

Y 染色体无精子症因子微缺失的筛查与临床探讨

欧妙玲, 陈志华, 刘丽雅, 朱晓丹 (广东省佛山市妇幼保健院检验科 528000)

【摘要】 目的 筛查男性不育患者 Y 染色体无精子症因子(AZF)微缺失发生率,并分析缺失类型与临床表型的关系。**方法** 选取 2013 年 1~12 月于佛山市妇幼保健院男科就诊的男性不育症患者 200 例,其中非梗阻性无精子症 141 例,重度少精子症 59 例;另选取 100 例正常孕育男性作为阳性对照;100 例正常孕育女性作为阴性对照。采用聚合酶链反应分析男性 Y 染色体 AZF 微缺失。**结果** 特发性不育组 AZF 微缺失率显著高于非特发性不育组,差异有统计学意义($P<0.05$)。在所有 AZF 微缺失类型中以 AZFc 最常见,占 55.6%;非梗阻性无精子症组与重度少精子症组微缺失率及微缺失类型分布情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** Y 染色体 AZFa、AZFb、AZFc 区微缺失与男性不育具有密切的相关性。

【关键词】 男性不育症; Y 染色体; 无精子症因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.031 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)03-0365-03

Screening and clinical phenotype explore of Y chromosome microdeletions of azoospermia factor in male infertility patients OU Miao-ling, CHEN Zhi-hua, LIU Li-ya, ZHU Xiao-dan (Department of Clinical Laboratory, Maternal and Children Health Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 528000, China)

【Abstract】 Objective To investigate incidence of Y chromosome microdeletions of azoospermia factor (AZF) in male infertility patients, and to analyze the relationship between types of gene deletion and clinical phenotype. **Methods** A total of 200 cases of patients with male infertility were recruited in this study from January to December 2013, including 141 cases with non-obstructive azoospermia and 59 cases with severe oligozoospermia. Another 100 healthy males were enrolled as positive control group, and 100 healthy females were enrolled as negative control group. Male Y chromosome AZF microdeletions were analyzed by using polymerase chain reaction method. **Results** The incidence of AZF microdeletions of idiopathic infertility group was significantly higher than that of non-idiopathic infertility group ($P<0.05$). In all types of AZF microdeletions, AZFc was the most common type, accounting for 55.6%. No significant differences of AZF microdeletions incidence and distribution of types of AZF microdeletions were found between non-obstructive azoospermia group and severe oligozoospermia group ($P>0.05$). **Conclusion** Y chromosome AZFa, AZFb and AZFc microdeletion could be closely correlated to male infertility.

【Key words】 male infertility; Y chromosome; azoospermia factor

大约有 10%~15% 育龄夫妇存在不育情况,其中男性因素大约占了 50%,在男性不育中 30% 是因为遗传因素所导致。Tiepolo 等于 1976 年发现 Y 染色体长臂 q11 区与精子的生成相关,称之为无精子症因子(AZF)。之后学者进一步研究确定, AZF 包含 AZFa、AZFb、AZFc 3 个区域,而 AZF 的缺失与无精子或重度少精子的男性原发性不育具有相关性^[1]。聚合酶链反应(PCR)具有结果稳定、方法简便迅速及成本低等优点,其在男性不育症患者外周血 DNA 筛查 Y 染色体微缺失区间等方面逐渐得到推广应用^[2]。本研究对 200 例不育症患者 Y 染色体微缺失进行 PCR 筛查,分析筛查结果及缺失类型与临床表型的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 1~12 月于本院男科就诊的男性不育症患者 200 例,其中非梗阻性无精子症患者 141 例,重度少精子症患者 59 例。所有患者均具有正常的男性核型(46, XY),年龄 22~45 岁,平均(30.5±5.2)岁。另选择 100 例正常孕育男性作为阳性对照;选择 100 例正常孕育女性作为阴性对照,分析微缺失情况。根据患者是否存在其他睾丸异常、长

期服用棉籽油、腮腺炎病史、精索静脉曲张、输精管堵塞等,将 200 例患者分为特发性不育组和非特发性不育组,其中特发性不育组 96 例,非特发性不育组 104 例。

1.2 检测方法

1.2.1 提取外周血 DNA 采用全血细胞试剂盒进行提取,所有操作按照说明书进行;采用紫外分光光度计检测 DNA 浓度,提取后于-20℃保存。

1.2.2 PCR 扩增 采用多重 PCR 分析 AZFa 区(UsPgY 和 sY86)、AZFb 区(sY127 和 sY134)、AZFc 区(sY254 和 sY255)3 个区 6 个位点。内对照为 sry 基因,阳性对照为正常孕育男性,阴性对照为正常孕育女性,空白对照为去离子水。扩增条件:预变性 95℃ 10 min,变性 95℃ 30 s,退火 59℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,共进行 35 个循环,72℃ 充分延伸 5 min,4℃ 保存。

