

# 男性特发性不育症与 RBM 基因关系的探讨

冀荣俊<sup>1</sup>, 刘刚<sup>2</sup>

[摘要] 目的: 评估特发性无精子症和严重少精子症患者中 RBM 基因微缺失发生的频率, 并探讨 RBM 基因检测的临床意义。方法: 对 22 例无精子症和 8 例严重少精子症患者的外周血细胞运用聚合酶链反应技术进行 RBM 基因的检测。结果: 4 例无精子症和 2 例严重少精子症患者有 RBM 基因微缺失。结论: Y 染色体微缺失有可能通过垂直传播给男性后代; 对无精子症和严重少精子症患者, 在进行丈夫精液人工授精或胞浆内精子注射前, 进行相关基因检测, 对防止基因缺失传给下一代、提高优生率有着重要的临床意义。

[关键词] 不育症, 男性; 微缺失; RBM 基因

[中国图书资料分类法分类号] R 698.2 [文献标识码] A

## RBM gene and idiopathic infertility in men

Ji Rong-jun, Liu Gang

(Department of Urology, Bengbu Third Hospital, Anhui 233000, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the frequency of RBM gene microdeletion in men with idiopathic azoospermia and severe oligozoospermia, and to discuss the clinical significance of RBM gene detection. **Methods:** The RBM gene of peripheral blood leukocytes was detected by PCR technique in 22 azoospermia and 8 severe oligozoospermia patients. **Results:** RBM gene microdeletion was observed in 4 azoospermia and 2 severe oligozoospermia patients. **Conclusions:** As Azoospermic factor deletion on Y chromosome long arm may be transmitted by vertical transmission, and result in infertile sons, detection of related genes is important for azoospermia and severe oligozoospermia patients before starting artificial insemination with the husband's semen and intracytoplasmic sperm injection in order to increase the eugenic birth rate.

[Key words] infertility, male; microdeletion; RBM gene

据估计全世界约有 10% 的育龄夫妇不育, 其中接近半数的原因是精子发生障碍。在排除输精管梗阻、克氏症和其它泌尿生殖系原因后, 无精子症和严重少精子症最有可能的原因就是精子发生基因的异常<sup>[1]</sup>。本研究运用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术探讨男性特发性不育与 RBM (RNA-binding Motif) 基因微缺失的相关性, 现作报道。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 所有患者均来自我院男性不育症门诊, 研究的对象为男性特发性不育患者, 年龄 27~40 岁; 30 例患者均通过临床检查排除阻塞性无精子症或其它泌尿生殖系疾患; 无精子症和严重少精子症 [(2~5) × 10<sup>6</sup>/ml] 患者的精液标本需连续 3 次, 每次间隔 3 周, 随后经 3 天禁欲后获得, 并符合世界卫生组织的诊断标准; 所有患者都有正常的

46XY 核型, 性激素检测正常; 此外, 22 例无精子症患者石蜡包埋的睾丸组织通过病理检查均符合精子发生不完全的诊断。对照组: 30 名正常男性作为对照, 他们均有子女且精子计数 > 4 × 10<sup>7</sup>/ml。基因组 DNA 来自患者和正常生育者的外周血标本, 通过多重聚合酶链反应技术来完成 RBM 基因的检测。

### 1.2 检测方法

1.2.1 外周血细胞 DNA 模板制备 患者组和健康对照组分别抽取静脉血 1 ml, 100 μl 0.5 mmol/L EDTANa<sub>2</sub> 抗凝, 迅速离心 (3 000 r/min, 10 min), 分离血浆和血细胞, 然后去血浆, -80℃ 冰箱保存。有吸烟嗜好者, 抽血前 3 天禁烟。用酚-氯仿提取法抽提 DNA 模板 4℃ 保存备用。

1.2.2 聚合酶链反应引物 RBM1 基因引物由上海生工公司合成, 上游引物序列为: 5' ATGCAC-TTCAGAGATCGC3', 下游引物序列为: 5' CTTTG-AAAACAATTCCTTTTCC3', 扩增 800 bp<sup>[1]</sup> SRY (sex-determining region Y) 基因作为阳性对照, 引物由上海生工公司合成, 上游引物序列为: 5' GAATA-TTCCCGCTCTCCGA3', 下游引物序列为: 5' GCGTGGTGCATTCCTTGAG3', 扩增为 472 bp<sup>[3]</sup>。

[收稿日期] 2004-01-07

[作者单位] 安徽省蚌埠市第三人民医院 1. 泌尿外科, 2. 检验科, 233000

[作者简介] 冀荣俊 (1951-), 男, 安徽蚌埠人, 副主任医师。

1.2.3 两种不同基因 30 $\mu$ l 反应体系中所含的各试剂量 见表 1。表 1 两种不同基因 30 $\mu$ l 反应体系中所含的各试剂量( $\mu$ l)

