

# 13 例先天性双侧输精管缺如不育患者的致病基因突变检测

汤莹\*, 张湧波\*, 吴丹红, 林炎鸿, 兰风华<sup>△</sup>

[福建省移植生物学重点实验室, 福建医科大学福总临床医学院(第九〇〇医院), 福州 350025]

**[摘要]** **目的:**检测先天性双侧输精管缺如(congenital bilateral absence of the vas deferens, CBAVD)患者中囊性纤维化跨膜转导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*)基因和 CBAVD 易感基因的突变情况,探讨它们与 CBAVD 发病风险的相关性。**方法:**对 13 例诊断为孤立发生的 CBAVD 患者的致病基因 *CFTR* 及易感基因黏附型 G 蛋白偶联受体 G2(adhesion G protein-coupled receptor G2, *ADGRG2*)、上皮细胞钠离子通道 β 亚单位(sodium channel epithelial 1 subunit beta, *SCNN1B*)和碳酸酐酶 12(carbonic anhydrase, *CA12*)和溶质载体家族 9 成员 3(solute carrier family 9 member A3, *SLC9A3*)行全外显子测序及 Sanger 测序验证,针对 *CFTR* 基因多态性位点、内含子及侧翼序列行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增后用 Sanger 测序,并运用生物信息学方法对 CBAVD 易感基因新发突变进行保守性分析和有害性预测。对 13 例 CBAVD 患者中 1 例患者的家系进行遗传学分析,评估子代遗传风险。**结果:**外显子测序发现 13 例 CBAVD 患者中,只有 6 例患者检测到 *CFTR* 基因外显子突变,有 6 种错义突变:c. 2684G > A(p. Ser895Asn)、c. 4056G > C(p. Gln1352His)、c. 2812G > T(p. Val938Leu)、c. 3068T > G(p. Ile1023Arg)、c. 374T > C(p. Ile125Thr)、c. 1666A > G(p. Ile556Val), 1 种无义突变:c. 1657C > T(p. Arg553Ter), 这 6 例患者中有 2 例患者同时还存在 *CFTR* 的纯合 p. V470 位点,另外 7 例患者未检测出 *CFTR* 基因外显子区域的突变。13 例 CBAVD 患者中,3 例患者携带纯合 p. V470 的多态性位点,4 例患者携带 5T 等位基因,2 例患者携带 TG13 等位基因,10 例患者携带 c. -966T > G 位点。4 例 CBAVD 患者同时携带以上 *CFTR* 基因突变位点中的 2~3 个位点。13 例患者中 CBAVD 易感基因突变情况:1 种 *ADGRG2* 错义突变 c. 2312A > G(p. Asn771Ser), 2 种 *SLC9A3* 错义突变 c. 2395T > C(p. Cys799Arg)、c. 493G > A(p. Val165Ile), 1 种 *SCNN1B* 错义突变 c. 1514G > A(p. Arg505His)和 1 种 *CA12* 错义突变 c. 1061C > T(p. Ala354Val), 其中,*SLC9A3* 基因的 c. 493G > A(p. Val165Ile)突变位点是首次在 CBAVD 患者中被发现,以上 5 种突变位点在 gnomAD 数据库中的人群变异频率极低,属于罕见突变,用 Mutation Taster 和 Polyphen-2 软件预测显示 *SLC9A3* 基因的 c. 493G > A(p. Val165Ile)位点和 *SCNN1B* 基因的 c. 1514G > A(p. Arg505His)位点的有害性等级为致病突变。1 例家系遗传分析发现,先证者的 c. 1657C > T(p. Arg553Ter)突变为新生突变,先证者父亲、母亲均未携带该突变,先证者及其配偶通过辅助生殖技术孕育 1 女婴,该女婴遗传了先证者的致病性突变 c. 1657C > T(p. Arg553Ter)。**结论:***CFTR* 基因突变仍然是中国 CBAVD 患者的主要致病原因,但突变的分布与频率与国内外其他研究的数据存在一定差异,需要进一步扩充中国 CBAVD 患者的 *CFTR* 突变谱;*ADGRG2*、*SLC9A3*、*SCNN1B* 和 *CA12* 易感基因可能解释部分无 *CFTR* 突变的 CBAVD 病例;CBAVD 患者多无特殊临床表现,建议临床医生确诊前对患者行进一步的体格检查,并结合其阴囊超声或经直肠超声检查;建议将 *CFTR* 基因突变检测应用于辅助生殖前的遗传学筛查,降低子代罹患 CBAVD 及囊性纤维化的风险。

**[关键词]** 先天性双侧输精管缺如;囊性纤维化跨膜转导调节因子;黏附型 G 蛋白偶联受体 G2;溶质载体家族 9 成员 3

[中图分类号] R394.1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2024)05-0763-12

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2024.05.003

## Detection of pathogenic gene mutations in thirteen cases of congenital bilateral absence of vas deferens infertility patients

TANG Ying\*, ZHANG Yongbo\*, WU Danhong, LIN Yanhong, LAN Fenghua<sup>△</sup>

[Fujian Provincial Key Laboratory of Transplant Biology, Fuzong Clinical Medical College of Fujian Medical University (The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force, PLA), Fuzhou 350025, China]

**基金项目:**福建省自然科学基金(2020J011149, 2023J011351)和第九〇〇医院院立课题(2021MS03) Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province(2020J011149, 2023J011351), and Medical Research Project of 900th Hospital of Joint Logistics Support Force(2021MS03)

<sup>△</sup> Corresponding author's e-mail, fhlan@mail.fjmu.edu.cn

\* These authors contributed equally to this work

网络出版时间:2024-04-16 14:43:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20240412.2103.013.html>

**ABSTRACT Objective:** To detect the cystic fibrosis transmembrane transduction regulator (*CFTR*) gene mutations and congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD) susceptibility gene mutations in patients with CBAVD, and to explore their association with the risk of CBAVD. **Methods:** Whole-exome sequencing and Sanger sequencing validation were conducted on the pathogenic genes *CFTR*, adhesion G protein-coupled receptor G2 (*ADGRG2*), sodium channel epithelial 1 subunit beta (*SCNN1B*), carbonic anhydrase 12 (*CA12*), and solute carrier family 9 member A3 (*SLC9A3*) in thirteen cases of isolated CBAVD patients. The polymorphic loci, intron and flanking sequences of *CFTR* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) followed by Sanger sequencing. Bioinformatics methods were employed for conservative analysis and deleterious prediction of novel susceptibility gene mutations in CBAVD. Genetic analysis was performed on the pedigree of one out of thirteen patients with CBAVD to evaluate the risk of inheritance in offspring. **Results:** Exome sequencing revealed *CFTR* gene exon mutations in only six of the thirteen CBAVD patients, with six missense mutations c. 2684G > A (p. Ser895Asn), c. 4056G > C (p. Gln1352His), c. 2812G > (p. Val938Leu), c. 3068T > G (p. Ile1023Arg), c. 374T > C (p. Ile125Thr), c. 1666A > G (p. Ile556Val), and one nonsense mutation (c. 1657C > T (p. Arg553Ter)). Among these six patients, two also had the *CFTR* homozygous p. V470 site, additionally, mutations in *CFTR* gene exon regions were not detected in the remaining seven patients. Within the thirteen CBAVD patients, three carried the homozygous p. V470 polymorphic site, four carried the 5T allele, two carried the TG13 allele, and ten carried the c. -966T > G site. Four CBAVD patients simultaneously carried 2 - 3 of the aforementioned *CFTR* gene mutation sites. Susceptibility gene mutations in CBAVD among the thirteen patients included one *ADGRG2* missense mutation c. 2312A > G (p. Asn771Ser), two *SLC9A3* missense mutations c. 2395T > C (p. Cys799Arg), c. 493G > A (p. Val165Ile), one *SCNN1B* missense mutation c. 1514G > A (p. Arg505His), and one *CA12* missense mutation c. 1061C > T (p. Ala354Val). Notably, the *SLC9A3* gene c. 493G > A (p. Val165Ile) mutation site was first identified in CBAVD patients. The five mutations exhibited an extremely low population mutation frequency in the gnomAD database, classifying them as rare mutations. Predictions from Mutation Taster and Polyphen-2 software indicated that the harmfulness level of the *SLC9A3* gene c. 493G > A (p. Val165Ile) site and the *SCNN1B* gene c. 1514G > A (p. Arg505His) site were disease causing and probably damaging. The genetic analysis of one pedigree revealed that the c. 1657C > T (p. Arg553Ter) mutation in the proband was a de novo mutation, as neither the proband's father nor mother carried this mutation. The proband and his spouse conceived a daughter through assisted reproductive technology, and the daughter inherited the proband's pathogenic mutation c. 1657C > T (p. Arg553Ter). **Conclusion:** *CFTR* gene mutations remain the leading cause of CBAVD in Chinese patients; however, the distribution and frequency of mutations differ from data reported in other domestic and international studies, highlighting the need to expand the *CFTR* mutation spectrum in Chinese CBAVD patients. The susceptibility genes *ADGRG2*, *SLC9A3*, *SCNN1B*, and *CA12* may explain some cases of CBAVD without *CFTR* mutations. Given the lack of specific clinical manifestations in CBAVD patients, it is recommended that clinicians conduct further physical examinations and consider scrotal or transrectal ultrasound before making a definitive diagnosis. It is advisable to employ *CFTR* gene mutation testing in preconception genetic screening to reduce the risk of CBAVD and cystic fibrosis in offspring.

