

不明原因男性不育人群中睾丸特异性乳酸脱氢酶基因突变的发现及其意义*

李 博 张 朵 曾 健 富显果 柯龙凤 颜水堤 严爱贞 兰风华**

(南京军区福州总医院临床遗传与实验医学科, 福州 350025)

摘要 为了研究睾丸特异性乳酸脱氢酶, 即乳酸脱氢酶 C₄(LDH-C₄)基因突变在男性不育发病中的作用, 利用 LDH-C₄ 特异性底物对 100 名不明原因男性不育症患者的精子 LDH-C₄ 进行活性显色, 用变性高效液相色谱(DHPLC)技术对 LDH-C₄ 活性低下的患者进行 LDHC 基因 PCR 产物的突变筛查, 对 DHPLC 峰形异常的 PCR 产物进行序列测定. 筛选到一组精子 LDH-C₄ 活性明显下降的患者, 其中 1 名患者的 LDHC 基因 PCR 产物在 DHPLC 中呈异常洗脱峰. 对这一 PCR 产物进行序列测定, 发现患者 LDHC 基因第 5 外显子的 115 位碱基发生了 T→A 的杂合改变(GenBank 登录号 GU479375), 该突变使 LDHC 基因的 178 位密码子由原来的 TTG(编码亮氨酸)变为 TAG(终止密码子), 形成截短的 C 亚基. T 克隆-测序进一步证实了该无义突变的杂合状态. 这是在人类 LDHC 基因上发现的第一个突变, 提示 LDHC 基因突变可能是男性不育发病的原因之一.

关键词 不育症, 睾丸特异性乳酸脱氢酶, 乳酸脱氢酶 C₄, DHPLC, 基因突变

学科分类号 Q75, R394

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00526

睾丸(精子)特异性乳酸脱氢酶(testis-specific lactate dehydrogenase), 是 20 世纪 60 年代由 Goldberg 等和另一个研究小组发现的乳酸脱氢酶同工酶之一^[1-2], 最早称乳酸脱氢酶 -X (lactate dehydrogenase X), 现称乳酸脱氢酶 C₄ (lactate dehydrogenase-C₄, LDH-C₄). 与其他乳酸脱氢酶同工酶不同, LDH-C₄ 只见于成年男性的睾丸, 是精子能量代谢的一个关键酶类, 与精子的获能、运动以及精卵结合等密切相关^[3]. 自发现以来, LDH-C₄ 一直作为避孕疫苗的研发对象受到关注^[4]. 动物实验证明, 以 LDH-C₄ 或其多肽片段免疫家兔、狒狒等, 可在动物体内诱导抗 LDH-C₄ 抗体的产生, 并使其生育率下降^[5-6]. 我们用 LDH-C₄ 基因疫苗也取得相同的效果^[7-8]. LDH-C₄ 还是免疫不育患者体内抗精子抗体所针对的主要抗原之一^[9]. 研究还表明, 部分不育男性的精子或精液的 LDH-C₄ 活性比正常男性明显降低^[10-11]. 在体外实验中, 抑制 LDH-C₄ 活性可阻断小鼠精子的获能^[3]. 基于以上研究结果, 我们曾提出: LDHC 基因突变可导致 LDH-C₄ 活性降低甚至缺失, 进而影响精子的获能、

运动等功能, 最终导致男性不育.

本文报道我们在一组不明原因男性不育患者中发现的一个呈杂合状态的无义突变: L178X. 据我们所知, 这是在人类 LDHC 基因上发现的第一个突变.

1 材料和方法

1.1 研究对象

不明原因不育症男性患者 100 名, 年龄 22~40 岁, 均来自我院生殖医学中心, 患者选择标准^[12]: 未采取任何避孕措施, 婚后一年以上其配偶未孕者; 女方检查无异常, 排除少精(无精)症、输精管阻塞、腮腺炎病毒感染、隐睾、营养不良、内分泌紊乱、精索静脉曲张、Y 染色体微缺失综合征

* 福建省重点科技攻关项目(2002Y032)和全军医药卫生“十五”基金项目(01MA032).

