DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000741

抗苗勒管激素及卵丘细胞端粒长度与卵母细胞成熟度的相关研究

王兴玲，蔡鹏飞，张文娟，肖雅琳
（郑州大学第三附属医院生殖中心，郑州 450052）

【摘 要】**目的**：探讨体外受精-胚胎移植（in vitro fertilization-embryo transfer，IVF-ET）中卵泡液内抗苗勒管激素（anti-mullerian hormone，AMH）水平及对应的卵丘细胞端粒长度与卵母细胞成熟度的关系。**方法**：收集 52 例行 IVF-ET 患者卵泡液及卵丘细胞，依据每位患者卵母细胞成熟度，将成熟卵泡液、未成熟卵泡液分别混合标记为成熟的卵泡液组（follicular fluids of mature oocyte，FFMⅡ）、未成熟的卵泡液组（follicular fluids of immature oocyte，FFMI）。从卵母细胞周围机械剥离的部分卵丘颗粒细胞同样依据卵母细胞成熟度分组，标记为成熟卵母细胞的颗粒细胞组（cumulus cells of mature oocyte，CCMⅡ）、未成熟卵母细胞的颗粒细胞组（cumulus cells of immature oocyte stage，CCMI）。应用酶联免疫法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测卵泡液中 AMH，实时定量 PCR 测定卵丘细胞端粒长度。**结果**：未成熟卵泡液组中 AMH 水平高于成熟组[(6.02 ± 1.34) vs.(5.66 ± 1.42)]，差异未达到统计学意义（P=0.13）；未成熟组卵丘细胞端粒长度较成熟组的短[(3.50 ± 1.08) vs.(4.40 ± 1.24)]，差异有统计学意义（P=0.000）。**结论**：未成熟的卵泡液组中 AMH 水平高于成熟组，卵泡液中 AMH 可能与卵母细胞成熟度有关，卵丘细胞端粒长度可以反映卵母细胞成熟度。

【关键词】卵泡液；抗苗勒管激素；卵丘颗粒细胞；端粒长度；卵母细胞成熟度
【中图分类号】R711.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-04-16

Relationship between anti-mullerian hormone in follicular fluid and telomere length in cumulus cells with oocytes at different mature stages

Wang Xingling, Cai Pengfei, Zhang Wenjuan, Xiao Yalin
(*Reproductive Center, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the association between anti-mullerian hormone (AMH) levels in the follicular fluid and corresponding cumulus cell telomere length as well as oocyte maturity *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET). ***Methods***: Follicular fluids and cumulus granular cells were obtained from 52 patients during IVF cycles. On the basis of oocyte maturation of each patient, the immature follicle fluid, mature follicle fluid were respectively mixed and marked as mature follicle fluid group (FFMⅡ) and immature follicular fluid (FFMI) group. Cumulus granular cells (CCs) were manually separated from the oocyte-cumulus complex under microscope. All the CCs sample were divided into two groups: granulosa cells of mature oocytes (CCMⅡ), granular cell of immature oocytes group (CCMI) based on the maturation of oocyte in every patient. Follicular fluids AMH basal levels were evaluated by ELISA, DNA was extracted from cumulus cells and assessed for telomere length by real-time quantitative PCR. ***Results***: AMH concentrations in the FFMI group were higher than those in FFMⅡ group, but without statistical significances[(6.02±1.34) vs. (5.66 ± 1.42), P= 0.13]. The telomere length was significantly shorter in CCMI group than in CCMⅡ group, with significant differences between the two groups [(3.50 ± 1.08)vs.(4.40 ± 1.24), P=0.000]. ***Conclusion***: AMH in follicular fluid may reflect the degree of oocyte maturation; the telomere length could be used as a diagnostic criterion for oocyte maturation.

