

男性不育患者 Y 染色体微缺失和染色体核型的研究

张思 范舒舒 黄文波 苗淑红 马占忠*

(汕头大学医学院附属粤北人民医院 生殖医学中心, 广东 韶关 512026)

【摘要】 目的 探讨男性不育患者中 Y 染色体微缺失、染色体核型异常与男性精液质量的关系, 为男性不育患者的临床治疗和选择合理的生殖辅助技术以及优生优育提供科学依据。**方法** 回顾性分析 2019 年 1 月至 2023 年 12 月于汕头大学医学院附属粤北人民医院生殖医学中心就诊的男性不育患者 210 例, 分为无精子症组、严重少精子症组、少精子症组。同期 36 例健康男性为对照组。所有患者均进行精液常规分析, 采用 PCR 荧光探针法进行 Y 染色体微缺失检测和 G 显带技术进行染色体核型分析。**结果** 210 例不育男性中检出 11 例 Y 染色体微缺失异常, 29 例染色体核型异常, 染色体正常多态性 3 例, 1 例无精患者 *CFTR* 基因杂合突变。其中最常见异常染色体核型为 47, XXY, 检出 14 例。36 例健康对照组中有 3 例染色体正常多态性。男性不育组和健康对照组在 Y 染色体微缺失和染色体核型异常检出率存在显著差异。**结论** Y 染色体微缺失和染色体核型异常是男性不育的重要因素。孕前进行遗传学检查, 有助于患者诊断治疗和选择合理的生殖辅助技术, 为优生优育提供科学依据。

【关键词】 男性不育; Y 染色体微缺失; 染色体核型; 优生优育

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

Study on Y chromosome microdeletion and karyotype in male infertile patients

Zhang Si, Fan Shushu, Huang Wenbo, Miao Shuhong, Ma Zhanzhong*

(Reproductive Medicine Center, Northern Guangdong People's Hospital Affiliated to Shantou University School of Medicine, Shao Guan 512026, Guangdong, China)

【Abstract】 Objective To explore the relationship between Y chromosome microdeletions, karyotypes and male semen quality in male infertile patients, so as to provide scientific basis for the clinical treatment of male infertile patients and the selection of reasonable reproductive assistance techniques and eugenics.
Methods Retrospective analysis of 210 male infertile patients who visited the Reproductive Medicine Center of Northern Guangdong People's Hospital from January 2019 to December 2023, divided into azoospermia group, severe oligozoospermia group, and oligozoospermia group. 36 healthy males were selected as the control group during the same period. All patients underwent routine semen analysis, and using PCR fluorescent probe method for Y chromosome microdeletion and G-banding techniques for chromosome karyotype analysis. **Results** Among 210 infertile males, 11 cases of Y chromosome microdeletion abnormalities, 29 cases of chromosomal karyotype abnormalities, 3 cases of chromosomal normal polymorphism, and 1 case of *CFTR* gene heterozygous mutation were detected. The most common abnormal chromosome karyotype among them is 47, XXY, with 14 cases detected. Among the 36 healthy control groups, 3 cases had normal chromosomal polymorphisms. There were significant differences in the Y chromosome microdeletions and karyotype abnormalities between the male infertile group and the

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2024.02.006

* 通信作者: 马占忠, E-mail: mazhanzhong816@163.com

healthy control group. **Conclusion** Y chromosome microdeletions and chromosomal karyotypes abnormalities are important factors in male infertility. Conducting genetic testing before pregnancy can help patients diagnose, treat and choose appropriate reproductive assistance techniques. Provide scientific basis for eugenics.

【Key words】 Male infertility; Y chromosome microdeletion; Karyotype; Eugenics

先天性精子生成障碍、激素紊乱、泌尿生殖系统结构异常等均可导致男性不育的发生^[1-2]。克氏综合征(47,XXY)和Y染色体微缺失是男性少精、无精的常见遗传学病因,但部分无精子症、少精子症患者的染色体核型及Y染色体微缺失未见异常,可能存在其他遗传学病因^[3]。因此,对不育男性进行遗传学筛查,有助于明确病因和选择合适的诊疗或辅助生殖方案。基于此,本研究探讨男性不育患者中Y染色体微缺失、染色体核型异常与男性精液质量的关系,为男性不育患者的临床诊断、治疗和选择合理的辅助生殖技术以及优生优育提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2019年1月至2023年12月在本院就诊的210例男性不育患者的临床资料,按WHO《人类精液检查与处理实验室手册》第5版^[4]进行浓度分级。其中无精子症91例,严重少精子症62例,少精子症57例。将同期体检的36例健康男性作为对照组。所有对象均进行精液常规分析、Y染色体微缺失和染色体核型分析。本研究通过汕头大学医学院附属粤北人民医院医学伦理委员会批准(YBEC-KY-2024-009),并签署知情同意书。

