

非梗阻性无精子症的精母细胞同源染色体联会分析

张秋芳, 黄翔, 闫丽盈, 乔杰*

(北京大学第三医院妇产科生殖医学中心, 教育部辅助生殖重点实验室, 北京 100191)

[摘要] 目的:探讨 Y 微缺失与同源染色体联会异常在精子发生障碍中的意义。方法:选择无 Y 微缺失的单纯精子发生障碍患者 3 例、合并有 Y 微缺失和 AZFc 缺失的精子发生障碍患者 3 例、无 Y 微缺失的精子发生正常者(3 例)为对照组;利用免疫荧光技术比较 3 组睾丸组织中精母细胞的同源染色体联会情况,包括联会复合体(synaptonemal complexes, SC)上 gap 和 split 出现的数目。结果:SC 中出现 gap 的频率在对照组为 10%、单纯精子发生障碍组为 22%、合并有 Y 微缺失的精子发生障碍组为 25%。两个精子发生障碍组与对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$),两个精子发生障碍组之间无统计学差异。SC 中出现 split 的频率对照组为 1%、单纯精子发生障碍组为 13%、合并有 Y 微缺失的精子发生障碍组为 15%。两个精子发生障碍组与对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$),两个精子发生障碍组之间无统计学差异。结论:精母细胞中同源染色体联会异常是影响精子发生的重要机制之一, Y 微缺失的睾丸组织精母细胞中同源染色体联会异常有加重的趋势。

[关键词] 非梗阻性无精子症; Y 微缺失; 同源染色体联会

[中图分类号] R698.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-399-04

Analysis of homologous synapsis in spermatocytes of non-obstructive azoospermics

ZHANG Qiu-fang, HUANG Xiang, YAN Li-ying, QIAO Jie*

(Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital, Key Laboratory of Assisted Reproduction, Ministry of Education, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Y chromosome microdeletion and homologous synapsis abnormalities in spermatocytes of male spermatogenesis failure. **Methods:** Nine cases were recruited in this study, including controls (3 cases), with normal spermatogenesis in their testes; spermatogenesis failure group (3 cases), with spermatogenesis arrest in their testes and without Y microdeletion; and spermatogenesis failure with Y microdeletion group (3 cases). Immunofluorescent staining technology was used to analyze synaptonemal complexes (SC) of spermatocytes. **Results:** There were 10%, 22%, 25% gaps presented in testes of controls, spermatogenesis failure group and spermatogenesis failure with Y microdeletion group, respectively. There were significant differences between two spermatogenesis failure groups and controls (10% vs. 22%, $P = 0.012$; 10% vs. 25%, $P = 0.014$). However, there was no significant difference between two spermatogenesis failure groups. There were 1%, 13%, 15% splits presented in testes of controls, spermatogenesis failure group and spermatogenesis failure with Y microdeletion group, respectively. There were significant differences between two spermatogenesis failure groups and controls (1% vs. 13%, $P = 0.000$; 1% vs. 15%, $P = 0.000$). However, there was also no significant difference between two spermatogenesis failure groups. **Conclusion:** Homologous synapsis abnormalities may play an important factor in spermatogenesis failure. Furthermore, homologous synapsis abnormalities would be more frequent in infertile men with Y chromosome microdeletion.

[Key words] non-obstructive azoospermia; Y chromosome microdeletion; homologous synapsis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 399-402]

近年来,随着辅助生育技术的快速发展,以及人们对辅助生育技术认识的不断提高,越来越多的

不孕不育夫妇利用辅助生育技术获得了自己遗传学意义的后代。而随着环境污染的不断加重,越来越多的已婚男性出现不育。据文献报道,目前大约有 11% 的男人不育,其中遗传因素是重要的发病原因,主要包括染色体异常、微小缺失和基因突变等 3

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(308250381)

