·论　著·

东莞地区男性不育患者 Y 染色体 AZF 基因微缺失分析

曹金如，陈寿云
（东莞市第三人民医院输血科中心实验室，广东东莞 523320）

摘　要：目的　探讨东莞地区男性不育患者 Y 染色体无精子因子（AZF）基因微缺失情况和特点。**方法**　采用多重 PCR 方法对 120 例来该院就诊的特发性少精症和无精症的不孕患者和 60 例同期门诊精液常规检查正常患者进行 Y 染色体 AZF 基因微缺失检测，同时对该 120 例患者进行外周血染色体核型分析。**结果**　120 例患者外周血核型分析未见明显异常，Y 染色体 AZF 基因微缺失检测检出 23 例患者均为 AZFc 区缺失，检出率为 19.2%，未检出其他位点缺失。**结论**　AZFc 区为该地区男性不育 AZF 基因筛查的主要候选基因，Y 染色体微缺失是导致男性不育的重要原因。

关键词：Y 染色体；　基因；　男性不育
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.032　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)06-0791-03

Analysis of AZF gene microdeletions on Y chromosome in male infertility patients from Dongguan

Cao Jinyu, Chen Shouyun
(*Central Laboratory, Department of Blood Transfusion, Dongguan Municipal Third People's Hospital, Dongguan, Guangdong* 523320, *China*)

Abstract: Objective　The multiple polymerase chain reaction (PCR) technique was adopted to detect AZF microdeletion of Y chromosome in 120 patients with idiopathic oligozoospermia and azoospermia and contemporaneous 60 cases of normal semen routine examination in the outpatient department. At the same time the peripheral blood chromosome karyotype analysis was performed on these 120 patients. **Methods**　Multiple PCR (Polymerase chain reaction) technique were used to analyze 15 locus of the azoospermia factor (AZF) in the 120 patients with idiopathic azoospermia and oligozoospermia and 60 mormal cases. using the Karyotype analysis technique to analyze karyotype of the 120 male infertile patients, at the same time. **Results**　Among 120 cases of male infertility, no obvious abnormal karyotype was found. 23 cases were detected AZFc deletions with the detection rate of 19.2%, no microdeletions at other loci were detected. **Conclusion**　AZFc is the major candidate gene for AZF gene screening in male infertility patients from this area. The Y chromosome microdeletion is the important cause leading to male infertility.

Key words: Y chromosome;　gene;　male infertility

男性不育的原因一般有多种，除输精受阻和射精障碍以及炎症和梗阻等病因导致不孕外，生精障碍是一个主要原因，而遗传性缺陷导致的不孕占 30%。正确诊断男性不育的原因，能有效防治男性不育。经研究发现 Y 染色体基因缺失是引起男性不育的重要原因。在精子发生障碍引起的男性不育患者中，Y 染色体微缺失的发生率仅次于 Klinefelter's syndrome（克氏综合征），是居于第二位的遗传因素。本研究拟采用多重 PCR 对 Y 染色体上的精子发生调控基因 AZF 进行多位点检测，对东莞地区男性不育病因从分子水平做一探讨。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取 2013 年 6 月至 2014 年 5 月来本院门诊就诊的 120 例广东东莞籍特发性少精症和无精症患者，排除炎症性输精管梗阻以及结核性睾丸炎等病因，60 例同期门诊精液常规检查正常者为对照组。

1.2　检测方法

1.2.1　染色体核型分析　抽取外周血 2 mL，进行外周血淋巴细胞培养，常规制备染色体，G 显带计数 20 个中期核型，分析 5 个核型，按照人类细胞遗传学国际命名体制（ISCN，1985）进行染色体核型描述。采用湖南湘雅基因技术有限公司提供的外周血培养基进行外周血培养和采用北京国联在线医疗技术有限公司提供的分析系统进行外周血核型分析。

