

非梗阻性无精子症和严重少精子症患者 Y 染色体微缺失的研究

韩婷婷, 丁显平[△], 魏霞, 冉静, 张丽媛

四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 遗传医学研究所(成都 610064)

【摘要】 目的 探究非梗阻性无精子症和严重少精子症患者中 Y 染色体微缺失的情况。**方法** 利用多重 PCR 技术,对 203 例非梗阻性男性不育患者,包括 125 例无精子症患者和 78 例少精子症患者以及 100 位正常男性进行 Y 染色体微缺失检测。**结果** 203 例患者中,发现 22 例(10.8%)患者存在 Y 染色体微缺失,其中,125 例无精子症患者中,共检测出 12 例 Y 染色体微缺失,缺失率为 9.6%,78 例严重少精子症患者中,共检测出 10 例 Y 染色体微缺失,缺失率为 12.8%。AZFc 区的缺失率最高,严重少精子症患者仅发现存在 AZFc 区缺失,正常对照组中未发现 Y 染色体微缺失。**结论** 男性不育患者在施行卵胞浆内单精子注射(ICSI)或体外受精(IVF)技术之前,有必要进行遗传筛查和遗传咨询。

【关键词】 男性不育 无精子症 严重少精子症 多重 PCR Y 染色体微缺失

Analysis of Y Chromosome Microdeletion in Non-obstructive Male Infertile Patients with Azoospermia and Severe Oligozoospermia HAN Ting-ting, DING Xian-ping[△], WEI Xia, RAN Jing, ZHANG Li-yuan. *Institute of Medical Genetics, Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China*

[△] Corresponding author, E-mail: Brainding@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the frequency and types of the major Y chromosome microdeletions in non-obstructive infertile males with azoospermia and severe oligozoospermia in Chinese. **Methods** Multiplex polymerase chain reaction (PCR) amplification was used to detect Y chromosome microdeletion in 203 non-obstructive infertile men, including 125 patients with azoospermia and 78 with severe oligozoospermia, as well as 100 fertile men in the control group. **Results** Among the 203 non-obstructive infertile cases, 22 (10.8%) carried a Y chromosome microdeletion and the frequencies of such microdeletions were 9.6% in azoospermia and 12.8% in oligozoospermia. The most frequent microdeletions were in the AZFc, and all the severe oligospermia were found microdeletions in the AZFc. No Y chromosome microdeletion was detected in the control group. **Conclusion** It is necessary to offer genetic screening and counseling to infertility men prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or *in-vitro* fertilization (IVF).

【Key words】 Male infertility Azoospermia Severe oligozoospermia Multiplex PCR Y chromosome microdeletion

全球大约 12%~15% 的育龄夫妇不育,男性因素约占 50%^[1,2]。Yq11 上存在控制精子生成的基因或基因家族,称为无精子症因子(azoospermia factor, AZF)。AZF 区域存在 4 个互不重叠的亚区(AZFa、AZFb、AZFc 和 AZFd)与精子生成相关,AZFa 区缺失引起唯支持细胞综合征和无精子症^[3],AZFb 区或 AZFc 区缺失引起多种症状表型^[4]。自从在 AZFb 和 AZFc 区之间确定 AZFd 区的存在以来,至今还未在该区发现新的调节基因或功能基因。利用辅助生殖技术(assisted reproduction technique, ART)来达到生

育目的男性不育患者有可能将 Y 染色体微缺失传递给后代。因此建议男性不育患者在施行卵胞浆内单精子注射术/体外受精术(ICSI/IVF)之前,进行遗传咨询和遗传缺陷的筛查。

目前,对于 Y 染色体微缺失检测,临床上一般采用欧洲男科学会(EAA)和欧洲分子遗传实验质控网(EMQN)推荐的 6 个序列标签位点(sequence tagged site, STS):SY84, SY86, SY127, SY134, SY254, SY255,但是对于欧洲人来说这 6 个 STS 位点仅检测出 AZF 区 90% 以上的缺失率,对于中国人来说,检测率不足 90%。本研究通过改进方法,以提高对中国男性不育人群 Y 染色体微缺失检测

