

## 反复种植失败患者子宫内膜“种植窗”时期催产素受体的表达

夏婷婷<sup>1,2</sup>, 李洁<sup>2,3</sup>, 张媛<sup>4</sup>, 习羽<sup>5</sup>, 欧建平<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第三医院生殖医学中心, 广东广州 510630; 2. 中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东广州 510080; 3. 上海市第十人民医院生殖医学中心, 上海 200072; 4. 中山大学附属第三医院产科, 广东广州 510630; 5. 中山大学附属第三医院不育与性医学科, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】研究催产素受体(OTR)在反复种植失败(RIF)妇女的“种植窗”时期子宫内膜组织中的表达及其与RIF的关系,并了解正常妇女月经周期子宫内膜催产素受体的表达。【方法】采用免疫组化法和RT-PCR法检测OTR在正常妇女月经周期增殖早、中、晚期和分泌早、中、晚期子宫内膜组织及RIF妇女分泌中期子宫内膜组织的表达情况,其中正常妇女分泌中期10例,其他5个时期各3例;RIF妇女分泌中期10例。【结果】RIF妇女组子宫内膜组织分泌中期OTR蛋白质和mRNA显著高于正常妇女组( $P < 0.05$ )。正常妇女月经周期子宫内膜组织存在OTR/OTR mRNA的周期性表达。【结论】RIF妇女“种植窗”时期子宫内膜OTR/OTR mRNA高表达可能与RIF发生相关。

**关键词:**反复种植失败;催产素受体;子宫内膜

中图分类号:R711.74 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2020)04-0589-07

## Endometrial Expression of Oxytocin Receptor in Women with Repeated Implantation Failure During Implantation Window and in Normal Women During Menstrual Cycle

XIA Ting-ting<sup>1,2</sup>, LI Jie<sup>2,3</sup>, ZHANG Yuan<sup>4</sup>, XI Yu<sup>5</sup>, OU Jian-ping<sup>1</sup>

(1. Center for Reproductive Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Reproductive Medical Center, Tenth Shanghai People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China; 4. Department of Obstetrics, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 5. Department of Infertility and Sexual Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: LI Jie, E-mail: 13719332136@139.com; OU Jian-ping, E-mail: 1356048116@qq.com

**Abstract:**【Objective】To investigate the expression of endometrial oxytocin receptor (OTR) during the implantation window in women with repeated implantation failure (RIF) and its relationship with RIF, and to describe the characteristic of endometrial OTR of normal women during the menstrual cycle.【Methods】Immunohistochemistry and RT-PCR were performed on the endometrial tissue from early, middle, late proliferation and secretion phase of normal women, as well as middle secretion phase of women suffering from RIF to detect the endometrial OTR expression. Ten samples of the middle secretion phase and 5 samples of the other phases each of normal women were obtained. Ten samples of RIF women were obtained during the middle secretion phase.【Results】The OTR protein and mRNA expression of RIF patients was significantly higher than that of normal women in middle secretion phase ( $P < 0.05$ ). There was cyclic expression of OTR/OTR mRNA of the endometrial tissue of normal women.【Conclusion】The high expression of OTR/OTR mRNA during the im-

收稿日期:2020-02-26

基金项目:国家自然科学基金(201201201412);广东省科技计划项目(200704201003);广东省医学科研基金(A2020575)

作者简介:夏婷婷,硕士研究生,主治医师,研究方向:反复种植失败的诊治,E-mail:xiating@mail.sysu.edu.cn;李洁,通信作者,教授,主任医师,研究方向:卵巢功能调控和胚胎种植,E-mail:13719332136@139.com;欧建平,通信作者,主任医师,研究方向:生殖医学和反复种植失败,E-mail:1356048116@qq.com

plantation widow might participate in the occurrence of RIF.

