

论著·临床研究

无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失类型与不同分型下性激素水平差异分析

林 静,梁权辉,朱嫦琳,李炜煊

(佛山市第一人民医院检验科,广东佛山 528000)

摘要:**目的** 分析无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失类型与不同分型下性激素水平差异。**方法** 选取本院 2017 年 1 月至 2018 年 5 月收治的 293 例无精及严重少精症患者为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 的方法检测 Y 染色体无精子症因子(AZF),依据检测结果分为 Y 染色体微缺失组 21 例及 Y 染色体无微缺失组 272 例,统计无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失类型,并对不同 Y 染色体微缺失类型患者性激素水平进行比较。**结果** 293 例无精及严重少精症患者中 Y 染色体微缺失 21 例(7.17%),AZFc 缺失 12 例(57.14%)、AZFa 缺失 2 例(9.52%)、AZF(b+c)缺失 4 例(19.05%)、AZF(a+b+c)缺失 3 例(14.29%),AZF 微缺失位点检出率,c 区 61.29%,b 区 22.58%,a 区 16.13%,差异有统计学意义($P<0.05$);Y 染色体微缺失组促卵泡生成素(FSH)(19.49 ± 6.88)IU/L、促黄体生成素(LH)(8.17 ± 3.72)IU/L、睾酮(T)(12.48 ± 2.27)mmol/L,Y 染色体无微缺失组 FSH(9.91 ± 4.07)IU/L、LH(7.06 ± 2.35)IU/L、T(13.91 ± 4.43)mmol/L,FSH 差异有统计学意义($P<0.05$),LH、T 差异无统计学意义($P>0.05$);Y 染色体微缺失组内不同分型患者性激素相比较,AZF(a+b+c)缺失模式 FSH 和 LH 值升高最为显著,差异有统计学意义($P<0.05$),T 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失类型以 AZFc 缺失为主、AZFb 缺失次之、AZFa 缺失少见,FSH 水平在 Y 染色体微缺失患者中显著升高,其中 AZF(a+b+c)缺失模式 FSH 升高最为显著,通过检测 Y 染色体有无缺失可为辅助生殖及治疗提供强有力的帮助。

关键词: 无精; 严重少精症; Y 染色体微缺失; 性激素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.016

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2019)09-1086-04

文献标识码:A

Study on the relationship between the typing of Y chromosome microdeletion and the serum hormone levels in patients with azoospermia and severe oligozoospermia

LIN Jing, LIANG Quanhui, ZHU Changlin, LI Weixuan

(Department of Clinical Laboratory, Foshan First People's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract:**Objective** To analyze the relationship between the typing of Y chromosome microdeletion and the serum hormone levels in men with azoospermia and severe oligozoospermia. **Methods** 293 cases of azoospermia and severe oligozoospermia in the hospital from January 2017 to May 2018 were selected as the research objects. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect Y chromosome azoospermia factor (AZF). According to the results, all patients were divided into Y chromosome microdeletion group ($n=21$) and Y chromosome microdeletion-free group ($n=272$). The Y chromosome microdeletion types of azoospermia and severe oligospermia patients were counted and sex hormone levels in patients with different Y chromosome microdeletion types were compared. **Results** Among 293 azoospermia and severe oligozoospermia patients, 21 had Y chromosome microdeletion, the microdeletion rate was 7.17%, 12 had AZFc deletion (57.14%), 2 had AZFa deletion (9.52%), 4 had AZF(b+c) deletion (19.05%) and 3 had AZF(a+b+c) deletion (14.29%). The detection rate of AZF microdeletion sites was 61.29% in region c, 22.58% in region b and 16.13% in region a, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). In Y chromosome microdeletion group, follicle stimulating hormone (FSH) was (19.49 ± 6.88)IU/L, luteinizing hormone (LH) was (8.17 ± 3.72)IU/L, testosterone (T) was (12.48 ± 2.27)mmol/L. In Y chromosome microdeletion-free group, FSH was (9.91 ± 4.07)IU/L, LH was (7.06 ± 2.35)IU/L, T was (13.91 ± 4.43)mmol/L, and the difference of FSH level was statistically significant ($P<0.05$), but there was no statistical significance in LH

