

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.04.007

卵母细胞分泌因子在卵巢储备功能减退患者中的表达及对胚胎发育的影响*

程立立¹, 刘少华², 刘珊^{3△}, 许鹏宇¹, 李冬秀¹, 刘松娜¹, 齐丽丽¹

1. 河北医科大学第三医院生殖医学科, 河北石家庄 050000; 2. 邢台医学高等专科学校第一附属医院妇产科, 河北邢台 054000; 3. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院生殖医学中心, 河北石家庄 050000

摘要:目的 分析卵母细胞分泌因子在卵巢储备功能减退(DOR)患者卵丘颗粒细胞(CCs)中的表达情况, 预测不同的促排卵方案对卵母细胞成熟及胚胎发育的影响, 为 DOR 不孕女性寻找更有效的促排卵方案。**方法** 收集接受卵胞浆内单精子显微注射(ICSI)助孕治疗的 80 例 DOR 患者, 425 份 CCs 为研究对象, 其中微刺激方案组 30 例 171 份 CCs, 促性腺激素释放激素拮抗剂(GnRH-A)方案组 30 例 165 份 CCs, PPOS 方案组 20 例 89 份 CCs, 单卵丘颗粒细胞群与卵母细胞一一对应。提取卵母细胞周围 CCs 的 mRNA, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测各组 CCs 中生长分化因子-9(GDF-9)、骨形成蛋白-15(BMP-15)和转化生长因子-β1(TGF-β1)相对表达量。**结果** GnRH-A 方案组中采用促性腺激素(Gn)天数及 Gn 剂量明显多于其余两组($P < 0.05$)。在 3 种促排卵方案中, M II 期 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量高于 M I 和 GV 期; 正常受精组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量高于异常受精组; 优质胚胎组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量高于非优质胚胎组($P < 0.05$); 优质囊胚组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量明显高于非优质囊胚组($P < 0.05$)。在卵母细胞阶段, GnRH-A 方案组 GDF-9、BMP-15 相对表达量明显高于微刺激方案组、PPOS 方案组($P < 0.05$); 微刺激方案组 BMP-15 相对表达量明显低于 PPOS 方案组($P < 0.05$); 其余各组间 GDF-9、BMP-15、TGF-β1 相对表达量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** GnRH-A 方案可能增加采用 Gn 天数及 Gn 剂量, GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 可作为评估 DOR 患者卵母细胞成熟度及其发育潜能的客观指标, 对于高龄 DOR 患者, 微刺激方案、GnRH-A 方案和 PPOS 方案均可选择。

关键词: 卵母细胞分泌因子; 卵丘颗粒细胞; 卵巢储备功能减退; 成熟; 发育; 控制性卵巢刺激
中图分类号: R446.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2023)04-0460-07

Expression of oocyte secreted factor and its relationship with embryonic development in patients with diminished ovarian reserve*

CHENG Lili¹, LIU Shaohua², LIU Shan^{3△}, XU Pengyu¹, LI Dongxiu¹, LIU Songna¹, QI Lili¹

1. Department of Reproductive Medicine, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai, Hebei 054000, China; 3. Center of Reproductive Medicine, the 980th Hospital of the PLA Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Abstract: Objective To analyze the expression of oocyte secretion factor in cumulus granulosa cells (CCs) of patients with diminished ovarian reserve (DOR), to predict the influence of different ovulation induction schemes on oocyte maturation and embryo development, and to find more effective ovulation induction schemes for infertile women with DOR. **Methods** A total of 425 CCs samples were collected from 80 DOR patients who received Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) as pregnancy aid treatment, including 171 CCs samples from 30 patients treated with microstimulation (microstimulation group), 165 CCs samples from 30 patients treated with antagonist (GnRH-A group), and 89 CCs samples from 20 patients treated with PPOS (PPOS group). The monozygotic granulosa cell populations were one-to-one corresponding to oocytes. The mRNA of CCs around oocytes was extracted. The relative expression levels of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in each

* 基金项目: 河北省卫生健康委员会立项青年科技课题(20210330)。

作者简介: 程立立, 女, 主治医师, 主要从事卵母细胞分泌因子对胚胎发育潜能影响的研究。△ 通信作者, E-mail: liushan6016515@163.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1167.R.20230201.1723.002.html\(2023-02-02\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1167.R.20230201.1723.002.html(2023-02-02))

group of CCs were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, then compared.

Results The days and dose of Gn in GnRH-A group were significantly higher than those in other two groups ($P < 0.05$). The relative expression levels of GDF-9, BMP-15 and TGF- β 1 in the M II stage were higher than those in the M I and GV stages. The relative expression levels of GDF-9, BMP-15 and TGF- β 1 in normal fertilization group were significant higher than those in abnormal fertilization group ($P < 0.05$). The relative expression levels of GDF-9, BMP-15 and TGF- β 1 in high-quality embryo group were significant higher than those in non-high-quality embryo group ($P < 0.05$). The relative expression levels of GDF-9, BMP-15 and TGF- β 1 in high quality blastocyst group were significant higher than those in non-high quality blastocyst group ($P < 0.05$). The relative expression levels of GDF-9 and BMP-15 in GnRH-A group were significant higher than those in micro-stimulus group and PPOS group ($P < 0.05$). The relative expression level of BMP-15 in micro stimulation group was significantly lower than that in PPOS group ($P < 0.05$). There was no significant difference on the relative expression levels of GDF-9, BMP-15 and TGF- β 1 among other groups ($P > 0.05$). **Conclusion** GnRH-A regimen may increase the number of days and dose of Gn. GDF-9, BMP-15 and TGF- β 1 could be used as objective indicators to evaluate oocyte maturity and developmental potential in patients with DOR. For elderly DOR patients, microstimulation regimen, GnRH-A regimen and PPOS regimen could be selected.