** 通讯联系人.

Tel: 0591-22859617, E-mail: fhlan@mail.fjmu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-07, 接受日期: 2010-02-05

患者、免疫性不育症等，常规精液检查无异常。

1.2 PCR 引物

参考 GenBank 的 *LDHC* 基因序列，针对 7 个

外显子(外显子 1 不参与氨基酸序列的编码，未列入 PCR 扩增)，设计 7 对引物并委托上海生工公司合成。引物序列见表 1。

Table 1 PCR primers for amplification of exons of human *LDHC* gene

Fragments	Primers	Primer sequence	Annealing temperature/°C	Expective length/bp
LDHC-E2	LDHC-E2F	ctccaacattctgcaaac	56	295
	LDHC-E2R	aacctgaatacatcgaca		
LDHC-E3	LDHC-E3F	ccaggctcattgaaaaac	57	436
	LDHC-E3R	gtgacagagtgtgagactctctca		
LDHC-E4	LDHC-E4F	aggagtttaaggcacagtgg	58	418
	LDHC-E4R	gtatcttgatcatggcgg		
LDHC-E5	LDHC-E5F	gtgatccacctacctaagc	56	421
	LDHC-E5R	gcactagtagagataagaaggg		
LDHC-E6	LDHC-E6F	catgagatttggaggagac	56	374
	LDHC-E6R	gtgttttcaggagcctaga		
LDHC-E7	LDHC-E7F	aagcaagaccctgtctcaa	62	446
	LDHC-E7R	gcctggcatatagtagtgacc		
LDHC-E8	LDHC-E8F	ctctgagcgaattctgtt	56	448
	LDHC-E8R	ctctttaccatttgctcg		

1.3 精液中精子 LDH-C₄ 特异性活性显色

按文献[13]方法，以 α -羟基戊酸(Sigma 公司产品)为 LDH-C₄ 特异性底物，对精子 LDH-C₄ 行活性显色，油镜下计数 100 个精子的甲臞显色强度，按无色、灰、紫、淡紫蓝、深紫蓝分为 5 级，分别计 0、1、2、3、4 分。积分相加即得该份精液精子 LDH-C₄ 活性总积分。

1.4 精子基因组 DNA 的提取及 *LDHC* 基因外显子的 PCR 扩增

精子基因组 DNA 的提取按文献报道的方法^[14]。以精子 DNA 为模板进行 PCR 反应，扩增第 2~8 外显子(LDHC-E2-8)，反应总体积为 50 μ l，其中含：基因组 DNA 100 ng、引物各 20 pmol、dNTP 各 0.2 mmol/L、Taq DNA 聚合酶(Ampli Taq Gold DNA polymerase, ABI 公司产品) 5U。LDHC-E2 按下列条件扩增：95℃ 预变性 5 min 后，94℃，45 s；56℃ 45 s；72℃ 45 s；共 30 个循环。最后一个循环结束后继续在 72℃ 延伸 4 min。LDHC-E5、6、8 退火温度与 LDHC-E2 相同，LDHC-E3、4、7 退火温度分别为 57℃、58℃、62℃，其他扩增条件与 LDHC-E2 相同。

1.5 PCR 产物的 DHPLC 及 PCR 扩增产物序列测定

PCR 产物经变性后在变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)仪(WAVE-MD, 美国 TransGenomic 公司)上进行分析，5 μ l 进样，流速 0.9 ml/min，LDHC-E2~8 扩增产物的解链温度分别为 53.2℃、52.5℃、54.7℃、53℃、53.9℃、54.6℃，波长 260 nm 处吸光度监测洗脱过程。

