

·临床研究·

人类水通道蛋白在不同径线卵泡的黄素化颗粒细胞中的表达水平

郑泽桐, 谈际范, 李宇彬, 张秀冰, 刘思敏, 周灿权
(中山大学附属第一医院生殖中心//广东省生殖医学重点实验室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨取卵日不同径线卵泡的黄素化颗粒细胞中各种水通道蛋白(AQPs)的mRNA表达水平。【方法】收集2022年3月25日至2022年9月23日在本中心行体外受精胚胎移植助孕的不孕患者取卵日的卵泡液共48例,根据卵泡径线分为小(< 13 mm)、中($13 \sim 18$ mm)、大(≥ 18 mm)卵泡群分开收集卵泡液提取颗粒细胞。经RNA定量后纳入22例进行分析,比较3组卵泡群的AQPs mRNA表达水平。根据促排卵方案将患者分为拮抗剂组和激动剂组,分析AQPs的表达差异。【结果】黄素化颗粒细胞中AQP2的mRNA水平随卵泡径线的增加而升高(linear trend $P = 0.004$),其差异在大、小卵泡组间具有统计学差异($P = 0.017$);该差异在拮抗剂组内具有统计学意义($P = 0.0496$),在激动剂组中无统计学意义($P = 0.108$)。【结论】AQP2在黄素化颗粒细胞中的mRNA水平随着卵泡径线的增长而增加,其表达量与促排卵方案有关,提示AQP2在卵泡生长和卵泡液生成过程中可能起到一定作用,且其mRNA表达水平可能受到FSH和LH的调节。

关键词:水通道蛋白;黄素化颗粒细胞;卵泡液;卵泡生长

中图分类号:R711.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2023)03-0462-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0313

mRNA Expression of Aquaporins in Human Luteinized Granulosa Cells from Different Diameter Follicles

ZHENG Ze-tong, TAN Ji-fan, LI Yu-bin, ZHANG Xiu-bing, LIU Si-min, ZHOU Can-quan
(Reproductive Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University//Guangdong Key Laboratory of Reproductive Medicine, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZHOU Can-quan; E-mail: zhoucanquan@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the mRNA expression levels of various aquaporins (AQPs) in luteinized granulosa cells from follicles of different diameters.【Methods】From March 25, 2022 to September 23, 2022 in our reproductive medicine center, 48 women undergoing in-vitro fertilization (IVF) were enrolled and divided into the antagonist group and the agonist group according to the ovarian stimulation protocol. Follicular fluid samples were collected on the day of oocyte pick-up and granulosa cells were extracted from follicles of different diameters: small (< 13 mm), medium ($13 \sim 18$ mm) and large (≥ 18 mm). After RNA quantification, 22 cases (66 samples) were included for analysis and mRNA expression levels of AQPs were compared among the three follicle groups.【Results】The mRNA expression of aquaporin 2 (AQP2) in luteinized granulosa cells increased with the increase of follicle diameter (linear trend $P = 0.004$) and the difference was statistically significant between two groups of large and small follicles ($P = 0.017$). Statistical difference was found in the antagonist group ($P = 0.0496$), but not in the agonist group ($P = 0.108$).【Conclusion】The mRNA level of AQP2 in luteinized granulosa cells increases with the increase of follicle diameter and its expression is related to the ovarian stimulation protocol, suggesting that AQP2 may play a role in follicle growth and follicular fluid formation, and its mRNA

收稿日期:2023-03-10

基金项目:广东省生殖医学重点实验室(2020B1212060029),广东省自然科学基金(2021A1515010559)

作者简介:郑泽桐,硕士生,研究方向:生殖内分泌, E-mail: zhengzt3@mail2.sysu.edu.cn;周灿权,通信作者,教授,博士生导师, E-mail: zhoucanquan@mail.sysu.edu.cn

expression level may be regulated by follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH).

Key words: aquaporins (AQPs); luteinized granulosa cells; follicular fluid; follicle growth

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(3): 462-470]