*通讯作者, E-mail: jie.qiao@263.net

类^[1-3]。但是,迄今为止,中国还没有相关的准确的数据报道。

随着生物学及分子生物学的发展,关于减数分裂的研究越来越深入。其中,染色体联会是减数分裂中的关键过程。因此,联会复合体(synaptonemal complex, SC)是大家研究的核心,它是一种呈框架状结构的蛋白质复合体,十分保守,是真核生物在性配子发生过程中第一次减数分裂前期同源染色体配对时形成的一种核内临时结构^[4]。SC 蛋白质(synaptonemal complex protein, SCP)的表达具有严格的时间和空间特异性:在减数分裂前期的细线期出现,消失于双线期;SC 与染色体的凝缩、同源染色体的配对、重组以及双链断裂的形成均有关^[5-6]。

因此,研究不育男性生精细胞同源染色体联会的情况,有利于探索此类患者生精障碍的发病机制。基于此点,本研究比较了精子发生正常与严重生精障碍患者精母细胞中同源染色体的联会情况。

1 材料与方法

1.1 研究对象

以 2011 年 10 月~2011 年 12 月在北京大学第三医院就诊的非梗阻性无精子症患者为研究对象,包括不伴有 Y 微缺失的单纯精子发生障碍患者 3 例、合并有 Y 微缺失和 Y 染色体 AZFc 区缺失的精子发生障碍患者 3 例,睾丸组织 HE 染色均提示精子发生严重阻滞,年龄 24~36 岁。另以体外受精(IVF)周期中因取精困难而行睾丸活检的患者 3 例为对照组,睾丸组织 HE 染色提示精子发生正常,所有研究对象外周血核型均为 46,XY。本实验所用睾丸组织均为睾丸活检所得,本研究通过北京大学第三医院医学伦理委员会审查并批准。

实验中所用的抗体包括:兔抗 SCP3 抗体(美国 Santa Cruz 公司:SC-20485);小鼠抗 MLH1 抗体(美国 BD 公司:551092);人抗 CREST 抗体(美国 ImmunoVision 公司:3075);Alexa 555 驴抗兔二抗、Alexa 488 山羊抗小鼠二抗(美国 Molecular Probes 公司);1-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid (AMCA) 驴抗人二抗(美国 Jakson Immuno Research)。其他主要试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 精母细胞减数分裂联会复合体的制备

取睾丸组织新鲜活检样本,立即置于低渗液(30 mmol/L Tris,pH8.2、50 mmol/L 蔗糖、17 mmol/L 柠檬

酸钠、5 mol/L EDTA、2.5 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF,pH8.2~8.4),钝性撕碎,低渗处理 1 h,然后将组织放置在含 0.1 mol/L 蔗糖的载玻片上,制备单细胞悬液,然后铺片。

1.2.2 精母细胞的同源染色体联会的保真度分析

铺好的制片用 0.04% Photo-Flo 洗涤 4 min,晾干。用 ADB(1%驴血清、0.3% BSA 和 0.005% Triton X-100 的 Tris-缓冲液)封闭 30 min。加一抗(兔抗 SCP3、小鼠抗 MLH1、人抗 CREST)37℃孵育过夜。TBS 洗 3 次,加相应二抗,37℃孵育 90 min。TBS 洗 3 次后,封片。用荧光显微镜观察细胞,分析粗线期细胞,统计 SC 上的 gap(不连续的缺口区域)和 split(未配对的泡状区域)数目,每个研究对象分析 200 个细胞。减数分裂联会的保真度以精母细胞 SC 中出现 gap 或 split 的细胞比率进行评价。

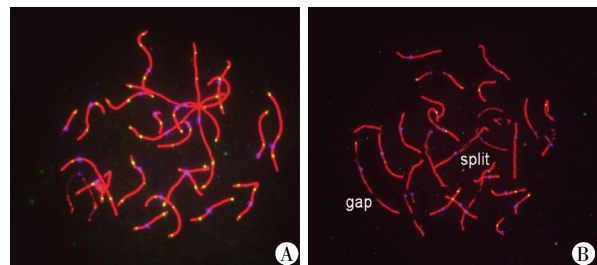
1.3 统计学分析

数据统计分析用 SPSS13.0 软件。率的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

对照组 SC 中出现 gap 的频率为 10%,单纯精子发生障碍组为 22%,合并有 Y 微缺失的精子发生障碍组为 25%。与对照组相比,两个精子发生障碍组 SC 中出现 gap 的频率均明显增加(10% vs. 22%, $P = 0.012$; 10% vs. 25%, $P = 0.014$,图 1),两个精子发生障碍组之间无统计学差异。

