

- [5] Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGFβ and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes[J]. Cell Cycle, 2010, 9(12): 2363-2374.
- [6] Maitah MY, Ali S, Ahmad A, et al. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF-β1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16068-e16072.
- [7] Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(55): 6958-6969.
- [8] Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(9): 1207-1216.
- [9] Chiou SH, Wang ML, Chou YT, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation[J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10433-10444.
- [10] Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, et al. Epithelial to mesenchymal transition by TGFβ-1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21548-e21552.
- [11] Tellez CS, Juri DE, Do K, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells[J]. Cancer Res, 2011, 71(8): 3087-3097.
- [12] Kim SH, Kim JM, Shin MH, et al. Correlation of epithelial-mesenchymal transition markers with clinicopathologic parameters in adenocarcinomas and squamous cell carcinoma of the lung[J]. Histol Histopathol, 2012, 27(5): 581-591.
- [13] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24): 8686-8698.
- [14] Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, et al. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 105(9): 1338-1341.
- [15] Kim JH, Jang YS, Eom KS, et al. Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(5): 898-904.
- [16] Chung JH, Rho JK, Xu X, et al. Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs[J]. Lung Cancer, 2011, 73(2): 176-182.

(收稿日期: 2012-06-28)

Y 染色体微缺失检测及临床应用

丑广程, 李铁民 综述, 陈占良 审校(河北大学附属医院检验科, 河北保定 071000)

【关键词】 无精子症因子; Y 染色体微缺失; 无精子症

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 21. 038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)21-2727-03

无精子症因子(AZF)是由 Tiepolo 等在 1976 年首先提出, 他们认为 AZF 是存在于 Y 染色体长臂控制精子生成的基因位点。以后又有大量研究证实, 在染色体 Yq11. 23 上存在着精子生成控制的基因, Y 染色体长臂第 5、6 号区间内至少存在 4 个互不重叠的区域与精子生成有关, 即 AZFa、AZFb、AZFc 和 AZFd 等^[1], 每个区域内又包含若干 AZF 候选基因, 如 DF-
FRY/USP9Y、DBY(AZFa)、RBM1Y(AZFb)、DAZ(AZFc)等。以上基因的缺失或异常可能导致精子生成异常。随着分子生物学检测技术的发展和普及, 给 Y 染色体微缺失的检测提供了良好的技术条件, 我国在 Y 染色体微缺失方面的研究也越来越多, 辅助生育技术也在逐渐开展, 本文就相关内容综述如下。

1 Y 染色体微缺失的特点

1.1 Y 染色体微缺失的临床表现 AZF 微缺失的类型随精子生成障碍类型不同而不同。曾有研究发现, AZFa 缺失患者表现为唯支持细胞综合征^[2]; AZFb 缺失患者表现为精子成熟障碍, 主要停滞在精母细胞阶段^[3]; AZFc 缺失是临床上最常见的 AZF 缺失类型, 患者临床表现为少精子症。以后进一步临床研究发现, 唯支持细胞综合征患者也可存在 AZFb 与

AZFc 的缺失^[4]。不同的研究结果提示, AZFa、AZFb 和 AZFc 3 个区同时缺失者 100% 表现为无精子症; AZFa 完全缺失或 AZFb 与 AZFc 2 个区同时缺失者 96% 为无精子症^[3, 5-7]。

1.2 Y 染色体微缺失的发生频率 统计国外文献 Y 染色体缺失率为 1%~55%^[8], 数据相差很大。Vogt^[9]统计了 1992~1997 年发表的 10 余篇文献, 发现 Y 染色体微缺失的平均发生率约为 10%。Simoni 等^[10]统计了 1995~1997 年发表的相关文献, 发现男性不育者 Y 染色体微缺失率约为 7.3%, 其中无精子症患者占 66%, 少精子症、精子计数正常者分别占 28% 和 6%。国内学者也做了 Y 染色体微缺失研究, 如郑红云等^[11]检测了 200 例男性不育患者样本, 发现 AZF 总缺失率为 3.5%, 单纯 AZFc 缺失率为 1%, 单纯 AZFb 缺失率为 1.5%, 单纯 AZFa 缺失率为 1%, 未发现 2 个区以上联合缺失。叶长烂等^[12]报道 151 例无精少精患者中总 Y 染色体微缺失率为 5.3%。其中 25 例无精子症不育者 AZF 缺失率为 12%, 均为 AZFc 整体缺失 (SY242、SY254、SY255 及 SY239 全部缺失) 及 AZFd 部分缺失 (SY152 缺失); 126 例少精子症不育者, AZF 缺失率为 4.0%, 其中 4 例为 AZFc 整体缺失 (SY242、SY254、SY255 及 SY239 全部缺失) 及 AZFd 部分缺失 (SY152