1.2 纳入标准 纳入标准:①男性,年龄24~55周岁;②均进行Y染色体微缺失、染色体核型检查,和至少2次精液检查的男性。排除标准:①因内分泌紊乱、炎症、肿瘤及化疗后导致的精液异常的患者;②精索静脉曲张的患者;③结扎患者;④不愿参与研究的患者。

1.3 方法

1.3.1 精液常规分析: 患者采用自慰法获取完整精液于无菌采集杯中,待精液液化后于CFT-9201型精子质量检测分析系统(江苏瑞祺生命科学仪器有限公司)进行精子浓度检测。检测结果按WHO

《人类精液检查与处理实验室手册》第5版分组,正常:精子浓度 $\geq 15 \times 10^9/L$;少精子症:精子浓度为 $(5 \sim 15) \times 10^9/L$;严重少精子症:精子浓度 $< 5 \times 10^9/L$;无精子症组:若是无精子症标本,应取1ml精液以3000g离心15分钟,去掉上清液后混匀沉淀物,取10 μ l沉淀悬液于显微镜下查找,如未观察到精子则报告“离心后未见精子”。

1.3.2 Y染色体微缺失检测: 无菌条件下采集患者外周静脉血2~3ml,EDTA-K2抗凝。使用Y染色体微缺失检测试剂盒(PCR-荧光探针法,上海透景生命科技股份有限公司)检测Y染色体AZFa、AZFb、AZFc 3个区的缺失状态,每个区域分别以两个序列标签位点(sequence tag site, STS)为代表。AZFa区: sY84和sY86;AZFb区: sY127和sY134;AZFc区: sY254和sY255。判断AZFa、AZFb、AZFc三个区域六个序列标签位点的微缺失,同时设置两个内参照基因:男性性别决定基因SRY和编码锌指蛋白基因ZFX/ZFY。在全自动医用荧光定量PCR分析系统(西安天隆科技有限公司Gentier 96E)进行扩增,PCR扩增反应条件为:50 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 15s; 60 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 30s,进行38个循环;72 $^{\circ}$ C, 5 min。收集60 $^{\circ}$ C的FAM/VIC/ROX/Cy5通道的荧光信号。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。

1.3.3 染色体核型分析: 无菌条件下采集患者外周静脉血2~3ml,肝素抗凝。接种至5ml细胞培养基(广州拜迪生物科技有限公司),置于CO₂恒温培养箱(美国赛默飞世尔科技有限公司Thermo3111)37 $^{\circ}$ C培养72h,培养收获前1h用7号针头加6滴20 μ g/ml秋水仙素于培养瓶中,继续培养。取出培养瓶,将培养液转入离心管中,2000rpm离心5分钟,去上清液。每管加入37 $^{\circ}$ C预热的

0.075M KCL低渗液 8ml,用吸管吹打均匀,放入 37℃水浴中低渗 40 分钟。常规染色体制片和 G 显带,在自动染色体核型扫描分析系统(德国蔡司 Imager. z2)中常规计数 20 个分裂相,分析 5 个 G 带核型,如遇嵌合体加倍计数和分析。参照《人类细胞遗传学国际命名体制 2017》描述核型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计数资料以 n(%)表示,采用 χ^2 检验比较各组染色体异常检出率和 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 Y 染色体微缺失检测结果 210 例男性不育患者中 Y 染色体微缺失者共检出 11 例(5.2%,11/210),其中无精子症 5 例(2.4%,5/210),严重少精子症 6 例(2.8%,6/210);少精子症及 36 例健康对照组中未检出 Y 染色体微缺失。最常见的是 AZFc 区缺失,占微缺失的 72.7%(8/11);2 例 AZFbc 区缺失,占微缺失 18.2%(2/11);1 例 AZFb 区缺失,占微缺失 9.1%(1/11)。有 1 例 AZFbc 区微缺失合并核型正常多态性(46,X,Yqh-),见表 1 和图 1~图 2。对男性不育组及健康对照组的 Y 染色体微缺失结果采用 Fisher 确切概率法分析,发现各组别的微缺失异常检出率存在显著性差异(P<0.05),见表 2。