PCR 产物按常规在 2.0%琼脂糖凝胶上进行电泳，紫外灯下切下含预期区带的凝胶块，用德国 Qiagen 公司试剂盒回收 DNA。以相应引物，委托上海生工公司在 ABI377 型或 3730 型测序仪上进行 PCR 产物的序列测定。

1.6 PCR 产物的 T 克隆和序列测定

按 Promega 公司说明书，将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接，用连接反应物转化 XL1-Blue 菌，将菌液涂布于含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板上，37℃ 倒置培养过夜。挑取白色菌落，置于 3 ml 的 LB 培养液中，37℃ 振荡培养过夜，用质粒提取试剂盒提取质粒。EcoR I 酶切鉴定后送上海生工公司进行序列测定。

2 结 果

2.1 精子 LDH-C₄ 活性显色

以 α -羟基戊酸为底物, 对 100 名不明原因不育症患者的精子 LDH-C₄ 进行了活性显色(图 1),

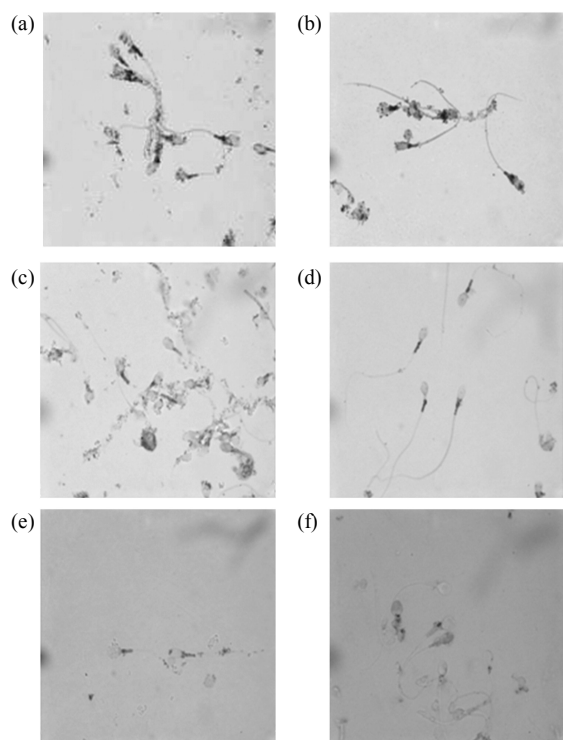


Fig. 1 Activity staining of LDH-C₄ in the sperm

(a) Normal control 1. (b) Normal control 2. (c) Patient 11. (d) Patient 12. (e) Patient 15. (f) Patient 17. ($\times 1000$)

并对着色情况进行量化处理(染色积分值的计算, 结果略). 从图 1 中可以看出, 活性染色主要集中在精子尾部的颈段和中段. 积分值最高 199(患者 97), 最低 103(患者 20), 两者相差 96. 选取积分值在 130 以下的 14 名患者进入下面的实验.

2.2 人 LDHC 基因的 PCR 扩增

以精子 DNA 为模板对 LDHC 基因 7 个外显子进行 PCR 扩增, 均得到预期大小的特异性片段(如表 1 所列), 结果见图 2.

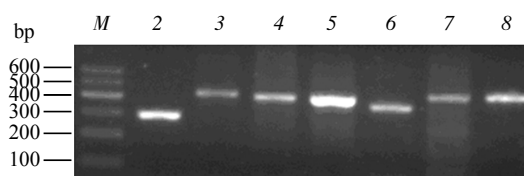


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products from 7 exons of LDHC gene

M: DNA marker; 2 ~ 8: PCR products of genomic DNA, gel concentration: 2%.

2.3 PCR 扩增产物的 DHPLC 筛查和序列测定

利用 DHPLC 对酶活性染色积分值最低的 14 名患者的 LDHC₄ 基因 6 个外显子扩增产物进行分析, 结果在患者 17 外显子 5 (LDHC-E5) 的 PCR 产物检测到异常洗脱峰(图 3).

