

# 516 例无精症 Y 染色体微缺失及细胞遗传学分析

吴丽华 胡晶晶 梁凯玲 张忆聪\*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511442)

**【摘要】 目的** 探讨 Y 染色体微缺失和细胞遗传学分析在无精症中的相关性。**方法** 对 2015 年 3 月至 2019 年 12 月来广东省妇幼保健院就诊的诊断无精症的患者进行外周血染色体 G 显带核型分析, 运用多重定量荧光聚合酶链反应(quantitative fluorescent PCR, QF-PCR)技术检测 Y 染色体上的无精因子(azoospermia factor, AZF)。**结果** 516 例无精症患者中共检出染色体异常者 66 例, 异常率 12.8%; 检出 AZF 缺失 40 例, 总缺失率为 7.8%; 40 例 Y 染色体微缺失中检出正常核型 27 例(67.5%, 27/40)及异常核型 13 例(32.5%, 13/40)。**结论** AZF 微缺失的无精症患者大多核型正常, 常规细胞遗传学不能直接反映 AZF 微缺失情况。联合运用 2 种检测方法有助于明确无精症患者遗传学病因, 为临床辅助生殖技术提供理论依据。

**【关键词】** 无精症; 染色体核型; Y 染色体微缺失

**【中图分类号】** R394.2 **【文献标识码】** A

## Analysis of Y chromosomal microdeletions and chromosome karyotype in 516 patients with azoospermia

Wu Lihua, Hu Jingjing, Liang Kailing, Zhang Yicong\*

Medical Genetic Centre, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511442, China

\* Corresponding author: Zhang Yicong, E-mail: 476048962@qq.com

**【Abstract】 Objective** To explore frequency and type of major chromosomal abnormalities including Y chromosome microdeletions in patients with azoospermia. **Methods** A total of 516 patients with azoospermia were enrolled from our hospital from March 2015 to December 2019. Chromosome karyotype analysis was performed on peripheral blood with G-banding. Y-chromosome azoospermia factor (AZF) was detected by quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR). **Results** There were 66 cases of abnormal chromosome karyotypes in 516 patients with azoospermia, with abnormal rates were 12.8%. In addition, 7.8% (40/516) presented with Y-chromosome AZF microdeletions, in which 27 cases patients with karyotype of 46,XY(67.5%, 27/40) and 13 cases of chromosome abnormalities(32.5%, 13/40). **Conclusion** The incidence of Y chromosome microdeletion was higher in the patients with karyotype of 46,XY. Conventional cytogenetics cannot directly reflect the microdeletions of Y chromosome. Therefore, the combination of these two detection methods can help to clarify the genetic causes of patients with azoospermia and provide a theoretical basis for clinical assisted reproductive technology.

**【Key words】** Azoospermia; Chromosome karyotype; Y chromosome microdeletion

全世界大约有 10%~15% 的育龄夫妇不育,世

界卫生组织认为不育夫妇中的 50% 都由男性因素引起的<sup>[1]</sup>,而在男性不育中无精症和隐匿性无精症占 10%~20%。引起男性无精症的原因有遗传学

异常、性激素水平异常、免疫异常、年龄和环境等因素。染色体异常及Y染色体微缺失是男性不育症患者重要的遗传学病因,也是目前临床上最关注的遗传学异常。该病因学检查有助于临床采取相应治疗措施或辅助生育技术,减少患者经济负担。本文通过回顾性分析了516例无精症患者的染色体核型和Y染色体上的无精因子(azoospermia factor, AZF)微缺失检测结果,探讨Y染色体微缺失和细胞遗传学分析在无精症中发生的频率以及它们之间的相关性,帮助明确无精症患者的遗传学病因。

