

IVF 促排卵不同卵巢反应病人血清 let-7 的表达及意义

赵鸿娟¹, 胡 宾², 陈秀娟³, 王 煜³

(1. 山东省立第三医院 妇产科, 山东 济南 250000; 2. 内蒙古医科大学; 3. 内蒙古医科大学附属医院 生殖中心)

摘要:目的:通过比较 let-7g、let-7f 及 let-7i 在促排卵卵巢不同反应月经期血清中的表达情况,初步探讨 let-7 在预测卵巢反应的价值。方法:选取 2014-03~2015-11 期间于医院生殖中心因输卵管因素或男方因素行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的不孕 40 例,卵巢高反应组 14 例、中反应组 14 例、低反应组 12 例。常规长方案促排卵,分别在月经第 2 天抽取外周血 5 mL。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)方法,检测血清中 let-7g、let-7f 及 let-7i 的表达水平。结果:let-7g、let-7f 及 let-7i 在中反应组血清中表达量最高,差异有统计学意义($P=0.014$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.008$);高反应组血清中 let-7f 的表达量高于低反应组,差异有统计学意义($P=0.028$);let-7g-5p、let-7i-5p 在高反应组及低反应组血清中的表达无显著差异($P=0.704$ 、 $P=0.310$)。结论:let-7g、let-7f 及 let-7i 在卵巢中反应组病人血清中表达升高,提示不同卵巢反应的病人血清 let-7 的表达水平存在差异,可能对卵巢反应性的评估有一定预测价值。

关键词:控制性超促排卵;let-7;卵巢反应

中图分类号:R97

文献标识码:A

文章编号:2095-512X(2020)04-0341-05

EXPRESSION AND SIGNIFICANCE OF let-7 IN SERUM OF IVF PATIENTS WITH DIFFERENT OVARIAN RESPONSE TO CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION

ZHAO Hong-juan, HU Bin, CHEN Xiu-juan, et al.

(Department of Gynecology and Obstetrics, Shandong Provincial Third Hospital, Jinan 250000 China)

Abstract: Objective: To detect the expression of let-7g, let-7f and let-7i in basal serum of different ovarian response patients during menstrual period, preliminary discuss the value of let-7 in predicting ovarian response. **Methods:** 40 infertility patients with fallopian tube and male factors in vitro fertilization (IVF) were collected at reproductive center of Inner Mongolian Medical University affiliated Hospital from March 2014 to December 2015, including 14 high ovarian responders, 14 moderate responders and 12 poor responders, undergoing controlled ovarian hyperstimulation(COH). peripheral blood samples were collected at menstrual period. The expression of let-7g, let-7f and let-7i were detected by quantitative real time polymerase chain reaction. **Results:** qRT-PCR confirmed that, let-7g, let-7f and let-7i were expressed highest in moderate response patients basal serum($P=0.014$, $P=0.001$, $P=0.008$); The expression of let-7f in high group was higher than that in poor group($P=0.028$) and the let-7g and let-7i expression shows no significant difference among three groups ($P=0.704$, $P=0.310$). **Conclusion:** Let-7g, let-7f and let-7i were expressed highest in moderate response patients basal serum. It suggests that let-7 expression level in basal serum were different among three ovarian response patients, and that might have any value in prediction of ovarian response.