**Key words:** repeated implantation failure; oxytocin receptor; endometrium

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(4): 589-595]

在过去40年,体外受精(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF)和胚胎培养技术得到飞速发展,胚胎种植率目前可高达50%以上<sup>[1]</sup>。然而仍有10%左右的患者在进行IVF治疗后经历反复种植失败(repeated implantation failure, RIF)<sup>[2]</sup>。某些专家认为移植优质胚胎至少3个新鲜或冷冻周期仍未能成功种植定义为RIF<sup>[2]</sup>。种植失败可能是由于子宫内膜容受性下降,胚胎缺陷或者混合因素<sup>[3]</sup>。允许胚胎种植的理想宫腔条件需要合适的子宫内膜状态,充足的子宫血供和缺少过度的子宫收缩<sup>[4]</sup>。比如,之前有报道胚胎移植时子宫过度收缩可能会导致胚胎从宫腔内排出,这也许是RIF的一个重要原因<sup>[5]</sup>。根据上述研究,我们推测子宫过度收缩可能通过降低子宫内膜容受性从而导致RIF。子宫收缩活动主要受多种生理物质如性激素、神经垂体激素、神经递质、前列腺素和催产素(oxytocin, OT)的高度调控<sup>[6]</sup>。因此,这些物质的表达水平失调或子宫对这些物质的异常反应可能导致子宫异常收缩。在这些物质中,OT被认为是最有效的促子宫收缩激素之一,其受体广泛表达于子宫肌层和子宫内膜,且越来越受到生殖医生的重视。大量研究<sup>[4,7-9]</sup>表明,抑制催产素受体(oxytocin receptor, OTR)可改善胚胎移植(embryo transfer, ET)期间子宫的容受性,提高RIF患者IVF治疗的成功率,提示OTR可能是治疗RIF的潜在靶点<sup>[5]</sup>。然而其他一些研究<sup>[10-11]</sup>表明,OTR拮抗剂未能提高IVF患者的活产率。此外,我们之前的研究<sup>[12]</sup>也表明在体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)周期中,RIF患者的血清OT水平没有显著升高。总之,OT/OTR虽然在调节子宫收缩方面起着重要作用,但其与胚胎着床失败的关系仍存在争议。事实上,OT对子宫收缩的影响不仅取决于血清水平,OTR的表达状态会直接影响子宫对OT敏感性<sup>[13]</sup>。因此,仅根据血清OT水平来确定体外受精患者是否应用OTR拮抗剂是不合理的,这也许能解释为什么OTR拮抗剂在改善IVF生育结局方面的结论不一致。显然,为了提高胚胎植入的成功率,生殖医生在决定用OTR

拮抗剂治疗IVF患者时必须同时考虑OT和OTR的表达水平。故而阐明OTR在RIF患者“种植窗”时期子宫内膜的表达非常关键。目前暂时没有对RIF患者“种植窗”时期子宫内膜OTR表达的研究报道,本研究首次选择RIF妇女和正常妇女作为研究对象,测定正常妇女月经周期和RIF妇女“种植窗”时期子宫内膜OTR的表达,希望探讨OTR在子宫内膜组织月经周期的表达规律及其与RIF的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择2010年10月至2016年8月在中山大学附属第一医院和附属第三医院生殖中心进行助孕治疗的妇女35名,年龄范围24~43岁。入选标准:月经周期规则,基础内分泌正常。排除标准:子宫肌瘤、腺肌瘤及内膜息肉、盆腔炎症、宫腔粘连、子宫内膜增殖症等病变,3个月内未使用过激素治疗。其中已自然生育,因输卵管阻塞或男方因素导致继发不孕要求再生育的女性志愿者25名;反复种植失败妇女10名。本研究获中山大学附属第三医院伦理委员会批准,已取得患者知情同意。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 取材** 根据月经周期天数,采用经阴道超声监测卵泡发育,结合血、尿促黄体激素(luteinizing hormone, LH)测定,分别于卵泡早、中晚期和黄体早、中晚期进行微创组织活检,获取子宫前、后壁内膜组织约0.3 g作为实验材料。部分子宫内膜组织经40 g/L多聚甲醛固定用于制备组织切片,部分行病理组织学检查以确定子宫内膜的组织时相,共分为6个时期:增殖早期(early proliferation phase, EPP)、增殖中期(middle proliferation phase, MPP)、增殖晚期(late proliferation phase, LPP)、分泌早期(early secretory phase, ESP)、分泌中期(middle secretory phase, MSP)和分泌晚期(late secretory phase, LSP),部分直接冻存于液氮,备用于提取总RNA样品。本研究中35例患者各取材1次,正常

