

·临床研究·

男性不育患者 Y 染色体微缺失的多重 PCR 筛查

于丛一, 庄广伦, 周灿权

(中山大学第一附属医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立一套 Y 染色体微缺失的多重 PCR 筛查方法, 对因无精症或少精症欲行单精子卵细胞浆注射(ICSI)治疗的男性不育患者进行 Y 染色体微缺失的常规筛查。【方法】建立两套稳定和可靠的五重 PCR 筛查方法, 对在本中心进行 ICSI 治疗的 26 例无精症患者和 61 例少精症患者进行 Y 染色体微缺失的检测。【结果】在 26 例无精症患者中发现 1 例有 Y 染色体 AZF_c/DAZ 的缺失, 在 61 例少精症患者中发现 4 例 Y 染色体 AZF_c/DAZ 的缺失。【结论】本研究 Y 染色体微缺失的多重 PCR 筛查方法是易行和可靠的。

关键词: Y 染色体; 染色体缺失; 多重 PCR; 不育, 男(雄)性; 遗传筛查

中图分类号: R715.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)04-0265-03

Multiplex PCR for Screening of Microdeletions on the Y Chromosome in Male Infertility Patients YU Cong-yi, ZHUANG Guang-lun, ZHOU Can-quan. (Reproductive Medical Center, Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To develop a multiplex PCR protocol suitable for routine screening of microdeletions on the Y chromosome in male infertility patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI). 【Methods】Two multiplex sets, each consisting of five primer pairs, were established. 26 azoospermic men and 61 oligozoospermic men undergoing ICSI in the center were screened for microdeletions of Y chromosome. 【Results】One patient with AZF_c/DAZ microdeletions was found in 26 azoospermic men, and four patients with AZF_c/DAZ microdeletions were found in 61 oligozoospermic men. 【Conclusion】The multiplex PCR protocol established in this study is an easy and reliable method for detection of microdeletions on the Y chromosome.

Key words: Y chromosome; chromosome deletion; multiplex PCR; infertility male; genetic screening

目前估计在育龄夫妇中约有 15% 患有不育, 而男性因素在不育病例中所占比例几乎已接近 50%^[1]。精子发生障碍可由多方面因素引起, 例如疾病、营养不良、内分泌紊乱、遗传缺陷和环境因素等^[2]。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估计占男性不育因素的 30%^[1]。近 20 年的研究提示 Y 染色体对性发育和精子发生是必需的。

1 资料和方法

1.1 研究对象

87 例男性不育患者均为自 2001 年 10 月至 2001 年 12 月在本中心进行单精子卵细胞浆注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 治疗的患者, 按照 WHO 的诊断标准, 确诊为无精症和少精症, 其中无明确病因的无精症患者 26 例, 少精症患者 61 例, 常规染色体核型分析均为正常 (46, XY), 无精症患者睾丸活检均可找到成熟精子。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 的提取 抽取研究对象 2 mL 外周血加入含 EDTA 的抗凝管, DNA 抽提按中山大学达安基因诊断中心 DNA 抽提试剂盒说明进行。抽提的 DNA 用紫外分光光度计 (SHIMADZU UV-1206 型, 岛津公司, 日本) 测波长 260 nm、280 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算两者比值并算出所抽提 DNA 量。

1.2.2 引物设计 2 套多重 PCR, 每套包含 5 对引物, 其中 2 对引物 SRY 和 ZFY 作为质控片段, 另外 3 对引物分别检测 3 个 AZF 区域, 引物序列见表 1。引物由上海博亚公司合成。

1.2.3 多重 PCR 反应 50 μL PCR 反应体系包括去离子水、缓冲液 (buffer)、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶以及模板。PCR 反应条件 93 °C 3 min, 93 °C 30 s, 65 °C 25 s, 72 °C 45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。所使用 PCR 扩增仪为 PE9600 型 (PE 公司, 美国)。为避免假阳性结果, 所有的缺失标本都至少检验 3 次, 并对所缺失的片段进行一

收稿日期: 2002-03-10

基金项目: 卫生部重点基金资助项目 (2001321)

作者简介: 于丛一 (1973-), 男, 山东烟台人, 博士生, 妇产科生殖内分泌专业; 周灿权, 教授, 课题负责人。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of the PCR primers