缺失),另外 1 例为 AZFb 部分缺失(SY143 缺失)及 AZFd 部分缺失(SY152 缺失)。慕明涛等^[13]检测 62 例原发无精子症与少精子症患者,AZF 微缺失的总发生率为 20.97%,其中无精子症 AZF 缺失率为 22.5%,少精子症 AZF 缺失率为 18.18%,其中 AZFa 缺失率为 3.23%,AZFb 缺失率 3.23%,AZFc 缺失率 17.74%。无精子症的缺失在 AZFa、AZFb 及 AZFc 区内均有发生,少精子症的缺失主要发生在 AZFc 区,未见 AZFa 和 AZFb 区缺失。通观上述研究结果发现,AZF 的缺失率在 AZFa、AZFb 及 AZFc 区内发生率不尽相同,造成原因可能与实验对象的选择标准、遗传背景和环境差异、实验中的序列标签位点(STSs)标记位点的选择差异、检测技术及方法等有关。还有的文献提出,AZF 总缺失率和各区缺失率与种族、患者生活区域有关,还需各临床实验室做大量的研究加以揭示。

涂向东等^[14]筛查了 91 例 Y 染色体微缺失者的男性直系亲属,其中 5 例存在 AZFc 的微缺失会出现由父代遗传给子代的现象,提示 Y 染色体微缺失患者的精子生成随时间不同而出现不同的变化。因此,通过检测明确少精子症患者 AZF 缺失的基因型,及时检测其精子质量尤其是精子数量动态变化,采集患者精子进行贮存以备后用,是对患者十分有利的措施。

2 Y 染色体微缺失检测

2.1 多重聚合酶链反应电泳法 该法为当前临床实验室 Y 染色体微缺失检测最常用方法,其具有灵敏度高、特异性强、方法简单、检测速度快且经济的特点,国内已有多家生产厂家生产成品试剂盒。

2.2 探针检测法 采用特异探针进行 AZF 微缺失检测由于过于繁琐,临床实验室很难达到设备和技术要求,故多用于科学研究。

2.3 基因芯片检测法 已有文献报道采用基因芯片技术检测 AZF 的方法^[15],该方法已建立了液态芯片检测技术,可用于 AZF 的快速检测,可同时检测多个热点基因,但是其检测成本较高,临床推广速度较慢。

2.4 毛细管电泳检测法 Bor 等^[16]采用毛细管电泳技术对 AZF 进行检测,具有灵敏度高、检测速度快、高通量及加样量少的优点,但该方法需要专门的毛细管电泳仪,临床实验室采用此方法的较少。

3 Y 染色体微缺失检测的临床意义

3.1 通过对男性不育者进行 Y 染色体微缺失筛查,可指导临床诊断和选择治疗方案 男性不育的发生原因众多,其中隐睾、精索静脉曲张、泌尿生殖系统感染、内分泌紊乱、异常免疫反应等情况目前通过手术治疗或药物治可得到较好疗效;遗传缺陷引起的精子生成障碍,药物治疗无效。有研究结果显示,由精索静脉曲张、隐睾等原因导致的男性不育者中 AZF 微缺失存在一定的检出率,在未明确此类患者是否合并遗传缺陷的情况下,常规治疗措施可能较难达到预期治疗效果^[17]。所以对男性不育者进行 Y 染色体微缺失筛查,明确精子生成障碍原因,是十分必要的。

3.2 实施单精子细胞质内注射术(ICSI)前的必要检查 ICSI 是目前临床对无精子症和严重少精子症男性不育者较为有效的治疗方法。单精子注射术所需精子可取自精液中的少量精子或通过睾丸细针穿刺术及经皮附睾穿刺抽吸取精术获得的少量精子^[18]。由于不能通过正常受精时的自然选择,注入卵细胞的精子可能携带 Y 染色体遗传缺陷,而此基因缺陷很可能会遗传给男性子代。携带 Y 染色体微缺失遗传缺陷的精

子,其胚胎种植率与正常精子并无差别,通过胚胎植入前遗传学诊断技术筛查其是否为缺陷胚胎,进而选择无此遗传缺陷的女性胚胎即可避免 Y 染色体微缺失传到下一代。有资料显示,AZFa 或 AZFb 完全缺失者,通过睾丸穿刺获得精子的可能性几乎为 0,基本没必要进行睾丸穿刺术获取精子^[7];部分 AZFc 缺失的无精子者,通过睾丸穿刺术有可能获得少量精子。睾丸穿刺取精对患者睾丸造成不同程度的损伤,为了减少患者穿刺取精时的痛苦和成功率,有必要在对睾丸取精前进行 Y 染色体微缺失的检测。