水的稳态对于生命十分重要,在女性生殖系统中其重要性体现在卵母细胞运输、激素分泌、受精完成、囊胚形成、怀孕和分娩等各个方面。1992年, Peter Agre 等发现了水通道蛋白1(aquaporin-1, AQP1), 由此创下了水的跨膜运输研究的又一里程碑^[1]。水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一类特异性快速转运水分的细胞膜通道类蛋白质,广泛表达于原核和真核生物的细胞膜上。目前在哺乳动物上已发现13个水通道成员,分别为AQP0~AQP12。在女性生殖系统中,AQPs与管腔内、间质中、毛细血管水平上的水运输有关^[2]。卵巢颗粒细胞(granulosa cells, GCs)上的AQPs通过跨细胞膜的方式介导小鼠卵巢中窦卵泡的水运输^[3]。Lee等^[4]在人卵巢颗粒细胞中检测到AQP7和AQP9的mRNA水平较高,而发现AQP0、AQP8和AQP10的mRNA的表达水平较低或几乎检测不到。Thorddsen等^[5]在腹腔镜下分离行绝育术女性的卵泡后,在GCs中检测到了AQP1~AQP4的表达,并发现其表达水平随排卵的进展而改变。张贺等^[6]则发现使用孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)与人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)刺激卵巢后诱导的小鼠排卵模型中AQP2的mRNA水平得到短暂提高;Zou等^[7]在AQP2的启动子区域发现了雌激素反应元件(estrogen-response elements, ERE),这些研究结果均提示AQPs可能受到激素的调节。目前尚不清楚不同径线卵泡的颗粒细胞中各种AQPs表达水平的差异及其与不同激素水平之间的关系。本研究的目的是探索不同径线卵泡黄素化颗粒细胞上各种AQPs的表达差异并初步探讨其在卵泡液生成及卵泡生长的作用,为进一步探索卵泡生长机制及卵泡生长障碍性疾病提供线索。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2022年3月25日至2022年9月23日于中山大

学附属第一医院生殖中心因输卵管因素行体外受精(in vitro fertilization, IVF)、因男方因素行卵母细胞内单精子注射(intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI)、因地中海贫血或其他与卵巢功能无关的基因病、男方染色体结构或整倍体性异常而行胚胎植入前遗传学检测(preimplantation genetic testing, PGT)助孕治疗的小于40岁的不孕患者。排除标准:①多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS);②早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI);③子宫内膜异位症或子宫腺肌病;④既往放疗或卵巢手术史;⑤自身免疫性疾病。本研究已获得中山大学附属第一医院伦理委员会批准,回顾性研究免患者知情同意。最后,纳入分析的患者共48例。分组:根据促排卵方案将患者分为拮抗剂组和激动剂组。

1.2 促排卵及卵泡监测

临床医生根据患者的年龄、卵巢储备功能、身体质量指数(body mass index, BMI)以及既往促排卵方案个体化选择促排卵方案,如激动剂方案、拮抗剂方案等。促排卵期间使用经阴道超声测量卵泡径线合并检测血液内分泌激素水平共同评估卵泡的生长发育情况。当2个主导卵泡的径线 ≥ 18 mm时,于当晚给予患者艾泽或者hCG进行扳机,并在扳机36 h后行经阴道超声引导下卵泡穿刺术。

1.3 卵泡液分组收集与颗粒细胞分离

于取卵当日根据卵泡径线分群收集卵泡液:小卵泡群(< 13 mm)、中卵泡群(13 mm~18 mm)、大(≥ 18 mm)卵泡群。使用Percoll密度梯度离心法提取颗粒细胞:①将收集所得卵泡液1 065 $\times g$, 4 $^{\circ}C$ 离心20~25 min。弃去上清后用1 \times PBS重悬沉淀,吹打均匀。②将细胞重悬液缓慢加至稀释好的50%的Percoll(Solarbio, p8370)液面上,以652 $\times g$,以最高的升速及最低降速在4 $^{\circ}C$ 条件下离心10 min。③离心结束后,可见离心管内液体明显分层。第1层和第3层间的白色絮状物即颗粒细胞层。吸出白色絮状物,用1 \times PBS(浙江吉诺, GNM20012)洗涤,453 $\times g$, 4 $^{\circ}C$ 离心5 min。④弃去上清,用1 \times

PBS重悬沉淀,吹打均匀。用直径为 4×10^{-3} mm的细胞滤网进行过滤并收集滤液后, $453 \times g$, 4°C 离心5 min。⑤弃去上清后用 $1 \times$ PBS重悬细胞,加入2~3 mL红细胞裂解液(Solarbio, R1010)混匀, 4°C 静置10 min。随后 $453 \times g$, 4°C 离心5 min,获得白色沉淀即颗粒细胞。最后,加入1 mL的RNAiso Plus(Takara, 9109)溶液,转移至 -80°C 冰箱冷冻待用。

1.4 颗粒细胞总RNA提取及实时荧光定量PCR

按照RNAiso Plus产品说明书步骤提取颗粒细胞的总RNA。使用超微量分光光度计(DeNovix,

DS-11FX)进行RNA浓度定量,浓度过低的患者同时舍去三组数据,其余进行逆转录及后续实验。使用HiScript III RT SuperMix for qPCR (Vazyme, R323)进行逆转录,按照Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Q712)操作说明进行实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)。选用管家基因 β -actin的转录水平作为内参。引物序列见表1。结果采用 ΔCT 表示基因相对内参基因表达水平,采用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 比较3组卵泡群的表达量。

