

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告
台灣無精蟲或精蟲極度不良的男性不孕病人 Y 染色體基因缺損
研究(二)-臨床和病理的對照分析

Clinical and Pathological Correlation of the Microdeletion of Y
Chromosome for the Patients with Azoospermia and
oligoasthenospermia in Taiwan

計畫編號：NSC 89-2314-B-038-080

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 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

在本年度計畫中，我們從 334 位男性不孕病人中篩檢出 32 位 Y 染色體基因缺損的病人，做臨床、病理、整體染色體異常的分析；並把 32 位病人缺損區域分成四類，將缺損情況和臨床、病理、整體染色體異常對照，發現：

1. Y 染色體上基因缺損的區域有其特性；在 AzFc 區域內的缺損影響製造精蟲功能最小；3 位病人中有 2 位精液中尚有精蟲。AzFc 到 AzFd 區內的缺損則尚有 52.6% 在精液內有精蟲，AzFc 到 AzFb 區內的缺損則祇有 12.5% 在精液內有精蟲，兩位 Y 染色體完全缺損的病人則全無精蟲。

2. 臨床以睪丸大小和血清中 FSH 濃度來評估製造精蟲功能，結果也和 Y 染色體上缺損的區域相稱。從第一類 AzFc 區內缺損、第二類 AzFc 到 AzFd 區內缺損、第三類 AzFc 到 AzFb 區內缺損到第四類 Y 染色體完全缺損，睪丸大小和血清中 FSH 濃度不正常的比率明顯變高。

3. 在 32 位 Y 染色體缺損病人中整體染色體異常率(31.3%) 要高於 334 位男性不孕病人的染色體異常率(15.9%)。

4. 11 例做病理切片病人的結果，以及在任一區缺損均有不同表現個案來看，Y 染色體上基因缺損絕非影響製精功能的單一因素；還有其他可能基因、染色體缺陷和外在因素影響睪丸的製精功能。

關鍵詞：男性不孕症、無精蟲症、Y 染色體、基因缺損

Up to this year of our study, we screened out 32 cases of microdeletion of Y chromosome from 334 patients with male infertility. The clinical informations, chromosomal anomalies and pathological pictures of these 32 cases were collected for a correlative study to evaluate the severity of the spermatogenesis defect. We divided the cases of microdeletion of Y chromosome into 4 groups with deletion in 4 different areas; AzFc, from AzFc to AzFd, from AzFc to AzFb and the whole segment of Y chromosome deletion. Based on our observation, there are some remarkable difference among the 4 groups as the followings:

1. When the deletion area is within AzFc, it has less affect to the spermatogenesis. Two of the 3 patients still have sperm appeared in the semen. If the deletion area is from AzFc to AzFd, 52.6% patients still have sperm appeared in the semen; however, when the deletion area is from Azfc to AzFb, only 12.5% patient is oligozoospermia, others are total azoospermia.
2. Clinically, the testicular size and semen FSH level are used to evaluate the function of spermatogenesis. It is quite compatible to the wideness of deletion area in the Y chromosome. When the deletion is within AzFc area, 66% of the patients have normal size tests and normal FSH level of the deletion extends from AzFc to AzFd area, 47.4% and

Abstract

73.7% patients have normal size tests and normal FSH. However, patients with microdeletion of Y chromosome in the area from AzFc to AzFb, only 12.5% patients have normal size tests and 37.5% patients have normal FSH.

3. The overall anomaly rate of chromosome is higher (31.3%) in the 32 patients with microdeletion of Y chromosome than that of the 334 patients with male infertility (15.9%) in this study.
4. Based on the findings that spermatid is still present in the pathological specimen of the patients in the different group of Y chromosome deletion, as well as that variable clinical picture appeared in each group of Y chromosome deletion, we can conclude that the causing factors of spermatogenesis defect is multiple. It's needed further investigation.