Key words: oocyte secretory factor; cumulus granulosa cells; diminished ovarian reserve; mature; development; controlled ovarian stimulation

目前,晚婚晚育已成为社会常态,特别是我国生育政策放开后,高龄夫妇要求再生育的比例明显增加,不孕症的发生率更高^[1]。高龄女性卵巢储备功能下降,需要借助辅助生殖技术实现妊娠,但是其取卵数及可利用胚胎数大大减少,临床妊娠率较低^[2]。如何改善高龄不孕女性助孕治疗结局是目前临床研究的热点。对于卵巢低储备功能患者主要以促性腺激素释放激素拮抗剂(GnRH-A)方案、微刺激方案及高孕激素状态下促排卵(PPOS)方案为主要促排卵方案,但哪种方案效果更优仍存在争议,而且从卵母细胞成熟度方面对这3种方案进行比较,国内外鲜有研究。因此,本研究通过分析卵母细胞分泌因子在卵丘颗粒细胞(CCs)中的表达情况,预测不同的促排卵方案对卵母细胞成熟度及胚胎发育潜能的影响,为高龄不孕女性寻找更有效的促排卵方案,实现获卵最大化及寻找胚胎移植机会提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2019年1月至2021年10月于中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院生殖医学中心行卵胞浆内单精子显微注射(ICSI)助孕治疗的高龄(本研究定义为年龄 ≥ 38 岁)DOR患者为研究对象。纳入标准:(1)年龄 ≥ 38 岁;(2)符合卵巢低反应的标准^[3],①抗苗勒氏管激素(AMH)为0.5~1.1 ng/mL或者促卵泡激素(FSH)/促黄体生成素(LH) > 3.6 ;②双侧卵巢窦卵泡数(AFC)5~7个;③既往有卵巢储备功能减退(DOR)或卵巢早衰(POF)病史,常规刺激方案获卵数 ≤ 3 个。满足以上3项中任意2项即为DOR。排除标准:(1)夫妇双方或一方存在染色体异常;(2)合并各种内分泌代谢疾病,如甲状腺功能亢进症或甲状腺功能减退症、糖尿病、高泌

乳素血症、多囊卵巢综合征等。本研究共纳入80例患者425份CCs。

1.2 促排卵方法

1.2.1 分组 根据促排卵方案,随机分为PPOS方案组(20例89份CCs)、GnRH-A方案组(30例165份CCs)及微刺激方案组(30例171份CCs)。另外根据卵母细胞成熟情况,将卵母细胞分为GV期、M I期及M II期,M II期根据受精情况分为正常受精组及异常受精组;正常受精组继续培养至第3日,根据胚胎情况分为优质胚胎组及非优质胚胎组;非优质卵裂胚继续培养至第5日或第6日囊胚期,分为优质囊胚组及非优质囊胚组。

1.2.2 促排卵方案 微刺激方案:月经第2天或第3天开始给予来曲唑(LE,江苏恒瑞医药集团有限公司)2.5 mg/d或氯米芬(CC)100 mg/d口服,同时给予注射用尿促性素(HMG,广州丽珠集团股份有限公司),起始剂量为75~150 IU/d,5 d后停用LE或CC,根据患者卵泡大小和激素水平来调整促性腺激素(Gn)剂量,当卵泡直径为12~14 mm或血清LH水平 > 5 IU/L,皮下注射醋酸西曲瑞克(思则凯,默克雪兰诺有限公司,瑞士)0.25 mg,每天1次,直至注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)日。

GnRH-A方案:于月经第2天或第3天开始,给予注射用重组人促卵泡素(果纳芬,默克雪兰诺有限公司,瑞士),起始剂量为150~300 IU/d,根据卵泡大小及激素水平适时调整Gn剂量,当卵泡直径为12~14 mm,和(或)雌二醇(E₂)水平超过400 pg/mL,和(或)LH > 5 IU/L时,加用醋酸西曲瑞克(思则凯,默克雪兰诺有限公司,瑞士)0.25 mg/d,直至注射HCG日。

PPOS方案组:月经第2~3天,B超提示卵泡直

径 ≤ 7 mm,开始使用地屈孕酮(达芙通,雅培制药有限公司,美国)20 mg/d,同时应用 HMG(广州丽珠集团股份有限公司)150~300 IU/d,根据患者激素水平及卵泡发育情况来调整 Gn 剂量,直至注射 HCG 日。