表 1 男性不育症组和健康对照组 Y 染色体微缺失

组别	例数	结果分析(例)			合计
		AZFb 缺失 AZFb	AZFc 缺失 AZFc	AZFbc 缺失 AZFbc	
无精子症	91	1	2	2	5
严重少精子症	62	0	6	0	6
少精子症	57	0	0	0	0
健康对照组	36	0	0	0	0
合计	246	1	8	2	11

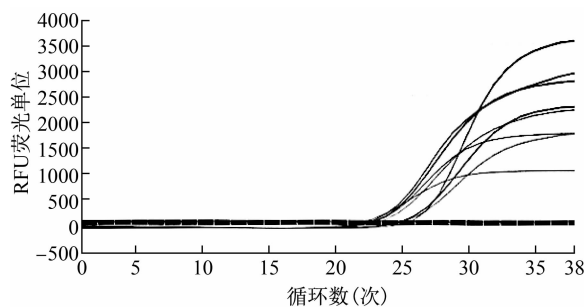


图 1 健康男性 AZF 基因 PCR 扩增曲线

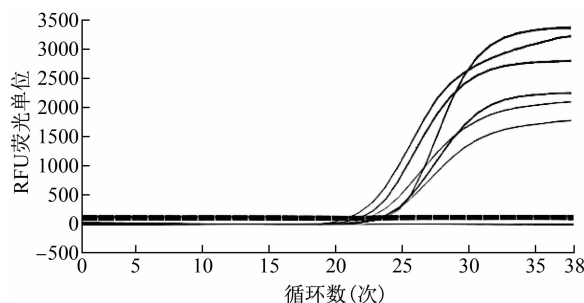


图 2 不育男性 AZFc 区缺失 PCR 扩增曲线

表 2 各组别微缺失 Fisher 检验结果

结果	无精子症组 [例(%)]	严重少精子症组 [例(%)]	少精子症组 (例)	健康组 (例)	总计 (例)	Fisher 值	P 值
缺失	5(5.5)	6(9.7)	0	0	11	7.667	0.032
正常	86(94.5)	56(90.3)	57	36	235		
总计	91(100)	62(100)	57	36	246		

2.2 染色体核型分析结果 210 例男性不育患者中共检出染色体异常 29 例(13.8%,29/210),正常多态性 3 例(1.4%,3/210);其中以克氏综合征(47,XXY)最为常见,占染色体异常 48.3%(14/29)。无精子症中染色体异常 19 例(9.0%,19/210),正常多态性 2 例(0.9%,2/210);严重少精子症中染色体异常 4 例(1.9%,4/210),正常多态性 1 例(0.5%,1/210);少精子症中染色体异常 6 例(2.9%,6/210)。健康对照组核型正常多态性 3 例(8.3%,3/36),具体见表 3 和图 3~图 6。对不育男性及健康对照组

的染色体核型结果采用 χ^2 检验分析,发现各组别的核型异常检出率存在显著性差异(P<0.05),见表 4。

3 讨论

男性不育的因素众多,精液常规是评估男性生育力的临床一线方法。无精子症可以分为梗阻性无精子症和非梗阻性无精子症。梗阻性病因占有无精子症病例的 40%,可能是由于男性生殖道的特发性或医源性梗阻^[5]。非梗阻性无精子症(non-obstructive azoospermia, NOA)可进一步细分为辜

表 3 男性不育症患者及健康对照组染色体核型分析结果(例)

分类	染色体核型	无精子症 (n=91)	严重少精子症 (n=62)	少精子症 (n=57)	健康对照 (n=36)
性染色体异常	47,XXY	14	0	0	0
	47,XXY[96]/46,XY[4]	0	1	0	0
	45,X[47]/46,X,i(Y)(q10)[36]	1	0	0	0
	46,X,inv(Y)(p11.1q11.23)	1	0	0	0
	46,XY,inv(Y)(p11.2q11.23)	1	0	0	0
	46,X,inv(Y)(p11q11)	0	0	1	0
常染色体异常	46,XY,inv(6)(p23q21)	0	0	1	0
	46,XY,inv(1)(p21p32)	0	1	0	0
	46,XY,inv(9)(p11q13)	1	1	2	0
	46,XY,inv(8)(q22q24.3)	1	0	0	0
	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	0	0	1	0
	常染色体+性染色体异常	46,XY,t(7;14)(q11.1;p11.1)[3]/46,XY[97]	0	1	0
	46,X,Yqh+,t(20;22)(q13.3;q11.2)	0	0	1	0
总计	—	19	4	6	0