的准确性,并加以验证。

1 对象和方法

1.1 研究对象

2009 年 1 月至 2011 年 12 月到我所就诊的 203 例非梗阻性男性不育患者,其中包括 125 例无精子症患者(20~53 岁)和 78 例少精子症患者(20~45 岁)。诊断标准:婚后 1 年以上在未采取避孕措施的情况下无生育者,且女方检查正常。对照组为 100 例体检健康或有正常生育史的男性(20~35 岁)。按照 WHO(1999)推荐的方法进行 2 次以上的精液分析,每次间隔 7~21 d,精子密度小于 5×10^6 /mL 的患者诊断为严重少精子症,精液分析未见精子的患者诊断为无精子症。所有患者均获得知情同意权。

1.2 细胞遗传学分析

无菌条件下,所有患者和正常人的外周血培养后制备中期染色体分裂相,常规 G 显带分析。根据人类遗传学国际命名体制 ISCN 进行染色体核型分析,每个标本至少观察 20 个核型。

1.3 Y 染色体微缺失的检测

1.3.1 DNA 提取 抽取不育男性、正常男性以及正常女性的外周血 5 mL,置于真空 ACD 抗凝管中,−20 ℃ 保存,用 DNA 提取试剂盒(优晶,安徽)提取全血基因组 DNA。

1.3.2 STS 的选择和多重 PCR 检测 AZF 基因 选择 15 个亚洲人常见缺失序列标签位点 STS,分别是 AZFa 区的 SY84, SY86; AZFb 区的 SY127, SY134, SY121, SY124, SY133; AZFc 区的 SY254, SY255, SY157, SY242, SY277 和 AZFd 区的 SY145, SY152, SY153, SRY 引物作为内对照。正常男性、女性的 DNA 以及蒸馏水作为阳性对照、阴性对照及空白对照。引物序列来自 NCBI 数据并由上海英骏生物技术有限公司合成。

5 种多重 PCR 组合分别为:组合 A 包含的引物:SY255, SY133, SY157, SY14;组合 B 包含的引物:SY124, SY121, SY277, SY14;组合 C 包含的引物:SY152, SY242, SY86, SY14;组合 D 包含的引物:SY153, SY127, SY84, SY14;组合 E 包含的引物:SY145, SY134, SY254, SY14(表 1)。多重 PCR 反应体系为:总体积 25 μ L,包括模板 DNA 200 ng, $1\times$ PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+}), Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa),引物为 0.1~0.4 μ mo/L。多重 PCR 所

有组合的反应条件为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物和 1 μ L $6\times$ Loading buffer 混匀,100 V 的电压下,用含有核酸染料的 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳 30 min。如果检测到 STS 的缺失,则利用二重 PCR 重复检测上述缺失位点 2 次。使用 AlphaImager 软件上进行光密度扫描分析,计算出基因的相对表达量。

1.4 统计学方法

均数比较选择成组 *t* 检验分析,染色体异常率和 Y 染色体微缺失率的差异选择卡方检验分析,检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

