行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台灣男性不孕病人染色體和 Y 染色體基因病變的篩檢研究(3/3)

Screening study of the chromosome disorder and gene disorder in the Y chromosome of the Taiwanese infertile male

計畫編號：NSC 90-2314-B-038-050
執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日
主持人：江漢聲　　台北醫學大學醫學研究所

一、中文摘要

本研究計畫以三年的時間做台灣男性不孕病人染色體和 Y 染色體基因病變的全面篩檢。我們共篩了 415 位男性不孕病人，其中 279 位無精蟲、136 位精蟲極度稀少，發現共有 86 位病人染色體或 Y 染色體上基因缺陷，佔 20.7%，其中較有意義的發現是精蟲極度稀少的病人，也有相當比率的病變，在染色體結構上異常有七位（5.2%）比率和無精蟲病人的染色體結構異常比率 5.4%差不多，也有一位 47XXY 的染色體異常；另有 12 位（8.8%）Y 染色體基因缺損；這些病人可以藉現代生殖科技的卵細胞質內單一精蟲注射來達到生育的目的。而我們在父代子代的追蹤上發現在 Y 染色體基因缺損的病人，父代並無缺損，子代卻有更大範圍的缺損，顯示這種 DeNovo 的變異不僅會遺傳而且會擴大。本研究的結果建議男性不孕病人必須做例行的染色體和 Y 染色體篩檢，並且在進行生殖科技治療前做遺傳諮商，以確保後代的身心健康。

關鍵詞：男性不孕、Y 染色體、基因顯微缺損

Abstract

In our 3 years study of the chromosome disorder and gene disorder in the Y Chromosome, we totally screened 415 Taiwanese patients with male infertility – 279 azoospermia patients and 136 Severe oligozoasthenospermia patients. There are 86 patients (20.7%) in this study found to have Chromosome disorder or Y Chromosome gene deletion. Our special findings are including that patients with severe oligozoasthenospermia also have a similar prevalence (5.2%) of structural anomaly of chromosome as that of the patients with azoospermia (5.4%). There is also an oligozoasthenospermia patient has the 47XXY Chromosomal Anomaly. The prevalence of Y chromosome gene microdeletion for the patients with severe oligozoasthenospermia is even higher (8.8%) than that for the patients with azoospermia. Patients with severe oligozoasthenospermia could have their own child by the technique of ICSI (intracytoplasmic sperm injection). The existed genetic disorder might became a hazard of early spontaneous abortion after fertilization and implantation, or might inherited to the son. We follow-up our patients who had received ICSI treatment and got male offspring's, and found that the microdeletion of Y chromosome gene is a kind of DeNovo mutation and can become a longer deletion in the Y chromosome of this son. These result may suggest a that the examinations of chromosome and Y chromosome gene deletion should be routine procedures for the patients with azoospermia and severe oligozoasthenospermia. It also provides the detail genetic information for the couples in preoperative counseling.

Keywords: Y Chromosome gene deletion, oligozoasthenospermia, azoospermia,

二、緣由與目的

卵細胞質內單一精蟲注射(Intracytoplasmic Single Sperm Injection 簡稱 ICSI)已經成為我們男性不孕治療的一個選擇[1]，從 1992 年開始這種人工生殖科

技以來[2]，十年來對這種治療是否會有遺傳的問題有許多爭議[3]，所以遺傳篩檢[4]、生育諮商[5]都已是我們男性不孕門診的例行工作。

本研究從三年前起就進行 Y 染色體基因缺損的大量篩檢和分析，其間有些重大的發現，包括：

(1) 精蟲極度稀少（Severe Oligoazoospermia）的病人，也會有染色體的異常，大部分都是結構異常(Structural Anomaly)，這是早期胚胎異常而流產的原因[4]；此外，我們發現精蟲極度稀少的病人在 Y 染色體基因缺損的比率（10.3%）還要比無精蟲病人多（9.2%），這和一般文獻中所敘述的不相同[6]。