注:男性不育组有 3 例检出染色体正常多态性,其中无精子症组发现 1 例 46,X,Yq-,1 例 46,X,Yqh-,严重少精子症发现 1 例 46,XY,16qh+。健康对照组中检出 3 例染色体正常多态性,分别为 2 例 46,X,Yq-和 1 例 46,X,Yqh-。

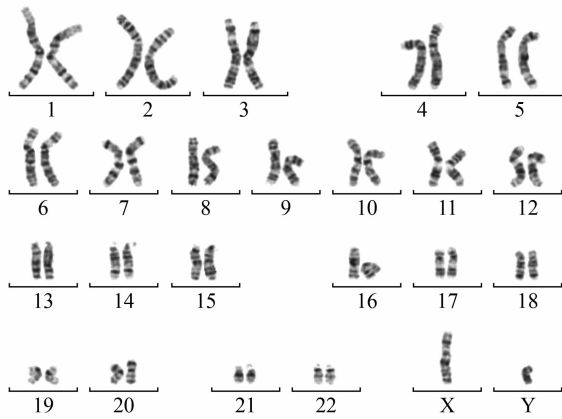


图 3 健康男性染色体核型图谱

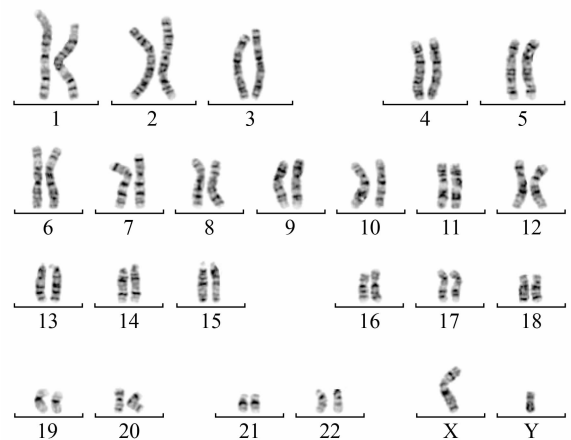


图 5 异常核型 46,X,inv(Y)(p11.1q11.23)图谱

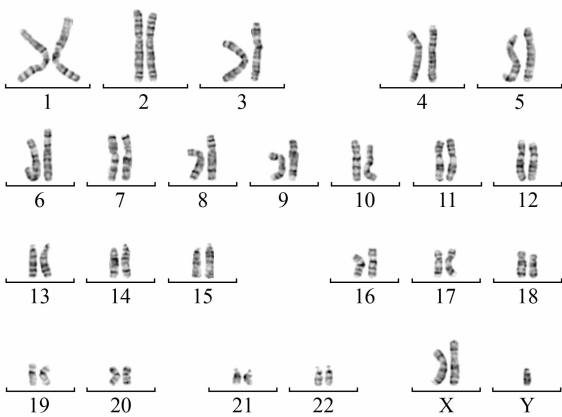


图 4 克氏综合征(47,XXY)染色体核型图谱

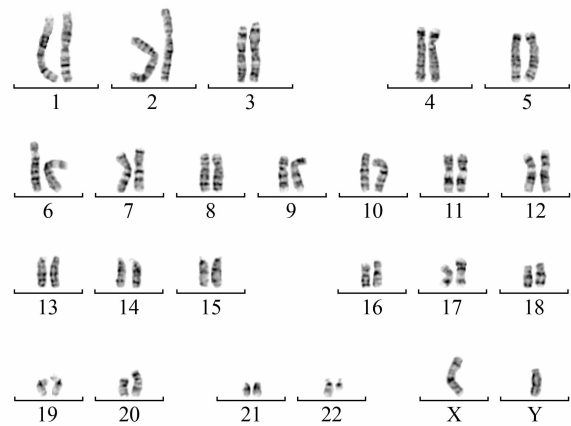


图 6 异常核型 46,X,Yqh+,t(20;22)(q13.3;q11.2)图谱

表 4 各组别核型异常 χ^2 检验结果

结果	无精子症组 [例(%)]	严重少精子症组 [例(%)]	少精子症组 [例(%)]	健康组 (例)	合计 (例)	χ^2 值	P 值
异常核型	19(20.9)	4(6.5)	6(10.5)	0	29	13.828	0.003
正常核型	72(79.1)	58(93.5)	51(89.5)	36	217		
合计	91(100)	62(100)	57(100)	36	246		