当双侧卵巢中直径 ≥ 18 mm 的卵泡数是直径 ≥ 14 mm 的卵泡数的 60%~70%,每个卵泡的平均 E_2 水平为 200~300 pg/mL 时进行扳机,于扳机后 36~38 h 进行经阴道 B 超引导下取卵术。

1.2.3 观察指标 取卵后 4~6 h 采用机械法剥离单个卵子周围的 CCs,使卵母细胞与单卵丘颗粒细胞群一一对应。观察 GV、M I、M II 期卵母细胞中生长分化因子-9(GDF-9)、骨形成蛋白-15(BMP-15)和转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的相对表达量;所有的成熟卵母细胞均采用 ICSI 授精,并连续观察受精、卵裂及囊胚形成情况。2PN 为正常受精,其余为异常受精。本中心优质胚胎的评分标准^[4]:卵裂球 7~9 个、排列规则、碎片 $\leq 20\%$ 。Gardner 囊胚评分系统标准: ≥ 4 AA、4AB、4BA、4BB 的囊胚为优质囊胚。

1.3 卵母细胞分泌因子检测方法

1.3.1 CCs 中 RNA 提取及反转录反应 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 的 mRNA 提取方法按照 Trizol

进行。提取的 RNA 采用琼脂糖凝胶电泳判定是否合格,然后按照反转录反应试剂盒(普洛麦格生物技术有限公司)说明书进行反转录,反应条件如下:70 °C 10 min,42 °C 50 min,95 °C 5 min。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 的 mRNA 表达量检测,按照 Quanti-Fast[®] SYBR[®] Green 试剂盒(德国 Qiagen Rotor-Gene Q)说明书进行检测并收集数据:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。将所得的 Ct 值按照公式 $2^{-\Delta Ct}$ 进行计算。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组患者基线资料比较 3 组患者年龄、不孕年限及卵巢功能指标等基线资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。GnRH-A 方案组采用 Gn 天数及 Gn 剂量明显多于微刺激方案组和 PPOS 方案组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

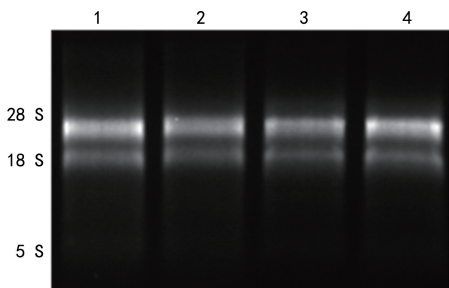
表 1 3 组患者基线资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄(岁)	不孕年限(年)	AMH(ng/mL)	AFC(个)	bFSH(mIU/mL)
微刺激方案组	30	39.70 \pm 1.75	7.18 \pm 4.58	0.79 \pm 0.32	5.63 \pm 1.43	11.45 \pm 2.63
PPOS 方案组	20	39.90 \pm 1.65	6.83 \pm 4.55	0.82 \pm 0.41	5.50 \pm 1.24	11.92 \pm 2.63
GnRH-A 方案组	30	39.10 \pm 1.30	6.78 \pm 4.46	0.81 \pm 0.35	5.85 \pm 1.60	11.31 \pm 3.10
P		0.164	0.998	0.954	0.382	0.754

组别	n	bLH(mIU/mL)	bE ₂ (pg/mL)	采用 Gn 天数(d)	Gn 剂量(IU)
微刺激方案组	30	4.99 \pm 1.13	61.77 \pm 13.88	9.55 \pm 0.89	2 077.50 \pm 153.23
PPOS 方案组	20	4.62 \pm 0.78	71.29 \pm 17.20	9.50 \pm 1.05	2 061.25 \pm 152.06
GnRH-A 方案组	30	4.64 \pm 1.03	70.03 \pm 18.90	10.16 \pm 0.91 ^{ab}	2 232.50 \pm 168.94 ^{ab}
P		0.419	0.157	0.024	<0.001

注:与微刺激方案组比较,^a $P < 0.05$;与 PPOS 方案组比较,^b $P < 0.05$;bFSH 为基础促卵泡生成素;bLH 为基础黄体生成素;bE₂ 为基础雌二醇。

2.2 总 RNA 检测 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 结果显示,提取的 RNA 完整性及纯度均较高,符合实验条件,见图 1。