1.2.3 结果确认 电泳后检测扩增结果发现, AZF 缺失的样本对相应位点进行 3 次独立 PCR 扩增验证,如仍无目的基因扩增条带,则确定为该位点缺失。

1.3 结果分析 比较特发性不育组和非特发性不育组的缺失率,以及无精子症和严重少精子症患者的缺失类型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计学软件进行数据分析;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 特发性不育组和非特发性不育组 AZF 微缺失率比较 特发性不育组 AZF 微缺失率[14.6%(14/96)]显著高于非特发性不育组[3.8%(4/104)],两组差异有统计学意义($\chi^2=5.777, P<0.05$)。

表 1 AZF 微缺失类型与临床表型的关系[n(%)]

组别	n	AZF _a	AZF _b	AZF _c	AZF _{a-b}	AZF _{a-c}	AZF _{b-c}	AZF _{a-b-c}
非梗阻性无精子症	13	2(15.4)	1(7.7)	6(46.2)	1(7.7)	0(0.0)	2(15.4)	1(7.7)
严重少精子症	5	0(0.0)	0(0.0)	4(80.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(20.0)	0(0.0)
合计	18	2(11.1)	1(5.6)	10(55.6)	1(5.6)	0(0.0)	3(16.7)	1(5.6)

3 讨 论

全球不孕不育症的发生率约为 10%~15%,而男性因素大约占到一半。导致男性不育的主要原因包括内分泌紊乱、隐睾、精索静脉曲张、生殖炎症、免疫异常等。基因突变及染色体异常所导致的精子生成障碍在男性不育症发病中超过 30%,但是文献报道的无精子症患者染色体核型异常检出率约为 10.5%,主要为 47,XXY 核型异常。1996 年有学者研究发现,精子发生基因位于 Y 染色体长臂的 3 个区域,分别为 AZFa、AZFb、AZFc 区域,并提出每个亚区均与组织病理学相关。1976 年研究发现,Y 染色体长臂的缺失与精子生成障碍有关,并推测在 Yq11 上存在 Y 染色体精子生成相关基因,将此区域命名为“无精子症因子”。既往的研究主要通过染色体核型分析方法对 Y 染色体长臂的实际情况进行分析。1994 年报道了采用 PCR 对不育男性外周血 DNA Y 染色体微缺失区间进行筛查。由于 PCR 具有结果稳定、方法简便、成本低等优点,近年来多采用 PCR 进行研究^[3-4]。回顾国内外研究结果显示,受种族特异性、环境因素等影响,不同种族、不同地区、不同病种患者的微缺失发生率和发生区域不相同。

无精子症患者因不育而使 AZF 缺失较少发生代代相传,但是随着现代辅助生殖技术的发展,这样的 AZF 微缺失很可能通过人为因素而传给男性后代。通过对 Y 染色体上的 DNA 序列标记位点,对严重少精子症和无精子症患者进行 Y 染色体上的微缺失进行 PCR 筛查,对存在微缺失的患者通过胚胎植入前遗传学诊断,选择女性胚胎植入,可以避免该微缺失传给后代,有利于优生优育。同时,在分子水平上找到精子生成障碍的病因,可避免不必要的治疗,降低经济损失及治疗对患者造成的痛苦^[5]。

既往因 Y 染色体体积小,含有的基因少,通常认为 Y 染色体的作用就是区别性别。通过目前的研究,比较确定 AZFc 区的 daz 基因家族、AZFb 区的 rbmyi 基因家族、AZFa 区的 dbby、usp9y 基因家族与无精子症有关。关于 AZFc 区的 daz 基因家族的研究最早,daz 为多拷贝基因,编码的蛋白质特异性地在睾丸中表达,分布于晚期精细胞和精子的尾部^[6]。

本次研究采用 PCR 检测 Y 染色体的微缺失,选择 AZFa、AZFb、AZFc 区的缺失热点,琼脂糖凝胶电泳紫外线下观察片段的大小简便易行。在本研究中,伴有 AZF 微缺失的患者

