

# 严重寡精症 ICSI 精子供体的 *DAZ* 基因拷贝缺失研究

阿周存, 杨元, 张思仲, 林立

(四川大学华西医院医学遗传室, 国家生物治疗重点实验室, 成都 610041)

**摘要:** *DAZ* 基因拷贝缺失与人类的生精障碍有关。为了解中国正常生精男性和 ICSI 中严重寡精症精子供体 *DAZ* 基因拷贝缺失的分布, 探讨 *DAZ* 基因拷贝数检测在严重生精障碍精子供体遗传缺陷筛查中的意义, 本研究运用多重 PCR 和 PCR-RFLP 技术, 对 128 例严重寡精症 ICSI 精子供体和 287 个正常生精男性的 *DAZ* 基因缺失进行了研究。发现 *DAZ1/DAZ2*、*DAZ3/DAZ4* 和全部 4 个拷贝缺失等 3 种拷贝缺失类型, 其中全部 4 个拷贝缺失仅见于严重寡精症患者, 频率为 11.7%; *DAZ1/DAZ2* 缺失的频率在严重寡精症患者中显著高于正常男性(9.4% vs 2.8%,  $P = 0.004$ ); 在严重寡精症患者中 *DAZ* 基因拷贝完全缺失与 *DAZ1/DAZ2* 缺失的总发生率为 21.1%。*DAZ3/DAZ4* 缺失的频率在两组人群中无显著差异(7.0% vs 3.8%,  $P > 0.05$ )。这些结果提示, *DAZ* 基因全部拷贝缺失是严重寡精症患者生精障碍的常见遗传病因, 而 *DAZ1/DAZ2* 缺失则可能是一种高风险因素。鉴于上述 *DAZ* 基因缺失在严重生精障碍精子供体中较高的发生率, 在应用 ICSI 进行辅助生育前, 建议对严重寡精症的精子供体进行 *DAZ* 基因全缺失与 *DAZ1/DAZ2* 共缺失筛查, 以评估其男性后代患病的风险。

**关键词:** 无精症缺失基因; 基因缺失; 严重寡精症; ICSI

中图分类号: R349.5 R544.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)09-1057-04

## Study on *DAZ* Gene Copy Deletion in Severe Oligozoospermia Sperm Donor for ICSI

A Zhou-Cun, YANG Yuan, ZHANG Si-Zhong, LIN Li

(Department of Medical Genetics, West China Hospital, Sichuan University, and Division of Human Morbid Genomics, National Key Laboratory of Biotherapy, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** Deletion of *DAZ* gene copies is related to spermatogenesis impairment. To investigate the distribution of *DAZ* gene copy deletions among Chinese men, we analyzed *DAZ* gene deletions by multiplex polymerase chain reaction (multi-PCR) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 128 infertile patients with severe oligozoospermia selected as semen donors for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and 287 normospermic men. Three patterns of *DAZ* gene deletions, namely *DAZ1/DAZ2* deletion, *DAZ3/DAZ4* deletion and complete deletion of all 4 *DAZ* copies, were found in the present study. Complete deletion of the entire *DAZ* family of genes was only present in 11.7% of severe oligozoospermic patients. The frequency of *DAZ1/DAZ2* deletion was significantly higher in severe oligozoospermic patients than that in the controls(9.4% vs 2.8%,  $P = 0.004$ ). The total frequency of complete *DAZ* deletion and *DAZ1/DAZ2* deletion was 21.1%. No significant difference in the frequency of *DAZ3/DAZ4* deletion was observed between the patient and control group (7.0% vs 3.8%,  $P > 0.05$ ). These results suggest that complete *DAZ* deletion is a frequent genetic cause of severe oligozoospermia, and *DAZ1/DAZ2* deletion is a high risk factor for the disease. Thus, it is

收稿日期: 2005-09-23; 修回日期: 2005-12-08

基金项目: 国家 863 计划(国家高技术研究发展计划项目) (No.2002BA711A-08)[Supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No.2002BA711A-08)]

作者简介: 阿周存(1966—), 男, 大理人, 副教授, 博士, 专业方向: 医学遗传学

通讯作者: 张思仲(1935—), 男, 成都人, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 医学遗传学。E-mail: [szhang@mcwcums.com](mailto:szhang@mcwcums.com)

necessary to screen the two deletion patterns of *DAZ* genes in severely oligozoospermic sperm donors before ICSI during assisted reproduction.

