

关性的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(5):674-678.

[19] ZABORSKA B, SIKORA-FRAC M, SMARZ K, et al. The role of Galectin-3 in heart failure-the diagnostic, prognostic and therapeutic potential-where do we stand [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17):13111-13118.

[20] 莫秋萍, 卓柳安, 廖致红, 等. 血清 Gal-3、GDF-15、CK-MB 水平联合检测在急性心肌梗死并发恶性室性心律失常诊

断和预后评估中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(6):1128-1132.

[21] SHI Y, DONG G, LIU J, et al. Clinical implications of plasma Galectin-3 in heart failure with preserved ejection fraction: a meta-analysis [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9(1):854501-854509.

(收稿日期:2024-06-30 修回日期:2024-09-19)

• 短篇论著 •

Y 染色体 AZFc 区部分缺失与男性生精障碍的相关性研究

吴丹红¹, 郑双林¹, 黄吴键², 林炎鸿¹, 曾 健^{1△}

厦门大学附属东方医院/联勤保障部队第九〇〇医院:1. 基础医学实验室/福建省移植生物学重点实验室;2. 生殖医学中心, 福建福州 350025

摘要:目的 分析生精障碍人群中无精子症因子(AZF)c 区部分缺失的发生率,并探讨 AZFc 区部分缺失与生精障碍的相关性。方法 采用基于 5 个序列标签位点(STS)即 sY1197、sY1192、sY1191、sY1291 和 sY1189 的多重 PCR 法,对福建地区常规 Y 染色体微缺失筛查阴性的 491 例生精障碍患者(包括 383 例无精子症患者和 108 例严重少精子症患者),以及 114 例生精正常男性的 AZFc 区域进行检测和分析。结果 生精障碍组中, AZFc 区部分缺失率为 13.03%(64/491)。在无精子症组和严重少精子症组中, gr/gr 缺失(sY1291 和 sY1189 缺失)发生率均最高,分别为 5.48%(21/383)和 8.33%(9/108)。在生精正常组中, b2/b3 缺失(sY1192 和 sY1191 缺失)发生率最高,为 4.39%(5/114)。严重少精子症组与生精正常组 gr/gr 缺失发生率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。b2/b3 缺失发生率在各生精障碍组与生精正常组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 gr/gr 缺失提示生精障碍风险, b2/b3 缺失可能对生精障碍无明显影响,属于基因组多态性。

关键词: Y 染色体微缺失; 产前诊断; AZFc 部分缺失

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.02.025

文章编号:1673-4130(2025)02-0250-04

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

男性不育的致病因素众多,其中由遗传缺陷引发的生精障碍是男性不育的主要原因^[1]。研究表明, Y 染色体无精子症因子(AZF)区微缺失是男性原发性生精障碍的第二大遗传因素^[2]。AZF 分为 AZFa、AZFb 和 AZFc 3 个区域,其中 AZFc 区缺失的发生率最高,患者生精表型差异性最大^[3]。由于 AZFc 几乎由扩增子重复序列构成,因此容易通过非等位基因同源重组(NAHR)的方式造成片段不同程度的缺失。根据不同扩增子序列的同源重组形式, AZFc 缺失可分为 b2/b4 缺失、gr/gr 缺失、b2/b3 缺失和 b1/b3 缺失^[2],其中 b2/b4 缺失是 AZFc 区完全缺失,一般导致严重的精子发生障碍, gr/gr 缺失、b2/b3 缺失和 b1/b3 缺失属于 AZFc 区部分缺失亚型。目前, AZFc 区部分缺失与生精障碍表型之间的关联性仍存在争议。欧洲男科学协会/欧洲分子遗传质量协作网(EAA/EMQN)指南推荐使用 6 个序列标签位点(STS)常规检测 Y 染色体微缺失^[2],但该微缺失筛查无法检测 AZFc 部分缺失。本研究对本院生殖医学

