

桂西地区原发性无精子症和严重少精子症患者 Y 染色体无精子因子检测分析^{*}

潘 云, 卢 冬, 潘国刚, 李北林(右江民族医学院附属医院检验科, 广西百色 533000)

【摘要】 目的 探讨桂西地区原发性无精子症和严重少精子症患者 Y 染色体无精子因子(AZF)微缺失状况。**方法** 采用多重聚合酶链反应技术对桂西地区 56 例原发无精子症、78 例原发严重少精症患者及 40 例正常生育男性进行 4 个区域 15 个位点微缺失分析。**结果** 40 例正常生育男性未发现 Y 染色体 AZF 微缺失, 134 例生精障碍患者中发现 AZF 微缺失 14 例, 总缺失率为 10.5%。生精障碍组与正常生育组比较 Y 染色体 AZF 微缺失率差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** Y 染色体 AZF 微缺失是男性原发无精、少精子症的重要原因之一, AZF 微缺失检测对男性不育症患者进行遗传学诊断与筛查有一定意义。

【关键词】 无精子因子; 微缺失; 男性不育

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 06. 003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)06-0645-02

Analysis of measure of Y chromosome azoospermia factor microdeletions in patients with idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia in west Guangxi area^{*} PAN Yun, LU Dong, PAN Guo-gang, LI Bei-lin (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Youjiang Nationality Medical College, Baise, Guangxi 533000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the microdeletion situation of Y chromosome azoospermia factor(AZF) in the patients with idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia in the west Guangxi area. **Methods** Multiplex PCR was used to detect Y chromosome microdeletion in 15 STS in 56 cases of idiopathic azoospermia, 78 cases of severe idiopathic oligozoospermia and 40 healthy male controls. **Results** No Y chromosome AZF microdeletion was found in 40 controls. Y chromosome AZF microdeletion was found in 14 cases among 134 azoospermia patients, the total prevalence rate of the total microdeletion was 10.5%. Difference of microdeletion rate between two groups was statistically significant($P<0.01$). **Conclusion** Y chromosome AZF microdeletions is one of important reasons in idiopathic azoospermia and oligozoospermia. The detection of AZF factor may play an important role in the genetic diagnosis and screening among male infertility patients.

【Key words】 azoospermia factor; microdeletion; male infertility

目前世界上已婚育龄夫妇中约 10%~15% 的夫妇不育, 其中男性不育因素约占 50%^[1]。引起男性不育常见原因有营养不良、内分泌疾病、环境毒物、生殖道炎症、精索静脉曲张、隐睾、核型异常(克氏征)及免疫异常等因素, 其中由于遗传缺陷包括基因突变和染色体异常所引起的精子发生障碍占 30% 以上^[1]。除输精管梗阻、腮腺炎病毒感染等明确原因外, 还有相当一部分精子发生障碍的男性不育找不出病因, 因此有关原发性无精子症及严重少精子症的遗传因素日益受到重视。随着对精子发生的细胞遗传学和分子生物学等领域的深入研究以及分子生物学检验技术的发展, 人们逐步认识到引起无精症的基因——无精子因子(AZF)位于 Y 染色体长臂, 可导致 10%~15%^[2] 无精子症及严重少精子症。本文采用多重 PCR 技术, 对 134 例不育患者进行 Y 染色体 AZF 4 个区域的 15 个序列位点(STS)进行筛查, 探讨桂西地区不育患者 AZF 缺失状况。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集桂西地区 2008 年 1 月至 2009 年 6 月在本院不育门诊就诊的男性不育患者 134 例为作生精障碍组, 年龄 23~42 岁, 平均年龄 30.5 岁, 检查排除精索静脉曲张、隐睾、附睾损伤以及阻塞性无精子症等疾病。且无特殊病史及家

族史;按照 WHO 标准连续 3 次精液常规分析确诊为无精子症 56 例, 严重少精子症(精子密度低于 5×10^6 /mL)78 例;染色体核型分析均为 46, XY;血清性激素浓度均在正常范围。正常生育组选择有生育史男性共 40 例, 年龄 23~38 岁, 平均 28.2 岁。

1.2 方法

1.2.1 外周血 DNA 提取

抽取两组外周血 2 mL, 枸橼酸钠抗凝, 深圳亚能生物有限公司提供试剂盒并严格按其说明书进行, 快速从全血中抽提 DNA。

1.2.2 引物及 DNA 检测

15 个 STS 分别为 AZFa 区的 SY86、SY84、SY82; AZFb 区的 SY143、SY134、SY133、SY128、SY127、SY124; AZFc 区的 SY254、SY242、SY239、SY126; AZFd 区的 SY152、SY145。15 对引物组合成 4 管多重 PCR 系统, 每管中均加入睾丸决定基因(SRY)内控引物, 第 1 管为: SRY(470 bp), SY254(380 bp), SY143(310 bp), SY242(230 bp), SY255(126 bp); 第 2 管为: SRY(470 bp), SY84(326 bp), SY239(200 bp), SY152(125 bp); 第 3 管为: SRY(470 bp), SY86(320 bp), SY127(270 bp), SY145(140 bp), SY124(109 bp); 第 4 管: SRY(470 bp), SY134(301 bp), SY82(264 bp), SY128(228 bp), SY133(177 bp)。设立 SRY 质控片

^{*} 基金项目: 广西教育厅资助项目(200710LX125)。

段、正常男性对照及空白对照。反应体积为 25 μ L,包括模板 DNA、DNA 聚合酶、dNTP、缓冲液、去离子水。扩增条件:50 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,15 min;94 $^{\circ}$ C,30 s;58 $^{\circ}$ C,60 s;72 $^{\circ}$ C,60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经后 3%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,电泳电压 100 V,约 45 min 完成。

