doi:10.11659/jjssx.09E021099

·临床研究·

人卵丘颗粒细胞 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平与 IVF 胚胎学结局的相关性分析

许相洋[1],黄 煌[1],林迳苍[1],杜冰汝[2] (1.泉州医学高等专科学校基础医学部,福建 泉州 362000;2.泉州医学高等专科学校附属人民医院病理科,福建 泉州 362000)

[摘 要] **目的** 研究人卵丘颗粒细胞 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平与体外受精—胚胎移植(IVF)胚胎学结局的相关性。**方法** 采用前瞻性研究方法,将于我校附属医院诊断并进行 IVF 治疗的 120 例不孕症患者作为观察组,根据妊娠结局将其分为妊娠成功组(75 例)和妊娠失败组(45 例);另选取 120 例同期进行健康体检的女性作为对照组。比较观察组和对照组以及不同 IVF 胚胎学结局患者 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平,采用 *Spearman* 相关性分析 IVF 胚胎学结局与 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平的相关性,绘制受试者工作特征(*ROC*)曲线分析各指标检测价值。**结果** 观察组的 ADAMTS-1($t=6.936$,$P=0.000$)、GDF-9($t=19.487$,$P=0.000$)表达水平显著低于对照组;妊娠成功组的 ADAMTS-1($t=18.912$,$P=0.000$)、GDF-9($t=18.224$,$P=0.000$)表达水平显著高于妊娠失败组。*Spearman* 相关性分析结果显示,患者的 IVF 胚胎学结局与 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平呈正相关。ADAMTS-1、GDF-9 表达水平的联合检测特异度显著高于单独检测,ADAMTS-1、GDF-9 表达水平联合检测的曲线下面积(*AUC*)显著高于单独检测($P<0.05$);针对妊娠失败的患者,ADAMTS-1、GDF-9 的临界值分别为 0.3 及 0.15。**结论** 人卵丘颗粒细胞 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平与 IVF 胚胎学结局呈现显著的相关性,可作为临床诊断的重要依据。

[关键词] 卵丘颗粒细胞;ADAMTS-1;GDF-9;体外受精—胚胎移植;胚胎学结局

[中图分类号] R715.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-22

Correlation between expression levels of ADAMTS-1 and GDF-9 in human cumulus granulosa cells and embryological outcome of IVF

XU Xiang-yang[1], HUANG Huang[1], LIN Jing-cang[1], DU Bing-ru[2] (1. Department of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362000, China; 2. Department of Pathology, People's Hospital Affiliated to Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362000, China)

Abstract: Objective To study the correlation between the expression levels of ADAMTS-1 and GDF-9 in human cumulus granulosa cells and the embryological outcome of in vitro fertilization-embryo transfer (IVF). **Methods** A total of 120 infertile patients diagnosed and treated with IVF in the affiliated hospital of our university were selected as the observation group by the prospective research method, and they were divided into the pregnancy success group (75 cases) and the pregnancy failure group (45 cases) according to the pregnancy outcome. Another 120 women who underwent physical examination in the same period were selected as the control group. The expression levels of ADAMTS-1 and GDF-9 between the observation group and the control group, as well as in patients with different embryological outcome of IVF were compared. *Spearman* correlation was used to analyze the correlation between the embryological outcome of IVF and the expression levels of ADAMTS-1 and GDF-9. The *receiver operating characteristic* (*ROC*) curve was drawn to analyze the detection value of each index. **Results** The expression levels of ADAMTS-1 ($t=6.936$, $P=0.000$) and GDF-9 ($t=19.487$, $P=0.000$) in the observation group were significantly lower than those in the control group. The expression levels of ADAMTS-1 ($t=18.912$, $P=0.000$) and GDF-9 ($t=18.224$, $P=0.000$) in the pregnancy success group were significantly higher than those in the pregnancy failure group. The results of *Spearman* correlation analysis showed that the embryological outcome of IVF in patients was positively correlated with the expression levels of ADAMTS-1 and GDF-9. The specificity of the combined detection of ADAMTS-1 and GDF-9 expression levels was significantly higher than that of the single detection, and the *area under the curve* (*AUC*) of the combined detection of ADAMTS-1 and GDF-9 expression levels was significantly higher than that of the single detection ($P<0.05$). For patients with pregnancy failure, the critical values of ADAMTS-1 and GDF-9 were 0.3 and 0.15, respectively. **Conclusion** The expression levels of ADAMTS-1 and GDF-9 in human cumulus granulosa cells are significantly correlated with the embryological outcome of IVF, which can be used as an important basis for the clinical diagnosis.