表1 引物序列
Table 1 Primers

Gene	Forward Primers	Reverse Primers
AQP0	CTTTGCTCCTGCCATTCTCA	AGGTTCCCTGTGACCTCTG
AQP1	GACCACGAGGCTGATTCCTCTC	CTCCCTCCATCACAACTCTCC
AQP2	AGCCGCTCTGCTCCATGAGATCAC	GGCGGAAACAGCACGTAGTTGTAG
AQP3	TCAATGGCTTCTTTGACCAGTTCA	CTTCACATGGGCCAGCTTCACATT
AQP4	CTATCGCCTTGTGGATGG	CTCTTCTCTGTGTATCTGTCA
AQP5	CGCGCTCAACAACAACACAA	AGTGGAGGCCGAAGATGCAGAG
AQP6	CTTAGTTTCCTGGGTCCCTCCTG	GAAGCCGTCTCCAGGCTCTCT
AQP7	GTTTCCGGTCTATGTGCTG	GAATGGCCGTGTAGAAGAG
AQP8	CACTGGAACCTCCACTGGA	AATGAAGCACCTAATGAGCAG
AQP9	CGGCATTTGTACAGTCAGAGACTC	AATGCGTTCGCCAGAGATAGATAC
AQP10	CCCATTACATCTTGGTGCAG	CTGTAGGGCATCATGGTAGAG
AQP11	GCAGGAGGAAGTCTAACAG	AAGGAGCCAGCCAGTATA
β -actin	ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

AQP: aquaporin

1.5 统计学方法

采用IBM SPSS 25.0进行基线资料统计学分析:连续变量资料正态分布变量以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布变量以中位数[四分位数间距]表示,定性资料用率[n(%)]表示。两组间均数的比较,若满足正态分布则采用 t 检验,若不满足则采用Mann-Whitney U 检验;两组间率的比较,采用卡方检验或Fisher's精确检验。RT-qPCR结果使用GraphPad Prism[8.0.2]进行分析:因取样时容易在中组卵泡群内混有大或小组卵泡群的卵泡液,故采用单因素重复测量方差分析(Geisser-Greenhouse校正)及线性趋势检验分析3组卵泡群所得

颗粒细胞内AQPs的mRNA表达水平的趋势,均有差异者再进一步用配对 t 检验比较大、小卵泡群间的表达差异。采用双侧检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基线信息资料分析

共收集48位患者的卵泡液,经RNA定量最后可用于后续逆转录及RT-qPCR检测分析的卵泡液标本共计22例。其中,行IVF、ICSI、PGT治疗的患者分别为10例、3例和9例。患者的年龄分布在24

~38岁,中值为32.5岁。BMI为20.64 [2.18] kg/m²,基础卵泡刺激素(basic follicle stimulating hormone, bFSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、泌乳素(prolactin, PRL)、雌激素(estradiol, E₂)、睾酮(testosterone, T)为(5.31±1.29) U/L、(3.34±1.17) U/L、(14.99±6.34) μU/mL、29.00 [14.00] pmol/L、(0.32±0.07) nmol/L,抗缪勒管激素(anti Mullerian hormone, AMH)为5.97 [6.46] ng/mL。hCG日的FSH、LH、E₂、孕酮(progesterone, P)分别为:(15.10±6.21) U/L、1.08 [1.38] U/L、4 328.50 [2 276.50] pmol/L、(1.25±0.36) nmol/L。平均获卵数为20.0 [15]枚,促排卵过程中所用促性腺激素(gonadotropin, Gn)总用量为(2 250.75±725.74) U。

2.2 不同径线卵泡颗粒细胞的AQPs mRNA表达差异

AQP9在卵巢黄素化颗粒细胞中表达水平最高(平均ΔCT = 7.1±2.8),AQP11、AQP2、AQP3也有较高的mRNA表达水平(平均ΔCT = 8.8±1.1, 10.5±1.6, 10.5±1.4),而AQP4的mRNA表达水平最低(平均ΔCT = 14.6±1.6;表2)。

AQP2在小、中、大卵泡群颗粒细胞的mRNA水平差异具有统计学意义($F = 5.078, P = 0.017$),其表达量随着卵泡径线增加而升高,该上升趋势具有统计学意义(linear trend $P = 0.004$)。AQP6在三组

内的表达差异接近临界值($F = 3.421, P = 0.052$),其在小、中、大卵泡组颗粒细胞中的mRNA表达水平呈下降趋势,该下降趋势具有统计学意义(linear trend $P = 0.019$)。余AQP0、AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10、AQP11在3组颗粒细胞中的mRNA表达水平无明显趋势(表2)。进一步进行分析发现AQP2在大卵泡群所得颗粒细胞上的表达量较小卵泡群升高($t = 2.887, P = 0.009$;图1)。

