

• 临床研究 •

全面检测 Y 染色体 AZF 微缺失方法的研究

福建省龙岩市第二医院 (龙岩 364000) 郑文通 张洪彬 钟国伟 阙华星 袁建兴 张满娥 彭明健¹

【摘要】 目的 研究全面检测 Y 染色体 AZF 微缺失的方法。方法 用自主设计探针捕获体系和二代测序技术, 开发 Y 染色体 AZF 区微缺失的全面检测方法。结果 采用的探针捕获体系, 结合高通量测序技术, 能精确检测 AZF 区微缺失类型、缺失区域及缺失引起的 DNA 拷贝数变化、AZF 区微重复, 发现未知缺失类型。结论 全面检测 Y 染色体上 AZF 区域微缺失的方法可为男性不育诊断、辅助生殖提供依据。

【关键词】 Y 染色体 AZF 微缺失; 全面检测; 探针捕获体系; 二代测序

【中图分类号】 R698⁺.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)05-0023-05

不育夫妇占已婚育龄夫妇的 15%, 其中男性因素约占一半^[1]。男性不育症 20%~30% 是由遗传因素造成的, 其中 Y 染色体 AZF 区微缺失是男性不育的重要遗传因素, 约占原发性无精和少弱精患者的 10%~15%^[2-5]。Y 染色体微缺失主要发生在 Y 染色体上的 AZF (azoospermia factor) 区, 包括 AZFa、AZFb、AZFc 三个亚区, 其基因组序列存在大量的重复和回文结构, 使得该区域更容易发生缺失、重复、倒位等结构变化^[6]。AZF 区域包括许多与精子形成有关的基因, 这些区域的完全缺失或部分缺失可引起男性精子发生障碍、少精、弱精, 甚至无精^[5]。

检测 Y 染色体 AZF 区微缺失现在已经成为男性不育专科的常规检查, 可以为男性不育患者找出病因, 为遗传咨询提供依据, 也为临床医生的后续治疗提供指导。Y 染色体微缺失检测主要通过检测 Y 染色体特异性 STS 位点是否存在缺失, 进一步推断 Y 染色体是否存在缺失以及具体的缺失类型。目前, 最常用的检测方案均以 2014 年 EAA/EMQN 联合发表的 Y 染色体微缺失检测指南为依据, 即必须检测 6 个基础性 Y 染色体特异性 STS 位点 (sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255), 根据 6 个基础性位点的检测结果可以选择进一步检测扩展性位点 (sY82, sY83, sY1064, sY1065, sY1182, sY88, sY105, sY121, sY124, sY143, sY1192, sY153, sY160)。通过检测基础性 STS 位点, 可以初步判断受检者是否存在 AZF 微缺失; 通过进一步分析扩展性位点, 可以进一步

判断患者所发生的缺失是否为完全缺失。如果患者为部分缺失, 则患者可能通过睾丸取精等方式获得精子。目前较常用的 Y 染色体微缺失检测试剂盒大致分为两类, 一类是仅检测基础性 STS 位点, 这类试剂盒检测方便快捷, 但精确度不足; 另一类是在检测基础性 STS 位点后, 进一步检测扩展性位点, 这类试剂盒检测结果较第一种更为准确。但值得注意的是, 由于 Y 染色体 AZF 区存在大量的重复和回文结构, 使得该区域更容易发生缺失、重复、倒位等结构变化^[6], 因此即便检测扩展性位点, 也不能准确检测患者 Y 染色体 AZF 区的突变类型。

基于下一代测序 (NGS) 检测 Y 染色体 AZF 微缺失是近年新兴的技术^[7-8]。2020 年由中华医学会男科学分会发表的《男性生殖相关基因检测专家共识》指出, “Y 染色体 AZF 区域缺失推荐检测位点主要根据欧美人群建立, 是否完全适用于中国人群尚无定论。鼓励有条件的医疗机构通过高通量检测技术 (如 NGS) 进行深入研究。”但目前基于 NGS 的 Y 染色体 AZF 微缺失检测还未在实际应用中大规模展开, 因此有必要继续深入研究基于 NGS 的 Y 染色体 AZF 微缺失检测的实际效果和应用前景。

