

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*

张丽洁, 赵 园, 赵乔佳杰, 王九菊, 李艳春, 魏绪仓 (陕西省人民医院血液遗传研究所, 西安 710068)

摘要:目的 探讨男性不育的遗传因素。方法 采用多重荧光定量 PCR 方法对 60 例严重少、弱精症和无精症的不育患者进行 Y 染色体 AZF 基因微缺失检测, 同时用 G 显带方法分析染色体核型。结果 60 例患者中有 5 例染色体核型异常, 检出率为 8.33%, 且异常核型均为 47, XXY, 即克氏综合征。Y 染色体 AZF 基因微缺失检出 2 例患者, 检出率为 3.33%, 缺失类型均为 AZFc 区缺失。30 例精液常规正常的健康志愿者未检出 Y 染色体 AZF 基因缺失。结论 染色体核型异常及 Y 染色体 AZF 基因微缺失与男性不育密切相关, 且克氏综合征和 AZFc 区缺失为常见的异常类型。

关键词:不育; 遗传因素; 染色体核型异常; Y 染色体微缺失

中图分类号: R698.2; R394-33 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)03-059-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.03.014

Detection of Y Chromosome AZF Gene Microdeletion and Karyotype Analysis in Male Infertile Patients

ZHANG Li-jie, ZHAO Yuan, ZHAO Qiao-jia-jie, WANG Jiu-ju, LI Yan-chun, WEI Xu-cang

(Institute of Hematogenetics, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To explore the genetic factors of male infertility. **Methods** Multi-fluorescence quantitative PCR was used to detect AZF gene microdeletion of Y chromosome in 60 infertile patients with severe oligozoospermia and azoospermia, and G-banding method was adopted to analyze the karyotype. **Results** Among the 60 infertile patients, 5 patients bore the abnormal chromosome karyotype of 47, XXY, and the detection rate was 8.33%. Two patients with AZFc region deletion in Y chromosome were detected by AZF gene microdeletion assay, and the detection rate was 3.33%. AZF gene deletion of Y chromosome was not detected in the 30 healthy volunteers with normal sperm routine. **Conclusion** Abnormal chromosome karyotype and microdeletion on Y chromosome were closely correlated with male infertility, and the Klinefelter syndrome and AZFc microdeletion are common abnormal types.

Keywords: infertility; genetic factors; abnormal chromosomal karyotype; Y chromosome microdeletion

目前越来越多的育龄夫妇患有不孕不育症, 其中男性方面因素约占 30%~50%, 由遗传因素导致精子生成障碍约占男性不育症的 30%^[1]。克氏综合征(klinefelter syndrome, 核型为 47, XXY)和 Y 染色体微缺失是引起男性不育的前两位遗传因素。克氏综合征在人群中的发生率约为 1/1 000, 不育男性中占 1/10, 是发生率较高的一种性染色体病。研究证明, Y 染色体上长臂 1 区 1 带(Yq11)存在精子生成相关基因, 即无精子症因子(AZF), 分为 AZFa, AZFb 和 AZFc 3 个区域, 这些区域的缺失会导致生精障碍, 引起少精子症或无精子症^[2]。

本研究对 60 例不育患者进行 Y 染色体微缺失检测和染色体核型分析, 进而在细胞和分子遗传水平探讨男性不育的原因。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 1 月~2019 年 1 月陕西省人民医院男科门诊就诊的 60 例男性不育患

者(严重少、弱精症和无精症)的全血标本, 对照组为 30 例精液常规检测正常的男性志愿者, 年龄 20~42 岁。

1.2 仪器与试剂 德国 ZEISS 显微镜及染色体图像分析系统。Roche Cobas z480 荧光定量 PCR 仪, 外周血淋巴细胞培养基(广州市达晖生物技术有限公司), Chromed G 吉姆萨染液(上海乐辰生物科技有限公司), 外周血 DNA 提取试剂盒(江苏康为世纪生物科技有限公司), Y 染色体微缺失检测试剂盒(上海透景生命科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 Y 染色体微缺失检测

