

轻微型和控制型卵巢刺激对卵巢低反应患者 卵泡液微环境的不同影响

李婷婷, 张晓莉, 黄睿

(中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广东广州 510655)

摘要:【目的】比较卵巢低反应患者进行卵巢轻微刺激和控制性卵巢刺激体外受精-胚胎移植(IVF-ET)周期中卵泡液内激素水平、细胞因子的差异及其与获卵数、胚胎数等的关系。【方法】本研究为观察性研究。招募符合博洛尼亚标准的卵巢低反应患者,随机分为实验组(组2)和对照组(组1)。实验组采用来曲唑及低剂量外源性促卵泡生成素(Gn)进行卵巢轻微刺激,对照组采用常规控制性卵巢刺激(黄体期GnRH激动剂修饰长方案)进行卵巢刺激。于取卵日收集成熟卵泡(>16 mm)的卵泡液,其中实验组共23例,对照组共28例,测量卵泡液中促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌激素(E₂)、孕激素(P)、睾酮(T)和抗苗勒管激素(AMH)水平,以及抑制素(inhibin)、生长分化因子9(GDF9)和骨形成蛋白家族(BMP)水平。统计分析卵泡液中各激素、因子水平与获卵数、可利用胚胎数及优质胚胎数的相关性。【结果】实验组和对照组患者基本情况各指标之间:年龄、不孕年限、基础FSH、和窦卵泡数(AFC)差异均无显著性意义($P>0.05$)。与对照组相比,实验组Gn用量更少,但两组的获卵数,可利用胚胎数及优质胚胎数差异均无统计学意义($P>0.05$)。与对照组相比,实验组卵泡液中LH水平、睾酮水平和inhibin B水平明显增高,而FSH水平、inhibin A水平、BMP8B和GDF9水平明显降低。其他几种激素水平,包括E₂、P、AMH和BMP2、6、8B、15水平,两组间差异无显著性意义($P>0.05$)。相关分析显示,卵泡液中各激素和细胞因子水平均与获卵数、可移植胚胎数及优质胚胎数无相关性。【结论】POR患者使用不同的轻微刺激和常规控制性卵巢刺激,卵泡微环境不同。但未发现这些变化与获卵数、可利用胚胎数、优质胚胎数存在相关性。

关键词: 卵巢轻微刺激; 卵巢低反应; 卵泡液微环境

中图分类号: R711.75

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)05-0736-06

Hormonal Profile of Follicular Fluid between Mild Stimulation and Controlled Ovarian Hyperstimulation IVF Cycles in POR Patients

LI Ting-ting, ZHANG Xiao-li, HUANG Rui

(Reproductive Medicine Research Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: HUANG Rui, E-mail: drhuangr@sina.com

Abstract: 【Objective】 To compare the hormonal milieu of follicular fluid from pre-ovulatory follicles between mild stimulation and controlled ovarian hyperstimulation (COH) in-vitro fertilization (IVF) cycles in poor ovarian response (POR) patients. 【Methods】 From August to November 2014, follicular fluid was prospectively collected from 51 POR patients undergoing IVF treatment stimulated with mild stimulation ($n=23$) or COH (GnRH agonist long “stop” protocol, $n=28$), Follicular fluid (FF) was collected from one follicle larger than 16 mm and intra-follicular FSH, LH, estradiol

收稿日期: 2018-04-06

基金项目: 广东省医学科学基金(A2015025); 国家重点研发计划“生殖健康及重大出生缺陷防控研究”重点专项课题(2016YFC1000302)

作者简介: 李婷婷, 硕士, 研究方向: 生殖医学, E-mail: qingqingwenyuan@126.com; 黄睿, 通信作者, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: drhuangr@sina.com

(E₂), progesterone (P), testosterone(T) and anti-mullerian hormone (AMH) levels were assayed. The differences in FF hormonal profile between two groups were compared and the correlation between each identical hormonal level and number of oocytes retrieved, transferrable embryos or good-quality embryos was evaluated. 【Results】The differences in basic characteristics, such as age, AFC, basal FSH, E₂, LH and AMH levels between two groups had no statistical significant meaning. The dose of Gn consumption was significantly higher in COH group, while the number of oocyte retrieved, transferrable embryo and good quality embryo were same in two groups. Comparing with COH group, the FF LH and T levels were significantly higher, while the FSH, inhibin A, BMP 8B and GDF 9 level were significantly lower in mild stimulation group. No significant difference was observed in other hormones, including E₂, P, AMH and BMP2/6/8A/15. None of these hormones was found to be correlated with the number of oocyte retrieved, transferrable embryos, or good quality embryos (all with $P>0.05$). 【Conclusions】Comparing with COH group, the intra-follicular LH, T and inhibin B were significantly higher, while FSH level was lower in mild stimulation group. No significant difference was observed in E₂, P, AMH and BMP2/6/8A/15 levels between two groups. The distinction of intra-follicular hormone profiles indicated that follicular microenvironment was varied between mild stimulation and COH, which might consequently have impact on the growth and maturation of oocyte.