**KEY WORDS** Congenital bilateral absence of the vas deferens; Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Adhesion G protein-coupled receptor G2; Solute carrier family 9 member A3

先天性双侧输精管缺如 (congenital bilateral absence of the vas deferens, CBAVD) 是一种男性生殖系统的先天畸形疾病, 属常染色体隐性遗传病, 致病基因为囊性纤维化跨膜传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*)<sup>[1]</sup>。患者表现出双侧输精管缺失或发育不全, 临床特征主要为梗阻性无精子症, 是男性不育的重要原因<sup>[2]</sup>。CBAVD 与囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 有共同的遗传基础, 被认为是一种轻度的囊性纤维化, 与经典 CF 相比, 临床表现较轻, 主要影响男性生育能力, 其呼吸和胰腺并发症较少, 通常不会像典型的 CF 那样影响个体的整体健康或预期寿命<sup>[3]</sup>。当 CBAVD 患者只有输精管缺失的表现, 其他系统和器官没有明显临床表现时, 称为孤立型 CBAVD<sup>[4]</sup>。*CFTR* 基

因位于人类染色体 7q31.2, 全长约 250 kb, 包括 27 个外显子。目前已报道了 2 000 余种 *CFTR* 基因突变 (www.cfr2.org), 研究表明 *CFTR* 突变和 CBAVD 风险之间存在遗传关联, 但这些突变的热点和频率在地区和种族之间存在明显差异<sup>[5]</sup>。

几乎所有的 CBAVD 患者至少携带一种形式的 *CFTR* 基因突变<sup>[6]</sup>, 但仍有 10% ~ 20% 的 CBAVD 患者缺乏基因诊断, 尤其是在亚洲人群中这一比例更高, 提示可能存在其他遗传学机制或致病机制<sup>[7]</sup>。研究确认, 黏附型 G 蛋白偶联受体 G2 (adhesion G protein-coupled receptor G2, *ADGRG2*) 是一种罕见的与男性不育相关的 X 连锁基因<sup>[8]</sup>。溶质载体家族 9 成员 3 (solute carrier family 9 member A3, *SLC9A3*) 与 CBAVD 的发生有直接关联, *CFTR* 和

*SLC9A3* 突变的累积效应导致了 CBAVD 的发生<sup>[9]</sup>。另外,上皮细胞钠离子通道  $\beta$  亚单位(sodium channel epithelial 1 subunit beta, *SCNN1B*)和碳酸酐酶 12(carbonic anhydrase, *CA12*)是 *CFTR* 的修饰基因,当敲除 *SCNN1B* 和 *CA12* 时,细胞中泛素介导的 *CFTR* 降解增加<sup>[10]</sup>。以上研究表明,*ADGRG2*、*SLC9A3*、*SCNN1B* 和 *CA12* 基因可能是促进 CBAVD 发病的潜在因素,需进一步探讨其在 CBAVD 发生发展过程中的具体机制。

值得注意的是,中国 CBAVD 患者的突变谱与欧美人群存在较大差异<sup>[11]</sup>,单纯参考国外突变谱无法完全解释中国 CBAVD 患者的临床表象。如果 CBAVD 患者通过辅助生殖技术生育,*CFTR* 基因的突变很可能遗传给下一代,后代可能患有更严重的 CF。

本研究对 13 例 CBAVD 患者的临床资料进行收集,通过检测 CBAVD 相关易感基因 *ADGRG2*、*SLC9A3*、*SCNN1B* 和 *CA12* 的全外显子测序及致病基因 *CFTR* 基因全序列(包括外显子、多态性位点、内含子及侧翼序列)测定,鉴定中国 CBAVD 致病基因。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

收集 2019 年 6 月至 2020 年 6 月就诊于福建医科大学福总临床医学院(第九〇〇医院)生殖中心符合研究纳入标准的 13 例 CBAVD 患者[年龄( $29.23 \pm 4.82$ )岁]及 54 名正常男性对照者[年龄( $32.00 \pm 4.30$ )岁],本研究经福建医科大学福总临床医学院(第九〇〇医院)生物医学伦理委员会审批(批准号:SC-2018-024),所有研究对象均签署知情同意书。

CBAVD 患者纳入标准:(1)男性不育:患者夫妇间有正常规律的性生活,未采用避孕措施,婚后 2 年以上女方不能受孕,且排除女方因素所致不育;(2)体格检查:经两名固定的男科医师行体格检查证实患者为男性特征,阴茎及双侧睾丸发育正常,双侧未触及输精管;(3)核型分析:染色体核型为 46,XY。(4)精液常规检测未见精子;(5)腹部超声检查:未发现肾发育不良及先天性孤立肾。

正常男性对照者纳入标准:(1)因女性不育而接受辅助生殖治疗;(2)双侧睾丸发育正常;(3)精液常规检查结果正常;(4)染色体核型正常。

CBAVD 患者及正常男性对照者排除标准:合并慢性胰腺炎、肺囊性纤维化等其他 CF 相关疾病。

### 1.2 CBAVD 患者致病基因及易感基因全外显子测序

采集 13 例 CBAVD 患者外周静脉血样本,委托上海福君基因生物科技有限公司进行致病基因及易

感基因全外显子测序并 Sanger 测序验证(表 1),分别获得 *CFTR* (NG\_016465.4)、*ADGRG2* (NG\_021304.1)、*SLC9A3*(NG\_046804.1)、*SCNN1B*(NG\_011908.2)和 *CA12* (NG\_028022.2)基因的突变情况。测序结果与 NCBI 数据库中的标准序列进行对比,用 Chromas 软件观察是否存在突变位点。

### 1.3 CBAVD 患者易感基因突变位点的生物信息学分析

在 UniProt 数据库中查找基因的氨基酸序列,采用 Clustal Omega 软件对突变位点进行多个物种间的同源性比对,观察其在进化中的保守性。利用 Mutation taster、Polyphen-2 在线软件对突变位点进行有害性预测。