作者简介:林静,女,主管检验技师,主要从事分子诊断方面的研究。

本文引用格式:林静,梁权辉,朱嫦琳,等.无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失类型与不同分型下性激素水平差异分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1086-1089.

and T levels ($P>0.05$). Compared with the sex hormones of different types of patients in Y chromosome microdeletion group, the FSH and LH levels of AZF(a+b+c) deletion mode increased most significantly, and the difference was statistically significant ($P<0.05$) and there was no statistical significance in LH and T levels ($P>0.05$). **Conclusion** In azoospermia and severe oligozoospermia patients, the Y chromosome microdeletion is mainly AZFc deletion, followed by AZFb deletion and AZFa deletion. FSH level is significantly increased in Y chromosome microdeletion patients, especially in AZF(a+b+c) deletion mode. Detection of Y chromosome microdeletion can provide strong help for assisted reproduction and treatment.

Key words: azoospermia; severe oligozoospermia; y chromosome microdeletion; sex hormone

关于男性不育,世界卫生组织将其定义为夫妇同居 1 年以上且性生活期间未采取任何避孕措施,由男方因素所致的女性不孕^[1]。影响男性不育的因素众多,诸如性功能正常与否、输精管是否畅通、精子优良程度均为引发该病症的因素,以最后一个因素最为常见^[2-3]。现有研究指出,遗传缺陷为精子质量较差的重要诱因,而 Y 染色体微缺失在所有遗传因素中占有重要的地位^[4]。随着以试管婴儿、卵泡浆内单精子注射技术为代表的辅助生殖技术日臻成熟,对于基因缺陷引起的男性不育不再是一个不可解决的问题^[5],所以围绕 Y 染色体微缺失展开的研究成为一个全新的热点议题。本次研究围绕无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失类型与不同分型下性激素水平差异予以分析,探讨 Y 染色体微缺失检测在辅助生殖及治疗中的运用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2017 年 1 月至 2018 年 5 月收治的 293 例无精及严重少精症患者为研究对象,在患者知情同意下实施 Y 染色体 AZF 检测,依据检测结果分为 Y 染色体微缺失组 21 例及 Y 染色体无微缺失组 293 例。Y 染色体微缺失组患者年龄 23~45 岁,平均(30.14±6.26)岁;病程时间 1.5~5 年,平均(2.34±0.16)年;病症类型:无精症 5 例、严重少精症 16 例。Y 染色体无微缺失组患者年龄 22~44 岁,平均(29.20±5.24)岁;病程时间 1.2~5 年,平均(2.58±0.20)年;病症类型:无精症 89 例、严重少精症 183 例,均自愿参与本研究并签署知情同意书。纳入标准:(1)根据世界卫生组织发布的《男性实验室检测手册》,无精子症患者符合连续 2 次精液分析并离心后在沉淀中均未发现精子;严重少精子症患者符合连续 2 次精液分析结果为精子密度 $<5\times 10^6/\text{mL}$;(2)染色体核型正常者。排除标准:(1)弱精子症、精子无力症、精子数正常性不育者;(2)生理性不育者;(3)其他病理原因导致的男性不育者。两组无精及严重少精症患者在年龄等一般资料上比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 Y 染色体 AZF 检测方法 紫色 EDTA 抗凝管采集患者外周静脉血 2 mL,操作流程:(1)提取外

周血细胞基因组 DNA。(2)实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)试剂配制。(3)PCR 扩增。检测方法 PCR,采用荧光探针进行多重 PCR 扩增,具体检测缺失位点为:AZFa(sY84, sY86),AZFb(sY127, sY134),AZFc(sY254, sY255),AZFa, AZFb, AZFc 为 3 个独立的检测区域,对应 5 种缺失模式,分别为 AZFa, AZFb, AZFc, AZF(b+c), AZF(a+b+c),试剂盒由上海透景生命科技有限公司提供,所有步骤均严格按照试剂盒内说明书要求进行。使用的仪器设备为 Applied Biosystems ABI 7500 型定量 PCR 仪(Biolytic 美国),对 4 个通道荧光(FAM /VIC/ROX/ Cy5)同时进行检测。