Key words: mild stimulation; poor ovarian response; hormonal profile of follicular fluid

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2018, 39(5): 736-741]

卵巢低反应(poor ovarian response, POR)患者的助孕是目前辅助生殖技术最具挑战性的,因过多女性推迟生育年龄以及环境因素导致,POR发生率居高不下,并在各个生殖中心的治疗患者中司空见惯^[1]。对于POR患者,她们更焦虑进行体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)治疗的成功率,并注重咨询预测其成功率的指标有哪些,目前临床可预测患者成功率的指标有年龄、抗苗勒管激素(anti-müllerian hormone, AMH)、基础性激素等,对于POR患者,却缺乏强有力的证据和指标。临床治疗上,促排卵方案可以选择常规方案,如长方案、拮抗剂方案、短方案等,也有学者提出,微刺激方案更加适合POR患者,因其可利用卵子率、优质胚胎率都明显增加^[2]。微刺激与常规方案相比,是卵泡中部分激素和因子是否存在差异,是因激素和因子的差异是否导致卵子、胚胎质量的不同并不知晓。本研究就修饰长方案和微刺激方案对卵泡发育的不同,探讨卵巢低反应患者进行卵巢轻微刺激和控制性卵巢刺激IVF-ET周期中卵泡液内激素、相关细胞因子水平的差异及其与获卵数、胚胎数等的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究为观察性研究,并取得中山大学附属

第六医院生殖伦理委员会批件。招募符合博洛尼亚标准的卵巢低反应患者:①年龄 ≥ 40 岁,或其他任何POR高危因素;②既往POR史(常规方案获卵数 ≤ 3 个);③卵巢储备功能试验异常:窦卵泡计数(antral follicle count, AFC) < 5 个;AMH $< (0.5 \sim 1.1)$ ng/mL,至少符合以上标准中任意两条即可^[3]。2014年8月到2016年4月在本中心行IVF助孕患者,签署相关知情同意后,随机分为实验组和对照组。于取卵日收集成熟卵泡(> 16 mm)的卵泡液,其中实验组共23例,对照组共28例,测量卵泡液中促卵泡生成素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌激素(estradiol, E₂)、孕激素(progesterone, P)、睾酮(testosterone, T)和抗苗勒管激素(anti-müllerian hormone, AMH)水平,以及抑制素(inhibin)、生长分化因子9(growth differentiation factor 9, GDF9)和骨形成蛋白家族(bone morphogenetic protein, BMP)水平。所有病例的排除标准为:合并卵巢早衰、子宫内膜异位症、高泌乳素血症、甲状腺功能异常者;曾接受过卵巢手术或放化疗者;近3个月内接受过促排卵治疗或服用性激素者。

1.2 助孕方法

实验组采用来曲唑及低剂量外源性促性腺激素(gonadotropin, Gn)进行卵巢轻微刺激,于月经第2~3天开始口服来曲唑每天5 mg,持续5 d,用药第2~4天给予基因重组促卵泡生成素(果纳芬, Merck Serono)150 U,用药第6天持续果纳芬直

至扳机日。对照组采用常规控制性卵巢刺激(黄体期 GnRH 激动剂修饰长方案)进行卵巢刺激,黄体期开始给予短效 GnRH 激动剂(达必佳, Ferring)每天 0.1 mg, 14 d 后复查女性基础内分泌项目、阴超, 达降调标准后开始用 Gn(果纳芬, Merck Serono)225~300 U 启动, 于出现 3 个 17 mm 以上优势卵泡或主导卵泡直径 > 18 mm 以上时采用重组人绒毛膜促性腺素 α (艾泽, Merck Serono)250 μ g 扳机。在扳机后 36~38 h 行超声引导下取卵, 根据精子质量采用常规 IVF 或卵母细胞内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 方式受精, 观察到受精正常的胚胎放入 G1 培养液 (Vitrone, Sweden) 中培养。卵裂期胚胎根据本中心评分标准^[4]对胚胎进行评分: 1 级, 细胞大小均匀, 形状规则, 透明带完, 碎片 0~5%; 2 级, 细胞大小略不均匀, 形状略不规则, 碎片 5.2%~20%; 3 级, 细胞大小明显不均匀, 碎片 21%~50%; 4 级, 细胞大