中心就诊的常规 Y 染色体微缺失筛查结果阴性的生精障碍患者进行 AZFc 区部分缺失的多重 PCR 检测,探讨 AZFc 区部分缺失与生精障碍之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月至 2020 年 12 月就诊于本院生殖中心的男性生精障碍患者 491 例的临床资料,平均年龄(30.4±5.4)岁。按照世界卫生组织(WHO)《人类精液检查与处理实验室手册》及《少精子症诊疗中国专家共识》分类标准^[4-5]将其分为无精子症组(精液经过离心沉淀未见精子, 383 例)和严重少精子症组(精液中有精子,但精子浓度小于 5×10^6 /mL, 108 例)。生精障碍组纳入标准:基于常规 Y 染色体微缺失筛查^[2]结果为阴性。排除标准:外周血染色体核型异常;临床检查为泌尿生殖道感染、隐睾症、输精管阻塞、囊性纤维化等生精障碍继发性因素。另选取同期就诊于本院的 114 例已育 1 个以上健康后代且精液常规正常(精子浓度大于 15×10^6 /mL)的健康体检男性纳入生精正常组,平均年龄(35.2±

△ 通信作者, E-mail: zengjian1980222@163.com。

8.0)岁。所有受试者均来自中国福建地区汉族人群,均知情并签署相关知情同意书。本研究已通过本院伦理委员会审查。

1.2 方法

1.2.1 碘化钾法提取外周血 DNA

抽取受试者外周血 2 mL,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,将血标本混匀,取 400 μ L 于 EP 管内。加灭菌水 950 μ L,离心,弃上清,加入 KI 溶液 70 μ L 混匀,加入 350 μ L 生理盐水,460 μ L 异戊醇:三氯甲烷混合液(1:24),振荡离心,将上清转至新的 EP 管中,加入 190 μ L 异丙醇上下颠倒至可见絮状沉淀。离心弃上清,加入 1 mL 无水乙醇,再次离心弃上清,待乙醇彻底挥发后加入适量无菌水溶解 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 多重 PCR 法检测 AZFc 区部分缺失

对 DNA 样本的 5 个 STS 位点(sY1197、sY1192、sY1191、sY1291 和 sY1189)进行多重 PCR 检测。AZFc 区结构和各 STS 位点分布参考 AZFc 区结构和相关 STS 位点分布示意图^[1,6-7]。sY1197、sY1192、sY1191、sY1291 和 sY1189 位点的 PCR 引物序列和反应条件分别参考网址(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)GenBank 编号 G67168、G67166、G73809、G72340 和 GF102061。实验设计两个多重 PCR 扩增体系:扩增体系 I 包含 sY1197、sY1191 和 sY1291;扩增体系 II 包含 sY1192、sY1189 和内参对照锌指蛋白基因 ZFX/Y。同时,将灭菌水设为空白对照,正常男性设为阳性对照。PCR 扩增结束后,将反应产物进行

琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像仪内分析电泳条带结果,判断标准:gr/gr 缺失型为仅有 sY1291 和 sY1189 缺失;b2/b3 缺失型为仅有 sY1192 和 sY1191 缺失;b1/b3 缺失型为 sY1191、sY1197 和 sY1291 3 个 STS 位点的联合缺失。条带缺失者,将该位点进行单独扩增,重复 3 次 PCR 扩增以确认结果。

1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS25.0 研究数据进行分析。计数资料采用例数或百分率表示,采用比值比(OR)评估 AZFc 部分缺失亚型与各生精组的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 AZFc 区部分缺失类型及发生率

对来自福建地区的 491 例生精障碍患者进行检测,共检出 64 例 AZFc 区部分缺失,总发生率约占 13.03%(64/491);其中,gr/gr 缺失发生率最高[6.11%(30/491)],b2/b3 缺失发生率次之[4.68%(23/491)],b1/b3 缺失发生率仅为 0.20%(1/491),其他特殊类型缺失率为 2.03%(10/491),包括 sY1189 单独缺失 2 例,sY1192 单独缺失 4 例,sY1189 和 sY1192 两位点联合缺失 1 例,以及 sY1192、sY1197、sY1189、sY1191 四位点联合缺失 3 例。在无精子症组和严重少精子症组中,gr/gr 缺失发生率均最高,b2/b3 缺失次之;生精正常组中,b2/b3 缺失发生率最高。各组 AZFc 区部分缺失类型及缺失率见表 1,部分缺失亚型电泳结果见图 1。