Keywords: Male Infertility, Azoospermia, Y Chromosome, Gene Deletion

二、緣由與目的

自從卵細胞質內單一精蟲注射 (Intracytoplasmic Single Sperm Injection 簡稱 ICSI) 為許多睪丸起因的無精蟲症或精蟲極度不良病人開啟了生育的機會之後 (1) (2), 對這類男性不孕病人研究的重點改向了遺傳基因和諮詢, 因為這對病人治療的選擇決定有相當重要的參考價值 (3)。

本研究在第一年的計畫中針對 220 位台灣男性不孕的病人做染色體和 Y 染色體基因缺損的篩檢 (4), 結果發現共有 36 位 (16.4%) 病人有染色體的異常, 至於 Y 染色體上基因缺損, 則無精蟲病人中有 12 位 (9.0%) Y 染色體上基因缺損, 精蟲極度不良病人中有 10 位 (11.6%) Y 染色體上基因缺損, 比率上來看, 後者反而居多。所以 Y 染色體基因缺損對男性不孕的影響更為複雜, 也值得深入研究。

在第二年的研究中, 至民國 90 年 3 月止我們將病案收案增至 334 位男性不孕病人, 包括 218 位無精蟲病人, 116 位精蟲極度不良病人, 在遺傳缺陷的比率上如表一, 和第一年的結果相去不遠。而在第二

年的計畫中, 我們更進一步去分析共 32 位 Y 染色體上基因缺損的病人的臨床和病理對照情形。因為最近對這些缺損所造成病人不孕的程度有很多爭議 (5)(6), 在我們病例術較多時, 做完整的對照分析, 有幫助釐清這些爭議中的幾個重點。

三、結果與討論

從圖一看出我們共 32 位病人 Y 基因缺損的部位, 為了分析 Y 基因缺損和臨床病理的對照關係, 我們參考了最近的一些文獻, 分析較大幾個系列有關 Y 染色體上基因缺損的分佈 (7)(8), 將這些基因缺損分成四類 (表二), 依照其嚴重程度分為第一類在 AzFc 範圍之內, 也就是在 DAZ 基因附近的缺損; 第二類在 AzFc 和 AzFd 範圍中的缺損; 第三類是到達 AzFb 或超過這一區的缺損; 第四類則是到達 AzFa 或更大的缺損。在我們 32 例中有兩例是完全看不到 Y 基因的 46XX 病例。32 例 Y 染色體上基因缺損分佈可見表三, 最多 19 位病人是第二類從 AzFc 到 AzFd 的缺損。這類缺損病人有 9 位 (47.4%) 在臨床上是完全無精蟲, 有 10 位 (52.6%) 是精蟲極度稀少; 其次是第三類從 AzFc 到 AzFb 缺損的 8 位病人, 在這類缺損病人中有 7 位 (87.5%) 在臨床上是完全無精蟲, 有 1 位 (12.5%) 是精蟲極度稀少。最輕度缺損是第一類在 AzFc 範圍之內有 3 位病人, 這類病人有 2 位 (66.6%) 是精蟲極度稀少, 但也有 1 位 (6.3%) 是完全無精蟲症, 第四類有兩位病人是 46XX, 這類病人 Y 基因完全缺損, 臨床上都是完全無精蟲症。從以上的分析來看, Y 染色體上基因缺損愈遠離 AzFc 區, 範圍愈大, 臨床上完全無精蟲的比例也愈高; 這從第三類, 到達 AzFb 區和其附近的基因缺損病人有 87.5% 無精蟲。而第二類到達 AzFd 和 AzFc 區的基因缺損病人祇有 47.4% 無精蟲來看是有意義的; 然而祇從缺損到達的區域並不能預測病人是否有精蟲出現, 這從在第一類祇是 DAZ 和附近區域缺損病人仍有無精蟲症來看, 顯示決定臨床睪丸製精功能絕非祇有 Y 染色體上的已知基因而已。