本研究开发了一种新的 AZF 区微缺失的检测方法。采用的探针捕获体系, 结合高通量测序技术, 精确判定 AZF 区微缺失类型、具体缺失区域及缺失引起的 DNA 拷贝数变化, 包括目前未知的缺失类型, 为男性不育的临床诊断与后续治疗提供

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2017J01165)

¹ 通信作者, E-mail: pengmj01@163.com

更多的参考依据。

1 方法

1.1 探针设计: 按照 AZF 区序列结构特征 (包括特异性区域、重复区域、回文结构等), 在 AZF 区域设计 138 条探针 (包括 EAA/EMQN 推荐的 6 个核心 STS 位点以及 12 个扩展 STS 位点), 均匀覆盖 AZFa 区域、AZFb 部分区域的特异性探针; 均匀覆盖 AZFb 剩余区域、AZFc 区域的低重复探针。另外在 Y 染色体其他稳定区域设计 10 条特异性探针作为参照, 包括 SRY、ZFY 等基因区域的探针。

1.2 临床样本收集以及临床知情签署: 选取在 2017—2019 年中, 经精子质量分析被诊断为无精症或严重少精症的 126 名患者为研究组。年龄 20~49 岁, 平均 31.32 岁。纳入标准: 所有患者均参照世界卫生组织 (WHO) 标准进行精液常规分析, 精液标本在 3~7 d 内射精获得, 连续 3 次不同时间段进行精液检查, 并经离心沉淀后镜检均无精子者为无精症, 精子计数 $\leq 5 \times 10^6$ /mL 者为严重少精症; 排除标准: 全身性疾病、泌尿生殖道感染、逆行性射精、输精管阻塞、精索静脉曲张及隐睾等非特异性男性不育病例。

1.3 检测方法: 在签署知情同意书, 并且经过医院伦理委员会通过后, 采集上述 126 名患者的外周血, 用于 NGS 法 Y 染色体 AZF 微缺失检测。采集患者静脉血 10 mL 于真空采血管 (EDTA 抗凝) 中, 经 1 600 g 离心 10 min, 16 000 g 离心 10 min 后得到约 4 mL 血浆。用磁珠法血清/血浆游离 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP709) 分离血浆游离 DNA。50 μ L DNA 末端标记反应体系中含 300 ng 游离 DNA, 0.3 μ L biotin-16-dUTP (Sigma), 2 μ L Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) 和 1X TdT 缓冲液 (Enzymatics), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加异丙醇沉淀后用 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA 溶解游离 DNA。将末端标记的 DNA 和 100 μ g myOneC1 磁珠 (购自 Dynal 公司)

混合, 并混合以下缓冲液致体积为 50 μ L: 60 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 mM EDTA, 300 mM NaCl, 35% formamide, 0.1% Tween-80, 及 4 nM 结合引物。混合液在 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 退火后 25 $^{\circ}$ C 继续反应 2 h 以上。然后将反应管放到磁力架上磁吸, 加入 50 μ L 洗液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) 洗涤, 磁珠重悬于 50 μ L 包含 1U Taq 连接酶和 1X Taq 缓冲液 (Enzymatics) 的反应液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。磁珠用洗液洗涤 2 次后悬浮于 30 μ L TE 缓冲液中。连接产物于 95 $^{\circ}$ C 洗脱 3 min。再经 PCR 扩增 23 循环, PCR 反应体系为: 1U Phusion 多聚酶, 1X Phusion 缓冲液, 200 μ M dNTPs, 200 nM 上游通用引物 (序列: CCATCTCATCCCTGCGTGTC), 200 nM 下游通用引物 (序列: CCACTACGCCTC-CGCTTTCCTCTCTATG)。PCR 产物用 AMPure XP (Beckman 公司产品) 磁珠纯化。纯化后的 PCR 产物 (即文库) 经用 Ion PGM™ Template OT2 200 Kit 制备成乳液 PCR 样本, 在 Ion Torrent PGM (life technology) 上测序。