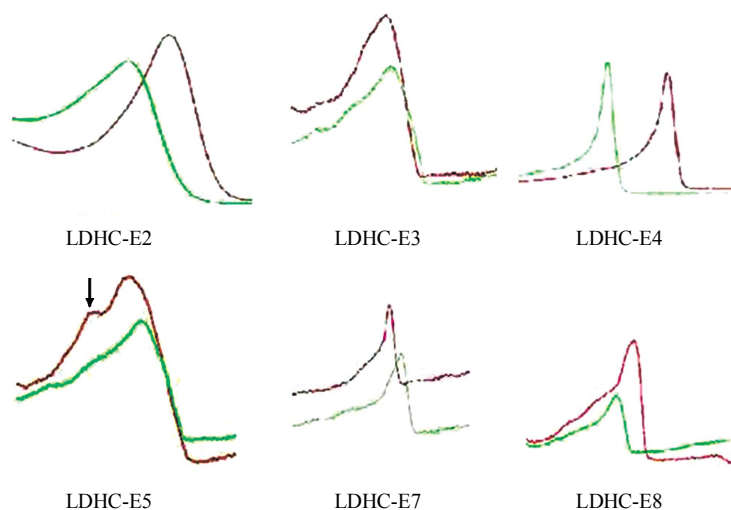


Fig. 3 DHPLC analysis on amplicons from 6 exons of LDHC gene of patient 17

Green: Normal control; Red: Patient 17. An abnormal peak (indicated by an arrow) appeared when the amplicon of LDHC-E5 was loaded on the DHPLC column.

将患者 17 的第 5 外显子(LDHC-E5)PCR 扩增产物进行序列测定, 结果显示: 第 5 外显子的 115 位碱基发生了 T→A 的杂合突变, 如图 4 所示. 该突变使 *LDHC* 基因第 178 位由亮氨酸变为终止密码 (TAG), 即 L178X 突变.

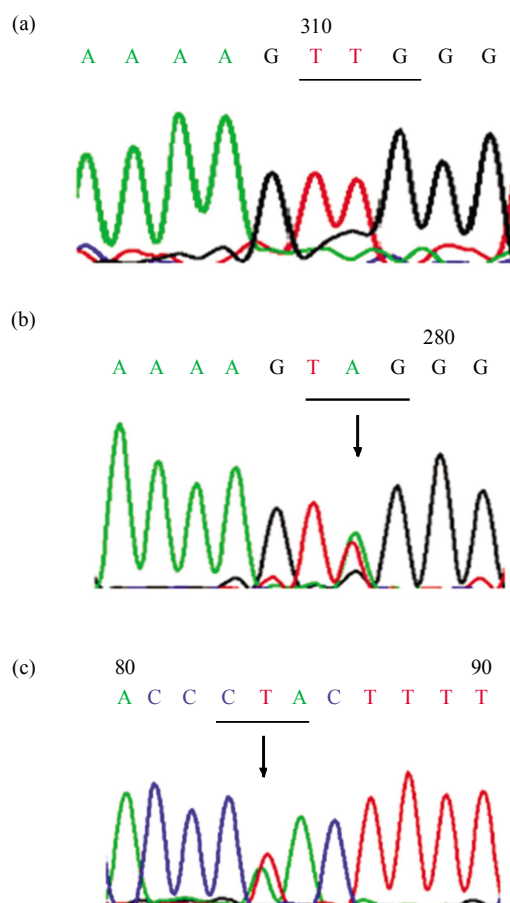


Fig. 4 Direct sequencing of PCR product from *LDHC* exon 5 of patient 17

(a) Normal control (sense strand). (b) Patient 17 (sense strand). (c) Patient 17 (antisense strand). Position of mutated codon is underlined and the arrows indicate the mutated bases.