### 1.4 CBAVD 患者 *CFTR* 基因多态性位点、内含子及侧翼序列测序

针对 *CFTR* 外显子 11 多态性位点 p.V470M (rs213950, c.1408G > A)、内含子 9 (TG)mTn、短串联重复序列 IVS10-11(TAAA)<sub>n</sub> 及启动子 ATG 前方 1.4 kb 序列设计引物(表 1),进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增后行 Sanger 测序验证。

### 1.5 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 20.0 对患者临床数据进行分析。符合正态分布的计量资料用均数  $\pm$  标准差表示,不符合正态分布的计量资料采用中位数(四分位数)表示,正态分布计量资料采用独立样本 *t* 检验,非正态分布计量资料组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。所有统计检验均为双侧检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床资料

对精液常规、精浆生化指标及外周血性激素检测结果进行统计,发现 CBAVD 患者相比正常对照者,精液体积、pH、精浆果糖、中性  $\alpha$ -葡糖苷酶均差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)等各项性激素浓度均差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但雌二醇(estradiol, E2)显著低于正常对照者( $P < 0.05$ ),详见表 2。

通过阴囊超声检查 13 例 CBAVD 患者附睾发育情况,双侧附睾形态、大小均正常者占 69.2% (9/13),附睾体、尾部缺失者占 15.4% (2/13),附睾淤积症占 15.4% (2/13),无静脉曲张。

表 1 致病基因及易感基因的部分 PCR 引物序列

Table 1 Partial PCR primer sequences of pathogenic genes and susceptible genes

Gene	Sequence of primer	Product length/bp
<i>CFTR</i> (exon4)	F: GTTTCACATATGGTATGACCCT R: GGCAGTTTACAGAAGATACTCAA	573
<i>CFTR</i> (exon12)	F: AGCAATGTTGTTTTTGACCAACT R: AATGTGATTCTTAACCCACTAGCC	427
<i>CFTR</i> (exon17)	F: GAGTGATTTTGAGGTTAAGGGTG R: CACAGAAATATTAGGAGCAACAAT	587
<i>CFTR</i> (exon19)	F: CTCACCAACATGTTTTCTTTGA R: CCAAAATGAAGTCACATGGTCA	399
<i>CFTR</i> (exon25)	F: AGGTAGTGGGGGTAGAGGG R: TTCGGAAGAAAACACAAGACTC	495
<i>CFTR</i> (V470M)	F: GTCTCTTTTACTTTCCTTGTATC R: ATTCACAGTAGCTTACCATAGA	525
<i>CFTR</i> (IVS9-10)	F: AACTTGATAATGGGCAAATATCTTA R: AAAGCCACTGAAAATAATATGAGG	613
<i>CFTR</i> promoter	F: TCACAAGACCCTTGCCTTAG R: GCCTTTTCCAGAGGGACCT	1402
<i>CFTR</i> (TAAA) <sub>n</sub>	F: AACTTGATAATGGGCAAATATCTTA R: AAAGCCACTGAAAATAATATGAGG	613
<i>ADGRG2</i> (exon25)	F: CATCCAGTCATGTGCCAAAG R: CTGTGAAGGCTGCTGTGAAG	706
<i>SLC9A3</i> (exon2)	F: CTGGACGCCGGCTACTTC R: CTTGGTCACGAGGGCCTAC	303
<i>SLC9A3</i> (exon16)	F: AGCAGGTGGGTTATGTCTTG R: GAGACCTGGAGGGAGAGGAG	537
<i>SCNN1B</i> (exon12)	F: GCAGTTCTCGTTTGGACCTC R: TTCCTGGGAGGTGATTCTTG	511
<i>CA12</i> (exon11)	F: AAACGGCTCATTCATACCT R: CAGCATGGCTTGGTTTGTGATT	463

PCR, polymerase chain reaction; *CFTR*, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; *ADGRG2*, adhesion G protein-coupled receptor G2; *SLC9A3*, solute carrier family 9 member A3; *SCNN1B*, sodium channel epithelial 1 subunit beta; *CA12*, carbonic anhydrase.

表 2 CBAVD 患者临床资料

Table 2 Clinical data of patients with CBAVD

Items	CBAVD (n = 13)	Control (n = 54)	P value
Semen volume/mL	0.79 ± 0.39	4.10 ± 1.22	<0.001 *
Semen pH	6.70 (6.35, 7.00)	7.29 ± 0.16	<0.001 *
Berry sugar/μmol	0.60 (0, 1.15)	65.47 ± 35.27	<0.001 *
Seminal plasma α-glucosidase /mIU	65.95 (36.68, 81.35)	2.40 (0.90, 5.55)	<0.001 *
FSH/(IU/L)	5.44 (3.89, 7.48, )	4.63 (2.97, 5.23)	0.113
LH/(IU/L)	3.49 (2.85, 4.83)	3.49 (2.70, 5.39)	0.739
T/(ng/dL)	414.72 ± 151.20	435.95 ± 144.67	0.639
E2/(ng/L)	34.38 ± 5.84	41.60 (32.18, 48.82)	0.038 *
PRL/(μg/L)	9.43 (5.99, 19.06)	8.29 (5.65, 10.75)	0.247

Data were presented with  $\bar{x} \pm s$ ,  $M (P_{25}, P_{75})$ . \*  $P < 0.05$ . CBAVD, congenital bilateral absence of the vas deferens; FSH, follicle stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; T, testosterone; E2, estradiol; PRL, prolactin.

2.2 CBAVD 患者全外显子测序及生物信息学分析

2.2.1 致病基因及易感基因全外显子测序 本研究从 13 例 CBAVD 患者中共检测出 7 种 *CFTR* 基因外显子突变(表 3,图 1A), 检出率为 46.2%, 其中 6

种为错义突变:c. 2684G > A (p. Ser895Asn)、c. 4056G > C (p. Gln1352His)、c. 2812G > T (p. Val938Leu)、c. 3068T > G (p. Ile1023Arg)、c. 374T > C (p. Ile125Thr)、c. 1666A > G (p. Ile556Val), 1 种为无义突变:

c. 1657C > T (p. Arg553Ter), 1例CBAVD患者携带CFTR双等位基因突变c. 2684G > A(p. Ser895Asn)、c. 4056G > C(p. Gln1352His)。对13例CBAVD患者中1例患者(c. 1657C > T (p. Arg553Ter))的家系进行遗传学分析发现,先证者(II-1)的CFTR基因第12号外显子上终止突变c. 1657C > T (p. Arg553Ter)为新生突变,其父亲(I-1)为c. 1666A > G (p. Ile556Val)杂合突变的携带者,其母亲(I-2)及配偶(II-2)的CFTR基因均未发现突变。先证者及其配偶通过辅助生殖技术成功孕育1女婴(III-1),该女婴携带了先证者的致病基因c. 1657C > T (p. Arg553Ter)(图1B、C)。直肠超声检查发现先

证者(II-1)精囊腺发育双侧全部缺如(图1D)。对CBAVD易感基因的突变情况进行筛选分析,共检测出1种ADGRG2错义突变c. 2312A > G(p. Asn771Ser), 2种SLC9A3错义突变c. 2395T > C(p. Cys799Arg)、c. 493G > A(p. Val165Ile), 1种SCNN1B错义突变c. 1514G > A(p. Arg505His)和1种CA12错义突变c. 1061C > T(p. Ala354Val), 其中,SLC9A3基因的c. 493G > A(p. Val165Ile)突变位点是首次在CBAVD患者中被发现(表3,图2)。以上5种CBAVD易感基因的突变位点在gnomAD数据库中的人群变异频率极低,属于罕见突变(表4)。

