

男性不孕的分子生物遺傳學檢測

林永明

前言

隨著卵子細胞質內精蟲注射(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技術的發展，許多男性不孕症的患者都有機會藉著這個技術，以極少量的精蟲達到讓配偶受孕的目標。但是對於大部分造精障礙患者而言，他們所真正面臨到的問題是：大多數的非阻塞性無精蟲症患者，即使藉助 ICSI 技術，都未能如願的使配偶受孕；一旦懷孕成功，他們的子代產生先天缺陷的危險性顯著高於自然受孕者。事實上在這些不孕症的患者中，有 25-30%的患者是屬於原因不明的造精功能障礙，在治療上非常困難。多年來研究學者相信，這些原因不明的造精功能障礙通常與染色體異常或基因異常有關。在臨床上，目前最常被認為與男性不孕症相關的分子遺傳因素包括了：1.染色體異常 2.囊腫纖維症基因(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)突變及 3.Y 染色體缺損。

染色體異常

整體而言染色體異常佔所有男性不孕症患者約 7%，而寡精蟲症患者及無精蟲症患者則分別有 5%及 10-15%是導因於染色體異常[1,2]。而另一項研究則顯示所有接受 ICSI 治療的夫妻中，有 4.3%的男性患者有染色體異常[3]。染色體異常可粗略分為性染色體異常與體染色體異常。根據統計，無精蟲症患者大多屬於性染色體異常，其中以 Klinefelter's syndrome (KS) 47, XXY 最多。而寡精蟲症患者則以體染色體異常為多，包括了染色體的易位(translocation)或翻轉(Inversion)。

KS 在男性不孕症門診中極為常見，在一般男性中發生率約為 1/500(0.2%)，是最常見之性染色體異常，典型特徵包括了睪丸萎縮、無精蟲症及男性女乳症。KS 的患者中約 3-10%是屬於鑲嵌型(mosaicism)，即 46XY/47XXY，這類患者半數以上睪丸會有造精能力，而比較不會有生育上的困擾。而非鑲嵌型(non-mosaicism)則幾乎是無精蟲症，但是如果這些 non-mosaic KS 患者接受睪丸取精手術(testicular sperm extraction, TESE)，則約有 21-45%患者會睪丸取精成功，而且這些所取出的精蟲，絕大部分染色體數目正常，即為 23X 或 23Y [4,5]。在 2004 年的一篇回顧性文章中分析了 non-mosaic KS 患者，睪丸取精成功後所生下的 39 位嬰兒，其中僅有一位染色體異常 47, XXY [6]。但是另一篇研究則顯示，這些 KS 患者受孕後的胚胎，性染色體異常及體染色體異常的比例分別為 13.2%及 15.6%，顯著高於一般自然受孕者[7]。這個結果也突顯出遺傳諮詢及胚胎著床前基因診斷(pre-implantation genetic diagnosis, PGD)的重要。

體染色體易位約佔不孕症男性比例的 2-3%。其中第 13、14 對染色體的

Robertsonian 易位最常被報告與精蟲品質不良有關(oligoasthenoteratozoospermia) [8]。文獻上約有超過 40 種的體染色體易位被報告與男性不孕症有關。患者如果是平衡性易位，則其一般表現型為正常，主要是通過對減數分裂的影響而導致造精障礙，同時可能產生染色體異常的配子。

染色體翻轉可分為 per-centric 或 para-centric 兩類型。同樣的，翻轉後若沒有遺傳物質的缺失，則患者表現型為正常，但是該患者生殖細胞在減數分裂時，同源染色體配對會發生問題，而產生造精障礙，也可能在不正常的染色體配對過程中產生染色體不正常的配子。因此不管是體染色體的易位或翻轉都有可能產生染色體異常的子代或先天性畸形，這也是孕婦習慣性流產的原因之一。

囊腫纖維症(Cystic fibrosis)基因(CFTR)突變與先天性雙側無輸精管症(CBAVD)