（2）Y 染色體基因缺損的病人，合併染色體異常比率偏高（31.3%），其中無精蟲病人染色體異常可高達 42%，而一般無精蟲病人染色體異常祇有 20%，可以證明 Y 染色體缺損可能祇是多重染色體異常中的一部份[6]。

（3）我們大部分的病人 Y 染色體上缺損的部分在 AzFc 到 AzFd 區，精蟲的變異性也較大；有半數病人尚有精蟲，也會有生育力，所以必須做完整的追蹤。

因此，在我們第三年的計劃中，我們對所累積的415病例做進一步的研究分析：

（1）AzFa 區的缺損再偵測：由於尚無 AzFa 區片段缺損的病例發現；因此，我們對是否仍存有較嚴重缺損的病例感到懷疑，改用在 AzFa 區較常見缺損的基因去做 PCR，再做一次篩檢，也是對我們先前所做的片段複檢來看檢查缺損的方法是否正確。

（2）對有精蟲病人以及做過取精和 ICSI 病人共 10 位進行追蹤問卷和後代篩檢，看 Y 染色體基因缺損是否會遺傳給下一代。

三、結果與討論

我們在 1998 年月至 2002 年月三年間共完成 415 位男性不孕病人的篩檢，在這大量的篩檢中，共有 86 位有染色體或 Y 基因的問題，比率共有 20.7%，而 63 位是染色體的問題（15.2%），33 位是 Y 染色體上基因的問題（8%）（表一）；雖然比先前樣本數較少時報告的比率稍微下降，可是和國外的報告比起來，是相當合理的一個比率[7]，而且，在精蟲稀少的 136 位病人中，有 12 位(8.8%)Y 染色體基因缺損，8 位其它染色體異常（5.9%），比文獻中所敘述祇有 3.4%有 Y 染色體基因缺損[5]還來得嚴重，顯示這類男性不孕的檢查將來更須要做遺傳的篩檢。

在染色體的篩檢上，我們一共發現了 63 位染色體異常的病人；絕大部分還是無精蟲病人，共有 55 位，佔無精蟲病人的 15.2%，而精蟲較少的病人祇有 8 位，佔精蟲較少的病人的 5.9%；其中染色體數目（Numerical Disorder）異常，有 40 位無精蟲病人染色體數目異常，其中最多的是 47XXY，也就是 Kleinefelter 症候群，佔所有無精蟲病人的 12.5%，和文獻上報告差不多[8]；比較特別的是我們也發現一位極度精蟲稀少的病人染色體是 Pure 47XXY，表示這位病人睪丸內尚有製造精蟲的功能，也證實文獻上所報告 47XXY 病人尚有少數可藉由 ICSI 來生育後代[9][10]。至於染色體結構上異常（Structual Disorder），則在無精蟲病人中有 15 位佔 5.4%，而在精蟲極度稀少病人中有 7 位佔 5.2%，兩組病人的比率差不多，表示這是存在於所有不孕病人中的一個普遍問題—染色體結構異常，也可能導致不同程度的精蟲製造缺損；也是造成受孕後自然流產的原因[4]。

在本年度計劃中我們針對30位不同程度 Y 染色體上基因缺損的病人做 AzFa 上幾種最常見的基因做 PCR 的篩檢。因為以往我們所做的篩檢是以區域的偵測，去瞭解兩基因之間的區域是否有缺損，像最多是 SY153-277 這兩基因之間的區域（AzFd 之內）缺損病人共有 19 名；這些都是影響

製造精蟲功能較少的區域。而更接近 centromere 的區域，則是影響製造精蟲更嚴重的區域如 AzFb，AzFa；在本研究中則較少見到有缺損的現象（表三）（圖一），在最嚴重的區域 AzFa，在本研究中除了兩位整條 Y 染色體都闕如的病人之外，並沒見到其它病人在 AzFa 之內的任何區域的缺損，使我們懷疑到底是不是沒偵測到。所以底下這些我們從文獻上找出 AzFa 上最常見缺損的基因如下列[11][12]：SY85，SY86，SY82，SY630，SY745，SY87，SY88，SY704，SY740，UTY1（圖二），以每一基因為單位做成 Primer 和對照組對照來看是否有哪個基因缺損。有兩位整條 Y 基因闕如的病人都看不到這些基因的顯現，而其它 28 位在 Y 染色體上 AzFc，AzFc 至 AzFd 或 AzFc 至 AzFb 區域有缺損的病人，以上 10 種 AzFa 區域中的基因均無缺損，結果顯示，我們以往偵測區域缺損的篩檢是很精確的。也可以得到一個結論是，在 Y 染色體基因缺損的病人大部分還是缺損到影響製造精蟲較少的區域 AzFc 和 AzFc 到 AzFd(共 66.7%)。（表三）