1.4 数据分析: 首先过滤低质量测序序列, 去掉 < 70 bp 的测序片段, 将过滤后的序列比对到 155 个用来设计引物的参考基因组序列片段, 计算这 155 个目标区域的总测序序列条数 N 和各自的测序序列条数 N_i 。利用 12 个内部参考区域的引物序列条数的均值 N_0 , 将 143 个 AZF 区域的引物序列条数进行均一化, 公式为: $C_i = N_i/N_0$ 。根据每个引物的 C_i 值, 计算 AZF 区划分的每个小区的均值, 即得到待检测样本 AZF 区各小区的真实拷贝数信息。

2 结果

2.1 方法建立: 根据检测结果图, 计算待检样本理论检测值和实际检测值的比值, 将每个样本的检测结果分为正常、缺失和重复。如图 1 所示。

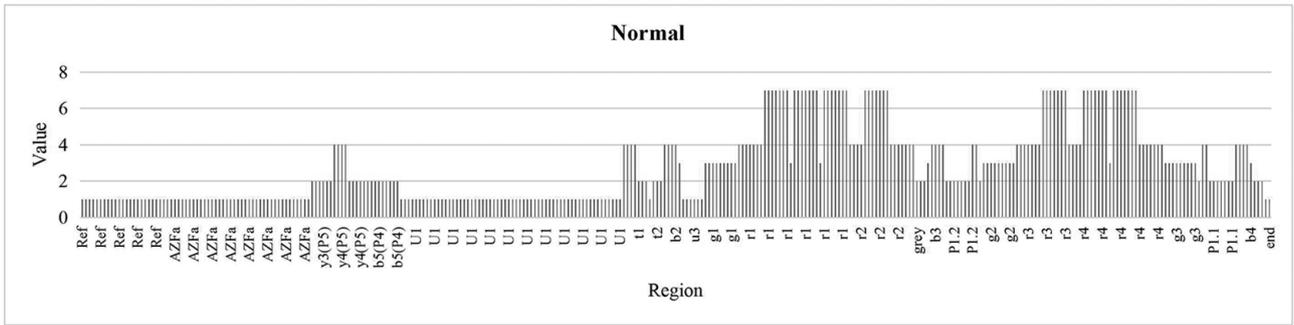


图1A

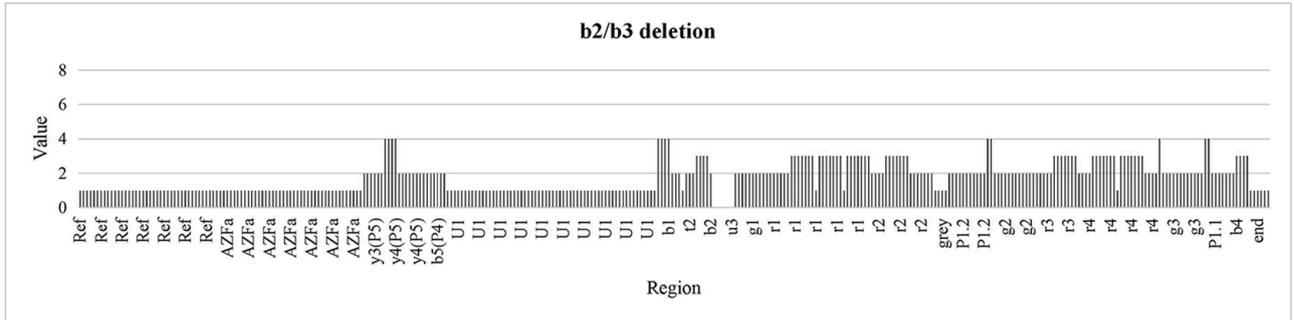


图1B

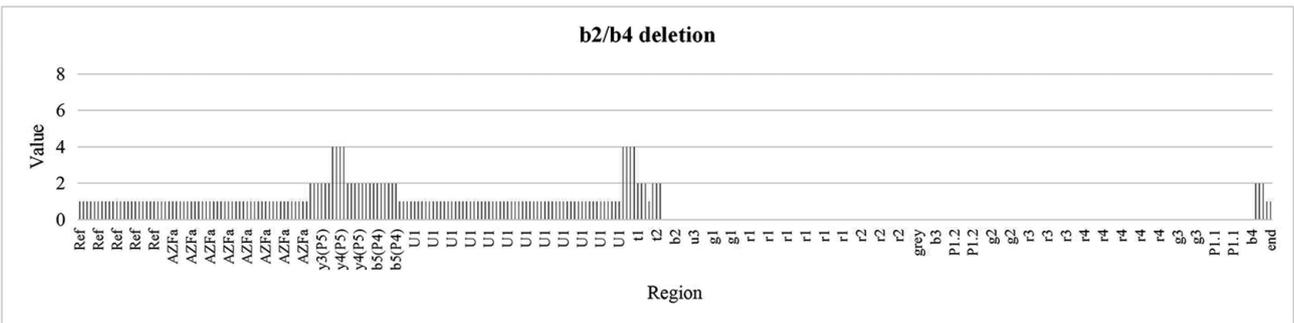


图1C

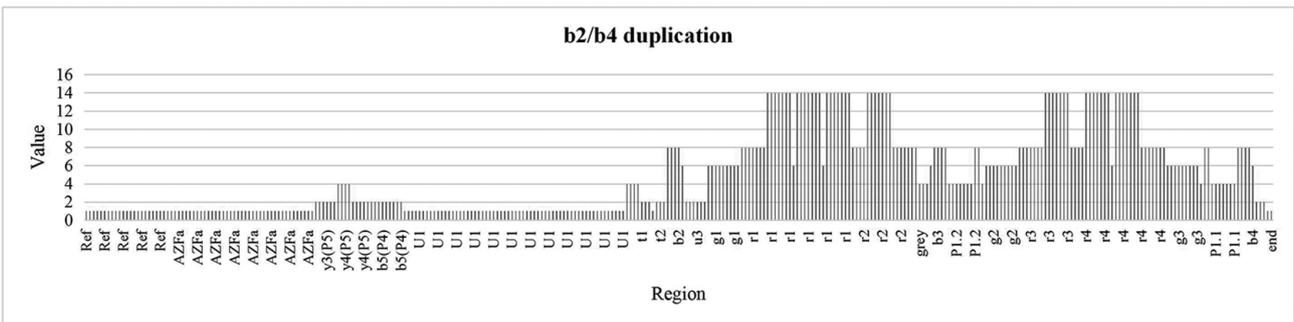


图1D

注：根据信号值的偏差以及柱子所在的区域判断检测结果类型，图 1A 的检测结果为正常，图 1B 为 b2/b3 缺失，图 1C 为 b2/b4 缺失，图 1D 为 b2/b4 重复。

图 1 目标区域的拷贝数检测结果

2.2 病人检测：本研究纳入的 126 名少精症患者中，共检测出 13 种、34 例（26.98%）Y 染色体