基因	10 $\times$ buffer	MgCl <sub>2</sub> 25 mmol/L	DNTP 100 mmol/L	引物 1 10 pmol/L	引物 2 10 pmol/L	Taq 酶 5 u/ $\mu$ l	模板 25 ng/ $\mu$ l	无菌 三蒸水
SY14	3	2.5	0.6	4.5	4.5	0.2	1	13.7
YRRM <sub>1</sub>	3	2.5	0.6	4.5	4.5	0.2	1	13.7

1.2.4 两种不同基因的 PCR 扩增条件 基因 SY14、YRRM<sub>1</sub> 均采用预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 终末延伸 72 $^{\circ}$ C 7 min, 循环 35 个。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳法检测扩增片段酶切产物长度多态性, 溴乙锭染色后在紫外线灯下观察结果, 并照相保存。

## 2 结果

30 名正常生育男性标本均可见 SRY、RBM 扩增带, 表明无 RBM 基因缺失; 30 例患者标本中有 4 例无精子症和 2 例严重少精子症见 SRY 扩增带, 但未见 RBM 扩增带, 表明有 RBM 基因缺失。为排除假阳性反应, 对这 6 例标本进行 3 次 PCR 重复检测, 均证实 RBM 微缺失的存在。

## 3 讨论

据世界卫生组织统计: 已婚育龄夫妇中约有 10% 不育, 其中与男性有关的因素约占 50%<sup>[1]</sup>。除输精管道梗阻、炎症、性功能不全等病因外, 精子发生障碍为一个重要的原因, 表现为无精子症或严重少精子症。精子发生(spermatogenesis)是指生精上皮的干细胞发育到成熟精子的一系列变化过程, 其中任何一个环节异常均可导致男性不育。在男性不育症中特发性无精子、少精子症是数量较多、病情较重的一种, 但病因一直不明确。Tiepolo 等<sup>[2]</sup>首次提出 Y 染色体长臂非荧光区域的远侧部分(Yq11.23)存在着控制精子发生的基因或基因族, 称为无精子因子。Ma 等<sup>[3]</sup>用缺失的 DNA 片段作探针, 从 Y 染色体质粒库中分离了一系列质粒, 其中一个探针 Y367 筛选出的质粒 A5F 是限制性内切酶 AseI、Eag、KspI 的聚集位点。用全部的 A5F DNA 作探针探测成人睾丸的 cDNA 库, 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 重组体 33 个阳性被筛选出, 进一步筛选后得到两个 1.9 kB cDNA 克隆 MK5 和 MK29, 对它们进行亚克隆, 测序发现: 它们都编码含 90 个氨基酸 RNA 识别位点的 RNA 结合蛋白。因此 MK5 和 MK29 分别被命名为

RBM<sub>1</sub> 和 RBM<sub>2</sub>。RBM 基因编码 RNA 结合蛋白, 并与常染色体基因 hnRNPG 同源, 仅表达在精原细胞和精母细胞中, 调节 RNA 的过程和翻译。用 Northern Blot 分析发现 RBM<sub>1</sub> 仅在成人睾丸中特异性表达, 睾丸组织原位杂交法表明 RBM<sub>1</sub> 表达局限在生殖细胞, 特别是精原细胞和精母细胞上, Southern Blot 分析表明 RBM<sub>1</sub> 仅在人类和猩猩中存在, 研究同时发现中、日人群中 RBM<sub>2</sub> 基因缺乏, 基于上述特性, 因此认为 RBM<sub>1</sub> 是无精子因子的重要候选成分。RBM<sub>1</sub> 表达的缺失可引起减数分裂障碍, 从而影响单倍体形成, 进而造成男性不育。Kobayashi 等<sup>[4]</sup>报道在核型正常的 63 例无精症中, 3 例有 RBM<sub>1</sub> 的丢失。宋宁宏等<sup>[5]</sup>检测 38 例无精子症和 12 例严重少精子症患者, 发现 2 例无精子症和 1 例少精子症患者有 RBM<sub>1</sub> 的微缺失。本组 RBM<sub>1</sub> 的微缺失率为 20%, 通过检测: (1) 可为原因不明的男性不育症作出病因学上的诊断。通过微缺失的检测, 可以找到精子生成障碍的真正原因, 从而避免一些不必要的药物和手术治疗。目前研究认为, RBM 微缺失患者, 睾丸内找到成熟精子的几率非常渺茫。因此对后者来说, 应明确告诉男性患者: 在卵泡内精子注射治疗过程中对其配偶进行超排卵后有可能在其睾丸内找不到用于 ICSI 治疗的精子。因找不到用于 ICSI 治疗的精子, 对其睾丸反复穿刺或活检可能带来的损害。在这种情况下是否放弃 ICSI 治疗。(2) 目前微缺失的研究还在开始阶段。我们知道精子生成过程可能受到不止一个基因所编码的蛋白质的调控, 这些基因不一定仅仅位于 Y 染色体上; 精子生成过程可能受到多个相关基因的连锁式调控, 而不是由某一个或多个基因分阶段调节, 任何一个环节受到损害均可引起以后的基因表达受损。虽然我们已经检测到有一部分患者是由于 RBM 微缺失而造成的生精障碍, 但是, 本组大部分患者无精子或少精子的原因不清楚。这可能是因为在某些更微小的缺失或点突变, 如是否有 DAZ 基因微缺失或因为某些精子发生相关基因位于所研究的区域之外, 甚至位于常染色体上, 如位于 3 号染色体上的 DAZLA