## 1 资料和方法

1.1 临床资料 收集自2015年3月至2019年12月近5年来广东省妇幼保健院生殖健康与不育症科诊断为无精症的患者共516例,年龄21~52岁,平均年龄31.7岁。所有的患者均通过体检和精液常规分析检查,排除精索静脉曲张、内分泌紊乱、生殖道炎症、免疫异常和理化等引起无精的因素。无精子症的诊断标准按照世界卫生组织第5版《人类精液检查与处理实验室手册》<sup>[2]</sup>的定义及方法,检查精子密度至少3次或3次以上,且精液离心后也未见精子。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞遗传学分析 患者签署知情同意后,抽取肝素抗凝外周血4ml,常规进行淋巴细胞培养72h,常规制备染色体,G显带,计数20个核型,分析5个核型,有数目异常者加倍计数及分析,染色体命名参考根据《人类细胞遗传学国际命名体制2016》<sup>[3]</sup>。

1.2.2 Y染色体微缺失检测 抽取患者EDTA-K2抗凝外周血2ml,提取基因组DNA,选择Y染色体AZF上6个STS序列,分别是AZFa: SY84、SY86, AZFb: SY127、SY134, AZFc: SY254、SY255,以SRY(SY14)和ZFX/Y位点为内对照同时进行扩增,PCR引物末端FAM、JOE和TAMRA荧光基团标记<sup>[4]</sup>。除ZFX/ZFY引物外,其他引物和扩增条件按照参考欧洲男科学会(European Academy of Andrology, EAA)2004版指导原则和欧洲分子基因诊断质量联盟(European

Molecular Genetics Quality Network, EMQN)标准进行<sup>[5]</sup>,最后使用GeneMaker(version2.2.0)软件对毛细管电泳结果进行数据分析。

## 2 结果

2.1 细胞遗传学分析 516例无精症患者中共检出染色体异常患者66例,检出率12.8%(66/516)。检出性染色体异常57例(86.36%,57/66),包括性染色体结构异常4例、性染色体数目异常44例、46,XX性别发育异常4例和嵌合体9例;检出常染色体结构异常9例(13.64%,9/66)。详见表1。

2.2 Y染色体微缺失检测 检出AZF缺失40例,总缺失率为7.8%(40/516),包括5例AZFa(12.5%,5/40)、1例AZFb(2.5%,1/40)、20例AZFc(50.0%,20/40)、9例AZFb+AZFc(22.5%,9/40)、4例AZFa+AZFb+AZFc(10.0%,4/40)。详见表1。

2.3 Y染色体微缺失患者中的细胞遗传学分析 40例Y染色体微缺失中检出正常核型27例(67.5%,27/40),异常核型13例(32.5%,13/40),异常核型包括46,X,del(Y)(10.0%,4/40)、性染色体嵌合体(12.5%,5/40)和46,XX(10.0%,4/40)。详见表1。

## 3 讨论

在男性无精症的遗传病因中,染色体核型异常和Y染色体AZF微缺失是2个常见的遗传因素。染色体Y染色体长臂q11区存在AZF,其含有3个互不重叠的AZFa、AZFb、AZFc区域组成<sup>[6]</sup>,为调控精子发生的基因位点,一个或多个区域的缺失可引起生精功能障碍,导致男性无精症。本研究516例无精症患者中异常核型检出率为12.8%,与Fu<sup>[7]</sup>报道的14.71%相近。我们发现无精症患者中最常见的异常核型是47,XXY,占异常核型的49.4%,与Zhang<sup>[8]</sup>报道的51.14%相一致。Klinefelter综合征即先天性睾丸曲细精管发育不全,Y染色体上存在控制睾丸发育的SRY基因,表型为男性,但是由于患者核型中多余的X染色体导致Y染色体功能受到抑制,使睾丸曲精管发育受到

影响,生精小管玻璃样变和纤维化。临床表现无精子,且有睾丸小而质硬和第二性征发育异常。刘兴章等<sup>[8]</sup>报道的无精症或隐匿性无精症患者中检出的 165 例 47,XXY,未发现 Y 染色体 AZF 微缺失。本

文 39 例 47,XXY 中也未检出 AZF 微缺失,提示 47,XXY 患者的无精症病因与 Y 染色体微缺失无明显相关性。因此,对于 Klinefelter 综合征患者可能没必要进行 AZF 基因微缺失检测。