也由於大部分病人都尚有製造精蟲的功能，所以也可以藉由現代 ICSI 的生殖科計有自己的後代；至於子嗣是否也會有 Y 染色體的基因缺損呢？則是很值得探討的問題[13][14]。本研究中目前追蹤到兩位經由 ICSI 生育成功的病人，一位生了兩個女兒，一位有一子一女，有兒子的這位病人，我們將其父親和兒子都做 DNA 抽取的 Y 染色體基因篩檢，發現他父親並無 Y 染色體的缺損，病人 AzFc 區的 DAZ 基因的缺損應該是 De Novo 的變異而來，更有意思的是他兒子 Y 染色體有從 DAZ 到 SY153 的缺損，也就是從 AzFc 到 AzFd 區的缺損（圖三），所以缺損不僅遺傳，而且擴大[15]。為什麼傳下一代後缺損會擴大？是一個相當值得深入研究的題目，不過目前為止，我們可以在 ICSI 前的不孕諮商中讓病人夫婦知道這個訊息，並做更進一步的生育規則和決定[16][17]。

四、計畫成果自評

本研究在三年內收集 415 位男性不孕病人包括 279 位無精蟲、136 位精蟲極度稀少的病人，共發現了 86 位遺傳缺陷的病人，不僅是國內空前的最大系列調查，目前文獻中，單一醫院能有 33 位 Y 基因缺陷病例的分析也是僅有。在篩檢有些重大的發現，包括精蟲極度稀少的病人也有相當比例的染色體和 Y 染色體基因的變異，是以後遺傳諮商的重要參考，也有一位 47XXY 尚有精蟲的病例發現。更有價值的是父代子代的追蹤上發現 Y 染色體基因缺損會遺傳並擴大。值得更進一步的統計、分析和原因探究。三年來，病例數銳減，是否為國內不孕症患者治療意願減低，以後希望能建立全國男性不孕的連結網，才能繼續大幅擴大樣本數，並在遺傳篩檢上提供全國不孕中心的服務。

五、參考文獻

[1] Chiang, H. S., Liu, C. H., Tzeng, C. R., and Fang, C. L. Surgical and pathologic observations of epididymal tubules during microscopic epididymal sperm aspiration for intracytoplasmic sperm injection. J Formos Med Assoc. 97:838-844, 1998.

[2] Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 34:17-18, 1992.

[3] Hansen, M., Kurineznk, J. J., Bower, C., Webh, S., The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. NEJM. 346:725-730, 2002..

[4] Chiang, H. S., Wei, H. J. and Chen, Y. T. Genetic screening for patients with

azoospermia and severe oligo-asthenospermia. Int J Androl. 23:20-25, 2000.

[5] Simoni, M., Kamischke, A., and Nieschlag, E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Hum Reprod. 13:1764-1768, 1998.

[6] Weil, D. et al. Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hst-spots for ectopic recombinations leading to XX males. Nature Genetics. 7:414, 1994.

[7] Mak, V., Jarvi, K, A. The genetics of male infertility. J Urol. 156:1245-1256, 1996.

[8] Rao, M., Rao, D. Cytogenic studies in primary infertility. Fertil. Steril. 28:209, 1977.

[9] Bourne, H., Stern, K., Clarke, G., Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa from a patient with 47, XXY Klinefelter's syndrome. Hum Reprod. 12: 2447-2450, 1997.

[10] Sasagawal, I., Nakada, T., and Yanagimachi, R. Application of ICSI for cryptorchid therapy. Arch Androl. 45:77-83, 2000.