如果我們分析 32 位病人中整體染色體異常的比率來看, 32 位病人中有 10 位整

體染色體異 (31.3%)，而在我們 334 位男性不孕病人中，只有 53 位染色體異 (15.9%)，可見得有 Y 染色體上基因缺損的人事實上有較高的染色體異的機率，如果再從四類不同的缺損情況來看的話，在 AzFc 第一類的缺損只有一例染色體異，在第二類從 AzFc 到 AzFd 區的缺損共有三位病人染色體異 (16%)，第三類從 AzFc 到 AzFb 區的缺損，則有四位病人染色體異 (50%)，可見缺損區域愈大，染色體異比率也愈高。此外；在 Y 染色體基因缺損的病人中有 19 位是精液中無精蟲，其中 8 位有染色體異 (42%)，比我們研究中所有 218 位無精蟲病人祇有 45 位染色體異 (20%) 多出一倍。這結果顯示 Y 染色體基因缺損區域較大的可能從染色體檢查中找得出來，所以染色體異比率增高。另一個思考是當病人被發現是 Y 染色體基因缺損，可能其他染色體也有缺陷，是一種多處基因缺陷的表現(表四)，所以染色體檢查異比率也偏高。

Y 染色體上的基因缺損情況和臨床上病人製精功能是否相符，也是我們這年度研究的重點。臨床評估的標準是以睪丸的大小和血清 FSH 濃度來測定，根據我們以往的經驗，台灣人睪丸大小直徑在 2.5 公分以上為正，小於 1 公分以下為萎縮，中間的大小定義為製精功能低下，而血清 FSH 濃度大於 15mIU 以上，反映睪丸製造精蟲功能的缺損(表五)(9)。以這些評估標準來看 32 位 Y 染色體上基因缺損病人製造精蟲的臨床診斷，發現缺損情況嚴重的，臨床上睪丸製造精蟲的功能也會差；從表六來看，AzFc 區域缺損的病人 66.7% 睪丸大小 66.7% 血清 FSH 濃度正；從 AzFc 區到 AzFd 區缺損的病人 47.4% 睪丸大小正，73.7% 血清 FSH 濃度正；從 AzFc 區到 AzFb 區缺損的病人 12.5% 睪丸大小正，37.5% 血清 FSH 濃度正；而兩位 Y 染色體完全缺損的 46XX 病人，則睪丸均為萎縮，血清 FSH 濃度也都大幅升高。

至於 Y 染色體上基因缺損的情況是否也相對於睪丸病理切片的結果？在 32 位 Y 染色體上基因缺損的病人中，有 11 位做了睪丸病理切片，除了有一位缺損在 AzFc

區，精液中尚有精蟲的病人，病理切片發現睪丸製精功能完全正，而 Y 染色體完全缺損的一位 46XX 病人，病理切片發現睪丸組織幾乎纖維化；祇有少數的 Sertoli 細胞；五位第二類缺損(從 AzFc 區到 AzFd 區)和四位第三類缺損(從 AzFc 區到 AzFb 區)無精蟲病人的睪丸切片來看，缺損較嚴重的第三類缺損，都可以看到 Spermatid 的出現，反而是較輕微的第二類缺損有各種不同的製精障礙，從祇有 Sertoli cell 到成熟中斷、製精功能不良到有 Spermatid 出現等等(表七)。這結果顯示，睪丸製精功能不祇受基因缺損的影響，也受其他疾病、後天因素的影響；當然，我們祇有 11 例的病理切片，而且所取的睪丸組織是否能完全代表睪丸的製精功能，也值得進一步討論。