1.2.2　Y 染色体微缺失检测　Y 染色体 AZF 基因微缺失检测试剂盒由深圳亚能生物技术公司提供。试剂盒中 15 对引物覆盖 AZF15 个 STS 位点和一对引物扩增 SRY 基因作为内控，组成 4 套 PCR 多重系统，分装在四种不同颜色的扩增管，扩增出的产物大小具体见表 1。静脉抽取外周血 2 mL，EDTA 抗凝，混匀后取 100 μL 采用硅胶法进行外周血 DNA 提取，取 DNA1 μL 和 10 μL 去离子水加入反应管中，同时设立正常男性阳性对照和空白对照及阴性对照。采用 ABI2720 进行完成扩增，反应条件为预变性 50 ℃10 min，95 ℃15 min，然后 94 ℃ 30 s，58 ℃ 60 s，72 ℃ 60 s 循环 35 次后，72 ℃延伸 10 min。PCR 反应结束后，扩增产物点样于 2%琼脂糖凝胶 110 V，60 min 水平电泳。采用上海培清全自动凝胶成像系统 JS-780 进行产物电泳后的分析。

1.3　统计学处理　采用 SPSS19.0 统计学软件，选用四格表 χ^2 检验比较患者和对照组 Y 染色体 AZF 基因微缺失检出率，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　染色体核型分析结果　120 例患者外周血核型分析，均未见明显异常。9 例为多态性表现，其余表型正常，核型分别为 46，XY（111 例）、46，XY，1qh＋（2 例）、46，XY，16qh＋（1 例）、46，XY，21pstk＋（3 例）、46，XY，15pstk＋（1 例）、46，XY，Y＝G（2 例）。

2.2　Y 染色体 AZF 微缺失检测结果

作者简介：曹金如，女，主管检验师，主要从事生物化学与分子生物学研究。

2.2.1 扩增体系有效性检测　所有研究对象标本均能检出 SRY 基因片段，证实实验中提取的 DNA 模板符合要求，扩增体系有效。同时以水为模板的阴性对照应无任何扩增条带。

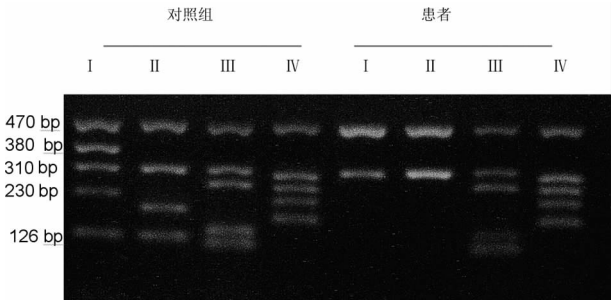
2.2.2 对照组 Y 染色体 AZF 微缺失检测结果　60 例对照组均扩增出所有的 19 个基因片段，空白对照及阴性对照未检出任何扩增片段。

表 1　男性 AZF 基因微缺失检测中扩增的 STS 位点、产物大小及对应区域

扩增管		目的基因检测片段				
Ⅰ管(紫色)	STS 位点	SRY	SY254	SY143	SY242	SY255
	产物大小(bp)	470	400	310	233	126
	区域	—	AZFc	AZFb	AZFc	AZFc
Ⅱ管(白色)	STS 位点	SRY	SY84	SY239	SY152	—
	产物大小(bp)	472	326	200	125	—
	区域	—	AZFa	AZFc	AZFc	—
Ⅲ管(蓝色)	STS 位点	SRY	SY86	SY127	SY145	SY124
	产物大小(bp)	472	320	274	140	109
	区域	—	AZFa	AZFb	AZFb/c	AZFb
Ⅳ管(黄色)	STS 位点	SRY	SY134	SY82	SY128	SY133
	产物大小(bp)	472	301	264	228	177
	区域	—	AZFb	—	AZFb	AZFb

—：无数据。

2.2.3 120 例患者 Y 染色体 AZF 微缺失检测结果　在本次研究中的 120 例患者中，23 例患者检出 Y 染色体 SY 239、SY242、SY254、SY255、SY152 位点缺失，表现为 AZFc 区缺失，检出率为 19.2%，未发现其他区域的位点缺失，PCR 产物电泳图见图 1。60 例对照组 Y 染色体微缺失基因检测 15 位点未见缺失。120 例患者 Y 染色体 AZF 微缺失检出率和对照组 Y 染色体 AZF 微缺失检出率差异有统计学意义($P<0.05$)



Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ分别为一次 AZF 微缺失检测的 4 管扩增产物。

图 1　健康男性和 Y 染色体 AZFc 基因微缺失患者微缺失检测产物琼脂糖凝胶电泳图

3　讨　论

世界上不育夫妇约占育龄夫妇的 10%～15%，而其中由于男性不育引起的占有 50%。男性不育与遗传因素有着密切的关系[1]。

染色体核型异常是常见的导致男性不育的遗传因素，主要表现为染色体数目和畸形等原因，Klinefelter 综合征(47，XXY)是临床最常见的男性型年功能低下疾病。但在本次分析中，所有的待检者均未见明显异常。

而自从 1976 年 Tiepolo 等[2]在显微镜下发现无精症的患者存在 Y 染色体长臂缺失以来，当前 Y 染色体 AZF 缺失研究已经成为男性临床学研究和临床诊断的热点。有资料表明，在遗传因素引起的男性不育中 Y 染色体微缺失的发生率占第 2 位[3]。1996 年 Voget 等[4]将 AZF 划分为三区 AZFa 区、AZFb 区、AZFc 区。AZFa 区主要负责精母细胞的生成。AZFb 区缺失表现为精子发育停滞在精母细胞阶段无成熟精子生成。AZFc 区候选基因有 DAZ、PRY、BPY2、TTY2、CDY 等。该区最重要的基因 DAZ 被称为无精子缺失基因[5-6]。

近年来国内相继开展了产前不孕咨询和 Y 染色体微缺失基因检测。作为一种遗传因素引起的疾病，往往存在种族和地域的差异表现[7]，因此广泛的在不同地区开展 AZF 基因微缺失检测具有重要的临床实践意义。目前国内不同地区报道的 AZF 基因微缺失情况均不同。谭建强等[8]通过对柳州地区 530 例性不育患者细胞遗传学与分子遗传学的分析发现 34 例存在 AZF 基因缺失，缺失率为 6.4%。郝胜菊等[9]通过对甘肃地区 373 例男性不育症患者进行 Y 染色体 AZFa，AZFb，AZFc 三个区域 6 个 STS 位点的微缺失检测，42 例发生了 STS 位点缺失，缺失率 11.3%。杨慧敏等[7]通过对 331 例男性不育患者进行微缺失分析发现 23 例患者微缺失，其中 11 例为 AZFc 区缺失，占缺失患者中的 47%。

本研究通过对 120 例男性不育患者进行外周血核型和 Y 染色体微缺失检测后分析发现，在本地区 Y 染色体 AZF 微缺失是造成男性不育的重要原因。在 120 例男性不育患者中有 23 例微缺失，均为 AZFc 区缺失，占此次分析对象中的19.2%。

AZFc 区的缺失是常见的 Y 染色体微缺失，患者表现为睾丸组织学表现为多样化，患者保留有精子生成能力，可以采取辅助生殖技术解决不孕[10]，目前，以试管婴儿和卵泡浆内单精子注射技术为治疗男性不育最有效的辅助生殖技术[11]，但是其缺失位点可以遗传下一代，这类患者在辅助生殖实验中建议选择女性为后代。

本次分析结果提示 Y 染色体上 AZFc 区微缺失是本地区男性不育患者的缺失热区。这与广州军区广州总医院的叶长灿，叶长灿等[12]报道符合。在本次分析中其他位点目前尚未检出缺失，不排除有其他 AZF 微缺失基因型的存在，是否存在还有待分析数量的扩大。Y 染色体 AZF 基因微缺失检测为男性不育的诊断以及后续辅助生殖治疗提供了(下转第 795 页)

B+)[17]。本研究显示，在 68 株艰难梭菌临床菌株中，67 株(98.5%)为产毒株，其中 64 株 *tcdA*、*tcdB* 均为阳性，为毒素 A+B+，3 株 *tcdA* 阴性、*tcdB* 阳性，为毒素 A−B+。这一结果表明悉尼地区流行的艰难梭菌产毒特性与其他地区菌株一样，以同时产毒素 A 和 B 为主。

总之，本研究表明悉尼地区分离的艰难梭菌基因型分布与北美和欧洲地区不同，有其自身的地区特异性，但菌株的产毒特性与其他地区相似，绝大部分均为毒素 A+B+。

参考文献

[1] Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of Clostridium difficile infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(3): 604-630.