表 1 STS 位点及其引物序列
Table 1 STS and primer sequences of AZF region

Multiplex PCR set	STS	Region	Primer sequence	Size (bp)
1	SY14	SRY	Forward;5'GAATATTCGCTCTCCGA3' Reverse;5'GCTGGTGCTCCATCTTGAG3'	472
	SY157	AZFc	Forward;5'CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG3' Reverse;5'CCTGCTGTGACGAAGATACA3'	286
	SY133	AZFb	Forward;5'ATTTCCTGCGCTTCACCAGGA3' Reverse;5'TGATGATTGCTAAAGGGAATTCCA3'	177
	SY255	AZFc	Forward;5'GTTACAGGATTCGGCGTGAT3' Reverse;5'CTCGTCATGTGCAGCCAC3'	123
	SY277	AZFc	Forward;5'GGGTTTTGCCTGCATACGTAATTA3' Reverse;5'CCTAAAAGCAATTCTAAACCTCCA3'	312
	SY121	AZFb	Forward;5'AGTTCACAGAATGGAGCTG3' Reverse;5'CCTGTGACTCCAGTTTGGTTC3'	190
2	SY124	AZFb	Forward;5'CAGGCAGGACAGCTTAAAG3' Reverse;5'ACTGTGGCAAAGTTGCTTTC3'	109
	SY14	SY86	AZFa Forward;5'GTGACACACAGACTATGCTTC3' Reverse;5'ACACACAGAGGGACAACCTC3'	320
	SY242	AZFc	Forward;5'ACACAGTAGCAGCGGGAGTT3' Reverse;5'TCTGCCATAAACTGTAAGCTCC3'	233
	SY152	AZFd	Forward;5'AAGACAGTCTGCCATGTTTCA3' Reverse;5'ACAGGAGGGTACTTAGCAGT3'	125
3	SY14	SY84	AZFa Forward;5'AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT3' Reverse;5'GCCTACTACCTGGAGGCTTC3'	326
	SY127	AZFc	Forward;5'GGCTCACAACGAAAAGAAA3' Reverse;5'CTGCAGGCAGTAATAAGGGA3'	274
	SY153	AZFd	Forward;5'GCATCCTCATTTTATGTCCA3' Reverse;5'CAACCCAAAAGCACTGAGTA3'	139
	SY14	SY254	AZFc Forward;5'GGGTGTTACCAGAAGGCAAA3' Reverse;5'GAACCGTATCTACCAAGAGCAGC3'	380
4	SY134	AZFb	Forward;5'GTCTGCCTCACCATAAAACG3' Reverse;5'ACCACTGCCAAAACCTTTCAA3'	301
	SY145	AZFd	Forward;5'CAACACAAAAACATCATATACTC3' Reverse;5'TTGAGAATAATTGTATGTTACGGG3'	160

2 结果

2.1 染色体核型检测

203 例男性不育患者中,包括 125 例无精子症患者(20~53 岁)和 78 例严重少精子症患者(20~45 岁),无精子症患者的平均年龄为(30.36 $\pm$ 5.49)岁,严重少精子症患者的平均年龄为(29.22 $\pm$ 5.36)岁,两组患者的年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

203 例男性不育患者中,共检测出 18 例染色体

异常(表 2),核型异常率为 8.9%(18/203),其中 15 例为无精子症患者,染色体异常率为 12%(15/125),3 例为严重少精子症患者,染色体异常率为 3.8%(3/78)。无精子症患者和严重少精子症患者的染色体异常率无明显差异($\chi^2=3.007,P=$

0.083)。18 例染色体异常患者中,共有 14 例为克氏综合征患者(47,XXY),染色体异常患者中,克氏综合征患者的频率(77.8%),高于其他染色体异常患者(22.2%)。100 例正常男性对照组中染色体核型未见异常。

