasco MA, Trimarchi JR, Keefe DL. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol*, 2002, 249(1): 74–84. [DOI]
- [6] Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao BN, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women—toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(4): 1256–1260. [DOI]
- [7] Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. *Andrologia*, 2013, 45(5): 289–304. [DOI]
- [8] Campbell PJ. Telomeres and cancer: from crisis to stability to crisis to stability. *Cell*, 2012, 148(4): 633–635. [DOI]
- [9] Thilagavathi J, Kumar M, Mishra SS, Venkatesh S, Kumar R, Dada R. Analysis of sperm telomere length in men with

- idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 287(4): 803–807. [DOI]
- [10] Ferlin A, Rampazzo E, Rocca MS, Keppel S, Frigo AC, De Rossi A, Foresta C. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod*, 2013, 28(12): 3370–3376. [DOI]
- [11] Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES, Jr., Agarwal A. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology*, 2012, 79(1): 16–22. [DOI]
- [12] Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): e47. [DOI]
- [13] O'Callaghan NJ, Dhillon VS, Thomas P, Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques*, 2008, 44(6): 807–809. [DOI]
- [14] Hemann MT, Rudolph KL, Strong MA, DePinho RA, Chin L, Greider CW. Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(7): 2023–2030. [DOI]
- [15] Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2014, 26(3): 193–198. [DOI]
- [16] 刘静宇, 代小华, 曾宪录, 张传善, 郝水, 宋运淳. 男性育性障碍与联会复合体异常的关系. *遗传*, 2005, 27(5): 819–827. [DOI]
- [17] Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*, 2010, 56(6): 407–412. [DOI]
- [18] Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 2006, 65(5): 979–991. [DOI]

(责任编辑: 苗龙)