



在线全文

全外显子组测序在少弱畸形精子症患者中检测到 *ADGB*新的致病性变异*

王秋毅^{1,2}, 杨镒舫¹, 蒋川², 沈英^{2△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】目的 系统分析Androglobin基因(*ADGB*)在不育男性中的突变谱系,并探讨其与男性不育相关的基因型与表型之间的关联性,以明确*ADGB*在男性生殖功能中的关键作用。**方法** 本研究共招募781例被诊断为原发不育的中国男性,采用全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)联合Sanger测序技术,筛查并鉴定*ADGB*基因在不育男性中的潜在致病性突变。随后,使用MEGA11软件对*ADGB*的进化保守性进行生物信息学分析。采用Western blot检测患者精子中*ADGB*的表达。通过精液常规检测与改良巴氏染色法评估患者精子的运动能力与形态特征,并利用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察其精子超微结构的异常情况。此外,采用实时荧光定量PCR检测小鼠不同组织及睾丸发育各阶段中*Adgb* mRNA的表达水平,同时结合免疫荧光染色方法,分析*ADGB*在不同发育阶段的人类与小鼠生殖细胞中的定位与表达分布。最后,基于STRING数据筛选与*ADGB*相关的蛋白,并通过免疫共沉淀验证。**结果** 在781例不育男性中,共鉴定出148个*ADGB*基因的突变位点。依据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)发布的变异分级指南,其中45个位点被判定为良性突变,1个位点为可能良性突变,96个位点被归类为意义不明的变异,另有6个位点被评估为可能致病突变。其中两个可能致病突变(c.4859G>A和c.4981A>G)以复合杂合状态出现在1例患有特发性少弱畸形精子症(oligoasthenoteratozoospermia, OAT)患者中。保守性分析结果提示,这两个突变位点可能破坏了*ADGB*基因在跨物种间保守的功能结构域,具有潜在致病性。Western blot实验发现患者精子中*ADGB*蛋白表达缺失。形态学分析显示,该患者精子存在明显的头部畸形(小头、锥形头)及尾部缺陷(短尾、锐角弯曲尾、卷尾、无尾)。TEM观察发现其精子表现出顶体缺失、线粒体鞘螺旋结构紊乱,以及轴丝“9+2”微管结构紊乱和部分缺失。同时,在人类和小鼠睾丸中*ADGB*均呈现青春期后高表达特征,并定位于生精细胞顶体和鞭毛。最后,免疫共沉淀实验验证TTC29和CFAP47是*ADGB*的互作蛋白。该例携带*ADGB*致病突变的患者可通过卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)治疗,成功受孕。**结论** 本研究拓展了*ADGB*在男性不育症中的突变谱与表型谱,明确了*ADGB*在人类生育力维持中的生物学重要地位。

【关键词】 全外显子组测序 基因 男性不育症 鞭毛 顶体

Whole Exome Sequencing Identified Novel Pathogenic Mutations of *ADGB* in Patients With Oligoasthenozoospermia

WANG Qiuyi^{1,2}, YANG Yihong¹, JIANG Chuan², SHEN Ying^{2△}. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yingcaishen01@163.com

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82471650) and Sichuan Science and Technology Program (No. 2024YFFK0267).

[Abstract] Objective To systematically analyze the mutation spectrum of the androglobin gene (*ADGB*) in infertile males and investigate the association between its genotypes and phenotypes related to male infertility, thereby elucidating the critical role of *ADGB* in male reproductive function. **Methods** This study recruited 781 Chinese males diagnosed with primary infertility. Whole exome sequencing (WES) combined with Sanger sequencing was used to screen for and identify potential pathogenic mutations in the *ADGB* gene among infertile males. Bioinformatics analysis of *ADGB* evolutionary conservation was conducted using MEGA11 software. Western blotting was performed to detect *ADGB* expression in patients' sperm. Semen analysis and modified Papanicolaou staining were used to evaluate sperm

* 国家自然科学基金(No. 82471650)和四川省科技厅重点研发项目(No. 2024YFFK0267)资助

△ 通信作者, E-mail: yingcaishen01@163.com

出版日期: 2026-01-20

motility and morphological characteristics, while transmission electron microscopy (TEM) was used to observe abnormalities in sperm ultrastructure. Additionally, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect *Adgb* mRNA expression levels in various mouse tissues and testicular developmental stages. Immunofluorescence staining was used to analyze the localization and expression distribution of ADGB in human and mouse germ cells across different developmental stages. Finally, proteins associated with ADGB were screened using STRING data and validated by co-immunoprecipitation. **Results** Among 781 infertile men, 148 ADGB gene mutation sites were identified. According to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Variant Classification Guidelines, 45 sites were classified as benign mutations, one site as a potentially benign mutation, 96 sites as variants of uncertain significance, and 6 sites as potentially pathogenic mutations. Two potentially pathogenic mutations (c.4859G > A and c.4981A > G) were identified in a compound heterozygous state in a patient with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia (OAT). Conservation analysis suggested that these mutations may disrupt functionally conserved domains of the ADGB gene across species, indicating potential pathogenicity. Western blot analysis revealed absent ADGB protein expression in the patient's sperm. Morphological analysis showed marked head abnormalities (microcephaly, conical heads) and tail defects (short tails, acutely angled curved tails, coiled tails, and tailless sperm) in the patient's sperm. TEM observations showed spermatozoa with acrosome loss, disorganized mitochondrial sheath helical structures, and disrupted or partially absent "9 + 2" microtubule structures in the axoneme. Additionally, ADGB was found to be highly expressed after puberty in both human and mouse testes and was localized to the acrosome and flagella of spermatogenic cells. Co-immunoprecipitation experiments confirmed TTC29 and CFAP47 as interacting proteins of ADGB. The patient carrying the pathogenic ADGB mutation achieved a successful pregnancy through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. **Conclusion** This study expands the mutation and phenotypic spectrum of ADGB in male infertility, confirming its biological significance in maintaining human fertility.

