

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.21.015

卵泡液激素水平和卵泡大小与卵母细胞发育潜能的相关研究^{*}

许鹏宇¹,李冬秀^{1△},程立立¹,张 敏²

1. 河北医科大学第三医院,河北石家庄 050051;2. 白求恩国际和平医院,河北石家庄 050051

摘 要:目的 探讨卵泡液中生殖激素水平和卵泡大小与卵母细胞发育潜能的关系。方法 一对一搜集 48 例行胞浆内单精子注射(ICSI)助孕患者的 636 份卵泡液,测量各卵泡直径[直径 ≥ 18 mm(大卵泡), $14 \sim < 18$ mm(中卵泡), < 14 mm(小卵泡)]并记录,测定卵泡液中促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)、睾酮(T)水平,拆蛋后记录获取的卵母细胞的成熟度[生发泡期(GV)、第一次减数分裂中期(M I)、第二次减数分裂中期(M II)]。对 444 枚 M II 卵行 ICSI 助孕,观察实验室结局。**结果** M II 组 FSH 水平显著高于 GV 组和 M I 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);GV 组 FSH 水平与 M I 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。大卵泡组、中卵泡组和小卵泡组 FSH、LH、E2、T 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。大卵泡组双原核受精率高于小卵泡组和中卵泡组,差异有统计学意义($P < 0.05$);大卵泡组可利用胚胎率高于小卵泡组和中卵泡组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 卵泡液中 FSH、LH、T 水平与卵母细胞成熟度密切相关,直径 ≥ 18 mm 的卵泡获取的 M II 卵发育潜能优于直径 < 18 mm 的卵泡。

关键词:激素; 卵泡液; 直径; 卵母细胞

中图法分类号:R714.8

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)21-2941-04

Correlation of follicular fluid hormone levels and follicle size with oocyte developmental potential^{*}

XU Pengyu¹,LI Dongxiu^{1△},CHENG Lili¹,ZHANG Min²

1. Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050051, China;

2. The Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China

Abstract: Objective To investigate the correlation of follicular fluid hormone levels and follicle size with oocyte developmental potential. **Methods** Follicular fluid of 636 follicles were collected from 48 patients undergoing ICSI treatment and all the follicle size were measured and recorded [diameter ≥ 18 mm(big follicle group), $14 \sim < 18$ mm(middle follicle group), < 14 mm(small follicle group)]. Maturity of the oocytes was recorded[(germinal vesicle, GV), (metaphase I, M I), (metaphase II, M II)] and the concentrations of follicle-stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone(LH), estradiol(E2), testosterone(T) were measured. 444 M II eggs were treatmented with ICSI and laboratory outcomes. **Results** The level of FSH in M II group was significantly higher than that in GV group and M I group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The level of FSH in GV group was significantly higher than that in M I group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the levels of FSH, LH, E2 and T between the large follicle group, the medium follicle group and the small follicle group ($P > 0.05$). The fertilization rate of two pronuclear in large follicle group was higher than that in small follicle group and medium follicle group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The available embryo rate of large follicle group was higher than that of small follicle group and medium follicle group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The concentrations of FSH, LH, T in follicular fluid were closely related to oocyte maturity. The oocyte development potential of M II follicles obtained from the follicles ≥ 18 mm was better than that from the follicles < 18 mm.

Key words: hormone; follicular fluid; diameter; oocytes

卵母细胞的发育和成熟是一个复杂的过程,促卵 睾酮(T)、孕激素(P)、褪黑素等与卵母细胞的生长发
泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)、 育密切相关,为卵母细胞核及胞浆的同步成熟提供内