妇女组 25 例共 6 个时间点,其中 5 个时期(EPP、MPP、LPP、ESP、LSP)各 3 例患者,MSP 有 10 例患者进行了取材,反复种植失败组 10 例患者均于 MSP 各取材 1 次。本研究采用组织活检法获取子宫内膜组织,其方法的可靠性已在我们前期报道中证实<sup>[14]</sup>。此外,分泌中期为胚胎种植的最佳时期,即“种植窗”时期,因此我们选择 RIF 妇女分泌中期子宫内膜组织进行活检并检测 OTR 表达水平。

**1.2.2 免疫组化检测 OTR** 脱蜡前,将组织石蜡切片室温中放置 60 min。石蜡组织切片用二甲苯脱蜡浸泡 3 次,每次 10 min;无水乙醇中浸泡 2 次,每次 5 min;95%的乙醇中浸泡 5 min;75%的乙醇中浸泡 5 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;3% $H_2O_2$  浸泡切片,室温静置 25 min,以消除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水洗 2 次,每次 2 min;柠檬酸盐微波热修复,高温档至液体沸腾后,换至中低温档 10 min,自然冷却;PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加正常牛血清封闭液,室温 50 min,甩去多余液体;滴加 OTR 多克隆抗体 30  $\mu$ L(浓度 1:100, ab 13051, abcam), 4  $^{\circ}$ C 过夜;过夜后在室温复温 45 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 EnVision<sup>TM</sup> Detection Kit 中的二抗,室温孵育 45 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min, DAB 显色 12 s;苏木精复染 15 s,自来水冲洗 10 min;梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封固、镜检。每张切片 400 倍镜下随机拍取 5 个不重叠视野,子宫内膜 OTR 蛋白阳性表达表现为黄色或棕黄色颗粒。应用 Image Pro Plus 5.0 分析软件对各视野进行分析,测量出目标蛋白在组织中的光密度,然后计算积分光密度(integrated optical density, IOD) 值,各切片中目标蛋白平均 IOD 值的大小表示 OTR 表达的强弱。

**1.2.3 RT-PCR 检测 OTR mRNA** 液氮中取出样品,立即于研钵中利用液氮研磨子宫内膜组织使其呈粉末状,移入 1.5 mL 离心管并加入 1 mL Trizol,吹打混合;加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min;12 000 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min。样品分为 3 层:底层为黄色有机相,上层为无色水相和一个中间层。将上层水相转移到新的 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇,轻轻混匀,室温放置 10 min;12 000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,可见白色沉淀,弃上清;加入用 DEPC 水配制的 75%乙醇 1 mL,震荡混合,7 500 $\times$ g, 4  $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃上清;室温放置干燥 RNA 沉淀,大约在空气中晾 5~10 min。加入 25~30  $\mu$ L 无 RNase 的水,用枪头吸打几次,55  $^{\circ}$ C~60  $^{\circ}$ C 放置

10 min 使 RNA 溶解,每份样品取 1  $\mu$ L 用于检测 RNA 浓度,其余储存于 -80  $^{\circ}$ C 备用。取 1  $\mu$ L RNA 溶液加去离子水 49  $\mu$ L 稀释 50 倍,设定核酸/蛋白测定仪的相应参数,以去离子水空白管调零,在仪器上直接读取 RNA 浓度和纯度的数值。所读取的 RNA 样品  $OD_{260}/OD_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间。利用 M-MLV First Strand 和 Premix Taq<sup>+</sup> 试剂盒进行 RT-PCR 半定量分析,PCR 反应条件如下:94  $^{\circ}$ C 5 min,为第一步,1 个循环;94  $^{\circ}$ C 30 s, 53  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s,为第二步,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min,为第三步,1 个循环。配制 1.5%的琼脂糖凝胶,PCR 反应结束后跑电泳,恒压 85 V,约 45 min。凝胶自动成像分析软件系统处理扫描电泳结果。