1.2.2 性激素水平检测方法 黄色凝胶促凝管采集患者空腹静脉血 4 mL 并以 3 000 r/min 离心 15 min,收集血清后以电化学发光法进行性激素水平的测定,仪器设备为德国西门子拜耳公司生产的 ADVIA Centaur XP 全自动化学发光免疫分析仪,各指标生物参考区间:FSH 1.00~7.00(IU/L),LH 1.00~8.00(IU/L),T 9.10~46.20(mmol/L)。

1.3 观察指标 选取 Y 染色体微缺失位点和不同缺失模式以及性激素 FSH、LH、T 水平为观察指标。

1.4 统计学处理 本次研究中所有数据均采用 SPSS22.0 统计软件进行处理,数据进行正态性检验,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验;计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失位点和缺失模式构成 293 例无精及严重少精症患者中 Y 染色体微缺失 21 例(7.17%),缺失类型包括 AZFc 缺失 12 例(57.14%)、AZFa 缺失 2 例(9.52%)、AZF(b+c)缺失 4 例(19.05%)、AZF(a+b+c)缺失 3 例(14.29%),AZFc 区缺失率最高,次之 AZFb, AZFa 最低,差异有统计学意义($\chi^2=16.645, P<0.05$)。见表 1。

2.2 Y 染色体微缺失与性激素的关系

2.2.1 两组患者性激素水平比较 两组 FSH、LH、T 相比较,Y 染色体微缺失组 FSH 高于 Y 染色体无

微缺失组,差异有统计学意义($P<0.05$),LH、T 差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 Y 染色体微缺失位点和缺失模式例数及频率		
组别	<i>n</i>	频率(%)
缺失位点数目及频率		
a(sY84,sY86)	5	16.13
b(sY127,sY134)	7	22.58
c(sY254,sY255)	19	61.29
缺失模式例数及频率		
AZFc	12	57.14
AZFa	2	9.52
AZF(b+c)	4	19.05
AZF(a+b+c)	3	14.29

表 2 两组患者性激素水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	FSH(IU/L)	LH(IU/L)	T(mmol/L)
Y 染色体微缺失组	19.49±6.88	8.17±3.72	12.48±2.27
Y 染色体无微缺失组	9.91±4.07	7.16±2.34	13.09±4.43
<i>t</i>	9.787	1.813	0.624
<i>P</i>	<0.001	0.071	0.533

2.2.2 Y 染色体微缺失组内不同分型患者性激素水平比较 Y 染色体微缺失组内不同分型患者性激素水平相比较,FSH 和 LH 水平由高至低均依次为,AZF(a+b+c)缺失、AZF(b+c)缺失、AZFa 缺失、AZFc 缺失,AZF(a+b+c)缺失模式水平升高最为显著,差异有统计学意义($P<0.05$),T 水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 Y 染色体微缺失组内不同分型患者性激素水平比较($\bar{x}\pm s$)			
缺失模式	FSH(IU/L)	LH(IU/L)	T(mmol/L)
AZF(a+b+c)	40.98±5.84	22.12±6.14	10.03±4.33
AZF(b+c)	23.73±9.89	8.52±1.38	11.77±1.35
AZFa	17.89±2.64	6.99±2.58	13.81±1.60
AZFc	12.97±2.65	4.76±0.76	13.12±2.07
<i>F</i>	6.175	10.878	0.417
<i>P</i>	0.005	<0.001	0.743

3 讨 论

根据流行病学调查,目前全球范围内出现不育的育龄夫妇占比约为 10%~15%,而在此其中约有半数是由男方因素所致^[6-7]。既往临床认为核型异常、内分泌功能紊乱、长期接触环境毒物、生殖道病变、精索静脉曲张、睾丸等因素是导致男性不育的主要原因,但随着细胞遗传学以及分子生物学内容的不断拓展,位于 Y 染色体上的 AZF 基因日益引起医学界的重视与关注^[8]。该基因一旦存在缺失情形,势必会给男性