【Key words】follicular fluid; anti-mullerian hormone; cumulus cells; telomere length; oocyte maturation

作者介绍：王兴玲，Email：wangxingling123456@163.com，
研究方向：生殖内分泌与辅助生殖技术。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1555.020.html
（2015-08-05）

优质成熟的卵母细胞是体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer,IVF-ET)成功的关键因素之一,目前临床上主要应用显微镜下形态学分级来评估卵母细胞成熟度。在 IVF 过程中卵丘-卵母细胞复合物(cumulus-oocyte complexes,COCs)内的卵丘颗粒细胞不能全部剥离,卵母细胞未能完全暴露,使得不同的观测者对其评估存在主观性,导致无法准确筛选出优质的卵母细胞。与卵母细胞成熟度相关的生化指标较形态学能更准确、客观地反映卵母细胞质量。卵泡液是 COCs 生长发育的微环境,卵泡液内的细胞因子能调控卵母细胞的发育和成熟;抗苗勒管激素(anti-mullerian hormone,AMH)是转化生长因子-β 超家族成员,能调控卵子的生长和发育。以前的研究[1-2]主要关注单个优势卵泡内AMH对卵母细胞成熟及卵母细胞发育潜能的影响,结论相互矛盾存在争议。这可能是仅针对单个卵泡,不能全面反映促排卵中卵泡的整体状况。若以卵巢中卵泡池内 AMH 水平为研究对象,探究其与卵母细胞成熟的关联,将比单个卵泡更能准确全面地反映 AMH 与卵母细胞质量的关系。

卵母细胞与卵丘颗粒细胞紧密相连、相互支持,形成了 COCs。细胞间存在缝隙连接,同时卵母细胞通过旁分泌-自分泌方式调控其自身及卵丘细胞的生长,经细胞间双向调节轴来维持卵母细胞和卵丘细胞同步发育。一些学者[3-4]对颗粒细胞与卵母细胞发育潜力及胚胎质量关系进行了广泛研究,结果提示颗粒细胞凋亡的程度与卵母细胞的成熟及胚胎质量有相关性,未成熟卵泡内颗粒细胞呈现高凋亡率。颗粒细胞内端粒酶与端粒共同控制细胞的衰老、凋亡,随着细胞的分裂,端粒不断缩短;当端粒缩短至其阈值时,出现细胞凋亡。目前,国内外关于卵丘颗粒细胞端粒与卵母细胞成熟度之间关系鲜有报道。本文通过对卵泡液中 AMH 及细胞端粒的研究,探讨能否以 AMH 及端粒作为评估卵母细胞成熟度的生物指标,从而为临床治疗提供理论基础及实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2014 年 2 月至 2014 年 12 月 期间在郑州大学第三附属医院因输卵管因素接受 IVF-ET 治疗的患者,纳入标准:①符合输卵管性不孕的诊断;②男方精液正常;③既往月经规律;④近 3 个月内未服用激素类药物。排除标准:①排卵障碍性疾病(多囊卵巢综合征、高泌乳素血症等);②子宫内膜异常(子宫内膜异位症、黏膜下子宫肌瘤等);③有卵巢手术史。本实验获得郑州大学第三附属医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 促排卵方案 采用黄体期短效长方案促排卵治疗,黄体中期开始注射短效达菲林进行降调节。降调达标后开始每日注射促性腺激素(gonadotropin,Gn),启动剂量为 150~300 IU/d;根据患者卵泡发育情况适时调整药物剂量,当达到至少有 3 个优势卵泡发育至直径为 18~20 mm,肌肉注射重组人绒毛膜促性腺激素(rhCG,默克雪兰诺公司)250 mg,34~36 h 后 B 超引导下经阴道穿刺取卵。

1.2.2 标本的采集与保存 经阴道超声引导下穿刺取卵抽吸每份卵泡液,一对一收集卵泡液及 COCs;若未找到卵母细胞则将该卵泡的卵泡液丢弃。根据卵母细胞成熟度,将相同成熟度卵母细胞对应的卵泡液混合,对应卵泡液分为 2 组:成熟卵母细胞的卵泡液组(follicular fluids of mature oocyte,FFMⅡ)、未成熟卵母细胞的卵泡液组(follicular fluids of immature oocyte,FFMI);采用机械法剥除每个卵母细胞周围的部分卵丘颗粒细胞,将相同成熟度卵母细胞的颗粒细胞混合,对应的卵丘颗粒细胞分为 2 组:成熟卵母细胞的颗粒细胞组(cumulus cells of mature oocyte,CCMⅡ)、未成熟卵母细胞的颗粒细胞组(cumulus cells of immature oocyte,CCMI)。将获得卵泡液立即 3 000 r/min,离心 15 min,取上清液储存至 EP 管内-80 ℃保存;将所获得的颗粒细胞收集到 EP 管内-80 ℃保存。卵母细胞成熟度分级:(1)MⅡ期形态表现:卵丘松散,可见透明带和第一极体,放射冠呈放射状排列;(2)MⅠ期表现:卵丘紧密,透明带不清楚,第一极体尚未排出,放射冠不同程度分散。