### 1.3 统计学分析

全部数据用  $M(P_{25}\sim P_{75})$  表示,应用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,数据呈正态分布且方差齐的数据采用  $t$  检验,不服从正态分布的计量资料采用秩和检验。服从正态分布且方差齐性的多组计量资料比较采用方差分析法,方差分析中两两比较采用 Bonferroni 法,方差不齐时采用秩和检验。双侧检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 正常和 RIF 妇女基本特征及 MSP 期子宫内膜 OTR 及 OTR mRNA 表达

共采集正常和 RIF 妇女分泌中期子宫内膜组织各 10 例,两组基本特征如年龄, BMI, 基础 FSH, LH 和 E2 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 表 1)。通过免疫组织化学实验,应用 Image Pro Plus 5.0 分析软件进行分析,比较 RIF 和正常妇女分泌中期 OTR 蛋白质的表达,发现分泌中期 OTR 蛋白质在 RIF 组的表达水平明显高于正常妇女组的表达水平,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 1, 图 1)。通过 RT-PCR 实验,比较 RIF 妇女和正常妇女分泌中期 OTR mRNA 的表达,发现分泌中期 mRNA 在 RIF 组的表达水平明显高于正常妇女组的表达水平,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 1, 图 2)。

### 2.2 OTR 在子宫内膜组织的定位表达

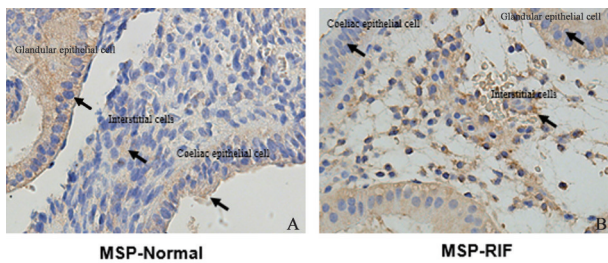
**2.2.1 月经周期子宫内膜组织学比较** 共采集正常妇女增殖早、中、晚期和分泌早、中、晚期子宫内膜组织各 3 例,组织学分析显示卵泡发育及排卵时期与子宫内膜组织学分期符合,提示标本来源于卵

表1 正常和RIF妇女基本特征及MSP期子宫内膜OTR表达的比较

Table 1 Clinical characteristics, OTR proteins and OTR mRNA in normal women and RIF women [M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)]

	Normal (n = 10)	RIF (n = 10)	Z	P
Average age/years	31.00 (29.75~33.00)	33.50 (32.25~35.00)	-1.33	0.199
BMI	20.23 (18.98~22.28)	21.23 (20.45~21.89)	-0.345	0.734
Baseline FSH/(U/L)	4.87 (3.97~6.92)	5.91 (4.61~7.23)	-1.083	0.293
Baseline LH/(U/L)	2.81 (2.47~4.40)	2.41 (1.86~3.52)	1.168	0.258
Baseline E2/(pg/mL)	38.50 (22.75~40.25)	44.00 (36.50~53.50)	-1.934	0.069
OTR proteins	0.15 (0.12~0.18)	0.20 (0.16~0.32)	-2.517	0.022
OTR mRNA	0.47 (0.43~0.52)	0.56 (0.48~0.59)	-2.297	0.034

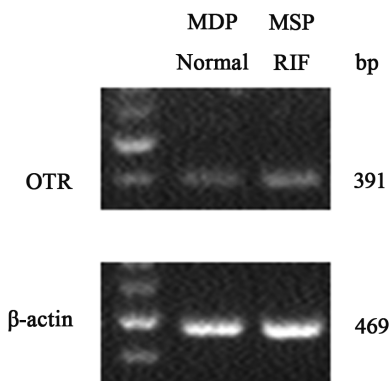
Data was presented by the median (P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>). BMI: body mass index; FSH: follicle stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; E2: estradiol; OTR: oxytocin receptor.



OTR: oxytocin receptor; MSP: Middle secretory phase; RIF: repeated implantation failure. The expression of OTR was positive by yellow-brown staining. A: endometrial tissue of MSP from normal women, ×400; B: endometrial tissue of MSP from RIF women, ×400.