生育带来严重不利影响,引发无精或严重少精^[9]。尽管当前研究已经一致证实 Y 染色体微缺失为男性不育的重要诱因,但是关于具体的缺失机制却并未形成一致共识,绝大多数学者认为 Y 染色体独特的单倍体结构是导致 AZF 缺失的主要原因^[10]。理由如下:由于 Y 染色体为单倍体结构,自身不具有 DNA 修复能力,男性精子生成过程中胚细胞分裂尤为迅速,导致其与卵子结合时突变的风险更高,一旦某一个区域缺失就会给整个 Y 染色体带来不利影响^[11]。故 Y 染色体微缺失检测能够帮助临床确诊无精或严重少精症患者的根本病因,目前已经在欧美发达国家中成为常规的不孕检测项目^[12]。

AZFa、AZFb、AZFc 为 3 个独立的检测区域,KRAUSZ 等^[13]研究表明 AZFc 区域的缺失率发生最高,其次是 AZFb,AZFa 的检出率最低,据此该学者指出男性不育患者 Y 染色体 AZF 区微缺失是导致其不育的主要原因且关系十分紧密。本次研究通过对 293 例无精及严重少精症患者 Y 染色体 AZF 进行检测,结果发现 Y 染色体微缺失 21 例(7.17%),AZFc 缺失 12 例(57.14%)、AZFa 缺失 2 例(9.52%)、AZF(b+c)缺失 4 例(19.05%)、AZF(a+b+c)缺失 3 例(14.29%),AZFc 区缺失率最高,次之 AZFb,AZFa 最低,与现有研究成果基本吻合,均一致证实 AZFc 区域为 Y 染色体微缺失的主要类型以及热点缺失区域,但本文研究发现 b 位点单独缺失模式少见,常见联合 a 位点或者 c 位点出现联合缺失,其发生机制有待进一步研究。此外,本文研究证实,Y 染色体微缺失组 FSH 显著高于 Y 染色体无微缺失组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 LH、T 差异无统计学意义($P>0.05$),表明 Y 染色体微缺失将会导致患者生精能力下降,即便是生出的精子也并未发育成熟,使得下丘脑-垂体-性腺轴无法正常运转,能够抑制 FSH 的抑制素分泌严重不足,造成了 FSH 浓度的升高^[14]。Y 染色体微缺失组内不同分型的无精及严重少精症患者性激素水平相比较,AZF(a+b+c)缺失模式者 FSH、LH 水平显著高于其他缺失模式,差异有统计学意义($P<0.05$),T 差异无统计学意义($P>0.05$),提示不同 AZF 缺失分型与性激素中 FSH、LH 存在着密切的关联性。AZFa 区域的缺失者通常表现为支持细胞综合征(SCOS),为绝对的无精子症,供精成为其唯一选择,AZFb 区域缺失者表现为生精阻滞,精子生成被阻滞在精母细胞阶段,睾丸内几乎没有成熟精子形成,而 AZFc 区域缺失者尚存精子生成能力,但随着 FSH 的升高,精子数目呈进行性下降趋势,所以必须予以及早干预治疗或无创取精后冷冻保存^[15]。

4 结 论

无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失位点以 AZFc 区域缺失为主、AZFb 缺失次之、AZFa 缺失少

见;所形成的 5 种缺失模式中,又以 AZFb 单独缺失模式最为少见,常联合 a 位点或者 c 位点出现共同缺失。FSH 水平在 Y 染色体微缺失患者中显著升高,其中 AZF(a+b+c)缺失模式的 FSH 水平升高最为显著,通过检测 Y 染色体有无缺失可为辅助生殖及治疗提供强有力的帮助。

参考文献

- [1] 陈前. 不育男性染色体异常和 Y 染色体微缺失的相关性研究[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(32): 136-137.
- [2] 徐清华, 吴小华, 王琳琳, 等. 少、弱精子症及无精子症患者染色体多态性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(8): 71-73.
- [3] 肖宗辉, 汪惠琴, 张文金, 等. 少精子症患者 Y 染色体微缺失与否与单精子卵细胞胞浆内注射的相关性[J]. 中国性科学, 2017, 26(8): 105-107.
- [4] 陈竞茜, 马燕琳, 黎明红, 等. 4043 例男性不育患者 Y 染色体多态性观察[J]. 山东医药, 2017, 57(19): 74-76.
- [5] 杨帆, 林琳, 赵克温. 运用 MLPA 技术检测男性不孕患者 Y 染色体微缺失的临床应用[J]. 实用检验医师杂志, 2017, 9(1): 13-15.
- [6] DAUMLER D, CHAN P, LO K C, et al. Men's knowledge of their own fertility; a population-based survey examining the awareness of factors that are associated with male infertility [J]. Hum Reprod, 2016, 31(12): 2781-2790.
- [7] YUMURA Y, TSUJIMURA A, IMAMOTO T, et al. Nationwide survey of urological specialists regarding male infertility; results from a 2015 questionnaire in Japan[J]. Reprod Med Biol, 2018, 17(1): 44-51.
- [8] 郑毅春, 徐丽清, 梁嘉颖, 等. 优化处理技术对男性不育症

