

广东韶关地区 163 例男性不育患者 Y 染色体微缺失分析

黄文波^{1*} 马占忠² 范舒舒² 徐静² 罗慧旗² 刘满霞² 陈玉美²

(1. 韶关学院医学院医学技术系, 广东 韶关 512026;

2. 汕头大学医学院附属粤北人民医院 检验科、产前诊断中心, 广东 韶关 512026)

【摘要】 目的 探讨 Y 染色体 AZF 基因微缺失检测对男性不育患者诊疗的临床意义。**方法** 采用荧光定量 PCR 法对 163 例无精或严重少精子患者和 50 例健康男性进行 Y 染色体 AZF 基因微缺失分析。**结果** 163 例男性不育患者中, 共检出 9 例 Y 染色体微缺失, 总检出率为 5.52%。包括 5 例 AZFc 缺失, 3 例 AZFb+c 缺失, 1 例 AZFa+b+c 缺失。对照组未检出 Y 染色体微缺失。两组检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 开展 Y 染色体 AZF 基因微缺失检测对男性不育患者查明病因和指导选择辅助生殖方式具有重要意义。

【关键词】 男性不育; Y 染色体微缺失; AZF

【中图分类号】 R446.9 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To explore the clinical significance of Y chromosome AZF gene microdeletions in the diagnosis and treatment of male infertility. **Method** A total of 163 patients with azoospermia or severe oligozoospermia and 50 healthy men were analyzed for the microdeletions of Y chromosome AZF gene by real-time PCR. **Results** 9 cases of Y chromosome microdeletions were detected in the 163 male infertility patients, the total detection rate is 5.52%, Including 5 cases of AZFc deletion, 3 cases of AZFb+c deletion, 1 case of AZFa+b+c deletion. No Y chromosome microdeletions were detected in the control group. There was a statistically significant difference in detection rate between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusions** It is great significance to carry out the Y chromosome AZF gene microdeletions to identify the cause and guide the selection of assisted reproductive methods in male infertility patients.

【Key words】 male infertility; Y chromosome microdeletions; azoospermia factor (AZF);

全世界约有 15% 的夫妇不育, 50% 与男性因素有关^[1]。Y 染色体无精因子(azoospermia factor, AZF)微缺失是男性不育的重要遗传因素^[2]。本研究采用荧光定量 PCR 技术对无精子或严重少精子患者的 Y 染色体 AZF 基因的 6 个序列标签位点进行检测, 从分子水平探讨男性不育的病因, 为临床辅助生殖提供依据和指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 10 月

在粤北人民医院就诊的 163 例无精或严重少精子的患者, 年龄 24~45 岁(平均年龄 31.6 岁), 无精症或严重少精症诊断参照 WHO 诊断标准^[3]。选取 50 例精液常规分析正常的健康男性为对照组, 两组年龄差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 试剂 Y 染色体微缺失检测试剂(PCR 荧光探针法)由上海透景生命科技股份有限公司生产, 检测包括 AZFa 区的 sY84、sY86, AZFb 区的 sY127、sY134, AZFc 区的 sY254、sY255A 以及 SRY、ZFX/ZFY 位点。核酸提取纯化试剂由江苏康为世纪生

物科技有限公司生产。仪器:伯乐 CFX96 荧光定量 PCR 仪,IMPLEN Nano photometer N50 Touch 微量分光光度仪等。

1.2.2 提取 DNA,PCR 扩增采集静脉血 2 ml,EDTA 抗凝;取 200 μ l 血液样本,用 BloodGen Mini Kit 核酸提取试剂盒提取全血基因组 DNA;用微量分光光度仪检测 DNA OD260/OD280,要求在 1.8~2.0 之间。PCR 反应体系:A 组和 B 组分别加 PCR 预混液 22.5 μ l,样本 DNA 模板 2.5 μ l,设阴性对照和质控品。PCR 反应条件:50 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,38 cycles;72 $^{\circ}$ C 5 min;60 $^{\circ}$ C 时收集 FAM/VIC/ROX/Cy5 荧光信号。具体步骤按照试剂盒说明书和相应 SOP 文件操作。