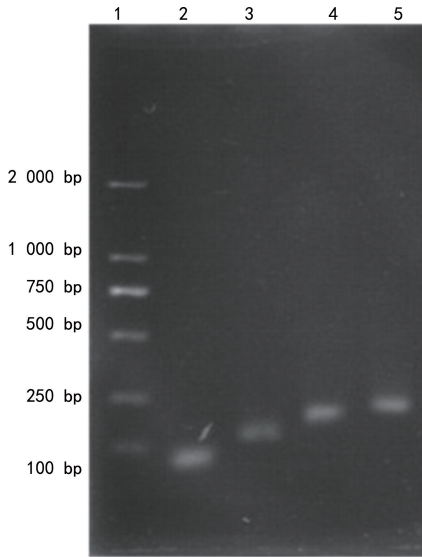
注:1、2 泳道为成熟卵母细胞 RNA;3、4 泳道为未成熟卵母细胞 RNA。

图 1 琼脂糖凝胶电泳 RNA 检测结果

2.3 聚合酶链反应产物凝胶电泳检测结果 聚合酶链反应产物通过电泳检测验证可见电泳条带清晰单一,见图 2。

2.4 微刺激方案组中 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 的相对表达量 在微刺激促排卵方案组中,M II 期的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 相对表达量明显高于 M I 期,差异有统计学意义($P = 0.037$ 、 $P = 0.046$ 、 $P < 0.001$);M I 期 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 相对表达量明显高于 GV 期,差异有统计学意义($P = 0.046$ 、 $P < 0.001$ 、 $P = 0.035$);正常受精组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 相对表达量明显高于异常受精组,差异有统计学意义($P = 0.001$ 、 $P = 0.012$ 、 $P = 0.048$);优质胚胎组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- $\beta 1$ 相

对表达量均明显高于非优质胚胎组,差异有统计学意义($P=0.007$ 、 $P=0.015$ 、 $P=0.003$);优质囊胚组 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于非优质囊胚组,差异有统计学意义($P=0.048$ 、 $P=0.040$ 、 $P=0.037$)。见表 2。



注:1~5 泳道分别为 100 bp DNA ladder、TGF- β 1、核糖体蛋白 L/P(RDL-19)、BMP-15、GDF-9。

图 2 PCR 扩增产物的电泳检测结果

表 2 微刺激方案组中 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

期/组别	n	GDF-9	BMP-15	TGF- β 1
GV 期	13	0.012 \pm 0.003	0.063 \pm 0.025	0.070 \pm 0.017
M I 期	24	0.014 \pm 0.004 ^{ab}	0.066 \pm 0.013 ^{ab}	0.079 \pm 0.033 ^{ab}
M II 期	134	0.015 \pm 0.003	0.074 \pm 0.023	0.091 \pm 0.019
正常受精组	98	0.013 \pm 0.003 ^c	0.075 \pm 0.025 ^c	0.093 \pm 0.020 ^c
异常受精组	36	0.011 \pm 0.002	0.071 \pm 0.015	0.084 \pm 0.014
优质胚胎组	42	0.014 \pm 0.003 ^d	0.092 \pm 0.024 ^d	0.096 \pm 0.025 ^d
非优质胚胎组	56	0.013 \pm 0.003	0.063 \pm 0.016	0.091 \pm 0.016
优质囊胚组	14	0.015 \pm 0.002 ^e	0.077 \pm 0.018 ^e	0.095 \pm 0.022 ^e
非优质囊胚组	42	0.012 \pm 0.003	0.058 \pm 0.013	0.089 \pm 0.014

注:与 GV 期比较,^a $P<0.05$;与 M II 期比较,^b $P<0.05$;与异常受精组比较,^c $P<0.05$;与非优质胚胎组比较,^d $P<0.05$;与非优质囊胚组比较,^e $P<0.05$ 。

2.5 GnRH-A 方案组中 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 的相对表达量 在 GnRH-A 方案组中, M II 期的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于 M I 期,差异有统计学意义($P=0.029$ 、 $P=0.025$ 、 $P=0.049$), M I 期 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于 GV 期,差异有统计学意义($P=0.014$ 、 $P=0.038$ 、 $P=0.043$);正常受精组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于异常受精组,差异有统计学意义($P=0.036$ 、 $P=0.034$ 、 $P=0.044$);优质胚胎组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于非优质胚胎组,差异有统计学意义

($P=0.014$ 、 $P=0.002$ 、 $P<0.001$);优质囊胚组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于非优质囊胚组,差异有统计学意义($P=0.029$ 、 $P=0.049$ 、 $P=0.045$)。见表 3。

表 3 GnRH-A 方案组中 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

期/组别	n	GDF-9	BMP-15	TGF- β 1
GV 期	16	0.009 \pm 0.001	0.115 \pm 0.016	0.057 \pm 0.009
M I 期	22	0.012 \pm 0.003 ^{ab}	0.124 \pm 0.023 ^{ab}	0.075 \pm 0.016 ^{ab}
M II 期	127	0.016 \pm 0.004	0.136 \pm 0.037	0.089 \pm 0.023
正常受精组	95	0.018 \pm 0.003 ^c	0.140 \pm 0.039 ^c	0.091 \pm 0.025 ^c
异常受精组	32	0.011 \pm 0.002	0.121 \pm 0.028	0.084 \pm 0.018
优质胚胎组	43	0.019 \pm 0.002 ^d	0.161 \pm 0.026 ^d	0.101 \pm 0.029 ^d
非优质胚胎组	52	0.017 \pm 0.003	0.123 \pm 0.040	0.083 \pm 0.016
优质囊胚组	12	0.019 \pm 0.002 ^e	0.167 \pm 0.024 ^e	0.095 \pm 0.019 ^e
非优质囊胚组	40	0.016 \pm 0.003	0.110 \pm 0.034	0.079 \pm 0.013

注:与 GV 期比较,^a $P<0.05$;与 M II 期比较,^b $P<0.05$;与异常受精组比较,^c $P<0.05$;与非优质胚胎组比较,^d $P<0.05$;与非优质囊胚组比较,^e $P<0.05$ 。