患者精子形态和 DNA 碎片指数的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(2): 231-234.

- [9] 赵亚梅, 刘建刚. 少精、无精症患者的染色体与性激素水平分析[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(16): 74-75.
- [10] 杨洋, 王树玉, 周丽颖, 等. PCR-荧光探针法检测严重少精子症或无精子症患者 Y 染色体微缺失的研究[J]. 中国性科学, 2016, 25(6): 123-126.
- [11] 段晋燕, 侯逸, 薛丹丹, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在男性不育患者 Y 染色体微缺失检查中的应用[J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(4): 312-316.
- [12] MISHIMA T, WATARI M, IWAKIY, et al. Miller - Dieker Syndrome with unbalanced translocation 45, X, psudic(17;Y)(p13;p11. 32) detected by fluorescence in situ hybridization and G - banding analysis using high resolution banding technique[J]. Congenit Anom, 2017, 57(2): 61-63.
- [13] KRAUSZ C, HOEFSLOOT L, SIMONI M, et al. EAA/ EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions; state-of-the-art 2013[J]. Andrology, 2014, 2(1): 5-19.
- [14] 何海洪, 周后钢, 陈艳清, 等. 626 例严重生精障碍男性染色体和无精子因子的研究分析[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(11): 1564-1568.
- [15] MASCARENHA M, THOMAS S, KAMATH MS, et al. Prevalence of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletion among men with severe semen abnormalities and its correlation with successful sperm retrieval [J]. J Hum Reprod Sci, 2016, 9(3): 187-193.

(收稿日期: 2018-09-28 修回日期: 2018-11-16)

(上接第 1085 页)

- et al. Low concentration toxic metal mixture interactions; Effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure [J]. Chemosphere, 2015, 132: 79-86.
- [15] ANOSHKINA Y, COSTAS-RODRIGUEZ M, SPEECK-AERT M, et al. Iron isotopic composition of blood serum in anemia of chronic kidney disease [J]. Metallomics, 2017, 9(5): 517-524.
- [16] SHUSTERMAN E, BEHARIER O, LEVY S, et al. Zinc transport and the inhibition of the L-type calcium channel are two separable functions of ZnT-1 [J]. Metallomics, 2017, 9(3): 228-238.
- [17] SCHLUETER N, LUSSI A, GANSS C, et al. L929 fibroblast bioassay on the in vitro toxicity of SnCl₂, H₃PO₄, Clearfil SE primer and combinations thereof [J]. Swiss Dent J, 2016, 126(6): 566-572.
- [18] JAILLON S, MOALLI F, RAGNARSDOTTIR B, et al. The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infec-

tion [J]. Immunity, 2014, 40(4): 621-632.

- [19] SHUKLA S K, RAO T S. Effect of calcium on Staphylococcus aureus biofilm architecture; a confocal laser scanning microscopic study [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 103(4): 448-454.
- [20] ROMAN A Y, DEVRED F, LOBATCHOV V M, et al. Sequential binding of calcium ions to the B-repeat domain of SdrD from Staphylococcus aureus [J]. Can J Microbiol, 2016, 62(2): 123-129.
- [21] USKOKOVIC V, DESAI T A. Simultaneous bactericidal and osteogenic effect of nanoparticulate calcium phosphate powders loaded with clindamycin on osteoblasts infected with Staphylococcus aureus [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 37: 210-222.
- [22] 刘劲松, 范震, 麻健丰, 等. 铍对口腔链球菌生长及黏附性能的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(12): 1091-1093.

(收稿日期: 2018-09-30 修回日期: 2018-11-18)