

网络出版时间: 2017-6-16 11:46:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170616.1146.015.html>

◇临床医学研究◇

基于 Array-CGH 技术的胚胎植入前遗传学诊断 在 XYY 综合征患者中的应用

陈 成, 贺小进, 陈大蔚, 吴 欢, 周 平, 章志国, 曹云霞

摘要 **目的** 评估基于 Array-CGH 技术的植入前遗传学诊断(PGD)对超雄综合征(XYY综合征)患者胚胎染色体进行分析的应用效果。**方法** 研究选取行 PGD 助孕的 5 例 XYY 患者及 15 例染色体易位患者,对两组的女方年龄、精子浓度、前向运动精子比例、获卵数、第二次减数分裂中期(MII)卵子数、优质胚胎数、染色体异常率进行比较。**结果** XYY 组和染色体易位组在女方年龄、精子浓度、PR、获卵

数、MII 卵子数、优质胚胎数均差异无统计学意义,PGD 检测结果中,两组的染色体异常率差异无统计学意义。XYY 组活检 21 枚胚胎,其中 10 枚胚胎为常染色体异常,1 枚为性染色体异常。非整倍体率为 52.38%,常染色体异常为 47.62%,性染色体异常为 4.80%。**结论** XYY 综合征患者行体外受精时有和男性染色体易位患者类似的胚胎染色体异常率,Array-CGH 可同时检测 XYY 综合征患者全部染色体情况,避免大量异常胚胎植入女方体内,有利于降低子代出生缺陷,值得临床应用。

关键词 47,XYY; 胚胎非整倍体; Array-CGH; PGD

中图分类号 R 715.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1168-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.015

XYY 染色体综合征的发病率约为千分之一,是仅次于 Klinefelter 综合征(47,XXY)的男性染色体

2017-04-18 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1604a0802077); 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2014A114)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院生殖中心, 合肥 230022

作者简介: 陈 成,女,硕士研究生;

曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: caoyunxia6@126.com;

章志国,男,副教授,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: zzg_100@163.com

The effect of penta-acetyl geniposide on CUMS-induced depressive behaviors and HPA axis in rats

Zhao Xia¹, Cai Li¹, Li Rong², et al

(¹Dept of Pathology, ²School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To observe the effect of penta-acetyl geniposide on chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depressive behaviors and its effect on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in rats with CUMS-induced depression. **Methods** Sixty rats were randomly divided into six groups: normal group, CUMS group, penta-acetyl geniposide (25, 50, 100 mg/kg)-treated groups and fluoxetine (10 mg/kg)-treated group. Except the rats in normal group, CUMS was applied to induce depression in rats. Penta-acetyl geniposide and fluoxetine were intragastric administrated from day 8 to day 21 after CUMS exposure. Sucrose preference test, open field test and forced swimming test were used to evaluate the antidepressant effect of penta-acetyl geniposide. Corticosterone (CORT) serum level, adrenal index and hypothalamic corticotrophin-releasing hormone (CRH) mRNA level were assayed to assess the potential effect of penta-acetyl geniposide on HPA axis. **Results** Compared with the normal group, CUMS rats showed abnormal behaviors and HPA axis activation. Penta-acetyl geniposide could reverse the CUMS-induced behavioral abnormalities, as indicated by increased sucrose consumption, improved crossing and rearing behavior, reduced immobility time and increased swimming time. In addition, penta-acetyl geniposide could restore the CUMS-induced overactivity of HPA axis, evidenced by decreased CORT serum level, adrenal gland index and hypothalamic CRH mRNA level. **Conclusion** Penta-acetyl geniposide can improve the behaviors of CUMS rats and exert its antidepressant effect by modulation of the HPA axis.