^{*} 基金项目:河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划(20190623)。

作者简介:许鹏宇,男,副主任医师,主要从事胚胎实验室及生殖男科临床工作研究。 △ 通信作者,E-mail:lidongxiu1976@163.com。

环境的卵泡液至关重要,因此卵泡液及其对卵母细胞的发育成为辅助生殖领域的研究热点^[1-2]。在体外受精胚胎移植过程中胚胎实验室将获得不同成熟度的卵母细胞,尤其在多囊卵巢综合征患者中,未成熟卵母细胞体外成熟培养受到越来越多胚胎学家的重视。但是,目前没有一种未成熟卵体外培养体系能够获得满意的实验室结局。本研究通过测定不同成熟度的卵母细胞卵泡液的生殖激素水平,观察不同卵泡大小来源的第二次减数分裂中期卵(MⅡ)实验室结局,探讨生殖激素和卵泡大小与控制性超促排卵(COH)过程中卵母细胞发育潜能的关系,为完善未成熟卵体外培养体系提供理论依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 7 月至 2016 年 4 月接受胞浆内单精子注射(ICSI)助孕患者作为研究对象。纳入标准:(1)女性年龄 22~35 岁;(2)体重指数(BMI):18~25 kg/m²;(3)基础激素正常;(4)无其他内分泌疾病;(5)因女方输卵管因素或男方因素行 ICSI 助孕;(6)采用《辅助生殖促排卵药物治疗专家共识》里标准的长方案促排卵^[3]。排除标准:(1)高泌乳素血症;(2)多囊卵巢综合征;(3)子宫内膜异位症;(4)甲状腺功能亢进症或甲状腺功能低下症。本研究均经河北医科大学第三医院伦理委员会批准且研究对象签署知情同意书。

1.2 COH 方案 患者排卵后给予皮下注射醋酸曲普瑞林(法国益普生)0.1 mg/d 降调节,至月经第 2 天或第 3 天起检测血清 FSH、LH、E₂、P 及 B 超监测研究对象降调节情况。达到降调节(FSH<5 mIU/mL、LH<5 mIU/mL、E₂<50 pg/mL,子宫内膜厚度<5 mm)标准后开始皮下注射醋酸曲普瑞林 0.05 mg/d 直至人绒毛膜促性腺激素(hCG)日,应用醋酸曲普瑞林至 18 d 时给予促性腺激素(Gn) 75~300 IU/d 直至 hCG 日,根据超声监测的卵泡情况及血清激素水平调整 Gn 用量。当 B 超提示出现 3 个及以上主导卵泡直径≥18 mm 时,肌肉注射绒毛促性腺激素 5 000~10 000 U,36~38 h 后经阴道超声引导下取卵。

1.3 卵泡液标本收集 取卵日,采用单腔取卵针取卵(美国库克)。记录每个穿刺卵泡的直径,一一对应收集研究对象卵泡液,将混有血块或者红细胞污染的卵泡液丢弃。将搜集的无血液污染的卵泡液 200×g 离心 10 min,取上清液 3 mL 置于 5 mL 的 EP 管内,标记后置于-80℃冰箱中保存储备。

1.4 体外受精-胚胎培养 胚胎实验室将获得的每个卵丘复合物单独置于微滴中培养 2~4 h 后拆蛋,观察卵母细胞成熟度。卵泡浆内可见生发泡,卵周间隙未见第一极体为生发泡期(GV);卵胞浆内未见生发泡,卵周间隙未见第一极体为第一次减数分裂中期(M

I);卵周间隙可见第一极体为第二次减数分裂中期(MⅡ)。按卵母细胞成熟度进行分组:GV 组、MⅠ组和 MⅡ组,并根据卵泡直径将 MⅡ卵分为大卵泡组(直径≥18 mm)、中卵泡组(14~<18 mm)和小卵泡组(直径<14 mm)。

对 MⅡ卵行 ICSI,受精后的卵置于卵裂胚培养液做成的微滴中。18~20 h 观察受精情况并记录,观察到两个极体算正常受精。68~70 h 进行卵裂胚评分。卵裂胚评分如下:I 级,碎片<10%,卵裂球均匀;Ⅱ级,碎片 10%~<25%,卵裂球均匀或略不均匀;Ⅲ级,碎片 25%~<50%,卵裂球不均匀;Ⅳ级,碎片 50%~≤100%,卵裂球不均匀。7~9 细胞 I/Ⅱ级胚胎定义为优质胚胎,6~10 细胞Ⅲ级及以上胚胎为可利用胚胎。实验室结局中各组双原核(2PN)受精率、优质胚胎率、可利用胚胎率计算方法如下:2PN 受精率=2PN 卵子数/注射 MⅡ卵子总数×100%,优质胚胎率=优质胚胎数/正常受精胚胎总数×100%,可利用胚胎率=可利用胚胎数/卵裂胚胎数×100%。