小严重不均匀, 碎片 50% 以上。所有胚胎均采用统一的培养箱(日本 ASTEC 培养箱)进行培养。

1.3 样品收集及激素测定

51 位 POR 患者, 收集超促排卵患者在 B 超下经阴道穿刺卵泡采集的第一管清亮卵泡液, 以 2500 r/min(离心机半径为 16 cm)离心 5 min, 去沉淀, 取上清用于后续激素和生长因子的检测。化学发光法分别检测卵泡液中的 FSH、E₂、LH、P、T、AMH。使用 Roche 公司 E170 电化学发光分析仪、配套试剂及标准品。酶联免疫法 (ELISA) 检测卵泡液中 inhibin 和 BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP8、BMP15、GDF9 浓度, 使用 CUSABIO 公司 ELISA KIT 配套试剂及相应的操作说明操作。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行处理, 计量资料采用均值 \pm 标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为组间差异有统计学意义。

表 1 两组患者基本信息的比较
Table 1 Comparison of general conditions between two groups ($\bar{x} \pm s$)

General indicators	Group 1 (n = 28)	Group 2 (n = 23)	<i>t</i>	<i>P</i>	95%CI
Age/years	36.1 \pm 5.4	37.6 \pm 4.6	-1.007	0.319	(-4.262, 1.417)
AFC	4.9 \pm 1.4	4.7 \pm 1.7	0.452	0.653	(-0.679, 1.073)
BMI/(kg/m ²)	23.2 \pm 3.0	22.0 \pm 3.2	1.416	0.163	(-0.5132, 2.9633)
Duration of infertility/years	4.7 \pm 4.5	5.9 \pm 5.2	-0.869	0.389	(-3.959, 1.569)
AMH/(ng/mL)	0.89 \pm 0.54	0.69 \pm 0.61	1.236	0.222	(0.1993, 0.1612)
Basal FSH/(U/L)	8.9 \pm 4.4	10.0 \pm 5.5	-0.817	0.418	(-3.8974, 1.6434)
Basal LH/(U/L)	4.3 \pm 2.4	4.0 \pm 2.0	0.380	0.706	(-1.0310, 1.5113)
Basal E ₂ /(pg/mL)	43 \pm 19	36 \pm 21	1.128	0.265	(6.2688, 5.5561)
Basal T/(nmol/L)	0.28 \pm 0.19	0.29 \pm 0.25	-0.177	0.860	(-0.1332, 0.1116)
GN dose	2833 \pm 581	867 \pm 235	15.218	< 0.001	(1722.084, 2209.205)
Stimulation day	9.8 \pm 1.7	5.8 \pm 1.7	8.490	< 0.001	(3.083, 4.995)
HCG day LH/(U/L)	2.4 \pm 1.5	5.7 \pm 3.8	-4.305	< 0.001	(-5.08241, -1.64069)
HCG day E ₂ /(pg/mL)	1178 \pm 561	668 \pm 718	2.814	0.007	(144.05279, 63.81088)
HCG day P/(ng/mL)	0.62 \pm 0.40	0.51 \pm 0.36	1.048	0.300	(-0.1035, 0.3290)
HCG day 10~13 mm F	1.14 \pm 1.46	0.87 \pm 0.69	0.824	0.414	(-0.393, 0.940)
HCG day 14~17 mm F	1.50 \pm 1.32	0.87 \pm 1.18	1.780	0.081	(-0.081, 1.342)
HCG day >17 mm F	2.50 \pm 1.55	2.43 \pm 1.27	0.162	0.872	(-0.745, 0.876)
No. of oocyte	2.82 \pm 2.61	2.87 \pm 2.01	-0.082	0.935	(-1.232, 1.136)
No. of 2PN	1.82 \pm 1.79	1.65 \pm 1.19	0.389	0.699	(-0.706, 1.044)
No. of transferrable embryo	1.54 \pm 1.48	1.22 \pm 1.00	0.880	0.383	(-0.408, 1.045)
No. of good quality embryo	1.14 \pm 1.35	1.04 \pm 0.98	0.295	0.770	(-0.578, 0.777)

The data were expressed as the mean \pm SD, and Student's *t*-test was used for comparisons between two groups

AFC: antral follicle cont; BMI: body mass index; AMH: anti-müllerian hormone; FSH: follicle stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; E₂: estradiol; T: testosterone; P: progesterone