表 1 各组 AZFc 部分缺失情况[% (n/n)]

组别	n	gr/gr 缺失亚型	b2/b3 缺失亚型	b1/b3 缺失亚型	其他部分缺失亚型
生精正常组	114	1.8(2/114)	4.4(5/114)	—	2.6(3/114)
无精子症组	383	5.5(21/383)	4.7(18/383)	0.3(1/383)	2.1(8/383)
严重少精子症组	108	8.3(9/108)*	4.6(5/108)	—	1.9(2/108)

注:与生精正常组比较, $t=5.097$,* $P=0.024$;—表示无数据。

2.2 各类 AZFc 部分缺失亚型与生精障碍的关系

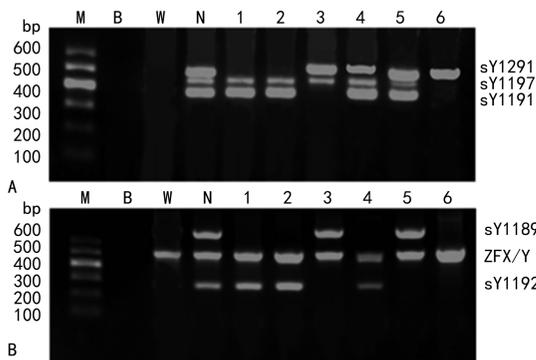
对各组 gr/gr 缺失和 b2/b3 缺失的数据进行统计学分析以明确这两类 AZFc 部分缺失类型对精子生成的影响。严重少精子症组中的 gr/gr 缺失发生率显著

高于正常生精组($P < 0.05$),但无精子症组与正常生精组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),而 b2/b3 缺失在任意两个实验组之间均差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 gr/gr 或 b2/b3 缺失与生精障碍的关系

组别	gr/gr 缺失率[% (n/n)]	OR(95%CI)	b2/b3 缺失率[% (n/n)]	OR(95%CI)
正常生精组	1.75(2/114)	1.000	4.39(5/114)	1.000
无精子症组	5.48(21/383)	3.249(0.750~14.070)	4.70(18/383)	1.075(0.390~2.962)
严重少精子症组	8.33(9/108)	5.091(1.074~24.126)*	4.63(5/108)	1.058(0.298~3.763)

注:与正常生精组相比, $Z=2.020$,* $P=0.040$ 。



注:A为PCR体系I;B为PCR体系II;M表示Maker;B为空白对照;W表示正常女性;N表示正常男性;泳道1和2表示gr/gr缺失患者;泳道3表示b2/b3缺失患者;泳道4表示sY1189位点缺失患者;泳道5表示sY1192位点缺失患者;泳道6表示sY1189+sY1191+sY1192+sY1197位点联合缺失患者。

图1 基于5个STS位点的多重PCR产物电泳图

3 讨论

迄今为止,AZFc区是具有最长回文序列的基因组结构,这种结构特殊性促使AZFc区更易出现各种不同类型的缺失^[2]。除了发生率最高的AZFc区完全缺失(b2/b4),AZFc区部分缺失常见类型主要为gr/gr、b2/b3和b1/b3。有研究指出,相较于正常生精男性而言,gr/gr缺失在无精子症或少精子症患者中更常见,是精子发生障碍的重要危险因素^[8-9]。同时也有研究者提出相反的结论,他们认为虽然gr/gr缺失频率在不育男性中发生率较高,但在生精障碍患者和正常男性对照间差异并无统计学意义^[10-11]。总之,gr/gr缺失与生精障碍之间的相关性,目前还存在争议。

在本研究中,gr/gr缺失在生精障碍组中最为常见,且严重少精子症组的gr/gr缺失发生频率显著高于正常生精组,这表明,gr/gr缺失可能提升了生精障碍风险。另外,本研究还发现,gr/gr缺失在无精子症组与正常生精组间无明显差异,推测gr/gr缺失可能有削弱但非完全丧失精子发生功能。研究表明,DAZ基因是AZFc区最为关键的生精障碍候选基因^[3]。因此推测gr/gr缺失中残留的DAZ基因拷贝在生精障碍中发挥了一定程度的补偿作用。