Key words: controlled ovarian hyperstimulation; let-7; ovarian response

收稿日期: 2020-04-15; 修回日期: 2020-07-06

作者简介: 赵鸿娟(1988-),女,山东省立第三医院妇产科住院医师。

通讯作者: 王煜,主任医师, E-mail: wuai1544@163.com 内蒙古医科大学附属医院生殖中心, 010050

控制性超排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)是辅助生殖技术的重要环节,是为了一次获取适当数量及质量的卵子,受精形成胚胎后植入宫腔,以提高妊娠的机率。卵巢储备功能是女性生育能力的重要标志,卵巢内卵泡数目随年龄的增长不断减少且质量逐渐变差,即卵巢储备功能逐渐下降。卵子的数量和质量对IVF至关重要,一定的卵巢储备功能是卵巢反应的前提^[1]。卵巢反应性是指卵巢对促性腺激素的敏感程度,根据在促性腺激素(gonadotropin, Gn)作用下卵巢的反应性,可分为卵巢低反应、正常反应及高反应。卵巢对Gn刺激反应不良的状态,称为卵巢低反应。相反,当卵巢对Gn的刺激异常敏感,超出了预期的范围与合理水平时,则称为高反应,卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)是最常见的表现之一。卵巢低反应和OHSS是目前导致IVF治疗周期取消的主要原因,因此,正确评价卵巢对COH的反应性,防止卵巢低反应和OHSS的发生,成为生殖领域的研究热点。

Let-7是卵巢中含量最丰富的miRNA之一,其在卵巢的不同发育时期和不同细胞中表达不同^[2],在维持卵巢正常功能与卵巢疾病的发生发展中具有重要的作用,例如,参与卵泡发育的调控、卵巢激素的合成与释放、卵丘-卵母细胞间的信息交流^[3]、卵巢癌细胞的发展等过程。

近年来,卵巢功能方面的研究越来越多,但对于卵巢反应性的评估尚无明确标准。本文采用qRT-PCR法分别检测卵巢高、中、低反应组病人月经期血清中let-7g、let-7f及let-7i的表达水平,探讨let-7g、let-7f及let-7i可能参与调节卵巢生理的作用,初步评价其对IVF促排卵病人卵巢反应性的预测价值,为临床评价卵巢反应性提供一条新的可能途径。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集2014-03~2015-11期间于医院生殖中心因

输卵管因素或男方因素行IVF-ET的原发不孕病人40例,其中卵巢高反应组14例、中反应组14例、低反应组12例,新鲜周期均移植。入选妇女年龄25~42岁,平均31.6岁,月经规律,3个月内未服用过激素类药物,无不良生活嗜好。分别在常规长方案促排卵之前的月经第二天,抽取外周血5mL,将上层血清提取,-80℃冰箱冻存待检测。标本采集均征得内蒙古医科大学伦理委员会批准及病人本人知情同意,所以标本有完整病例资料。

卵巢反应性分组参照:(1)卵巢高反应组^[4](满足以下任意两项):①总卵泡数≥14个或单侧卵巢卵泡数>10个或获卵数>15个;②人绒毛膜促性腺激素(HCG)日雌二醇(E2>12000pmol/L或E2峰值>75~90百分位^[5]);③有OHSS史或因OHSS风险致流产史;(2)卵巢中反应组:介于卵巢高低反应组之间,3个<获卵数<14个;(3)卵巢低反应组:2011年欧洲人类生殖及胚胎学会年会上制定的博洛尼亚标准^[6], (满足以下任意两项):①高龄(≥40岁)或存在卵巢反应不良的其它危险因素;②前次IVF周期卵巢低反应,常规方案获卵数≤3个;③卵巢储备下降(窦卵泡(AFC)<5~7个或抗苗勒氏管激素(AMH)<0.5~1.1 ng/mL)。如果年龄或卵巢储备功能检测正常,病人连续两个周期应用最大化的卵巢刺激方案仍出现卵巢低反应也可诊断。其他危险因素包括:影响卵巢储备和对卵巢刺激反应的遗传或获得性的疾病,如染色体的数量和结构异常、基因突变(如Turner综合征等);既往的盆腔炎、子宫内膜异位症、卵巢囊肿手术史、放化疗(特别是烷化剂的化疗药)史。

1.2 RT-PCR引物序列设计和合成:

为了使目标基因归一化,正确反映不同标本的RNA产量和质量,cDNA合成效率中的变化趋势,结合本实验的特点,选取了血清中表达稳定的miR-16-5p作为内参基因。所有引物设计软件基于Gen Bank数据库的let-7g、let-7f、let-7i及miR-16-5p序列,设计特异扩增引物,引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。合成的引物序列如下:

基因	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
let-7g	CCGCGTGAGGTAGTAGTTTGTACAGTTAAA	GTGCAGGGTCCGAGCT
let-7f	GCGCGCTGAGGTAGTAGATTGTATAGTTAAA	GTGCAGGGTCCGAGCT
let-7i	CGGCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTAA	GTGCAGGGTCCGAGCT
miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCC	GTGCAGGGTCCGAGCT

1.3 定量PCR检测 let-7g、let-7f、let-7i 及 miR-16-5p 的表达水平

1.3.1 总RNA提取 取出保存的上层血清制备总RNA, RNA提取试剂购自宝生物工程(大连)有限公司Takara, 根据说明书提取总RNA, 置于-80℃冰箱保存备用。

1.3.2 RNA的纯度及质量鉴定 紫外线分光光度计检测提取总RNA的吸光度(A)值, A260/A280值在1.8~2.1可进行下一步实验, 并用琼脂糖变性凝胶电泳检测RNA的完整性。

1.3.3 let-7g、let-7f、let-7i 及 miR-16-5p 的检测 以RNA为模板进行反转录, 获得互补DNA, 反转录试剂购自Takara公司, 反转录条件: 37℃ 60 min; 85℃ 5s, 采用实时荧光定量PCR试剂盒(Takara公司)扩增 let-7g、let-7f、let-7i 及 miR-16-5p, 荧光定量PCR仪(美国Bio-rad 7300公司)行定量PCR, 反应参数为95℃ 30s, 预变性95℃ 5s, 60℃ 30s, 溶解曲线分析95℃ 15s 荧光检测1次, 共40个循环, 记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数(Ct值), 若未检测到Ct值或复孔间Ct值之差>1, 需要重复实验。反应结束后根据溶解曲线分析产物是否单一, 每组均设3个复孔。

1.4 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析, 计量资料用单因素方差分析。显著性检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 统计数据

Let-7g、let-7f 及 let-7i 在中反应组病人血清中表达量最高, 差异有统计学意义($P=0.014$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.008$); 高反应组病人血清中 let-7f 的表达量高于低反应组病人, 差异有统计学意义($P=0.028$); let-7g、let-7i 在高反应组及低反应病人血清中的表达无显著差异($P=0.704$ 、 $P=0.310$)。

2.2 临床特征

体重指数: 三组病人体重指数无明显差异($P=0.403$); 年龄: 卵巢低反应组病人明显比中、高反应组大, 差异具有统计学意义($P=0.034$); Gn 天数: 卵巢低反应组病人明显比中、高反应组病人用药时间长($P=0.001$); Gn 总量: 低反应组病人比中、高反应组病人用量大, 差异具有统计学意义($P=0.003$), 余两组间无明显差异($P=0.173$); 基础FSH水平: 低反

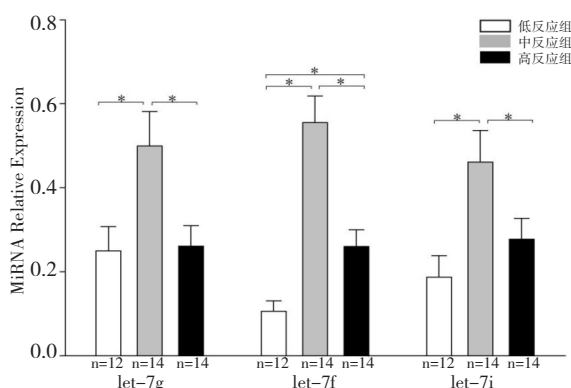


图1 let-7g、let-7f 及 let-7i 分别在卵巢低中高反应组的相对表达量

Fig. 1 Expression of let-7g, let-7f and let-7i in serum of different ovarian response patients