Keywords: cumulus granulosa cells; ADAMTS-1; GDF-9; in vitro fertilization-embryo transfer; embryological outcome

---

[基金项目] 泉州医学高等专科学校重点科技项目(XJK2002A)

[通信作者] 黄 煌,E-mail:575714415@qq.com

体外受精—胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer,IVF)过程中,受精的质量以及早期的胚胎质量是影响患者妊娠效果的重要因素[1]。Ⅰ型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs,ADAMTS-1)是人卵泡颗粒细胞及人卵丘颗粒细胞重要的蛋白水解酶,但以往研究主要集中于动物实验,人体研究较少[2]。ADAMTS-1 可通过对患者的多功能蛋白聚糖、短蛋白聚糖以及聚集蛋白聚糖产生降解作用,造成蛋白聚糖的结节,导致卵泡壁破溃[3]。生长分化因子-9(growth differentiation factor-9,GDF-9)是由卵母细胞分泌,属于卵源性生长因子,也是卵泡发育的重要调节因子。有效分析 IVF 胚胎学结局的影响因素,并给予针对性措施进行干预,具有十分重要的临床价值,但目前临床人卵丘颗粒细胞 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平与 IVF 胚胎学结局的相关性仍处在探索阶段,本研究主要通过分析人卵丘颗粒细胞 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平与 IVF 胚胎学结局的相关性,为临床不孕症的诊断以及早期干预提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

采用前瞻性研究方法,将 2017 年 1 月至 2021 年 1 月于泉州医学高等专科学校附属人民医院诊断并进行 IVF 治疗的 120 例不孕症患者作为观察组,年龄 21 ~35岁,平均(28.12 ± 2.11)岁,BMI 为(24.55 ± 3.43)kg/m^2,根据妊娠结局将其分为妊娠成功组(75 例)和妊娠失败组(45 例);另选取 120 例同期进行健康体检的女性作为对照组,年龄 21 ~ 36 岁,平均(28.09 ± 3.52)岁,BMI 为(24.66 ± 1.33)kg/m^2。观察组与对照组患者的年龄、BMI 比较差异无统计学意义(P >0.05)。本研究经泉州医学高等专科学校附属人民医院医学伦理委员会审核批准(LLH20160611),所有研究对象均签署知情同意书。

观察组患者纳入标准:①首次进行 IVF 治疗;②年龄 <35 岁;③基础卵泡刺激素 <10 IU/L;④窦卵泡数 >5 个;⑤获卵数 >15 个。排除标准:①不宜接受排卵治疗;②有高泌乳素血症;③高雄性激素分泌。

1.2 方法

IVF 治疗:患者于月经后 2 ~ 4 d 注射 50 ~ 100 mg/d克罗米芬,5 d 后采用 150 IU/d 尿促卵泡素和 50 mg/d 克罗米芬至扳机日,按照血中促黄体生成素(luteotropic hormone,LH)、卵泡直径、雌孕激素等水平和状态确定干预时间,当有 1 个卵泡直径≥18 mm、有 2 个卵泡直径≥17 mm 或有 3 个卵泡直径≥16 mm 时,给予曲普瑞林干预,32 ~ 34 h 后取卵,依照精液参数行常规 IVF 干预并进行体外受精,评估胚胎质量后进行移植。

采集所有患者的卵泡液,室温下将患者的卵泡液以 2 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液,将细胞沉积重悬于磷酸缓冲盐溶液中,使用 1∶1 的细胞悬浮液悬浮于 Ficoll 分离液中,再次以 2 500 r/min 离心 10 min,抽取两液面之间的颗粒细胞层,加入 5 倍体积的磷酸缓冲盐溶液,再次以 2 500 r/min 离心 20 min,弃去上清液,在 1 mL 0.1% 透明质酸酶中充分震荡及消化,使用 2 倍体积的 10% 胎牛血清终止消化,离心后弃去上清液,参照文献[4]制备颗粒细胞。

采用 Western blot 对以上细胞液中相关蛋白水平进行检测,使用细胞刮刀收集细胞,将收集的细胞放在冰上裂解 30 min,充分裂解后,再次以 2 500 r/min 离心 10 min,取上清液,采用 SDS-PAGE 以 120 V 恒压进行电泳,检测卵泡液中的 ADAMTS-1 以及 GDF-9 水平。

1.3 观察指标

比较观察组和对照组 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平;比较不同 IVF 胚胎学结局患者 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平。联合检测评估不良结局,计算灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值,灵敏度 = 真阳性例数/(真阳性例数 + 假阴性例数)×100%,特异度 = 真阴性例数/(真阴性例数 + 假阳性例数)×100%,阳性预测值 = 真阳性例数/(真阳性例数 + 假阳性例数),阴性预测值 = 真阴性例数/(真阴性例数 + 假阴性例数)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以率(%)表示,采用χ^2检验。采用 *Spearman* 相关性分析 IVF 胚胎学结局与 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平的相关性,绘制受试者工作特征(*receiver operating characteristic*,*ROC*)曲线,计算曲线下面积(*area under the curve*,*AUC*),分析各指标单独及联合检测预测不良结局的价值,P <0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平比较