[文章编号] 1000-2200(2004)05-0402-03

·临床医学·

## 硬膜外麻醉对心率变异性的影响

段思源<sup>1</sup>, 庄心良<sup>2</sup>, 李继昌<sup>2</sup>

[摘要] 目的: 观察硬膜外麻醉对心率变异性(HRV)的影响。方法: 25例ASA I ~ II级择期手术患者, 以硬膜外穿刺部位的高低分为A、B两组; A组15例为中胸段硬膜外麻醉组; B组10例为腰段硬膜外麻醉组。分别测定硬膜外麻醉前后心率变异性的功率谱及心率、血压变化。结果: 中胸段硬膜外麻醉后低频(LF)、平均动脉压(MAP)均显著下降( $P < 0.05$ ), LF值与血压的变化之间存在正相关。腰段硬膜外麻醉对HRV未见明显影响。腰段麻醉10 min后LF、高频(HF)、总功率(TF)、MAP均高于中胸段麻醉( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。结论: 中胸段硬膜外麻醉可影响心率变异性, 使反映交感神经张力的LF值明显下降, 其对心率变异性的影响与麻醉平面有关。

[关键词] 麻醉, 硬膜外; 心率变异性; 心率功率谱

[中国图书资料分类法分类号] R 614.42 [文献标识码] A

### The influence of epidural anesthesia on heart rate variability

DUAN Si-yuan, ZHUANG Xin-liang, LI Ji-chang

(Department of Anesthesiology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Integrated Hospital, Shanghai 200082, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of epidural anesthesia on heart rate variability(HRV). **Methods:** Twenty-five ASA I to II patients scheduled for elective surgery under epidural anesthesia were included in this study. They were divided into two groups according to the segment of epidural block. Group A included 15 patients undergoing cholecystectomy or gastrectomy under epidural anesthesia on middle chest segment and group B included 10 patients undergoing orthopaedics operation on lower limbs under epidural anesthesia on lumbar segment. The Power spectrum of HRV, heart rate and blood pressure(BP) were observed before and after epidural anesthesia. **Results:** The value of low frequency(LF) and BP were markedly reduced 5, 10, 15 and 20 minutes after epidural anesthesia on middle chest segment( $P < 0.05$ ). The value of LF correlated closely with BP( $r = 0.9802$ ,  $P < 0.01$ ). HRV changed little after epidural anesthesia on lumbar segment. **Conclusions:** The epidural anesthesia on middle chest segment has influence on HRV and reduces the value of LF reflecting the tension of the sympathetic nerve, which correlates with the level of epidural block.

[Key words] anesthesia, epidural; heart rate variability; heart rate power spectrum

心率变异性(heart rate variability, HRV)是指逐次心搏间期之间的微小差异, 它产生于心脏自主神经系统对窦房结自律性的调制, 反映了心脏交感神经、迷走神经活动的紧张性和均衡性。本研究通过

对心率变异性的功率谱分析, 观察了硬膜外麻醉对心率变异性的影响, 同时探讨心率变异性功率谱分析技术的临床应用价值。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2000~2001年25例ASA I ~ II级择期手术患者, 以硬膜外穿刺部位的高低分为两组; A组15例, 男5例, 女10例; 年龄(49.6 ±

[收稿日期] 2004-03-12

[作者单位] 1. 上海市中西医结合医院 麻醉科, 200082; 2. 上海市第一人民医院 麻醉科, 200082

[作者简介] 段思源(1964-), 男, 上海人, 主治医师。

基因可能是常染色体隐性遗传男性不育的致病基因。因此本研究有必要再去寻找新的精子发生基因。

### [参考文献]

- [1] Cooke HJ, Hargreave T, Elliott DJ. Understanding the genes involved in spermatogenesis; A progress report[J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(50): 989~995.
- [2] Tiepolo L, Zuffardi D. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm[J]. *Hum Genet*, 1976, 34(2): 119~124.

- [3] Ma K, John D, Page DC, et al. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: Candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis[J]. *Cell*, 1993, 75(7): 1287~1295.
- [4] Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, et al. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients; Evidence for a second locus required for spermatogenesis[J]. *Hum Mol Genet*, 1994, 3(11): 1965~1967.
- [5] 宋宁宏, 吴宏飞, 林敏等. 男性不育症患者RBM、DAZ基因检测的临床意义[J]. *江苏医药*, 2002, 28(12): 881~883.