应组比高反应组水平高, 差异具有统计学意义($P=0.008$), 而低、中反应组及中、高反应组之间差异无明显统计学意义($P=0.091$ 、 $P=0.264$); FSH/LH 比值: 低反应组比值>2, 且高于其余两组, 差异具有统计学意义($P=0.003$), 余两组组间无明显差异($P=0.163$); AMH: 卵巢低、中、高反应组中呈上升趋势, 差异无统计学意义($P=0.437$); AFC: 卵巢低、中、高反应组中呈上升趋势, 差异无统计学意义($P=0.145$); 获卵数: 卵巢低、中、高反应组病人逐渐增加, 三组间差异具有统计学意义($P=0.001$); 新鲜周期胚胎移植后妊娠率: 三组病人分别25.0%、57.14%和42.86%。

3 讨论

近期国外研究发现, let-7a、b、d、f、h 在团头鲂卵巢发育I期至V期逐渐升高, VI期显著下降, let-7可能在其卵巢发育中发挥重要作用^[7]。本实验团队前期高通量测序的技术分析早期流产蜕膜和正常早孕蜕膜中 miRNAs 的表达谱显示^[8], let-7 家族高丰度表达, qRT-PCR 显示 let-7f、let-7g 和 let-7i 在流产蜕膜中的表达显著低于早孕蜕膜中的表达, let-7i 在早孕蜕膜中表达显著升高^[9], 这些都提示 let-7 可能参与早期流产。

IVF 中, 年龄大的病人 COH 时间长, 因对 Gn 的反应性下降而使用量增多, 胚胎的着床率及妊娠率降低, 妊娠后流产、早产及子代染色体异常几率也增高^[10]。Chuang^[11]等研究认为, 年龄是妊娠率的独立预测因子, 女性的生育潜能与年龄密切相关, 35~41 岁女性不孕的概率比 30~35 岁女性增加一倍。

本研究中卵巢低反应组病人明显比其余两组病人大、Gn天数长、Gn总量也最多,结果与上述描述相符。由于个体间存在差异,且女性生理年龄常常与卵巢功能不完全相符,因此,实际年龄预测结果有出入,应结合其他预测指标综合评估。

生理状态下,随卵巢功能的下降,卵泡刺激素(FSH)及黄体生成素(LH)水平升高。在卵巢反应不良病人中,FSH的水平升高,导致卵泡生长及消耗加快,加速卵巢功能的衰竭。本研究中,卵巢低反应组病人基础FSH水平最高。而在一项回顾性研究中^[12],对689例IVF病人以获卵数为依据将病人分为低反应(0~3枚)、中反应(4~15枚)及高反应(16枚以上)三组,根据血清FSH的水平为指标预测卵巢的反应性,结果显示FSH作为预测因子是有限的。本研究中卵巢低反应组病人FSH/LH>2,且高于中、高反应组病人,差异具有统计学意义,目前影响卵巢储备功能和卵巢反应性的基础血清FSH/LH比值的阈值目前尚无统一标准,文献报道从>2.0~3.6不等^[13]。

AMH属于β2转化生长因子家族的糖蛋白,2015年荷兰的一项大型观察性研究得出结论,干预前AMH能准确预测使用促性腺激素释放激素(GnRH)拮抗剂方案者的卵巢反应性,AMH>4.5ng/mL提示卵巢反应性好,而且AMH<0.8ng/mL则提示卵巢无反应^[14]。目前多项研究认为直径2~6mm的AFC数目更能定量直接的反映卵巢储备功能。AFC减少,尤其是≤9h,在预测卵巢低反应时,敏感度为84%,特异度为79%^[15]。在本研究中,卵巢低、中、高反应组中,血清中AMH水平呈上升趋势。目前尚无能够独立评价卵巢储备功能的特异性标志物,应考虑个体差异,通过联合多种指标进行评估,除上述外,还有获卵数、HCG注射日血清E2峰值、抑制素B、卵巢体积及卵巢基质血流等。