4 问题及展望

Y 染色体存在 STSs,AZF 的 STSs 图谱已更新过多次。STSs 存在不同地区、不同种族间的差异。另外,不同实验室选用的 STSs 不同,导致 AZF 缺失的检出率存在较大差异。如 Y 染色体大致完整,AZF 缺失并非绝对不育,但可引起严重的精子生成障碍。随着我国男性不育者就诊率的不断升高,辅助生殖技术开展广泛,Y 染色体微缺失的检测在临床上的应用越来越重要。但目前临床的相关研究比较少,所以只有在不同地区,采用多方法和检测大量样本才能进一步揭示不同基因型的临床特征,发现 AZF 基因缺失在地域、种族间的差异。

参考文献

- [1] Kent-First M, Muallem A, Shultz J, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53(1): 27-41.
- [2] Sadeghi-Nejad H, Oates RD. The Y chromosome and male infertility[J]. *Curr Opin Urol*, 2008, 18(6): 628-632.
- [3] Ferlin A, Moro E, Rossi A, et al. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men[J]. *J Med Genet*, 2003, 40(1): 18-22.
- [4] Pandey LK, Pandey S, Gupta J, et al. Loss of the AZFc region due to a human Y-chromosome microdeletion in infertile male patients[J]. *Genet Mol Res*, 2010, 9(2): 1267-1273.
- [5] 蔡志明. Y 染色体及其微缺失与男性不育:过去、现在与将来[J]. *中华男科学*, 2010, 16(5): 387-394.
- [6] Mirfakhraie R, Mirzajani F, Kalantar SM, et al. High prevalence of AZFb microdeletion in Iranian patients with idiopathic non-obstructive azoospermia[J]. *Indian J Med Res*, 2010, 132: 265-270.
- [7] 丛学文,涂向东,严爱贞,等. 精子生成障碍患者 Y 染色体 AZFc 区部分缺失分析[J]. *中华男科学*, 2010, 16(7): 594-598.
- [8] Shimizu A, Ichikawa T, Suzuki N, et al. Microdeletions in the Y chromosome of patients with idiopathic azoospermia[J]. *Asian J Androl*, 2002, 4(2): 111-115.
- [9] Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update[J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(8): 739-744.
- [10] Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions[J]. *Int J Androl*, 1999, 22(5): 292-299.

[11] 郑红云,李艳,童永清,等. 200 例男性不育患者的 Y 染色体微缺失检测[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(7):42-43.

[12] 叶长烂,江悦华,王捷,等. Y 染色体微缺失与男性无精少精的相关关系[J]. 中国实验诊断学,2010,14(4):566-568.

[13] 慕明涛,霍满鹏,张静,等. 男性不育患者无精子因子微缺失的检测意义[J]. 医药论坛杂志,2011,32(2):4-5.

[14] 涂向东,谢飞,张宝珍,等. 男性生精障碍的细胞遗传学和分子遗传学检测[J]. 中国男科学杂志,2006,20(1):28-31.

[15] 邵晨,杨波,王禾,等. 基因芯片技术在 COX10 等无精症患者相关基因的分析[J]. 西安交通大学学报:医学版,

2003,24(4):345-347.

[16] Bor P, Hindkjaer J, Kolvraa S, et al. A new approach for screening for Y microdeletions: capillary electrophoresis combined with flu. htmlrescent multiplex PCR[J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(1): 46-51.

[17] Kunej T, ZornB, Peterlin B. Y chromosome microdeletions in infertile men with cryptorchidism [J]. Fertil Steril, 2003, 79: 1559-1565.

[18] 刘海宁, 汤秀明, 李强, 等. 卵母细胞浆内单精子显微注射治疗男性不育的效果[J]. 齐鲁医学杂志, 2005, 20(1): 31-32.

(收稿日期:2012-06-26)

食管癌组织和外周血 miRNA 检测技术及其应用的研究进展

史 菊¹综述, 缪竞诚², 顾国浩³审校 (1. 江苏省宿迁市泗洪县人民医院检验科 223900; 2. 苏州大学, 江苏苏州 215000; 3. 苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215000)

【关键词】 miRNA 检测技术; 食管癌; 外周血
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 21. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)21-2729-03