[Key words] Whole exome sequencing Genes Male infertility Flagellum Acrosome

不孕不育是全球重大生殖健康问题,影响着1.86亿育龄人口(占育龄夫妇的8%~12%),其中男性因素约占一半^[1-3]。男性不育症呈现高度异质性,主要包括精子数量减少(无精症或少精症)、精子活力降低(弱精症)或形态学缺陷(畸形精子症),其病因涉及下丘脑-垂体-性腺轴功能异常、生精障碍及输精管梗阻等多重机制^[4]。值得注意的是,遗传因素约占男性不育病因的15%~30%,包括染色体异常、单基因缺陷及表观遗传调控失常^[5]。精准识别遗传病因不仅可优化辅助生殖策略选择,如卵胞浆内单精子显微注射(intracytoplasmic sperm injections, ICSI)或体外受精-胚胎移植,更能预警子代遗传风险,实现垂直防控^[6]。尽管高通量测序等技术已鉴定出SYCP3、CFAP43和SEPT12等男性不育关键致病基因,但仍有近60%病例缺乏明确分子诊断^[7-9]。因此,系统解析男性不育的遗传学基础仍是生殖医学研究的重点方向。

球蛋白作为一类含血红素的蛋白超家族,其核心功能是通过氧运输与储存维持有氧生物代谢稳态^[10-11]。近年研究发现,该家族新成员Androglobin(ADGB)在生殖系统中展现出独特的分子特征:双功能结构域整合了N端类钙蛋白酶催化活性与C端珠蛋白氧感应模块,提示其可能通过耦联蛋白水解修饰与氧稳态调控参与配子发生^[11]。ADGB在哺乳动物睾丸中特异性高表达,且在不育男性睾丸组织中显著下调,表明其与精子发生的密切关联^[12]。表型分析发现,ADGB基因敲除(*Adgb*^{-/-})雄性小鼠

的生殖功能严重受损^[13-14]。迄今为止,关于人类ADGB突变导致男性不育的报道有限,而且ADGB在精子发生中的生物学功能,特别是其对顶体和鞭毛组装的调控路径仍未被阐明^[13,15]。因此,亟需通过大样本队列研究系统解析ADGB的突变谱系,并进一步揭示其在生精微环境稳态调控中的分子机制,从而确立ADGB在人类生殖中的关键作用。为此,本研究基于生物信息学与多组学实验方法,通过全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)技术筛选781例原发不育男性ADGB致病突变、STRING互作网络分析核心靶点,并进一步利用精子蛋白检测、透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)及免疫共沉淀等技术进行实验验证,旨在系统阐明ADGB基因缺陷致男性不育的分子机制,为男性不育的精准诊疗提供新靶点与理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

共招募了781例原发不育男性,均来自四川大学华西第二医院生殖男科门诊。所有患者的染色体核型均为46,XY,Y染色体上的AZF区没有缺失,且排除其他可能导致不育的因素。正常对照组来源于自然受精至少有1个后代的志愿者。本研究经四川大学华西第二医院伦理委员会批准[医学科研2024年(申017)号],所有参与者签署知情同意书。

1.2 遗传学分析

采集所有受试者外周静脉血样本2 mL,采用EDTA进行抗凝处理。使用FitAmp血浆/血清DNA提取试剂盒(Axygen Scientific, Union City, San Francisco, CA, USA)完成基因组DNA的分离纯化,具体操作严格遵循制造商标准化流程。并采用WES结合生物信息学分析方法进行系统研究。具体流程如下:采用Agilent SureSelectXT Human All Exon V6试剂盒对目标外显子进行捕获,并通过Illumina HiSeq X-TEN平台进行高通量测序;基于Burrows-Wheeler比对工具将测序reads映射至人类参考基因组(UCSC hg19),并使用Picard软件进行重复序列过滤;通过公共人群数据库(1 000 Genomes、ExAC、GnomAD等)评估基因突变的频率;采用SIFT、Polyphen-2及CADD_phred对错义突变进行致病性预测,采用SPIDEX剪接评分系统与SpliceAI深度学习模型评估突变对剪接信号的影响。基因突变的致病性评估严格遵循美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)变异分级指南^[16-17]。然后,采用Sanger测序验证候选突变,引物序列如下:F 5'-GGATGAGTAGTTTTGCTAAAGTGGTGA-3', R 5'-CAGGCAGTTTAGAGTGTCAAACATATTTTA-3'。最后,通过Uniprot数据库获取不同物种的ADGB的蛋白质序列,使用MEGA11软件进行多序列比对,并构建进化树;基于人的蛋白质序列和筛查出的1例患者的突变位点,通过Alphafold3(<https://alphafold3.org>)构建野生型和突变型ADGB的三维结构。

1.3 生物信息学分析

通过MeDAS数据库(<https://das.chenlulab.com>, 访问日期: 2025年5月),限定物种为人类并选择睾丸组织,检索基因“ADGB”(ENSG00000118492),获取其在人类睾丸组织中的转录组表达图谱;通过Human Protein Atlas数据库(<http://www.proteinatlas.org>, 访问日期: 2025年5月),检索基因符号“ADGB”并下载其睾丸组织单细胞表达数据(<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000118492-ADGB/single+cell/testis>),解析ADGB在睾丸组织细胞亚群中的特异性表达模式;通过STRING数据库(<https://cn.string-db.org>, 访问日期: 2025年5月),以“Homo sapiens”为目标物种、ADGB为查询蛋白,构建其蛋白质相互作用网络。

1.4 精液分析常规参数及巴氏染色

筛查出的ADGB突变患者禁欲3~7 d后手淫法取精液于干燥的消毒量杯内,置37℃恒温操作台上静置60 min以上。待精液液化后采用西班牙SCA全自动精子

质量分析仪(SCA-H-01)并按世界卫生组织(WHO)人类精液检查与实验室处理标准第六版进行分析。根据WHO第六版改良巴氏染色法染色:首先,精液样本经体积分数为4%多聚甲醛固定后涂片并风干,载玻片依次用80%、70%、50%乙醇处理和蒸馏水复水,并用Lea苏木精染色;然后,蒸馏水冲洗载玻片,并用G-6橙色染色剂和EA-50染色;最后,将载玻片用乙醇脱水并固定。

1.5 TEM观察精子鞭毛及顶体超微结构

取该患者的精液样本,于4℃条件下以3 000×g离心10 min,去除上清液,加入预冷的2.5%戊二醛固定24 h以上,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤4次(每次10 min),1%锇酸固定90 min。然后,依次经30%、50%、70%、90%丙酮各处理10 min,100%丙酮洗涤3次(每次10 min);加入环氧树脂812,37℃过夜聚合。最后,用EM UC6超薄切片机(Leica)切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后使用TEM(TECNAI G2 F20, Philips)在120 kV下成像。