1.2.3 结果判读质控品结果为典型的 S 型扩增曲线且 Ct<32,阴性对照 4 个通道检测均无扩增曲线。其他样本位点结果为典型的 S 型扩增曲线且 Ct<32 判为存在,否则判为缺失。

1.2.4 统计分析利用 SPSS 19.0 软件统计分析,比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在 163 例男性不育患者中,共检出 9 例 Y 染色体微缺失,总检出率为 5.52%。包括 5 例 AZFc 缺失,检出率为 3.07%;3 例为 AZFb+c 缺失,检出率为 1.84%;1 例为 AZFa+b+c 缺失,检出率为 0.61%,该患者 SRY 基因阴性,外周血染色体核型结果为 46,XX,为男性性反转患者。见表 1 和图 1~4。对照组未检出 Y 染色体微缺失。两组间 Y 染色体微缺失检出率差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 163 例男性不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失检测结果($n=163$)

AZF 微缺失位点	例数(例)	阳性率(%)
AZFc	5	3.07
AZFb+c	3	1.84
AZFa+b+c	1	0.61
合计	9	5.52

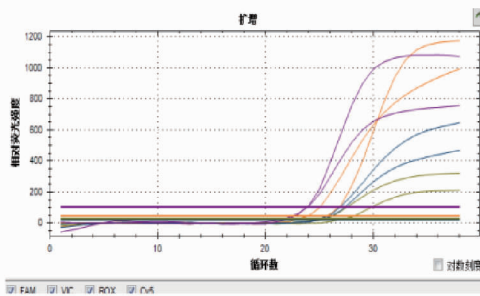


图 1 健康男性 AZF 基因 PCR 扩增曲线

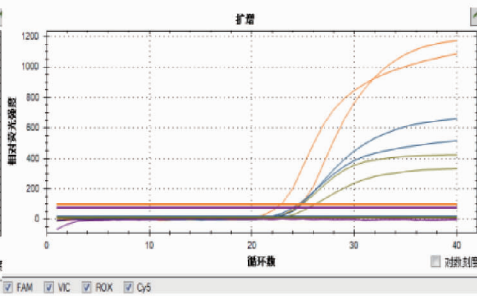


图 2 AZFc 缺失 PCR 扩增曲线

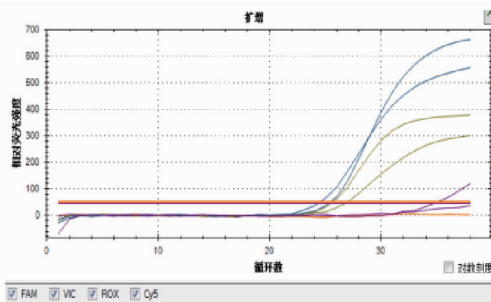


图 3 AZFb+c 缺失 PCR 扩增曲线

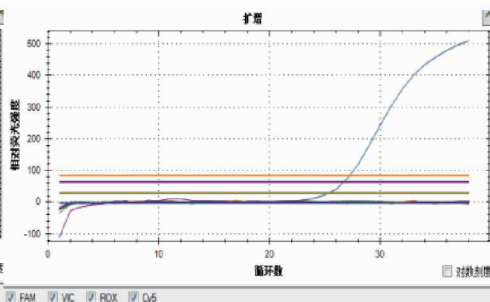


图 4 AZFa+b+c 缺失且 SRY(-)PCR 扩增曲线

3 讨论

Y染色体AZF基因与精子发生密切相关,分为AZFa、AZFb、AZFc 3个区域,任何一个区域微缺失都会引起无精或少精子症。AZFa缺失表现为唯支持细胞综合征,为绝对的无精子症,AZFb缺失患者精子生成被阻滞在精母细胞阶段,没有精子生成,因此,AZFa缺失和AZFb缺失的患者都不能通过单精子胞浆内注射,只能选择供精的方式来生育后代。AZFc缺失是临床上最常见生精障碍的病因,AZFc缺失患者的临床表现多样,有些能生成精子,可以通过辅助生殖技术生育后代,但是会将AZFc缺失遗传给男胎,可通过遗传咨询告知风险或者选择女胚进行移植避免遗传缺陷^[4]。

