



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

杨帆 林琳 赵克温

作者单位: 200025 上海, 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科(杨帆 林琳)

200025 上海, 上海交通大学医学院病理生理教研室(赵克温)

通讯作者: 赵克温, Email: zkewen@shsmu.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.01.004

【摘要】 目的 调查男性不育患者中 Y 染色体微缺失的分布频率及缺失位点。方法 选择 2015 年 1 月至 2016 年 12 月上海交通大学医学院附属瑞金医院妇产科生殖中心收治的 110 例男性不育患者, 抽取外周静脉血 DNA; 运用多重链接依赖性探针扩增 (MLPA) 技术检测 Y 染色体微缺失情况, 分析比较不同缺乏类型组 Y 染色体缺失率及缺失位点的差异。结果 110 例男性不育患者中, 有 36 例检出存在无精子因子 (AZF) 区不同程度微缺失, 缺失率为 32.7%; 其中 AZFc 区缺失发生频率最高, 占总缺失的 75.0% (27/36); Y 染色体微缺失患者无精、少精的发生率更高 72.2% (26/36)。结论 男性不育患者尤其是无精症/少精症患者 Y 染色体微缺失发生率较高, 应在治疗前进行遗传检测及咨询。

【关键词】 Y 染色体微缺失; 多重连接依赖性探针扩增技术; 男性不育

Clinical application and research of MLPA technology to detect Y chromosome microdeletions

Yang Fan¹, Lin Lin¹, Zhao Kewen². ¹Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China ²Department of Pathophysiology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 200025 Shanghai, China

【Abstract】 **Objective** To investigate Y chromosome microdeletions and their distribution characteristics among the male infertile patients. **Methods** 110 male infertility patients admitted to Reproductive Center of Obstetrics and Gynecology in Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine from January 2015 to December 2016 were Selected. The DNA was extracted from peripheral venous blood. Y chromosome microdeletion was detected by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). The frequency and site of Y chromosome microdeletions were compared between azoospermia and oligospermia patients. **Results** Y chromosome microdeletions were found in 36 cases (32.7%) in 110 infertile patients. Microdeletion of AZFc region was the most frequent it was 75.0% of all microdeletions (27/36). The azoospermic and oligospermic incidence was higher in patients with Y chromosome microdeletions 72.2% (26/36). **Conclusion** The occurrence of Y chromosome microdeletions is higher in azoospermic and oligospermic patients, it is necessary for them to have the genetic detection and the genetic counsel before performing treatments.

【Key words】 Y Chromosome Microdeletion; Multiplex ligation-dependent probe amplification; Male Infertility

多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 技术是一种高通量、针对待测核酸中靶序列进行定性和半定量分析的技术, 其原理是经过探针的杂交、连接、聚合酶链式反应 (PCR) 及毛细管电泳, 对多个靶序列的扩增产物量进行相对定量分析。自推出以来, 由于其高效检测基因突变和拷贝数的能力已广泛应用于各种分子生物学和遗传学的研究。本研究应用

MLPA 技术对男性不育患者 Y 染色体进行检测, 旨在通过简单快捷的方法发现 Y 染色体异常, 调查 Y 染色体微缺失的分布以及发生频率, 为辅助生殖提供必要的遗传咨询。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 1 月至 2016 年 12 月本院妇产科生殖中心男性不育患者 110 例, 年龄

21~47 岁,平均(29.9±6.1)岁;排除感染和抗精子抗体阳性等原因造成的不育。根据世界卫生组织(WHO)精液分析标准分为:无精症(连续 3 次精液检测和睾丸穿刺均未见精子)、少精症(精子密度 < 15×10⁶/mL)和精液正常。

1.2 仪器和试剂 QIAamp Blood DNA Mini 基因组 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;SALSA MLPA 的 P360-B1 Y 染色体微缺失配套试剂盒购自荷兰 MRC-Holland 公司;3500xL Dx 基因测序仪和 ProFlex PCR 扩增仪均购自美国应用生物系统公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 抽取患者 2 mL 静脉血,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用 QIAamp Blood DNA Mini 试剂抽提。