观察组的 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平显著低于对

照组($P<0.05$),见表1。妊娠成功组的ADAMTS-1、GDF-9表达水平显著高于妊娠失败组($P<0.05$),见表2。

2.2 相关性分析

*Spearman*相关性分析结果显示,患者的IVF胚胎学结局与ADAMTS-1、GDF-9表达水平呈正相关,见表3。

2.3 联合检测效能分析

ADAMTS-1、GDF-9表达水平的联合检测特异度高于单独检测,见表4。

2.4 *ROC*曲线分析

ADAMTS-1、GDF-9表达水平联合检测的*AUC*显著高于单独检测,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表5。针对妊娠失败患者,ADAMTS-1、GDF-9的临界值分别为0.3及0.15。

表1 观察组和对照组ADAMTS-1、GDF-9表达水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=120$)

组别	ADAMTS-1	GDF-9
观察组	0.60±0.16	0.33±0.13
对照组	1.21±0.95	1.37±0.57
t	6.936	19.487
P	0.000	0.000

表2 不同IVF胚胎学结局患者的ADAMTS-1、GDF-9表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ADAMTS-1	GDF-9
妊娠成功组	75	0.78±0.22	0.45±0.17
妊娠失败组	45	0.30±0.17	0.13±0.09
t		18.912	18.224
P		0.000	0.000

表3 相关性分析

指标	r	P
ADAMTS-1	0.365	0.000
GDF-9	0.495	0.000

表4 联合检测效能分析

诊断方法	真阳性例数/例	假阳性例数/例	真阴性例数/例	假阴性例数/例	准确率/%	灵敏度/%	特异度/%	阳性预测值/%	阴性预测值/%
ADAMTS-1	70	12	33	5	85.83	93.33	32.04	85.37	86.84
GDF-9	69	18	27	6	80.00	92.00	28.13	79.31	81.82
联合检测	64	1	44	11	90.00	85.33	40.74	98.46	80.00

表5 *ROC*曲线分析

指标	标准误	*AUC*	95% *CI*	*P*
ADAMTS-1	11.231	0.775	0.520~0.872	0.000
GDF-9	9.252	0.603	0.600~0.746	0.000
联合检测	9.665	0.822	0.230~0.974	0.000

3 讨论

IVF的关键步骤在于获取合适的优质卵子及胚胎,随着辅助生殖技术的日益发展和促排卵方案的日臻成熟,如何根据卵巢储备功能选择合适的促排卵方案成为了临床医生必须面对的关键问题[5]。而在实际的IVF治疗中,患者的宫颈机能不全极易造成流产以及早产。所以在对患者的IVF治疗中及时对其不良预后的风险进行评估,及早开展干预,对于患者的妊娠具有积极的意义[6]。

ADAMTS-1主要位于人体的21号染色体中[7],有研究发现,ADAMTS-1与细胞外基质的生理功能显著相关,是机体排卵以及受精过程中的重要关键水解蛋白酶[8]。动物研究结果显示,将实验小鼠的ADAMTS-1基因进行靶向破坏敲除后,小鼠卵巢功能会发生障碍[9]。目前临床对于ADAMTS-1的研究仅仅局限在动物研究中,对于人体的研究较少[10]。理论研究认为,ADAMTS-1可通过对蛋白聚糖的裂解作用进一步对排卵前卵泡以及卵母细胞复合物的细胞结构与形态进行调控[11]。本研究结果显示,采用IVT治疗的不孕症患者ADAMTS-1表达水平显著低于正常人群,妊娠成功患者的ADAMTS-1表达水平显著高于妊娠失败患者。妊娠失败患者卵丘—卵母细胞复合体在输卵管运输时间的延长,进一步抑制了ADAMTS-1的表达,导致ADAMTS-1表达水平明显下降[12-13]。纪艺珍等[14]通过对采用IVT治疗的患者的ADAMTS-1表达水平进行分析发现,随着患者妊娠结局变差,其ADAMTS-1表达水平呈显著下降趋势,本研究结果与之一致。

GDF-9的异常表达影响着卵巢中卵泡的发育,体外实验已经证实,GDF-9可造成大量的始基卵泡生长启动,进一步降低卵泡闭锁,促进患者卵泡存活以及生长发育,同时,其通过对患者垂体激素的显著激活作用,可进一步促进患者颗粒细胞分泌因子的分泌,进而促进患者的卵泡发育[15]。在卵巢体细胞的发育过程中,GDF-9对于卵巢功能的维持具有显著作用,同时,其还可通过卵母细胞的直接作用对卵巢功能进行调节。李春燕等[16]通过对患者的GDF-9水平与卵巢功能进行分析发现,患者的卵巢功能与GDF-9呈现明显相关性,本研究与之互为印证。