[11] Carole, A. S., Catherine, A. B., Stefan, K., Graeme, B., Birgit, W., Anita, T., Paul, B., Neomie, S., Christine, D., Nicolas, L., Philippe, T., Timothy H., Howard, C., Michael, M., Gudrun, A. R., Nabeel, A. A. The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. J Med Genet. 36:670-677, 1999.

[12] Lin, Y. M., Teng, Y. N., Lee, P. C., Lin, Y. H., Hsu, C. C., Lin, J. S. N., Kuo, P. L. Y chromosome deletion in Taiwanese patients with spermatogenic failure: role of AZFa candidate genes AZFaT1, DFFRY, DBY and UTY. J Formos Med Assoc .

[13] David C. P., Sherman, S. and Laura, G. B. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. Hum Reprod. 14:1722-1726, 1999.

[14] Peter L. C., Mark, V. S. and Stephen, B. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. Hum Reprod. 14:2689-2694, 1999.

[15] Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes. Am. J. Hum. Genet. 59:1393-1395, 1996.

[16] Chang, L. J., Kuo, M. C. and Chiang, H. S. A study of the childbearing conceptions of male infertility outpatients. Formosan J of Sexology. 6:64-76, 2000.

[17] Biesecker, B. B., Marteau, T. M. The future of genetic counseling: an international perspective. Nature Genetics. 22:133-137,1999.

表一、Incidence of genetic defects in 415 patients with azoospermia or oligo-asthenospermia

		Chromosome disorder	Y gene deletion	Total
Azoospermia group	*N*=279	55（19.7%）	21（7.5%）	*68（24.4%）
Oligoasthenospermia group	*N*=136	8（5.9%）	12（8.8%）	**18（13.2%）
Total	*N*=415	63（15.2%）	33（8.0%）	86（20.7%）

*Eight patients in the azoospermia group have both chromosome disorder and Y gene deletion. **Two patient in the oligo-asthenospermia group has both chromosome disorder and Y gene deletion.

表三、Distribution of the Different Types of Microdeletion on Y Chromosome in the Study of 33 Infertile Males with Azoospermia and Severe Oligoasthenospermia