1.3.1.1 PCR 反应体系: 实验操作按照上海透景科技公司的 Y 染色体微缺失检测试剂盒进行, 采用多重荧光定量 PCR 方法判断 AZFa 区(sY84, sY86), AZFb 区(sY127, sY134)和 AZFc 区(sY254, sY255)的 6 个序列标签位点(STS)的微缺失, 同时设置男性性别决定基因(SRY)和编码锌

* 作者简介: 张丽洁(1982—), 女, 博士, 主治医师, 从事细胞和分子遗传学诊断检测, E-mail: cyzlj8383@163.com。

通讯作者: 魏绪仓(1962—), 男, 本科, 研究员, 二级教授, 硕士生导师, 从事血液遗传诊断工作, E-mail: weixucang62@sina.com。

指蛋白基因(ZFX/ZFY)为两个内对照基因。SRY, sY84, sY127和sY255为组别A, ZFX/ZFY, sY86, sY134和sY254为组别B。4种荧光标记FAM, VIC, ROX和Cy5分别对应内对照(SRY, ZFX/ZFY), AZFa(sY84, sY86), AZFb(sY127, sY134)和AZFc(sY254, sY255)。

1.3.1.2 PCR扩增反应条件:第一阶段:50℃ 2 min, 95℃ 5 min;第二阶段 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 38个循环,在每个循环的60℃时收集FAM/VIC, ROX和Cy5信号;第三阶段72℃延伸5 min。

1.3.1.3 结果判读:通过分析扩增曲线判读结果,出现典型的S型扩增曲线且Ct值小于32表示基因表达正常,否则表示缺失。

1.3.2 染色体核型分析

1.3.2.1 染色体核型标本制备:采用常规细胞遗传学方法进行外周血淋巴细胞培养和G显带染色体核型标本制备。

1.3.2.2 核型分析:采用Ikaros核型分析系统软件计数20个中期分裂相,采集5个中期分裂相以分析核型。

2 结果

2.1 不育患者Y染色体AZF基因微缺失结果分析 60例男性不育患者中Y染色体AZF基因缺失的有2例,检出率为3.33%,且均为AZFc区的sY254, sY255位点缺失。30例精液常规检测正常的志愿者未检测到AZF基因缺失。

2.2 60例不育患者的染色体核型分析结果 在60例严重少精症和无精症的不育患者中检出5例异常核型(占8.33%),均为克氏综合征(47, XXY),其中3例患者还出现乳房发育和激素水平的异常,即卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、泌乳素(PRL)的水平异常增高和睾酮(TT)水平下降等。该5例染色体异常患者的Y染色体AZF基因并无缺失。

3 讨论 很多原因会导致男性不育,遗传性因素致生精障碍引起的不育占30%,临床上主要表现为严重少、弱精症和无精症。目前临床对男性不育的鉴别大多基于常规精液分析和血清生殖激素的测定,但这些检测并不能明确患者是否具有生育能力及对后代的影响,因而开展细胞和分子遗传检测对患者的诊断和治疗具有重要意义^[3-4]。

克氏综合征和Y染色体微缺失是导致精子发生障碍的主要遗传性缺陷。克氏综合征患者临床多表现为身材高大、睾丸小、第二性征发育不良、不育等,典型病例的血浆睾酮仅为正常人的一半,个别患者睾酮正常。外周血染色体核型分析是诊断

克氏综合征的主要实验依据。本文对60例不育男性患者的染色体核型分析结果与陈琨等^[5]对574例男性不育患者的核型研究结果一致,即不育男性中约有8%为克氏综合征患者。