本研究对患者的联合检测效能进行比较发现,ADAMTS-1、GDF-9对于早期妊娠结局的预测具有重要

的作用,而通过 *ROC* 曲线得到的临界值对于临床早期预测不良妊娠结局具有重要意义。

综上所述,人卵丘颗粒细胞 ADAMTS-1、GDF-9 表达水平与 IVF 胚胎学结局呈显著相关性,可作为临床诊断的重要依据。

[参考文献]

[1] 杨 珑,姚桂东,孙莹璞. 颗粒细胞 Lnc-ADAMTS1-1:1的表达与PCOS患者脂代谢及胚胎质量的相关性[J]. 河南医学研究,2020,29(15):2689-2693. doi:10.3969/j.issn.1004-437X.2020.15.001.

[2] Ma Y, Jin J, Tong X, et al. ADAMTS1 and HSPG2 mRNA levels in cumulus cells are related to human oocyte quality and controlled ovarian hyperstimulation outcomes[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37(3): 657-667. doi:10.1007/s10815-019-01659-8.

[3] Mani S, Ghosh J, Lan Y, et al. Epigenetic changes in preterm birth placenta suggest a role for ADAMTS genes in spontaneous preterm birth [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(1): 84-95. doi: 10.1093/hmg/ddy325.

[4] 李 哲,张俊韦,胡继君,等. 卵巢低反应患者微刺激促排卵取卵后继续黄体期促排卵的临床效果观察[J]. 中华生殖与避孕杂志,2019,39(4):269-273. doi:10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2019.04.002.

[5] Namlı Kalem M, Kalem Z, Yüce T, et al. ADAMTS 1, 4, 12, and 13 levels in maternal blood, cord blood, and placenta in preeclampsia[J]. Hypertens Pregnancy, 2018, 37(1): 9-17. doi:10.1080/10641955.2017.1397690.

[6] Henríquez S, Kohen P, Muñoz A, et al. In-vitro study of gonadotrophin signaling pathways in human granulosa cells in relation to progesterone receptor expression[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 35(4): 363-371. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.011.

[7] Tola EN, Karatopuk DU, Koroglu N, et al. Follicular ADAMTS-1 and aggrecan levels in polycystic ovary syndrome[J]. J Assist Reprod Genet, 2017, 34(6): 811-816. doi:10.1007/s10815-017-0913-7.

[8] Satu K, Alex JP, Justin C, et al. Corpus luteum as a novel target of weight changes that contribute to impaired female reproductive physiology and function[J]. Syst Biol Reprod Med, 2016, 62(4): 227-242. doi:10.3109/19396368.2016.1173743.

[9] Lee B, Kroener LL, Xu N, et al. Function and hormonal regulation of GATA3 in human first trimester placentation[J]. Biol Reprod, 2016, 95(5): 113. doi:10.1095/biolreprod.116.141861.

[10] Appeltant R, Beek J, Vandenberghe L, et al. Increasing the cAMP concentration during in vitro maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization in vitro[J]. Theriogenology, 2015, 83(3): 344-352. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.09.023.

[11] Campos LB, Silva AM, Praxedes ÉCG, et al. Effect of growth differentiation factor 9 (GDF-9) on in vitro development of collared peccary preantral follicles in ovarian tissues[J]. Anim Reprod Sci, 2021, 226: 106717. doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106717.

[12] Vendrell-Flotats M, García-Martínez T, Martínez-Rodero I, et al. In vitro maturation in the presence of leukemia inhibitory factor modulates gene and miRNA expression in bovine oocytes and embryos[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1777. doi:10.1038/s41598-020-74961-6.

[13] Yung Y, Maman E, Konopnicki S, et al. ADAMTS-1: a new human ovulatory gene and a cumulus marker for fertilization capacity[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 328(1-2): 104-108. doi:10.1016/j.mce.2010.07.019.

[14] 纪艺珍,张佳荣,张瑞晴,等. TGF-β1 对不孕症患者颗粒细胞卵丘扩展相关基因 PTX3、TNFAIP6 表达的影响[J]. 山东医药,2017,57(21):84-86. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2017.21.029.

[15] Guzman L, Adriaenssens T, Ortega-Hrepich C, et al. Human antral follicles < 6 mm: a comparison between in vivo maturation and in vitro maturation in non-hCG primed cycles using cumulus cell gene expression[J]. Mol Hum Reprod, 2013, 19(1): 7-16. doi:10.1093/molehr/gas038.

[16] 李春燕. 卵巢内异症患者腔镜剥除术对卵巢功能的影响[J]. 腹腔镜外科杂志,2015,20(6):408-411. doi:10.13499/j.cnki.fqjwkzz.2015.06.408.

(编辑:贺绍梅)