2.3 不同促排方案人群间AQP2表达水平比较

2.3.1 进行AQP2检测患者的基线信息资料分析
进行AQP2 mRNA水平检测的患者20人,其中拮抗组共11人,激动剂组9人。拮抗剂组较激动剂组的AMH水平高(9.0 [4.6] vs. 2.7 [2.0] ng/ml, $Z = -2.725, P = 0.006$),平均bLH低(3.24±1.37 vs. 3.35±0.66, U/L, $t = 4.522, P = 0.048$),hCG日FSH水平低(10.21 [4.46] vs. 20.44 [4.39], U/L, $Z = -2.725, P = 0.006$),hCG日LH水平高(2.06±1.39 vs. 0.63±0.30, U/L, $t = 5.242, P = 0.034$),而年龄、BMI、bFSH、bPRL、bE₂、bT、获卵数、hCG日E₂、hCG日P、Gn总用量及助孕方式在两组间的差异不具有统计学意义(表3)。

2.3.2 不同促排卵方案患者AQP2表达水平的差异
拮抗剂组中,病人的大卵泡所得黄素化颗粒细

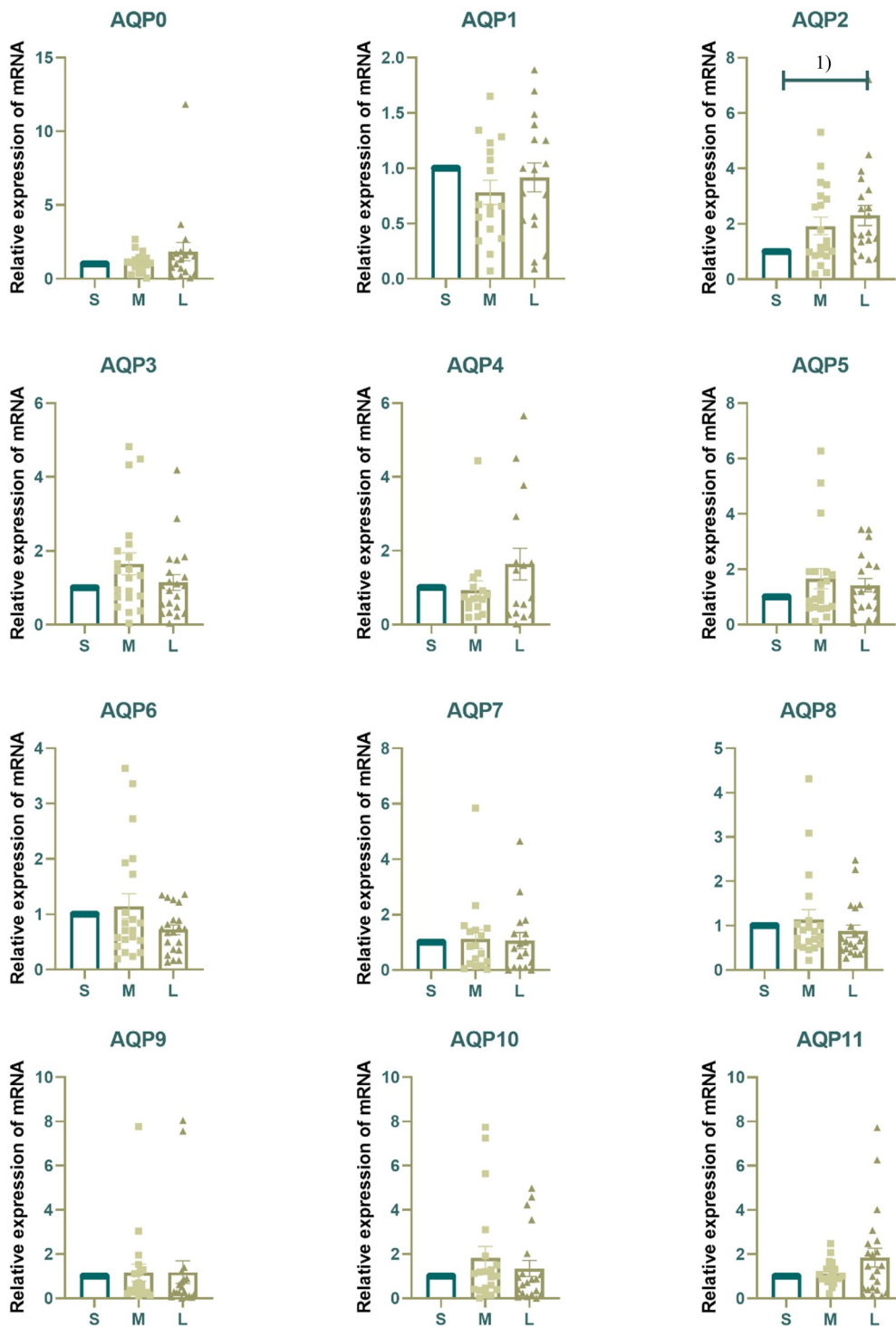
表2 AQPs在颗粒细胞中的表达水平及在3组内的趋势检验

Table 2 Results of mRNA expression of AQPs

($\bar{x} \pm s$)