Y染色体微缺失发生的区域不同,不育患者的临床表型也有所不同,因此明确Y染色体微缺失有无及缺失位点类型有助于临床医师为不育患者选择最佳的治疗方案。AZFa缺失发生频率最低,一般表现为无精症和唯支持细胞综合征(SCOS),此类患者不建议做单精子胞浆内注射手术(ICSI);AZFb, AZFb+c缺失可导致SCOS或生精阻滞,也不建议做ICSI;AZFc缺失最为常见,表现为严重少精症或无精症,该类患者尚存精子生成能力,可通过ICSI等辅助生育手段获得后代,建议生女孩,避免AZFc缺失在男性后代的传递^[6-7]。目前国内不同地区研究者报道的AZF基因微缺失发生率有所不同。曹金如等^[8]对东莞地区的120例不育患者的Y染色体AZF基因微缺失的检测中发现23例AZFc区缺失,检出率为19.2%,未发现其它区域缺失。樊冰等^[9]通过对深圳地区180例男性不育患者的Y染色体微缺失的分析发现18例AZFc缺失,2例AZFb+c缺失,缺失检出率为11.11%。韩瑞玲等^[10]发现346例男性不育患者中有17例Y染色体微缺失,缺失检出率为4.9%。本研究中的Y染色体微缺失检出率偏低,这可能与地域差别,或选择的STS位点有关,且此次分析的标本量偏少,有待后续研究中增加标本量进一步探讨Y染色体微缺失与男性不育的相关性。

综上所述,遗传缺陷导致的精子生成障碍是男性不育的重要因素。染色体核型分析和Y染色体AZF基因微缺失检测有助于筛查男性不育的原因,为医师对不育男性的合理诊疗提供依据。

参考文献:

- [1] KRAUSZ C, RIERA-ESCAMILLA A. Genetics of male infertility[J]. Nat Rev Urol, 2018, 15(6): 369-384.
- [2] 刘琳, 赵小东, 温臻, 等. Y染色体微缺失对ICSI结局的影响研究进展[J]. 中国男科学杂志, 2017, 31(3): 64-68.
- [3] LIU Lin, ZHAO Xiaodong, WEN Zhen, et al. Progress in the study of the effect of Y chromosome microdeletion on the outcome of ICSI[J]. Chinese Journal of Andrology, 2017, 31(3): 64-68.
- [4] KRAUSZ C G, CARRELL D T. Advances in understanding the genetics underlying male infertility and evolving diagnostic and treatment options[J]. Andrology, 2014, 2(3): 302-303.
- [5] 刘政, 王喜良, 邱广斌. 男性不育的分子和遗传诊断的现状与挑战[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(8): 511-513.

- LIU Zheng, WANG Xiliang, QIU Guangbin. Molecular and genetic diagnosis of male infertility practices and challenges[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2015, 38(8): 511-513.
- [5] 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. Karyotype analysis and Y chromosome AZF microdeletion of 575 male infertile patients in Guizhou[J]. Shandong Medicine, 2017, 57(47): 42-44.
- [6] 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.
- [7] 杨卓, 郭野, 李宏军, 等. EAA/EMQN Y 染色体微缺失分子诊断应用指南解读[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(7): 454-456.
YANG Zuo, GUO Ye, LI Hongjun, et al. Interpretation of the guidelines for molecular diagnosis of EAA/EMQN Y chromosome microdeletions[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2015, 38(7): 454-456.
- [8] 曹金如, 陈寿云. 东莞地区男性不育患者 Y 染色体 AZF 基因微缺失分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(6): 791-792, 795.
CAO Jinru, CHEN Shouyun. Analysis of A2F gene microdeletion on Y chromosome in male infertility patients from Dongguan[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(6): 791-792, 795.
- [9] 樊冰, 罗勇, 李卓成. 180 例男性不育患者 Y 染色体微缺失的检测分析[J]. 中华生物医学工程杂志, 2017, 23(4): 311-313.
FAN Bing, LUO Yong, LI Zuocheng. Human Y chromosome microdeletions findings in 180 male infertile patients[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2017, 23(4): 311-313.
- [10] 韩瑞玲, 李艳, 童永清, 等. 无精症及严重少精症 Y 染色体微缺失和生殖激素水平研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 42-43, 47.
HAN Ruiling, LI Yan, TONG Yongqing, et al. Analysis of Y chromosome microdeletions and gonadal levels in severe oligozoospermia and azoospermia men[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(1): 42-43, 47.

收稿日期: 2019-03-21

修回日期: 2019-04-04