图1 不同组别患者分泌中期子宫内膜组织OTR免疫组织化学染色

Fig.1 Representative immunohistochemical staining of OTR in endometrial tissues of MSP in different group



MSP: Middle secretory phase; RIF: repeated implantation failure

图2 正常和RIF妇女分泌中期子宫内膜OTR mRNA表达

Fig.2 Expression of OTR mRNA in the endometrium of RIF women and normal women in MSP

泡和子宫内膜发育同步的妇女。

2.2.2 子宫内膜组织OTR的免疫组化二步法定位表达 免疫组织化学结果显示OTR在正常妇女月经周期增殖早、中、晚期和分泌早、中、晚期子宫内膜组织均有表达,OTR表达主要定位于胞浆,在上皮细胞中表达更强(图3)。

### 2.3 正常月经周期子宫内膜组织OTR及OTR mRNA表达

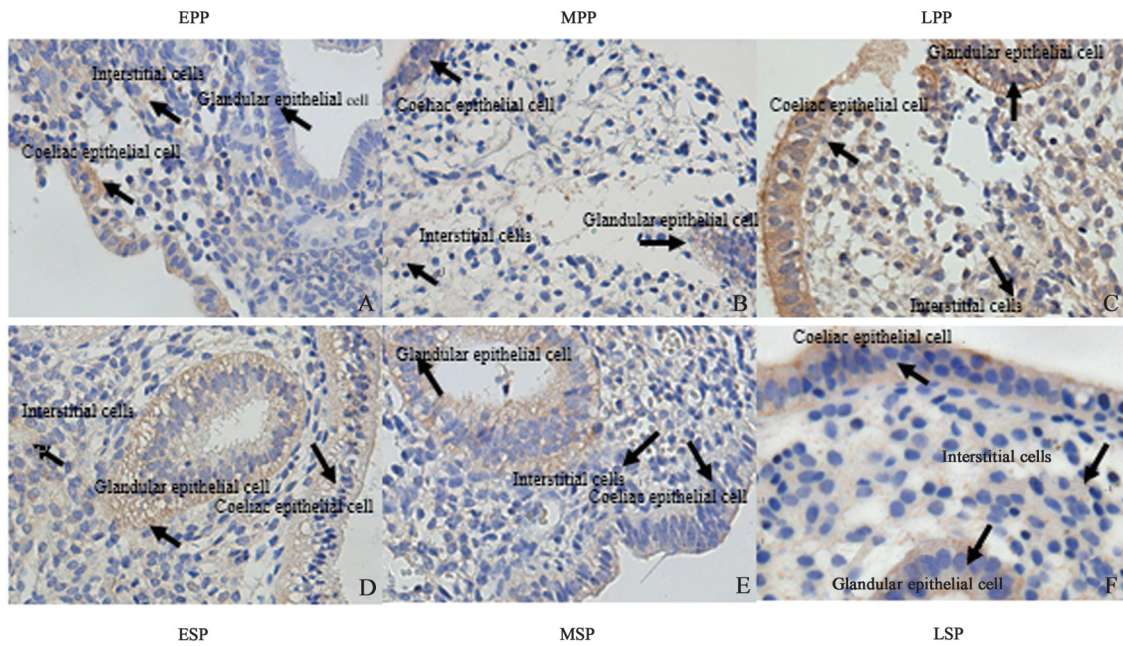
OTR蛋白质在EPP、MPP、LPP、ESP、MSP和LSP表达差异无统计学意义(P > 0.05)。OTR mRNA在EPP、MPP、LPP、ESP、MSP和LSP表达差异无统计学意义(P > 0.05)。正常妇女在体子宫内膜OTR及OTR mRNA在增殖期呈上升趋势,分泌期呈下降趋势,增值晚期达到峰值(表2,图3,4)。

## 3 讨论

我们的研究显示RIF妇女子宫内膜组织分泌中期OTR蛋白质和mRNA显著高于正常妇女。正常妇女月经周期子宫内膜存在OTR的周期性表达在增殖期呈上升趋势,分泌期呈下降趋势,增值晚期达到峰值。

### 3.1 OTR与RIF的关系

研究显示子宫内膜容受性降低,胚胎缺陷和其他因素共同导致RIF<sup>[3]</sup>。既往研究报道<sup>[5]</sup>有三分之一的超促排卵患者在胚胎移植前可观察到子宫收缩加强。胚胎移植时子宫收缩频率高的患者妊娠率和种植率显著低于子宫收缩频率低患者,并发