**Key words:** *DAZ* gene; gene deletion; severe oligozoospermia; ICSI

无精症缺失基因(Deleted in Azoospermia gene, *DAZ*) 定位于 Y 染色体长臂无精症因子 c 区(azoospermia factor c, AZFc), 在大多数个体中有 4 种拷贝, 分别被命名为 *DAZ1*、*DAZ2*、*DAZ3* 和 *DAZ4*<sup>[1]</sup>。研究表明, *DAZ* 基因在睾丸组织中特异表达, 其产物为 RNA 结合蛋白, 可能在生精过程中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。*DAZ* 基因的全部拷贝缺失已被普遍认为是生精障碍的重要遗传病因。近年来, 有文献报道 *DAZ* 部分拷贝缺失的某些类型也与人类的生精障碍有关<sup>[3,4]</sup>。

随着卵细胞浆内单精子显微注射授精(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术在辅助生育中的推广, 越来越多的严重寡精症患者有可能被作为精子供体, 而这些患者往往可能携带某些与生精功能障碍相关的遗传异常, 筛查他们的遗传缺陷, 对避免垂直传递是十分必要的。为探讨在严重寡精症精子供体中进行 *DAZ* 基因缺失筛查的必要性, 我们采用多重 PCR 和 PCR-RFLP 技术对严重寡精症精子供体和正常生精男性的 *DAZ* 基因拷贝缺失进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

(1) 病例组: 从四川大学华西医院收集的作为 ICSI 精子供体的 128 例年龄在 24~35 岁的严重寡精症患者(精子密度小于  $5 \times 10^6/\text{mL}$ )。所有患者经过至少两次按 WHO 标准进行的精液检查, 并排除泌尿生殖道感染、输精管阻塞或缺如及睾丸炎等疾病; 同时用染色体 G 带分析排除了染色体异常以及用相应分子生物学方法排除了 Y 染色体长臂上 AZFa 和 AZFb 区的缺失<sup>[5]</sup>。

(2) 对照组: 287 个精子密度大于  $20 \times 10^6/\text{mL}$ 、年龄在 26~42 岁的正常生精男性作为对照, 亦收集自华西医院。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 提取

3~5 mL 肝素抗凝的外周血, 用常规的方法抽

提基因组 DNA, 4℃ 保存备用。

#### 1.2.2 PCR 扩增

用于分析的 4 个 STS 的引物序列参照 GenBank, *ZFX/ZFY* 的引物序列参照有关文献<sup>[6]</sup>。sY254、sY255 及 *ZFX/ZFY* 进行多重 PCR 扩增, 同时用一个女性标本作阴性对照。PCR 反应体积为 25  $\mu\text{L}$ , 内含 0.2~0.5  $\mu\text{g}$  基因组 DNA、800  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 引物各 10 pmol, 4  $\mu\text{L}$  10×PCR 缓冲液和 2 U *Taq* DNA 聚合酶。反应条件为: 55℃ 保温 5 min, 95℃ 预变性 5 min, 35 个循环(94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 1 min)、72℃ 延伸 5 min。发现 sY254、sY255 缺失的标本, 再重复扩增一次加以确认。对于未发现 sY254、sY255 缺失的标本, 进一步用 PCR 分别扩增 sY581 和 sY587 位点, 反应条件除使用 200  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 2.5  $\mu\text{L}$  10×PCR 缓冲液和 1U *Taq* DNA 聚合酶外, 其他条件同上。

#### 1.2.3 水平电泳检测

多重 PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳, 100 V 30 min, 同时以设置 100 bp DNA 分子量标记。如检测到内对照 *ZFX/ZFY* 有扩增, 而 sY254 和 sY255 无扩增, 则表明 *DAZ* 基因的所有拷贝全部缺失。sY581 和 sY587 的扩增产物, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 以检测其是否有特异性扩增。

#### 1.2.4 酶切及垂直电泳检测

sY581 和 sY587 的扩增产物分别用 *Sau3A I* 和 *Dra I* 酶切消化。酶切产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 300 V 3 h, 银染后观察结果。sY581 和 sY587 不同的酶切片段可反映出 *DAZ* 基因拷贝缺失情况: *Sau3A I* /sY581 酶切图谱中的 189 bp、130 bp 片段的消失分别表示 *DAZ1/DAZ4*、*DAZ2/DAZ3* 的缺失, 而 *Dra I* /sY587 酶切图谱中的 195 bp、122 bp 片段的消失则分别表示 *DAZ3/DAZ4*、*DAZ1/DAZ2* 的缺失<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.5 统计分析

