Mosaic Klinefelter Syndrome 病人睪丸切片以 Fluorescence in Situ Hybridization(FISH)分析其製精功能

Spermatogenesis Detection by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in Testis biopsy of Mosaic Klinefelter Syndrome Patient

計畫編號：NSC 88-2314-B-038-115
執行期限：87 年 08 月 01 日至 88 年 07 月 31 日

主持人：江漢聲　　台北醫學院 泌尿科
E-mail: hansun@tmc.edu.tw

一、中文摘要

Klinefelter 症候群（47XXY）原本是不能治療的男性不孕，目前已有重大突破，在部分 Mosaic XXY 病人可經由睪丸精蟲萃取術來授孕。本研究計劃以 21 例 Klinefelter 症候群病人做臨床染色體篩檢，發現有 3 例 Mosaic XXY；在 21 例中有 10 例做睪丸切片，9 例同時用 DXz1 和 DYz1 Probe 進行染色體 FISH(Fluorescence in Situ Hybridization) 檢測，看 XY 非雙套（Aneuploidy）染色體精蟲或精原細胞的存在與否。結果發現在 10 例睪丸切片中僅有 1 例有精原細胞的製造，但未成熟，8 例的 FISH 檢查均未發現有精原細胞的存在。這個研究顯示 Mosaic XXY 的比例在我們的族群中不高（14.3%），目前也沒發現有 Spermatid 的存在，然而 FISH 的技巧可以正確的篩檢遺傳疾病原本無法生育的個案，將來在 Klinefelter 病人診療規劃、生育遺傳諮詢上是必要的一個流程。

關鍵詞：Klinefelter 症候群、FISH (Fluorescence in Situ Hybridization)、Mosaic XXY 染色體篩檢

Abstract

Intracytoplasmic injection of single sperm (ICSI) is a big break through of male infertility. For the patients with Klinefelter's Syndrome (47XXY), they were previous intreatable, now could possibly be treated with TESE (Testicular sperm extraction) and following ICSI. Some patients with Mosaic 47XXY do have sperm in the testis. In this project, we collected 21 cases of Klinefelter's Syndrome for a complete chromosome study. Three of them are Mosaic 47XXY. After general evaluation and counseling, testis biopsy was performed for 10 patients and 8 of them simultaneously did dual labeled FISH with DXz1 and Dyz1 probes to detect the existence of the aneuploidy of the sperm or spermatid. In our preliminary result of the 10 cases testis biopsy, only 1 case had "hypospermatogenesis". All of the 9 cases was not found to have Anenploidy spermatid in the FISH diagnosis. It seems the percentage of mosaic 47 XXY is rather low (14.3%) in our Kleinefelter's patients' population.

However, we had established the laboratory diagnosis with FISH technique and confirmed by clinical and pathological data.

From this way we can elucidate the spermatogenesis in these Mosaic XXY chromosome patients. FISH diagnosis for the evidence of spermatogenesis will be an important information of the treatment protorol and counseling for the patients with Klinefelter's Syndrome.

Keywords: Intracytoplasmic injection of single sperm (ICSI), Klinefelter's Syndrome (47XXY), FISH (Fluorescence in Situ Hybridization)

二、緣由與目的

自從卵細胞質內精蟲注射（Intracytoplasmic injection of single sperm 簡稱 ICSI）發展演變【1】，男性不孕的治療有了重大的突破。祇要在睪丸內找到少

量的精蟲(Testicular Sperm Extraction 簡稱 TESE)【2】【3】【4】，甚至成熟的精原細胞(Round Spermatid)【5】都可以 ICSI 治療成功。由於這種技巧的突破，使得人工生殖科技在實驗室的技術研發上有了方向的改變，本來精密研究的精卵反應如 Acrosome Reaction，Capacitation 都不再是重點；反而染色體遺傳的研究成為最具前瞻性的課題，因為那些病患？那些精蟲？那些精卵？那些胚胎可以做 ICSI 生出健康的後代。如果能以染色體研究來預知的話，將對人工生殖科技有相當的保障。

男性不孕中，Kleinefelter 症候群為染色體 47XXY 的病人，是因為在精卵受孕時母親多給了一個 X 染色體；所以這些病人在成年發育之後，睪丸依然萎縮，睪丸內無法經減數分裂形成精細胞於成熟之精蟲；也因為睪丸萎縮，體內的荷爾蒙的回饋機轉（feedback mechanism）使 FSH 和 LH 升高；這些病人在以往的醫學診斷中是屬於先天無法治療的睪丸起因男性不孕症。