1.5 实验室方法 卵泡液中 FSH、LH、E₂、T 水平测定采用化学发光法测定,使用德国罗氏公司的 ELECSYS 试剂,严格按照试剂盒说明书操作。

1.6 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件处理数据。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析对多组均数行显著性检验;计数资料以例数、百分率表示,比较行 χ^2 检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般情况 本研究共纳入 48 例患者作为研究对象,平均年龄为(28.23±3.43)岁,平均体重指数(BMI)为(21.43±1.76)kg/m²,基础 FSH 为(5.94±1.03)mIU/mL,LH 为(4.15±0.84)mIU/mL,E₂ 为(43.60±5.55)pg/mL,T 为(1.06±0.22)nmol/L。穿刺卵泡 688 个,共获卵 636 枚,其中大卵泡获卵 379 枚,中卵泡获卵 143 枚,小卵泡获卵 114 枚。拆蛋后观察卵母细胞成熟度:GV 卵 79 枚,MⅠ卵 113 枚,MⅡ卵 444 枚。将 444 枚 MⅡ卵行 ICSI 治疗,其中小卵泡来源 20 枚,中卵泡来源 69 枚,大卵泡来源 355 枚。

2.2 GV 组、MⅠ组、MⅡ组激素水平比较 MⅡ组 FSH 水平显著高于 GV 组和 MⅠ组,差异有统计学意义($P<0.05$);GV 组 FSH 水平与 MⅠ组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。MⅡ组 LH 水平显著高于 GV 组和 MⅠ组,差异有统计学意义($P<0.05$);GV 组 LH 水平与 MⅠ组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。各组 E₂ 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。MⅡ组 T 水平显著高于 GV 组和 MⅠ组,差异有统计学意义($P<0.05$);GV 组 T 水平与 MⅠ组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3 MⅡ卵各组激素水平比较 大卵泡组、中卵泡组和小卵泡组 FSH、LH、E2、T 水平比较,差异无统

计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 GV 组、MⅠ组、MⅡ组激素水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	E2(pg/mL)	T(nmol/L)
GV 组	5.99±0.78 [*]	0.29±0.09	5 285.43±1 474.24	34.99±2.35
MⅠ组	6.57±1.27	0.30±0.08	5 575.51±1 552.62	34.86±2.58
MⅡ组	6.93±1.37	0.37±0.05	4 967.29±1 143.45	41.78±4.26
<i>F</i>	18.671	96.261	2.362	216.954
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.095	<0.001

注:与 MⅠ组比较,^{*} $P<0.05$ 。

表 2 MⅡ卵各组激素水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	E2(pg/mL)	T(nmol/L)
小卵泡组	6.71±1.47	0.38±0.06	4 466.14±735.22	41.52±3.64
中卵泡组	6.93±1.28	0.38±0.05	5 419.56±1 311.44	41.37±4.39
大卵泡组	6.94±1.39	0.37±0.05	4 907.62±950.98	41.88±4.28
<i>F</i>	0.264	1.247	1.032	0.453
<i>P</i>	0.768	0.289	0.357	0.636

2.4 各组 2PN 受精率、优质胚胎率、可利用胚胎率比较 从受精率看,大卵泡组 2PN 受精率高于小卵泡组和中卵泡组,差异有统计学意义($P<0.05$);而小卵泡组 2PN 受精率与中卵泡组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。大卵泡组可利用胚胎率高于小卵泡组和中卵泡组,差异有统计学意义($P<0.05$);而小卵泡组可利用胚胎率与中卵泡组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。大卵泡组优质胚率略高于小卵泡和中卵泡组,但两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组 2PN 受精率、优质胚胎率、可利用胚胎率比较[%(n/n)]