[2] 何英. 艰难梭菌相关性腹泻的实验室诊断[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(7): 837-840.

[3] Pepin J, Valiquette L, Alary ME, et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity[J]. CMAJ, 2004, 171(1): 466-472.

[4] Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in north america and Europe[J]. Lancet, 2005, 366(2): 1079-1084.

[5] Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, et al. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12 Suppl 6: 2-18.

[6] Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of Clostridium difficile: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 431-437.

[7] Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of Clostridium difficile and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2): 461-463.

[8] Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex pcr targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcda (toxin a), and tcdb (toxin b) genes for toxigenic culture of clostridium difficile[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 5710-5714.

[9] Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Identification of toxin a-negative, toxin b-positive clostridium difficile by pcr[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2): 2178-2182.

[10] Huber CA, Foster NF, Riley TV, et al. Challenges for standardization of Clostridium difficile typing methods[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 2810-2814.

[11] He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated Clostridium difficile[J]. Nat Genet, 2013, 45(1): 109-113.

[12] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey[J]. Lancet, 2011, 377(9759): 63-73.

[13] Tenover FC, Akerlund T, Gerding DN, et al. Comparison of strain typing results for Clostridium difficile isolates from North America[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1831-1837.

[14] Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of Clostridium difficile infection in Asia[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2013, 2(1): 21.

[15] Ferguson JK, Cheng AC, Gilbert GL, et al. Clostridium difficile laboratory testing in Australia and New Zealand: national survey results and Australasian Society for Infectious Diseases recommendations for best practice[J]. Pathology, 2011, 43(1): 482-487.

[16] 罗珊. 艰难梭菌致病相关研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(19): 2575-2577.

[17] Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin a-negative, toxin b-positive clostridium difficile[J]. Int J Infect Dis, 2007, 11(1): 5-10.

(收稿日期：2014-11-08)

(上接第 792 页)

重要实验依据，在诊疗男性不育中具有重要意义。

参考文献

[1] 张伟伟，卓胜楠，张云山，等. 男性不育患者卵裂期胚胎 Y 染色体微缺失检测分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(11): 746-749.

[2] Tiepolo L, Zuffardi O. loclization of factors controlling Spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm[J]. Hum Genet, 1976, 34(2): 119-124.

[3] 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.

[4] Voget PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. human Y chromosome azoospermia factor(AZF) mapped to different subregions in Yq11 [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(7): 933-943.

[5] Gatta V, Raicu F, Ferlin A, et al. Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with without AZFc microdeletion[J]. Bmc Genomics, 2010, 11(1): 401-410.

[6] Kim B, Lee Y, KimY, et al. Polymorphic expression of DAZ proteins in the human testis[J]. Human Reprod, 2009, 24(6): 1507-1515.

[7] 杨慧敏，陈国武. 上海地区原发性男性不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失分析[J]. 检验医学, 2012, 27(6): 479-481.

[8] 谭建强，蔡稔. 柳州地区 530 例男性不育患者细胞遗传学与分子遗传学的分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(1): 18-20.

[9] 郝胜菊，冯暄，闫有圣. 甘肃部分地区 373 例男性不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失基因诊断的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(10): 43-45.

[10] Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microde-letion in a father and his four infertile sons[J]. Hum Reprod, 1999, 14(11): 2689.

[11] 阮健，贺小进，吴欢，等. 无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失分析[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(7): 702-704.

[12] 叶长灿，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.

(收稿日期：2014-12-18)