

· 论 著 ·

特发性重度少畸精子症全外显子组测序的临床意义

潘锋, 张兴源, 潘连军

南京市妇幼保健院 南京医科大学附属妇产医院男科, 江苏 南京 210004

摘要: **目的** 探讨全外显子组测序(WES)检测技术在特发性重度少畸精子症中的临床意义。**方法** 选取2019年1月至10月收治的54例特发性重度少畸精子症患者为研究对象,收集患者个人史、性激素等结果,采集全血标本进行WES检测,随访生育结局。**结果** 54例患者中8例(14.81%)WES结果阳性,46例(85.19%)结果阴性;8例WES阳性病例共9种基因变异中的5种变异与临床表型一致,分别是SLC26A8、SPO11、DPY19L2、DNAH1和SUN5。WES阳性与WES阴性两组性激素水平、个人史方面差异无统计学意义($P>0.05$)。随访中总体成功生育率37.04%(20/54),其中通过卵胞浆内单精子注射(ICSI)成功受孕率占80.00%(16/20)。总体不育率62.96%(34/54),其中受孕失败[包括自然流产和体外授精(IVF)失败]者占38.24%(13/34),仍在备孕者占61.76%(21/34),备孕者中拟行IVF者占71.43%(15/21)。**结论** WES检测为部分特发性重度少畸精子症患者提供了基因诊断依据。但临床治疗上,IVF仍是该类患者配偶成功受孕的主要方式。

关键词: 少精子症; 畸形精子症; 全外显子组测序; 基因突变

中图分类号: R698⁺.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)10-1314-05

Clinical significance of whole exome sequencing in severe idiopathic oligoasthenoteratozoospermia

PAN Feng, ZHANG Xing-yuan, PAN Lian-jun

Department of Andrology, Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210004, China

Corresponding author: PAN Lian-jun, E-mail: pljandrol@163.com

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of whole exome sequencing (WES) in severe idiopathic oligoasthenoteratozoospermia (iOAT). **Methods** Fifty-four patients with severe iOAT treated from January to October 2019 were selected as the research subjects. After collecting the patients' personal history, sex hormones and whole blood samples for WES detection, the patients were followed up for fertility outcomes. **Results** There were WES-positive results in 8 of 54 patients (14.81%) and WES-negative in 46 of 54 patients (85.19%). In WES-positive group, 5 out of 9 gene variants (SLC26A8, SPO11, DPY19L2, DNAH1 and SUN5) were consistent with the clinical phenotype. There were no significant differences in hormone levels and personal history between WES-positive group and WES-negative group ($P>0.05$). During the follow-up period, the overall successful fertility rate was 37.04% (20/54), in which the successful pregnancy rate through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) accounted for 80.00% (16/20). The overall infertility rate was 62.96% (34/54), in which spontaneous abortion and in vitro fertilization (IVF) failure accounted for 38.24% (13/34), and the persons still preparing for pregnancy were 61.76% (21/34). The persons proposed for IVF accounted for 72.43% (15/21). **Conclusions** WES detection provides a basis for the genetic diagnosis of some severe iOAT patients. In clinical practice, IVF remains an effective option for successful pregnancy for the spouses of iOAT patients.

Keywords: Oligospermia; Teratozoospermia; Whole exome sequencing; Genetic mutations

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81771572); Nanjing Health Youth Talent Training Project during the 13th Five-Year Plan (QRX17071)

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2021.10.004

基金项目: 国家自然科学基金(81771572); 十三五南京市卫生青年人才培养工程项目(QRX17071)

通信作者: 潘连军, E-mail: pljandrol@163.com

不孕不育已成为全球范围内的重大疾病之一,据统计育龄夫妇的不孕率约为15%^[1]。约50%的不孕病例由男方因素单独或协同导致。虽然男性不育的原因已被广泛研究,但仍有25%的男性不育是特异性的^[2]。目前认为50%的特发性男性不育可能存在单基因突变^[3],如DPY19L2基因突变导致圆头精子症、DNAH1基因突变所致鞭毛异常等。近年来,随着全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)的兴起,越来越多的基因突变被发现。WES是指利用序列捕获技术将全基因组外显子区域DNA捕获富集后进行高通量测序,因为人类疾病的大多数遗传变异可能是由低频稀有编码变体引起的,可以通过测序而不是对一组已知变体进行基因分型来获得^[4-8]。如今,WES也越来越多的被运用于特发性男性不育患者的基因诊断中。然而,临床中的特发性男性不育,尤其是特发性重度少弱畸精子症患者,往往直接诉求于体外受精(IVF)技术,忽略了进一步的病因检测,而IVF依然有受精失败、胚胎发育异常,以及子代遗传风险,特定的基因突变还需要选择卵胞浆内单精子注射(ICSI)甚至胚胎植入前遗传学诊断(PGD)进行治疗^[9]。但从另一角度来看,进一步的基因检测也会给患者增加经济负担。鉴于此,本研究随访2019年1月至10月在南京市妇幼保健院就诊并行WES的特发性重度少精和/或畸精症患者,回顾分析WES对其生育结局的临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 共纳入特发性男性不育且重度少精和/或重度畸精症患者62例。所有患者均签署知情同意书并行WES,随访时间至少1年,其中,因离异或失联排除病例8例,最终纳入病例54例,所有患者均填写包含一般情况及生育结局的问卷调查表。