Key words penta-acetyl geniposide; depression; chronic unpredictable mild stress; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; corticotrophin-releasing hormone

异常^[1]。相对于其他染色体数目及结构异常的男性多有不育而言,大部分 XYY 综合征患者可生育,仅有部分患者表现为生育率降低。有研究^[2]通过精子染色体检测显示 XYY 综合征患者精子并未出现明显染色体异常,这可能和在细胞分裂过程中,多余 Y 染色体通过凋亡等途径被清除有关^[3]。Gonzalez-Merino et al^[4]发现 XYY 综合征患者精子的性染色体和常染色体均存在明显的异常,由此胚胎染色体异常的风险也显著增加。随着植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 技术的广泛开展,运用 PGD 技术对 XYY 综合征患者胚胎进行诊断可以帮助这些患者获得健康子代的出生^[5]。然而,也有观点推测,对于 XYY 患者应用 PGD,不仅增加经济负担,而且胚胎活检可能造成潜在风险^[6]。该研究拟探讨基于 Array-CGH 技术的胚胎 PGD 检测 XYY 综合征患者胚胎的非整倍体率的临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2014年2月~2016年2月在本院妇产科生殖医学中心行 PGD 助孕的 5 例患者为 XYY 组,男方染色体核型均为 47,XYY,男方无精子症基因未见缺失;为证明 PGD 对于 XYY 综合征患者胚胎染色体异常筛查的意义,选择同期因染色体易位(包括平衡易位及罗氏易位)行 PGD 的 15 例的患者为染色体易位组,其中女方染色体核型为正常,男方无精子症基因检查未见缺失。两组女方年龄均 < 35, XYY 组女方年龄 21 ~ 28 (24.40 ± 3.04) 岁,染色体易位组女方年龄 21 ~ 32 (26.93 ± 3.63) 岁。

1.2 实验方法

1.2.1 胚胎体外受精及活检 患者均采用本中心常规超排卵方案促排,待主导卵泡 > 18 mm,注射 HCG 32 ~ 36 h 后经阴道超声引导下取卵,同时对精液进行处理。去除卵子周围颗粒细胞,对第二次减数分裂中期 (Metaphase II, M II) 卵子行单精子胞浆内显微注射 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 受精,培养并观察至第 5 天,对胚胎质量进行评估,选取优质胚胎,从滋养层进行活检,取 10 个以上细胞进行检测。

1.2.2 Array-CGH 检测 样本扩增:取 3 个 0.2 ml 的 PCR 管分别加入 2.5 μl PBS, 15.6 pg 和 62.5 pg 参照 DNA,将活检样本洗涤后移入含有 PBS 的 PCR 管中并离心,每个样本管依次加入加入 2.5 μl 细胞

提取液, Extraction cocktail 5 μl, 上 PCR 仪 3 个循环。每样本加入 Pre-amp cocktail 5 μl, 上 PCR 仪 14 个循环。每样本再次加入 60 μl Amplification cocktail, 上 PCR 仪 15 个循环,取 5 μl 产物与 Buffer 到琼脂凝胶上检测。标记:将 Primer solution 和样本的混合,混合液上 PCR 仪,分别加入 12 μl Cy3 和 12 μl Cy5 于装有样本和对照的 PCR 管中,上 PCR 仪。将 Cy3 标记的样本和相应 Cy5 标记的对照混合。每管加入 25 μl COT Human DNA 和 7.5 μl 醋酸钠后加入无水乙醇混匀,离心 10 min 后加 70% 乙醇,混匀后离心。杂交:上述标记好的产物中加入 DS hybridization buffer 21 μl, 75 °C 水浴 10 min,待沉淀完全溶解,加 18 μl 样本于芯片杂交区域,置于湿盒,漂浮于 47 °C 水浴中 3 h 以上。洗片:将芯片置于盛有洗液的染缸内搅动,依次加入洗液。