2.6 PPOS 方案组中 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 的相对表达量 在 PPOS 方案组中, M II 期的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于 M I 期,差异有统计学意义($P=0.016$ 、 $P=0.049$ 、 $P=0.023$), M I 期的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于 GV 期,差异有统计学意义($P=0.026$ 、 $P=0.044$ 、 $P=0.044$);正常受精组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于异常受精组,差异有统计学意义($P=0.028$ 、 $P=0.024$ 、 $P=0.036$);优质胚胎组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于非优质胚胎组,差异有统计学意义($P=0.026$ 、 $P=0.040$ 、 $P<0.001$);优质囊胚组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 相对表达量明显高于非优质囊胚组,差异有统计学意义($P=0.016$ 、 $P=0.037$ 、 $P=0.039$)。见表 4。

表 4 PPOS 方案组中 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

期/组别	n	GDF-9	BMP-15	TGF- β 1
GV 期	9	0.009 \pm 0.001	0.065 \pm 0.027	0.073 \pm 0.004
M I 期	12	0.011 \pm 0.002 ^{ab}	0.077 \pm 0.018 ^{ab}	0.085 \pm 0.013 ^{ab}
M II 期	68	0.013 \pm 0.003	0.095 \pm 0.027	0.094 \pm 0.025
正常受精组	48	0.014 \pm 0.003 ^c	0.101 \pm 0.029 ^c	0.099 \pm 0.027 ^c
异常受精组	20	0.013 \pm 0.002	0.082 \pm 0.017	0.083 \pm 0.017
优质胚胎组	23	0.015 \pm 0.003 ^d	0.116 \pm 0.021 ^d	0.107 \pm 0.033 ^d
非优质胚胎组	25	0.013 \pm 0.004	0.087 \pm 0.028	0.091 \pm 0.017
优质囊胚组	6	0.017 \pm 0.002 ^e	0.106 \pm 0.017 ^e	0.099 \pm 0.027 ^e
非优质囊胚组	19	0.012 \pm 0.003	0.081 \pm 0.028	0.089 \pm 0.013

注:与 GV 期比较,^a $P<0.05$;与 M II 期比较,^b $P<0.05$;与异常受精组比较,^c $P<0.05$;与非优质胚胎组比较,^d $P<0.05$;与非优质囊胚组比较,^e $P<0.05$ 。

2.7 3组在卵母细胞阶段 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 的相对表达量比较 GnRH-A 方案组 GDF-9、BMP-15 相对表达量明显高于微刺激方案组、PPOS 方案组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 微刺激方案组 BMP-15 相对表达量明显低于 PPOS 方案组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其余各组间 GDF-9、BMP-15、TGF-β1 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 3组在卵母细胞阶段 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GDF-9	BMP-15	TGF-β1
微刺激方案组	171	0.014±0.003	0.072±0.022 ^b	0.087±0.022
GnRH-A 方案组	165	0.015±0.004 ^{ab}	0.132±0.034 ^{ab}	0.084±0.024
PPOS 方案组	89	0.013±0.003	0.090±0.028	0.091±0.024
P		<0.001	<0.001	0.111

注:与微刺激方案组比较,^a $P < 0.05$;与 PPOS 方案组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨 论

DOR 是一种以卵巢内可募集的 AFC 减少和(或)卵母细胞质量下降, 导致配子生成功能下降, 生育力低下的生殖内分泌疾病^[5]。DOR 病因众多, 即使经过全面评估, 病因仍不明确, 主要与遗传、年龄、自身免疫性疾病、感染性疾病、社会环境及心理等多种因素有关^[6]。辅助生殖技术是 DOR 患者在有限的时间内尽快实现生育的重要辅助治疗手段, 在生殖医学领域备受关注。目前, 如何更有效地预测胚胎的发育潜能, 为 DOR 患者选择个体化的促排卵方案, 在最短的时间内最大限度增加获卵数及优质胚胎数是生殖医学领域迫切需要解决的难题之一。

CCs 紧紧包绕在卵母细胞周围, 与卵母细胞关系最为紧密, 对卵母细胞的生长、发育、成熟、受精发挥至关重要的作用。CCs 和卵母细胞通过缝隙连接进行双向交换, CCs 为卵母细胞成熟及发育提供必需的营养物质, 促进卵母细胞成熟、排卵及随后的胚胎发育, 提高卵母细胞质量。同时卵母细胞调控 CCs 的细胞外基质合成及细胞分化, 并积极调节 CCs 的功能, 从而控制复杂的 CCs 微环境。CCs 基因的表达谱因卵母细胞成熟的阶段不同而不同。

本研究选取 CCs 作为研究载体, 可以使 CCs 与卵母细胞一一对应, 较壁层颗粒细胞及卵泡液有更高的同源性、特异性及较低的污染率^[7-8], 研究结果更加精确。本研究首次对高龄患者的单卵丘颗粒细胞群进行研究, 采用实时荧光定量聚合酶链反应来定量检测卵母细胞分泌因子 GDF-9、BMP-15 及 TGF-β1 的相对表达量。