1.1.1 纳入标准 (1)规律同房、未避孕未育1年以上,按WHO5标准检测精液质量 ≥ 3 次;(2)确诊为重度少精和/或重度畸精症(精子浓度 $< 5 \times 10^6$ 个/ml,和/或畸形率 $> 99\%$)。

1.1.2 排除标准 (1)排除女方原因、继发性不育、无精子症、有女方自然流产病史患者;(2)排除精索静脉曲张、隐睾、炎症等睾丸性疾病;(3)排除染色体核型异常、Y染色体微缺失、下丘脑-垂体异常患者。

1.2 WES及分析

1.2.1 静脉采血 晨起安静状态下采集静脉血5 ml,

采血前空腹8 h以上,收集到EDTA抗凝管,血液DNA提取使用安捷伦SureSelect V5平台(阅尔基因,上海)。

1.2.2 WES检测 基因组DNA经Covaris超声破碎仪(冠森生物,上海)随机打断,连接接头制备文库。带有不同标记的DNA文库混合后与特异性探针进行杂交,经PCR线性扩增进行2 100文库质检后进行高通量测序(阅尔基因,上海)。使用Agilent SureSelect人全外显子V6捕获试剂盒,测序平台选用Illumina HiSeq 2000平台,平均测序深度30 \times ,平均外显子覆盖度为95%。

1.2.3 数据分析 通过Qualimap工具来获取靶区间的平均测序深度达到30 \times 覆盖的百分比,再通过Annovar对变异信息注释,包括(1)1 000 Genomes Project, ExAC, GnomAD等数据库进行群体突变率分析;(2)参考dbSNP、ClinVar、CosMic等多种数据库对致病变异位点进行评估;(3)使用SIFT、PolyPhen2、MutationTaster、GERP++、REVEL等蛋白功能预测软件进行基因突变功能预测。通过拷贝数变异(CNV)分析进行变异解读,最后形成分析结果。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件分析数据。连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用独立样本 t 检验;定性资料采用 $n(\%)$ 形式表示,组间比较采用Pearson χ^2 检验或者Fisher精确概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

共收集到54例患者,其中重度少精症患者38例,重度畸精症患者9例,重度少畸精子症患者7例。患者年龄25~38岁,平均(29.45 \pm 3.15)岁;体重55~84 kg,平均(67.83 \pm 7.31) kg;身高156~185 cm,平均(173.81 \pm 6.42) cm。

2.1 特发性重度少畸精子症患者WES检测 54例特发性男性不育患者进行WES检测,其中有8例(14.81%)患者被检测出WES阳性,阳性结果中发现9种致病的基因突变,其中常染色体显性遗传方式有3种,常染色体隐性遗传为4种,不明遗传方式为2种。在变异与临床表型的相关生物信息学分析中,涉及生精障碍的基因有SLC26A8、DNAH11和SPO11,涉及精子畸形的基因有DPY19L2、DNAH1和SUN5,涉及到性腺功能的基因有CYP19A1、PROK2和抗苗勒管激素(AMH)。回顾分析发现,9种基因突变中的5种与临床表型一致,分别是SLC26A8、SPO11、DPY19L2、DNAH1和SUN5。见表1。

2.2 特发性重度少畸精子症患者个人史及性激素分析 特发性少畸精子症患者 54 例个人史方面,记录患者吸烟、饮酒、电脑接触、体育锻炼等信息,并进行统计学分析,结果显示 WES 阳性与 WES 阴性组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。针对 54 例患者进行性激素检查,统计结果显示 WES 阳性与 WES 阴性两组的性激素指标水平对比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

2.3 特发性男性不育患者生育结局 随访中总体成功生育率为 37.04%(20/54),其中其配偶自然受孕率为 7.41%(4/54),占生育组 20.00%(4/20),包括