EPP: early proliferation phase; MPP: middle proliferation phase; LPP: late proliferation phase; ESP: early secretory phase; MSP: middle secretory phase; LSP: late secretory phase. The expression of OTR was positive by yellow-brown staining. The expression of OTR was mainly located in the cytoplasm of endometrial epithelial cells and stromal cells in the proliferative and secretory phases of normal women. A: endometrial tissue of EPP from normal women,  $\times 400$ ; B: endometrial tissue of MPP from normal women,  $\times 400$ ; C: endometrial tissue of LPP from normal women,  $\times 400$ ; D: endometrial tissue of ESP from normal women,  $\times 400$ ; E: endometrial tissue of MSP from normal women,  $\times 400$ ; F: endometrial tissue of LSP from normal women,  $\times 400$ .

图3 正常月经周期子宫内膜 OTR 免疫组织化学染色

Fig.3 Representative IHC staining of OTR in the endometrium of normal women during the menstrual cycle

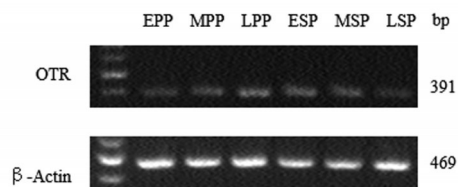
表2 正常月经周期子宫内膜组织 OTR 及 OTR mRNA 表达

Table 2 Expression of OTR and OTR mRNA in endometrium of normal women during menstrual cycle

[ $M(P_{25} \sim P_{75}), n=3$ ]

Groups	OTR	OTR mRNA
EPP	0.14 (0.11~0.14)	0.46 (0.45~0.49)
MPP	0.12 (0.10~0.16)	0.51 (0.49~0.57)
LPP	0.35 (0.31~0.36)	0.62 (0.62~0.68)
ESP	0.22 (0.19~0.23)	0.57 (0.54~0.58)
MSP	0.16 (0.14~0.17)	0.46 (0.45~0.47)
LSP	0.09 (0.08~0.16)	0.48 (0.44~0.52)
<i>H</i>	10.169	10.554
<i>P</i>	0.071	0.061

Data was presented by the  $M(P_{25} \sim P_{75})$ . EPP: early proliferation phase; MPP: middle proliferation phase; LPP: late proliferation phase; ESP: early secretory phase; MSP: middle secretory phase; LSP: late secretory phase; OTR: oxytocin receptor. Differences among the six groups were analyzed by Kruskal-Wallis test.



EPP: early proliferation phase; MPP: middle proliferation phase; LPP: late proliferation phase; ESP: early secretory phase; MSP: middle secretory phase; LSP: late secretory phase.

图4 正常月经周期中子宫内膜组织 OTR mRNA 表达

Fig.4 Expression of OTR mRNA in the endometrium of normal women during the menstrual cycle

现妊娠率和种植率与子宫收缩频率呈负相关,可能是由于子宫收缩活动增加导致胚胎排出<sup>[15]</sup>。基于上述研究,我们推测子宫收缩频率增加可能会导致 IVF-ET 治疗中发生 RIF。

OTR 属于 G 蛋白偶联受体超家族,受受体表达、受体脱敏和 OT 局部浓度变化的调节,OTR 激活可触发许多信号事件从而刺激收缩<sup>[16]</sup>。由于 OT/