表3 CFTR及易感基因全外显子测序

Table 3 Whole exon sequencing of CFTR and susceptibility genes

No.	CFTR gene (het/homo)	ADGRG2 gene (het/homo)	SLC9A3 gene (het/homo)	SCNN1B gene (het/homo)	CA12 gene (het/homo)
1	N	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>homo</sup>	N	N
2	N	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>homo</sup>	N	N
3	N	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup> c. 493G > A (p. Val165Ile) <sup>het</sup>	N	N
4	c. 2684G > A (p. Ser895Asn) <sup>het</sup> c. 4056G > C (p. Gln1352His) <sup>het</sup>	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	N	N
5	c. 2812G > T (p. Val938Leu) <sup>het</sup>	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	N	N
6	N	c. 2312A > G (p. Asn771Ser) <sup>homo</sup>	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	N	N
7	N	c. 2312A > G (p. Asn771Ser) <sup>homo</sup>	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	N	N
8	c. 1657C > T (p. Arg553Ter) <sup>het</sup>	c. 2312A > G (p. Asn771Ser) <sup>homo</sup>	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>homo</sup>	N	c. 1061C > T (p. Ala354Val) <sup>het</sup>
9	N	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	N	N
10	c. 3068T > G (p. Ile1023Arg) <sup>het</sup>	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	N	N
11	N	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>homo</sup>	N	N
12	c. 374T > C (p. Ile125Thr) <sup>het</sup>	N	c. 2395T > C (p. Cys799Arg) <sup>het</sup>	c. 1514G > A (p. Arg505His) <sup>het</sup>	N
13	c. 1666A > G (p. Ile556Val) <sup>het</sup>	N	N	N	N

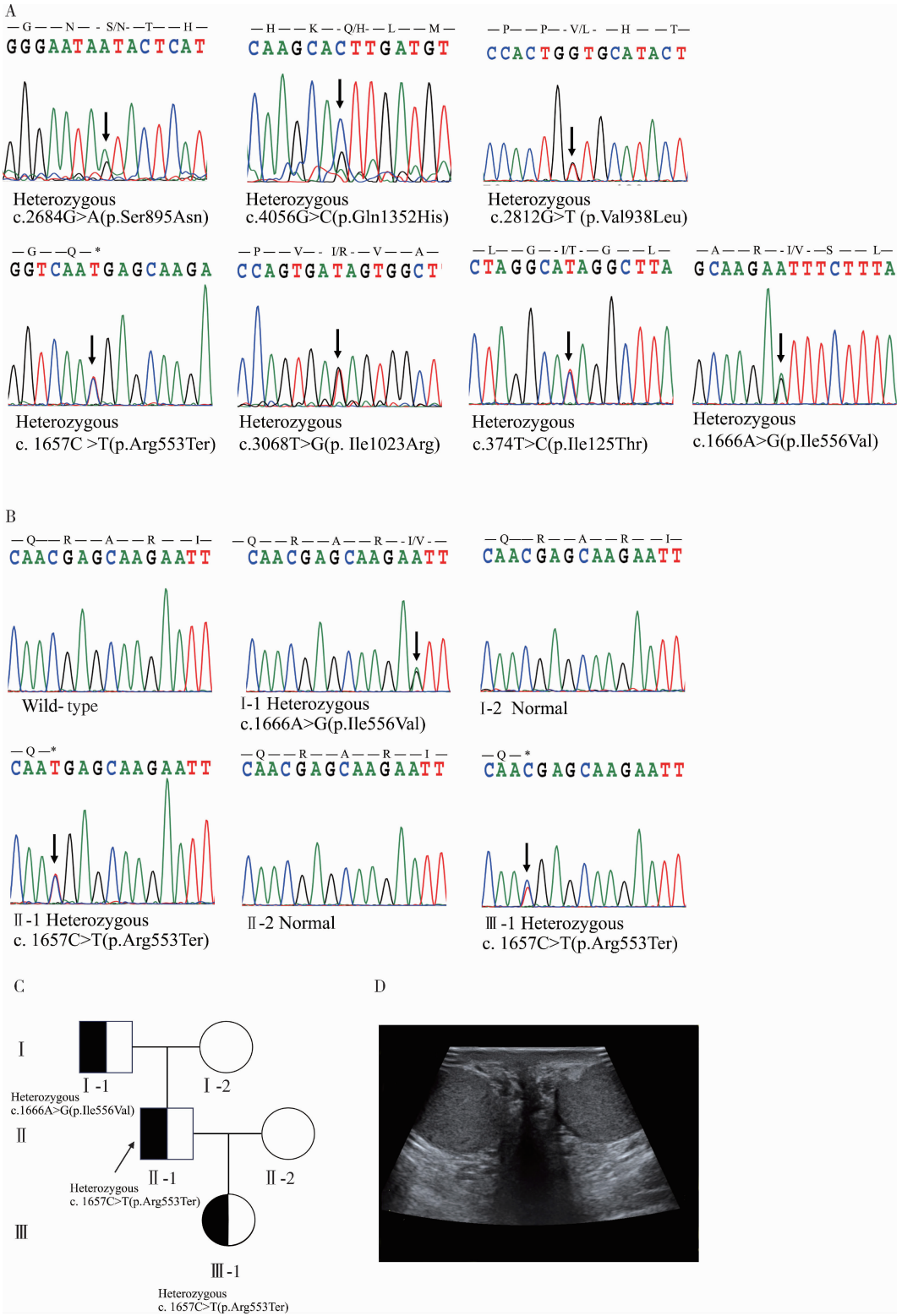
CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ADGRG2, adhesion G protein-coupled receptor G2; SLC9A3, solute carrier family 9 member A3; SCNN1B, sodium channel epithelial 1 subunit beta; CA12, carbonic anhydrase; Het, heterozygous; Homo, homozygous. N, none.

2.2.2 生物信息学分析 用Clustal Omega软件对ADGRG2、SLC9A3和SCNN1B的突变位点氨基酸进行保守性分析,发现ADGRG2基因的c. 2312A > G (p. Asn771Ser)位点、SLC9A3基因的c. 493G > A (p. Val165Ile)和SCNN1B基因中的c. 1514G > A

(p. Arg505His)在不同物种间存在高度保守性(图2)。用Mutation Taster和Polyphen-2在线软件对ADGRG2、SLC9A3、SCNN1B和CA12基因中的突变位点进行有害性预测分析,2个软件均显示SLC9A3基因的c. 493G > A (p. Val165Ile)位点和SCNN1B基因

的 c. 1514G > A (p. Arg505His) 位点的有害性等级为致病突变,表明这 2 种突变位点可能是高度有害的,但 *ADGRG2* 基因的 c. 2312A > G (p. Asn771Ser) 位点、