Gene	Average	S	M	L	Linear trend P
AQP0	12.8±1.8	12.7±2.0	13.0±2.0	12.8±1.5	0.239
AQP1	12.4±1.7	12.1±1.6	12.5±1.9	12.7±1.4	0.385
AQP2	10.5±1.6	11.0±1.3	10.5±1.8	10.1±1.4	0.004
AQP3	10.5±1.4	10.4±1.6	10.2±1.3	10.8±1.4	0.268
AQP4	14.6±1.6	14.3±1.5	14.8±1.8	14.6±1.7	0.343
AQP5	11.8±1.5	11.8±1.4	11.7±1.6	11.9±1.4	0.727
AQP6	11.8±1.4	11.4±1.4	11.7±1.6	12.2±1.0	0.019
AQP7	12.6±3.0	12.0±3.8	12.4±3.2	13.4±1.5	0.085
AQP8	12.1±1.4	11.9±1.5	12.0±1.5	12.3±1.3	0.387
AQP9	7.1±2.8	6.8±3.2	6.9±2.1	7.8±3.1	0.062
AQP10	12.4±3.4	11.9±4.0	12.2±3.3	13.1±2.6	0.273
AQP11	8.8±1.1	8.8±1.0	8.8±1.2	8.8±1.1	0.775

AQP: aquaporin; S, small-follicle group, <13 mm; M, middle-follicle group, 13 ~ 18 mm; L, large-follicle group, ≥18 mm. Each sample was normalized to reference gene, β -actin. Δ CT±SD was presented and trend test was performed. Bolded values are for significant differences.



The expression of AQPs (AQP0 ~ AQP11) in luteinized granulosa cells from different diameters of follicles (AQP0, 1, 7, $n = 18$; AQP2, 5, 8, 10, $n = 20$; AQP3, 6, 9, $n = 21$; AQP4, $n = 16$; AQP11, $n = 22$). AQP2: $n = 20$, $F = 5.830$, $P = 0.017$; S vs. L, $t = 2.887$, $P = 0.009$. AQP, aquaporin; S, small-follicle group, < 13 mm; M, middle-follicle group, 13 ~ 18 mm; L, large-follicle group, ≥ 18 mm. Data was analysed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ and presented as $2^{-\Delta\Delta CT}$ relative to S group (value = 1) in pictures. Values are mean and SEM. 1): $P < 0.01$.

图1 AQP在小、中、大卵泡颗粒细胞中的mRNA表达水平

Fig. 1 AQP mRNA expression in luteinized granulosa cells from different diameters of follicles

表3 AQP2样品来源患者的基础资料
Table 3 Baseline of patients for AQP2 testing

$[\bar{x} \pm s, n(\%)]$

Items	Antagonist	Agonist	$t/Z, \chi^2$	P
No. of patient	11	9	–	–
Age/years	31.27±4.90	32.78±3.80	1.473	0.241
BMI/(kg/m ³)	21.51±2.43	20.41±1.65	0.393	0.539
bFSH/(U/L)	4.91±1.37	5.93±0.94	3.244	0.088
bLH/(U/L)	3.24±1.37	3.35±0.66	4.522	0.048
bPRL/(μU/mL)	13.86±5.03	18.35±8.78	2.163	0.159
bE ₂ /(pmol/L)	26.18±9.89	42.67±14.90	1.563	0.227
bT/(nmol/L)	0.32±0.09	0.31±0.07	1.447	0.245
AMH/(ng/mL)	9.0 [4.6]	2.7 [2.0]	–2.725	0.006
Number of oocytes retrieved	20.36±9.52	20.78±10.46	0.002	0.969
ART method			0.880	0.842
IVF	5 (45.5%)	3 (33.3%)		
ICSI	1 (9.1%)	2 (22.2%)		
PGT	5 (45.5%)	4 (44.4%)		
Endocrine profile on the day hCG administration				
FSH/(U/L)	10.21 [4.46]	20.44 [4.39]	–2.725	0.006
LH/(U/L)	2.06±1.39	0.63±0.30	5.242	0.034
E ₂ /(pmol/L)	4 043.82±1 291.68	4 402.11±990.30	0.871	0.363
P/(nmol/L)	1.18±0.34	1.34±0.46	0.356	0.558
Gonadotropin usage/U	1 761.36±338.81	2 863.89±599.49	2.538	0.129

AMH and bFSH data were analysed using Mann–Whitney U test and presented with Z ; ART method data were analysed using *chi square* test and presented with χ^2 . AQP: aquaporin; BMI: body mass index; b: basic; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; PRL: prolactin; E₂: estradiol; T: testosterone; AMH: anti-Mullerian hormone; ART: assisted reproductive technology; IVF: in vitro fertilization; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; PGT: preimplantation genetic testing; hCG: human chorionic gonadotropin. Bolded values are for significant differences between the two groups.