WES 阳性组 1 例,WES 阴性组 3 例。通过 IVF 患者配偶成功受孕率 29.63%(16/54),占生育组 80.00%(16/20),包括 WES 阳性组 2 例,WES 阴性组 14 例。总体不育率 62.96%(34/54),其中,通过自然受孕而配偶自然流产的患者占 9.26%(5/54),包括 WES 阳性组 1 例,WES 阴性组 4 例;IVF 失败 8 例(14.81%),均来自 WES 阴性组。自然流产和 IVF 失败共占不育组 38.24%(13/34)。随访中仍然在等待受孕的患者 21 例,占不育组 61.76%(21/34),这些患者中选择等待自然受孕者占 28.57%(6/21),准备行 IVF 者占 71.43%(15/21)。见表 4。

表 1 WES 检测阳性 8 例患者基因突变情况及生育结局

WES 阳性患者	临床表型 (重度)	WES 突变基因	染色体位置	突变方式	遗传模式	疑似疾病	生育结局
I	少精症	SLC26A8	chr6:35943265	Exon8 杂合	常显	3 型生精功能障碍	自然生育 1 女
II	少精症	CYP19A1	chr15:51519979-91	Exon3 杂合	常显	芳香化酶缺乏/过多	ICSI 成功 二胎妊娠中
III	少精症	PROK2	chr3:71830716	Exon2 杂合	常显	4 型性腺功能减退	未育、备行 IVF
IV	少精症	DNAH11	chr7:21904204	Exon70 杂合	常隐	7 型原发性纤毛运动障碍	自然妊娠下早期胚停 1 次
V	少精症	AMH	chr19:2251727, 30	Exon5 杂合	常隐	1 型苗勒管永存综合征	未育、尝试自然受孕
VI	少畸精症	SPO11	chr20:55910871-72	Exon7 杂合	不明	生精功能障碍	未育、备行 IVF
VII	畸精症	CNV 重复 (覆盖基因 DPY19L2); DNAH1	chr12: 63952668-64052395 重复;chr3:52415744	Duplication; Exon49 杂合	不明;常隐	不明;37 型原发性纤毛运动障碍	ICSI 成功生育 1 子
VIII	畸精症	SUN5	chr20:31585453	Exon6 纯合	常隐	16 型生精功能障碍	未育、备行 IVF

注:常显为常染色体显性遗传;常隐为常染色体隐性遗传。

表 2 WES 阳性与阴性患者个人史比较 [例(%)]

个人史	WES 阳性 (n=8)	WES 阴性 (n=46)	χ^2 值	P 值
吸烟				
从不	3(37.50)	22(47.83)	0.300	0.860
中度	2(25.00)	10(21.74)		
重度	3(37.50)	14(30.43)		
饮酒				
从不	4(50.00)	32(69.57)	1.141	0.565
中度	3(37.50)	11(23.91)		
重度	1(12.50)	3(6.52)		
电脑接触				
较少	2(25.00)	14(30.43)	0.482	0.786
中度	2(25.00)	15(32.61)		
频繁	4(50.00)	17(36.96)		
锻炼				
较少	5(62.50)	30(65.22)	0.109	0.947
中度	2(25.00)	12(26.09)		
频繁	1(12.50)	4(8.70)		

注:吸烟中度为<10 支/d 且烟龄<5 年,重度为≥10 支/d 或烟龄≥5 年;饮酒中度为<4 次/周,重度为≥4 次/周;电脑接触较少为<2 h/d;中度为 2~6 h/d;频繁为≥6 h/d;锻炼较少为≤1 次/周,中度为 2~4 次/周,频繁为>4 次/周。

表 3 WES 阳性与阴性患者性激素水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

性激素	WES 阳性 (n=8)	WES 阴性 (n=46)	t 值	P 值
LH	3.15±0.24	3.04±0.46	0.657	0.514
FSH	2.59±0.38	2.95±0.81	1.226	0.226
T	3.55±0.52	3.84±0.77	1.021	0.312

注:黄体生成素(LH,mIU/ml)、卵泡刺激素(FSH,mIU/ml)、雄激素(T,ng/ml)。

表 4 总体生育结局情况 [例(%)]

生育结局	WES 阳性 (n=8)	WES 阴性 (n=46)	合计 (n=54)
自然生育	1(12.50)	3(6.52)	4(7.41)
自然妊娠状态下的自然流产等不良孕史	1(12.50)	4(8.70)	5(9.26)
IVF 成功生育	2(25.00)	14(30.43)	16(29.63)
运用 IVF 失败	0	8(17.39)	8(14.81)
不育并仍在尝试自然受孕	1(12.50)	5(10.87)	6(11.11)
不育并备行 IVF	3(37.50)	12(26.09)	15(27.78)