CBAVD 約佔不孕男性的 1-2%，在阻塞性無精蟲症的患者中，有 25% 的患者是屬於 CBAVD [9,10]。CBAVD 被認為是輕症的囊腫纖維症，一般認為 CBAVD 的發生與 CFTR 基因突變有關，而且幾乎所有的囊腫纖維症患者都會有 CBAVD。在高加索族群中約有 2/3 的 CBAVD 患者被證實有 CFTR 基因的突變 [11,12]。CFTR 位於 7 號染色體上，帶有 27 個 exon，至目前有超過 1000 個 CFTR 基因突變被報告(<http://www.genet.sickkids.on.ca>)。文獻上至少有 20 篇研究探討 CBAVD 的發生與 CFTR 基因突變之關係。在高加索族群中最常見的突變點包括了 Δ F508、R117H、W1282X 等，CFTR 基因 Intron 8 的多肽性在 CBAVD 的分子病理中也很重要，多肽性序列包括 5 個，7 個或 9 個胸腺嘧啶核苷酸 (Thymidine)，常稱為 5T、7T 和 9T。Intron 8 的 IVS8-5T 被證實在 CBAVD 上扮演重要的角色 [13]。國內因為囊腫纖維症的患者極少，所以這些突變點的好發率與位置必定與高加索族群不同。根據台北醫學大學吳建志醫師的報告 [14]，36 位台灣 CBAVD 患者的 CFTR 基因突變情形與高加索族群有明顯的差異。台灣 CBAVD 患者並不帶有在高加索族群中常見的突變點，同時在台灣 CBAVD 患者中 IVS8-5T 是最常發現的突變對偶基因(allele)，佔 81%。研究中更發現了 5 個突變點包括了 p.V201M、p.N287K、c.-8G>C、p.M469I 及 p.S895N，其中 p.N287K、p.M469I 及 p.S895N 是首次被發表的新突變點。整體而言，台灣 CBAVD 患者 CFTR 對偶基因的突變率為 36%。

American College of Medical Genetics 曾針對 CBAVD 患者建議檢測以下突變點：R117H/5T/7T/9T、I506V、I507V 及 F508C [15]，基於族群上的差異及吳醫師的研究，這個檢測方法的項目可能不適合國內的 CBAVD 患者。儘管如此，檢測 CBAVD 患者 CFTR 基因突變的重要性，可能隨著 ICSI 的廣泛應用而日趨重要。根據 EAU guideline，一位 CBAVD 男性，他的配偶若帶有囊腫纖維症的變異基因(carrier)，則他們的子代罹患囊腫纖維症的機率為 25% 或 50%，取決於該 CBAVD 男性的基因型為 heterozygous (25%) 或 homozygous (50%)。若配偶並不帶

有已知突變點的變異基因，則其子代罹患囊腫纖維症的機率為 1/410 [16]。雖然國內外 CBAVD 患者之基因變異情形並不同，但是目前仍然無法排除國內 CBAVD 患者，經過 ICSI 治療後產出囊腫纖維症的子代。

Y 染色體缺損

Y 染色體缺損目前已被認為是，僅次於 KS (47, XXY)，最常見造成男性不孕症的分子遺傳因子。自從 1996 年德國 Vogt 教授把 AZF (Azoospermia factor) 分成 3 個區域並命名為 AZFa、AZFb 及 AZFc 之後，許多學者已提出不同於 AZFa、AZFb 及 AZFc 的缺損機轉與模式。目前被報告的缺損模式包括 AFZa、P5/proximal P1、P5/distal P1、P4/ distal P1、b2/b4 (AZFc) [17-19]。一般而言，男性不孕症的患者 Y 染色體檢測出缺損的比例大約在 10% 左右，其中以 b2/b4 的缺損最為常見，這種情形並沒有種族或地域性的差異。

Y 染色體缺損的確會造成睪丸功能不良，但未必就完全製造不出精蟲，在探討基因型與表現型之間的相關時，發現大概只有 b2/b4 缺損的患者，在進行睪丸取精時能夠找到精蟲(表一)。

表一. Y 染色體缺損與睪丸表現型之相關

Deletion Model	Testicular phenotype	TESE
AZFa	SCOS	Failure
P5/proximal P1	SCOS	Failure
P5/distal P1	SCOS	Failure
P4/distal P1	SCOS	Failure
b2/b4	Maturation arrest; Hypospermatogenesis	Success