1.3.2 MLPA 检测 P360-B1 Y 染色体微缺失试剂盒包含 55 对探针(130~507nt),针对 Y 染色体无精子因子(AZF)区域内的多个序列标签位点(STSs);其中 AZFa 区包括 RPS24P1、ARSEP、BPY1 等区域的 16 个探针, AZFb 区包括 RBMY1J、DY2、KDM5D 等区域的 15 个探针, AZFc 区包括 DAZ、BPY2、CDY 等区域的 12 个探针。根据试剂盒要求,主要实验步骤包括:DNA 变性(98 °C 变性 5 min、25 °C 冷却);分子杂交(95 °C 孵育 1 min、60 °C 孵育 16~20 h);连接反应(54 °C 15 min、98 °C 5 min、20 °C 冷却);特异性 PCR 扩增(95 °C 变性 30 s、60 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 60 s,共扩增 35 个循环,最后 72 °C 延伸 20 min,15 °C 冷却)和扩增产物的片段分析。运用 Coffalyser.Net 软件进行 MLPA 结果分析,比较样本结果与男性对照的剂量率值(DQ 值),即 0.8 < DQ < 1.2 为正常。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件分析处理数据,组间缺失差异采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 男性不育患者中 Y 染色体微缺失位点及分布 在 110 例男性不育患者中,共检测到 36 例患者存在 Y 染色体微缺失,缺失率为 32.7%,主要涉及 AZF 的 3 个区域,其中 AZFa 缺失 2 例,缺失率为 5.6%;AZFb 缺失 2 例,缺失率为 5.6%;AZFc 缺失 27 例,缺失率为 75.0%;AZFbc 缺失 3 例,缺失率为 8.3%;AZFac 和 AZFabc 缺失各 1 例,缺失率均为 2.7%。见表 1。

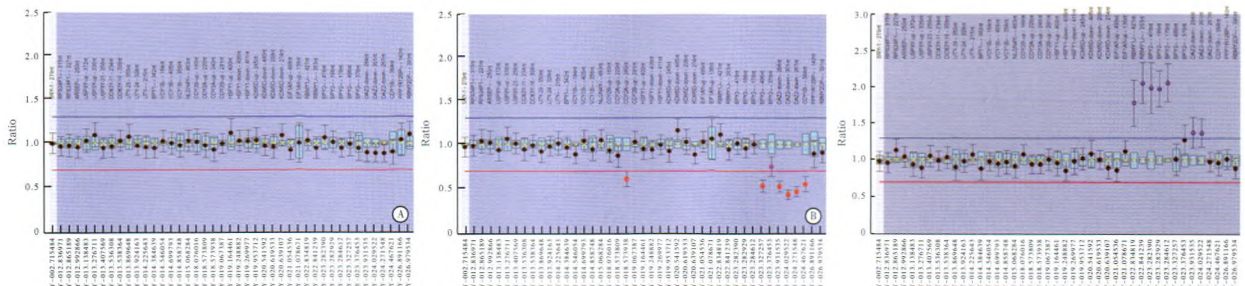
表 1 36 例存在 Y 染色体微缺失患者的位点分布

缺失区域	例数(例)	缺失率(%)	缺失位点
AZFa	2	5.6	UTY
AZFb	2	5.6	HSFY1
AZFc	27	75.0	BPY2、CDY1B、DAZ2、CDY2A
AZFbc	3	8.3	KDM5D、EIF1AY、RBMY1J、PPP1R12BP、RBMY2DP、BPY2、CDY1B、DAZ2、CDY2A
AZFac	1	2.7	ARSEP、USP9Y、DDX3Y、VCY1B、NLGN4Y、BPY2、CDY1B、DAZ2、CDY2A
AZFabc	1	2.7	大片段缺失

2.2 无精症和少精症患者中 Y 染色体微缺失情况 在 110 例男性不育患者中无精症患者 43 例,少精症患者 24 例,分别存在单纯缺失、单纯重复和重复+缺失 3 种缺失类型。在检测到 Y 染色体微缺失的 36 例患者中,无精症和少精症患者占 26 例,缺失率为 38.8%(26/67),精子正常组中占 10 例,缺失率 23.3%(10/43),无精症和少精症组患者 Y 染色体微缺失率高于精子正常组($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 不同缺失类型的不同临床表现

组别	例数(例)	Y 染色体未检测到异常[例(%)]	Y 染色体微缺失[例(%)]			
			缺失	重复	重复+缺失	微缺失率
无精症组	43	29(67.5)	12(27.9)	1(2.3)	1(2.3)	14(32.6)
少精症组	24	12(50.0)	10(41.7)	0(0.0)	2(8.3)	12(50.0)
精子正常组	43	33(76.7)	3(6.9)	5(11.6)	2(4.7)	10(23.3)