目前,b2/b3缺失对生精功能的影响尚不清晰。多数学者认为b2/b3缺失对男性的生育能力无直接影响,出现概率也较gr/gr缺失低,但另有学者认为b2/b3缺失与原发男性不育有显著相关^[10-12]。本研究发现正常生精组的b2/b3缺失发生率与各病例组的发生率差异无统计学意义($P > 0.05$),这提示b2/b3缺失的出现可能属于遗传多态性,对精子生成无明显影响。本研究认为,造成上述结论差异化的因素很多,如样本容量差异、检测手段差异或更新迭代,以及种族和地域的特征性差异等^[6,13-14]。b1/b3缺失较为罕见,受困于检出率(如本研究仅检出1例),暂

未有确切证据表明b1/b3缺失与男性生育能力具有相关性。

得益于检测技术的发展,除上述常见的AZFc部分缺失类型外,在无精子症或严重少精子症患者中还发现了新的AZFc部分缺失类型,新类型的产生可能是新的断裂位点删除了回文结构P3所致^[15]。本研究亦检出几种特殊的AZFc部分缺失类型,包括标签位点的单独缺失或多个位点联合缺失类型。新类型的检出反映了非等位基因同源重组是个复杂的过程,虽有文章指出罕见的缺失型可能是通过微同源重组方式产生^[15-16],但其产生原因、致病机制和临床意义仍需进一步研究。

目前,虽然对生精障碍男性开展AZFc区部分缺失常规筛查的时机还不成熟,但这类检测对原发性无精子症和严重少精子症患者进行辅助生殖预后有一定意义。首先,开展AZFc区部分缺失常规筛查,将有效避免无明显诱因的原发性生精障碍患者进行“大撒网”检查,较大程度地减轻患者身心和经济负担。另外,AZFc部分缺失的遗传特征会垂直传递给男性后代,进行AZFc区部分缺失筛查有助于患者选择辅助生殖技术孕育后代时,通过选择孕育女性子代,从而避免男性后代遭遇不育症困扰。

综上所述,综合分析国内外相关研究发现,该领域的研究数据受样本量、地域、种族及基因多态性影响较大,样本容量较小、代表性不强是该领域研究人员共同面临的难题。因此,收集更多地区和种群的数据,开展样本数据丰富的分子流行病学调查,无疑是AZFc部分缺失领域乃至其他遗传病研究努力的方向。

参考文献

- [1] PINHO A, BARROS A, FERNANDES S. Clinical and molecular characterization of Y microdeletions and X-linked CNV67 implications in male fertility: a 20-year experience[J]. *Andrology*, 2020, 8(2): 307-314.
- [2] KRAUSZ C, COSTA P N, WILKE M, et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state of the art 2023[J]. *Andrology*, 2024, 12(3): 487-504
- [3] JIANG W, XIE Q, LI X, et al. Y chromosome AZFc microdeletion may have negative effect on embryo euploidy: a retrospective cohort study[J]. *BMC Med Genomics*, 2023, 16(1): 324.
- [4] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen[R], 6th ed. Switzerland, Geneva: World Health Organization, 2021.
- [5] 熊承良, 谷翔群, 康跃凡. 少精子症诊疗中国专家共识[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2021, 41(7): 586-395.