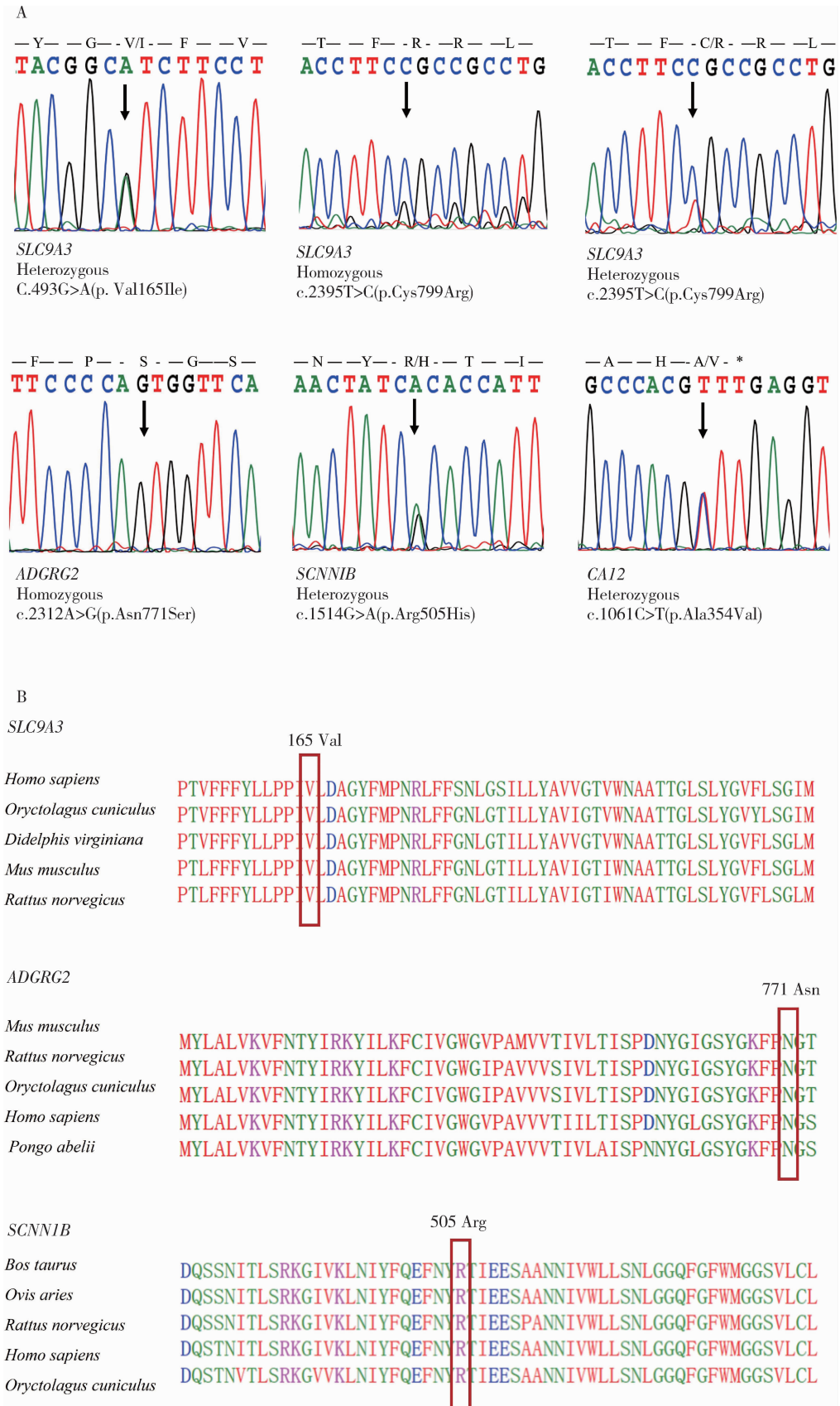
*SLC9A3* 基因的 c. 2395T > C (p. Cys799Arg) 及 *CAI2* 基因的 c. 1061C > T (p. Ala354Val) 位点 2 个软件均预测可能为良性(表 4)。



A, *CFTR* exon mutation Sanger sequencing of patients; B, Sanger sequencing of *CFTR* gene in c. 1657C > T (p. Arg553Ter) patient family; C, pedigree analysis diagram of c. 1657C > T (p. Arg553Ter) patient; D, rectal ultrasound images of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *CFTR*, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Arrow, the proband.

图 1 *CFTR* 外显子突变位点的 Sanger 测序结果及 c. 1657C > T (p. Arg553Ter) 患者家系分析

Figure 1 Sanger sequencing of *CFTR* exon mutation site and pedigree analysis of the c. 1657C > T (p. Arg553Ter) patient



A, Sanger sequencing of patient susceptibility genes; B, schematic diagram of conservative analysis of mutation sites of susceptibility genes. *SLC9A3*, solute carrier family 9 member A3; *ADGRG2*, adhesion G protein-coupled receptor G2; *SCNNIB*, sodium channel epithelial 1 subunit beta; *CA12*, carbonic anhydrase.

图2 易感基因外显子突变位点的 Sanger 测序结果及保守性分析

Figure 2 Sanger sequencing and conservative analysis of exon mutation sites of susceptibility genes

表 4 易感基因突变的人群等位基因频率及致病性分类

Table 4 Allele frequency and pathogenicity classification of susceptible genes mutation

Mutation site	Reference ID	gnomAD	Clinical variation	ACMG *	Mutation taster	Polyphen-2
<i>ADGRG2</i>						
c. 2312A > G (p. Asn771Ser)	rs3924227	0.00211	Benign	Benign	Polymorphism	Benign (0.009)
<i>SLC9A3</i>						
c. 2395T > C (p. Cys799Arg)	rs2247114	0.000001242	Benign	Benign	Polymorphism	Benign (0.000)
<i>SLC9A3</i>						
c. 493G > A (p. Val165Ile)	rs369854335	0.00006534	Uncertain significance	Uncertain significance	Disease causing	Probably damaging (0.928)
<i>SCNN1B</i>						
c. 1514G > A (p. Arg505His)	rs138784278	0.0001413	Conflicting	Uncertain significance	Disease causing	Probably damaging (0.575)
<i>CA12</i>						
c. 1061C > T (p. Ala354Val)	rs201427665	0.00005143	Likely benign	Likely benign	Polymorphism	Benign (0.008)

\* The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification is based on the 2015 ACMG guidelines; Polyphen-2, the closer the score is to 1.0, the more damage is likely to occur.

2.3 CFTR 基因多态性位点、内含子及侧翼序列 Sanger 测序结果

在 13 例 CBAVD 患者中 CFTR 基因 p. V470M 多态性以 MV 基因型最为常见, 频率为 46.1% (6/13), 其次是 MM 基因型, 频率为 30.8% (4/13), 而 VV 基因型频率最低, 为 23.1% (3/13); 其中 2 例 (15.4%) 携带纯合 p. V470 的 CBAVD 患者还分别携带了 CFTR 基因的 c. 374T > C (p. Ile125Thr) 和 c. 1657C > T (p. Arg553Ter) 突变位点, 详见表 5 和图 3A。

CFTR 基因内含子 (TG)mTn 检测发现 4 例患者

为 5T 携带者, 其中 2 例为 5T 纯合突变, 2 例为 5T/7T 杂合突变, 5T 等位基因的频率为 23.1% (6/26)。对于 TG 重复序列, 我们观察到 TG12 等位基因最为常见, 频率为 61.5% (16/26), 次常见为 TG11 等位基因, 频率为 30.8% (8/26), 而 TG13 最为少见, 在 CBAVD 患者的频率为 7.7% (2/26)。在 13 例 CBAVD 患者中, TG12-7T 为最常见的单倍型, 频率为 46.1% (12/26), TG12-5T 单倍型频率为 15.4% (4/26), TG13-5T 单倍型频率为 7.7% (2/26), 详见表 5 和图 3B。

表 5 CBAVD 患者 CFTR 基因多态性位点、内含子及侧翼序列突变情况

Table 5 Polymorphic loci, intron and flanking sequences mutations of CFTR gene in patients with CBAVD