AZF 区拷贝数异常。其中 AZFc 区 gr/gr 缺失发生频率最高，达到 10.32%（表 1）。

表 1 AZF 缺失和重复病例分布

类型	NGS 检测结果		经典 6 位点检测结果*	
	样本数	比例/%	是否存在缺失	检测结果
正常	92	73.02	否	Normal
gr/gr 缺失	13	10.32	否	Normal
b2/b3 缺失	7	5.56	否	Normal
gr/gr 重复	3	2.38	否	Normal
b2/b4 缺失	2	1.59	是	AZFc
gr/gr 缺失, b2/b4 重复	1	0.79	否	Normal
b1/b3 缺失	1	0.79	否	Normal
b2/b3 缺失, grey1 r2 重复	1	0.79	否	Normal
b2/b3 缺失, b3/b4 重复	1	0.79	否	Normal
b2/b3 缺失, grey1 r1 r2 重复	1	0.79	否	Normal
AZFb+c 缺失 (y4-AZF 末端缺失)	1	0.79	是	AZFbc
b2/b3 重复	1	0.79	否	Normal
b2/b4 重复	1	0.79	否	Normal
gr/gr 重复, b1/b3 缺失	1	0.79	否	Normal
综合阳性率/%		26.98		2.38

注: * 经典 6 位点是指 AZFa 区的 sY84 和 sY86, AZFb 区的 sY127 和 sY134, AZFc 区的 sY254 和 sY255^[4]。经典 6 位点的检测结果是依据 NGS 检测结果为依据, 根据经典 6 位点的位置进行推断所得。