3 讨论

特发性男性不育伴随的重度少、畸精子症是目前临床诊疗中最棘手的问题之一^[10]。首先,直接行IVF不仅会增加经济负担,也存在失败的风险,如授精失败和早期胚停,本研究病例最终选择IVF并失败者占14.81%(8/54);其次,重度少畸精子症患者并非绝对不能自然受孕,本研究中最终自然受孕成功者7.41%(4/54),但概率很低,大部分人仍然需要选择IVF,本研究随访过程中,已行或备行IVF者占72.22%(39/54)。所以保守治疗并不是可靠的方案。鉴于此,特发性男性不育伴随的重度少、畸精子症既不像无精子症的治疗手段那样明确,即争取手术获得精子并行ICSI,也不像其他少弱畸精子症治疗那样,纠正病因的基础上保守治疗,便有机会自然受孕。对这类患者怎样才能选择最优的治疗方案显得尤为困难。

理论上,通过WES测序可以获知基因突变信息,为精准诊疗提供重要依据。本研究发现8例WES阳性患者,涉及9个突变基因,SLC26A8、DNAH11、SPO11、SUN5、DPY19L2、DNAH1、CYP19A1、PROK2、和AMH。其中5种基因突变与临床表型一致(SLC26A8、SPO11、DPY19L2、DNAH1和SUN5),而DPY19L2、DNAH1和SUN5的检出减少了患者的尝试性治疗,建议患者行ICSI可直接获益,具有临床价值。

SLC26A8被称为睾丸阴离子转运体1(TAT1),作为一个大的阴离子转运体家族的男性生殖细胞特异性成员,溶液连接载体26(SLC26)^[11],可以协同并激活囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)。有研究表明SLC26A8(MIM 608480)和CFTR(MIM 602421)的突变可能会损害精子的运动能力和获能能力,导致SLC26A8-CFTR介导下的精子活化异常^[12]。SPO11基因是减数分裂相关基因,已有多项研究表明其为男性不育的易感基因,SPO11基因突变导致减数分裂缺陷和前期凋亡导致严重的性腺异常,导致男性不育^[13-14]。SUN5是一种睾丸特异性核被膜蛋白,主要在精子形成的减数分裂期发挥作用,也是目前在无头精子症患者中发现的唯一有意义的突变基因。目前的研究发现,SUN5基因变异导致SUN5蛋白缺失,影响精子头尾连接装置(HTCA)的功能,使得HTCA连同精子尾巴一起从精子头部脱落,产生没有授精功能的无头精子^[15]。CYP19A1基因编码芳香化酶,芳香化酶将雄激素转化为雌激素,

是女性性发育和两性生长发育所必需的。芳香化酶抑制剂可用于部分少精子症患者的治疗^[16]。PROK2基因是特发性低促性腺功能减退(IHH)的已知致病基因之一。DNAH11基因编码动力蛋白重链家族成员之一,参与呼吸纤毛和精子鞭毛的组装。在DNAH11高度保守的情况下,突变可导致原发性纤毛运动障碍(PCD)和弱精子症^[17]。AMH基因编码AMH,是一种二聚糖蛋白,是转化生长因子 β 超家族的成员^[18]。在男性主要由睾丸未成熟的支持细胞分泌,临床上为男性睾丸Sertoli细胞功能、男性生育力的标志物。

本组例Ⅶ患者临床表现为重度畸精症,检出12号染色体63952668-64052395区域重复,约99 kb,该区域包含整个DPY19L2基因,系为圆头精子症的主要致病基因。但DPY19L2基因重复是否致病,目前临床意义未明,该患者的精子确实存在重度畸形、顶体缺失,但并未表现为典型的圆头精子症。其次,这位患者还出现DNAH1的外显子杂合突变,DNAH1是精子尾部畸形(MMAF)的第一个报道致病基因。因此临床上推荐进行ICSI治疗,患者配偶最终成功受孕。

