

DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2021.04.07

不育男性 Y 染色体微缺失与辅助生殖助孕结局的关系*

侯建华, 马玉珍, 孙文芳, 陈红, 任宇(内蒙古自治区人民医院生殖医学中心, 呼和浩特 010051)

摘要:目的 探讨男性不育症患者 Y 染色体微缺失与辅助生殖技术助孕结局的关系。方法 用 PCR 技术对 346 例男性不育症患者 Y 染色体无精子因子(AZF)6 个序列标签位点(STS)基因进行微缺失检测,并同时进行男性性激素、染色体核型分析及精液常规检查,其中 94 例同期在我中心进行了体外受精(IVF)/卵细胞质内单精子注射(ICSI)助孕治疗。结果 346 例男性不育症患者中共检出 AZF 微缺失 17 例,总缺失率为 4.91%(17/346)。其中无精子症 105 例(A 组)中,9 例缺失有 AZF c 区缺失、AZF b 区缺失、AZF a+b+c 区缺失;重度少精子症 75 例(B 组)中,6 例缺失均为 AZF c 区缺失;轻、中度少精子症 166 例(C 组)中,2 例缺失均为 AZF c 区缺失;A 组的缺失率(8.57%,9/105)、B 组的缺失率(8.00%,6/75)高于 C 组(1.26%,2/166),但 A 组与 B 组相比较,差异无统计学意义。同期 94 例进行 IVF/ICSI 助孕治疗的患者中,9 例有 Y 染色体微缺失,妊娠率为 55.6%(5/9),活产 4 例(1 例因胎儿畸形行孕中期引产);85 例无 Y 染色体微缺失,妊娠率为 48.2%(41/85),活产 39 例,流产 2 例;两组妊娠率及活产率均无统计学差异。结论 Y 染色体微缺失是无精子症及重度少精子症的重要原因之一,且缺失区域以 AZF c 区最多见,AZF b 区次之,AZF a 区罕见。

关键词:Y 染色体微缺失;无精子因子;辅助生殖;助孕

中图分类号:R446

文献标志码:A

据 WHO 统计,育龄期夫妇中不孕不育比率约为 10%~15%,男性因素占 30%~50%^[1],其中由染色体所致的遗传因素约占男性因素的 30%^[2-3],是男性不育症的重要因素之一。Y 染色体微缺失已经成为继克氏综合征后的又一大男性不育的遗传学因素^[4],受到越来越多的关注、重视和深入研究。辅助生殖技术作为治疗不育症的重要手段之一,已日益成熟并广泛应用。但该技术在成功帮助不育夫妇实现生育后代的同时,也在很大程度上将某些遗传性不育的基因垂直传递给了后代,所以在决定采用辅助生殖助孕技术之前,对不育患者进行染色体等遗传学检测非常必要。1976 年 Tiepolo 等^[5]首次发现无精子症与 Y 染色体长臂上的微缺失有关,推测与 Y 染色体长臂 1 区 1 带(Yq11)的精子生成基因或无精子因子(azoospermia factor, AZF)基因家族相关^[6-7]。Dohle 等^[8]对原发性无精子症和少精子症患者分析发现,存在 Y 染色体 AZF 的微缺失,提示 AZF 微缺失可能是造成男性原发性不育的重要遗传因素之一,AZF 基因片段的丢失可能造成生精障碍。研究证实^[9-10],Y 染色体长臂(Yq)AZF a、b 和 c 区域中的一个或多个部位出现缺失时,将会造成精子发生障碍,进而导致少精子症甚

至无精子症的发生,从而影响男性生育能力。本研究探讨不育男性 Y 染色体微缺失与辅助生殖助孕结局的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 5 月至 2020 年 12 月在内蒙古自治区人民医院生殖医学中心就诊的进行染色体检查及 Y 染色体微缺失检测的 346 例少精子或无精子的男性不育症患者,分为 3 组:A 组为无精子症组(105 例),年龄(33.5±3.9)岁;B 组为重度少精子症组(75 例),年龄(34.1±4.1)岁;C 组为轻、中度少精子症组(166 例),年龄(34.2±4.3)岁。3 组间年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。排除女方子宫内膜及卵子因素(子宫内膜异位症、卵巢囊肿、多囊卵巢综合征等),仅纳入男方精子因素及女方输卵管因素的 94 例患者进行体外受精(IVF)/卵细胞质内单精子注射(ICSI)助孕治疗。

