

Y染色体微缺失检测对男性不育的临床价值研究

张燕, 索峰, 顾灵山, 王亿, 孙成才, 王传霞, 顾茂胜

(徐州市妇幼保健院遗传医学中心, 江苏徐州 221000)

摘要:目的 探讨Y染色体无精子症因子(azoospermia factor AZF)基因微缺失检测对男性不育的临床诊疗价值。方法 选取2016年11月~2019年7月于徐州市妇幼保健院就诊的509例男性不育患者,依据临床诊断类型分为初诊为不育组(369例)、精子状态异常组(117例)和睾丸发育异常组(23例)。采用多重PCR技术进行Y染色体微缺失检测。结果 509例患者中检出Y染色体微缺失24例,检出率4.72%(24/509)。其中初诊为不育组11例,精子状态异常组9例和睾丸发育异常组4例,三组数据差异均具有统计学意义($\chi^2 = 13.004, P = 0.002$)。24例AZF基因微缺失患者中初诊为不育组检出AZFc区缺失10例, AZFbc区缺失1例;精子状态异常组检出AZFc区缺失7例, AZFbc区及AZFb区缺失各1例;睾丸发育异常组检出AZFc区缺失1例, AZFbc区缺失3例。三组数据差异具有统计学意义($\chi^2 = 15.093, P = 0.020$)。结论 Y染色体微缺失的检出有助于尽快明确部分男性不育的根本原因,从而指导临床制定出更加合理有效的诊疗方案。

关键词: Y染色体微缺失;男性不育;临床价值;无精子症因子

中图分类号: R698.2; R446.7 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2020)01-040-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.011

Study on the Clinical Value of Y Chromosome Microdeletion Detection in Male Infertility

ZHANG Yan, SUO Feng, GOU Ling-shan, WANG Yi, SUN Cheng-cai, WANG Chuan-xia, GU Mao-sheng

(Genetic Medicine Center, Xuzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Jiangsu Xuzhou 221000, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical value of Y chromosome AZF gene microdeletion detection for male infertility. **Methods** 509 cases of male infertility patients admitted to Xuzhou Maternal and Child Health Care Hospital from November 2016 to July 2019 were selected. According to clinical diagnosis types, and they were divided into three groups: initially diagnosed as infertility group (369 cases), sperm state abnormality group (117 cases) and testicular dysplasia group (23 cases). Multiple PCR was used to detect Y chromosome microdeletion. **Results** Y chromosome microdeletion was detected in 24 of 509 patients, with a detection rate of 4.72% (24/509). Among them, 11 cases were initially diagnosed as infertility group, 9 cases were diagnosed as sperm state abnormality group and 4 cases were diagnosed as testicular dysplasia group. The data differences between the three groups were statistically significant ($\chi^2 = 13.004, P = 0.002$). Among the 24 cases of AZF gene microdeletion, 10 cases of AZFc region deletion and 1 case of AZFbc regions deletion were detected in the initially diagnosed as infertility group. AZFc region deletion was detected in 7 cases, AZFbc regions deletion and AZFb region deletion in 1 case each. AZFc region deletion was detected in 1 case and AZFbc regions deletion was detected in 3 cases in the testicular dysplasia group. The differences between the three groups were statistically significant ($\chi^2 = 15.093, P = 0.020$). **Conclusion** The detection of Y chromosome microdeletion will help to identify the root cause of some male infertility as soon as possible, so as to guide the clinical work out a more reasonable and effective diagnosis and treatment plan.