Multiplex	Primers
A and B	ZFY-F: 5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3'
	ZFY-R: 5'-GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T-3'
A and B	SRY-F: 5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3'
	SRY-R: 5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'
A	sY86-F: 5'-G TG ACA CAC AGA CTA TGC TTC-3'
	sY86-R: 5'-ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'
A	sY127-F: 5'-GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3'
	sY127-R: 5'-CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'
A	sY254-F: 5'-GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3'
	sY254-R: 5'-GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C-3'
B	sY84-F: 5'-AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3'
	sY84-R: 5'-GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'
B	sY134-F: 5'-G TC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3'
	sY134-R: 5'-ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'
B	sY255-F: 5'-G TT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3'
	sY255-R: 5'-CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'

ZFY: 495 bp; SRY: 472 bp; sY254: 400 bp(AZFc); sY84: 320 bp(AZFa); sY127: 274 bp(AZFb); sY86: 326 bp(AZFa); sY134: 301 bp(AZFb); sY255: 126 bp(AZFc)

重 PCR 扩增以进一步验证。

1.2.4 扩增产物电泳 10 μL PCR 产物经 20 g/L 的普通琼脂糖凝胶电泳后, 通过凝胶扫描仪(GDS7600型, UVP 公司, 美国)进行 DNA 电泳条带的观察并记录结果。

2 结果

电泳结果显示, 在 26 例无精症患者中发现 1 例有 Y 染色体 AZFc/DAZ 的缺失, 在 61 例少精症患者中发现 4 例 Y 染色体 AZFc/DAZ 的缺失, 未发现 AZFa 和 AZFb 区域的缺失。空白对照泳道未见电泳条带, 女性对照泳道仅见 ZFY 扩增片段, 正常男性对照和未发生缺失患者泳道可见 5 条电泳条带(图 1)。

3 讨论

虽然有研究观察到 Y 染色体长臂的缺失会导致精子发生障碍从而引起不育, 然而直到 1976 年, Tiepolo 和 Zuffardi^[3] 的发现才使研究者认识到 Y 染色体长臂上携带有精子发生所必需的遗传信息。其后的更多研究表明, 人类 Y 染色体靠近异染色质区域的部分缺失, 将导致男性少精和无精的发

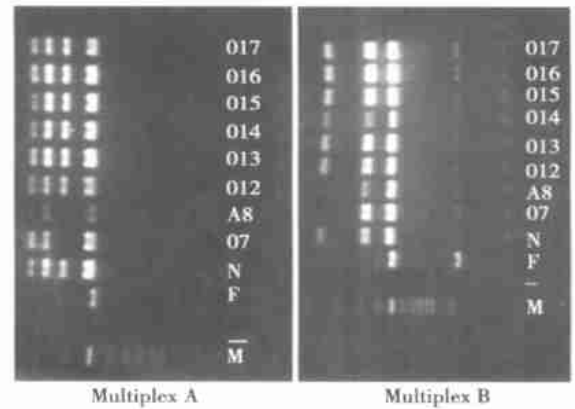


图 1 多重 PCR 电泳例图

Fig. 1 Example of both multiplex PCR

M: marker; -: water; F: female DNA; N: DNA of normal male; O7 and A8: DNA of AZF/DAZ deleted patients; O12-O17: DNA of AZF/DAZ non-deleted patients

生。由于许多男性无精症病人均有 Yq11 的异常, 故将其命名为无精子因子(AZF, azoospermia factor)。1996 年, Vogt^[4] 将 AZF 划分为 3 个无重叠部分, 分别命名为 AZFa、AZFb 和 AZFc。目前, 在欧美许多分子遗传和不育实验室都已广泛开展和进行 Y 染色体微缺失的分子诊断, 通过 Y 染色体缺失的诊断和分析为进行辅助生育治疗的不孕夫妇提供遗传咨询, 并对部分男性因素不育患者提供原因和解释。因此, 本研究建立和应用一套易行和可靠的 Y 染色体微缺失的分子诊断方法对在本中心进行 ICSI 治疗的男性不育患者进行常规筛查。