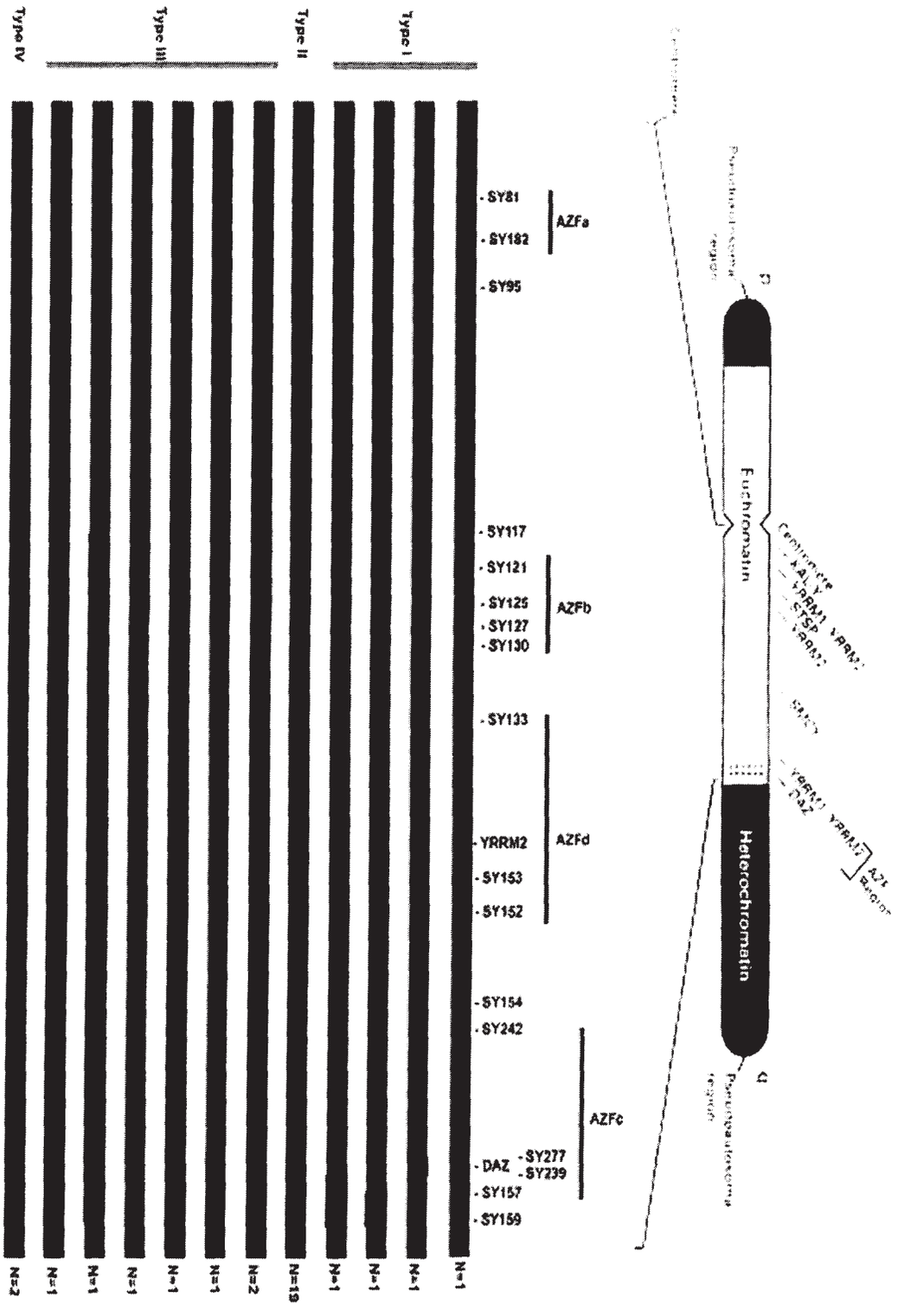
		Azoospermia	Severe Oligoasthenospermia	Total
Type I	Within AZFc area	3	1	4 (12.1%)
Type II	From AZFc to AZFd	9	9	18 (54.5%)
Type III	From AZFc to AZFb	7	2	9 (27.3%)
Type IV	Beyond AZFa	2	0	2 (6.1%)
Total		21	12	33 (100%)