丸前或睾丸原因。在睾丸前 NOA 中,这种缺陷通常改变了正常精子发生所需的激素环境,导致精子产生中断。尽管激素调节正常,NOA 的睾丸原因可能导致精子发生受损。睾丸 NOA 的病因包括遗传条件(如克氏综合征:47, XXY),Y 染色体微缺失或获得性原因(如化疗、放疗、感染等)^[6]。

有研究表明 AZF 基因的缺失率存在地域性差异,Y 染色体微缺失在全球范围内高达 3%~20%^[7-8]。在本研究中不育男性的 Y 染色体微缺失检出率为 5.2%,以 AZFc 区微缺失多见,无精子症组及严重少精子症组均有 AZFc 区微缺失。与之前文献报道的同地区不育男性患者 Y 染色体微缺失检出率 5.52% 相近,同样以 AZFc 微缺失最常见^[9]。AZFc 微缺失的临床表型较轻,且具有异质性,有些男性可能患有无精子症,但有些男性只表现为轻度少精子症^[10]。在 AZFc 区微缺失的少精子症患者可提前冷冻保存精液,无精子症患者可以经睾丸切开取精术(testicular sperm extraction, TESE)和人工辅助生殖技术生育后代,但由于 Y 染色体伴性遗传的存在,这些患者的男性后代将获得 AZFc 位点缺失,可以进行优生学上的性别干预来预防出生缺陷^[11]。

本研究中不育男性的异常核型检出率 13.8%,而健康对照组中无异常核型,结果表明核型异常的确与男性不育相关。不育男性的异常核型,以表现为 47, XXY 的克氏综合征最为多见,临床表现为小睾丸、无精子症。在 210 例不育男性中发现有 1 例 AZFbc 区微缺失合并核型正常多态性(46, X, Yqh-),临床表现为小睾丸、无精子症。据报道,这些发生在 Y 染色体断裂后的染色体易位或染色单体融合,导致两个着丝粒和相关的基因重复或丢失^[12]。根据获得或丢失的 Y 染色体区域,来获得不同的表型,包括发育迟缓,身材矮小,生殖器模糊,语言延迟,自闭症,畸形等特征^[13]。另外,本研究在

不育男性及健康组均发现染色体正常多态性,值得注意的是健康对照中有 3 例 Y 染色体正常多态性,其中 2 位男性的妻子有不良孕产史。有研究表明,染色体多态性与复发性流产、死产、出生畸胎、少精子症、无精子症和不孕症相关^[14]。本研究中还需要进一步扩大样本,跟踪随访证实其相关性。结合研究的数据与大量的文献资料表明^[15-18],Y 染色体微缺失和染色体异常是男性不育的危险因素。

此外,本研究在收集无精子症组临床检验资料中发现 1 例 Y 染色体微缺失和核型分析均正常的患者,此患者临床表现为男性不育,无精子症,先天性输精管缺如,经临床全外显子组测序结果提示囊性纤维跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane regulators, CFTR)基因(OMIM: 602421)在染色体 chr7:117232130 位置发生 c.1909C>T(p. Gln637Ter)致病性杂合突变以及在染色体 chr7:117188684 位置发生 c.1210-11T>G 致病性杂合突变。CFTR 基因编码完整的跨膜蛋白,是一种氯离子跨细胞膜的选择性通道^[19]。当 CFTR 发生突变时,蛋白不能正常分泌 ATP,从而不能激活一系列氯离子通道,致使氯离子运输障碍,影响氯离子、钠离子和水分子的正常输出,使得细胞表面因缺水而致黏液层增厚,在一些器官(如胰腺、输精管等)的腔道中形成栓塞^[20]。据文献报道,CFTR 功能障碍被认为与囊性纤维化、先天性双侧输精管缺如有关^[21]。CFTR 基因突变频率及热点因地域、种族不同而有差异^[22]。有国家和地区对本土人群不育男性进行 CFTR 基因的筛查并证实 CFTR 的突变与多态性均可以导致无精子症^[23]。