1.6 免疫荧光染色检测精子中ADGB及其互作蛋白的表达

睾丸生精细胞取自8周龄C57BL/6雄性小鼠以及获得知情同意的梗阻性无精子症患者;人类精液样本来自筛查出的ADGB突变患者及健康志愿者。精液样本经体积分数为4%多聚甲醛固定后涂片,干燥2 h后使用0.3% Triton X-100处理20 min, PBS洗涤3次(每次5 min),30%驴血清封闭30 min。然后,分别加入以下一抗工作液后湿盒内4℃孵育过夜:ADGB(1:20, ARP68897_P050, Aviva systems biology)、 α -Tubulin(1:200, ab7291, Abcam)、四肽重复结构域29(tetratricopeptide repeat domain 29, TTC29)(1:25, HPA061473, Sigma-Aldrich)及纤毛和鞭毛相关蛋白47(cilia and flagella associated protein 47, CFAP47)(1:50, sc-514714, Santa Cruz Biotechnology)。随后, PBS洗涤3次后(每次10 min),室温避光孵育以下工作液2 h: Alexa Fluor 488(1:500, 2309139, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594(1:1000, 2160431, Thermo Fisher Scientific)及花生凝集素(peanut agglutinin, PNA)(1:50, 2328948, Thermo Fisher Scientific)。最后, PBS洗涤3次后(每次5 min),使用抗荧光猝灭封片液(含DAPI)(P0131, Beyotime)封片, Olympus FV3000共聚焦显微镜成像。

1.7 Western blot检测精子ADGB表达

精液样本经4℃ PBS洗涤2次后,使用RIPA裂解液分别提取健康志愿者与筛查出的ADGB突变患者的精子蛋白,并通过BCA蛋白定量试剂盒(23227, Thermo Fisher)测定蛋白浓度。取等量蛋白(20 μ g)加入10% SDS-PAGE凝胶进行电泳:初始80 V恒压电泳至样品进入分离胶,切

换至120 V恒压直至溴酚蓝达凝胶底部。随后在260 mA恒流条件下将蛋白转印至PVDF膜(ISEQ00010, Millipore) 60 min。转膜后使用5%脱脂奶粉室温封闭90 min, 继而将膜与以下一抗于4 ℃孵育过夜: ADGB (1 : 1 000)、 α -Tubulin(1 : 5 000, 10094-1-AP, Proteintech, USA)。次日以TBST洗涤3次(每次10 min), 再与HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1 : 3 000, 7074, Cell Signaling Technology)室温孵育60 min, TBST复洗3次后, 采用ECL化学发光底物(TWBKLS0500, Millipore)进行显影分析。

1.8 实时荧光定量PCR检测小鼠组织Adgb mRNA表达

本研究经四川大学华西第二医院实验动物管理与伦理委员会批准[动伦审查第(申2024088)号]。实验所用C57BL/6小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。小鼠经腹腔注射3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉, 待达到深度麻醉状态后, 采用颈椎脱臼法实施安乐死。随后进行组织取材: 取一只8周龄雄性小鼠(体质量约24 g)的睾丸、肺、膀胱、附睾、大肠、心脏、脾脏、肾脏、肝脏、胃及脑组织; 另分别取出生后10日龄(体质量约5 g)、15日龄(体质量约8 g)、20日龄(体质量约10 g)、25日龄(体质量约15 g)、35日龄(体质量约20 g)、40日龄(体质量约22 g)及60日龄(体质量约28 g)的雄性小鼠睾丸组织; 此外, 取一只8周龄雌性小鼠(体质量约20 g)的卵巢组织。首先, 采用TRIzol™ Reagent(Invitrogen, 15596026)裂解小鼠组织, 氯仿-异丙醇法分离RNA, 75%乙醇洗涤沉淀。然后, 使用PrimeScript™ RT Master Mix(TaKaRa, RR036A)逆转录。最后, 使用iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(Bio-Rad, 1725125)在iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)完成实时荧光定量PCR。实验具体方法按各试剂盒说明进行。采用2^{-ΔΔC_t}法计算基因相对表达量。引物序列如下: β -actin, F: 5'-CAGCTTCTTTGCAGCTCCTT-3'; R: 5'-CACGATGGAGGGAATACAG-3'; Adgb, F: 5'-AATGACACGTTGGAGCAGGT-3', R: 5'-GATGTGCG

GACCTGGATTGT-3'。

1.9 免疫共沉淀验证ADGB蛋白的相互作用

健康志愿者精子蛋白裂解液与7 μ L目标抗体于4 ℃孵育过夜。随后将样品加入含40 μ L预洗蛋白A/G磁珠(88803, Invitrogen)的离心管中, 室温恒速旋转孵育2 h。经PBS洗涤3次后, 免疫沉淀复合物用5 $\times$ SDS上样缓冲液洗脱, 100 ℃变性10 min。最终通过Western blot分析免疫共沉淀产物。

2 结果

2.1 在男性不育群体中鉴定ADGB基因的新突变

781例原发不育中国男性中共鉴定出148个ADGB突变(网络资源附件附表1)。根据ACMG标准, 其中45个突变为良性, 1个突变为可能良性, 96个突变为意义不确定的变异, 6个突变为可能致病性, 其中两个可能致病的错义突变来自于同一例患者。该患者精液分析提示严重特发性少弱畸精子症(oligoasthenoteratozoospermia, OAT)(浓度: 2.0 $\times 10^6$ mL⁻¹, 前向运动精子比: <1%, 正常形态精子比例: 0)(表1), 生殖内分泌指标正常, 染色体核型为46, XY, 无Y染色体微缺失。通过Sanger测序确定该患者为ADGB复合杂合突变(NM_024694.4: c.4859G>A, p.Arg1620Gln; c.4981A>G, p.Lys1661Glu)(图1A)。其中一个突变c.4859G>A在1 000 Genomes、ExAC及gnomAD数据库变异频率分别为0.0010、0.0001和0.00285; 另一个突变c.4981A>G分别为0、0和0.0006。通过SIFT、PolyPhen-2及CADD_phred评分, 预测这两个突变均为可能致病性(表2)。进一步通过MEGA11软件进行多序列比对和进化树构建, 发现ADGB蛋白的同源基因在大多数后生动物谱系中高度保守, 包括人类和多种脊椎动物, 其中Arg1620表现出跨脊椎动物的绝对保守, Lys1661的保守性呈现显著的类群特异性: 哺乳动物中完全保守为赖氨酸, 而在鸟类、两栖类和鱼类中则分别被谷氨酰胺、丝氨酸和甘氨酸替代(图1B、图1C)。以上结果说明了