用  $\chi^2$  检验比较两组间缺失类型频率的差异。

表 1 正常生精男性和严重寡精症患者中 DAZ 基因拷贝缺失分布

Table 1 Distribution of DAZ gene copy deletion in normzoospermic men and patients with severe oligozoospermia

| 缺失拷贝<br>Deletion copy | 正常生精男性(%)<br>Normzoospermia<br>(n=287) | 严重寡精症患者(%)<br>Severe oligozoospermia<br>(n=128) | P 值 *<br>P value |
|-----------------------|--|---|------------------|
| DAZ1/DAZ2             | 8 (2.8)                                | 12 (9.4)  | 0.004            |
| DAZ3/DAZ4             | 11 (3.8)                               | 9 (7.0)   | 0.1600           |
| DAZ1/DAZ2/DAZ3/DAZ4   | 0                                      | 15 (11.7)                                       | 0.0000           |

\*: 正常生精男性与严重寡精症患者相比较。

\*: Between normzoospermic men and patients with severe oligozoospermia.

## 2 结 果

### 2.1 正常生精男性 DAZ 基因拷贝缺失分布

在 236 个正常生精的男性中发现 DAZ1/DAZ2 和 DAZ3/DAZ4 两种 DAZ 基因拷贝缺失类型。DAZ1/DAZ2 的缺失频率为 2.8%(8/287), DAZ3/DAZ4 的频率为 3.8%(11/287)(表 1)。

### 2.2 严重寡精症患者中 DAZ 基因拷贝缺失分布

在 128 列严重寡精症患者中发现 3 种 DAZ 基因拷贝缺失类型, 即 DAZ1/DAZ2、DAZ3/DAZ4 和所有拷贝全部缺失。在这些患者中, DAZ 基因全缺失的频率为 11.7%(15/128), DAZ1/DAZ2 缺失为 9.4%(12/128)、DAZ3/DAZ4 缺失为 7.0%(9/128)。与正常生精男性相比, DAZ 基因全缺失只见于患者, DAZ1/DAZ2 缺失的频率显著高于正常生精男性(9.4% vs 2.8%,  $P = 0.004$ ), DAZ3/DAZ4 缺失的频率与正常男性无显著性差异(7.0% vs 3.8%,  $P > 0.05$ )。DAZ 基因拷贝完全缺失与 DAZ1/DAZ2 缺失的总发生率为 21.1%(27/128)。

## 3 讨 论

近年来, 男性生精障碍的遗传病因研究取得了较大的进展, 陆续发现了一些与无精症和严重寡精症相关的遗传因素, 如染色体异常、Y 染色体长臂 AZF 区的微缺失、某些基因的突变等<sup>[7]</sup>。在这些因素中, AZF 的微缺失被认为是仅次于 Klinefelter's 综合征(47, XXY)的常见病因<sup>[6]</sup>。在 AZF 缺失的病例中, 以 AZFc 区的微缺失频率最高, 而且几乎都导致 DAZ 基因的拷贝缺失<sup>[8,9]</sup>。DAZ 基因是第一个在 AZFc 区中鉴定的生精障碍的候选基因, 它是在进化过程中由 3p25 的 DAZL 祖基因转位而来, 而动物实验已证实后者在生精过程中有着重要作用<sup>[10]</sup>。虽然 DAZ 基因的功能还不完全清楚, 但人的 DAZ 转基因能部分恢

复 *daz1* 基因敲出小鼠的生精功能<sup>[11]</sup>; 此外, 大量的研究显示 DAZ 基因的全部缺失只见于生精障碍患者。这些结果提示, DAZ 基因可能与生精功能密切相关, 其异常可能是严重寡精症生精障碍的一个病因。

本研究结果显示, 在严重寡精症患者中 DAZ 基因全部 4 个拷贝缺失的频率为 11.7%, 而正常男性中没有发现这种类型的缺失, 进一步证实 DAZ 基因的全部拷贝缺失是严重寡精症的遗传病因。除 DAZ 基因的全部缺失外, 还发现 DAZ1/DAZ2 和 DAZ3/DAZ4 两种拷贝缺失类型。有文献报道 DAZ1/DAZ2 缺失与生精障碍相关<sup>[3,4]</sup>, 我们也观察到类似的结果。在本研究中, DAZ1/DAZ2 缺失的频率在严重寡精症患者中显著高于正常生精男性(9.4% vs 2.8%,  $P = 0.004$ ), 提示单一 DAZ1/DAZ2 缺失可能不足以直接导致严重寡精症, 但它是生精障碍的一个高风险因子。而 DAZ3/DAZ4 缺失的频率在严重寡精症患者虽略高于正常生精, 但无显著差异(7.0% vs 3.8%,  $P > 0.05$ ), 表明这种缺失可能对生精功能的影响甚微, 或仅仅是 Y 染色体的一种多态现象。