在檢測的方法方面，EAA/EMQN 曾提出 6 個 STS_s 加上 SRY 當作第一線檢查，這 6 個 STS_s 包括了 sY84、sY86(AZFa)；sY127、sY134 (AZFb)及 sY254、sY255(AZFc) [20]。根據 EAA/EMQN 報告使用這組 STS_s 可以檢測出 90% 的 Y 染色體缺損。在成大醫院，我們依據最新的缺損機轉設計了一組具有基因專一性 (gene specific) 的引子。一般相信以基因為基礎的篩檢將會比以 STS 為基礎的篩檢更具意義。因為它能夠真正反應出基因型與表現型之相關性，而所得到的結果在臨床上對於治療的選擇及遺傳諮詢都極具價值。這組檢測的基因包括了 USP9Y、DBY、SMCY、RBM1 及 DAZ。以這套檢測的方法及 EAA/EMQN 的檢測方法來診斷成大醫院 475 名男性不孕症患者，兩者的診斷結果幾乎完全一致。

Y 染色體缺損的檢測在臨床上有診斷、預後及預防的功能。例如患者若是屬於 b2/b4 缺損，則可預測該患者睪丸取精的成功率頗高，但是患者藉由生殖科技

而受孕成功後，其 Y 染色體缺損的情形將不可避免的遺傳至男性子代，而且其子代 Y 染色體缺損的情形可能更擴大。同時文獻報告顯示，帶有 Y 染色體缺損的患者，其睪丸內的造精能力可能會隨著時間的增加而逐漸衰退[21]，因此建議患者應及早進行睪丸取精手術及預做精蟲冷凍。這些衍生的問題也正突顯出遺傳諮詢在這些患者的重要性。

參考文獻

1. Vincent MC, Daudin M, De MP, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F, Calvas P, Bujan L, Bourrouillout G. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl.* 2002, 23:18-22
2. Hargreave TB. Genetics and male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2000, 12:207-19.
3. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Le Martelot MT, Roche S, Valeri A, Derrien V, Amice J, De Braekeleer M. Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. *Int J Androl.* 2004, 27:178-82.
4. Madgar I, Dor J, Weissenberg R, Raviv G, Menashe Y, Levron J. Prognostic value of the clinical and laboratory evaluation in patients with nonmosaic Klinefelter syndrome who are receiving assisted reproductive therapy. *Fertil Steril.* 2002, 77:1167-9.
5. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S, Hanson L, Hanson C, Bergh C. Testicular ultrasonography and extended chromosome analysis in men with nonmosaic Klinefelter syndrome: a prospective study of possible predictive factors for successful sperm recovery. *Fertil Steril.* 2001, 75:1102-5.
6. Denschlag D, Tempfer C, Kunze M, Wolff G, Keck C. Assisted reproductive techniques in patients with Klinefelter syndrome: a critical review. *Fertil Steril.* 2004, 82:775-9.
7. Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update.* 2003, 9:319-30.
8. Johannisson R, Schwinger E, Wolff HH, vom Ende V, Lohrs U. The effect of 13;14 Robertsonian translocations on germ-cell differentiation in infertile males. *Cytogenet Cell Genet.* 1993, 63:151-5.
9. Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H and Shwachman H. Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol.* 1971, 106:568-74.
10. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995,

332:1475-80.

11. Dohle GR, Veeze HJ, Overbeek SE, van den Ouweland AM, Halley DJ, Weber RF and Niermeijer MF. The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical, electrophysiological and genetic data. *Hum Reprod.* 1999, 14:371-4.
12. Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Delomel-Vinner E, Decaestecker B, Lafitte JJ and Roussel P. Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR): correlation between genotype and phenotype. *Hum Genet.* 1996, 97:7-10.
13. De Braekeleer M, Ferec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2:669-77.
14. Wu CC, Alper OM, Lu JF, Wang SP, Guo L, Chiang HS, Wong LJ. Mutation spectrum of the CFTR gene in Taiwanese patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod.* 2005, 20:2470-5.
15. Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ; Subcommittee on Cystic Fibrosis Screening, Accreditation of Genetic Services Committee, ACMG; American College of Medical Genetics. Laboratory standards and guidelines for population based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med.* 2001, 3:149-54.
16. Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol JM, Ghosh C; EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 2002, 42:313-22.
17. Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet.* 2003, 35:247-51.
18. Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics.* 2004, 83:1046-52.
19. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B and Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet.* 2003, 40:18-24.
20. Simoni M, Bakker E and Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl.* 2004, 27:240-249.
21. Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, De Palma A, Vicari E, Romeo R, Tumino S, D'Agata R. Spontaneous regression over time of the germinal

epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient: Case report. Hum Reprod. 2001, 16:1845-8.