有研究认为50%的特发性男性不育可能存在单基因突变^[3],而本文回顾性分析中发现可能有意义的基因突变仅占14.81%(8/54),且有些突变与临床表型存在差异,这可能与样本量较少有关,但也表明目前仍不应将基因检测作为临床常规检查项目。表型不一致的4例,包括DNAH11主要导致畸精症,而本组例Ⅳ患者表型为少精症,随访过程中还出现了自然受孕下的早期自然流产;CYP19A1编码芳香化酶,本组例Ⅱ患者虽然表现为少精症,但其性激素却在正常范围,因而没有足够的证据支持该基因突变致病;同理,PROK2是IHH的致病基因,虽然本组例Ⅲ患者表现为少精,但其性激素却未出现低促的表现;例Ⅴ患者出现AMH基因异常,亦没有出现AMH水平低下,因而也不支持该基因突变致病。

目前已知表观遗传学在精子发育中的重要作用,环境因素与表观遗传学的改变也有明确的相关性^[19]。因而本研究对54例患者全部进行个人史等生活环境因素调查,在吸烟、饮酒、电脑接触、体育锻炼方面差异无统计学意义;54例患者进行性激素检查,包括FSH、LH、T,结果显示WES阳性与WES阴性两组的性激素水平对比差异也无统计学意义。虽然病例数较少,但本研究并未发现环境因素或性激素指标与重度少畸精子症患者基因突变的相关性。

综上所述, WES 检测基因突变为部分特发性重度少畸精子症患者提供了基因诊断依据, 并可减少尝试性治疗, 指导预后。特发性重度少畸精子症患者如果合并特殊表型, 如圆头精子症、大头多尾精子症、无头精子症、IHH、AMH 异常等, 则行基因检测的意义更加重大。但理想状态下针对基因突变的精准治疗还有很长的路要走, IVF 仍然是特发性重度少畸精子症患者依赖的治疗方案。对于包括本研究发现的一些突变基因在内的许多可能致病的基因, 还需结合家族谱系检测等证据来明确其致病性, 甚至是不同突变方式的致病性。

参考文献

- [1] Fakhro KA, Elbardisi H, Arafa M, et al. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility [J]. *Genet Med*, 2018, 20(11):1365-1373.
- [2] Hodzic A, Maver A, Plaseska-Karanfilska D, et al. De novo mutations in idiopathic male infertility-A pilot study [J]. *Andrology*, 2021, 9(1):212-220.
- [3] Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(2):271-285.
- [4] Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(11):903-905.
- [5] Choi M, Scholl UI, Ji WZ, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(45):19096-19101.
- [6] Kim DW, Nam SH, Kim RN, et al. Whole human exome capture for high-throughput sequencing [J]. *Genome*, 2010, 53(7):568-574.
- [7] Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes [J]. *Nature*, 2009, 461(7261):272-276.
- [8] Saunders EJ, Dadaev T, Leongamornlert DA, et al. Fine-mapping the HOXB region detects common variants tagging a rare coding allele; evidence for synthetic association in prostate cancer [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(2):e1004129.
- [9] 中华医学会男科学分会. 男性生殖相关基因检测专家共识 [J]. *中华男科学杂志*, 2020, 26(9):844-851.
- [10] 翁浩伟, 冯家明, 陈琦, 等. 周少虎教授运用益肾活血方治疗畸形精子症经验 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(17):162-164, 168.
- [11] Toure A, Morin L, Pineau C, et al. Tat1, a novel sulfate transporter specifically expressed in human male germ cells and potentially linked to rhoGTPase signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23):20309-20315.
- [12] Dirami T, Rode B, Jollivet M, et al. Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(5):760-766.
- [13] Baudat F, Manova K, Yuen JP, et al. Chromosome Synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11 [J]. *Mol Cell*, 2000, 6(5):989-998.
- [14] Smirnova NA, Romanienko PJ, Khil PP, et al. Gene expression profiles of Spo11^{-/-} mouse testes with spermatocytes arrested in meiotic prophase I [J]. *Reprod Camb Engl*, 2006, 132(1):67-77.
- [15] Shang Y, Yan J, Tang W, et al. Mechanistic insights into acephalic spermatozoa syndrome-associated mutations in the human SUN5 gene [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(7):2395-2407.
- [16] Parween S, DiNardo G, Baj F, et al. Differential effects of variations in human P450 oxidoreductase on the aromatase activity of CYP19A1 polymorphisms R264C and R264H [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 196:105507.
- [17] Zhu D, Zhang H, Wang R, et al. Association of DNAH11 gene polymorphisms with asthenozoospermia in Northeast Chinese patients [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(6):BSR20181450.
- [18] Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2012, 25(1):1-16.
- [19] Dada R, Kumar M, Jesudasan R, et al. Epigenetics and its role in male infertility [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(3):213-223.

收稿日期:2021-02-04 修回日期:2021-03-24 编辑:石嘉莹