- [6] LARDONE MC, ORTEGA V, ORTIZ E, et al. Partial-AZFc deletions in Chilean men with primary spermatogenic impairment: gene dosage and Y-chromosome haplogroups[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37(12): 3109-3119.
- [7] LIU X, LI Z S, SU Z, et al. Novel Y-chromosomal microdeletions associated with non-obstructive azoospermia uncovered by high throughput sequencing of sequence-tagged sites (STSs)[J]. Sci Rep, 2016; 6: 21831
- [8] YANEZ J R, MONTOYA R S, GONZALEZ E P. AZFa, AZFb, AZFc and gr/gr Y-chromosome microdeletions in azoospermic and severe oligozoospermic patients, analyzed from a neural network perspective[J]. Cir Cir, 2022, 90(2): 202-209.
- [9] BUNYAN D J, SARAN M, HOBBS J I. Apparent homozygosity for a gr/gr AZFc deletion in a 47, XYY man with oligozoospermia and secondary infertility[J]. J Reprod Infertil, 2022, 23(4): 296-302.
- [10] RABINOWITZ M J, HUFFMAN P J, HANEY N M, et al. Y-chromosome microdeletions: a review of prevalence, screening, and clinical considerations[J]. Appl Clin Genet, 2021, 14: 51-59.
- [11] ROGERS M J. Y chromosome copy number variation and its effects on fertility and other health factors: a review
- [J]. Transl Androl Urol, 2021, 10(3): 1373-1382.
- [12] LIU C L, ZHAO X Y, MU C L, et al. The association of partial azoospermia factor C deletions and male infertility in Northwestern China[J]. Hum Hered, 2019, 84(3): 144-150.
- [13] ATAEI M, AKBARIAN F, TALEBI M A, et al. Analysis of partial AZFc (gr/gr, b1/b3, and b2/b3) deletions in Iranian oligozoospermia candidates for intracytoplasmic sperm injection (ICSI)[J]. Turk J Med Sci, 2018, 48(2): 251-256
- [14] COLACO S, MODI D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 14.
- [15] HIBI H, SUGIE M, SONOHARA M, et al. Infertility treatment for patients having a microdeletion of azoospermic factor (AZF)[J]. Nagoya J Med Sci, 2023, 85(2): 233-240.
- [16] RANI D S, RAJENDER S, PAVANI K, et al. High frequencies of non-allelic homologous recombination (NAHR) events at the AZF loci and male infertility risk in Indian men [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6276.

(收稿日期: 2024-07-19 修回日期: 2024-09-09)

• 短篇论著 •

2 型糖尿病患者血清 SP1 和 Robo4 水平与糖尿病视网膜病变的关系

常青青, 尚绪丽

山东第一医科大学附属人民医院内分泌代谢病科, 山东济南 271100

摘要:目的 探讨 2 型糖尿病(T2DM)患者血清特异性蛋白 1(SP1)和 Roundabout4(Robo4)表达与糖尿病视网膜病变(DR)的关系。方法 选取 2019 年 1 月至 2022 年 1 月在该院住院治疗的 80 例 DR 患者(DR 组)和 60 例无 DR 的 T2DM 患者(无 DR 组)作为研究对象,根据眼底检查结果将 DR 患者分为非增殖性 DR 组(49 例)和增殖性 DR 组(31 例)。收集各组基线资料及血清 SP1 和 Robo4 水平等实验室检查数据。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 SP1、Robo4 水平对 T2DM 患者发生 DR 的诊断价值,采用多因素 Logistic 回归分析 T2DM 患者发生 DR 的影响因素。结果 无 DR 组、非增殖性 DR 组和增殖性 DR 组体重指数、糖尿病病程、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹血糖(FPG)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)及血清 SP1、Robo4 水平依次升高,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平依次降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,血清 SP1、Robo4 单独及联合预测 T2DM 患者发生 DR 的曲线下面积(AUC)分别为 0.852、0.907、0.947。多因素 Logistic 回归分析结果显示,SP1、Robo4、FPG、HOMA-IR 均是影响 T2DM 患者发生 DR 的危险因素($P < 0.05$)。结论 血清 SP1、Robo4 高表达可能增加 T2DM 患者 DR 的发生风险,二者有望作为预测 T2DM 患者发生 DR 的辅助指标。

关键词: 2 型糖尿病; 糖尿病视网膜病变; 特异性蛋白 1; Roundabout4

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.02.026

中图法分类号: R587.2; R446.1

文章编号: 1673-4130(2025)02-0253-04

文献标志码: A

2 型糖尿病(T2DM)是一种代谢性疾病,糖尿病视网膜病变(DR)是其并发症之一。DR 以视网膜血管改变为病理特征,威胁患者的视觉健康。尽管目前

已经使用多种方式治疗 DR,但发病率仍在上升^[1-2]。特异性蛋白 1(SP1)是一种核转录因子,具有调节基因转录的功能。Robo4 是一种在脉管系统中特异性