2.2 AZF 微缺失类型与临床表型的关系 见表 1。非梗阻性无精子症 13 例患者发生微缺失,发生率为 9.2%(13/141),严重少精子症 5 例发生微缺失,发生率为 8.5%(5/59),两组微缺失发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在所有 AZF 微缺失类型中以 AZFc 最常见,占 55.6%(10/18)。两组微缺失类型分布情况比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.714, P>0.05$)。

此外周血染色体的核型正常。AZF 微缺失可导致精子生成决定基因缺乏,从而造成精子生成障碍。人类 Y 染色体 DNA 中存在高度的重复片段,在减数分裂过程中 95%不进行重组,基因的这种不稳定性导致基因材料具有较高的自发丢失率^[7]。在分析缺失片段的 DNA 序中发现,产生缺失的断裂点多位于顺向重复序列内。还有学者认为,Y 染色体发生微缺失的机制主要是 Y 染色体在精子发生过程中,胚细胞的快速分裂与卵子发生过程相比具有更多的突变机会,但又不能像常染色体一样进行 DNA 修复,且 Y 染色体基因为单倍体,一个基因缺失就可发生相应的效应。也有学者认为,Y 染色体微缺失不依赖于 Y 染色体出现的背景,是一种随机事件。卵细胞胞浆内单精子注射技术的发展为男性不育症的治疗带来了福音,但是其缺点是可能将遗传缺陷遗传给下一代^[8-11]。

近年来研究结果显示,不育男性微缺失的发生率差异很大,在 1%~55%之间。一方面,这可能与研究设计是否规范,阳性、阴性及空白对照是否合适等有关。本研究对扩增产物存在缺失的患者进行了 3 次重复的单一引物 PCR,从而确保检验结果的可靠性。另一方面,所选研究对象的标准和数量不同也会对发生率产生影响。男性不育的原因除了遗传因素外,还存在比如炎症、精索静脉曲张、隐睾等其他原因。本研究中 200 例患者共有 18 例发生微因子缺乏,占 9.0%,其中无精子症患者微因子缺失的发生率为 9.2%,严重少精子症患者为 8.5%,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。此外,选取的序列标记位点(STS)的标记位置、密度不同也会影响检测结果。有学者认为,无精子症和严重少精子症患者的 Y 染色体微缺失发生率与选择的 STS 数量的多少无显著相关性。也就是说,所选择的 STS 位点数量与检验结果关系不大,而主要需选择已知的、男性不育患者特异缺失的非多态性位点,同时位于功能候选基因的 DNA 序列内。本研究对 6 个缺失的热点位点进行研究,结果显示 AZFc 区最多,占 55.6%。

通过对 Y 染色体微缺失的研究确立 Y 染色体微缺失基因型与临床表型的关系,对指导临床实践具有重要意义。精子的发生经过“精原细胞-初级精母细胞-次级精母细胞-精子细胞-精子”的过程,其发生过程中有许多睾丸特异性的基因表达,从而产生相关酶类或蛋白分子,对精子的发生进行调控。目前,原癌基因和无精子症因子基因对精子发生调控作用的研究较

为肯定。Yq11 上存在 AZFa、AZFb 及 AZFc 精子发生相关的位点,它们在男性生殖细胞发育的不同时期发挥作用。AZFa 区缺失导致精子阻滞发生在青春期前阶段,主要表现为唯塞尔托利细胞综合征(SCOS)和小睾丸。AZFb 区缺失导致精子阻滞发生在青春期减数分裂前、后或者减数分裂期间,初级精母细胞阶段。AZFc 区缺失可表现为 SCOS、单个精母细胞、单个成熟精子及少精子症等。AZFc 区缺失的患者,对睾丸进行多点活检,有可能发现隐含的具有正常精子的生精小岛,进行冷冻可行睾丸精子吸取术。有研究发现,AZFc 缺失的少精子症患者,部分可发展为无精子症,因此,对这类患者应尽早给予治疗,或者将精液冷冻保存。

特发性不育也称原因不明性不育,指应用现有的诊断手段不能找出不育病因的一种类型,多与遗传缺陷、基因突变、染色体异常等导致精子发生障碍有关。本研究中特发性不育患者的 AZF 微缺失率显著高于非特发性不育患者,由此证实遗传缺陷是特发性不育的主要病因之一。但是,也有 3.8% 的非特发性不育患者存在 AZF 微缺失,说明此类患者也存在 AZF 微缺失的情况。

综上所述,Y 染色体 AZFa、AZFb、AZFc 区微缺失与男性不育有密切的相关性。本研究共纳入 6 个基因位点,表明 AZF 区域与不育症患者无精子之间存在相关性。但因样本量及所选基因位点数量的局限,需要增加样本量及研究位点进行进一步研究。

参考文献

[1] Rozen S,Skaletsky H,Marszalek JD,et al. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes[J]. *Nature*,2003,423(6942):873-876.

