

# Y染色体微缺失与男性少弱精子症相关性研究进展

王一鹏 秦 朗 李 颖

**摘要** 男性Y染色体微缺失(YCMs)是造成生精障碍的主要遗传学因素,Y染色体微缺失检查对于指导临床治疗、提高辅助生殖技术的有效性和安全性、开展胚胎植入前遗传学诊断等具有重要意义。本文综述了Y染色体微缺失的流行病学现状、各种分型的临床表现和治疗策略。YCMs的临床表现和助孕策略因缺失区域不同而不同,最近的文献支持将YCMs的精液筛查标准从 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 降低到 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,后续指南可能更新筛查标准,满足敏感度、特异性和性价比的需要。

**关键词** Y染色体微缺失 少精子症 无精子症 生殖遗传学

**中图分类号** R71

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.09.034

目前,不孕症影响着全球15%的夫妇,其中男性因素约占50%。引起男性不育的原因主要包括生精障碍、输精管道梗阻(感染性/输精管缺如)、性腺附属器官异常、性功能异常、全身性疾病、应用某些药物或接触毒物及放射线等。男性不育因素中以生精障碍最为常见,临床表现为无精子症和少弱精子症,约30%的生精障碍患者存在遗传学异常,包括性染色体数目异常(如47,XXY克氏征)、某些常染色体基因突变以及Y染色体结构或基因异常,而后者是15%的少精子症或无精子症患者发病的遗传因素<sup>[1]</sup>。男性生殖遗传学检查对于指导临床治疗、提高辅助生殖技术的有效性和安全性、开展胚胎植入前遗传学检测(pre-implantation genetic testing, PGT)等具有重要意义。

## 一、男性AZF基因微缺失是造成生精障碍的主要遗传学因素

Y染色体的雄性特异性区域(male-specific region of the Y chromosome, MSY)是男性独有的基因区域,该区域通过转录、基因沉默、泛素化等影响精子发生。MSY区域内包含大量高度同源的回文序列和发夹结构,这些结构间发生频繁的基因转换引起非等位同源性重组(non-allelic homologous recombination, NAHR)。NAHR是防止Y染色体遗传衰减的机制之一,但也会因此导致该区域内较高的基因缺失率。5%~10%的无精子症患者和2%~5%的严重少精子症患者是由于MSY区域内的基因缺失,即Y染色体微缺失(Y-chromosome microdeletions, YCMs)导致<sup>[2]</sup>。除精液异常外,YCMs还可能与睾丸及附睾发

育异常、精索静脉曲张、生殖激素异常等不育因素有关。

1976年,Tiepolo等<sup>[3]</sup>在6例无精子症患者中,发现Y染色体q11.2区域的缺失,并将该区域命名为男性少弱精因子(azoospermia factor, AZF)区域。研究者根据Yq11在无精子男性生殖细胞发育不同阶段的作用,将76个离散的“微缺失”位点定位到Yq11的3个亚区,它们被命名为AZFa(近端),AZFb(中段)和AZFc(远端),各个区域均存在导致男性精子生成障碍的候选基因<sup>[4]</sup>。2015年中华医学会男科学分会发布的《男性生殖遗传学检查专家共识》中提出,男性生殖疾病诊治中应进行染色体核型分析、AZF基因微缺失等常规检查以及基因突变检测等特殊检查<sup>[5]</sup>。

## 二、YCMs的流行病学

20多年来,全球范围内多采用巢式或多重PCR进行YCMs的检测,不同报道的YCMs检出率存在差异。美国生殖医学协会(American society for reproductive medicine, ASRM)2012年在男性不育的诊疗共识中发布,一般男性人群中YCMs的发生率可能为2%<sup>[6]</sup>。但欧洲男科学会(European academy of andrology, EAA)认为YCMs在普通男性人群中的发生率要低得多,约为1/4000(0.025%)<sup>[7]</sup>。另一项对超过10000例的Meta分析显示,5%北美严重少精症(精子数 $\leq 1 \times 10^6/\text{ml}$ )患者存在AZF微缺失,而精液正常男性的发生率则不到1%,研究者认为AZF的缺失是与生精失败相关的,北美和欧洲的男性不育指南建议只对精子浓度为 $\leq 1 \times 10^6/\text{ml}$ 的男性进行YCMs检测<sup>[8]</sup>。