表二-1、Classification of chromosome disorder in 55 patients with azoospermia

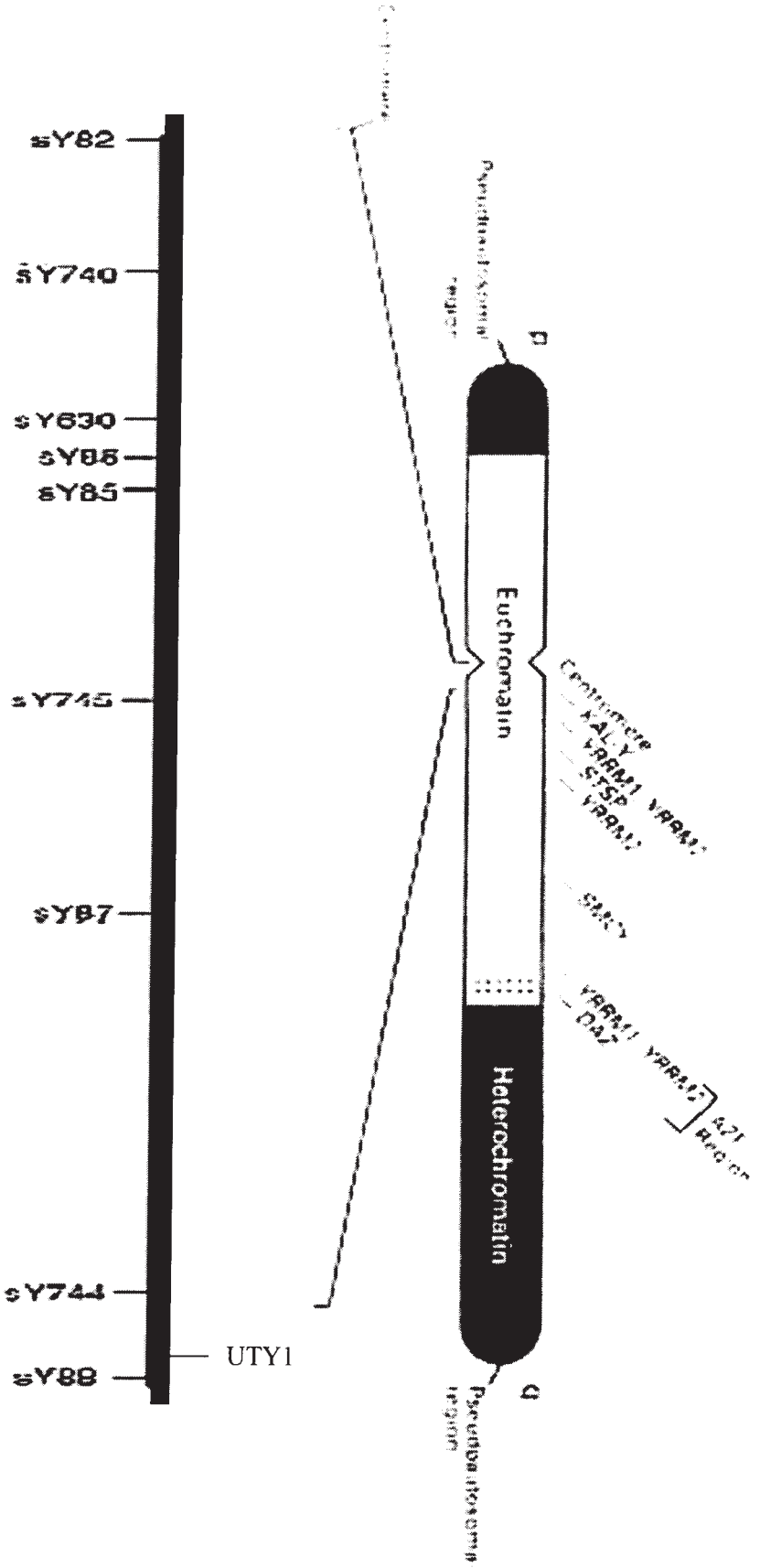
	Cases
Azoospermia group（N=279）	
I. Numerical disorders	
47XXY	35
Pure 47XXY	32
Mosaic 47XXY	3
46XY/47XXY（20%:80%）	1
46XY/47XXY（15%:85%）	1
46XX/47XXY（8%:92%）	1
47XYY	1
45X/46XY（30%:70%）	1
45X/46XY（25%:75%）	1
46XX	2
II. Structural anomalies	15
46X, t（6:Y）（p22, q11.2）	
46X, idic（Y）（p11.2）	
46XY, inv（15）（p13, q11.2）	
46X, inv（Y）（p11.2, q11.2）	
46X, Yqh-	
46X, + mar	
46XY, r（21）（p11.2, q22.2）/46XY, r（21）/45XY-21	
46X, ter rea（X; Y）（Xqter→cen→Xp22.3, Yp11.3→Yqter）	
46X, del（Y）（q11.2）	
46XY, inv（9）（p11q13）	
46XY, ins（18;10）（q21.3;q22.1;q26）	
46XY, 21pstk+	
46XY, t(2;7;16)（q31;q11.2;q22）	
Total	55

表二**-2**、Classification of chromosome disorder in 8 patients with oligoasthenospermia