1.3 扫描及分析 用扫描仪扫描芯片,保存数据。使用 BlueFuse Muti 分析软件分析结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,两组的女方年龄、前向运动精子比例、获卵数、MII 卵子数、平均优质胚胎数均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用 *t* 检验;男方精子浓度不符合正态分布,以 *M*(*Q*) 表示,两组间比较采用秩和检验;胚胎异常率应用 χ^2 检验比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料 XYY 组 5 对男方染色体为 47,XYY 患者夫妇,行 5 个 ICSI-PGD 周期,共获卵 77 枚,其中 MII 卵子数 61 枚,获得优质胚胎 21 枚。染色体易位组为 15 对不孕夫妇,行 18 个 ICSI-PGD 周期,共获卵 283 枚,其中 MII 卵子数 258 枚,获得优质胚胎 87 枚。XYY 组和染色体易位组在女方年龄、男方精子浓度、前向运动精子比例、获卵数、MII 卵子数、优质胚胎数均差异无统计学意义(表 1)。

表 1 患者基本资料

指标	XYY 组 (<i>n</i> = 5)	染色体易位组 (<i>n</i> = 15)	<i>P</i> 值
女方年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	24.40 ± 3.04	26.93 ± 3.63	0.424
精子浓度[百万/ml, <i>M</i> (<i>Q</i>)]	3.10(7.17)	2.90(58.25)	0.893
前向运动精子百分率(% , $\bar{x} \pm s$)	17.83 ± 10.51	31.22 ± 28.61	0.199
获卵数(个, $\bar{x} \pm s$)	15.40 ± 6.70	18.86 ± 8.95	0.219
II 卵子数(个, $\bar{x} \pm s$)	12.20 ± 5.26	17.20 ± 7.87	0.247
优质胚胎数(个, $\bar{x} \pm s$)	4.40 ± 2.30	5.80 ± 3.16	0.268

2.2 PGD 结果 XYY 组活检 21 枚胚胎,其中 10

枚胚胎为常染色体异常,1枚为性染色体异常。非整倍体率为 52.38%,常染色体异常为 47.62%,性染色体异常为 4.80%。染色体易位组活检 87 枚胚胎,其中 2 枚扩增失败,异常胚胎 58 枚(包括复杂异常及性染色体异常),非整倍体率为 68.23%,常染色体非整倍体率为 62.35%,性染色体异常为 5.88%。两组间胚胎异常率差异无统计学意义。

表 2 中列出 XYY 组 11 枚异常胚胎的具体情

况,仅 1 枚为性染色体异常,其余均为常染色体异常,同时显示,10 枚常染色体异常胚胎中,涉及染色体异常共 16 条,这 16 条染色体多数属于中小体积的染色体,多数为 E、F、G 组染色体。

使用软件分析,通过与正常参照进行对比后可判断胚胎的染色体整倍体情况。图 1 为 1 号病例的 3 枚胚胎活检结果分析,A 图提示整倍体胚胎,B 图及 C 图为非整倍体胚胎。图中分析可知 1 号胚