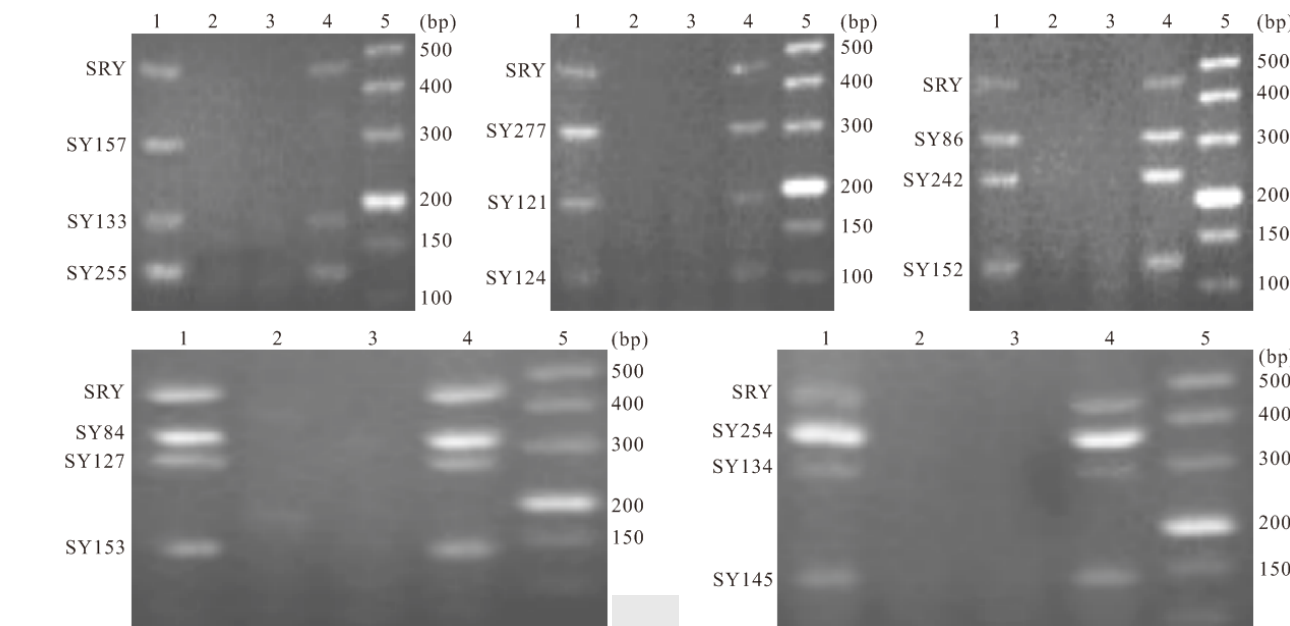
表 2 无精子症和严重少精子症患者的染色体异常核型
Table 2 Chromosomal abnormalities identified in patients with azoospermia and severe oligospermia

Chromosomal abnormality	Controls (n=100)	Azoospermia (n=125)(case)	Severe oligospermia (n=78) (case)	Total (n=203) [case (%)]
47,XXY		12	2	14 (6.90)
45,XO/46,XY		1		1 (0.49)
46,Y≤21		1		1 (0.49)
46,XX		1		1 (0.49)
46,XY,t(Xp;16q)			1	1 (0.49)
Total [case (%)]	0 (0)	15 (12)	3 (3.8)	18 (8.9)

2.2 Y 染色体微缺失检测结果

203 例男性不育患者、100 例正常对照组男性和正常女性对照,经多重 PCR 检测,结果显示(附图,表 3),男性不育患者中,共检测出 22 例 Y 染色体微缺失,AZF 微缺失率为 10.8%(22/203),其中,125 例无精子患者中,共检测出 12 例 Y 染色体微缺失,AZF 微缺失率为 9.6%(12/125),78 例严重少精子症患者中,共检测出 10 例 Y 染色体微缺失,AZF 微缺失率为 12.8%(10/78)。无精子症患者和严重少精子症患者的 Y 染色体微缺失率差异无统计学意义($\chi^2=$

0.516, $P=0.473$)。最常见的 AZF 微缺失区域位于 AZFc,其次是 AZFa+c,AZFb+c,AZFb,最后是 AZFb+c+d,AZFa,AZFa+b+c+d。并且,AZFc 区的缺失率明显高于 AZFa 和 AZFb 区($P<0.05$),同时,在无精子患者中检测出 AZF 4 个亚区的微缺失,而在严重少精子症患者中却只检测出 AZFc 区的缺失。22 例 AZF 微缺失患者中,缺失率最高的位点为 SY255、SY254(15/22,68.2%),其次是位点 SY157、SY242(12/22,54.5%)。100 例正常男性对照组中未发现 AZF 微缺失。



附图 多重 PCR 电泳图

Fig Multiplex PCR electrophoretogram

1: Normal men; 2: Normal women; 3: Sterile water; 4: Infertile men with SY157 deletion; 5: Marker

表 3 无精子症和严重少精子症患者 Y 染色体微缺失情况

Table 3 Y chromosome microdeletion detected in patients with azoospermia and severe oligospermia