表 1 ADGB基因突变患者的精液参数分析

Table 1 Analysis of semen parameters in patients with ADGB gene mutations

Parameter	Result	Reference
Semen volume/mL	4.3	≥ 1.4
Sperm concentration/ 10^6 mL ⁻¹	2.0	≥ 16
Vitality/%	16	≥ 54
Progressive motility/%	< 1	≥ 30
Normal sperm morphology/%	0	≥ 4
Abnormal head/% (case)	76.5 (153/200)	
Abnormal neck and middle piece/% (case)	14 (28/200)	
Abnormal flagella/% (case)	62.5 (125/200)	

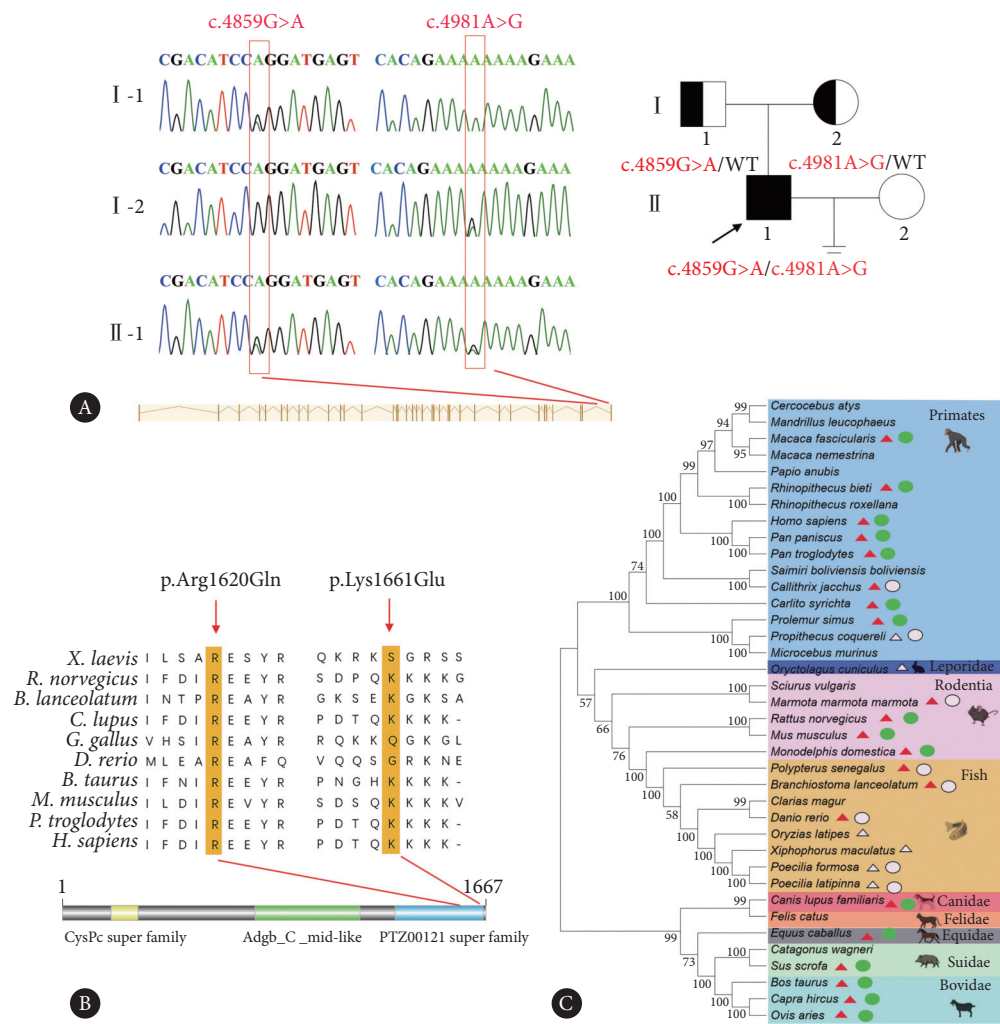


图 1 少弱畸精子症患者ADGB复合杂合突变的鉴定

Fig 1 Identification of ADGB compound heterozygous mutations in patients with oligoasthenozoospermia

A, Sanger sequencing results. B, Conserved amino acids indicated by alignment of ten species. C, Phylogenetic tree (red triangles represent Arg1620; white triangles represent other amino acids at position 1620; green circles represent Lys1661; white circles represent other amino acids at position 1661).

表 2 ADGB突变患者的遗传信息

Table 2 Ggenetic information of patients with ADGB mutations

Parameter	Mutation 1	Mutation 2
cDNA mutation	c.4859G > A	c.4981A > G
Protein alteration	p.Arg1620Gln	p.Lys1661Glu
Mutation type	Missense variant	Missense variant
Allele frequency		
1000 Genomes-East Asian	0.0010	N/A
ExAC-Asian	0.0001	N/A
GnomAD v4-East Asian	0.00285	0.0006
Function prediction		
SIFT	D	D
PolyPhen-2	D	P
CADD_phred	28.2	20.4

N/A: not available. Levels of function prediction: SIFT: D means deleterious; Polyphen-2: D means probably damaging, P means possibly damaging; CADD_phred: ≥ 30 highly deleterious, 20-29 likely deleterious, < 20 neutral/low risk.

ADGB的新突变(c.4859G>A, c.4981A>G)可能是导致男性不育的重要遗传病因。

2.2 ADGB基因突变对精子形态和超微结构的影响

为阐明ADGB突变对蛋白功能的影响,本研究首先基于AlphaFold3构建野生型及突变型蛋白质的三维结构,发现c.4859G>A(p.Arg1620Gln)和c.4981A>G(p.Lys1661Glu)突变分别引起蛋白质 α 螺旋结构和C端环状结构的构象改变(图2A)。通过免疫荧光分析,发现ADGB在正常精子中富集于顶体(PNA共定位)及鞭毛线粒体鞘(α -Tubulin共定位),而该患者的精子中PNA和ADGB表达均明显降低(图2B)。同时,Western blot也证实患者精子中ADGB蛋白的表达缺失(图2C)。接着,进一步的形态学分析显示,患者精子存在小头、锥形头等头部畸形,以及短尾、锐角弯曲尾、卷尾、无尾等尾部缺陷(图3A)。同时,TEM发现患者精子存在顶体缺陷、线粒体鞘螺旋紊乱及轴丝“9+2”微管紊乱、缺失(图3B)。综上,该ADGB复合杂合突变介导蛋白表达缺失,致使其在精子顶体与鞭毛的定位异常,最终导致精子超微结构缺陷。