1.2.3 测定卵泡液 AMH 水平和颗粒细胞端粒长度 采用 ELISA 法测定 AMH,步骤如下:①待测样品加至微孔中、室温下振荡孵育 90 min,孵育完后、自动洗板 5 次;②每孔加入 100 μl 抗 AMH 抗体-生物素结合物、室温下振荡孵育 30 min,孵育完成后、洗板 5 次;③每孔加入 100 μl 的 AMH 链霉亲和素-酶结合物、室温下振荡孵育 30 min,孵育完成后、洗板 5 次;④每孔加入 100 μl 显色液、室温下振荡孵育 10 min,每孔加入 100 μl 终止液、10 min 内用酶标仪 450 nm 波长读数,记录吸光度(absorbance,A)值。每个样品均做 2 个平行样,取其平均值为该样的 A 值。运用 qRT-PCR 检测端粒长度,步骤如下:①DNA 提取 取 100 μl 卵丘细胞到 1.5 ml 的 EP 管中,加入 20 μl 蛋白酶 K、180 μl 的 GA,混匀后 56 ℃水浴 30 min;加入 200 μl 的 GB,混匀后 70 ℃水浴 10 min;加入 200 μl 的乙醇,混匀后将溶液全部转入吸附柱 CR2 中、13 400 r/min离心 30 s;向 CR2 中加入 500 μl 的 GD、13 400 r/min 离心 30 s;向 CR2 中加入 600 μl 的 PW、13 400 r/min 离心 30 s,重复 1

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 qRT-PCR primers sequences

引物名称	引物序列	引物长度(bp)	产物长度(bp)
端粒	上游 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'	37	
	下游 5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'	39	76
36B4	上游 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'	23	
	下游 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'	25	63

次；将 CR2 转入 1 个干净 EP 管中、滴加 40 μl 的 TB，13 400 r/min 离心 2 min、收集 EP 管中溶液，-20 ℃保存颗粒细胞 DNA。②引物的设计、合成 引物设计参照文献，由上海生工生物工程有限公司合成，PCR 反应引物序列见表 1。③qRT-PCR 由北京康为世纪公司提供试剂盒，PCR 仪为 ABI7500。反应体系：上、下游引物 1 μl、UltraSYBR Mixture 10 μl、模板 DNA 2 μl、ddH_2O 6 μl，反应体系 20 μl。反应条件：反应体系于 95 ℃预变性 10 min 后，按程序 95 ℃变性 15 s，60 ℃退火和延伸 1 min，扩增 40 个循环。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，定量资料 2 组间比较采用 t 检验和 Levene's 方差齐性检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

共纳入 52 例输卵管性不孕患者，患者平均年龄 25~41（35.3 ± 2.8）岁。收集该 52 例患者对应的成熟卵泡液、未成熟卵泡液；及成熟、未成熟卵泡中的颗粒细胞团。样本量均为 52 份。

比较不同成熟度卵母细胞对应的卵泡液内 AMH 水平，FFMI 组的较 FFM Ⅱ 组高（6.02 ± 1.34 vs. 5.66 ± 1.42），差异无统计学意义（P>0.05）（表 2）。

表 2 比较成熟组卵泡液、未成熟组卵泡液的 AMH（$\bar{x} \pm s$ pg/ml）

Tab.2 Follicular fluid AMH concentration between mature follicle group and immature follicle group（$\bar{x} \pm s$ pg/ml）

组别	例数	AMH水平	t 值	P 值
FFM Ⅱ	52	5.66 ± 1.42	-1.560	0.125
FFMI	52	6.02 ± 1.34		

比较不同成熟度卵母细胞对应的颗粒细胞相对端粒长度，CCM Ⅱ 组端粒较 CCMI 组长（4.40 ± 1.24 vs. 3.50 ± 1.08），差异有统计学意义（P<0.01）（表 3）。