表 1 染色体核型和 Y 染色体微缺失检出率及分布

类型	染色体核型	例数 [例(%)]	AZF 缺失类型(例)					AZF 缺失比 (%)
			a	b	c	bc	abc	
正常核型	46,XY	450(87.2)	5	1	19	2	—	67.5
异常核型	47,XXY	39(7.56)	—	—	—	—	—	0
	46,XX	4(0.78)	—	—	—	—	4	10
	mos 47,XXY/46,XY	2(0.39)	—	—	—	—	—	0
	46,X,del(Y)(q11.22)	4(0.78)	—	—	1	2	1	10
	47,XYY	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	mos 45,X/46,XY	2(0.39)	—	—	—	1	—	2.5
	mos 45,X/46,X,Yqh-	2(0.39)	—	—	—	1	—	2.5
	mos 46,X,del(Y)(q11.22q11.23)/45,X	1(0.19)	—	—	—	1	—	2.5
	mos 46,X,del(Y)(q11.22)/46,X,idel(Y)(q11.22)/45,X/46,XY	1(0.19)	—	—	—	1	—	2.5
	mos 45,X/46,X,der(Y;Y)t(q? 11.23;q11.2)del(Y)(p? 11.1)	1(0.19)	—	—	—	1	—	2.5
	46,XY,t(18;22)(p11.2;q11.1)	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	46,XY,t(1;22)(q12;p12),14p+	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	46,XY,t(2;5)(q13;q13)	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	2(0.39)	—	—	—	—	—	0
	46,XY,der(1)? inv(1)(p36.2q21)? inv(1)(p31q36.1)	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	46,XY,inv(1)(p33q44)	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	46,XY,inv(15)(q11.2q24)	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
	46,XY,inv(1)(q34.2q24)	1(0.19)	—	—	—	—	—	0
合计		516(100)	5	1	20	9	5	100

国内外研究发现常染色体上存在 2000 多个与精子生成有关的基因<sup>[7]</sup>。一些研究发现 1 号染色体存在与生精功能相关的基因,包括 SCP-1、*tsMCAK*、*MTHFR*、*MSH4* 和 *MMP-23*<sup>[9,10]</sup>。本文检出的常染色体异常 9 例,均无 AZF 微缺失,其中 1 号染色体最常见,包括 3 例倒位和 1 例平衡易位,占常染色体异常的 44.4%。有研究在男性不育症,尤其是无精症患者中 1 号染色体断裂位点数相比其他常染色体要高<sup>[11]</sup>。可见 1 号染色体的结构异常可能与患者的无精症具有高度相关。原因可能是 1 号染色体发生易位或倒位后,这些断裂的位点如果位于生精功能的形成的相关基因,破坏了该基因的完整性,影响基因表达进而引发生精障碍,其发生机制有待日后进一步深入研究。

本文检出 AZF 总缺失率为 7.8%,与 Ferlin<sup>[12]</sup>报道的相近。AZF 至少可分为 a、b、c 3 个区域,分别位 Yq11.23 的近、中、远端。AZFa 缺失可导致唯

支持细胞综合征,病理检查表现为间质细胞及支持细胞减少,精曲小管发育不良;AZFb 缺失则会导致精原细胞和初级精母细胞成熟发育障碍,表现为无精;AZFc 缺失则比较复杂,可以出现有正常精子到无精症的表型。本文发现无精症中 AZFc 异常率为 50%,为最常见的缺失类型,其次为 AZFb+AZFc (22.5%)、AZFa (12.5%)、AZFa+AZFb+AZFc (10.0%)和 AZFb (2.5%)。以上涉及到 AZFa 和 AZFb 单个或多个区域的缺失无法获得精子,AZFc 缺失的无精症患者则可以通过睾丸穿刺而获成熟精子,借助卵细胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 生育后代<sup>[13,14]</sup>,但 AZF 缺失也有通过垂直传播给男性子代的风险。因而,早期发现是否存在 AZF 缺失及缺失区域,为男性无精症患者日后是否选择通过 ICSI 辅助生育治疗提供了科学依据,与此同时为 AZFc 缺失的患者行 ICSI 治疗前遗传诊断选择女性胚胎提供了遗传咨询,减