本研究在广东韶关地区163例无精或严重少精子患者中检出9例Y染色体微缺失,总检出率为5.52%,AZFc缺失最常见,与国内外报道的AZFc缺失发生率最高的结论一致^[5,6]。亚洲地区男性不育患者中AZF微缺失的发生率在2%~19.4%^[7]。广东省内报道的Y染色体微缺失率由高到低依次是东莞地区19.2%^[8],深圳地区10%~14.29%^[9,10],广州地区5.3%~10.9%^[11,12],惠州地区9.02%^[13],潮州地区7.14%^[14],佛山地区6.6%^[15]。各文献报道的检出率差异较大,与所选的研究对象和采用检测方法和位点不尽相同有关,也可能存在种族和地域的差异。

目前,Y染色体微缺失可采用荧光定量PCR法、PCR琼脂糖凝胶电泳法、毛细管电泳法、基因芯片法和荧光原位杂交法等,本文所用的荧光定量PCR法自动化程度高,操作简便,不需要电泳等繁琐的步骤,是一种简便高效的检测方法。但有文献报道基因多态性可能会导致扩增失败引起假阳性的风险需引起重视^[16,17],必要时采用PCR毛细管电泳测序确认。

欧洲男科协会和分子遗传质量协作网EAA/EMQN出版的指南^[18],首次提出了AZF筛查的规范化流程、遗传咨询和辅助生殖等相关内容。Y染色体微缺失分析已经成为一项常规的检查项目,可明确无精子症或少精子症患者的病因、指导选择辅

助生殖方式,对实现优生优育具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1): 1-12.
- [2] Hellani A, Al-Hassan S, Iqbal MA, et al. Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo-azoospermia[J]. J Exp Clin Assist Reprod, 2006, (3): 1.
- [3] 世界卫生组织. WHO人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社, 2011.
- [4] 付莉,毛熙光,陈绍威,等. 男性不育患者Y染色体无精子因子基因微缺失的研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(1): 85-88.
- [5] Sachdeva K, Saxena R, Majumdar A, et al. Use of ethnicity specific sequence tag site markers for Y chromosome microdeletion studies[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15(6): 451-459.
- [6] 韩瑞钰,宋潇潇,张展羽,等. 1875例不育症患者Y染色体微缺失的研究及评估[J]. 中国男科学杂志, 2016, 30(6): 45-48.
- [7] Kim MJ, Choi HW, Park SY, et al. Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1, 306 infertile Korean men[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(6): 539-546.
- [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, (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, 2018, 23(4): 311-313.
- [10] 张永科,法萍萍,谢君,等. 686例生精障碍患者染色体核型与Y染色体微缺失分析[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(5): 769-773.
- [11] 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.
- [12] 刘雅峰,欧建平,周灿权,等. 广州地区不育男性Y染色体无精子因子微缺失的筛查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(5): 564-566.
- [13] 纪妍,徐宏甲,黄健初. 133例男性原发不育患者染色体核型及Y染色体微缺失分析[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2): 388-390.
- [14] 卢丹洁,罗招云,林芬,等. Y染色体微缺失检测在男性不育的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(4): 228-232.
- [15] 李美珠,朱琳琳,吴智刚,等. Y染色体AZF基因微缺失在诊断男性不育中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8):

984-986.

[16] Wu Q, Chen GW, Yan TF, et al. Prevalent false positives of Azoospermia factor a (AZFa) microdeletions caused by single nucleotide Polymorphism rs72609647 in the sY84 screening of Male infertility [J]. Asian J Androl, 2011, 13 (6): 877-880.

[17] 杨卓,徐丹菲,张东红,等. Y 染色体 AZFa 区域 sY84 位点基因多态性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(11): 1036-1037.

[18] 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.

(收稿日期:2018-11-23)

编辑:宋文颖