2 结果

实验组(组2)和对照组(组1)患者基本情况各指标之间:年龄、不孕年限、基础FSH、AMH和AFC差异均无显著性意义(P 均 >0.05)。与对照组相比,实验组Gn用量更少,但两组的获卵数,可利用胚胎数及优质胚胎数差异均无统计学意义(P 均 >0.05 ,表1)。

与对照组相比,实验组卵泡液中LH水平、T水平和inhibin B水平明显增高,而FSH水平、inhibin A水平、BMP8B和GDF9水平明显降低。其他几种激素水平,包括 E_2 、P、AMH和BMP2、6、8B、15水平,两组间差异无统计学意义(P 均 >0.05 ,表2)。

3 讨论

在辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)中促排卵治疗已经成为重要环节。微刺激促排卵方案明显降低Gn用量,缩短治疗时间,有效预防卵巢过度刺激综合征,同时也取得较理想的成功率。因此微刺激促排卵方案正在越来越广泛地应用在IVF治疗周期。在卵母细胞成熟

的整个过程中,卵泡液成分改变等因素必然影响卵母细胞质量及后续的受精和胚胎发育情况^[5],而微刺激方案用药和剂量不同,可能会引起卵泡液成分改变,其与常规控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)对比,部分卵泡液成分是有相应改变。

微刺激方案与COH周期相比,卵泡液中的FSH水平更高,这与两种方案的用药有关,卵泡液中FSH水平与血清中的FSH水平正相关,研究证实了这一点。卵泡液中更低的FSH水平的临床意义仍不明,但是已有研究显示,过度的卵巢刺激损害早期胚胎的发育潜能并增加其染色体非整倍体发生率^[6]。同时,人类研究也显示尽管自然周期和控制性卵巢刺激周期获得的胚胎形态学评分没有显示出差异^[7],但卵子染色体非整倍体发生率却与Gn用量呈现剂量依赖的正相关关系。体外实验也证实,体外成熟过程中,添加高浓度FSH会导致卵子的非整倍体发生率增高^[8]。所有这些研究都提示,微刺激方案所产生的卵泡中卵泡液里更低的FSH水平,更有利于卵子的发育和生长。

来曲唑是芳香化酶抑制剂,由于抑制了颗粒细胞的芳香化酶,所以使得睾酮生成雌激素通路受阻,从而使得底物堆积,因而卵泡液中的T明显增高。但是我们还无法解释为何两组卵泡液中的

表2 各项激素和因子在两组卵泡液的表达及其差异
Table 2 Expression of hormones and factors between two groups

Item	Group 1	Group 2	<i>t</i>	<i>P</i>	95%CI
FSH/(U/L)	10.0 ± 5.0	6.8 ± 2.6	2.819	0.007	(0.9263, 5.527)
LH/(U/L)	1.8 ± 2.6	7.0 ± 4.3	-5.347	< 0.001	(-7.3323, -3.1629)
Estradiol/(ng/mL)	523 ± 274	550 ± 187	-0.400	0.691	(-161801, 108051)
Prolactin/(μg/L)	46 ± 22	31 ± 12	2.964	0.003	(5.3750, 24.8903)
Testosterone/(nmol/L)	5.9 ± 5.0	20.0 ± 0.0	-13.695	< 0.001	(0.9343, -16.0603)
AMH/(ng/mL)	1.70 ± 1.24	1.41 ± 0.79	0.946	0.349	(-0.3171, 0.8816)
Inhibin A/(pg/mL)	0.23 ± 0.03	0.12 ± 0.06	7.787	< 0.001	(0.0813, 0.1384)
Inhibin B/(pg/mL)	0.24 ± 0.14	0.33 ± 0.05	-2.916	0.007	(-0.1596, -0.0278)
BMP 2/(pg/mL)	0.68 ± 0.23	0.84 ± 0.39	-1.583	0.122	(-0.3602, 0.0441)
BMP 6/(pg/mL)	0.15 ± 0.08	0.17 ± 0.13	-0.390	0.699	(-0.0813, 0.0550)
BMP 8A/(pg/mL)	0.22 ± 0.04	0.17 ± 0.04	4.102	< 0.001	(0.0265, 0.0781)
BMP 8B/(pg/mL)	0.18 ± 0.05	0.20 ± 0.08	-0.616	0.543	(-0.0600, 0.0323)
BMP 15/(pg/mL)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	-0.221	0.827	(-0.0098, 0.0079)
GDF 9/(pg/mL)	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	4.384	< 0.001	(0.0073, 0.0200)

The data were expressed as the mean ± SD, and Student's *t*-test was used for comparisons between two groups

FSH: follicle stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; AMH: anti-müllerian hormone