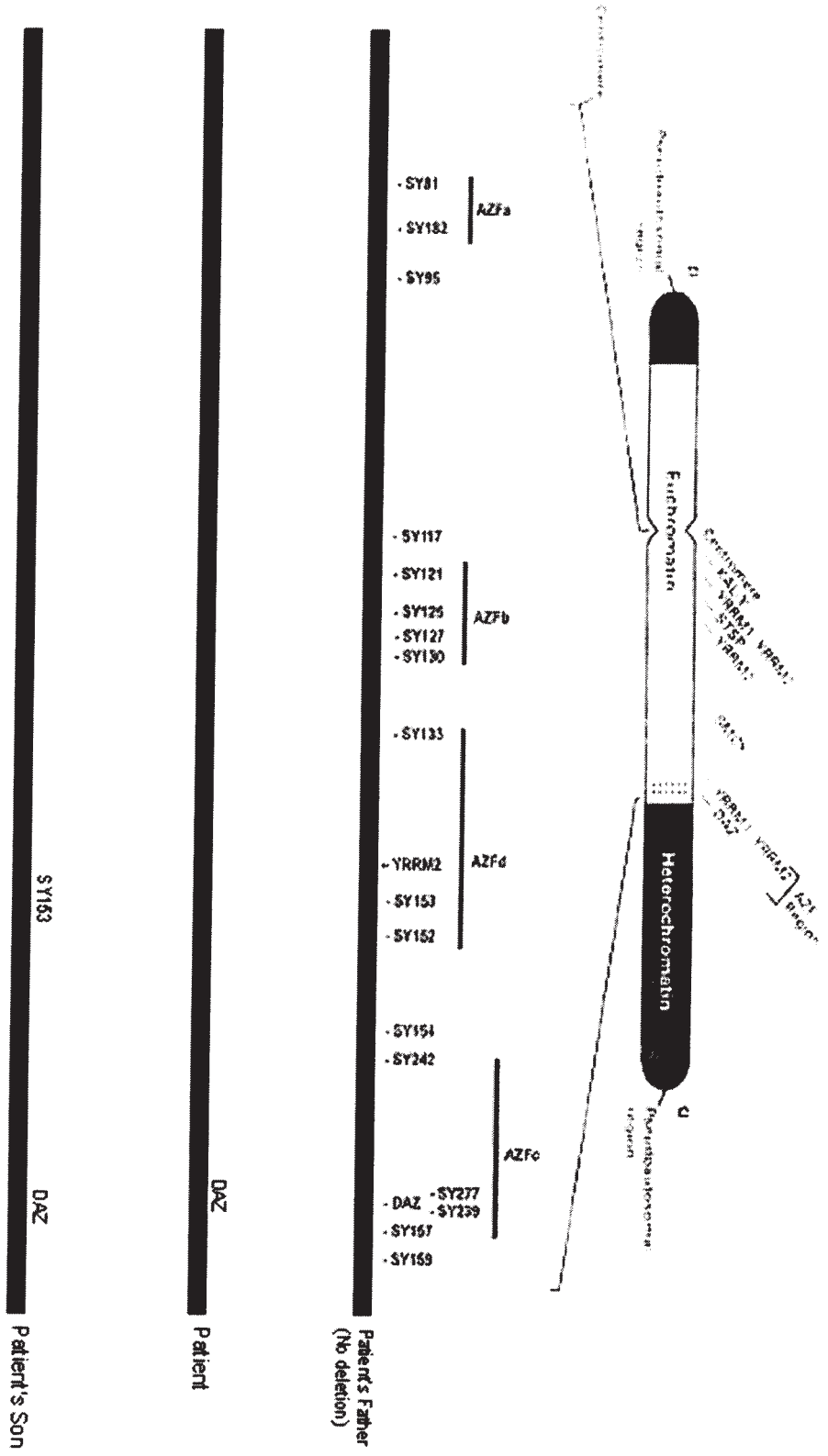
	Cases
Oligo-asthenospermia group（N=136）	
I. Numerical disorders	1
Pure 47XXY	
II. Structural anomalies	7
45XY, der（14; 21）(q21, q10）	
46XY, inv（9qh）	
46XY, t（1;19）(q21, p13.3）	
46XY, t（1;2）(p22, q31）	
46XY/47XY + 18（80%:20%）	
47XY, + mar	
46X, inv (Y)(p11.2;q11.2)	
Total	8



圖一、33 位病人 Y 染色體上基因缺損的分佈圖



圖二、AzFa 上常見十種基因缺損的位置圖



圖三、已經 ICSI 生子病人和父代、子代 Y 基因缺損演變圖