1.2 主要仪器与试剂 外周血 DNA 柱式小量提取试剂盒购自江苏康为世纪生物科技公司,Y 染色体微缺失检测试剂盒购自上海透景生命科技公司。根据欧洲男科协会(European Academy of Andrology, EAA)、欧洲分子遗传实验质控网(European Mo-

* 基金项目:国家自然科学基金(31360286);内蒙古自治区人民医院内青年基金(201555)。

作者简介:侯建华,1980 年生,女,副主任技师,硕士,主要从事生殖男科实验室相关检查。

通信作者:马玉珍,主任技师,二级教授,主要从事配子及胚胎学研究,E-mail:mayz1964@hotmail.com。

lecular Genetics Quality Network, EMQN) 2013 版推荐标准进行 Y 染色体微缺失检测。该试剂盒采用 2 管多重 PCR 扩增、4 个通道 [(羧基荧光素 (FAM)/绿色荧光蛋白 (VIC)/羧基-X-罗丹明 (ROX)/花菁素 (Cy5)] 荧光检测的方法,判断 AZF a、b、c 区域 6 个序列标签位点 (sequence tag site, STS) 的微缺失,同时设置 2 个内对照基因:男性性别决定基因 (sex-determining region of the Y chromosome, SRY) 和编码锌指蛋白基因 ZFX (zinc finger protein, X-linked)/ZFY (zinc finger protein, Y-linked), 对本标本采集、抽提、PCR 整个过程进行质控。

1.3 方法

1.3.1 精液常规检查 根据《人类精液检查与处理实验室手册》(第 5 版)的标准^[11],用 SSA-II 精子自动检测分析系统(穗加软件公司)检测。按 WHO 规定,至少 2 次常规检查无精子,离心沉淀后仍未见精子的诊断为无精子症。精子浓度 $<5 \times 10^6/\text{mL}$ 为重度少精子症; $5 \times 10^6/\text{mL} \leq$ 精子浓度 $<10 \times 10^6/\text{mL}$ 为中度少精子症; $10 \times 10^6/\text{mL} \leq$ 精子浓度 $<15 \times 10^6/\text{mL}$

为轻度少精子症。

1.3.2 Y 染色体微缺失检测 采用外周血 DNA 柱式小量提取试剂盒提取外周血 DNA,采用 Y 染色体微缺失检测试剂盒及荧光 PCR 仪进行 Y 染色体微缺失的检测。

1.3.2.1 DNA 提取 按照外周血 DNA 柱式小量提取试剂盒的使用说明书提取外周血 DNA。取 200 μL 外周血加入蛋白酶 K 及裂解缓冲液进行蛋白质裂解,再加入无水乙醇离心漂洗沉淀提取 DNA, -20°C 保存备用。

1.3.2.2 PCR 扩增 采用 25 μL 反应体系,包括 22.5 μL a 组或 b 组 PCR 预混液,2.5 μL 核酸样本或阴性对照或质控品。PCR 反应条件:第 1 阶段为 50°C 2 min,1 个循环;第 2 阶段为 95°C 5 min,1 个循环;第 3 阶段为 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s,38 个循环;第 4 阶段为 72°C 5 min,1 个循环。信号收集:在第 3 阶段 60°C 时收集 FAM/VIC/ROX/Cy5 信号,并保存相关文件。

1.3.2.3 结果判读 见表 1。

表 1 Y 染色体微缺失检测结果判读说明

编号	荧光染料设置	备注	结果判读
a 组	FAM	Control	结果为典型的 S 型扩增曲线且 $C_t < 32$, 进行结果判读, 否则实验失败, 建议重新抽提 当结果为典型的 S 型扩增曲线且 $C_t < 32$ 表示存在, 否则表示缺失
	VIC	AZF a	
	ROX	AZF b	
	Cy5	AZF c	
b 组	FAM	Control	结果为典型的 S 型扩增曲线且 $C_t < 32$, 进行结果判读, 否则实验失败, 建议重新抽提 当结果为典型的 S 型扩增曲线且 $C_t < 32$ 表示存在, 否则表示缺失
	VIC	AZF a	
	ROX	AZF b	
	Cy5	AZF c	

1.4 统计学分析 用 SPSS17.0 统计软件进行。结果以率 (%) 表示, 组间率的比较采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别 Y 染色体微缺失结果的比较 346 例男性不育症患者中共检出 AZF 微缺失 17 例, 总缺失率为 4.91% (17/346)。在 105 例无精子症组 (A 组) 中有 9 例微缺失, 其中 5 例为 AZF c 区缺失, 2 例为 AZF b 区缺失, 1 例为 AZF b+c 区缺失, 1