(上接第 364 页)

不良反应为血细胞减少、恶心呕吐、肌肉关节酸痛,患者均能耐受,未发生严重的心脏及肝肾功能损害。与热疗相关的主要不良反应为局部皮肤灼伤及脂肪硬结,患者均可耐受。在整个治疗过程中没有发生严重的不良事件。

综上所述,热疗联合周剂量多西紫杉醇能明显提高晚期 NSCLC 的疗效,且不良反应无明显增加,安全性高,适合年龄较大、耐受性差的晚期肺癌患者。同时结合肺癌相关肿瘤标志物的动态变化可以判断治疗疗效及预后。

参考文献

[1] Hurria A,Kris MG. Management of lung cancer in older adults[J]. *CA Cancer J Clin*,2003,53(6):325-341.
[2] 刘宝瑞,钱晓萍. 肿瘤热化疗的基础与临床研究进展[J]. 国外医学:肿瘤学分册,2004,31(1):34-37.
[3] 孙燕,赵平. 临床肿瘤学进展[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005:274-286.
[4] Hainworth JD,Burris H,Lithey S,et al. Weekly docetaxel in the treatment of elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: a Minnie Pear Cancer Research Network Phase II trial[J]. *Cancer*,2000,89(2):328-333.

[2] 叶峻杰,阎慧,李宗芳,等. 应用改良多重 PCR 筛查不育症患者 Y 染色体无精子症因子微缺失[J]. *中华检验医学杂志*,2010,33(2):111-114.
[3] 史铁超,崔英霞,魏莉,等. 不育男性无精子症因子微缺失的分子与临床特征:5 年研究回顾[J]. *中华男科学杂志*,2010,16(4):314-319.
[4] 刘思瑶. 液态基因芯片技术的建立及其在 Y 染色体微缺失检测中的应用[D]. 成都:四川大学,2007.
[5] 胡兰萍. Y 染色体微缺失与特发性无精子症、严重少精子症的相关性研究[D]. 长沙:中南大学,2006.
[6] Vogt PH. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence[J]. *Hum Reprod Update*,2005,11(4):319-336.
[7] Ferlin A,Arredi B,Speltra E,et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men:a 10-year experience in Italy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2007,92(3):762-770.
[8] 刘景,王兴玲,孙丽君,等. 短时受精联合早期补救 ICSI 与非补救 ICSI 治疗结局比较[J]. *中国男科学杂志*,2013,28(11):35-38.
[9] 孙林,罗海娇,鄢磊,等. IVF/ICSI-ET 技术中单卵双胞胎的发生及其相关因素[J]. *生殖与避孕*,2014,34(1):27-35.
[10] 李静越,张建伟. 中国大陆 IVF/ICSI 子代出生情况研究现状[J]. *吉林医学*,2013,33(34):7240-7242.
[11] 杨晓玉,张燕,孙雪萍,等. 精子染色质结构分析预测夫精宫腔内人工授精结局的临床研究[J]. *中华男科学杂志*,2011,17(11):977-983.

(收稿日期:2014-08-15 修回日期:2014-10-05)

[5] 邓文英,李苏宜. 射频透热增敏肿瘤化疗机制的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*,2006,11(8):636-638.
[6] Kim H,Rafiuddin-Shah M,Tu HC,et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies[J]. *Nat Cell Biol*,2006,8(12):1348-1358.
[7] 阮新建,刘畅,刘兵,等. 化疗联合射频热疗治疗晚期大肠癌的临床观察[J]. *实用癌症杂志*,2011,26(2):178-180.
[8] 俞宏伟,张广杰,艾冬梅,等. 热化疗对晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. *河北医药*,2012,34(20):3123-3124.
[9] Othman T,Goto S,Lee JB,et al. Hyperthermic enhancement of the apoptotic and antiproliferative activities of paclitaxel[J]. *Pharmacology*,2001,62(4):208-212.
[10] 殷旭东,袁昕,童建东,等. 周剂量多西紫杉醇单药治疗晚期老年性非小细胞肺癌[J]. *临床肿瘤学杂志*,2007,12(10):757-758.
[11] 郭俊召,刘文超,张红梅. 全身热疗联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌 meta 分析[J]. *现代肿瘤医学*,2013,21(11):2461-2463.

(收稿日期:2014-07-09 修回日期:2014-10-20)