最近有人研究【6】Klinefelter's 症候群病人並非都無精蟲，在睪丸內可以找到少許精蟲而且以 ICSI 達到授孕的目標；Klinefelter's症候群病人無論睪丸多小，FSH 升高與否，都可能以 TESE 找到精蟲【7】【8】，這是因為 Kleinefelter 症候群病人如果染色體分析是 Mosaic 47XXY，那麼睪丸內就還有 46XY 的精原細胞，可以減數分裂成熟之 23X 或 23Y 的精蟲，所以還可以精密的手術來找精蟲做 TESE 和 ICSI。

所以本研究計劃以臨床上所見 Klinefelter's 症候群病人做各種檢驗和血中染色體分析，同時也從病人的睪丸切片來找精蟲。我們做睪丸組織的萃取、培養，看有無精蟲發現；然後以螢光原位雜交染色（Fluorescence in Situ Hybridization 簡稱 FISH）來偵測是否有單套染色體的精蟲或精原細胞【9】【10】，並和病理切片對照，如果 FISH 染色有減數分裂的跡象，我們將進行顯微探索手術(Microdissection)，在手術檯上以顯微手術來找精蟲並做 ICSI【11】【12】。我們希望能收集台灣男性不孕中 Kleinefelter 症候群病人做一分析，並試圖找出有多少病人仍有生育的可能。

三、結果與討論

自 1997 年 11 月至 1999 年 11 月共有 21 位男性不孕病人被診斷為 Kleinefelter 症候群；年齡從 19 至 42(mean:32.33)，兩側睪丸的長徑都小於 1.2cm。

他們的荷爾蒙檢查結果，FSH:24.32 至 70.10(mean:40.63±11.32)；LH:8.87 至 34.09(mean:17.87±5.59)；Testosterone: 0.23 至 3.39(mean:1.68±0.97)；Prolactin:4.02 至 63.39(mean:15.64±13.73)；明顯看出有睪丸萎縮的證據。

染色體分析的結果，有 18 位病人是 47XXY，有 3 位病人是 Mosaic 47XXY；一位是 46XY:47XXY=4:15、一位是 46XY : 47XXY=3:17、一位是 46XX:47XXY=2:23; mosaic 佔 14.28%；和外國文獻相比，有偏低的現象【6】【7】【8】。

這些病人都做 Y Gene 檢查，包括:DYS280、DYS209、DYZ2、DYS7、DYS239、DYS237、RPS4Y、DAZ、AMELY、DYS271、DYS1、DYS232，發現都無這些區域的 deletion，這表示 Kleinefelter 病人祇是單純染色體的異常，合併常見掌控製精的 Y 基因缺陷的機率小至於零。

有十位病人做過睪丸切片檢查，其中有九位做 FISH 的檢測，結果如表一。結果顯示，病理切片中祇有一位尚有微弱的製精功能，其餘都祇有 Sertoil cell，無原始的精原細胞；當然，FISH 的檢測都看不到有單套染色體的精原細胞或精蟲。這在三位 Mosaic 47XXY 和六位單純 47XXY 病人的結果是一樣的。

四、計劃成果自評

雖然最近文獻上報告可以在 Mosaic 47XXY 的病人睪丸切片中找到精蟲，然而並非全部的病例；在本研究二十一例 Kleinefelter 病人中祇有三例是

Mosaic 47XXY，其中一例還是 46XX／47XXY；而我們所做切片十例，做 FISH 染色診斷九例中（包括這三例 Mosaic 47XXY）全是睪丸明顯萎縮的病例，因此找不到 Sperm 和 FISH 染不出單套染色體的 Spermatid 是預期中的結果；將來更多的經驗中可能能找到合適的病例。不過我們第一個結論是就我們男性不孕病人中的 Kleinefelter 症候群，Mosaic 47XXY 比率祇有 14.3%，找到單套染色體 Spermatid 有機會作 ICSI 的機會不高。