四、計畫結論和成果自評

本研究在第二年以 32 位 Y 染色體基因缺損的病人進行詳細的臨床和病理分析，並對照缺損的區域來進一步瞭解這些基因缺損所造成製精功能的影響。在文獻上，尚無這麼多 Y 基因缺損病人的分析，這是我們在兩年內篩檢 334 位病人所找出 32 位 Y 基因缺損的成果。這結果的貢獻有助於更釐清缺損區域大小和特異性是否相關於臨床製精障礙的嚴重性；我們大概確定局部 AzFc 區域的缺損可能都還有製精功能，甚至精液中都還有精蟲；如果缺損延伸到 AzFd 區，在本研究中共有 19 位病人，則有多數(10 位)尚有精蟲出現；但 9 位無精蟲病人中，則在臨床和病理分析上，部分精蟲的製造已嚴重障礙；如果缺損再延伸到 AzFb 區，8 位病人中祇有 1 位尚有精蟲出現，臨床上祇有 1 位睪丸大小完全正，3 位血清 FSH 值正，並有 50% 的染色體檢查異；至於本研究中兩例 Y 染色體完全缺損，也就是 46XX 的病例，可做很好的控制組，瞭解 Y 染色體完全缺損導致睪丸萎縮、完全無製精功能。

本研究的病例數對 Y 基因缺損的各種分析仍不足以做最後的定論，如果要更增加病例數，除了繼續收集病案之外，可能要和國內較大的男性不孕研究中心合作，短期內統合更多的病例，目前已和成

大泌尿科(10)、中山醫學院泌尿科談妥合作的計劃。此外，在 Y 基因缺損區域的篩檢標準上，也將在國內做一統合，成為男性不孕的例行篩檢項目。病理切片數目前也祇有 11 例，將在下年度大力加強，才能使病理對照的研究分析能有更多的參考價值。

五、參考文獻

1. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**, 17-8.
2. Chiang, H. S., Liu, C. H., Tzeng, C. R., and Fang, C. L. (1998). Surgical and pathologic observations of epididymal tubules during microscopic epididymal sperm aspiration for intracytoplasmic sperm injection. *J Formos Med Assoc* **97**, 838-44.
3. Mak, V., and Jarvi, K. A. (1996). The genetics of male infertility. *J Urol* **156**, 1245-56.
4. Chiang, H. S., Wei, H. J., and Chen, Y. T. (2000). Genetic screening for patients with azoospermia and severe oligo- asthenospermia. *Int J Androl* **23**, 20-5.
5. Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Kohn, F. M., Schill, W. B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H. M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Grone, H. J., Jung, A., Engel, W., and Haidl, G. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* **5**, 933-43.
6. Simoni, M., Kamischke, A., and Nieschlag, E. (1998). Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control. *Hum Reprod* **13**, 1764-8.
7. Pryor, J. L., Kent-First, M., Muallem, A., Van Bergen, A. H., Nolten, W. E., Meisner, L., and Roberts, K. P. (1997). Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* **336**, 534-9.
8. Kent-First, M., Muallem, A., Shultz, J., Pryor, J., Roberts, K., Nolten, W., Meisner, L., Chandley, A., Gouchy, G., Jorgensen, L., Havighurst, T., and Grosch, J. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* **53**, 27-41.
9. Bergmann M. Behre HM. Nieschlag E. (1994) Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clinical Endocrinology*. **40**,133-6.
10. Lin, Y. M., Chen, C. W., Sun, H. S., Hsu, C. C., Chen, J. M., Lin, S. J., Lin, J. S., and Kuo, P. L. (2000). Y-chromosome microdeletion and its effect on reproductive decisions in taiwanese patients presenting with nonobstructive azoospermia. *Urology* **56**, 1041-6.

Table 1. The Genetic Defects Detected in 334 Patients with Azoospermia or Severe Oligoasthenozoospermia

		Chromosome disorder	Y gene deletion	Total
Azoospermia group	N=218	45 (20.6%)	20 (9.2%)	57* (26.1%)
Oligoasthenospermia group	N=116	8 (6.9%)	12 (10.3%)	19** (16.4%)
Total	N=334	53 (15.9%)	32 (9.6%)	76 (22.8%)

* 8 patients in the azoospermia group have both chromosome disorder and Y gene deletion.