卵母细胞的发育潜能包括恢复第 1 次减数分裂; 受精后能够正常卵裂; 能够发育至囊胚期; 能足月活产; 子代健康^[9]。卵母细胞成熟度包含卵母细胞核成

熟和细胞质成熟, 只有细胞质和细胞核同步成熟, 卵母细胞才能成熟, 并完成受精及后续的胚胎发育^[10]。

本研究对高龄患者的胚胎从卵母细胞到囊胚形成阶段进行连续性研究, 且能做到和单卵丘颗粒细胞群一一对应进行观察及检测, 使结果更客观、更精确, 从而为胚胎学医生选择优质卵母细胞提供更有价值的参考, 更好地预测卵母细胞的发育潜能。

本课题组最近一项研究显示, 在年龄 < 35 岁患者中, 卵母细胞分泌因子可作为评价卵母细胞质量、预测卵母细胞发育潜能的客观指标^[11]。但是卵母细胞分泌因子在高龄患者中的相对表达量, 以及其对卵母细胞成熟度及其胚胎发育潜能的连续性研究鲜有报道。

本研究结果显示, 在 3 种促排卵方案中, M II 期 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 的相对表达量高于 M I 期和 GV 期; 正常受精组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量高于异常受精组 ($P < 0.05$); 优质胚胎组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量高于非优质胚胎组 ($P < 0.05$); 优质囊胚组的 GDF-9、BMP-15 和 TGF-β1 相对表达量明显高于非优质囊胚组 ($P < 0.05$)。由此可以看出, 上述 3 种卵母细胞分泌因子可作为高龄 DOR 患者评估卵母细胞质量、预测卵母细胞发育潜能的客观指标。

随着国家生育政策的实施, 尤其是“三孩”政策的放开, 高龄生育人群越来越多, DOR 患者在生育人群中所占的比例也越来越高, 其在辅助生殖过程中, 存在 Gn 用量大, 药物反应差, 获卵少, 胚胎质量差等问题^[12]。虽然各种促排卵方案均可用于 DOR 患者, 但是对于 DOR 患者人群而言, 需要减少促排卵时间、提高胚胎质量, 增加优质胚胎数, 在最短的时间实现活产。降调节方案可能导致卵巢过度抑制, 致使促排时间长, Gn 用量大、花费较高、再次取卵等待时间长等问题。GnRH-A 方案和微刺激方案虽然解决了卵巢过度抑制的问题, 且卵巢过度刺激综合征的发生率低, 但微刺激方案早发 LH 峰导致的周期取消率高, 新鲜周期移植率低, 取卵周期次数增加, 同时早期 LH 升高还可能会影响卵子质量^[13], 使可利用胚胎数减少, 延长妊娠时间; GnRH-A 方案可以迅速抑制 LH 升高的问题, 防止卵泡提早黄素化或排卵, 降低周期取消率, 但 DOR 患者更易引发突发 LH 峰, 同时伴有 E₂ 水平降低, 易造成非预期的排卵, 使周期取消率增加, 需要及时识别突发的 LH 峰, 及早处理。同时, 拮抗剂的添加可导致 FSH 及 LH 的迅速下降, 致使卵泡发育变慢, 雌激素水平下降, 可能增加 Gn 用量和采用 Gn 天数, 使周期花费稍微增高。PPOS 方案能够有效预防早发 LH 峰, 降低周期取消率, 而且具有 Gn 周期短、费用低、用药方便等优点, 近年来被广泛应用于 DOR 患者。沈秀等^[14]将 PPOS 方案应用于 FSH 升高的 DOR 患者, 结果发现其能有效抑制 LH 峰, 提

高优质胚胎率。最近的研究也表明, PPOS 方案较超短方案及微刺激方案, 能够有效抑制早发 LH 峰, 而且卵泡数量、卵子质量、可利用胚胎数及优质胚胎数更多^[15-16]。但 PPOS 方案使卵泡在发育过程中始终处于高孕激素状态, 过早使孕酮作用于子宫内膜, 导致胚胎发育和子宫内膜容受性之间的同步中断, 影响卵泡与子宫内膜的同步化, 需要全胚冷冻和延迟移植^[17-18]。因此, 寻找合适的促排卵方案, 尽快获取高质量的卵子和优质胚胎是改善 DOR 患者辅助生殖临床结局的关键。

本研究分析了高龄不孕患者的卵母细胞分泌因子相对表达量, 且在不同促排卵方案之间进行比较, 以期找到更适合高龄 DOR 患者的促排卵方案。本研究按促排卵方案分为微刺激方案组、GnRH-A 方案组和 PPOS 方案组。TGF- β 1 的相对表达量在不同促排卵方案组中比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 GDF-9 及 BMP-15 在不同促排卵方案组中比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但 GnRH-A 方案组采用 Gn 天数及 Gn 剂量明显多于其余两组 ($P < 0.05$)。笔者认为不同的促排卵方案可能影响卵母细胞分泌因子的表达情况, 从而影响卵母细胞的成熟度及其后续胚胎的发育潜能, 与妊娠结局密切相关。