例为 AZF a+b+c 区全部缺失, 其中 2 例 2~3 个 AZF 区域同时缺失的患者又进行再次抽血复查, 结果与原结果一致; 75 例重度少精子症组 (B 组) 中有 6 例微缺失, 均为 AZF c 区缺失; 166 例轻、中度少精子症组 (C 组) 中有 2 例微缺失, 均为 AZF c 区缺失, 结果见表 2。结果显示, A 组的缺失率 (8.57%, 9/105)、B 组的缺失率 (8.00%, 6/75) 高于 C 组的缺失率 (1.26%, 2/166), χ^2 分别为 5.466、7.171, P 均 < 0.05 ; 但 A 组与 B 组相比较, 差异无统计学意义 (χ^2 为 0.242, $P > 0.05$)。

表 2 不同组别 Y 染色体微缺失种类分布及缺失率的比较

分组	n	AZF a	AZF b	AZF c	AZF b+c	AZF a+b+c	总缺失率 [% (n)]
A 组	105	—	2	5	1	1	8.57 (9/105) *
B 组	75	—	—	6	—	—	8.00 (6/75) *
C 组	166	—	—	2	—	—	1.26 (2/166)

注: *, 与 C 组比较, χ^2 分别为 5.466、7.171, P 均 < 0.05 。

2.2 有无 Y 染色体微缺失患者 IVF/ICSI 助孕结局比较 17 例 Y 染色体微缺失患者中有 4 例无精子症患者为生精功能障碍型,通过睾丸/附睾穿刺均未找到精子,4 例通过精浆果糖及生殖激素等辅助检测判断为非梗阻性无精子症,以上 8 例均未行助孕治疗,其余 9 例 Y 染色体微缺失患者均进行了 IVF/ICSI 助孕治疗。本研究入组的 94 例进行助孕的夫妇,不孕原因女方排除排卵障碍、卵巢功能早衰、子宫内膜因素等,只有输卵管因素,其余均为男方严重少精子或无精子症因素。有 Y 染色体微缺失患者与无 Y 染色体微缺失患者 IVF/ICSI 妊娠结局比较见表 3,两组妊娠率及活产率差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

表 3 94 例有、无 Y 染色体微缺失患者助孕结局的比较

分组	妊娠率[% (n)]	活产率[% (n)]
微缺失组(n=9)	55.6(5/9)	80.0(4/5)
无微缺失组(n=85)	48.2(41/85)	95.1(39/41)
χ^2 值	0.005	0.111
P 值	0.944	0.739

3 讨论

本研究选取由 EAA 及 EMQN 推荐的 AZF a (sY84、sY86)、b (sY127、sY134) 及 c (sY254、sY255) 3 个区域 6 个位点的基因缺失进行分析,研究其与严重少精子症及无精子症的关系,这也是目前对于男性不育症诊断和治疗的共识^[12-13]。结果显示,346 例进行 Y 染色体微缺失检测的患者中共计 17 例存在 Y 染色体微缺失,总缺失率为 4.91%。按照精子质量的严重程度分成无精子症(A)组、重度少精子症(B)组及轻、中度少精子症(C)组,其 Y 染色体微缺失率分别为 8.57%、8.00% 和 1.26%,A 组和 B 组的 Y 染色体微缺失率均高于 C 组(P 均 <0.05),但 A 组与 B 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。国内许多生殖中心也有关于无精子症、少精子症相关 Y 染色体微缺失发生的报道,但结果变异较大^[14-16]。

随着辅助生殖技术的蓬勃发展,IVF/ICSI 技术用于治疗男性不育已广为接受。Y 染色体微缺失是否会影响 IVF/ICSI 的治疗结局,目前国内报道不多且结果不一、尚存争议。本研究 346 例中的 94 例进行了 IVF/ICSI 助孕治疗,结果显示 Y 染色体微缺失组与无缺失组相比,临床妊娠率及活产率差异无统计学意义($P>0.05$)。研究显示^[17-18],Y 染色体微缺失可能与流产有关,尤其是 AZF c 区缺

失。但由于本研究 Y 染色体微缺失组样本量小,比较结果可能存在偏差,还有待扩大样本量做进一步的研究。因 Y 染色体微缺失患者未行植入前遗传学诊断(PGD)技术进行性别筛选,也就存在将微缺失垂直传递给子代男婴以及将来男婴成人后依旧面临 Y 染色体微缺失乃至不育的风险。该结论与国内外大部分文献报道相一致^[19-20]。