Keywords: Y chromosome microdeletion; male infertility; clinical value; azoospermia factor

欧洲泌尿科学会(EAU)男性不育指南^[1]中指出男性因素在致使育龄夫妇不孕不育的因素中约占45%~50%,且根据近年的研究发现,约有50%的男性不育皆因遗传缺陷^[2]所致。Y染色体长臂上存在

着与精子生成相关的基因,称为无精子症因子(Azoospermia factor, AZF),主要包括AZFa, AZFb以及AZFc三个区域^[3],这三个区域相互独立,互不干扰,任何一个区域的微缺失都将导致精子生成障碍,

基金项目:江苏省妇幼保健重点学科(FXK201753);江苏省妇幼健康科研课题(F201819);徐州市科技计划项目(KC18175; KC18027)。

作者简介:张燕(1990-),女,本科,技师,从事分子遗传学筛查及诊断工作, E-mail: zhangyanx2014@163.com。

通讯作者:顾茂胜(1968-),男,本科,主任技师, E-mail: gumaosheng2007@126.com。

进而影响男性生育能力,其发生率在因精子生成障碍导致不育的因素中仅次于克氏综合征(klinefelter syndrome),位居第二。故本研究对509例男性不育患者采用多重PCR技术进行Y染色体微缺失检测,探讨其对男性不育的临床诊疗价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2016年11月~2019年7月于徐州市妇幼保健院就诊的509例男性不育患者,年龄17~52岁,平均年龄 33.2 ± 5.9 岁,其中包括初诊为不孕不育患者369例,已确诊为不同程度精子状态异常(包括少、弱、畸、死、无精子)患者117例,确诊为睾丸发育异常(包括不发育和发育不良)患者23例,所有入选患者均已排除生殖道感染、精索静脉曲张、输精管缺如等其他男性生殖系统疾病。采用真空采血管采集患者静脉全血2ml(EDTA抗凝)。

1.2 试剂和仪器 厦门致善生物科技股份有限公司生产的Lab-Aid 824核酸提取仪及其配套生产的Lab-Aid 824核酸提取Mini试剂,上海透景生命科技股份有限公司生产的SLAN 965实时荧光定量PCR仪及Y染色体微缺失检测试剂盒(PCR荧光探针法)。

1.3 方法

1.3.1 全血DNA提取:提取样本基因组DNA($\text{ng}/\mu\text{l}$),操作步骤按照试剂说明书进行。

1.3.2 Y染色体微缺失基因检测

1.3.2.1 PCR反应体系:检测Y染色体AZF区3对序列标签位点,包括AZFa(sY84,sY86),AZFb(sY127,sY134),AZFc(sY255,sY254),以及1对内对照位点SRY,ZFX/ZFY,每对位点对应探针依次用四种不同荧光染料(VIC,ROX,Cy5,FAM)标记。每个样本做A,B两组试验,A组检测位点为SRY,sY84,sY127,sY255;B组检

测位点为ZFX/ZFY,sY86,sY134,sY254。操作步骤按照试剂说明书进行。

1.3.2.2 PCR反应程序:第一阶段: 50°C 2min,1个循环;第二阶段: 95°C 5min,1个循环;第三阶段: 95°C 15s, 60°C 30s, 72°C 30s,38个循环,每个循环 60°C 时收集FAM/VIC/ROX/Cy5信号,并保存相关文件;第四阶段: 72°C 5min,1个循环。

1.3.3 结果判读:若扩增曲线出现相应典型S型曲线且Ct值小于32,则说明检测区域不存在基因缺失,反之,则存在缺失。

1.4 统计学分析 采用SPSS17.0统计软件进行分析,采用行 \times 列表资料 χ^2 检验。取 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AZF微缺失结果分析 见表1。509例患者检出Y染色体缺失24例,检出率4.72%。三组数据差异具有统计学意义($\chi^2 = 13.004, P = 0.002$)。

表1 509例不育患者AZF微缺失发生率

组别	微缺失	正常	合计	缺失率(%)
初诊为不孕不育	11	358	369	2.98
精子状态异常	9	108	117	7.69
睾丸发育异常	4	19	23	17.39

2.2 AZF基因不同区域微缺失结果分析 见表2。24例Y染色体微缺失样本中,检出AZFc微缺失18例,检出率最高(75%),其次为AZFabc三区同时缺失,AZFbabc两区同时缺失及AZFb缺失检出率最低且相等。三组数据之间的差异具有统计学意义($\chi^2 = 15.093, P = 0.020$)。

表2 24例AZF基因微缺失不同缺失区域发生率[n(%)]