從這些病人做 FISH 的經驗，以及我們對其他睪丸起因無精蟲症或精蟲極度稀少症病人所做 FISH 的經驗來看，以 FISH 染色來找單套染色體的 Spermatid 或精蟲，以此決定病人可否做顯微探索術和 ICSI 是可行的診斷方法【12】。對於一些以往被診斷是睪丸萎縮、無法生育的染色體病患或隱睪症、腮腺炎後睪丸萎縮等等男性不孕，應該再做最後的 FISH 染色診斷，來做最後能否進行 ICSI 的一個決定。

我們也曾考慮是否在本研究中睪丸切片的量不足以做完全的診斷，事實上在長徑小於 1 公分的萎縮睪丸取樣更要保守。但本研究還是可以顯微探索術來做更精密的精原小管搜尋；不過這要在病人有精卵交換或捐獻的精蟲備用的情況下來做才較合宜。

五、參考文獻

[1] Palermo, G., Joris, H., Devroey, P.: Pregnancies after introcytoplasmic injection of a single spermatozoa into an oocyte. Lancet, 340:17-18, 1992.

[2] Silber, S.J., Van Steirteghem, A.C., Liu, J.: High fertilization and pregnancy rate after sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Hum Reprod., 10:148-152,1995.

[3] Chiang, H.S., Liu, C.H.: Introcytoplasmic Sperm Injection in male Infertility. J. Urol. R.O.C.

[4] Chiang, H.S., Liu, C.H., and Fang, C.L.: Surgical and pathological observation of epididymal tubule in the microscopic epididymal sperm aspiration (MESA) for introcytoplasmic sperm injection (ICSI). J. Urol.

[5] Tesarik, J., Rolet, E., Brami, C.: Spermatid injection into human oocytes: II. Clinical application in the treatment of non-obstructive azoospermia.

[6] Harari, O., Bourne, H., Baker, G.: High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome. Fertility & Sterility., 63(1):223-234,1995.

[7] Tournaye, H., Staessen, C., Liebaers, I.: testicular sperm recovery in nine 47 XXY klinefelter patients. Hum. Reprod., 11(8):1644-1649,1996.

[8] Guttenbach, M., michelmann, H.W., Hinney, B.: Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47 XXY klinefelter's karyotype: a FISH analysis. Hum. Genetics. 99(4):474-477,1997.

[9] Wei, H.J., Su, T.H., Chien, C.L., Tzeng, C.R.: Fluorscence in situ hybridization (FISH) as a method to detect aneuploid cells. Fetal Diagn Ther.,12:309-313,1997.

[10] Wei, H.J., Tzeng, C.R.Kuo, L.L.: Improvement of in vitro fertilization rate in mouse by coculture with human ampullary cells. J OB/GYN ROC. 33(2):63-66,1994.

[11] Schlegel, P.N., Palermo, G.D., Goldstein, M., Meenendez, S., Zaninovic, N., Veeck, L.L., and rosenwaks, Z.: Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia. Urology. 49:435-440,1997.

[12] Chiang, H.S., Lin, W.M., Wei, H.J., and Fang, C.L.: Predictive diagnosis with FISH(fluorescence in situ hybridization) before sperm retrieval for the patients with non-obstructive azoospermia. 中華男性學一學會八十八年度會員大會暨第十一次學術演講會.1999

表一、十位病人檢查資料

	病患姓名	染色體	FSH	LH	Testosterone	病理報告	FISH
1	郭 XX	47XXY	24.32	12.02	2.04	Sertoil cell only	-
2	張 XX	47XXY	40.7	15.53	-	Sertoil cell only	No spermatid
3	陳 XX	46XY:47XXY (4:15)	33.99	24.71	0.23	Sertoil cell only	No spermatid
4	廖 XX	46XY:47XXY (3:17)	27.37	11.22	1.41	Sertoil cell only	No spermatid
5	沈 XX	47XXY	63.87	21	3.39	Sertoil cell only	No spermatid
6	李 XX	47XXY	27.56	13.27	2.76	Inadequate for diagnosis	No spermatid
7	陳 XX	47XXY	70.1	34.09	1.97	Sertoil cell only	No spermatid
8	田 XX	47XXY	37.57	17.78	0.52	Severe hypospermatogenosis with absence of spermatid	No spermatid
9	盧 XX	47XXY	31.9	19.82	2.4	Sertoil cell only	No spermatid
10	王 XX	46XX:47XXY (2:23)	42.56	24.06	0.64	Sertoil cell only	No spermatid