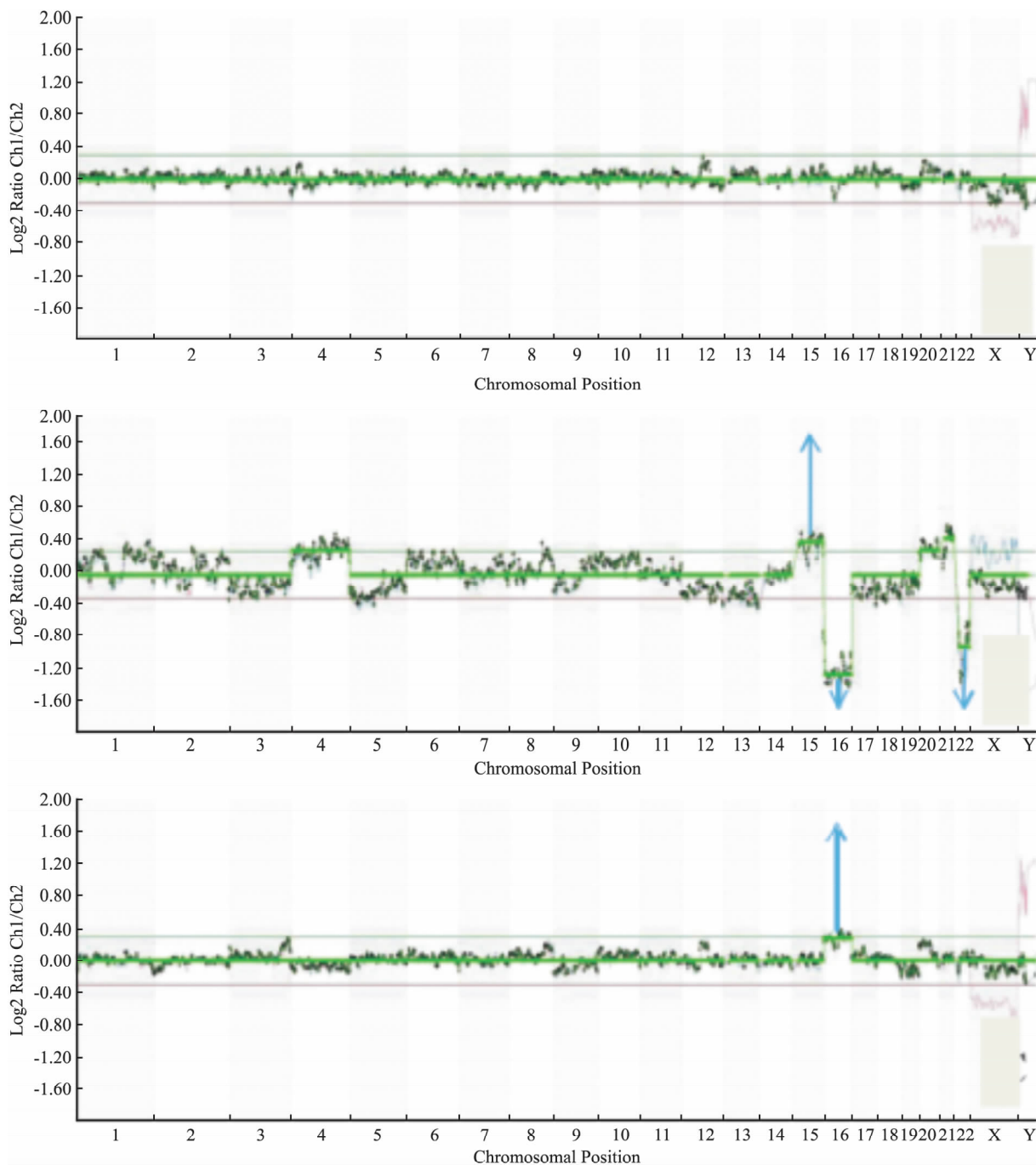


图 1 1 号患者胚胎活检 Array-CGH 结果

A: 整倍体胚胎; B: 1 号非整倍体胚胎; C: 2 号非整倍体胚胎; 图 B、C 中向上箭头为胚胎增加的染色体,向下箭头为胚胎缺失染色体

表2 XYY 组胚胎 PGD 检测结果(n)

病例 编号	获卵数	MII	优质 胚胎	异常 胚胎	异常结果
1	5	4	3	2	1: +15, -16, -22 2: +16
2	19	15	2	1	1: -18
3	15	11	3	2	1: +20, -8, -9 2: +22
4	15	13	5	3	1: -2 2: +16 3: 性染色体异常*
5	23	18	8	3	1: +19 2: +14, +19 3: -4, -17