对照组 SC 中出现 split 的频率为 1%,单纯精子发生障碍组为 13%,合并有 Y 微缺失的精子发生障碍组为 15%。与对照组相比,两个精子发生障碍组 SC 中出现 split 的频率均明显增加(1% vs. 13%, $P = 0.000$; 1% vs. 15%, $P = 0.000$,图 1),两个精子发生障碍组之间无统计学差异。



A: 精母细胞同源染色体联会基本正常;B: 精母细胞同源染色体联会出现明显异常。绿色:MLH1;红色:SCP3;蓝色:着丝粒($\times 100$)。

图 1 睾丸组织中精母细胞的同源染色体联会分析
Figure 1 Analysis of homologous synapsis of spermatocytes in testes

3 讨论

大量的研究显示,减数分裂过程中同源染色体联会缺陷可引起精子发生延迟甚至停止,进而导致男性不育。SC结构异常在正常男性中的发生率很高,如gap和split的平均发生频率分别为43%、11%,且90%的gap和58%的split发生在9号染色体长臂的异染色质区域^[7]。Sun等^[8-10]研究不明原因的非梗阻型无精症患者,结果显示,33%的减数分裂细胞停滞在偶线期,同源染色体未配对,联会未进行,从而不能到粗线期;64%的减数分裂细胞停滞在粗线期早期,且有多种染色体配对、重组交换异常。他们发现这些患者有偶线期/粗线期细胞比例增多,提示减数分裂过程发生停滞;同源染色体联会/重组交换异常,gap/split数目明显增多。本研究也发现,同源染色体联会中gap/split数目明显增多。这些结果也提示,同源染色体的联会异常是影响精子发生的重要机制之一。同时,我们观察到在精子发生障碍的睾丸组织中,偶线期/粗线期细胞比例增多的精母细胞数量比例明显高于对照组,说明这些患者的精子发生过程中减数分裂受到阻碍,影响了精子发生的顺利完成,其中部分精母细胞只是减数分裂减慢,但最后仍能完成分裂,进入下一阶段;而对于受阻比例更高的细胞可能就被阻滞在减数分裂早期,最后导致精母细胞凋亡或者退化。由于需要进一步深入研究,这一部分数据没有显示。

随着辅助生育技术的发展,越来越多的不孕不育夫妇有机会获取自己遗传学意义的后代。但是,随着环境污染的不断严重,越来越多的男性出现了明显不育。而其中精子发生异常是男性不育的重要内容。北京大学第三医院每年因无精症而行睾丸活检或附睾穿刺手术的患者超过1000例。随着对精子发生研究的不断深入,大量证据显示,Y微缺失是精子发生异常的一个重要原因^[11]。目前,国内外很多生殖中心都已经将检测Y微缺失作为常规的检测手段。对于有Y微缺失的男性不育患者,常常建议其进行胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetics diagnosis,PGD),选择女性胚胎移植,以防止不育的男性后代出生。但是,由于缺少相关机制的研究,因此缺少有力的证据佐证这个观点,在临床工作中患者常常不选择女性胚胎,因此,研究Y微缺失的深入影响,有着重要的社会意义。