表 3 比较成熟、未成熟组卵母细胞周围颗粒细胞端粒长度（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 Telomere length in cumulus cells around mature and immature oocytes（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	细胞端粒长度	t 值	P 值
CCM Ⅱ	52	4.40 ± 1.24	5.390	0.000
CCMI	52	3.50 ± 1.08		

3 讨 论

3.1 卵泡液 AMH 和卵母细胞成熟度的相关研究

AMH 由卵巢颗粒细胞产生，可调控卵泡的起始募集与周期募集；在<4 mm 卵泡中表达最强，随卵泡发育 AMH 表达逐渐减弱，当卵泡达 8mm 时卵泡液中 AMH 骤降，促进优势卵泡最终成熟[5]。卵泡液为卵母细胞发育提供微环境，卵泡液中 AMH 在卵泡发育、成熟过程中处于动态变化。研究表明卵泡液中 AMH 与卵母细胞受精率、优质胚胎率之间存在相关性，受精卵、优质胚胎对应卵泡液中 AMH 浓度较低。Desforges[2]和姜宇等人[6]研究结果显示卵泡液中高水平 AMH 阻碍卵子成熟，抑制卵母细胞的生殖潜力。然而赵海波研究[7]发现成熟卵母细胞的卵泡液 AMH 水平明显高于未成熟者，卵泡液中高浓度的 AMH 有利于卵子成熟、受精及优胚的形成。以上实验都是研究单个卵泡的 AMH，未能反应卵巢中卵泡池的总体状况。本实验显示未成熟卵泡池中 AMH 水平高于成熟卵泡池，但未达到统计学差异（P=0.130）。研究结果无统计学意义可能是因为收集的样本量较小，未能全面反映未成熟、成熟卵泡的总体的情况；另外本研究比较的是成熟、未成熟卵泡池中 AMH 不是对单一的卵泡进行比较，卵泡池中 AMH 水平比较均衡波动范围较小。下一步需扩大样本量，进一步明确二者间的关系。本研究比较未成熟卵泡池与成熟卵泡池中 AMH 水平，更能真实、全面地反应卵巢内 AMH 对卵母细胞发育、成熟的影响。胡蓉等研究[8]AMH 作用机制发现卵泡液中 AMH 可与颗粒细胞 AMHR Ⅱ 受体结合、形成复合物，影响细胞核基因表达；可抑制干细胞生长因子促进卵子生长的作用。此外 AMH 可以降低卵丘颗粒细胞中芳香酶 P450 的表达，抑制雄激素向雌激素转化；导致卵泡雄激素蓄积、雌激素缺乏，阻碍卵母细胞成熟。AMH 是卵泡成熟的负向调控因子，卵泡液AMH 水平可间接反应卵母细胞成熟度。

3.2 卵丘细胞端粒长度与卵母细胞成熟度的相关研究

COCs 中细胞间的缝隙连接及卵母细胞的自分泌-旁分泌，使卵母细胞、卵丘细胞同步发育。有研究发现[3]牛的颗粒细胞的凋亡程度可影响卵母细胞的发育潜力，二者呈现负相关；端粒和端粒酶可调控颗粒细胞增殖与凋亡的动态平衡。端粒随细胞分裂不断缩短，端粒酶可催化 DNA 的合成，抑制端粒缩短，延长细胞的寿命，抑制凋亡[9]。追踪端粒酶缺陷型小鼠繁殖进程发现：端粒长度缩短损害生育能力[10]。Keefe 等[11]研究 ICSI 中端粒与胚胎关系表明：卵子端粒长度与胚胎质量正相关，与胚胎胞质碎片率呈负相关。在本研究中发现成熟卵母细胞周围卵丘细胞端粒长度明显较未成熟卵母细胞的长，差异有统计学意义。一些环境或遗传因素可影响端粒酶活性，细胞分裂次数增加及氧化应激，导致端粒缩短、加速凋亡进程。异常的凋亡信息可经过细胞间缝隙连接，直接由颗粒细胞传递至卵母细胞；阻碍卵母细胞发育成熟及抑制其生殖潜力。Cheng 等[12]研究发现：颗粒细胞端粒长度可影响相应胚胎质量，端粒较长的卵母细胞发育潜力更强；颗粒细胞大量凋亡，可严重影响卵母细胞的成熟[13]。Endo 等[14]体外培养牛的未成熟 COCs，添加雌激素可显著延长未成熟颗粒细胞端粒长度、增加卵母细胞线粒体 DNA 的拷贝数，促进卵母细胞的成熟。卵丘细胞在结构及功能上支持卵母细胞发育成熟，其端粒可调控细胞衰老与凋亡，卵丘细胞端粒长度是反应卵母细胞成熟的一个良好指标。