注: * 性染色体异常指的是增加或缺失一条性染色体; + 表示增加; - 表示缺失

胎增加了 15 号染色体, 缺失 16, 22 号染色体。2 号胚胎增加了 16 号染色体。

3 讨论

在本研究中, PGD 结果显示 XYY 组胚胎异常率达到 52.38%, 与男方染色体为易位的染色体易位组胚胎异常率差异无统计学意义, 而且 Franasiak et al^[7] 通过回顾大量使用 CCS 分析胚胎染色体得到不同年龄段胚胎的非整倍体率, 与本研究匹配年龄人群的胚胎非整倍体率约为 24.6% ~ 27.8%, 远远低于本研究中 XYY 综合征患者胚胎染色体非整倍体率 52.38%。文献中也有关于 XYY 患者胚胎的非整倍体检测报道, Rodrigo et al^[8] 通过使用 FISH 技术对 X、Y、13、16、18、21、22 进行探针标记, 检测 36 个胚胎, 其中 21 个为异常胚胎, 胚胎非整倍体率较高, 为 58.33%, 与本研究的非整倍体率相似, 但胚胎仅表现为性染色体差异有统计学意义, 未显示明显常染色体非整倍体异常。而在另一项关于 XYY 患者胚胎非整倍体的研究中, Gonzalez-Merino et al^[4] 通过对同样的染色体进行探针标记, 发现 13 枚胚胎检测为染色体异常, 在这 13 个胚胎中, 作者同时发现常染色体非整倍体率与性染色体非整倍体率均差异有统计学意义, 分别为 13% 和 19%。本研究出现了高达 47.62% 的常染色体非整倍体异常, 提示 XYY 患者虽仅仅多一条 Y 染色体, 但子代的非整倍体染色体不仅涉及 Y 染色体, 同时涉及到与 Y 染色体无关的常染色体, 并出现较高的常染色体异常。由于胚胎的常染色体非整倍体率较高, 患者面临不孕、流产、出生有缺陷子代的风险, 因此 XYY 综合征患者的胚胎存在较高的非整倍体率是

亟需重视的染色体异常。

早期就有关于 XYY 综合征患者精子染色体的异常的报道, Mercier et al^[9] 通过使用两种颜色的探针的 FISH 技术分析 1 例 XYY 患者的精子性染色体, 发现性染色体存在显著异常。Shi et al^[10] 同样通过增加对 13、21 号的检测发现 47, XYY 患者精子仅存在明显的性染色体异常, 但随后通过继续增加 FISH 探针数目, Wong et al^[11] 对精液中的粗线期细胞进行 FISH 分析其染色体分裂行为后认为: 大部分精液中的粗线期细胞存在多余的 Y 染色体, 且发现患者少弱精的程度和粗线期细胞异常率成正比, 甚至在非嵌合体 XYY 患者中发现粗线期几乎没有正常的 XY 细胞并伴有严重少弱精, 值得注意的是该实验发现除了性染色体外, 13、21 号染色体非整倍体也有明显异常增加, 同样的, Gonzalez-Merino et al^[4] 观察到 XYY 男性精子中存在较显著的常染色体非整倍体率, 仅次于性染色体异常。在本研究中, 关于胚胎, PGD 结果显示了仅仅除了一枚胚胎为性染色体异常, 其余为常染色体异常。考虑较高的染色体异常可能来源于精子, 由于常染色体异常多为小体积(E、F、G 组)染色体异常, 推测其原因可能是性小体与常染色体作用造成常染色体非整倍体增加。

由于本研究和之前关于胚胎非整倍体检测的研究结果存在一定的差异, 分析可能与使用的检测方法有关, 文献^[4,8] 中的上述两个实验中使用的是基于 FISH 技术的 PGD 检测, 且仅检测了易产生非整倍体的 7 条染色体。FISH 技术虽广泛应用于 PGD 及筛查, 但仍存在一定的缺陷: ① 无法对全套染色体进行检测, 尤其是对于检测的染色体数目有一定的限制, 每次杂交仅能使用 2 ~ 5 枚探针, 有实验指出^[12] 多次杂交效果随着杂交次数增加而降低, 2 ~ 3 次为最佳; ② 可能出现杂交信号缺失: 包括杂交失败; 杂交信号重叠, 分裂等; 探针失效; 甚至在细胞固定过程中导致的细胞丢失等; ③ 影响因素较多, 检测者主观感受, 检测者技术水平等^[13]。相比而言, Array-CGH 可通过一次杂交检测全套染色体, 相对于 FISH 技术可快速准确的分析所有非整倍体, 并对 FISH 不能发现的染色体异常进行检测。尽管优势显著, Array-CGH 也有相应的不足, 无法对染色体数目变化的平衡易位, 倒位或整倍体变化进行检测。