OTR在诱导子宫收缩中起重要作用,OTR拮抗剂能够抑制催产素诱导的子宫收缩<sup>[17]</sup>。近期较多关于OTR拮抗剂能否提高RIF患者的妊娠率的研究。Pierzynski<sup>[4]</sup>首次报道了一位RIF患者在胚胎移植前通过B超监测到高频子宫收缩,使用OTR拮抗剂后收缩频率下降,后成功获得妊娠并活产的案例,Lan<sup>[9]</sup>的研究也显示在激素替代冷冻周期使用OTR拮抗剂有可能让RIF患者获益。首个旨在探讨OTR拮抗剂是否改善IVF-ET后临床妊娠率的前瞻性、随机、安慰剂对照的临床研究<sup>[18]</sup>同样表明ET前使用OTR拮抗剂治疗可有效改善种植率。近年一项荟萃分析<sup>[19]</sup>的结论同样认为OTR拮抗剂能提高RIF患者的种植率,临床妊娠率和活产率。尽管这些观察结果很有趣,但目前大多数生殖科并不常规使用OTR治疗RIF。一项多中心、随机、双盲的研究<sup>[10]</sup>显示在ET期间使用OTR拮抗剂并不能提高妊娠率和种植率。然而,这项研究仅移植卵裂期胚胎,没有测量子宫收缩频率和强度,研究人群也不能代表RIF妇女。本研究组前期研究<sup>[12]</sup>提示反复种植失败患者和正常妇女血清OT水平没有统计学差异。可惜的是,这项研究并没有报道RIF患者“种植窗”时期子宫内膜组织OTR的表达。如前所述,OT及其受体在调节子宫收缩程度中起着关键作用,且子宫上有功能性OTR表达<sup>[13,20]</sup>。子宫收缩的频率和强度取决于OT与子宫OT受体的结合。本研究对自然周期分泌中期正常妇女和反复种植失败妇女的子宫内膜OTR表达进行了检测,结果提示RIF妇女组子宫内膜组织分泌中期OTR蛋白质和mRNA显著高于正常妇女组。RIF患者“种植窗”时期子宫内膜组织OTR高表达可能通过与OT相互作用,增强子宫内膜收缩强度和频率,影响子宫内膜容受性,从而影响RIF的发生。因此我们的结果进一步支持OTR拮抗剂可以用于治疗RIF妇女的观点。

### 3.2 OTR/OTR mRNA在月经周期的表达变化

Dawood等<sup>[21]</sup>对正常月经妇女围“种植窗”时期子宫内膜组织通过免疫组织化学方法对OTR进行定位分析,发现OTR主要在腺上皮细胞表达,在间

质细胞有少量表达,这与本研究的结果一致。亦有研究报道OTR在子宫内腺上皮表达;在排卵期,即月经第14天,OTR mRNA表达量最高;在分泌晚期,OTR的含量很低;在子宫内膜间质细胞没有发现OTR的信号<sup>[22]</sup>。与该研究相同的是,本研究结果显示子宫内膜OTR及OTR mRNA表达在增殖期有上升趋势,分泌期有下降趋势,增值晚期达到峰值。与该研究不一致的是,本研究通过免疫组织化学的方法和IPP分析软件对OTR在子宫内膜的表达进行定位和半定量研究,结果提示增殖期和分泌期子宫内膜上皮和间质细胞均存在OTR表达,但在上皮细胞的表达更强。这可能是由于后一项研究与本研究使用的实验试剂和方法不同导致的。

### 3.3 子宫OTR/OTR mRNA表达的调节

有文献<sup>[23]</sup>报道雌二醇上调人子宫OTR基因的表达水平。IVF-ET治疗周期中,控制性超排卵带来了高水平雌激素,并持续整个种植窗时期,这可能会导致子宫内膜分泌中期OTR表达异常增高,从而影响胚胎种植。本研究检测的是自然周期OTR和OTR mRNA的表达水平,结果显示LPP子宫内膜OTR表达显著高于其他时期,可能与月经周期中LPP血清E2表达水平最高有关。

本研究的主要目的是了解RIF妇女子宫内膜OTR的表达,因此我们并没有监测子宫内膜收缩性;由于受到IVF治疗周期取内膜进行活检的限制,本研究所选取的内膜均是在自然周期,因此我们选取月经周期规则生育力正常和有RIF史的妇女;子宫内膜活检是一种有创的检查,导致本研究样本量较小。

综上,我们的研究数据表明正常妇女月经周期子宫内膜组织存在OTR的周期性表达,在增殖期有上升趋势,分泌期有下降趋势,增值晚期达到峰值。我们的实验结果显示RIF患者子宫内膜“种植窗”时期OTR高表达可能与RIF发生相关,具体的因果关系需要进一步探讨。本研究提示胚胎移植时应用OTR拮抗剂可能成为RIF的治疗新策略,未来需要更多的研究来对此进一步地证实。

#### 参考文献

[1] Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, et al. Forty years of IVF [J]. Fertil Steril, 2018, 110 (2) :

185-324.