** 1 patient in the oligoasthenospermia group has both chromosome disorder and Y gene deletion.

Table 2. Types of Microdeletion on Y Chromosome in the Study of 32 Infertile Male with Azoospermia and Severe Oligoasthenozoospermia

Classification	Correlated AZF area	Genomic locus
Type I	Within AZFc	SY159, DAZ, SY159-SY239 SY277, SY147-SY149
Type II	From AZFc to AZFd	SY277-SY153
Type III	From AZFc to AZFb	SY127-SY117 SY277-SY117 SY277-SY95 SY159-SY127 SY159-SY117 SY153-SY117
Type IV	Beyond AZFa	Almost whole Y chromosome

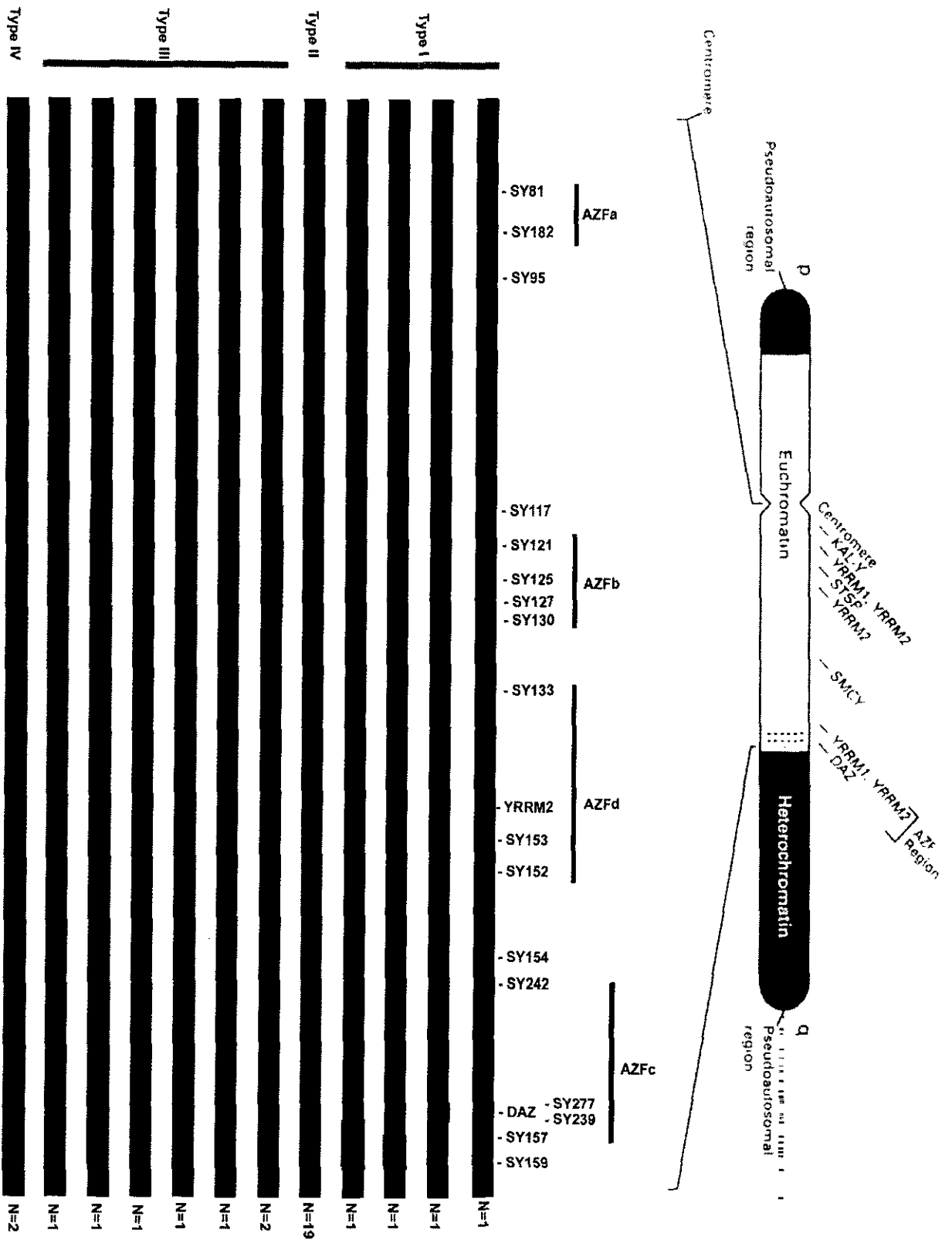


Table 3. Distribution of the Different Types of Microdeletion on Y Chromosome in the Study of 32 Infertile Males with Azoospermia and Severe Oligoasthenospermia