研究发现,在卵泡发育中,miR-143、let-7a和miR-125b的表达可被FSH抑制^[16]。let-7c在始基卵泡中的表达很少,在初级卵泡、次级卵泡和窦卵泡中持续表达^[17,18],其主要存在于颗粒细胞中^[19],颗粒细胞可促使卵巢周围微血管的生成。let-7c在MⅠ期卵母细胞周围的颗粒细胞中的表达明显高于MⅡ期。let-7c的水平增加,卵母细胞的成熟率升高^[20],这提示let-7c参与卵母细胞与周围颗粒细胞的相互作用。let-7b可通过转化生长因子β(TGF-β)信号转导途径影响雌激素的分泌^[21]。let-7c的表达可被雄激素(A)抑制,使用抗A药物可解除let-7c

的表达抑制,并缓解A介导的细胞增生,而let-7c可通过抑制雄激素受体(AR)的转录过程从而抑制AR的表达及其活性^[22]。多囊卵巢综合征(PCOS)病人存在高雄激素血症,Ding等^[23]检测病人血清miRNA发现,let-7c的表达下调。

本研究中,卵巢低、中、高反应组病人获卵数依次升高,而中反应组新鲜周期胚胎移植后的妊娠率最高,低反应组最低。qRT-PCR结果显示,卵巢中反应组病人血清中let-7g、let-7f及let-7i在相对表达量最高,提示基础血清中let-7g、let-7f及let-7i的表达水平可能与IVF病人卵巢反应及其妊娠结局有一定相关性。

Let-7与女性内分泌激素调节、卵泡发育之间存在一定的相互作用,因此而影响卵巢功能。我们的研究是相对较小的病人群,虽然研究结果显示let-7的表达存在差异,但显然需要进一步扩大样本量或改变COH方案等方面进行研究,探讨let-7是否可能作为IVF病人卵巢反应性的预测因子。

参考文献

- [1] Rooij I A J V, Broekmans F J M, Hunault C C, et al. Use of ovarian reserve tests for the prediction of ongoing pregnancy in couples with unexplained or mild male infertility[J]. Reproductive Biomedicine Online, 2006;12(2):182-190
- [2] Kang L, Cui X, Zhang Y, et al. Identification of mi RNAs associated with sexual maturity in chicken ovary by Illumina small RNA deep sequencing[J]. BMC Genomics, 2013;14:352
- [3] Uhde K, van Tol LT, Stout TA, et al. 79 micro RNA expression in bovine cumulus cells[J]. Reprod Fertil Dev, 2014;27(1):133
- [4] 胡琳莉,孙莹璞. 卵巢储备功能与卵巢反应性评估[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015(1):18-21
- [5] Qiu-Ju C, Xiao-Xi S, Lu L, et al. Effects of ovarian high response on implantation and pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation (with GnRH agonist and rFSH) [J]. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica, 2007;86(7):849-854
- [6] Ferraretti A P, Marca A L, Fauser B C J M, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria [J]. Human Reproduction, 2011;26(7):1616-1624
- [7] Lan T, Chen Y L, Gul Y, et al. Comparative expression analysis of let-7 microRNAs during ovary development in Megalobrama amblycephala[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019