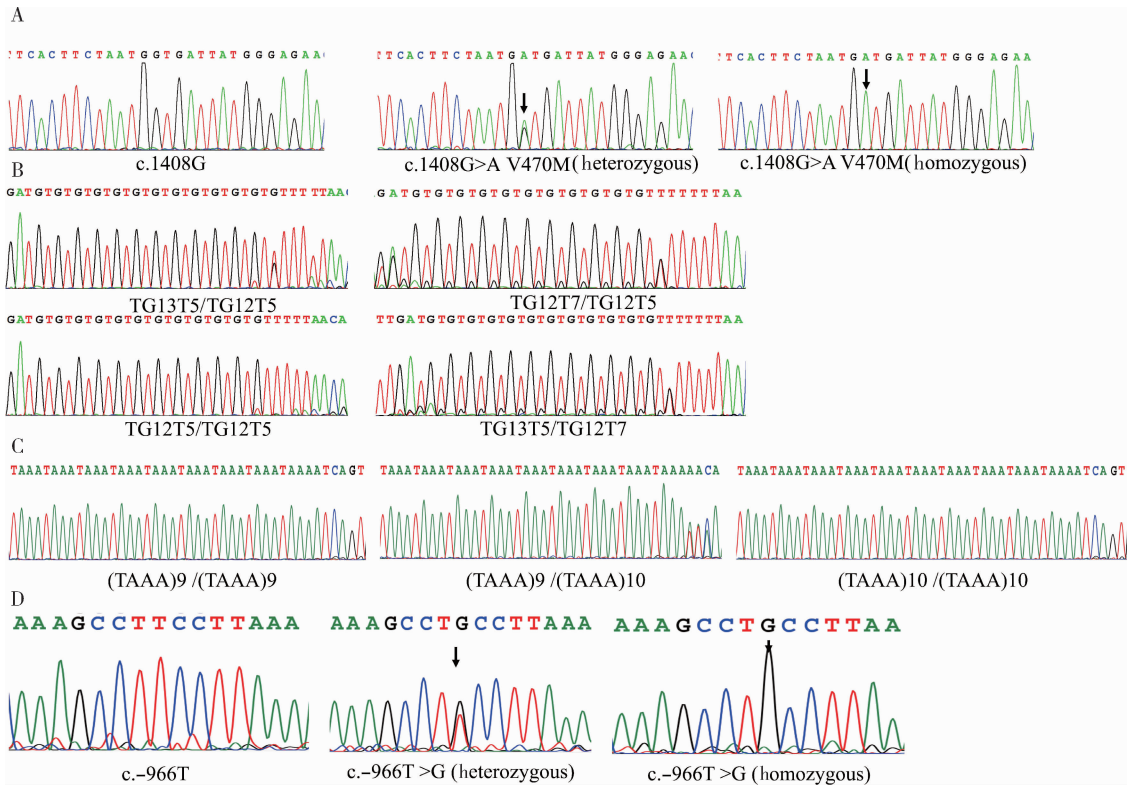
No.	V470M genotypes	(TG)mTn genotypes	IVS10-11 (TAAA)n	Upstream promoter sequence 1.4 kb
1	M/M	TG13-5T/TG12-5T	10/10	c. -966T > G <sup>homo</sup>
2	M/M	TG11-7T/TG1217T	10/10	c. -966T > G <sup>homo</sup>
3	M/M	TG13-5T/TG12-7T	10/10	c. -966T > G <sup>homo</sup>
4	V/M	TG11-7T/TG12-7T	9/10	c. -966T > G <sup>het</sup>
5	V/M	TG11-7T/TG12-7T	9/10	c. -966T > G <sup>het</sup>
6	V/V	TG12-5T/TG12-5T	9/9	N
7	M/M	TG12-7T/TG12-7T	10/10	c. -966T > G <sup>homo</sup>
8	V/V	TG12-7T/TG11-7T	9/9	N
9	V/M	TG12-7T/TG11-7T	9/10	c. -966T > G <sup>het</sup>
10	V/M	TG12-5T/TG12-7T	9/10	c. -966T > G <sup>het</sup>
11	V/M	TG12-7T/TG11-7T	9/10	c. -966T > G <sup>het</sup>
12	V/V	TG12-7T/TG11-7T	9/9	N
13	V/M	TG11-7T/TG12-7T	9/10	c. -966T > G <sup>het</sup>

CBAVD, congenital bilateral absence of the vas deferens; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Het, heterozygous; Homo, homozygous. N, none.



对 *CFTR* 基因 IVS10-11 (TAAA)<sub>n</sub> 检测发现, (TAAA)<sub>10</sub>/(TAAA)<sub>10</sub>、(TAAA)<sub>9</sub>/(TAAA)<sub>10</sub> 和 (TAAA)<sub>9</sub>/(TAAA)<sub>9</sub> 基因型,所占百分比分别为 30.77% (4/13)、46.15% (6/13)、23.08% (3/13), 未见其他等位基因型,详见表 5 和图 3C。

*CFTR* 基因启动子 ATG 前方 1.4 kb 序列测序发现 1 个突变位点 c. -966T>G,该位点以 G/G 基因型为主,约占 30.77% (4/13), 其他 T/G 和 T/T 基因型的频率分别为 46.15% (6/13) 和 23.08% (3/13), 详见表 5 和图 3D。



A, exon11 p. V470M; B, intron 9 (TG)mTn; C, IVS10-11 (TAAA)<sub>n</sub>; D, c. -966T>G. *CFTR*, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

图 3 *CFTR* 基因多态性位点、内含子及侧翼序列 Sanger 测序图

Figure 3 Sanger sequencing of polymorphic loci, intron and flanking sequences of *CFTR* gene

### 3 讨论

目前认为,CBAVD 是 CF 在生殖系统的一种温和的特殊表现形式。在白种人男性 CF 患者中, 95%~99% 同时合并 CBAVD<sup>[12]</sup>, 而在我国绝大部分 CBAVD 为孤立发生, 无 CF 表现。孤立型 CBAVD 彩超多提示附睾网格状回声、附睾发育不良、双侧精囊发育不良, 少数病例可合并肾脏发育畸形<sup>[13]</sup>。本研究收集的 13 例孤立型 CBAVD 患者, 均来源中国福建省, 主诉不育来福建医科大学福总临床医学院(第九〇〇医院)生殖中心就诊, 精液常规未发现精子, 直肠阴囊超声提示患者双侧输精管发育缺如, 医生诊断为孤立型 CBAVD。

本研究中 13 例 CBAVD 患者的 *CFTR* 基因外显子、*CFTR* 基因多态性位点、内含子及侧翼序列 Sanger 测序筛查结果显示, 6 例患者携带 7 种 *CFTR* 外显子错义突变, 3 例患者携带纯合 p. V470 的多态性

位点, 4 例患者携带 5T 等位基因, 2 例患者携带 TG13 等位基因, 10 例患者携带 c. -966T>G 位点, 多名患者同时携带以上突变位点中的 2~3 个位点, 表明 *CFTR* 基因突变仍然是中国 CBAVD 患者的主要致病原因, 但并未发现任何如 c. 1521\_1523delCTT (p. Phe508del) 等白种人 *CFTR* 热点突变<sup>[14]</sup>, 亦未见缺失、插入和大片段重排等其它类型的突变, 进一步说明 *CFTR* 突变谱在亚洲黄种人群和欧洲白种人群之间具有明显的种族差异。

*CFTR*(蛋白) 含有 1 480 个氨基酸残基, 由两个跨膜结构域(membrane spanning domain, MSD), 两个核苷酸结合域(nucleotide binding domain, NBD) 和一个调节域(R domain, RD) 组成<sup>[15]</sup>。本研究中发现的 c. 1657C>T(p. Arg553Ter) 突变位于 *CFTR* 蛋白的 NBD1 区域, 作为无义突变, 会产生提前终止翻译的截短蛋白, 导致 *CFTR* 蛋白功能受损, 之前有文献报道 1 例中国 CF 患儿携带 c. 1657C>T