2.3 ADGB在人和小鼠睾丸生殖细胞的特异性富集

为系统解析ADGB在雄性睾丸中的潜在功能,本研究

采用多组学技术对其表达特征进行了分析。首先,通过整合MeDAS数据库的转录组数据,本研究发现ADGB在人类睾丸组织中的表达呈现显著的年龄相关性:青春期前维持低水平,青春期后逐渐升高并在成年期达到表达峰值(附图1A)。进一步的单细胞测序数据揭示ADGB特异性富集于生精细胞谱系,包括精母细胞、圆形精子细胞和长形精子细胞,而在支持细胞及间质细胞中几乎不表达(附图1B)。同时,免疫荧光实验证实了ADGB富集于生精细胞谱系,并发现ADGB在精子发生过程中同时定位于顶体和鞭毛结构(图4)。附图1见网络资源附件。

为验证ADGB表达模式的物种保守性,本研究通过实时荧光定量PCR检测小鼠各器官及不同发育阶段睾丸中Adgb mRNA的表达。结果显示,Adgb mRNA在成年小鼠睾丸中特异性高表达,在肺和卵巢中低表达,而在其他器官(膀胱、附睾、大肠、心、脾、肾、肝、胃和脑)中几乎不表达(图5A)。时序分析表明,小鼠睾丸中的Adgb mRNA水平在性成熟时(出生后40 d)升至最高,比青春前期明显增高(图5B)。随后免疫荧光实验证实ADGB在小鼠精子发生过程中同样定位于顶体和鞭毛,且其表达模

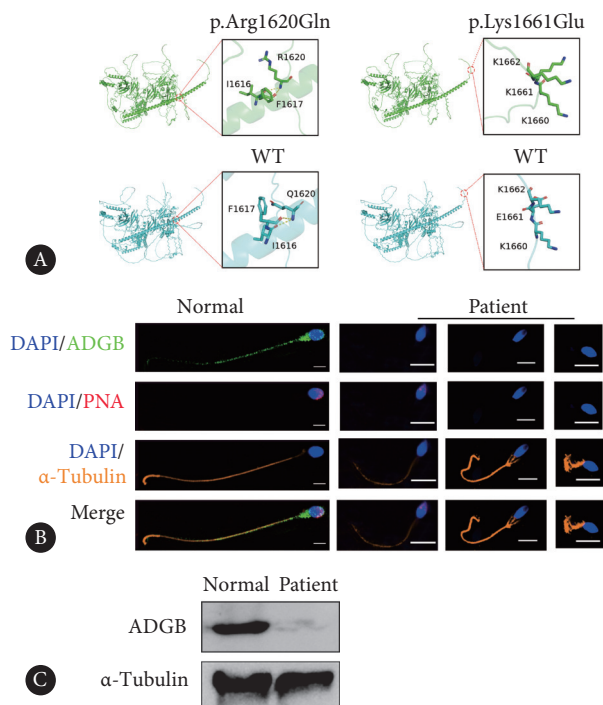


图2 ADGB突变患者和正常对照精子的ADGB的表达

Fig 2 ADGB expression in sperm from patients with ADGB mutations and normal controls

Predicted protein structure changes induced by ADGB missense variants (A), expression and localization of ADGB in spermatozoa from the patient and a control (B), scale bars = 5 μ m. ADGB protein from the patient and a control (C).

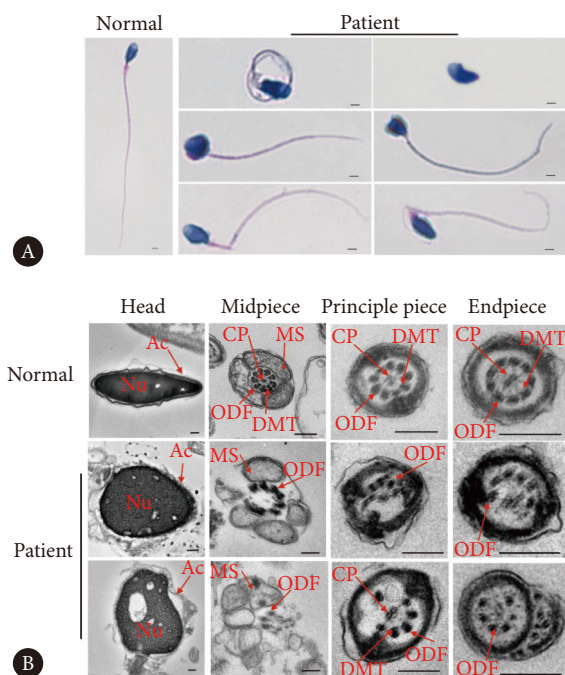


图3 ADGB突变患者的精子形态图和超微结构图

Fig 3 Sperm morphology and ultrastructural images of patients with ADGB mutations

A, Papanicolaou staining of spermatozoa obtained from a control and the patient (scale bars = 5 μ m). B, Morphological defects in the patient's sperm observed by transmission electron microscopy (CP: central pair of microtubules; ODF: outer dense fiber; MS: mitochondrial sheath; Ac: acrosome; Nu: nucleus; DMT: double microtubule. Scale bars = 200 nm).

式与人类高度一致(图5C)。

2.4 ADGB缺陷精子中轴丝组装相关蛋白异常: TTC29/CFAP47表达明显下调

为解析分子机制,基于STRING数据库的蛋白质互作网络分析筛选出ADGB与轴丝组装相关蛋白TTC29、

CFAP47存在潜在的功能关联(网络资源附件附图2)。为了进一步验证ADGB与上述靶蛋白的功能关联,本研究通过免疫荧光证实ADGB缺陷患者精子中TTC29和CFAP47蛋白水平较对照组明显降低(图6A)。同时,通过免疫共沉淀进一步验证了TTC29和CFAP47与ADGB在精

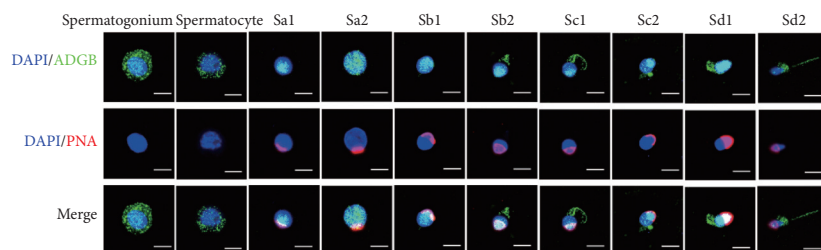


图 4 人类睾丸ADGB的表达模式

Fig 4 Expression pattern of ADGB in human testis

Sa1-Sa2: round spermatids; Sb1-Sb2: elongating spermatids; Sd1-Sd2: elongated spermatids; PNA: peanutagglutinin. Immunofluorescence staining of ADGB in different stages of germ cells from human testes. Scale bars = 5 μm.