本研究首次将Y微缺失与精母细胞的联会联合起来研究。早有研究显示,AZF不同区的缺失与

不同程度的生精障碍有关^[12]。Krausz等^[13]认为,AZFc缺失大约占60%,AZFb和AZFb+c或者AZFa+b+c缺失大约占35%,而AZFa的缺失比较少只占约5%,而后者主要与唯支持细胞综合症(sertoli cell only syndrome,SCOS)有关。对于无精症患者,如果伴有AZFa或者AZFb的缺失,提示这些患者睾丸活检的意义不大,应该避免手术。我们知道,精子发生是一个复杂而精细的分化过程,经过有丝分裂、减数分裂、减数分裂后精子细胞的变形3个阶段。在所有事件中,同源染色体的联会尤为关键,因为其是减数分裂的起始,是保障配子正确分化的基础,最终决定配子遗传特性。一旦同源染色体联会发生异常,将增加非整倍体配子发生,甚至发生不同阶段的生精阻滞,出现临床的无精症、反复流产、畸形儿等。而Y微缺失的存在是否与同源染色体联会异常有着密切的关系呢?本研究对单纯精子发生障碍者与合并有Y微缺失的精子发生障碍者的睾丸中精母细胞的联会进行比较。虽然比较结果并没有统计学意义,但是后者有明显加重的趋势。分析原因可能有以下几点:①可能与本研病例数较少有关。由于Y微缺失的病例并不多,同时有些患者儿时合并有腮腺炎,因为后者也是影响精子发生的一个重要原因,所以这些患者未纳入该项研究;②本中心检测的是中国人比较常见的微缺失位点,不包括研究发现的其它罕见的缺失位点或区域;③本研究中没有严重影响精子发生的AZFa缺失的病例。有1例患者合并AZFa、AZFb、AZFc3个区域的缺失,但是由于睾丸组织极少,没有能得到相应的实验结果。因此,还需要扩大病例,进一步深入研究Y微缺失与同源染色体联会之间的相关性。迄今为止,导致SC形成失败的具体作用机制尚不清楚。早在20世纪,Vidal等^[14]的研究就发现,SC粉碎化、膨胀化、配对紊乱导致精子发生失败。在人类男性不育症机制的研究中,目前已经发现有2例患者与SCP3基因的突变有关^[15],1例与SCP1基因的突变有关^[16]。另外,我们将继续深入研究联会异常发生的主要染色体种类。

综上所述,精母细胞同源染色体联会是影响精子发生的重要因素之一,合并Y微缺失的精子发生障碍患者可能存在更加紊乱的同源染色体联会。

[参考文献]

- [1] Solari AJ. Synaptonemal complex analysis in human male infertility[J]. J Eur Histochem, 1999,43(4):265-276
- [2] Chandley AC. Chromosome anomalies and Y chromosome

microdeletions as causal factors in male infertility [J]. Hum Reprod, 1998, 13(suppl 1):45-50

[3] Vogt PH. Molecular basis of male infertility [J]. Int J Androl, 1997, 20(suppl 3):3-10

[4] Fawcett DW. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes [J]. J Biophys Biochem Cytol, 1956, 2(4):403-406

[5] Heyting C. Synaptonemal complex: structure and function [J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(3):389-396

[6] Page SL, Hawley RS. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20:525-558

[7] Hansmann I. Structural variability of human chromosome 9 in relation to its evolution [J]. Hum Genet, 1976, 31(2):247-262

[8] Sun F, Greene C, Turek PJ, et al. Immunofluorescent synaptonemal complex analysis in azoospermic men [J]. Cytogenetic Genome Res, 2005, 111(3-4):366-370

[9] Sun F, Kozak G, Scott S, et al. Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: Case report [J]. Hum Reprod, 2004, 19(8):1770-1773

[10] Sun F, Turek P, Greene C, et al. Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia [J]. Fertil Steril, 2007, 87(3):565-571

[11] 夏欣一, 杨滨, 崔英霞, 等. 男性不育的遗传学病因研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(9):837-841

[12] Fujisawa M, Shirakawa T, Kanzaki M, et al. Y-chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia [J]. Fertil Steril, 2001, 76(3):491-495

[13] Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: Update, 2006 [J]. Front Biosci, 2006, 11:3049-3061

[14] Vidal F, Templado C, Navarro J, et al. Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males [J]. Hum Genet, 1982, 60(4):301-304

[15] Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3 [J]. Lancet, 2003, 362(9397):1714-1719

[16] Judis L, Chan ER, Schwartz S, et al. Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex [J]. Fertil Steril, 2004, 81(1):205-209

[收稿日期] 2012-01-10