在既往的报道中,不育男性的YCMs检出率存在

基金项目:北京市科技计划项目(Z181100001718108)

作者单位:100026 首都医科大学附属北京妇产医院

通讯作者:李颖,电子邮箱:liyng200306@ccmu.edu.cn

显著的地理区域和种族差异, AZF 缺失率从美国的 12.0% 和伊朗的 24.2% 到德国和奥地利等国的不到 2.0%<sup>[9]</sup>。2019 年的一项研究对 1030 例不育的日本男性进行了 YCMs 筛查, 严重少精症或无精症男性中 YCMs 近 7% (包括所有 AZF 重排), AZFc 是最常见的缺失区域<sup>[10]</sup>。

### 三、YCMs 检测的临床意义

1. AZF 分区: Y 染色体 AZF 区包括 a、b 和 c 等 3 个区域, 这 3 个区域内含有多种精子生发相关基因, 不同区域出现微缺失时均有可能通过影响相关基因造成少弱精症。目前主要通过检测序列标签位点 (sequence tag site, STS) 判断 AZF 区域缺失部位。2012 年欧洲男科学会发布的 Y 染色体微缺失检测专家共识提出, 应检测 6 个 STS 位点以检测 AZF 基因微缺失, 这 6 个 STS 位点分别为 AZFa 区的 sY84、sY86, AZFb 区的 sY127、sY134 及 AZFc 区的 sY254、sY255, 该专家共识一直沿用至今<sup>[11]</sup>。然而, 由于基因变异存在人种以及地域差异, 上述 6 个 STS 位点并不完全适合中国人群。2015 年中华医学会男科学分会发布的《男性生殖遗传学检查专家共识》中, 将 Y 染色体 AZF 微缺失检测位点扩增为 8 个, 在欧洲共识的基础上增加了 AZFc 区 sY145 及 sY152 位点的检测<sup>[5]</sup>。

在临床工作中, YCMs 检测在评估男性不育症和低生育能力中至关重要, 往往影响临床决策和辅助生殖技术的实施路径。在 AZFa、AZFb 和 AZFc 缺失中, AZFc 缺失是最常见的 YCMs, 占有报告缺失的 60% ~ 80%<sup>[7]</sup>。

2. AZF 各区候选基因及辅助生育策略: AZFa 区的候选基因有 USP9Y、DBY 和 UTY 基因, 目前临床共识推荐 sY84 及 sY86 为 AZFa 区基因微缺失的检测位点。AZFa 区基因发生微缺失会导致唯支持细胞综合征, 临床表现为睾丸体积的缩小和无精子症等<sup>[12]</sup>。由于 AZFa 区包含着精子生成必需的基因, AZFa 缺失确诊意味着即使采用包括显微穿刺取精术 (microdissection testicular sperm extraction, mTESE) 在内的所有取精手术都不能获得精子, 建议患者供精人工授精 (artificial insemination by donor, AID)。

AZFb 区主要候选基因有 RBMY1、EIFA1Y、HSFY 和 PRY 等基因, 目前临床共识推荐 sY127 及 sY134 为 AZFb 区基因微缺失的检测位点。AZFb + c 缺失会导致唯支持细胞综合征或精子发生阻滞, 患者多为无精子症, 故建议 AZFb 完全缺失 (含 AZFb + c

缺失) 的患者 AID<sup>[13]</sup>。

AZFc 区与少弱精症相关的候选基因较多, 有 DAZ、BPY2、CDY1、CSGP4LY 和 GOLGA2LY 等, 目前临床共识推荐 sY145、sY152、sY254 及 sY255 均为 AZFc 区基因微缺失的检测位点。AZFc 区候选基因中以 DAZ 基因家族最为重要, DAZ 基因家族包含 4 个 DAZ 基因 (DAZ1 ~ 4), 其功能是靶 mRNA 转运的适配区和翻译的激活区<sup>[14]</sup>。DAZ 基因家族缺失是 AZF 微缺失中最常见的类型, 特发性无精子症及严重少精子症患者中涉及 DAZ 缺失的比率分别为 13% 和 6%<sup>[15]</sup>。

3. AZFc 缺失患者体外辅助生育策略的选择及预后: AZFc 缺失患者的表型具有较高差异, 无精、少精均有可能, 由于仍存在产生正常精子的可能, AZFc 缺失患者可能是唯一可获得自身后代的 YCMs 患者。AZFc 缺失的无精子症患者, 可以试行睾丸取精术以获得精子, 并通过行卵胞质内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 进行体外辅助受孕。而对于 AZFc 缺失合并严重少精子症患者, 可以选择直接 ICSI。