目前 Y 染色体微缺失的分析和检测方法主要采用 PCR 技术, 使用特异引物扩增 Y 染色体不同分散区域的序列标签位点(sequence tag site, STS) 片段。综合所有 Y 染色体微缺失研究报道, 其所报道的筛查病人已超过 6 000 人, 近来有许多综述文献对这些数据进行了分析。然而在不同研究中微缺失的发生率差异很大, 从 1%^[5] 到 55.5%^[6]。Simoni^[7] 对到 1998 年为止所发表的数据做的一个 meta 分析显示, 无精症患者中微缺失的发生率约为 12%, 在少精症患者中约为 3.4%, 在 3 个 AZF 区域中, AZFc/DAZ 区域缺失的发生率最高, 其次为 AZFb, AZFa 微缺失检出率最低。从这些报道中, 可以发现不同研究缺失率相差很大, 除了所采用的实验方法不同(如选择的 STS 引物不同)外, 被检测的患者的选择标准和数量是造成这一差异的主要因素。本研究中, 在 26 例无精症患者中发现 1 例有 AZFc/DAZ 的缺失(3.8%), 在 61 例少精

症患者中发现4例AZFc/DAZ的缺失(6.6%),未发现有AZFa和AZFb区域的缺失。因时间所限,本研究的例数仍然较有限,结果仅供参考,仍需长时间、大样本甚至不同地区或多中心的研究结果进行综合分析,才能得出一定的结论。另外,Vogt^[4]提出,近端AZFa或AZFb的微缺失表现出的精子发生缺陷较严重,如I型唯支持细胞综合症(Sertoli cell-only syndrome, SCOS),而远端AZFc微缺失所表现出的精子发生缺陷则相对较轻。本研究的所有病例均来自于在本中心进行ICSI治疗的患者,故2/3患者为少精症,而所有无精症患者睾丸活检均可找到成熟精子,因此本研究中未发现有AZFa和AZFb区域的缺失的原因可能在此。

对文献的综合分析显示,在不育男性患者中微缺失的发生率与所分析的序列标签位点STS的数目无显著相关性。新近一些研究通过比较两套不同筛查方案对微缺失发生的检出效率,来专门研究STS引物的数量对研究的影响。Van Landuyt^[8]的研究显示,对进行ICSI治疗的患者,使用3个STS markers(一个AZF区域一个引物)与使用27个STS markers(标记),并没有显著改变对Y染色体微缺失的检出率。因此,使用有限数量的能够代表3个AZF区域的markers对以常规筛查为目的来说是足够的。不同研究者在研究中所使用的STS不同,其数量从5个^[9]到118个^[10],在绝大多数研究中都选用了或仅选用了AZFb和AZFc区域的STS。所有报告中的缺失标本都至少检验了3次,大部分PCR反应都选用了正常女性标本作为质量控制和阴性对照,部分实验中同时使用正常生育男性和正常女性作为阴性和阳性对照。另外,在少数设计严格的实验中,还使用Southern blotting对缺失进行确认。本研究建立了一套由2个5重PCR反应组成的Y染色体微缺失筛查方法,并可

以在相同的PCR反应条件下进行,从而可以在一次PCR循环中完成检测,并且由于该筛查方法具有严格的质控标准,因而其结果是可靠的。因此,本研究Y染色体微缺失的多重PCR筛查方法是易行和可靠的,并具有一定的推广价值。

参考文献:

- [1] Bhasin S, Ma K, de Kretser D M. Y-chromosome microdeletions and male infertility[J]. *Ann Med*, 1997, 29(4): 261.
- [2] Skakkebaek N E, Giwercman A, de Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility[J]. *Lancet*, 1994, 343(8911): 1473.
- [3] 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.
- [4] Vogt P H, Edelmann A, Kirsch S *et al*. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11[J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(7): 933.
- [5] van der Ven K, Montag M, Peschka B, *et al*. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection[J]. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(8): 699.
- [6] Foresta C, Fedin A, Ganolla A, *et al*. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(2): 302.
- [7] Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(7): 1764.
- [8] Van Landuyt L, Lissens W, Stouffs K, *et al*. Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population[J]. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(4): 291.
- [9] Simoni M, Grömol J, Dwomiczak B, *et al*. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in A-Zoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia[J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(3): 542.
- [10] Reijo R, Alagappan R K, Patrizio P, *et al*. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome[J]. *Lancet*, 1996, 347(9011): 1290.

(编辑 张恩健)

(上接第261页 from page 261)

- [3] 韩守威, 何斌, 唐茜萍, 等. 女性生殖系统恶性肿瘤组织胞浆雌激素及孕激素受体的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 1994, 29(1): 12.
- [4] 屠铮, 李小平, 魏丽惠. 孕激素受体亚型的研究现状[J]. *国外医学妇产科分册*, 2000, 27(5): 259.

- [5] Kumar N S, Richer J, Owen G, *et al*. Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1860.

(编辑 刘清海)