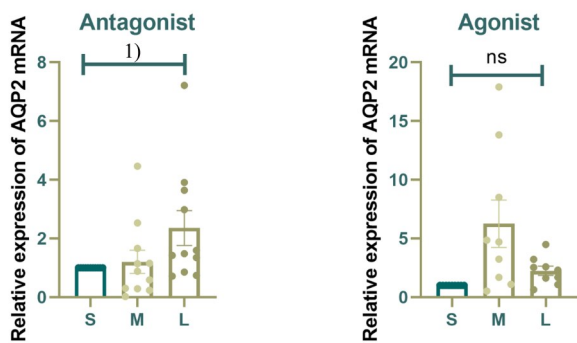
胞的 AQP2 表达水平较小卵泡的高 ($n = 11, t = 2.233, P = 0.0496$), 而激动剂组中病人的大、小卵泡所得黄素化颗粒细胞的 AQP2 表达水平差异无统计学意义 ($n = 9, t = 1.808, P = 0.108$; 图 2)。

3 讨论

水通道蛋白广泛存在于在女性生殖系统中, 与管腔内、间质中、毛细血管水平上的水运输有关^[2], 在卵母细胞运输、激素分泌、受精完成、囊胚形成、怀孕和出生等各个方面起到重要作用。水通道蛋白 (AQPs) 是一种特异性快速转运水分的细胞膜通道类蛋白质, 广泛表达于原核和真核生物的细胞膜上^[8-9]。

卵泡的窦腔是卵泡生长及最终成熟的基础, 其中的卵泡液为卵子-卵丘复合物和了粒细胞的成熟和分化提供了必须的微环境^[10-11]。因此, 探究卵泡液的形成机制有助于更好地了解卵泡的生长和发育。

关于人卵巢颗粒细胞上 AQPs 表达的有无及其表达水平, 报道不一。Lee 等^[4]在人卵巢黄素化颗粒细胞上检测到水平很低的 AQP0、AQP8 和 AQP10 的 mRNA 表达, 原因可能在于其研究仅采用了活性达到 85% 以上的颗粒细胞进行检测, 而本文纳入所有收集到的颗粒细胞, 更为全面地对颗粒细胞上 AQPs 的表达进行描述。此外, 本研究所用 AQPs 引物经过扩增效率评估 (未展示), 选用扩增效率在 95% ~ 110% 之间的引物进行 qPCR 检测, 一定程度上保证了结果的可靠性。本研究与 Lee HJ 等观察



AQP2 in large follicles is significantly higher than the small follicles in Antagonist group ($n = 11$, $t = 2.233$, $P = 0.0496$), while this difference was not seen in the Agonist group ($n = 9$, $t = 1.808$, $P = 0.108$). S, small-follicle group, < 13 mm; M, middle-follicle group, $13 \sim 18$ mm; L, large-follicle group, ≥ 18 mm. Data was analysed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ and presented as $2^{-\Delta\Delta CT}$ relative to S group (value = 1) in pictures. Values are mean and SEM. 1): $P < 0.05$

图2 拮抗剂组大、小卵泡的颗粒细胞中AQP2表达水平的差异具有统计学意义

Fig. 2 AQP2 in GCs from antagonist group is significantly different

到的结果一致,AQP9在颗粒细胞的mRNA表达水平较高^[4],有研究指出其表达水平可能与PCOS有关^[12-13]。

Thoroddsen等^[5]通过对20位行绝育术的妇女行腹腔镜下分离卵泡,将卵泡分为排卵期、排卵早期、排卵后期和排卵后共四个期做进一步处理分析后发现:人卵巢颗粒细胞中表达AQP1~AQP4,且发现其表达水平随着卵泡破裂的进展而改变:相比于排卵前,AQP2在重组人绒毛膜促性腺激素(recombinant hCG, rhCG)后12~18 h内的mRNA表达显著增加。本研究与其结果相符:随着卵泡径线的增大,AQP2在黄素化颗粒细胞中mRNA水平上升。这可能提示AQP2在卵泡生长过程及卵泡液聚集中的作用。随着促排卵的进展,卵泡液内的雌激素水平不断增长^[14]。Lee等^[15]发现在小鼠卵巢内AQP7、AQP8和AQP9分别对hCG刺激作出不同的反应;Zou等^[7]在AQP2的启动子区域发现了雌激素反应元件(estrogen-response elements, ERE);Moehren等^[16]则发现了AQP5上的ERE等,都提示AQPs的表达水平受到激素调节。张贺^[6]在使用PMSG与hCG作用于小鼠后,发现AQP2在卵巢及卵巢囊内短暂性上调,推测是前者引起雌激素的上升而导致的。在本研究中,AQP2在较大卵泡中的表达较高,可能与大卵泡群组卵泡液的雌激素水平较高有关。