组别	2PN 受精率	可利用胚胎率	优质胚胎率
小卵泡组	60.0(12/20)	26.7(4/15)	25.0(3/12)
中卵泡组	62.3(43/69)	35.7(20/56)	27.9(12/43)
大卵泡组	92.4(328/355) ^{#*}	63.9(214/335) ^{#*}	34.1(112/328)

注:与小卵泡组比较,[#] $P<0.05$;与中卵泡组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨 论

在卵泡早期 FSH 可以诱发颗粒细胞逐渐产生 LH 受体,随着卵母细胞的发育,颗粒细胞中 LH 受体增多,当卵泡成熟最后阶段,产生的 E2 对 LH 形成正反馈,LH 达峰值,LH 同时促进卵泡膜细胞产生 T,与 FSH 共同促进卵母细胞的成熟^[4]。

FSH、LH 自垂体分泌后经血液运输作用于颗粒细胞及卵泡膜细胞。FSH 在卵泡早期的募集发挥重要作用,随着卵母细胞成熟度的增加,本研究发现,MⅡ组 FSH 水平显著高于 GV 组和 MⅠ组,GV 组

FSH 水平与 MⅠ组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。GV 组 LH 水平与 MⅠ组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但是 MⅡ组 LH 水平显著高于 GV 组和 MⅠ组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这可能是在 LH 峰发生前环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)抑制细胞成熟因子(MPF)的活性,当 LH 水平增加时,卵母细胞内及卵泡内细胞的 cAMP 和 cGMP 急剧降低,对 MPF 的抑制作用减弱从而促使减数分裂继续,促进卵母细胞成熟^[5]。本研究结果显示,不同卵母细胞的卵泡液中 E2 水平并无显著增加,甚至随着卵母细胞成熟度增加略有下降,这可能与卵泡后期卵泡液体积增大对 E2 起到稀释作用有关,WALTERS 等^[6]研究同样发现这一现象。有研究认为左右卵巢的 E2 水平存在显著差异,但是不同卵母细胞之间 E2 水平无显著差异^[7]。本研究还发现,MⅡ组 T 水平显著高于 GV 组和 MⅠ组,这与周易等^[8]研究结果一致。随着卵母细胞的成熟,颗粒细胞 LH 受体的增加,T 的生成增加。T 通过 PI3K/AKT/Foxo3a 信号通路上调起始卵泡中卵母细胞的胰岛素样生长因子-1 受体促进始基卵泡的激活,同时 T 与 FSH 协同作用,增强 cAMP 介导的信号通路活性,从而促进颗粒细胞的增殖和窦前卵泡发育^[9-10]。有研究显示,给予 T 可显著增加窦前和小窦状卵泡的数目,减少了卵泡的闭锁,促进卵泡的发育^[11]。但是过量的 T,会激活缺氧诱导因子 1 促进血管内皮生长因子表达,导致卵巢人血管内皮细胞及平滑肌细胞的增殖,进而导致卵巢胶原纤维合成过度,间质弥漫性增生,抑制排卵^[12-13]。这在多囊卵巢综合征与非多囊卵巢

综合征患者的卵泡液比较中得到验证^[14]。

卵泡大小与卵母细胞成熟度及发育潜能的关系一直存在争议。有学者认为卵母细胞的成熟及卵裂能力与卵泡大小无关^[15],也有学者持相反观点^[16]。本研究发现:大卵泡组、中卵泡组和小卵泡组 FSH、LH、E2、T 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。但是大卵泡组受精率、可利用胚胎率显著高于小、中卵泡组。大卵泡组优质胚率略高于小卵泡和中卵泡组,但两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。国外有学者同样发现卵泡直径大具有更高的胚胎利用率,而随卵泡直径减小,卵母细胞成熟度和受精率降低,胚胎质量下降^[17]。不完全的细胞质成熟可能是造成临床结局差异的原因之一,这也是研究者进行未成熟卵母细胞体外培养成熟(IVM)后行 ICSI 治疗结局不太理想的主要原因。本研究 MⅡ组 FSH、LH、T 水平显著高于其余两组,因此笔者认为在对 GV、MⅠ卵行 IVM 时应适当添加这 3 类激素可以促进卵母细胞的成熟。