3 讨论

目前, 多重 PCR 结合电泳技术是临床检测 AZF 区微缺失的主要手段。该技术是通过 PCR 扩增 AZF 区的 STS 位点 (通常选取《欧洲 Y 染色体微缺失分子诊断实践指南》推荐的 6 个 STS), 并以 Y 染色体性别决定基因 (SRY) 扩增产物为内对照, 最终结合琼脂糖凝胶电泳条带信号判定 Y 染色体 AZF 区的缺失类型^[9]。

虽然该技术简单易行, 但在检测准确性和灵敏性上存在以下不足: 1) 该技术通过有限的几个 STS 位点不足以判定缺失的具体范围, 若遇到未知的缺失类型或缺失区域未涉及到所用的 STS 位点, 则检测会出现偏差和漏检, 造成假阴性; 2) 该技术不能检测拷贝数变化, 尤其面对类似 gr/gr 的缺失情况, 这类缺失只是引起 g、r 区拷贝数发生变化, 而对应的 STS 位点 (sY254、sY255) 的 PCR 条带则正常, 最终出现漏检, 造成假阴性; 3) 同样, 由于该技术不能检测拷贝数变化, 对于微重复的病例也会出现漏检, 造成假阴性; 4) 该技术由于 PCR 反应和电泳操作的波动, 可能在最终 STS 位点条带显示上存在偏差 (例如非缺失的 STS 位

点却没有出现条带信号), 造成检测的假阳性和假阴性。荧光 PCR 技术也是临床应用较成熟的检测技术, 然而同样避免不了上述多重 PCR 结合电泳技术的准确性和灵敏性不足的缺陷^[10-11]。

我们设计的引物有以下特点: 1) 均是以 DNA 上一段序列为模板来设计 3 段连续的引物, 这 3 段引物连接后形成 PCR 模板; 2) 在目标染色体上序列存在已知的拷贝数, 且在目标检测区域之外的其他染色体区域不存在该序列; 3) 这些序列引物具有接近的退火温度, 波动范围 < 5 °C; 4) 与通用扩增引物序列不存在互补性; 5) 与目前已知的具有多态性和染色体拷贝数变异的序列不一致。结果显示, 我们的方法能够精确地判定全部 AZF 区微缺失类型、具体缺失区域及缺失引起的 DNA 拷贝数变化等, 包括目前罕见或未知的缺失类型^[12-13]。和目前的多重 PCR 技术相比, 检出率高, 达 26.98%, 高出文献常规方法的检出率, 获得的信息量大大增加。

由于我们所设计的 AZF 检测位点包含 2014 年《EAA/EMQN》推荐的经典 6 位点, 因此根据 NGS 检测结果, 我们进一步推测了基于 NGS 检测方案与基于经典 6 位点的 PCR 检测方案的差异 (表 1)。经对比发现, 经典 6 位点检测方案仅能检出 3 例阳性患者, 分别为 2 例 AZFc 缺失患者, 1 名 AZFbc 缺失患者, 综合阳性率仅为 2.38%, 显著低于基于 NGS 检测方案的综合阳性率 (26.98%)。

在 NGS 方案检出的阳性案例中, gr/gr 缺失的频率最高, 这与已有的文献报道^[8]一致。Gr/gr 缺失在不同人群中致病效果表述不一^[4,14-15]。考虑到 2020 年由中华医学会男科学分会发表的《男性生殖相关基因检测专家共识》指出“Y 染色体 AZF 区域缺失推荐检测位点主要根据欧美人群建立, 是否完全适用于中国人群尚无定论。鼓励有条件的医疗机构通过高通量检测技术 (如 NGS) 进行深入研究”, 我们建议在中国人群中进一步推广基于 NGS 检测 AZF 微缺失的方案, 以便进一步明确 gr/gr 缺失对中国男性不育的影响。

总之, 我们开发了一种基于 NGS 的检测 Y 染色体上 AZF 区域微缺失的方法。与 PCR 检测结果相比, 常规方案检出的阳性全部可以通过 NGS 方案检出, 并且 NGS 方案可以检出更多常规 PCR 方案无法检出的 Y 染色体变异, 这对进一步探明不同 Y 染色体变异与男性不育的关系, 提供了有力的实