综上所述, 染色体易位的患者有很大的可能拥有异常配子及胚胎, 有研究^[5] 结果显示染色体易位患者使用 PGD 可降低因易位造成的多种不良妊娠

结局。而本实验 PGD 结果中显示 XYY 综合征患者行体外受精时有和男性染色体易位患者类似的胚胎染色体异常率,对 XYY 患者使用 PGD 从而提高妊娠率,避免不良结局有一定的参考意义。同时,基于 Array-CGH 技术的 PGD 可同时检测 XYY 综合征患者全部染色体情况,可避免移入未检测的异常胚胎,有利于降低子代出生缺陷,值得临床应用。

参考文献

- [1] Jacobs P A, Melville M, Ratcliffe S, et al. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants [J]. *Ann Hum Genet*, 1974, 37(4): 359 - 76.
- [2] Morel F, Roux C, Bresson J L, et al. Sex chromosome aneuploidies in sperm of 47, XYY men [J]. *Arch Androl*, 1999, 43(1): 27 - 36.
- [3] Milazzo J P, Rives N, Mousset-Siméon N, et al. Chromosome constitution and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47, XYY infertile males [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(7): 1749 - 58.
- [4] Gonzalez-Merino E, Hans C, Abramowicz M, et al. Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47, XYY men [J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(3): 600 - 6.
- [5] Fischer J, Colls P, Escudero T, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(1): 283 - 9.
- [6] Lee E, Lllingworth P, Wilton L, et al. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(2): 473 - 83.
- [7] Franasia J M, Forman E J, Hong K H, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15, 169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(3): 656 - 63.
- [8] Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, et al. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(4): 1380 - 6.
- [9] Mercier S, Morel F, Roux C, et al. Analysis of the sex chromosomal equipment in spermatozoa of a 47, XYY male using two-colour fluorescence in-situ hybridization [J]. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(7): 485 - 8.
- [10] Shi Q, Martin R H. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47, XYY male and a review of the literature [J]. *Am J Med Genetic*, 2000, 93(1): 40 - 6.
- [11] Wong E C, Ferguson K A, Chow V, et al. Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(2): 374 - 8.
- [12] 张月萍, 朱赛娟, 孙晓溪, 等. 胚胎植入前诊断中多轮荧光原位杂交效果及影响因素分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(5): 522 - 7.
- [13] 谢言信, 徐艳文, 苗本郁, 等. 微阵列芯片比较基因组杂交技术在植入前遗传学诊断中的应用研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2013, 30(3): 283 - 7.

PGD for 47, XYY karyotype patients based on array comparative genomic hybridization

Chen Cheng, He Xiaojin, Chen Dawei, et al

(*Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To evaluate the aneuploidy rates of embryos from men with 47, XYY karyotypes by using the Array-CGH. **Methods** Five patients with XYY syndrome and the fifteen patients carrying chromosome translocations consulted for infertility and were enrolled. Maternal age, sperm concentration, PR, oocytes, MII oocytes, high quality embryos and aneuploidy of embryos were compared. The *t* test and the χ^2 test were used for statistical analysis. **Results** There were no statistically significant differences in maternal age, sperm concentration, PR, oocytes, MII oocytes, high quality embryos and aneuploidy of embryos between the two groups; a total of 21 embryos in group XYY were biopsied, 10 (47.62%) of them were autosome aneuploidy embryos and only one embryo (4.80%) has sex chromosome problem. **Conclusion** Array-CGH is used to screening for aneuploidy of all 24 chromosomes simultaneously, the data from which shows that the aneuploidy rate in embryos in group XYY is as high as that in group translocation, male with a 47, XYY karyotype should be recommended to use PGD to avoid the risk of transferring embryos with potentially aneuploidies.

Key words 47, XYY karyotype; aneuploidy of embryos; Array-CGH; PGD