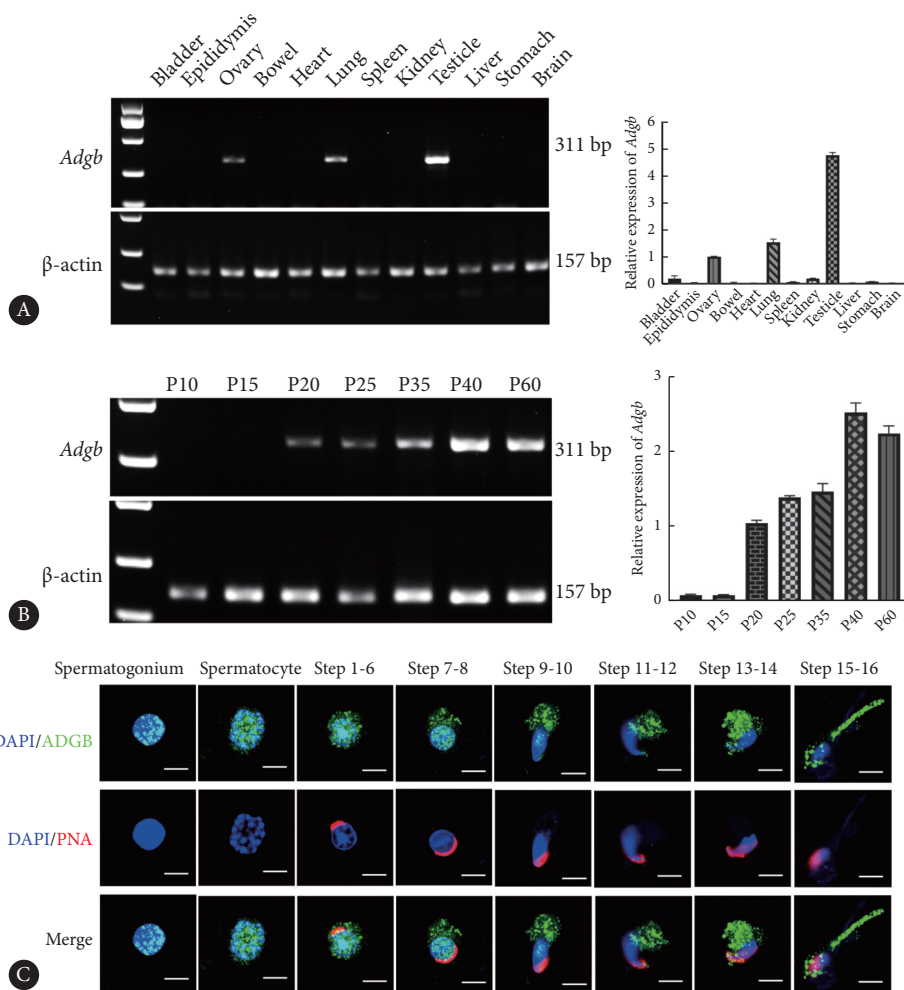


图 5 小鼠睾丸ADGB表达模式

Fig 5 Expression pattern of ADGB in mouse testes

A, Expression of *Adgb* mRNA in various mouse tissues. B, Expression of *Adgb* mRNA in mouse testes at different postnatal days (P: postnatal day). C, Immunofluorescence staining of ADGB in various stages of germ cells from mouse testes (Step 1-8: round spermatids; Step 9-12: early elongating spermatids; Step 13-14: late elongating spermatids; Step 15-16: elongated spermatids. Scale bars = 5 μm).

子中存在相互作用(图6B)。这些发现提示ADGB可能通过结合TTC29和CFAP47,从而维持顶体的功能和鞭毛轴丝的正常组装。

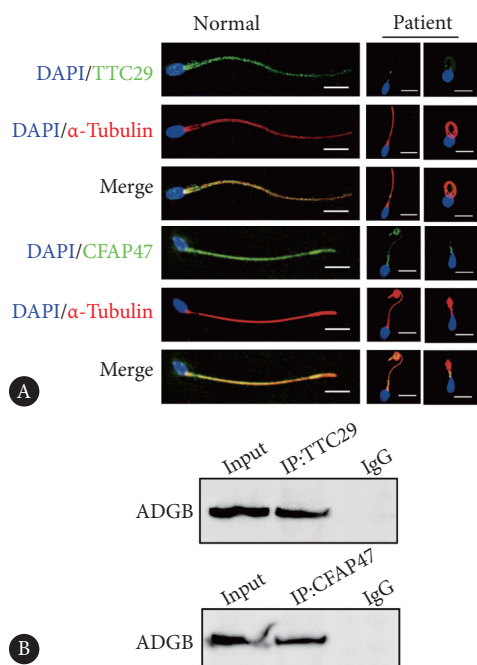


图6 ADGB与TTC29、CFAP47的功能相关性

Fig 6 Functional correlation between ADGB and TTC29, CFAP47

A, Immunofluorescence staining of TTC29 and CFAP47 in patients with ADGB mutations (blue: DAPI; green: TTC29 and CFAP47; red: α -tubulin. Scale bar=5 μ m). B, Co-immunoprecipitation analysis demonstrating the binding of ADGB with TTC29 and CFAP47 using human testis lysates.