GnRH拮抗剂能够与内源性GnRH竞争结合受体,迅速减少体内垂体FSH和LH的分泌;GnRH激动剂则通过使受体脱敏而达到效果,是临床上使用较多的两个方案。在激动剂方案中,hCG日血LH水平与GnRH激动剂所用剂量有关^[17]。在正常反应人群中尽管两者在新鲜周期临床结局方面的结果相似^[18],但两者导致的激素变化模式不同^[19],原因可能在于两者对人颗粒细胞芳香化酶表达的调节通路不同^[20]。在本研究中,将患者分为拮抗剂组和激动剂组后发现AQP2 mRNA水平在激动剂组的大、小卵泡间的表达差异消失。分析两组病人的基线信息发现,两组病人在取卵日的FSH水平和LH水平存在差异:尽管拮抗剂组患者一开始的基础LH水平较激动剂组低、FSH水平无差异,但经过一系列的促排卵药物治疗后,其hCG日血清LH水平较激动剂组高、FSH水平较低。据报道,AQP2在转录水平的调控受到cAMP反应元件及cAMP反应元件结合蛋白的影响^[21],而FSH能够通过cAMP-PKA通路促进卵泡发育^[22],LH也可以通过该通路调节颗粒细胞中类固醇激素合成急性调控蛋白(steroidogenic acute regulation protein, StAR)的表达^[23]。此外,有研究表明卵泡液中LH水平与hCG日血LH呈正相关关系^[24],且卵泡液内激素水平与基础水平无关^[25]。由此,我们推测颗粒细胞上AQP2的表达可能与卵泡液内FSH和LH水平相关,但需要进一步的体外激素刺激实验加以验证。

本研究获得的颗粒细胞为经过控制性卵巢刺激所得的黄素化颗粒细胞,其与非黄素化颗粒细胞相比在功能上存在一定差异^[26],如黄素化后颗粒细胞的芳香化酶表达水平较非黄素化颗粒细胞的明显增高、经过促排卵过程的颗粒细胞分泌的卵源性因子水平更高^[27]等,故需要进一步验证在生理状况下非黄素化颗粒细胞中AQPs的表达。此外,本研究纳入患者例数较少,未来需要更大样本量的研究进一步验证结果。

综上,我们的研究观察到:随着卵泡径线的增大,其黄素化颗粒细胞中AQP2的表达增加;AQP2 mRNA在大、小卵泡的颗粒细胞上表达差异与促排卵方案相关,提示AQP2在卵泡生长及卵泡液生成中可能起到一定作用,且其表达可能受到LH和FSH的影响。本文结果提示我们需要重视AQP2在卵泡生长中所起到的作用,并为进一步探索卵泡生长提供了新的思路。