2.4 T 克隆-测序分析

将患者 17 的 *LDHC*-E5 扩增片段克隆至载体 pGEM-T Easy 后, 选取 4 个独立的克隆进行序列测定, 结果 1 个为野生型序列, 3 个为突变型序列 (图 5), 证实了患者 17 第 5 外显子上述突变的存在及其杂合状态.

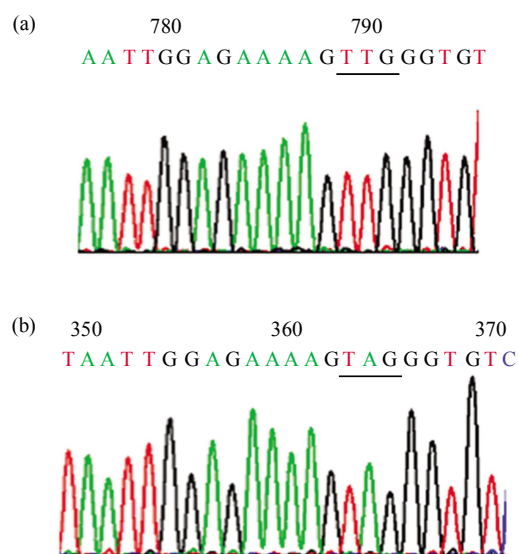


Fig. 5 Sequencing of recombinant pGEM-T Easy with *LDHC*-E5

(a) Wild-type sequence. (b) Mutant sequence. Underlined is codon 178 of *LDHC* gene.

3 讨 论

不育症困扰着全球 10%~15% 的夫妇^[15], 其中男性不育约占 50%. 男性不育是一类复杂的疾病, 目前只有一部分能够得到有效治疗. 除去输精管阻塞、腮腺炎病毒感染、隐睾、营养不良、内分泌紊乱和精索静脉曲张等明确原因外, 大多数不育男性患者病因不明^[12].

精子发生(spermatogenesis)是在严格的时空调控下有关基因有序表达的精细过程, 从精原细胞开始, 经历有丝分裂、减数分裂和精子形成(spermiogenesis) 3 个阶段, 涉及基因组约 2 000 个基因^[16]. 仅精子形成阶段就需要约 600~1 000 个精子特异性基因的参与^[17]. 理论上, 凡是参与精子发生的人体基因, 其突变都有可能引起男性不育.

近年的研究表明, *LDH-C₄* 也可见于成熟的卵子及肿瘤细胞^[18-19], 但在正常男性, *LDH-C₄* 只出现在个体进入青春发育期后的生殖上皮和成熟的精子^[20-21], 是男性生殖细胞发育和成熟的标志分子之一^[22-23]. Odet 等^[24]2008 年报道, *LDHC* 基因被敲除后, 雄性小鼠的生育能力严重受损, 尽管其睾丸和精子的形态、精子的产生未受影响. 从这类小鼠采

集的精子散失了大部分 LDH 活性, 从而严重影响精子的能量代谢, 使之不能穿透卵子的透明带^[24]。

以上研究强烈提示: LDH-C₄ 在睾丸和精子的特异性表达, 为雄性个体生育能力所必需的。

本研究利用 LDH-C₄ 的特异性底物对 100 位不明原因男性不育症患者的精子进行活性显色, 筛选出 14 名精子 LDH-C₄ 活性明显降低的不育症患者。用 DHPLC 对这组患者的 *LDHC* 基因部分外显子 PCR 扩增产物进行突变筛查, 发现其中一名患者的 *LDHC* 基因第 5 外显子存在碱基改变。对这名患者的 PCR 扩增产物进行直接测序和 T 克隆 - 测序, 查明突变性质为: 第 5 外显子的第 115 位碱基由正常的 T 变为 A, 且呈杂合状态。该突变使 *LDHC* 基因第 178 位密码子由正常的 TTG(编码亮氨酸)变为 TAG(终止密码)。这是国际上第一次鉴定的人类 *LDHC* 基因突变, 为“*LDHC* 基因突变可导致男性不育”的假说提供了直接证据。