注:A 为正常 Y 染色体;B 为 Y 染色体缺失;C 为 Y 染色体重复

图 1 MLPA 方法检测 Y 染色体微缺失结果

3 讨论

Y 染色体长臂上与精子发生密切相关的区域被称为 AZF, 分为 AZFa、AZFb、AZFc 3 个区域, 区域基因片段缺失、重复是导致男性原发性不育的遗传病因之一^[1]。Y 染色体微缺失的发生率是仅次于克氏综合征的第二位遗传因素, 常规基因检测是无精症、少精症诊断流程中的重要组成部分^[2]。其中 AZFc 的缺失出现较多的表现型, 包括唯支持细胞综合征 (SCOS)、无精症、少精症等。本研究结果表明, 在 Y 染色体微缺失患者中 AZFc 缺失率最高为 75.0%, AZFa 和 AZFb 的缺失率分别为 5.6%, 5.6%, AZFbc 的缺失率为 8.3%, 与国内外报道的 AZFc 区是主要缺失区域相符, 缺失率略高于 60%。对于 AZFc 微缺失是否会直接导致男性不育, 多篇文献报道存在不同见解^[3-5]。AZFc 区缺失患者可通过睾丸穿刺获得精子, 但是否会影响卵泡浆内单精子显微注射技术 (ICSI) 治疗效果、影响胚胎质量, 目前也还存在争议^[6-7]。此外, 本研究结果中发现, AZF 区域内存在单个基因缺失, 例如 AZFa 区的 USP9Y、AZFc 区的 DAZ2。有文献报道, USP9Y 基因缺失的携带者表型差异巨大, 提示此基因在精子生成过程中更多的是协调而非决定性的作用^[8]。

本研究选用的 Y 染色体微缺失试剂可以同时检测 AZF 的多个区域, 可以有效检测出插入的串联重复序列。结果显示, 在 Y 染色体微缺失的 36 例患者中, 无精症和少精症患者的 Y 染色体缺失率为 38.8% (26/67), 高于精子正常组的 Y 染色体缺失率 23.3% (10/43)。该数值与相关报道中显示的在无精症和少精症患者中 Y 染色体微缺失率介于 1%~55%^[9]相符。缺失率的范围较大可能是因为每个研究的序列标签位点 (STS) 引物选择不同, 也有可能与人种、遗传背景、环境等因素有关^[10]。

目前, 性染色体异常的临床诊断主要依赖于核型分析, 但核型分析操作繁琐、检测周期较长; 而荧光原位杂交 (Fish) 虽有高分辨率, 但受其检测范围限制, 对于微小的染色体缺失仍难以检测。MLPA 技术的局限性在于不能检测染色体的平衡易位、不

适合检测未知的点突变等。但是, MLPA 技术凭借其检测通量大、重复性好、效率高等优点可成为简单、便捷的筛查手段之一。通过增加 MLPA 检测平台, 男性不育患者的诊断体系得到了很大程度的完善, 可根据缺失区域为患者制定合理的治疗方案提供依据, 为辅助生殖提供遗传咨询。

参考文献

- Papachristou GI, Muddana V, Yadav D, et al. Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(2): 435-441; quiz 442.
- 杨卓, 郭野, 李宏军, 等. EAA/EMQN Y 染色体微缺失分子诊断应用指南解读 [J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(7): 454-456.
- Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia [J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(3): 286-298.
- Zhang F, Li Z, Wen B, et al. A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians [J]. *Ann Hum Genet*, 2006, 70(Pt 3): 304-313.
- Giachini C, Guarducci E, Longepied G, et al. The gr/gr deletion (s): a new genetic test in male infertility? [J]. *J Med Genet*, 2005, 42(6): 497-502.
- Van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, et al. Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(2): 289-292.
- 吴畏, 周作民, 林敏, 等. Y 染色体微缺失患者与无精子或严重少弱精子症患者 ICSI 治疗结局比较 [J]. *中华男科学杂志*, 2011, 17(9): 771-774.
- Tyler-Smith C, Krausz C. The will-o'-the-wisp of genetics—hunting for the azoospermia factor gene [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(9): 925-927.
- Mittal RD, Singh G, Srivastava A, et al. Y chromosome microdeletions in idiopathic infertility from Northern India [J]. *Ann Genet*, 2004, 47(4): 331-337.
- 王燕, 林元, 黄海龙, 等. 特发性不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失筛查及表型分析 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2015, 23(12): 819-821.

(收稿日期: 2017-01-18)

(本文编辑: 李银平)