本研究的不足之处: 样本量较少, 分析结果可能存在一定的偏倚, 还需要开展大样本、多中心研究; 本研究因大多数患者未进行胚胎移植, 因此未进行临床妊娠结局的比较, 在以后的临床工作中, 本课题组会继续跟踪观察这些患者的妊娠情况; 目前, 这 3 种方案对于年龄 < 35 岁, 卵巢储备功能正常患者的应用也越来越普遍, 因本中心对于卵巢储备功能正常的患者应用 PPOS 方案较晚, 本研究未与年龄较小、卵巢储备功能正常的患者进行比较, 后续本课题组会进行深入研究。

综上所述, 卵母细胞分泌因子 GDF-9、BMP-15 和 TGF- β 1 的相对表达量可以作为评价卵母细胞成熟度和发育潜能的客观指标, 为高龄患者提高妊娠率提供理论基础。对于 DOR 患者, GnRH-A 方案可以有效抑制 LH 峰, 降低周期取消率, 但 Gn 用量增加, 周期花费较高; 微刺激方案采用 Gn 天数更少、Gn 用量低, 对卵巢刺激小, 但易出现早发 LH 峰, 周期取消率高; PPOS 方案能有效抑制 LH 峰, Gn 用量少、花费较少, 但因孕激素过早作用于子宫内膜, 使卵泡发育和子宫内膜发育不同步, 不能行新鲜周期移植, 需行全胚冷冻。因此, 临床可根据 DOR 患者具体情况进行个体化的治疗, 选择更合适的方案。

参考文献

[1] ZHOU Z, ZHENG D, WU H, et al. Epidemiology of infertility in China: a population-based study[J]. BJOG, 2018, 125(4): 432-441.

[2] TANAKA Y, HSUEH A J, KAWAMURA K, et al. Surgical approaches of drug free in vitro activation and laparoscopic ovarian incision to treat patients with ovarian infertility[J]. Fertil Steril, 2020, 114(6): 1355-1357.

[3] FERRARETTI A P, LA MARCA A, FAUSER B C, et al.ESHRE consensus on the definition of "poor response" to ovarian stimulation for in vitro fertilization; the Bologna criteria [J]. Hum Reprod, 2011, 26(7): 1616-1624.

[4] GARDNER D K, LANE M, STEVENS J, et al. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability [J]. Fertil Steril, 2003, 79(2): 407-410.

[5] JAILLARD S, SREENIVASAN R, BEAUMONT M, et al. Analysis of NR5A1 in 142 patients with premature ovarian insufficiency, diminished ovarian reserve, or unexplained infertility [J]. Maturitas, 2020, 131: 78-86.

[6] LEE D Y, KIM J Y, YU J, et al. Prediction of successful ovarian protection using gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy in young estrogen receptor-negative breast cancer patients [J]. Front Oncol, 2020, 16, 10: 863.

[7] KENIGSBERG S, BENTOV Y, CHALIFA-CASPI V, et al. Gene expression microarray profiles of cumulus cells in lean and overweight obese polycystic ovary syndrome patients [J]. Mol Hum Reprod, 2009, 15(2): 89-103.

[8] LI R, NORMAN R J, ARMSTRONG D T, et al. Oocyte-secreted factor (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells [J]. Biol Reprod, 2000, 63(3): 839-845.

[9] DEMIRAY S B, GOKER E N, TAVMERGEN E, et al. Differential gene expression analysis of human cumulus cells [J]. Clin Exp Reprod Med, 2019, 46(2): 76-86.

[10] TURATHUM B, GAO E M, CHIAN R C. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization [J]. Cells, 2021, 10(9): 2292.

[11] 吴小华, 程立立, 张敏, 等. 卵母细胞分泌因子在人卵丘颗粒细胞中的表达及其与卵母细胞发育潜能的关系 [J]. 生殖与避孕, 2016, 36(9): 701-707.

[12] ZHANG J, QIU X, GUI Y, et al. Dehydroepiandrosterone improves the ovarian reserve of woman with diminished ovarian reserve and is a potential regulator of the immune response in the ovaries [J]. Biosci Trends, 2015, 9(6): 350-359.

[13] MASSIN N. New stimulation regimens: endogenous and exogenous progesterone use to block the LH surge during ovarian stimulation for IVF [J]. Hum Reprod Update, 2017, 23(2): 211-220.

[14] 沈秀, 李颂军, 周睿, 等. 高孕激素下促排卵方案用于 FSH 升高 DOR 患者的临床效果观察 [J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(4): 351-356.

[15] MU Z, SA Y, SUN Z, et al. Ovulation induction with high progesterone levels may be more suitable for elderly patients with low ovarian response [J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2021, 50(2): 101661. (下转第 469 页)

参考文献

[1] 黎瑶,陈新云,卢聪,等. 二维斑点追踪成像评价冠状动脉慢血流患者左心室收缩同步性[J]. 中国医学影像学杂志, 2022, 30(10):1013-1019.

[2] HENEIN M Y, VANCHERI F. Defining coronary slow flow[J]. *Angiology*, 2021, 72(9):805-807.