随着辅助生育技术的发展与 ICSI 技术的日益成熟, 使严重生精障碍不育患者也能生育后代。可以预见, 在接受 ICSI 的夫妇中, 越来越多的严重寡精症患者将被作为精子供体, 而研究已表明, 精子供体的异常遗传物质可能传递给下一代<sup>[12,13]</sup>, 因此, 在接受 ICSI 治疗前, 必须尽可能地了解严重寡精症精子供体的遗传缺陷, 才能有效避免其后代也出现类似的疾病。本研究的结果表明, 在中国人群中 DAZ 基因全部缺失是严重寡精症的一个常见遗传病因, 而 DAZ1/DAZ2 缺失则是一个高风险因子, 二者总的发生频率在严重寡精症精子供体中高达 21.1%, 因此, 在应用 ICSI 技术进行辅助生育前, 有必要对严重寡精症的精子供体进行 DAZ 基因全缺失与 DAZ1/DAZ2 共缺失筛查, 以评估其男性后代患病的风险。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] Saxena R, de Vries J W, Repping S, Alagappan R K, Skaletsky H, Brown L G, Ma P, Chen E, Hoovers J M, Page D C. Four *DAZ* genes in two clusters found in the *AZFc* region of the human Y chromosome. *Genomics*, 2000, 67(3): 256~267. [\[DOI\]](#)
- [2] Reijo R, Lee T Y, Salo P, Alagappan R, Brown L G, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*, 1995, 10(4): 383~393. [\[DOI\]](#)
- [3] Ferlin A, Moro E, Rossi A, Foresta C. A novel approach for the analysis of *DAZ* gene copy number in severely idiopathic infertile men. *J Endocrinol Invest*, 2002, 25(1): RC1~3.
- [4] Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek N E, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt P H. High frequency of *DAZ1/DAZ2* gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(3): 286~298. [\[DOI\]](#)
- [5] Simoni M, Bakker E, Eurlings M C, Matthijs G, Moro E, Muller C R, Voget P H. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl*, 1999, 22(5): 292~299. [\[DOI\]](#)
- [6] Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*, 2004, 27(4): 240~249. [\[DOI\]](#)
- [7] Maduro M R, Lamb D J. Understanding new genetics of male infertility. *J Urol*, 2002, 168(5): 2197~2205. [\[DOI\]](#)
- [8] Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen, S K, Korver C M, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries J W, Oates R D, Silber S, van der Veen F, Page D C, Rozen S. Polymorphism for a 1.6 Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet*, 2003, 35(3): 247~251. [\[DOI\]](#)
- [9] Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown L G, Minx P J, Cordum H S, Waterston R H, Wilson R K, Silber S, Oates R, Rozen S, Page D C. The *AZFc* region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*, 2001, 29(3): 279~286. [\[DOI\]](#)
- [10] Seboun E, Barboux S, Bourgeron T, Nishi S, Agulnik A, Egashira M, Nikkawa N, Bishop C, Fellous M, McElreavey K, Kasahara M. Gene sequence, localization, and evolutionary conservation of *DAZLA*, a candidate male sterility gene. *Genomics*, 1997, 41(2): 227~235. [\[DOI\]](#)
- [11] Slee R, Grimes B, Speed R M, Taggart M, Maguire S M, Ross A, McGill N I, Saunders P T, Cooke H J. A human *DAZ* transgene confers partial rescue of the mouse *DAZ1* null phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(14): 8040~8045. [\[DOI\]](#)
- [12] Kleiman S E, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Paz G, Lessing J B, Yaron Y, Yavetz H. Three-generation evaluation of Y-chromosome microdeletion. *J Androl*, 1999, 20(3): 394~398.
- [13] Oates R D, Silber S, Brown L G, Page D C. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the *AZFc* region of the Y chromosome and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod*, 2002, 17(11): 2813~2824. [\[DOI\]](#)