LDH-C₄ 由 4 个 C 亚基同源聚合而成, 每个亚基长 332 个氨基酸残基, 单独不具有 LDH 活性。本研究发现的 *LDHC* 基因突变(L178X 突变), 将使 C 亚基的生物合成提前终止, 形成只有 177 个氨基酸残基的截短多肽 (truncated polypeptide): C^t。尽管此突变呈杂合状态, 但考虑到精子(sperm)的蛋白质合成绝大多数已在精子成熟前完成^[25], 且精子细胞(spermatid)在减数分裂后有一段时期处于合胞体(syncytium)状态^[26], 所以, 由 L178X 突变所致的 C 亚基截短多肽 C^t 有机会与野生型 C 亚基(C^w)相互作用。我们推测, C^t 亚基与 C^w 亚基相互作用, 使患者精子的 LDH-C₄ 可出现 5 种组合: C₄^t、C₃^tC₁^w、C₂^tC₂^w、C₁^tC₃^w、C₄^w, 其中前 4 种组合(占 4/5)可能没有 LDH 活性。目前, 我们正在不明原因男性不育症患者中寻找更多的 *LDHC* 基因突变, 并分析 *LDHC* 基因突变对 LDH-C₄ 功能的影响。

参 考 文 献

- [1] Goldberg B. Lactic and malic dehydrogenases in human spermatozoa. *Science*, 1963, **139**(3555): 602
- [2] Blanco A, Zinkham W H. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science*, 1963, **139**(3555): 601
- [3] Duan C, Goldberg E. Inhibition of lactate dehydrogenase C₄ (LDH-C₄) blocks capacitation of mouse sperm *in vitro*. *Cytogenet Genome Res*. 2003, **103**(3-4): 352-359
- [4] Naz R K. Vaccine contraceptive targeting sperm. *Immunol Rev*, 1999, **171**(10): 93-202
- [5] Goldberg E, Wheat T E, Powell J E, *et al*. Reduction of fertility in female baboons immunized with lactate dehydrogenase C₄. *Fertil Steril*, 1981, **35**(2): 214-217
- [6] Beyler S A, Wheat T E, Goldberg E. Binding of antibodies against antigenic domains of murine lactate dehydrogenase-C₄ to human and mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 1985, **32**(5): 1201-1210
- [7] Chen Y, Zhang D, Xin N, *et al*. Construction of sperm-specific lactate dehydrogenase DNA vaccine and experimental study of its immunocontraceptive effect on mice. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2008, **51**(4): 308-316
- [8] 辛 娜, 张 朵, 陈 平, 等. 人精子特异性乳酸脱氢酶 DNA 疫苗的构建及免疫效果的初步研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, **24**(12): 1204-1206
- Xin N, Zhang D, Chen P, *et al*. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2008, **24**(12): 1204-1206
- [9] 辛 娜, 陈 平, 黄梁浒, 等. 人精子特异性乳酸脱氢酶在大肠杆菌中的表达及其初步应用. *中华检验医学杂志*, 2008, **31**(8): 933-936
- Xin N, Chen P, Huang L X, *et al*. *Chin J Lab Med*, 2008, **31**(8): 933-936
- [10] Orlando C, Krausz C, Forti G, *et al*. Simultaneous measurement of sperm LDH, LDH-X, CPK activities and ATP content in normospermic and oligozoospermic men. *Int J Androl*, 1994, **17**(1): 13-18
- [11] Sawane M V, Kaore S B, Gaikwad R D, *et al*. Seminal LDH-C₄ isoenzyme and sperm mitochondrial activity: a study in male partners of infertile couples. *Indian J Med Sci*, 2002, **56**(11): 560-566
- [12] Aboulghar M A, Mansour R T, Serour G I, *et al*. Diagnosis and management of unexplained infertility: an update. *Arch Gynecol Obstet*, 2003, **267**(4): 177-188
- [13] 王铁霞, 陈庆林, 郭玉佳. 试管悬浮孵育法检测人精子 LDH-X 活性. *湖南医科大学学报*, 1996, **21**(4): 364-366
- Wang T X, Chen Q L, Guo Y J. *Bull Hunan Med Univ*, 1996, **21**(4): 364-366
- [14] Shen H M, Chia S E, Ni Z Y, *et al*. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol*, 1997, **11**(5): 675-680
- [15] de Kretser D M, Baker H W. Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, **84**(4): 3443-3450
- [16] Hargreave T B. Genetic basis of male fertility. *Br Med Bull*, 2000, **56**(3): 650-671
- [17] Schultz N, Hamra F K, Garbers D L. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(21): 12201-12206
- [18] Coonrod S, Vitale A, Duan C, *et al*. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *J Androl*, 2006, **27**(4): 502-509
- [19] Koslowski M, Türeci O, Bell C, *et al*. Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res*, 2002, **62**(22): 6750-6755
- [20] Hintz M, Goldberg E. Immunohistochemical location of LDH-X