(p. Arg553Ter) 纯合子<sup>[16]</sup>。另外,我们在患者中发现的 c. 3068T > G (p. Ile1023Arg) 和 c. 4056G > C (p. Gln1352His) 均位于 CFTR 蛋白的 NBD2 区域,会导致运输缺陷和功能成熟的 CFTR 蛋白表达减少,其中 c. 3068T > G (p. Ile1023Arg) 属于中国汉族南方人的原始突变<sup>[17]</sup>, c. 4056G > C (p. Gln1352His) 突变是亚洲人群特有的,是中国 CBAVD 患者中最常见和最重要的错义突变<sup>[18]</sup>。c. 4056G > C (p. Gln1352His) 位点具有高度保守性,在日本<sup>[19]</sup>和越南<sup>[20]</sup>人群中的等位基因频率高于 CFTR 致病性等位基因最大频率,提示该突变可能是一种良性多态性,在我们的研究中携带 c. 4056G > C (p. Gln1352His) 的患者同时携带了另外一种意义不明确 c. 2684G > A (p. Ser895Asn) 突变,是否是这两种突变共同引起了该患者 CBAVD 的发生有待明确。我们发现的 c. 1666A > G (p. Ile556Val) 突变具有较高的等位基因频率,患者和对照人群间差异小,提示该突变可能是温和突变,与文献[18]报道一致。

本研究中仍有 53.8% (7/13) 的 CBAVD 患者 CFTR 基因外显子未观察到突变,可能存在突变位点位于非编码区的情况,其中 4 例患者中含两个以上非编码区突变,提示多个非编码区的温和突变也可能导致 CBAVD 的发病。本研究中 5T 等位基因频率为 23.1% (6/26),高于在德国(12.3%)、法国(16.3%)、美国(17.9%)、和西班牙(22.7%)等 CBAVD 人群中观察到的频率<sup>[21-22]</sup>,但略低于葡萄牙(27.4%)、埃及(28.6%)和以往研究中国 CBAVD 人群的频率(27.4% ~ 44.5%)<sup>[23-27]</sup>。5T 等位基因是中国 CBAVD 人群中最常见的基因变异之一,可引起 CFTR 10 号外显子缺失并影响剪接效率<sup>[28]</sup>。

另外,CFTR 基因中的 p. V470M 多态性可能加剧了 5T 对剪接缺陷的影响<sup>[29]</sup>。本研究中的 13 例 CBAVD 患者的 CFTR 基因检测发现,p. V470M 多态性以 MM 基因型最为常见,频率为 30.8% (4/13),在 2 例 CBAVD 患者中检测到纯合 p. V470 还分别携带了 CFTR 基因的 c. 374T > C (p. Ile125Thr) 和 c. 1657C > T (p. Arg553Ter) 突变位点,提示当 CFTR 同时存在多种复合杂合突变时,对 CBAVD 的致病性可能存在叠加效应。当短 poly T 和长 TG 重复序列结合时,外显子 11 转录缺失的概率越高,CBAVD 患病风险增加<sup>[30]</sup>。本研究显示,CBAVD 患者中 TG12-5T 和 TG13-5T 单倍型频率分别为 15.4% 和 7.7%,这支持了 TG 重复序列与 poly T 协同作用产生 CBAVD 的理论。

在我们的研究中,对 CFTR 启动子上游 1.4 kb 进行测序,仅检测到一种突变(c. -966T > G), T/G 杂合突变及 G/G 纯合突变的频率分别为 46.15% (6/13) 和 30.77% (4/13),并未检测到文献报道的其他热点突变<sup>[31]</sup>。文献报道 c. -966T > G 突变位点在欧洲 CBAVD 中等位基因突变频率为 2.2%<sup>[32]</sup>。Bai 等<sup>[33]</sup>通过双荧光素酶检测发现 c. -966T > G 纯合突变可导致 CFTR 转录水平显著降低。结合我们的结果,提示 c. -966T > G 位点在中国 CBAVD 患者与白种人之间存在差异,致病性有待探讨。

有意义的是,我们首次在 CBAVD 患者发现 SLC9A3 基因的 c. 493G > A (p. Val165Ile) 突变,在 gnomAD 数据库中的人群变异频率几乎为 0,属于罕见突变,用软件 Mutation Taster 和 Polyphen-2 预测该突变为有害性突变,该突变可能会引起 SLC9A3 蛋白表达异常,进一步影响钠离子和碳酸氢盐在细胞的跨膜运输和重吸收<sup>[34]</sup>;但在该患者中还观察到了 CFTR 致病性突变 TG13-5T, SLC9A3 和 CFTR 突变的致病性是否存在协同作用需进一步实验验证;已有文献报道在 SLC9A3 基因敲除小鼠的生殖器官中,CFTR 的表达显著降低,输精小管重吸收障碍及钙化,导致梗阻现象<sup>[35]</sup>;在受 SLC9A3 相关疾病影响的个体中,文献中尚未报道这种突变,因此,我们无法确定该突变是否对这例患者起致病作用。

本研究患者中发现的 ADGRG2 基因的 c. 2312A > G (p. Asn771Ser) 突变频率在东亚人群中 > 5%,用软件 Mutation Taster 和 Polyphen-2 预测及查询 ClinVar 数据库均提示其为良性突变,因此,我们认为该突变不会引起 CBAVD。我们在患者中发现的 SCNN1B 基因中的 c. 1514G > A (p. Arg505His) 属于错义突变,可能影响 SCNN1B 蛋白表达,从而导致钠离子通道功能的异常,用软件 Mutation Taster 和 Polyphen-2 预测该突变为有害性突变,该突变在支气管扩张、遗传性假性醛固酮增多症患者中有检出<sup>[36]</sup>,但现有证据不足以明确其在疾病中的作用。CAI2 基因的错义突变 c. 1061C > T (p. Ala354Val),用软件 Mutation Taster 和 Polyphen-2 预测可能为良性。尽管我们对这些突变进行了生物信息学分析预测,但缺乏相关功能性实验,无法确定其是否在 CBAVD 患者中发挥致病作用。

我们对位于 CFTR 基因第 12 号外显子的 c. 1657C > T (p. Arg553Ter) 杂合突变的先证者进行家系遗传分析发现,先证者母亲及配偶的 CFTR 基因均未发现突变;有意思的是,先证者父亲也未携带该突变,但携带 c. 1666A > G (p. Ile556Val) 杂合突

变,表明先证者的 c. 1657C > T (p. Arg553Ter) 突变为新生突变,但由于缺乏先证者父亲的临床资料,无法判断输精管的发育情况,我们推测先证者父亲可能为先天性单侧输精管缺如 (congenital unilateral absence of the vas deferens, CUAVD) 患者,通过另一条功能正常的输精管生育下一代。先证者及其配偶通过辅助生殖技术孕育 1 女婴,遗憾的是,该女婴遗传了先证者的致病性突变 c. 1657C > T (p. Arg553Ter)。截止到随访期,该女婴未表现出任何 CF 症状,但由于随访时间较短,并不能排除相关脏器受累情况。通过这项家系研究,强调了 *CFTR* 基因筛查及胚胎植入前遗传学诊断的重要性,因此,我们建议将 *CFTR* 基因突变检测应用于辅助生殖前的遗传学筛查,降低子代罹患 CBAVD 及 CF 的风险。当超声检查确诊 CBAVD 后,*CFTR* 基因出现单个纯合错义致病突变、多个杂合或多个温和突变时,建议患者进行辅助生殖前完善产前遗传咨询,降低子代遗传风险。

综上所述,本研究中 CBAVD 患者的 *CFTR* 基因突变谱与国外其他研究<sup>[37]</sup> 存在较大差异,可能是由于患者种族不同、样本量少所致。*CFTR* 基因总体分布情况与中国其他研究的数据基本相同<sup>[38]</sup>,但由于受试者仅来自福建省,不能代表中国所有 CBAVD 患者的情况。此外,除了 *CFTR* 基因突变,我们还观察了易感基因 *ADGRG2*、*SLC9A3*、*SCNN1B* 和 *CA12* 的突变情况,为部分未检测到 *CFTR* 突变的 CBAVD 病例提供了解释。本研究为深入了解 CBAVD 的遗传学特征,以及为相关遗传性不育症的诊断和治疗提供了新的线索和方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 汤莹:提出研究思路,设计研究方案,撰写论文;张湧波:整理数据,撰写论文;吴丹红、林炎鸿:协助课题实验;兰风华:总体把关和审定论文

## 参考文献

[ 1 ] Yang B, Lei C, Yang D, et al. Whole-exome sequencing identified *CFTR* variants in two consanguineous families in China [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 631221.