Y 染色体微缺失能够引起生精功能障碍造成少、弱精子症甚至无精子症,继而造成男性不育症的发生,但同时这种缺失不会传递给子代。而随着 ICSI 技术的产生、发展,由 Y 染色体微缺失引起的少精子症及无精子症均可以通过 ICSI 技术获得自己的子代,若获得的子代为男婴,这种微缺失就会垂直传递给子代,甚至有研究显示这种微缺失在男性子代成长过程中会扩大缺失片段,造成子代男性延续不育现象。为了避免此类情况的发生,就需要对该类微缺失患者进行 PGD 技术,俗称“三代试管婴儿”,它能够在胚胎植入母体前对胚胎进行筛选,选择没有 Y 染色体的胚胎,这样得到的女性后代就可以成功阻断微缺失的继续遗传。对于男方有 Y 染色体微缺失欲行 ICSI 助孕的夫妇,需告知若为男性后代成年后同样面临生育问题,但不影响健康^[21]。经过充分的遗传咨询,绝大部分夫妇仍然选择行常规 ICSI,理论上生育男性后代的概率为 50%,少部分夫妇选择 PGD 挑选女性胚胎移植或供精人工授精。但对这类患者是否需要行 PGD 一直以来备受争议,因为 PGD 技术不仅费用昂贵,且有可能无法筛选出合适的胚胎,这样的结果往往让患者难以接受。这也是目前国内外对于 PGD 这项技术争论的焦点之一。

4 参考文献

- [1] de Kretser DM. Male infertility [J]. Lancet, 2007, 349(9054): 787-790.
- [2] 姜辉, 田杨, 黄锦, 等. 重视染色体基因缺陷对男性生育的影响 [J]. 北京大学学报(医学版), 2012, 44(4): 504-506.
- [3] Hotaling JM. Genetics of male infertility [J]. Urol Clin North Am, 2014, 41(1): 1-17.
- [4] Sciarra F, Pelloni M, Faja F, et al. Incidence of Y chromosome microdeletions in patients with Klinefelter syndrome [J]. J Endocrinol Invest, 2019, 42(7): 833-842.
- [5] Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human y chromosome long arm [J]. Hum Genet, 1976, 34(2): 119-124.
- [6] Nailwal M, Chauhan JB. Azoospermia factor C subregion of the Y chromosome [J]. J Hum Reprod Sci, 2017, 10(4): 256-260.

- [7] Zhu Y, Hu LS, Cao DL, *et al.* Chromosomal microarray analysis of infertile men with azoospermia factor microdeletions [J]. *Gene*, 2020, 735: 144389.
- [8] Dohle GR, Halley DJ, van Hemel JO, *et al.* Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(1): 13-16.
- [9] Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome [J]. *Hum Genet*, 2017, 136(5): 637-655.
- [10] Rives N. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, patient approach and genetic counseling [J]. *Ann D'endocrinologie*, 2014, 75(2): 112-114.
- [11] 世界卫生组织. 人类精液检查与处理实验室手册 [M]. 5 版. 谷翊群, 等译. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [12] 欧阳洪根, 黄源鹏, 吴琼, 等. 126 例无精子症患者临床特征及细胞分子遗传学检测综合分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(11): 2553-2557.
- [13] 朱晓斌, 李铮. 2013 新版 EAA/EMQN Y 染色体微缺失检测指南解读 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(36): 2900-2902.
- [14] 刘英华, 宋小艳, 李庆阁, 等. Y 染色体 AZF 基因微缺失在诊断苏南地区男性不育患者中的研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2020, 28(6): 695-697.
- [15] 吴智刚, 李炜焯, 李启欣, 等. 佛山地区无精子症及严重少精子症患者 Y 染色体微缺失基因分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2020, 14(9): 85-87.
- [16] 胡一珍, 郑波, 栾世巍, 等. 男性不育患者的 Y 染色体异常检测结果分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2020, 28(8): 947.
- [17] Totonchi M, Mohseni Meybodi A, Borjian Boroujeni P, *et al.* Clinical data for 185 infertile Iranian men with Y-chromosome microdeletion [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(8): 847-853.
- [18] 赵邦荣, 杨书文. 早期反复自然流产的男方因素研究进展 [J]. *生殖医学杂志*, 2010, 19(4): 373-376.
- [19] Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(7): 1722-1726.
- [20] Xie C, Chen XF, Liu YL, *et al.* Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia [J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(1): 107-114.
- [21] McLachlan RI, O'Bryan MK. State of the art for genetic testing of infertile men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(3): 1013-1024.

(收稿日期:2021-01-16)

(本文编辑:王海燕)