验技术方案。

参考文献

- [1] Sun H, Gong T T, Jiang Y T, et al. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017; results from a global burden of disease study, 2017 [J]. *Aging*, 2019, 11 (23): 10952-10991.
- [2] 中华医学会男科学分会. 男性生殖相关基因检测专家共识 [J]. *中华男科学杂志*, 2020, 26 (9): 844-851.
- [3] Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility [J]. *Nature Reviews Urology*, 2018, 15 (6): 369-384.
- [4] 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.
- [5] Kuroda S, Usui K, Sanjo H, et al. Genetic disorders and male infertility [J]. *Reproductive Medicine and Biology*, 2020, 19 (4): 314-322.
- [6] Yu X W, Wei Z T, Jiang Y T, et al. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients [J]. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015, 8 (9): 14634-14646.
- [7] Liu X Y, Zhang H Y, Pang D X, et al. AZFa microdeletions: occurrence in Chinese infertile men and novel deletions revealed by semiconductor sequencing [J]. *Urology*, 2017, 107: 76-81.
- [8] Liu X, Zhang H, Zhang X, et al. Y chromosome structural variation in infertile men detected by targeted next-generation sequencing [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38 (4): 941-948.
- [9] Liu T, Song Y X, Jiang Y M. Early detection of Y chromosome microdeletions in infertile men is helpful to guide clinical reproductive treatments in southwest of China [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98 (5): e14350.
- [10] Hwang K, Weedon J W, Lamb D J. The use of fluorescent in situ hybridization in male infertility [J]. *Therapeutic advances in urology*, 2010, 2 (4): 157-169.
- [11] Osborne E C, Lynch M, McLachlan R, et al. Microarray detection of Y chromosome deletions associated with male infertility [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15 (6): 673-680.
- [12] Nailwal M, Chauhan J B. Azoospermia factor C subregion of the Y chromosome [J]. *J Hum Reprod Sci*, 2017, 10 (4): 256-260.
- [13] Colaco S, Modi D. Consequences of Y chromosome microdeletions beyond male infertility [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36 (7): 1329-1337.
- [14] Xie S, Zhang Y, Yang Y. Is the primary AZFc duplication a potential risk for male infertility: A systematic review and meta-analysis [J]. *Andrology*, 2020, 8 (5): 996-1004.
- [15] 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.

• 临床研究 •

上肢功能锻炼对动静脉内瘘术后成熟影响的 Meta 分析

福建卫生职业技术学院 (福州 350101) 庄海林 龚海蓉¹ 唐钦妹²

【摘要】 目的 系统评价动静脉内瘘术后上肢功能锻炼对其成熟的影响。方法 计算机检索 PubMed、The Cochrane Library、Web of Science、外文医学信息资源检索平台、维普网、万方和 CNKI 中对动静脉内瘘术后患者采用上肢功能锻炼的随机对照试验。采用 RevMan5.3 软件对数据进行 Meta 分析。结果 共纳入 9 项研究, 1 434 例患者。Meta 分析结果显示, 上肢功能锻炼对动静脉内瘘临床成熟率 [RR=1.08 (1.01, 1.15), P=0.02]、静脉直径 [SMD=0.24 (0.20, 0.28), P<0.001]、内瘘血流量 [SMD=118.47 (75.21, 161.73), P<0.001], 功能锻炼组与对照组比较差异有统计学意义; 上肢功能锻炼后动静脉内瘘超声成熟率 [RR=1.18 (0.98, 1.42), P=0.09]、内瘘吻合口直径 [SMD=0.07 (-0.26, 0.39), P=0.69]、术侧握力 [SMD=-1.66 (-9.91, 6.59), P=0.69], 功能锻炼组与对照组比较差异无统计学意义。结论 上肢功能锻炼可提高动静脉内瘘临床成熟率, 增加静脉血管直径和内瘘血流量, 但对超声成熟率、内瘘吻合口直径的促进作用尚不明确。目前有关动静脉内瘘术后功能锻炼的文献仍较少, 还需要更多高质量研究进一步论证。

基金项目: 福建卫生职业技术学院 2018 年度应用技术协同创新研究面上项目 (2018-2-4)

作者简介: 庄海林 (1972-), 男, 副教授。研究方向: 慢性病研究、预防医学教育。Email: 392965115@qq.com

1 通信作者, Email: 378613157@qq.com; 2 厦门大学附属福州市第二医院血液净化中心