综上所述，卵丘细胞及卵泡液构成了卵母细胞生长的微环境，二者在结构及功能上与卵母细胞息息相关。未成熟卵泡池中高水平 AMH 可抑制 E2 的合成，阻碍了卵泡的最终成熟；未成熟卵母细胞周围颗粒细胞中端粒酶未能修复缩短的端粒，加速了颗粒细胞的衰老凋亡导致未能形成适宜的微环境，不利于卵母细胞的成熟。AMH 和颗粒细胞的端粒在一定程度上可以反映卵母细胞的成熟情况，但因本研究样本量较少准确性欠佳。下一步应加大样本量，尝试找到能够区别卵母细胞成熟度的阈值；加深对卵泡液 AMH 及颗粒细胞与卵母细胞间关系研究，真正了解深层次的作用机制，从而为优质卵母细胞筛选及未成熟卵的体外培养提供新的方法。

参 考 文 献

[1] Tramišak Milakovi T, Panié Horvat L, Cavlović K, et al. Follicular fluid anti-Mullerian hormone: a predictive marker of fertilization capacity of MII oocytes[J]. Archives of gynecology and obstetrics, 2015, 291(3): 681-687.

[2] Desforges BV, Gallo C, Lefebvre C, et al. Increased anti-Mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization[J]. Fertility & Sterility, 2010, 94(1): 198-204.

[3] Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, et al. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation.[J]. Theriogenology, 2003, 59(5): 1421-1433.

[4] Hamel M, Dufort I, Robert C, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes[J]. Human Reproduction, 2008, 23(5): 1118-1127.

[5] Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, et al. Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection[J]. Molecular Human Reproduction, 2013, 19(8): 519-527.

[6] 姜 宙，王晓燕，邹淑花，等. 抗苗勒管激素及其Ⅱ型受体与卵母细胞成熟的关系[J]. 现代妇产科进展，2013，22(8)：635-637.

[7] 赵海波，宋 晖，于月成. 人卵泡液中抗苗勒管激素水平与卵母细胞关系的研究[J]. 现代中西医结合杂志，2009，18(11)：1205-1206.

[8] 王飞苗，罗 艳，胡 蓉，等. 多囊卵巢综合征患者抗苗勒氏管激素与干细胞因子的相关性[J]. 西安交通大学学报(医学版)，2012，33(4)：482-485.

[9] Hirt BV, Wattis JA, Preston SP. Modelling the regulation of telomere length: the effects of telomerase and G-quadruplex stabilising drugs [J]. Journal of Mathematical Biology, 2014, 68(6): 1521-1552.

[10] Hoffman GE, Le WW, Entezam A, et al. Ovarian abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2012, 60(6): 439-456.

[11] Keefe DL, Franco S, Liu L, et al. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2005, 192(4): 1256-1260.

[12] Cheng EH, Chen SU, Lee TH, et al. Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality [J]. Human Reproduction, 2013, 28(4): 929-936.

[13] 赵志明，崔 娜，郝桂敏，等. 人卵巢黄素化颗粒细胞端粒酶活性与卵巢反应性及胚胎质量的关系[J]. 河北医科大学学报，2014，35(6)：621-624.

[14] Endo M, Kimura K, Kuwayama T, et al. Effect of estradiol during culture of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the mitochondrial DNA copies of oocytes and telomere length of granulosa cells [J]. Zygote, 2014, 22(4): 431-439.

（责任编辑：张辉洁）