2 结 果

134 例患者全血基因组 DNA 经多重 PCR 扩增后电泳结果显示,14 例有 Y 染色体微缺失,总缺失率 10.5%,其中 5 例无精症患者和 2 例少精症患者的缺失发生在 AZFb 区域,缺失率为 5.22%;5 例无精症患者的缺失发生在 AZFc 区域,缺失率为 3.73%,1 例无精症患者和 1 例少精症患者发生 AZFb、AZFc 双重缺失,缺失率为 1.11%。正常生育组未发生缺失。生精障碍组与正常生育组比较,Y 染色体 AZF 区域微缺失率差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

近年来的研究表明,Y 染色体微缺失是导致男性不育的主要遗传学因素。1976 年,Tiepolo 等在无精子症患者中证实 Yq11 区域的缺失^[3],进而首先提出 Y 染色体长臂近端的 AZF 以来,国外学者对男性不育患者的 Y 染色体微缺失的主要位点和发生频率进行了广泛研究。1996 年,Vogt 等在对无精子症的研究中将位于 Yq11 的 AZF 划分为 AZFa、AZFb 和 AZFc。1999 年,Kent First 等又提出在 AZFb 与 AZFc 之间又增加了一个 AZFd 区域,但该区是否存在仍有争议。文献报道 Y 染色体微缺失发生率为 1%~55.5%^[4],之所以缺失频率范围如此大,可能有以下几点原因:(1)研究对象入选的标准不同,可能是无精子症、少精子症和不育症,但精子计数正常以及这几种人群的不同组合。无精和少精只是一个症状,本身就代表不同病因的不均一性。(2)选取 STS 标记位置的密度及位置不同。(3)病史不清,实验室检查不全面。(4)不同地域、种族间可能存在差异。

本文研究桂西地区男性不育人群无精子症和严重少精子症者,Y 染色体 AZF 微缺失率为 10.5%,与文献报道的 10.0%~15.0%^[5]大体接近。此次检测结果中 Y 染色体 AZF 微缺失主要表现为 AZFb(5.22%)和 AZFc(3.11%)缺失,与文献报道有所不同^[6],说明不同地区存在一定差异。AZFb 基因全部缺失的患者表现为生精阻滞,主要停留在精母细胞或精子细胞阶段,部分缺失时,临床表现多样化,包括唯支持细胞综合征(SCOS)、无精子症或少精子症;如果同时伴有 AZFa 或 AZFc 的缺失,则表现为 SCOS 或生精阻滞。研究证明,AZFc 缺失对生精障碍有重要作用,临床上 AZFc 缺失是 AZF 缺失的主要缺失区域^[7],AZFc 缺失的患者临床表现多种多样,可表现为无精症,也可表现为精子计数正常但伴有精子形态异常^[8]。然而,AZFc 对于精子的生成或生育并不是不可缺的。AZFc 完全缺失的患者可能也可以产生成熟精子,而且极少数

的病例显示 AZFc 缺失可以遗传给后代^[9]。本文提示 AZFb 和 AZFc 可能是桂西地区不育男性无精子症和严重少精子症患者 AZF 的常见区域,AZFc 并不占最大比例,说明 Y 染色体 AZF 微缺失的频率、位置及程度有所不同可能与种族、地区性差异、遗传多态现象有关,AZF 微缺失的区域不同,患者所表现的临床症状也不同,所以在不同地区进行 Y 染色体 AZF 微缺失的检测具有重要的实际意义。

卵泡内精子注射(ICSI)为男性不育症的治疗带来了革命性突破,但也有可能使遗传缺陷传给下一代,导致子代不育。因此,对这一类群体的的遗传学咨询和筛查是十分必要的,基因缺失的检测对男性不育的遗传学咨询和筛查有着重大的临床意义。

参考文献

[1] Dada R,Gupta NP,Kucheria K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia[J]. J Biosci,2003,28(2):163-168.

[2] 张华俊. AZF 与男性不育研究进展[J]. 中华男科杂志,2010,16(2):166-169.

[3] Li Z,Haines CJ,Han Y. “Micro-deletions” of the human Y chromosome and their relationship with male infertility [J]. J Genet Genomics,2008,35(4):193-199.

[4] Janet M,Pak C,Lucinda V,et al. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome[J]. Fertil Steril,2004,81(2):337-341.

[5] Slezak R,Sasiadek M. Chromosome Y microdeletions in the pathogenesis of male infertility[J]. Pol Merkur Lekarski,2002,13(75):229-233.

[6] 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.

[7] Pandey LK,Pandey S,Gupta J,et al. Loss of the AZFc region due to a human Y-chromosome microdeletion in infertile male patients[J]. Genet Mol Res,2010,9(2):1267-1273.

[8] Hucklenbroich K,Gromoll J,Heinrich M,et al. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis[J]. Hum Reprod,2005,20(1):191-197.

[9] Sun K,Chen XF,Zhu XB,et al. A new molecular diagnostic approach to assess Y chromosome microdeletions in infertile men[J]. J Int Med Res,2012,40(1):237-248.

(收稿日期:2012-09-05 修回日期:2012-12-20)

(上接第 644 页)

[9] 吴正林,朱新建,叶军. 冠心病患者同型半胱氨酸和超敏 C-反应蛋白的检测意义[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(3):395-396.

[10] 吴达党. B 型钠尿肽和超敏 C 反应蛋白在冠心病患者中的临床意义[J]. 现代医药卫生,2011,27(12):1784-1786.

[11] 李炳霞,李剑华,寇筱因. 107 例冠心病患者血清超敏 C 反应蛋白的测定分析[J]. 中国实用医药,2011,6(15):62-63.

(收稿日期:2012-09-06 修回日期:2012-12-27)