少非必要的有创手术,减轻患者的心理压力和经济损失。

40例AZF缺失患者中正常核型占65%,刘兴章等<sup>[15]</sup>也报道了997例无精症患者中有71.6%正常男性核型,可见AZF缺失中正常核型比例高。一般来说AZF微缺失很难通过染色体核型检测发现,因此,对无精症患者染色体核型正常的患者有必要再进一步行AZF基因的检测。

决定睾丸曲细精管生精细胞发育的关键基因存在Y染色体q11位置,该部分缺失或重排可能导致了Y染色体上一系列与生精子功能的相关基因缺失或改变。我们检出4例核型为46,XY,del(Y)(q11.22),细胞遗传学上Y染色体长臂有明显的缺失。同时涉及到不同区域的AZF微缺失,1例AZFc区缺失、2例AZFb+AZFc区缺失、1例AZFa+AZFb+AZFc区缺失。4例患者染色体核型Y染色体缺失定位于q11.22位置,分子水平表现出不同AZF的缺失,表明细胞遗传学上对Y染色体长臂q11.22缺失的无精症患者AZF微缺失的可能性大,且缺失的区域需要分子遗传学确认。

综上所述,染色体异常和Y染色体微缺失是影响男性无精症的重要遗传因素。AZF微缺失的无精症患者大多核型正常,常规细胞遗传学不能直接反应AZF微缺失情况,必需通过分子学水平明确诊断。2种方法联合检测有助于在接受辅助生育治疗前的无精症患者明确遗传学病因,从而减轻患者心理负担和避免不必要的临床治疗。

#### 参考文献

- [1] World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation diagnosis and management of the infertile male[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2005, 27(3), 100.
- [2] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[M]. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [3] MCGOWAN-JORDAN J, SIMONS A, SCHMID M. ISCN2016: An international system for human cytogenomic nomenclature[M]. Basel: Karger, 2013.
- [4] 杨曦,黄伟伟,卢建. 定量荧光PCR筛查Y染色体AZF微缺

失[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2018, 36(2), 81-86.

- [5] NAVARRO-COSTA P, WILKE M, HOEFSLOOT L, et al. The EAA/EMQN external quality control program critically improves the molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions[J]. Eur J Hum Genet, 2019; 167-168.
- [6] 吴媛媛, 丁建林, 吴行飞, 等. 武汉地区1617例少弱精及无精症患者的细胞遗传学分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(6): 714-715.
- [7] FU L, XIONG D K, DING X P, et al. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(6): 521-52.
- [8] ZHANG M, FAN H T, ZHANG Q S, et al. Genetic screening and evaluation for chromosomal abnormalities of infertile males in Jilin Province, China[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 16178-16184.
- [9] PAQUIS-FLUCKLINGER V, SANTUCCI-DARMANIN S, PAUL R, et al. Cloning and expression analysis of ameiosis-specific Mut Shomolog: the Human MSH4 Gene [J]. Genomics, 1997, 44(2): 188-194.
- [10] VELASCO G, PENDÁS AM, FUEYO A, et al. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members[J]. J Biol Chem, 1999, 274(8): 4570.
- [11] BACHE I, ASSCHE EV, CINGOZ S, et al. An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility[J]. Eur J Hum Genet, 2004, 12: 993-1000.
- [12] 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.
- [13] OATES RD, SILBER S, BROWN LG, et al. Clinical Characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of AZFc region of the Y chromosome and of 18 children conceived via ICSI [J]. Hum Reprod, 2002, 17: 2813-2824.
- [14] PARK SH, LEE HS, CHOE JH, et al. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in Korean men with Y chromosome microdeletions[J]. Korean J Urol, 2013, 54(8): 536-540.
- [15] 刘兴章, 唐运革, 郑立新, 等. 无精症及隐匿精子症患者染色体核型与Y染色体微缺失分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(4): 460-462.

(收稿日期: 2020-09-01)

编辑: 宋文颖