2.5 ADGB基因突变患者的辅助生殖结局

在首次ICSI治疗周期中,该患者的伴侣共获卵36枚。受精后18 h评估显示正常双原核受精率为70%,未发生多精受精现象。经体外培养至第3天,获得可移植胚胎12枚,选取2枚优质胚胎进行冷冻保存。剩余胚胎进一步培养至第5天,最终形成可利用囊胚7枚,其中4枚经形态学评估达到Gardner评分4BB及以上,均行玻璃化冷冻保存。首次冻融周期内,移植1枚4BA评分囊胚后,超声检测到胎心搏动,目前已足月分娩(详见网络资源附件附表2)。上述数据提示,针对ADGB基因突变导致的严重精子结构/功能缺陷,ICSI技术可有效规避自然受精障碍,为此类遗传性男性不育患者提供可行的辅助生殖策略。

3 讨论

OAT作为男性不育的主要表型特征,其遗传学机制研究近年来取得显著进展。目前已知致病基因主要涉及两类功能模块:一是精子鞭毛超微结构组装相关基因,如DNAH家族基因、CFAP家族基因、DRC家族基因和其他鞭毛组装调控基因等;二是线粒体能量代谢通路关键分

子,如线粒体DNA、细胞色素c氧化酶和ROS等^[18-19]。然而,仍有50%的临床病例无法解释,尚存在大量未知致病基因有待发掘^[7]。本研究通过WES在OAT患者中发现ADGB基因突变(c.4859G>A和c.4981A>G)。结果显示,正常男性生殖细胞中ADGB蛋白富集于顶体区和鞭毛区;而患者精子样本中标记顶体区的PNA及ADGB蛋白表达强度均下降,提示ADGB缺失可能损害精子顶体和鞭毛功能。发育时序研究进一步揭示,Adgb mRNA在小鼠睾丸中的表达具有显著的青春期中依赖性特征,其水平在生精周期中持续上调,至生精成熟期达到峰值,该表达模式与免疫荧光显示的ADGB蛋白在人和小鼠的圆形精子细胞及长形精子细胞的顶体和鞭毛中的动态定位高度吻合。值得注意的是,ADGB突变患者的精子鞭毛中,TTC29和CFAP47的荧光信号均减少,且TTC29和CFAP47均与ADGB存在互作关系,这为ADGB可能通过结合鞭毛结构蛋白来影响精子运动性提供了更多证据^[14, 20-22]。上述多维度证据链提示ADGB作为新型生育力相关基因,在顶体形成和鞭毛组装中可能发挥关键作用。

ADGB蛋白包含4个特征性结构域:一个约350个氨基酸的N端钙蛋白酶样结构域、一个约300个氨基酸的未知功能区、一个约150个氨基酸的环形珠蛋白结构域,以及一个约750个氨基酸、未知功能的C端结构域^[12]。在目前发现的ADGB基因突变患者中,两例患者的突变位点位于C端结构域,精液分析显示均存在OAT^[13, 15]。这与本研究报道的突变结构域及临床表现一致,提示未知功能的C端结构域可能在精子发生中起关键调控作用。从进化保守性来看,Arg1620在所有脊椎动物中均高度保守,这表明它可能参与ADGB的关键功能模块;与此相比,Lys1661的保守性则表现出显著的类群特异性,表明在低等脊椎动物中发生了适应性替代,提示这两个位点的功能约束可能存在部分差异。因此,笔者推测人类ADGB蛋白C端结构域在精子发生中起着关键作用,ADGB的c.4859G>A突变可能引起更严重的精子功能损伤,但其具体调控机制仍需进一步研究。

哺乳动物精子鞭毛作为高度特化的运动器官,其核心功能单元是由“9 $\times$ 2+2”微管构型组成的轴丝复合体^[23-24]。该超微结构通过动力蛋白臂、放射辐条及微管连接蛋白等分子元件的精密组装形成轴丝中央装置,这一结构完整性是调控鞭毛摆动方向性与运动协调性的物质基础^[25]。值得关注的是,ADGB作为进化保守的纤毛相关蛋白,在嗜热四膜虫模型中已被证实定位于轴丝中央装置,其缺失可导致纤毛摆动频率显著降低^[26]。小鼠模型

研究进一步揭示, *Adgb* 基因敲除可引发精子鞭毛轴丝微管排列紊乱及顶体囊泡形成异常, 最终导致体外受精率下降^[12-13]。从分子调控网络角度, ADGB 的表达受纤毛生成关键转录因子 FOXJ1 直接调控^[22]。蛋白质互作研究证实, ADGB 可与 SEPT10 (鞭毛基部连接段结构蛋白)、CFAP69 (轴丝动力臂调控复合体成员) 以及 SPEF2 (尾部纤维鞘组装调控因子) 形成功能复合体, 这种多维互作网络在维持鞭毛结构稳定性、动力协调性和环境响应性方面具有整合作用^[12-13]。本研究发现患者精子中 TTC29 和 CFAP47 表达水平显著下调, 且 TTC29 和 CFAP47 均与 ADGB 存在相互作用, 且 ADGB 缺陷与临床报道的 TTC29/CFAP47 缺陷导致的精子头尾畸形表型一致^[20-21], 提示 ADGB 可能通过与 TTC29 和 CFAP47 的互作来维持轴丝中央装置的完整性。因此, ADGB 突变可能通过破坏关键蛋白互作, 介导精子结构异常、鞭毛运动障碍及信号网络失调, 最终导致男性不育。这对携带 ADGB 突变的夫妇经 ICSI 治疗成功获得临床妊娠并分娩, 目前报道的 5 例 ADGB 基因突变不孕夫妇均通过 ICSI 技术实现临床妊娠 (详见网络资源附件附表 3)^[13, 15], 充分证实存在 ADGB 相关精子超微结构缺陷的患者可通过 ICSI 技术有效克服此类受精障碍。

综上所述, 本研究通过多维度揭示了 ADGB 与男性不育之间的关联, 尤其是在 OAT 病例中, 强调了 ADGB 在精子中的关键作用。通过建立基因型-表型关联谱系, 证实 ADGB 突变筛查可作为临床诊断的重要分子依据, 为建立精准的遗传筛查体系及个体化干预策略提供了理论依据。值得注意的是, 基于 ICSI 的辅助生殖技术在 ADGB 突变患者中展现出理想的妊娠结局 (临床妊娠率 100%), 凸显其在特定遗传性不育症中的治疗优势。机制研究方面, ADGB 突变引发的顶体和鞭毛结构异常提示该基因可能通过调控多细胞器协同发育影响精子功能, 这一假说亟待进一步研究予以深入阐释。

* * *

作者贡献声明 王秋毅负责论文构思、数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、验证、可视化和初稿写作, 杨镓钰负责调查研究、研究方法和提供资源, 蒋川负责调查研究、研究方法、验证和可视化, 沈英负责论文构思、数据审编、经费获取、研究项目管理、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊, 且对将要发表

的版本进行最终定稿, 并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution WANG Qiuyi is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, visualization, and writing--original draft. YANG Yihong is responsible for investigation, methodology, and resources. JIANG Chuan is responsible for investigation, methodology, validation, and visualization. SHEN Ying is

responsible for conceptualization, data curation, funding acquisition, project administration, resources, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 本文作者沈英是本刊编委会青年编委。该在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行, 且未经其本人经手处理。除此之外, 所有作者均声明不存在利益冲突。