- tension in the Era of Risk Stratification and Personalized Medicine[J]. American Journal of Hypertension, 2016; **29**(7): 792-795
- [13]高永兴. 氯吡格雷联合阿托伐他汀钙治疗高血压合并动脉粥样硬化的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2015; **30**(12): 1468-1472
- [14]Qin Youzhi, Wang Ying, Peng Juan. BNP and Hcy in the diagnosis of hypertensive intracerebral hemorrhage and prognosis [J]. Southwest National Defense Medicine, 2018; **28**(4): 332-334
- [15]Zhang L, Zeng Y, Qi J, et al. A cynomolgus monkey model of carotid atherosclerosis induced by puncturing and scratching of the carotid artery combined with a high-fat diet[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2018; **16**(1): 113-120
- [16]Tu Fulian, Du Hailin, Chen Tao, et al. Clinical correlation analysis of coronary heart disease, hypertension and coronary heart disease with hypertension and Hcy [J]. China Continuing Medical Education, 2016; **8**(14): 24-26
- [17]Zhang Xiaodong. Correlation between changes of serum lipoprotein CysCHcy and hs-CRP levels and atherosclerotic diseases[J]. Shanxi Medical Journal, 2015; **44**(24): 2853-2855
- [18]Yang Yue, Zhao Yi and Gu Dadong. Changes of carotid atherosclerosis and serum Hcy and hs-CRP levels in elderly patients with asymptomatic cerebral infarction [J]. Chinese General Medicine, 2015; **13**(10): 1635-1636
- [19]张建斌. 脑心通联合阿托伐他汀对老年脑梗死患者颈动脉粥样硬化危险因素的影响[J]. 中医药导报, 2014; **20**(14): 82-84
-
- (上接第344页)
- [8]Wang Y, Lv Y, Wang L, et al. MicroRNAome in decidua: a new approach to assess the maintenance of pregnancy[J]. Fertil Steril, 2015; **103**(4): 980-989
- [9]Lv Y, Gao S, Zhang Y, et al. miRNA and target gene expression in menstrual endometria and early pregnancy decidua[J]. European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology, 2015; 197
- [10]Franasiak JM; Forman EJ; Hong KH, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoblast biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening[J]. Fertility & Sterility, 2014; **101**(3): 656-663
- [11]Chuang C C, Chen C K, Chen S U, et al. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization[J]. Fertility & Sterility, 2003; **79**(1): 63-68
- [12]Birol V, Yigit C, Fisun V, et al. Hormonal and functional biomarkers in ovarian response[J]. Archives of Gynecology & Obstetrics, 2014; **289**(6): 1355-1361
- [13]A Miele, S Mancuso, A Miele, et al. Does day 3 luteinizing-hormone level predict IVF success in patients undergoing controlled ovarian stimulation with GnRH analogues?[J]. Fertility & Sterility, 2008; **90**(4): 1297-1300
- [14]Hamdine O, Eijkemans M J C, Lentjes E W G, et al. Ovarian response prediction in GnRH antagonist treatment for IVF using anti-Müllerian hormone[J]. Human Reproduction, 2015; **30**(1): 170-178
- [15]Nelson S M. Biomarkers of ovarian response: current and future applications[J]. Fertility & Sterility, 2013; **99**(4): 963-969
- [16]Okamoto M, Nasu K, Abe W, et al. Enhanced mi R-210 expression promotes the pathogenesis of endometriosis through activation of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Hum Reprod, 2015; **30**(3): 632-641
- [17]Kim YJ, Ku SY, Kim YY, et al. Micro RNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles[J]. Hum Reprod, 2013; **28**(11): 3050-3061
- [18]Yao N, Lu CL, Zhao JJ, et al. A network of mi RNAs expressed in the ovary are regulated by FSH [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009; **14**: 3239-3245
- [19]Assou S, Al-edani T, Haouzi D, et al. Micro RNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex [J]. Hum Reprod, 2013; **28**(11): 3038-3049
- [20]Ding C, Chen WQ, Zhu YT, et al. Circulating micro RNAs in patients with polycystic ovary syndrome [J]. Hum Fertil (Camb), 2015; **18**(1): 22-29
- [21]Zhang XD, Zhang YH, Ling YH, et al. Characterization and differential expression of micro RNAs in the ovaries of pregnant and non-pregnant goats (Capra hircus) [J]. BMC Genomics, 2013; **14**: 157
- [22]Sun D, Laver R, Mueller AC, et al. Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the mi R-99a/let-7c/mi R-125b-2 mi RNA cluster in prostate cancer cells [J]. Oncogene, 2013; **33**(11): 1448-1457
- [23]Ding C, Chen WQ, Zhu YT, et al. Circulating micro RNAs in patients with polycystic ovary syndrome [J]. Hum Fertil (Camb), 2015; **18**(1): 22-29