[2] Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management [J]. Reprod Biomed Online, 2014, 28(1): 14-38.

- [3] Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, et al. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET [J]. *Hum Rep*, 2006, 21 (12): 3036-3043.
- [4] Pierzynski P, Reinheimer TM, Kuczynski W. Oxytocin antagonists may improve infertility treatment [J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(1): 213.
- [5] Pierzynski P, Zbucka-Kretowska M. Uterine contractile activity at embryo transfer--as a new pharmacotherapeutic target in assisted reproduction [J]. *Ginekol Pol*, 2014, 85(8): 609-613.
- [6] Dittrich R, Mueller A, Oppelt PG, et al. Differences in muscarinic-receptor agonist-, oxytocin-, and prostaglandin-induced uterine contractions [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(5): 1694-1700.
- [7] Liang YL, Kuo TC, Hung KH, et al. Oxytocin antagonist for repeated implantation failure and delay of delivery [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2009, 48 (3): 314-316.
- [8] Chou PY, Wu MH, Pan HA, et al. Use of an oxytocin antagonist in in vitro fertilization-embryo transfer for women with repeated implantation failure: a retrospective study [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2011, 50(2): 136-140.
- [9] Lan VT, Khang VN, Nhu GH, et al. Atosiban improves implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(3): 254-260.
- [10] Ng EH, Li RH, Chen L, et al. A randomized double blind comparison of atosiban in patients undergoing IVF treatment [J]. *Hum Rep*, 2014, 29(12): 2687-2694.
- [11] Kim SK, Han EJ, Kim SM, et al. Efficacy of oxytocin antagonist infusion in improving in vitro fertilization outcomes on the day of embryo transfer: A meta-analysis [J]. *Clin Exp Rep Med*, 2016, 43 (4): 233-239.
- [12] Xia T, Liu Q, Ye Q, et al. Serum oxytocin profiles in patients with repeated implantation failure during IVF cycles [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(12): 1048-1052.
- [13] Friebe-Hoffmann U, Baston DM, Hoffmann TK, et al. The influence of interleukin-1beta on oxytocin signalling in primary cells of human decidua [J]. *Regul Pept*, 2007, 142(3): 78-85.
- [14] Li J, Tan Z, Li M, et al. Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the prereceptive and receptive phases after luteinizing hormone surge [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1161-1163.
- [15] Fanchin R, Ayoubi JM. Uterine dynamics: impact on the human reproduction process [J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18(S2): 57-62.
- [16] Arrowsmith S, Wray S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium [J]. *J neuroendocrinol*, 2014, 26(6): 356-369.
- [17] Nanetti L, Raffaelli F, Giulietti A, et al. Oxytocin, its antagonist atosiban, and preterm labor: a role for placental nitric oxide [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2015, 28(5): 611-616.
- [18] Moraloglu O, Tongue E, Var T, et al. Treatment with oxytocin antagonists before embryo transfer may increase implantation rates after IVF [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(3): 338-343.
- [19] Huang QY, Rong MH, Lan AH, et al. The impact of atosiban on pregnancy outcomes in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer: A meta-analysis [J]. *PloS one*, 2017, 12(4): e0175501.
- [20] Kim SH, Pohl O, Chollet A, et al. Differential effects of oxytocin receptor antagonists, atosiban and nolasiban, on oxytocin receptor-mediated signaling in human amnion and myometrium [J]. *Mol pharmacol*, 2017, 91(4): 403-415.
- [21] Dawood MY, Lau M, Khan-Dawood FS. Localization and expression of oxytocin receptor and its messenger ribonucleic acid in peri-implantation phase human endometrium during control and clomiphene-treated cycles [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, 181 (1): 50-56.
- [22] Ono M, Maruyama T, Masuda H, et al. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (47): 18700-18705.
- [23] Richter ON, Kubler K, Schmolling J, et al. Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10 (5): 339-346.

(编辑 余菁)