Declaration of Conflicting Interests SHEN Ying is a member of the Junior Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by the author. Other than this, all authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] AGARWAL A, BASKARAN S, PAREKH N, *et al.* Male infertility. *Lancet*, 2021, 397(10271): 319-333. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2.
- [2] 孙雅宁, 许宁, 陈银银, 等. 全球 204 个国家和地区 1990—2019 年不孕不育疾病负担分析及预测. *中华生殖与避孕杂志*, 2025, 45(3): 277-285. doi: 10.3760/cma.j.cn101441-20240908-00331.
- [3] SUN Y N, XU N, CHENG Y Y, *et al.* Global analysis and forecast of the burden of infertility in 204 countries and territories from 1990 to 2019. *Chin J Reprod Contracep*, 2025, 45(3): 277-285. doi: 10.3760/cma.j.cn101441-20240908-00331.
- [4] EISENBERG M L, ESTEVES S C, LAMB D J, *et al.* Male infertility. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 49. doi: 10.1038/s41572-023-00459-w.
- [5] TOURNAYE H, KRAUSZ C, OATES R D. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(7): 544-553. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30040-7.
- [6] 刘智任, 刘奇才, 洪国舜. 男性不育遗传因素相关检测的研究进展. *中华检验医学杂志*, 2022, 45(5): 553-558. doi: 10.3760/cma.j.cn114452-20211111-00706.
- [7] LIU Z R, LIU Q C, HONG G L. Research progress of genetic testing in male infertility. *Chin J Lab Med*, 2022, 45(5): 553-558. doi: 10.3760/cma.j.cn114452-20211111-00706.
- [8] KRAUSZ C, RIERA-ESCAMILLA A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(6): 369-384. doi: 10.1038/s41585-018-0003-3.
- [9] 刘旭东, 李彦锋. 精子鞭毛多发形态异常的相关基因研究进展. *中华生殖与避孕杂志*, 2021, 41(9): 843-849. doi: 10.3760/cma.j.cn101441-20200401-00178.
- [10] LIU X D, LI Y F. Progress in the study of the related genes of multiple morphological abnormalities of the sperm flagellum. *Chin J Reprod Contracep*, 2021, 41(9): 843-849. doi: 10.3760/cma.j.cn101441-20200401-00178.
- [11] 郭森朝, 于慧, 顾梦, 等. *SEPT12* 基因突变导致弱精子症引起男性不育. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(6): 939-946. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.003.
- [12] GUO S Z, YU H, GU M, *et al.* *SEPT12* gene mutation leads to asthenospermia and male infertility. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2024, 59(6): 939-946. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.003.
- [13] HOUSTON B J, RIERA-ESCAMILLA A, WYRWOLL M J, *et al.* A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Hum Reprod Update*, 2021, 28(1): 15-29. doi: 10.1093/humupd/dmab030.
- [14] BURMESTER T, HANKELN T. Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014, 211(3): 501-514. doi: 10.1111/apha.12312.
- [15] KEPNER A, MARIC D, CORREIA M, *et al.* Lessons from the post-genomic era: globin diversity beyond oxygen binding and transport. *Redox Biol*, 2020, 37: 101687. doi: 10.1016/j.redox.2020.101687.
- [16] HOOGHEWIJS D, EBNER B, GERMANI F, *et al.* Androglobin: a chimeric globin in metazoans that is preferentially expressed in mammalian testes.

- Mol Biol Evol, 2012, 29(4): 1105-1114. doi: 10.1093/molbev/msr246.
- [13] QU R, ZHANG Z, WU L, *et al.* ADGB variants cause asthenozoospermia and male infertility. *Hum Genet*, 2023, 142(6): 735-748. doi: 10.1007/s00439-023-02546-0.
- [14] KEPPNER A, CORREIA M, SANTAMBROGIO S, *et al.* Androglobin, a chimeric mammalian globin, is required for male fertility. *Elife*, 2022, 11: e72374. doi: 10.7554/eLife.72374.
- [15] GAO Y, LIU L, TIAN S, *et al.* Whole-exome sequencing identifies ADGB as a novel causative gene for male infertility in humans: from motility to fertilization. *Andrology*, 2025, 13(5): 1105-1116. doi: 10.1111/andr.13605.
- [16] ABOU TAYOUN A N, PESARAN T, DISTEFANO M T, *et al.* Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat*, 2018, 39(11): 1517-1524. doi: 10.1002/humu.23626.
- [17] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 2015, 17(5): 405-424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
- [18] JIAO S Y, YANG Y H, CHEN S R. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(1): 154-189. doi: 10.1093/humupd/dmaa034.
- [19] TU C, CONG J, ZHANG Q, *et al.* Bi-allelic mutations of DNAH10 cause primary male infertility with asthenoteratozoospermia in humans and mice. *Am J Hum Genet*, 2021, 108(8): 1466-1477. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.06.010.
- [20] LIU M, DAI S, ZHANG J, *et al.* A novel mutation in CFAP47 causes male infertility due to multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1155639. doi: 10.3389/fendo.2023.1155639.
- [21] DAI S, LIANG Y, LIU M, *et al.* Novel biallelic mutations in TTC29 cause asthenoteratozoospermia and male infertility. *Mol Genet Genomic Med*, 2022, 10(12): e2078. doi: 10.1002/mgg3.2078.
- [22] KOAY T W, OSTERHOF C, ORLANDO I M C, *et al.* Androglobin gene expression patterns and FOXJ1-dependent regulation indicate its functional association with ciliogenesis. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100291. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100291.
- [23] GUNES S, SENGUPTA P, HENKEL R, *et al.* Microtubular Dysfunction and Male Infertility. *World J Mens Health*, 2020, 38(1): 9-23. doi: 10.5534/wjmh.180066.
- [24] TOURE A, MARTINEZ G, KHERRAF Z E, *et al.* The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum Genet*, 2021, 140(1): 21-42. doi: 10.1007/s00439-020-02113-x.
- [25] SHAHROKHI S Z, SALEHI P, ALYASIN A, *et al.* Asthenozoospermia: cellular and molecular contributing factors and treatment strategies. *Andrologia*, 2020, 52(2): e13463. doi: 10.1111/and.13463.
- [26] JOACHIMIAK E, OSINKA A, FARAHAT H, *et al.* Composition and function of the C1b/C1f region in the ciliary central apparatus. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11760. doi: 10.1038/s41598-021-90996-9.

(2025-05-10 收稿, 2025-12-10 修回)

编辑 余琳



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0 国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2026 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Sciences)