综上所述,Y 染色体 AZF 区微缺失和染色体异常是男性不育的重要原因,对于这两项检查正常者,也有可能存在其他导致不育的遗传因素,如 CFTR 基因突变等。因此,临床上有必要对男性无精子症患者、少精子症患者常规检查 Y 染色体微缺失和染

染色体核型,建议对不明原因的无精子症患者做临床全外显子组测序,及时发现不育因素,避免不良孕育,指导临床选择合适的辅助生殖方案和精准诊疗提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] SANDRO C, HUMAIDAN P, FILIPPO M, et al. Aphrodite criteria: addressing male patients with hypogonadism and/or infertility owing to altered idiopathic testicular function[J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2023, 48(4):103647.
- [2] ESTEVES S. C, HUMAIDAN P. Towards infertility care on equal terms: A prime time for male infertility[J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 47:11-14.
- [3] 靳化, 赵勇, 钟建容, 等. 550例男性不育患者染色体核型和Y染色体微缺失情况分析[J]. *解放军杂志*, 2021, 46(11):1123-1128.
- [4] 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等译. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2011:33-35.
- [5] JARVI K, LO K, GROBER E, et al. The workup and management of azoospermic males[J]. *Can Urol Assoc J*, 2015, 9:229-235.
- [6] ESTEVES SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17:459-470.
- [7] MATTHEW JR, PHILLIP JH, NORA MH, et al. Y-chromosome microdeletions: a review of prevalence, screening, and clinical considerations[J]. *Appl Clin Genet*, 2021, 14:51-59.
- [8] 于海洋, 杨静静, 曾昭书. 1338例无精症或少精症患者Y染色体微缺失分析[J]. *临床医学工程*, 2023, 30(2):283-284.
- [9] 黄文波, 马占忠, 范舒舒, 等. 广东韶关地区163例男性不育患者Y染色体微缺失分析[J]. *中国产前诊断杂志*, 2018, 10(4):36-39.
- [10] ROZEN SG, MARSZALEK JD, IRENZE K, et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 91:890-896.
- [11] 张恒, 刘颖, 徐旻, 等. 男性不育患者Y染色体微缺失、染色体核型及性激素水平分析[J]. *浙江医学*, 2021, 43(24):2648-2651.
- [12] YANG Y, HAO W. Clinical, cytogenetic, and molecular findings of isodicentric Y chromosomes[J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 12:55.
- [13] COLACO S, MODI D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1):14.
- [14] 韩凯, 杨鹏, 唐凯, 等. 宝鸡地区1674对生育异常夫妇的细胞遗传学分析[J]. *临床医学研究与实践*, 2023, 8(23):1-4.
- [15] 兰贵斌, 余飞, 黄承乐, 等. 男性不育患者Y染色体微缺失的临床研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2023, 36(11):1844-1846.
- [16] NAHID P, CAROLINE K, PETER N. Clinical implications of Y chromosomemicrodeletions among infertile men[J]. *Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2020, 34(6):101471.
- [17] 聂茹. 849例男性不育患者的染色体核型分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27(11):1337-1338.
- [18] 薛春梅, 孟卫京. 男性不育患者外周血细胞遗传学分析[J]. *生殖医学杂志*, 2023, 32(2):447-451.
- [19] 邱毅, 王磊光, 杨丹彤, 等. 78例先天性双侧输精管缺如不育患者诊断及遗传学分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(2):73-76.
- [20] 孙红波. 男性先天性双侧输精管缺如的基因诊断研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2020.
- [21] VINCIANE S-C, MICHAEL A. Gray Role of CFTR in epithelial physiologyCell. Mol[J]. *Life Sci*, 2017, 74(1):93-115.
- [22] 杨斌. 先天性双侧输精管缺如的临床及遗传学病因初探[D]. 北京: 北京协和医院, 2019.
- [23] 杨慧敏, 胡蓉, 裴秀英. CFTR基因与无精子症关系研究进展[J]. *发育医学电子杂志*, 2019, 7(2):156-160.

(收稿日期:2024-04-08)

编辑:姚红霞