有研究发现 AZFc 区域缺失的少精子症患者, 其精子数目有进行性下降的趋势, 最后发展为无精子症。因此, 对此类患者建议及早生育或冷冻保存精子<sup>[16]</sup>。近年来有研究发现 AZFc 微缺失对 ICSI 结果有不利影响, AZFc 缺失组 ICSI 结局较差, 累积临床妊娠率 (45.39% vs 67.49%)、累积活产率 (35.15% vs 53.44%)、受精率 (46.80% vs 53.37%)、植入率 (28.63% vs 31.26%) 均低于 Y 染色体正常组<sup>[17]</sup>; 即使采取了 mTESE, AZFc 微缺失的无精子症患者的 ICSI 结果比无 AZF 缺失的男性更差<sup>[18]</sup>。近年来开展的对 12 项研究的 Meta 分析总结了 YCMs 对 ART 妊娠结局的影响, 发现与正常组比较, YCMs 组受精率显著降低 ( $P = 0.0006$ ), 优质胚胎率、临床怀孕率、早期流产率、流产率、活产率差异无统计学意义, 认为 YCMs 与 ART 的受精率降低有关<sup>[19]</sup>。

mTESE 被认为是治疗男性非阻塞性无精子症的“金标准”, 大约有 52% 的精子获取成功率, 然而 YCMs 男性成功取出精子的概率很可能取决于 AZF 缺失的区域<sup>[20]</sup>; AZFc 区缺失患者的精子获取率大约为 50% ~ 80%, 是 YCMs 中最高的, 而 AZFa 和 AZFb 区缺失的患者就有极差的精子获取率和临床结局, 多 AZF 区域缺失如 AZFbc 和 AZFabc 缺失, 也同样有很差的精子获取结果<sup>[7,8,10]</sup>。因此, 检测 YCMs 位置和

程度,对 ART 助孕策略和临床决策的制定意义重大。基于之前极低的精子获得率,对于 AZFa、AZFb、AZFbc 或 AZFbc 缺失的患者不推荐进行 mTESE<sup>[7]</sup>。

对于拟行 ART 的 AZFc 缺失患者建议进行遗传筛查和咨询,其男性后代都将继承他们父亲带有微缺失的 Y 染色体,这些男婴的不育程度将和他们的父亲一样,甚至更严重。此外,Y 染色体微缺失是 Y 染色体结构不稳定的表现之一,AZF 缺失患者男性后代罹患 Turner 综合征(45,X)和两性畸形可能性增大,故应建议胎儿进行产前诊断行染色体核型分析。对于拟行 ART 的 AZFc 微缺失患者,可以进行 PGT,选择女婴植入或者考虑供精<sup>[8]</sup>。

#### 四、YCMs 的检测方法

已发现的 AZF 区基因微缺失相关 STS 位点达数百个,各 STS 位点对应 AZF 的不同区域。国内现有的 AZF 微缺失临床检测试剂多遵循欧洲专家共识,检测 sY84、sY86、sY127、sY134、sY254 及 sY255 这 6 个 STS 位点<sup>[7]</sup>。可用于检测 AZF 区域微缺失方法包括多重 PCR、实时荧光 PCR、基因芯片等。

1. 多重 PCR 法:多重 PCR 结合琼脂糖凝胶电泳是 EAA/EMQN 制定的标准方法,具有以下优点:经济简便性,多个目的基因在同一反应管中被检出,将大大节省时间,节省试剂成本;快速高效性,在同一 PCR 反应管内同时对多个目的基因进行分型;系统性,多重 PCR 适宜于成组检测<sup>[7]</sup>。但是多重 PCR 的局限性在实验中也凸显出来,相对于常规 PCR 有更高的技术要求,例如针对每一个缺失位点都要设计单一引物,前期程序复杂,容易引起假阴性和假阳性结果。而且琼脂糖凝胶电泳分辨率较低,无法分辨相对分子质量相对接近的 STS 位点,如 EAA/EMQN 推荐检测的 6 个 STSs 中,有两组相对分子质量接近的 STS,分别是 sY127(274bp)与 sY134(301bp),sY84(326bp)与 sY86(320bp),以上位点在琼脂糖电泳条件下很难在一个泳道分离。因此 EAA/EMQN 在推荐的检测方法中,建议把这些 STS 分成两组检测,同时长时间电泳确保分辨率,导致实验耗时,增加工作量。