参考文献

- [1] Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein [J]. *Science*, 1992, 256(5055): 385–387.
- [2] Kordowitzki P, Kranc W, Bryl R, et al. The relevance of aquaporins for the physiology, pathology, and aging of the female reproductive system in mammals [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2570.
- [3] McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, et al. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(8): 2905–2912.
- [4] Lee HJ, Jee BC, Kim SK, et al. Expressions of aquaporin family in human luteinized granulosa cells and their correlations with IVF outcomes [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(4): 822–831.
- [5] Thoroddsen A, Dahm-Kahler P, Lind AK, et al. The water permeability channels aquaporins 1–4 are differentially expressed in granulosa and theca cells of the preovulatory follicle during precise stages of human ovulation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(4): 1021–1028.
- [6] 张贺. AQP2与AQP5在小鼠生殖系统平衡中的作用[D]. 西北农林科技大学, 2014.
Zhang H. The role of AQP2 and AQP5 for fluid homeostasis in mice reproductive system [D]. Northwest A&F University, 2014.
- [7] Zou LB, Zhang RJ, Tan YJ, et al. Identification of estrogen response element in the aquaporin-2 gene that mediates estrogen-induced cell migration and invasion in human endometrial carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(9): E1399–E1408.
- [8] Xu L, Guo X, Wang W, et al. Classification and gene structure of aquaporins [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1398: 1–13.
- [9] 季敏, 管怀进. 白内障的分子病理改变 [J]. *眼科学报*, 2021, 36(8): 663–668.
Ji M, Guan HJ. Molecular pathological changes of cataract [J]. *Eye Sci*, 2021, 36(8): 663–668.
- [10] Babayev E, Duncan FE. Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: the local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality [J]. *Biol Reprod*, 2022, 106(2): 351–365.
- [11] 周怡, 李婷婷, 郭映纯, 等. 卵泡液中神经生长因子4及卵丘细胞 TrkB受体与卵子发育潜能的关系 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2021, 42(2): 257–265.
Zhou Y, Li TT, Guo YC, et al. Relationship between follicular-fluid neurotrophin-4, TrkB receptors in cumulus cells and oocyte developmental competence [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2021, 43(2): 257–265.
- [12] Xiong Z, Li B, Wang L, et al. AQP8 and AQP9 expression in patients with polycystic ovary syndrome and its association with in vitro fertilization-embryo transfer outcomes [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 755–760.
- [13] Song WY, Wang Y, Hou XM, et al. Different expression and localization of aquaporin 7 and aquaporin 9 in granulosa cells, oocytes, and embryos of patients with polycystic ovary syndrome and the negatively correlated relationship with insulin regulation [J]. *Fertil Steril*, 2021, 115(2): 463–473.
- [14] Rehman R, Zafar A, Ali AA, et al. Impact of serum and follicular fluid kisspeptin and estradiol on oocyte maturity and endometrial thickness among unexplained infertile females during ICSI [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0239142.
- [15] Lee S, Kang HG, Ryou C, et al. Spatiotemporal expression of aquaporin 9 is critical for the antral growth of mouse ovarian follicles [J]. *Biol Reprod*, 2020, 103(4): 828–839.
- [16] Moehren U, Denayer S, Podvenc M, et al. Identification of androgen-selective androgen-response elements in the human aquaporin-5 and Rad9 genes [J]. *Biochem J*, 2008, 411(3): 679–686.
- [17] 罗颖怡, 邓明芬, 胡晓坤, 等. 不同降调节长方案 GnRH-a 剂量与 LH 水平的关系及临床结局的比较 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(2): 278–284.
Luo YY, Deng MF, Hu XK, et al. Relation between dosage of GnRH-a and serum LH levels and compari-

- son of clinical outcomes among different GnRH-a long protocols[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(2): 278-284.
- [18] 朱洁茹, 欧建平, 邢卫杰, 等. GnRH激动剂长方案与GnRH拮抗剂方案在不同年龄组、不同反应人群中的新鲜周期临床结局比较[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(5): 738-745.
- Zhu JR, Ou JP, Xing WJ, et al. Comparison of the clinical outcomes of fresh embryo transfer with GnRH agonist long protocol versus GnRH antagonist protocol in different age groups and different responders [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(5): 738-745.
- [19] Gui J, Ni Y, Liu Q, et al. Comparison of clinical effects between early follicular prolonged GnRH agonist protocol and GnRH antagonist protocol in 3310 cycles: a retrospective study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2022, 22(1): 942.
- [20] Khalaf M, Mittre H, Levallet J, et al. GnRH agonist and GnRH antagonist protocols in ovarian stimulation; differential regulation pathway of aromatase expression in human granulosa cells[J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(1): 56-65.
- [21] Zhao X, Liang B, Li C, et al. Expression regulation and trafficking of aquaporins[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1398: 39-51.
- [22] Lee EB, Chakravarthi VP, Wolfe MW, et al. ER β regulation of gonadotropin responses during folliculogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10348.
- [23] 乌日罕, 哈斯高娃, 陈小辛, 等. 类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)的研究进展[J]. *当代畜禽养殖*, 2021(4): 20-26.
- Wu RH, Hasi GW, Chen XX, et al. Research progress in steroid hormone synthesis of acute regulatory protein (StAR) [J]. *Mod Animal Husband*, 2021(4): 20-26.
- [24] 朱文君. 卵泡液中FSH、LH水平与不孕患者助孕结局关系的探究[D]. 南昌大学, 2017.
- Zhu JW. The exploration of the relationship between FSH and LH levels in follicular fluid and pregnancy outcome of infertile patients [D]. Nanchang University, 2017.
- [25] Walters KA, Eid S, Edwards MC, 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.
- [26] Lindeberg M, Carlstrom K, Ritvos O, et al. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(2): 401-406.
- [27] 魏莉娜, 李俐琳, 方丛, 等. 控制性卵巢刺激对多囊卵巢综合征患者和正常排卵妇女卵源性因子表达的差异[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(6): 867-872.
- Wei LN, Li LL, Fang C, et al. Different effects of controlled ovarian stimulation on expression of GDF9 and BMP15 from normal ovulatory women and women with PCOS [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2013, 34(6): 867-872.

(编辑 余菁)