- during spermatogenesis in mouse testes. *Dev Biol*, 1977, **57** (2): 375–384
- [21] Kroft T L, Li S, Doglio L, *et al.* A transgenic analysis of mouse lactate dehydrogenase C promoter activity in the testis. *J Androl*, 2003, **24**(6): 843–852
- [22] O'Flaherty C, Breining E, Beorlegui N, *et al.* Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **30**; **1726**(1): 96–101
- [23] von Eyben F E. Laboratory markers and germ cell tumors. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, **40**(4): 377–427
- [24] Odet F, Duan C, Willis W D, *et al.* Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biol Reprod*, 2008, **79**(1): 26–34
- [25] Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, 2006, **20**(4): 411–416
- [26] Fabrizio J J, Hime G, Lemmon S K, *et al.* Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 1998, **125**(10): 1833–1843

A Mutation of Testis-specific Lactate Dehydrogenase Gene Found in Male Patients With Unexplained Infertility*

LI Bo, ZHANG Duo, ZENG Jian, FU Xian-Guo, KE Long-Feng, YAN Shui-Di, YAN Ai-Zhen, LAN Feng-Hua**

(Department of Clinical Genetics and Experimental Medicine, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA, Fuzhou 350025, China)

Abstract To investigate the role played by mutations of *LDHC* gene in male infertility, 100 male patients with unexplained infertility were screened by activity staining of LDH-C₄ on sperm smears and those with lowered or no LDH-C₄ activity in their sperms were subject to DNA analysis. The encoding exons were PCR amplified and the PCR products were screened by DHPLC for mutations. The PCR products with abnormal elution peaks were subject to DNA sequencing. In 14 infertile male patients with lowered LDH-C₄ activity in sperms, it was identified a heterozygous T > A mutation in base 115 of exon 5 of *LDHC* gene (GenBank accession number: GU479375), changing codon 178 (TTG, encoding leucine) to a stop codon (TAG). This nonsense mutation (L178X) was predicted to result in a severely truncated protein. The mutation and the heterozygosity were further confirmed by T-cloning. To the best of the knowledge, this is the first mutation found in human *LDHC* gene, substantiating that mutations in *LDHC* gene might cause male infertility.

Key words infertility, testis-specific lactate dehydrogenase, LDH-C₄, DHPLC, gene mutation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00526

*This work was supported by grants from Key Science and Technology Programs of Fujian Province(2002Y032) and Tenth Five-Year Plan Medical & Pharmaceutical Foundation of Chinese PLA(01MA032).

**Corresponding author.

Tel: 86-591-22859617, E-mail: fhlan@mail.fjmm.edu.cn

Received: September 7, 2009 Accepted: February 5, 2010