组别	AZFc	AZFabc	AZFbabc	AZFb	合计
初诊为不育	10(90.91)	1(9.09)	0(0)	0(0)	11(100)
精子状态异常	7(77.78)	0(0)	1(11.11)	1(11.11)	9(100)
睾丸发育异常	1(25.00)	3(75.00)	0(0)	0(0)	4(100)
合计	18(75.00)	4(16.66)	1(4.17)	1(4.17)	24(100)

3 讨论

Y染色体是人类46条染色体中最短小的染色体,存在着大量的重复序列和回文序列,这两种序列的存在使得Y染色体很容易发生缺失。当缺失发生在AZF区域时,就有可能造成男性不育。根据文献报道发现,国内不同地区Y染色体微缺失发生率也不同,洛阳地区发生率为10.12%^[4],新疆地区发生率为6%^[5],贵州地区发生率为7.13%^[6],广东清远地区发生率为6.1%^[7],宁夏地区发生率为9%^[8]。本研究509例患者检出24例AZF微缺失,检出率4.72%,稍低于其他地方,这与不同种族、研究对象入选标准、临床诊断类型以及标本量多少有关。

AZFa,AZFb,AZFc三个区域对应五种缺失模式:AZFa,AZFb,AZFc,AZFbabc和AZFabc,本研究检出的24例微缺失中除AZFa缺失未检出外,其余缺失模式均被检出。其中AZFc缺失率最高(75%),与2013年版欧洲男科协会(EAA)Y染色体微缺失诊断指南^[9]中统计的AZFc缺失率($\sim 80\%$)接近;AZFabc三区同时缺失检出率为16.66%,远远高于指南中AZFabc的缺失率(0.5%~4%);AZFb和AZFbabc的缺失率均为4.17%,与指南中统计的缺失率(1~5%,1~3%)接近。

AZFa区的基因主导精母细胞增生,整个AZFa区的缺失表现为唯支持细胞综合症(sertoli cell only syndrome,SCOS),为绝对的无精子症,并伴有小睾丸

症状^[10]。本研究未发现仅 AZFa 区缺失,但 AZFbc 三区同时缺失检出 4 例。AZFb 区缺失的患者,生精阻碍在初级精母细胞阶段,没有精子生成。故患者只要检出包含 AZFa 和/或 AZFb 区的缺失都不建议做单精子胞浆内注射手术 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)^[11]。

AZFc 区缺失在临床上最常见,也是临床表现最为乐观的一种缺失。AZFc 区缺失的患者其精子数量从无到正常,并通常伴有形态及活力异常。有研究显示^[12],AZFc 区缺失的患者有一定的成功率可以通过 ICSI 来孕育后代,但这种缺失会遗传给男性后代^[13],故该类患者可行(孕前诊断 PGD)辅助生殖,选择生育女性后代。本研究中有大量患者初次检查均笼统诊断为不育,后期检查后未更新精子状态等具体不育病因,在后续研究中还需随访更新,对于提高小组检出率有很大帮助。

综上所述,Y 染色体 AZF 基因微缺失对于男性不育意义重大,通过检测可以帮助临床尽快明确部分男性不育的根本原因,从而指导临床制定出更加合理有效的辅助生殖诊疗方案,更好地造福于患者。

参考文献:

- [1] JUNGWIRTH A, GIWERCMAN A, TOURNAYE H, et al. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update [J]. *European Urology*, 2012, 62(2): 324-332.
- [2] 陈文杨, 沈丽霞, 张葵荣. 男性不育的遗传因素研究进展[J]. *神经药理学*, 2016, 6(5): 53-64.
CHEN Wenyang, SHEN Lixia, ZHANG Guirong. Progress in genetic factors for male infertility [J]. *Acta Neuroparmacologica*, 2016, 6(5): 53-64.
- [3] 何敏, 郭华, 张海祥, 等. 唐氏综合征高危孕妇血浆中游离胎儿 DNA 的 Y 染色体微缺失筛查[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(2): 39-41, 45.
HE Min, GUO Hua, ZHANG Haixiang, et al. Screening the Y chromosome microdeletion of free fetal DNA in plasma in maternal with High-risk down's syndrome [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(2): 39-41, 45.
- [4] 曹颖, 王亚男, 臧伟伟, 等. 洛阳地区 415 例男性不育症患者染色体核型及 Y 染色体微缺失分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27(6): 676-678.
CAO Ying, WANG Ya'nan, ZANG Weiwei, et al. Analysis of chromosome karyotype and Y chromosome microdeletion in 415 male infertility patients in Luoyang area [J]. *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 2019, 27(6): 676-678.
- [5] 潘晖, 刘晓贤, 张玲. 新疆地区男性不育患者 Y 染色体微缺失结果和临床遗传效应分析[J]. *医药论坛杂志*, 2018, 39(5): 21-23.
PAN Hui, LIU Xiaoxian, ZHANG Ling. Analysis of clinical genetic effects and results of Y chromosome microdeletion in infertile males [J]. *Journal of Medical Forum*, 2018, 39(5): 21-23.
- [6] 陈琨, 廖喆, 任凌雁, 等. 贵州地区 575 例男性不育症患者染色体核型分析及 Y 染色体 AZF 微缺失情况观察[J]. *山东医药*, 2017, 57(47): 42-44.
CHEN Kun, LIAO Zhe, REN Lingyan, et al. Chromosome karyotype analysis and observation of Y chromosome AZF microdeletion in 575 male infertility patients in Guizhou region [J]. *Shandong Medicine*, 2017, 57(47): 42-44.
- [7] 李付广. 197 例男性不育症患者染色体异常与 Y 染色体微缺失检测结果分析[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2018, 28(14): 14-16.
LI Fuguang. Analysis of detection results of chromosome abnormality and Y chromosome microdeletion in 197 male infertility patients [J]. *Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2018, 28(14): 14-16.
- [8] 师志云, 陈源昊琪, 于辛西, 等. 200 例无精症患者染色体核型分析及 Y 染色体 AZF 基因微缺失情况观察[J]. *山东医药*, 2018, 58(35): 70-72.
SHI Zhiyun, CHEN Yuanhaoqi, YU Xinyou, et al. Karyotype analysis and microdeletion of Y chromosome AZF gene in 200 patients with azoospermia [J]. *Shandong Medicine*, 2018, 58(35): 70-72.
- [9] KRAUSZ C, HOEFSLOOT L, SIMONI M, et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 [J]. *Andrology*, 2014, 2(1): 5-19.
- [10] KOTOV A A, OLENKINA O M, GODNEEVA B K, et al. Progress in understanding the molecular functions of DDX3Y (DBY) in male germ cell development and maintenance [J]. *Bioscience Trends*, 2017, 11(1): 46-53.
- [11] 王亚男, 赵柏丽. Y 染色体微缺失在无精子症及重度少弱精子症患者病因学研究中的应用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2018, 26(5): 53, 95.
WANG Ya'nan, ZHAO Baili. Application of Y chromosome microdeletion in etiology research of patients with azoospermia and severe oligozoospermia [J]. *Chinese Journal of Birth Health and Heredity*, 2018, 26(5): 53, 95.
- [12] 郭丽. Y 染色体微缺失对卵胞浆内单精子注射胚胎发育和妊娠结局的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2014, 28(12): 16-18.
GUO Li. Effects of the Y Chromosome microdeletions on the embryo development and clinical outcome of the ICSI treatment cycle [J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2014, 28(12): 16-18.
- [13] 张丽洁, 赵园, 赵乔佳杰, 等. 男性不育患者 Y 染色体 AZF 基因微缺失检测和染色体核型分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(3): 59-61.
ZHANG Lijie, ZHAO Yuan, ZHAO Qiaojiajie, et al. Detection of Y chromosome AZF gene microdeletion and karyotype analysis in male infertile patients [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(3): 59-61.

收稿日期: 2019-08-01

修稿日期: 2019-08-17