2. 荧光定量 PCR 法:荧光定量 PCR 法是临床 AZF 缺失检测试剂盒常用的检测方法。作为临床检验中最常用的分子生物学手段,荧光定量 PCR 法的检测敏感度和可靠性已经过长时间的临床验证。但是,由于荧光定量 PCR 技术只有对应 FAM、VIC、ROX 及 Cy5 4 种荧光染料的检测通道,每个检测体系最多

可检测 3 个检测指标 + 1 个质控指标。以现有针对欧洲共识 6 个 STS 位点进行检测的试剂盒为例,每例样本检测需至少准备 2 个扩增体系,如对我国共识所推荐的 8 个 STS 位点进行检测则需要准备 3 个甚至 4 个扩增体系。随着对人 Y 染色体生精相关基因的深入研究,男性生精相关基因 STS 检测位点还可能进一步增加,数量过多的扩增体系会显著增加操作难度及污染风险,造成质量控制难度大幅增加<sup>[5]</sup>。

3. 其他检测方法:尽管高通量测序(next-generation sequencing, NGS)技术在临床基因检测中越来越受欢迎,但由于 Y 染色体结构的特殊性,现阶段不适合将 WGS 应用于 YCMs 筛查。大多数致病性 YCMs 广泛分布在 Y 染色体常染色质的扩增子区,用 PCR 扩增来筛选 STS 位点更适合于鉴定这些缺失<sup>[21]</sup>。随着分子生物技术的进展,基于基因芯片的基因微缺失检测技术日渐成熟,以基因芯片技术将逐步取代需要建立多个扩增体系的 PCR 技术进行多基因位点检测。该方法将 PCR 与分子杂交技术结合,具有自动化、集成化、微量化、高通量等优点,在实验室内推广。

#### 五、YCMs 的筛查策略

ASRM 和 EAA/EMQN 等专业协会发布指南建议对严重少精症(精子数量  $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ )的男性进行筛查<sup>[7]</sup>。然而最近的研究表明筛查阈值可能需要调整。Kohn 等<sup>[8]</sup>开展的 Meta 分析发现,精子数量为  $1 \times 10^6/\text{ml} \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$  和  $5 \times 10^6/\text{ml} \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$  的 YCMs 发生率比较,差异无统计学意义;而在精子数量为  $0 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$  和  $1 \times 10^6/\text{ml} \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$  的男性中,YCMs 的发生率比较,差异有统计学意义( $P=0.001$ ),因此建议将检测的阈值降低到精子数  $1 \times 10^6/\text{ml}$  以下。Johnson 等<sup>[22]</sup>回顾性研究发现,以精子数  $5 \times 10^6/\text{ml}$  为筛选阈值具有 100% 的敏感度和 13% 的特异性;将该阈值降低到  $1 \times 10^6/\text{ml}$  仍具有 100% 的敏感度,但特异性提高到 24%。进一步降低到  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  可以再增加特异性,由于精子数为  $0.5 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$  的男性患者 YCMs 的发生率相对较高,所以仍推荐  $1 \times 10^6/\text{ml}$  作为筛查阈值<sup>[23]</sup>。

研究表明,在建立更好的男性少弱精症基因筛查和诊断策略前,需要开展更多研究来寻找本效益比和医学收益上比较适当的阈值,后续指南应建议更新筛查标准,包括更低的筛查阈值和考虑其他变量,以便更加合理地进行筛查。