		Azoospermia	Severe Oligoasthenospermia
Type I	Within AZFc area	1	2
Type II	From AZFc to AZFd	9	10
Type III	From AZFc to AZFb	7	1
Type IV	Beyond AZFa	2	0
Total		19	13

Table 4. Chromosome Anomaly in the 32 Infertile Patients with Y Chromosome Microdeletion by Using PCR Screening

Classification of Microdeletion	Chromosome Anomaly
Type I (Within AZFc)	0
Azoospermia (N=1)	
Oligoasthenospermia (N=2)	47XY+Mar
Type II (From AZFc to AZFd)	2
Azoospermia (N=9)	46X, Yqh 46X, +Mar
Oligoasthenospermia (N=10)	1
Azoospermia (N=7)	46XY, inv(9q6)
Type III (From AZFc to AZFb)	4
Oligoasthenospermia (N=1)	45X(30%), 46XY 46XY, inv(15) 46X del (Y) (q11.22) 46X del (Y) (q11.22)
Type IV (Beyond AZFa)	2
Subtotal	8
Azoospermia (N=2)	46XX
Oligoasthenospermia (N=19)	2
Total	10 (31.3%)

Table 5. The Criteria of the Clinical Examinations to Evaluate the Function of Spermatogenesis

Spermatogenesis	Normal	Decreased	Atrophy
Testicular size	One side > 2.5 cm	One side 1-2.5 cm	Both sides < 1 cm
Serum FSH	< 15 mIU	> 15 mIU	

Table 6. Correlation between the Area of Deletion and the Clinical Evidence of Spermatogenesis in the 32 Patients with Microdeletion in Y Chromosome

		Testicular size		Serum FSH		
		Normal	Decreased	Atrophy	Normal	Elevated
Type I (Within AZFc)	Azo(N=1)	0	1	0	0	1
	Oligo(N=2)	2	0	0	2	0
Type II (From AZFc to AZFd)	Azo(N=9)	4	5	0	6	3
	Oligo(N=10)	5	5	0	8	2
Type III (From AZFc to AZFb)	Azo(N=7)	1	5	1	2	4
	Oligo(N=1)	0	1	0	1	0
Type IV (Beyond AZFa)	Azo(N=2)	0	0	2	0	2

Table 7. Correlations among the Deletion Area and Pathological, Clinical Evidence of Spermatogenesis in 11 Cases of Microdeletion in Y Chromosome

Patient No.	Deletion Area	Semen Analysis	Pathology Finding	Testicular Size	Sperm FSH	Chromosome Exam.
D9	Type I	Oligo	Normal	Normal	Normal	47XY,+Mar
D5	Type II	Azo	Hypo	Normal	Normal	Normal
D22	Type II	Azo	Hypo	Normal	Elevated	Normal
D11	Type II	Azo	M. A.	Normal	Elevated	Normal
D24	Type II	Azo	SCO	Normal	Normal	Normal
D13	Type II	Azo	SCO	Decreased	Elevated	Normal
D1	Type III	Azo	Hypo	Decreased	Normal	Normal
D2	Type III	Azo	Hypo	Decreased	Elevated	Normal
D15	Type III	Azo	Hypo	Normal	Normal	46XY, inv(15)
D30	Type III	Azo	Hypo	Normal	Elevated	Normal
D32	Type IV	Azo	Fibrosis	Atrophy	Elevated	46XX