综上所述,激素与卵泡的发育成熟密切相关,直径 ≥ 18 mm 的卵泡获取 MⅡ卵行 ICSI 助孕的实验室结局优于直径 <18 mm 的卵泡。在超促排卵获取较大直径的卵泡中,提高卵母细胞细胞核与胞浆成熟的同步化是 IVM 获取优质胚胎的重要因素,对于 IVM 时各种激素的适宜浓度仍需大样本、多中心的研究。

参考文献

- [1] WEN X, LI D, TOZER A J, et al. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2010, 8(1): 117.
- [2] ZHENG M, TONG J, LI W P, et al. Melatonin concentration in follicular fluid is correlated with antral follicle count (AFC) and in vitro fertilization (IVF) outcomes in women undergoing assisted reproductive technology (ART) procedures[J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(5): 446-450.
- [3] 乔杰, 马彩虹, 刘嘉茵, 等. 辅助生殖促排卵药物治疗专家共识[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(4): 211-223.
- [4] SULLIVAN M W, STEWART-AKERS A, KRASNOW J S, et al. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(1): 228-232.
- [5] NORRIS R P, RATZAN W J, FREUDZON M, et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte[J]. Development, 2009, 136(11): 1869-1878.
- [6] WALTERS K A, EID S, EDWARDS M C, et al. Steroid profiles by liquid chromatography-mass spectrometry of matched serum and single dominant ovarian follicular fluid from women undergoing IVF[J]. Reprod Biomed Online, 2019, 38(1): 30-37.
- [7] ROBABEH T, MARZIEH Z, MOHAMMADALI K M, et al. Are intra follicular estradiol and oocytes quality in women undergoing assisted reproductive technology different between the right and left ovaries: an observational study[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019, 235(1): 100047.
- [8] 周易, 赵燕, 田琳, 等. 卵泡液内激素水平与卵母细胞成熟度的关系[J]. 生殖医学杂志, 2011, 20(6): 523-525.
- [9] YANG J L, ZHANG C P, LI L, et al. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis[J]. Endocrinology, 2010, 151(2): 774-782.
- [10] HILLIER S G, TETSUKA M, FRASER H M, et al. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary[J]. Hum Reprod, 1997, 12(1): 107-111.
- [11] RODRIGUES J K, NAVARRO P A, ZELINSKI M B, et al. Direct actions of androgens on the survival, growth and secretion of steroids and anti-Mullerian hormone by individual macaque follicles during three-dimensional culture[J]. Hum Reprod, 2015, 30(3): 664-674.
- [12] PARK C, KIM Y, SHIM M, et al. Hypoxia enhances ligand-occupied androgen receptor activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(2): 319-323.
- [13] SEN A, PRIZANT H, LIGHT A, et al. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(8): 3008-3013.
- [14] LIU G L, LIU S X, XING G L, et al. lncRNA PVT1/MicroRNA-17-5p/PTEN axis regulates secretion of E2 and P4, proliferation, and apoptosis of ovarian granulosa cells in PCOS[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 20(1): 205-216.
- [15] EPPIG J J, WIGGLESWORTH K, O'BRIEN M J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size[J]. J Reprod Fertil, 1992, 95(1): 119-127.
- [16] DURINZI K L, SANIGA EM, LANZENDORF S E. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte[J]. Fertil Steril, 1995, 63(1): 404-406.
- [17] ROSEN M P, SHEN S, DOBSON A T, et al. A quantitative assessment of follicle size oocyte developmental competence[J]. Fertil Steril, 2008, 90(3): 684-690.