## 参考文献

- 1 Arumugam M, Shetty DP, Kadandale JS, *et al.* Y chromosome microdeletion and cytogenetic findings in male infertility: a cross-sectional descriptive study[J]. *Int J Reprod Biomed*, 2021, 19(2): 147-156
  - 2 Krausz C, E Casamonti. Spermatogenic failure and the Y chromosome[J]. *Hum Genet*, 2017, 136(5): 637-655
  - 3 Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm[J]. *Hum Genet*, 1976, 34(2): 119-124
  - 4 Sha J, Huang G, Zhang B, *et al.* Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men with azoospermia and oligozoospermia in Eastern China[J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(4): 300060519896712
  - 5 《男性生殖遗传学检查专家共识》编写组, 中华医学会男科学分会. 男性生殖遗传学检查专家共识[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 12(21): 1138-1142
  - 6 Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): e18-e25
  - 7 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
  - 8 Kohn TP, Kohn JR, Owen RC, *et al.* The prevalence of Y-chromosome microdeletions in oligozoospermic men: a systematic review and Meta-analysis of European and North American studies[J]. *Eur Urol*, 2019, 76(5): 626-636
  - 9 Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of azoospermia[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3264
  - 10 Iijima M, Shigehara K, Igarashi H, *et al.* Y chromosome microdeletion screening using a new molecular diagnostic method in 1030 Japanese males with infertility[J]. *Asian J Androl*, 2020, 22(4): 368-371
  - 11 Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, *et al.* European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2012 update[J]. *Eur Urol*, 2012, 62(2): 324-332
  - 12 Liu XY, Zhang HY, Pang DX, *et al.* AZFa microdeletions: occurrence in Chinese infertile men and novel deletions revealed by semiconductor sequencing[J]. *Urology*, 2017, 107: 76-81
  - 13 Yan Y, Yang X, Liu Y, *et al.* Copy number variation of functional RBMY1 is associated with sperm motility: an azoospermia factor-linked candidate for asthenozoospermia[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(7): 1521-1531
  - 14 Li Q, Song NH, Cao WZ, *et al.* Relationship between AZFc deletions and testicular histology in infertile South Chinese men with azoospermia and severe oligospermia[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 1805
  - 15 Fu XF, Cheng SF, Wang LQ, *et al.* DAZ family proteins, key players for germ cell development[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(10): 1226-1235
  - 16 Vogt PH, Bender U, Deibel B, *et al.* Human AZFb deletions cause distinct testicular pathologies depending on their extensions in Yq11 and the Y haplogroup: new cases and review of literature[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 60
  - 17 Zhang L, Mao JM, Li M, *et al.* Poor intracytoplasmic sperm injection outcome in infertile males with azoospermia factor c microdeletions[J]. *Fertil Steril*, 2021, 21: 46-47
  - 18 Yamaguchi K, Ishikawa T, Mizuta S, *et al.* Clinical outcomes of microdissection testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in Japanese men with Y chromosome microdeletions[J]. *Reprod Med Biol*, 2020, 19(2): 158-163
  - 19 Esteves SC, Roque M, Bradley CK, *et al.* Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and Meta-analysis[J]. *Fertil Steril*, 2017, 108(3): 456-467
  - 20 Bernie AM, Mata DA, Ramasamy R, *et al.* Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(5): 1099-1103
  - 21 Liu X, Li Z, 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
  - 22 Johnson M, Raheem A, De Luca A, *et al.* An analysis of the frequency of Y-chromosome microdeletions and the determination of a threshold sperm concentration for genetic testing in infertile men[J]. *BJU Int*, 2019, 123(2): 367-372
  - 23 Liu JL, Peña V, Fletcher SA, *et al.* Genetic testing in male infertility - reassessing screening thresholds[J]. *Curr Opin Urol*, 2020, 30(3): 317-323
- (收稿日期: 2021-04-13)  
(修回日期: 2021-04-28)
- 
- (上接第 88 页)
- 19 Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, *et al.* Short-chain fatty acids activate amp-activated protein kinase and ameliorate ethanol-induced intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cell monolayers[J]. *J Nutr*, 2013, 143(12): 1872-1881
  - 20 Hustoft TN, Hausken T, Ystad SO, *et al.* Effects of varying dietary content of fermentable short-chain carbohydrates on symptoms, fecal microenvironment, and cytokine profiles in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2017, 29(4): epub
  - 21 Mcintosh K, Reed DE, Schneider T, *et al.* FODMAPs alter symptoms and the metabolome of patients with IBS: a randomised controlled trial[J]. *Gut*, 2017, 66(7): 1241-1251
  - 22 Hill P, Muir JG, Gibson PR. Controversies and recent developments of the low-FODMAP diet[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2017, 13(1): 36-45
  - 23 J Fernández, Redondo-Blanco S, I Gutiérrez-Del-Río, *et al.* Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: a review[J]. *J Funct Foods*, 2016, 25:511-522
- (收稿日期:2021-04-21)  
(修回日期:2021-05-22)