AZF, microdeletion region	Controls (n=100)	Azoospermia (n=125) (case)	Severe oligospermia (n=78) (case)	Total (n=203) [case (%)]
AZFa		SY84(1)		1 (0.49)
AZFb		SY134(1)		2 (0.99)
		SY127,134(1)		
AZFc		SY254,255(2)	SY242(2)	13 (6.40)
		SY157(1)	SY254,255(2)	
			SY254,255,242(1)	
			SY157,242,277(1)	
			SY254,255,157,242(4)	
AZFa+c		SY86,254,255,157,242(2)		2 (0.99)
AZFb+c		SY127,134,254,255,157(1)		
		SY127,134,121,254,255,157(1)		2 (0.99)
AZFb+c+d		SY127,134,121,254,255,157,242,145(1)		1 (0.49)
AZFa+b+c+d		SY84,86,127,134,121,124,133,254,255,157,242,277,145,152,153(1)		1 (0.49)
Total [case (%)]	0(0)	12 (9.6)	10 (12.8)	22 (10.8)

3 讨论

本研究中染色体异常率为 8.9%，与以前报道的染色体异常率 2.2%~19.6% 相似^[5,6]。其中最常见的是克氏综合征(47,XXY)，占有染色体异常的 77.8%。并且在严重少精子症患者中,发现了 2 例克氏综合征,国外曾有研究报道 1 例克氏综合征为严重少精子症患者,而且通过辅助生殖技术,生育了一名健康的女孩^[7,8]。

Y 染色体微缺失率也因研究人群和研究方法的不同,从 0.7%~34.5% 不等,平均为 8.2%^[9]。本研究中 Y 染色体微缺失率为 10.8%，其中无精子症患者和严重少精子症患者的缺失率分别为 9.6%、12.8%，这个结果稍高于平均值,而且明显高于一些研究结果^[5,10]。这可能是由于人群的选择,检测位点的不同以及种族的差异,Y 染色体单倍型、遗传背景、环境影响不同导致的。临床上,一般采用 EAA 和 EMQN 推荐的 6 个 STS 位点检测 Y 染色体微缺失,为了提高检测率,本研究选取了 15 个中国人常见 STS 缺失位点^[11,12],为了确保结果的可靠性,在 AZF 各亚区至少选取了两个 STS 位点。本研究通过调整多重 PCR 反应体系,使所有的 STS 位点的扩增条件一致,从而增加了在临床上应用的可能性。另外,本研究发现 AZFc 区的 SY242 和 SY157 位点的缺失率比较高,仅次于 SY254 和 SY255,并且发现 1 例无精子症患者仅缺失 SY157,2 例严重少精子症患者仅缺失 SY242,另外 1 例严重少精子症患者同时缺失 SY157、SY242 和 SY277。

本研究中,AZFc 区的缺失率最高,但具体的原

因还不清楚。其中一个可能原因是该区与男性不育相关基因多是重复序列,由于基因的同源重组,重复片段的数量会发生变化,这有可能会导致精子不同程度的生成障碍。另外一些研究认为 AZFc 区部分缺失是导致精子生成障碍的影响因素,AZFc 区部分缺失主要包括 b1/b3,b2/b3,gr/gr 缺失。但是对于 AZFc 区部分缺失是否会导致精子生成障碍还取决于 Y 染色体的进化背景,大多数研究表明 gr/gr 的缺失是导致男性精子生成障碍的危险因素,而 b2/b3 缺失只有出现非单倍体型 N 的男性中,才有可能成为导致精子生成障碍的危险因素。因此对于 AZFc 区部分缺失导致男性不育的分子机制还有待于进一步研究^[13]。

综上所述,中国地区的无精子症和严重少精子症患者染色体异常率和 Y 染色体微缺失率比较高,但是仍有大部分无精子症和严重少精子症患者的不育原因是不确定的,那么是否还存在 Y 染色体某些更微小的缺失或点突变,甚至是某些精子生成相关基因的突变,这就需要发展出检测位点更多更全面的检测技术满足临床需求,也需要对精子发生相关基因进行深入研究。并且无精子症和严重少精子症患者,在施行 ICSI/IVF 之前,要进行染色体核型和 Y 染色体微缺失筛查,避免将其异常基因垂直遗传给后代。