[3] 孙理华,幸世峰,张颖,等. 冠状动脉慢血流疾病转录组学研究及差异基因验证[J]. 中华心血管病杂志, 2021, 49(12):1206-1212.

[4] 张强,张莹,赵雪燕,等. 冠状动脉慢血流现象危险因素分析研究[J]. 心肺血管病杂志, 2021, 40(2):143-146.

[5] TURHAN G, SAYDAM G S, ERBAY A R, et al. Increased plasma soluble adhesion molecules; ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin levels in patients with slow coronary flow[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 108(2):224-230.

[6] 夏浩,严金川. 中性粒细胞胞外诱捕网与心肌缺血再灌注的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2021, 49(2):188-192.

[7] 崔佳佳,金卫东,韩明磊,等. 纤维蛋白原/清蛋白比值与急性心肌梗死患者介入治疗术后支架内再狭窄的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(11):1099-1103.

[8] 陈曦,江珊. 中性粒细胞百分比与清蛋白比值与冠状动脉狭窄程度的相关性[J]. 临床荟萃, 2022, 37(1):26-29.

[9] 董磊,樊泽元. 中性粒细胞百分比/清蛋白比值(NPAR)对冠状动脉支架内再狭窄的预测价值[J]. 吉林医学, 2020, 41(11):2565-2567.

[10] CUI H, DING X, LI W, et al. The neutrophil percentage to albumin ratio as a new predictor of in-hospital mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:7845-7852.

[11] LIN Y, LIN Y H, YUE J Q, et al. The neutrophil percentage-to-albumin ratio is associated with all-cause mortality in critically ill patients with acute myocardial infarction[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22(1):115.

[12] GIBSON C M, CANNON C P, DALEY W L, et al. TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow[J]. *Circulation*, 1996, 93(5):879-888.

[13] ACIKSARI G, CETINKAL G, KOCAK M, et al. The relationship between triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio and coronary slow-flow phenomenon[J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2022, 38(1):5-13.

[14] 李光源,蔡秋雨,马春燕,等. 超声心动图评价运动负荷对冠状动脉慢血流患者左心室功能的影响[J]. 中华超声影像学杂志, 2019, 28(5):387-391.

[15] LI J J, QIN X W, LI Z C, et al. Increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 concentrations in patients with slow coronary flow[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 385(1/2):43-47.

[16] 徐明星,刘文秀,赵德超. 中性粒细胞及其相关因子与血管内皮功能障碍的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2021, 20(8):846-849.

[17] 陈秀,刘小熊,夏豪. 中性粒细胞在心肌梗死中的作用研究进展[J]. 中国心血管杂志, 2020, 25(4):389-392.

[18] 谭利国,张涛,王家宁,等. 中性粒细胞-淋巴细胞比值与冠状动脉慢血流关系的 Meta 分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9(4):403-406.

[19] KANEKO K, KIMATA T, TSUJI S, et al. Serum albumin level accurately reflects antioxidant potentials in idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2012, 16(3):411-414.

[20] HE X B, GUO S J, CHEN D, et al. Preoperative Albumin to Globulin Ratio (AGR) as prognostic factor in renal cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8(2):258-265.

[21] UMEKI Y, ADACHI H, ENOMOTO M, et al. Serum albumin and cerebro-cardiovascular mortality during a 15-year study in a community-based cohort in tanushimaru, a cohort of the seven countries study[J]. *Intern Med*, 2016, 55(20):2917-2925.

[22] 杨倩倩,周鲁,宓宝斌,等. 老年冠状动脉慢血流患者的影响因素分析[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24(2):163-166.

[23] 牛霞霞,宝针,杨玉春,等. 冠状动脉慢血流的危险因素及冠状动脉病变特点的研究[J]. 心血管病学进展, 2022, 43(2):178-182.

[24] SANGHVI S, MATHUR R, BAROOPAL A, et al. Clinical, demographic, risk factor and angiographic profile of coronary slow flow phenomenon: a single centre experience[J]. *Indian Heart J*, 2018, 70(Suppl 3):S290-S294.

[25] 万进东,阚亮宇,王丹,等. 老年超重/肥胖患者冠状动脉慢血流与血管内皮功能及氧化应激的关系[J]. 岭南心血管病杂志, 2018, 24(3):322-326.

(收稿日期:2022-05-20 修回日期:2022-10-14)

(上接第 465 页)

[16] TU X, YOU B, JING M, et al. Progestin-primed ovarian stimulation versus mild stimulation protocol in advanced age women with diminished ovarian reserve undergoing their first in vitro fertilization cycle: a retrospective cohort study[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 24, 12:801026.

[17] EVANS M B, PARIKH T, DECHERNEY A H, et al. Evaluation of the cost-effectiveness of ovulation suppression with progestins compared with GnRH analogs in assisted reproduction cycles[J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 38(5):691-698.

[18] DOGAN D G, BEKTAS G, TÜRKÜYLMAZ E, et al. The efficacy of dydrogesterone use to suppress premature luteinizing hormone surge on cycle outcomes in controlled ovarian stimulation[J]. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2021, 22(4):293-299.

(收稿日期:2022-06-16 修回日期:2022-10-08)