[ 2 ] 王宇刚,马淑霞,姚晓飞,等. 男性不育伴精液量少的临床特点分析[J]. *生殖医学杂志*, 2023, 32(7): 997-1002.

[ 3 ] Chillón M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(22): 1475-1480.

[ 4 ] Qu X, Li L, Cui C, et al. Correlation between *CFTR* variants and outcomes of ART in patients with CAVD in Central China [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 64.

[ 5 ] Wang H, An M, Liu Y, et al. Genetic diagnosis and sperm retrieval outcomes for Chinese patients with congenital bilateral ab-

sence of vas deferens [J]. *Andrology*, 2020, 8(5): 1064-1069.

[ 6 ] Fang J, Wang X, Sun X, et al. Congenital absence of the vas deferens with hypospadias or without hypospadias: Phenotypic findings and genetic considerations [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 1035468.

[ 7 ] Bieth E, Hamdi SM, Mieusset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens [J]. *Hum Genet*, 2021, 140(1): 59-76.

[ 8 ] Lu Y, Xie Y, Li M, et al. A novel *ADGRG2* truncating variant associated with X-linked obstructive azoospermia in a large Chinese pedigree [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2023, 40(7): 1747-1754.

[ 9 ] Wu YN, Chen KC, Wu CC, et al. *SLC9A3* affects vas deferens development and associates with Taiwanese congenital bilateral absence of the vas deferens [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 10: 3562719.

[ 10 ] Shen Y, Yue HX, Li FP, et al. *SCNN1B* and *CA12* play vital roles in occurrence of congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD) [J]. *Asian J Androl*, 2019, 21(5): 525-527.

[ 11 ] Guo X, Liu K, Liu Y, et al. Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis in Chinese patients: A systemic review of reported cases [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2018, 13(1): 224.

[ 12 ] Souza PFN, Amaral JL, Bezerra LP, et al. ACE2-derived peptides interact with the RBD domain of SARS-CoV-2 spike glycoprotein, disrupting the interaction with the human ACE2 receptor [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2022, 40(12): 5493-5506.

[ 13 ] 顾怡栋,邓学东,程洪波,等. CBAVD 患者超声分型在穿刺取精方式选择中的应用价值[J]. *医学影像学杂志*, 2019, 29(9): 1621-1625.

[ 14 ] Prins S, Corradi V, Sheppard DN, et al. Can two wrongs make a right? F508del-*CFTR* ion channel rescue by second-site mutations in its transmembrane domains [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298: 101615.

[ 15 ] Gaikwad A, Khan S, Kadam S, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related male infertility: Relevance of genetic testing & counselling in Indian population [J]. *Indian J Med Res*, 2020, 152(6): 575-583.

[ 16 ] Li H, Lin L, Hu X, et al. Liver failure in a Chinese cystic fibrosis child with homozygous R553X mutation [J]. *Front Pediatr*, 2019, 20(7): 36.

[ 17 ] Leung GKC, Ying D, Mak CCY, et al. *CFTR* founder mutation causes protein trafficking defects in Chinese patients with cystic fibrosis [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2017, 5(1): 40-49.

[ 18 ] Luo S, Feng J, Zhang Y, et al. Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in Chinese congenital absence of vas deferens patients [J]. *Gene*, 2021, 765: 145045.

[ 19 ] Tadaka S, Hishinuma E, Komaki S, et al. jMorp updates in 2020: Large enhancement of multi-omics data resources on the general Japanese population [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D536-D544.

- [20] Le VS, Tran KT, Bui H TP, et al. A Vietnamese human genetic variation database [J]. *Hum Mutat*, 2019, 40(10): 1664 – 1675.
- [21] Gaikwad A, Khan S, Kadam S, et al. The CFTR gene mild variants poly-T, TG repeats and M470V detection in Indian men with congenital bilateral absence of vas deferens [J]. *Andrologia*, 2018, 50(2): e12858.
- [22] Casals T, Bassas L, Egozcue S, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(7): 1476 – 1483.
- [23] Grangeia A, Niel F, Carvalho F, et al. Characterization of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator gene mutations and IVS8 poly(T) variants in Portuguese patients with congenital absence of the vas deferens [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(11): 2502 – 2508.
- [24] Fathy M, Ramzy T, Elmonem MA, et al. Molecular screening of CFTR gene in Egyptian patients with congenital bilateral absence of the vas deferens: A preliminary study [J]. *Andrologia*, 2016, 48(10): 1307 – 1312.
- [25] Cheng H, Yang S, Meng Q, et al. Genetic analysis and intracytoplasmic sperm injection outcomes of Chinese patients with congenital bilateral absence of vas deferens [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39(3): 719 – 728.
- [26] Yuan P, Liang ZK, Liang H, et al. Expanding the phenotypic and genetic spectrum of Chinese patients with congenital absence of vas deferens bearing CFTR and ADGRG2 alleles [J]. *Andrology*, 2019, 7(3): 329 – 340.
- [27] Ni WH, Jiang L, Fei QJ, et al. The CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in Chinese males with congenital bilateral absence of the vas deferens [J]. *Asian J Androl*, 2012, 14(5): 687 – 690.
- [28] Tosco A, Castaldo A, Colombo C, et al. Clinical outcomes of a large cohort of individuals with the F508del/5T; TG12 CFTR genotype [J]. *J Cyst Fibros*, 2022, 21(5): 850 – 855.
- [29] Cuppens H, Lin W, Jaspers M, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(2): 487 – 496.
- [30] Nykamp K, Truty R, Riethmaier D, et al. Elucidating clinical phenotypic variability associated with the polyT tract and TG repeats in CFTR [J]. *Hum Mutat*, 2021, 42(9): 1165 – 1172.
- [31] Kerschner JL, Meckler F, Coatti GC, et al. The impact of genomic distance on enhancer-promoter interactions at the CFTR locus [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(4): e18142.
- [32] Verlingue C, Vuillaumier S, Mercier B, et al. Absence of mutations in the interspecies conserved regions of the CFTR promoter region in cystic fibrosis (CF) and CF related patients [J]. *J Med Genet*, 1998, 35(2): 137 – 140.
- [33] Bai S, Du Q, Liu X, et al. The detection and significance of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter mutations in Chinese patients with congenital bilateral absence of the vas deferens [J]. *Gene*, 2018, 672(25): 64 – 71.
- [34] Zhuo JL, Soleimani M, Li XC. New insights into the critical importance of intratubular Na( + )/H( + ) exchanger 3 and its potential therapeutic implications in hypertension [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2021, 23(6): 34.
- [35] Wang YY, Lin YH, Wu YN, et al. Loss of SLC9A3 decreases CFTR protein and causes obstructed azoospermia in mice [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(4): e1006715.
- [36] Karacan Küçükali G, Çetinkaya S, Tunç G, et al. Clinical management in systemic type pseudohypoaldosteronism due to SCNN1B variant and literature review [J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2021, 13(4): 446 – 451.
- [37] Ideozu JE, Liu M, Riley-Gillis BM, et al. Diversity of CFTR variants across ancestries characterized using 454 727 UK biobank whole exome sequences [J]. *Genome Med*, 2024, 16(1): 43.
- [38] Ni Q, Chen X, Zhang P, et al. Systematic estimation of cystic fibrosis prevalence in Chinese and genetic spectrum comparison to Caucasians [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2022, 17(1): 129.

(2023-11-25 收稿)

( 本 文 编 辑 : 刘 淑 萍 )