* * *

致谢 感谢所有提供实验标本的患者和捐献者,感谢四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室遗传医学研究所所有成员。

参 考 文 献

- 1 Zhu YJ, Liu SY, Wang H, *et al.* The prevalence of azoospermia factor microdeletion on the Y chromosome of Chinese infertile men detected by multi-analyte suspension array technology. *Asian J Androl*, 2008; 10(6): 873-881.
- 2 Massart A, Lissens W, Tournaye H, *et al.* Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl*, 2012; 14(10): 40-48.
- 3 Balkan M, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with oligozoospermia and azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet*, 2008; 25(11-12): 559-565.
- 4 Wang RX, Fu C, Yang YP, *et al.* Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *J Assist Reprod Genet*, 2010; 27(7): 391-396.
- 5 Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Sirirungsri W, *et al.* Frequency of Y chromosome microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile Thai men with oligozoospermia and azoospermia. *Asian J Androl*, 2007; 9(1): 68-75.
- 6 Poonthai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*, 2009; 50(4): 336-347.
- 7 Cruger DG, Agerholm I, Byriel L, *et al.* Genetic analysis of males from intracytoplasmic sperm injection couples. *Clin Genet*, 2003; 64(3): 198-203.
- 8 Crüger D, Toft B, Agerholm I, *et al.* Birth of a healthy girl after ICSI with ejaculated spermatozoa from a man with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod*, 2001; 16(9): 1909-1911.
- 9 Krausz C, Forti G. Clinical aspects of male infertility. *Results Probl Cell Differ*, 2000; 28: 1-21.
- 10 Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, *et al.* Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod*, 2002; 17(1): 17-24.
- 11 Yang Y, Zhang SZ, Peng LM, *et al.* Studies on molecular epidemiology of Y chromosome azoospermia factor microdeletions in Chinese patients with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Chin J Med Genet*, 2003; 20(5): 385-389.
- 12 于丛一, 庄广伦, 周灿权等. 男性不育患者 Y 染色体微缺失筛查方法的建立和初步应用. *中华医学遗传学杂志*, 2003; 20(4): 357-359.
- 13 Paulo NC, Joao G, Carlos EP. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update*, 2010; 16(5): 525-542.

(2012-07-20 收稿, 2012-11-12 修回)

编辑 吕 熙

(上接第 187 页)

- 2 Quick A, Patel D, Hadziahmetovic M, *et al.* Current therapeutic paradigms in glioblastoma. *Rev Recent Clin Trials*, 2010; 5(1): 14-27.
- 3 Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 2007; 21(21): 2683-2710.
- 4 Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 2007; 170(5): 1445-1453.
- 5 Parsons DW, Jones S, Zhang X, *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008; 321(5897): 1807-1812.
- 6 Horbinski C, Kelly L, Nikiforov YE, *et al.* Detection of IDH1 and IDH2 mutations by fluorescence melting curve analysis as a diagnostic tool for brain biopsies. *J Mol Diagn*, 2010; 12(4): 487-492.
- 7 Winkler BS, De Santis N, Solomon F. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina. *Exp Eye Res*, 1986; 43(5): 829-847.
- 8 Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+) dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1999; 274(43): 30527-30533.
- 9 Yan H, Parsons DW, Jin G. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 2009; 360(8): 765-773.
- 10 Balss J, Meyer J, Mueller W, *et al.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*, 2008; 116(6): 597-602.
- 11 Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, *et al.* IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*, 2009; 11(4): 341-347.
- 12 Hartmann C, Hentschel B, Wick W, *et al.* Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*, 2010; 120(6): 707-718.
- 13 Sanson M, Marie Y, Paris S, *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*, 2009; 27(25): 4150-4154.
- 14 Schnittger S, Haeflrich C, Ulke M, *et al.* IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood*, 2010; 116(25): 5486-5496.

(2012-09-07 收稿, 2012-11-14 修回)

编辑 沈 进