食管癌是人类常见的八大肿瘤之一^[1], 全世界每年约有 30 万人死于食管癌^[2], 其中 70% 发生在我国。食管癌起病隐匿, 大部分患者就诊时已是中晚期, 此时实施外科手术的 5 年存活率仅为 20%~30%^[3]。如何提高食管癌的早期诊断, 尽早治疗对提高食管癌患者生存率具有重要意义。目前用于食管癌筛查的首选方法是胃镜组织活检, 但是组织活检可能会导致肿瘤扩散, 且胃镜检查患者痛苦, 不能被无症状者接受^[1], 需要寻找一种无创性方法来替代。MicroRNA(miRNA) 是一类高度保守的内源性单链非编码 RNA, 通过与靶基因 3' 端非编码区发生不完全配对, 从而调节靶基因 mRNA 翻译、转录过程^[4-5], 参与转录后基因表达调控。microRNA 在组织、细胞、外周血中的表达有显著的肿瘤相关性、组织特异性和表达稳定性^[6-7], 作为致癌基因或抑癌基因参与肿瘤的发生、发展, 有望成为新的生物标志物。近年来, miRNA 是全世界学者研究的热点。现就食管癌组织和外周血 miRNA 检测技术及其应用的研究进展综述如下。

1 食管癌组织 miRNA 检测技术及其应用

Feber 等^[8]对食管癌手术时切取的冰冻保存的标本进行 miRNA 检测分析, 其中包括: 鳞癌 10 例、腺癌 10 例、正常上皮 9 例、Barrette 食管 5 例、高度不典型 1 例。他们先用 miRNA 提取试剂 (Ambion Inc, Austin, Tex) 提取总 RNA, 用分光光度计测量, 以作为质量控制, 然后用小 RNA 探针微阵列技术检测 miRNA。结果显示, 正常上皮样本 miRNA 接近于鳞癌样本, 而 Barrette 食管更接近于腺癌。Barrette 食管与食管腺癌 miRNA 表达谱接近, 证明了 Barrette 食管可能是食管腺癌的癌前病变, miRNA 可作为 Barrette 食管进展为食管腺癌的监测。各组织类型标本 miRNA 结果两两比较发现: (1) mir-203、mir-205 在食管肿瘤组织中低表达, 而 mir-21 高表达, 提示 miRNA 可以用于区分食管肿瘤组织与正常组织。(2) 食管鳞癌与食管腺癌 miRNA 的表达谱不同, 提示 miRNA 可用来预测食管癌的组织类型。Kan 等^[9]用微阵列芯片法研究发现, 食

管癌组织 mir-106b-25 有异常表达, 并用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 证实其存在。后来, 他们将 miR-106b-25 导入到人工培养的食管癌细胞株 OE33 中, 进一步研究发现, miR-106b-25 多顺反子具有促进细胞增殖和抗凋亡的作用, 在 Barrette 食管进展到食管腺癌的过程中通过激活 p21 和 Bim 2 个靶基因促进细胞癌变^[10]。至此, 人们对食管癌组织 miRNA 的研究提高到了靶基因的层面。此试验中利用了基因芯片技术、RT-PCR 技术和细胞信号转导技术。基因芯片可以直接测定一份标本的多种 miRNA, 但是此方法背景和杂信号干扰大, 重复性差, 不能区分差异小的 miRNA, 常被用于食管癌 miRNA 的筛选。RT-PCR 技术通过实时监测目标 miRNA 转录基因的扩增产物来推算目标基因的量, 灵敏度高, 精确度高, 但是多了转录步骤, 程序略复杂, 一次只能测定一种目标基因, 常被用于食管癌 miRNA 的确证实验。这两种方法都是检测 miRNA 的常用方法, 由于 RT-PCR 价格便宜, 精确度高, 被越来越多的研究者采用。细胞信号转导以细胞感受、转导机体内环境信息的分子通路、生物个体发育过程中调节基因表达和代谢生理反应等为其研究内容。细胞信号转导技术后来也成为研究食管癌 miRNA 功能的主要方法。Hiyoshi 等^[11]用 RT-PCR TaqMan 探针和原位杂交技术研究发现, mir-21 与食管鳞癌细胞程序性细胞死亡基因 4 呈负相关。mir-21 可能成为食管鳞癌治疗的新靶点。至此, 食管癌 miRNA 的研究进入治疗靶点的探索。本试验中用到的 TaqMan 荧光探针是一种寡核苷酸探针, 荧光基团连接在探针的 5' 末端, 而淬灭剂则在 3' 末端, 自身不发光, 当与靶基因结合后, 淬灭基团失活, 则发出荧光。原位杂交技术是经典的研究 miRNA 的方法, 可直观了解食管癌 miRNA 表达方式。近年来, miRNA 的检测技术也得到了迅猛发展, 出现了一大批高通量、高科技技术。xMAP 液态芯片技术是高通量检测技术的新亮点, 它采用了 DNA-RNA 嵌合探针, 该嵌合探针中, RNA 碱基序列部分与靶 miRNA 相互补, DNA 碱基序列部分与微球上的捕捉序列相互补, 形成微