雌激素水平并没有明显的差异。有研究显示,卵泡局部高浓度的T可能有利于卵泡的募集^[9],2012年,有研究发现,在颗粒细胞的体外培养体系中,加入T,可以明显提高颗粒细胞FSH受体的水平^[10]。

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者的卵泡液中AMH水平与卵子的成熟、受精及其后胚胎的发育都有关^[11]。而另一篇文献发现,卵泡液中AMH水平可以预测胚胎是否种植,但作者在进行多元Logistic回归后,发现卵泡液中AMH水平的预测价值消失^[12]。随后一篇文献报道,卵泡液中AMH更高的患者,其卵子受精率更高,而胚胎质量也更好^[13]。这些研究都提示,卵泡液中高的AMH预示其中卵子的发育潜能更好,但Desforges-Bullet的研究^[14]却并不同意该观点。他们发现,IVF术后妊娠的患者,其卵泡液中的AMH浓度要显著低于那些并没有妊娠妇女卵泡液中的AMH浓度。但我们的研究并没有发现不同促排卵方案卵泡液中AMH存在差异,可能原因是两者均为POR状态,AMH已经在低值状态,因此两组之间没有检测到差别。

目前相关学者认为,血液inhibin的浓度在月经周期中有变化^[15],比卵泡液中inhibin与卵泡发育、卵巢反应性及获卵数更有关联性^[16]。研究表明垂体细胞培养液中inhibin A和B对FSH的合成分泌有负调节作用,这种负反馈作用在人和灵长类动物体内已得到直接证实^[17]。卵泡黄体过渡期inhibin B分泌增多与FSH一致,可能与颗粒细胞和卵泡数目增多有关,inhibin B浓度反映了生长发育卵泡的数量,同时inhibin通过旁分泌刺激LH

产生,间接使卵泡内膜细胞合成雄激素增多。本研究中微刺激方案患者卵泡液中inhibin B水平高于修饰长方案者,提示微刺激方案卵泡微环境可能更优越,卵子质量和卵子利用率也会更高。可能因为样本量的原因,仍不能解释inhibin A水平在微刺激方案中较修饰长方案低的原因和意义。

GDF9和BMP与卵泡发育的关系十分密切。GDF9和BMP同属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)超家族,在卵泡发育和卵母细胞成熟过程中都发挥重要的调节作用^[18]。研究发现两者可促进原始卵泡和初级卵泡的形成,并促进始基卵泡生长至次级卵泡,还可促进窦前卵泡到窦卵泡的转变,对卵丘膨胀也具有不可替代的作用^[19]。GDF9和BMP15参与了卵泡发育的整个过程,共同促进卵泡的发育成熟及排卵。本研究显示,GDF9在微刺激方案患者卵泡液中的表达明显降低,而BMP家族部分因子也有改变,因此,微刺激方案在低剂量FSH的情况下,可能GDF9、BMP家族因子表达水平不同,导致卵泡发育数量和质量也会不同。

本研究中,POR患者使用两种不同促排卵方案,其获卵数、可利用胚胎数以及优质胚胎数均无统计学差异,但微刺激方案明显减少了Gn用量,卵泡液成分也有改变,因基础卵泡和发育成熟卵泡较少,其ART助孕指标中获卵数、受精数、可利用胚胎数以及优质胚胎数并无明显改变。

综上所述,POR患者使用不同的轻微刺激和常规控制性卵巢刺激,卵泡微环境不同,为此带来对卵子质量和胚胎质量的影响仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome[J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 685-718.
- [2] Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial [J]. Hum Reprod, 2007, 22(4): 980-988.

- [3] Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria[J]. Hum Reprod, 2011, 26(7): 1616-1624.
- [4] Fang C, Huang R, Li T T, et al. Day-2 and day-3 sequential transfer improves pregnancy rate in patients with repeated IVF-embryo transfer failure: a retrospective case-control study[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 26(1): 30-35.
- [5] Fu Q, Huang Y, Wang Z, et al. Proteome profile

- and quantitative proteomic analysis of buffalo (*bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 68-77.
- [6] Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(6):1237-1243.
- [7] Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(9): 980-988.
- [8] Xu YW, Peng YT, Wang B, et al. High follicle-stimulating hormone increases aneuploidy in human oocytes matured in vitro [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(1): 99-104.
- [9] Zhang H, Chu Y, Zhou P, et al. Dehydroepiandrosterone plus climen supplementation shows better effects than dehydroepiandrosterone alone on infertility patients with diminished ovarian reserve of low-FSH level undergoing in-vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 16(14): 9-11.
- [10] Hossein G, Arabzadeh S, Hossein-Rashidi B, et al. Relations between steroids and AMH: impact of basal and intrafollicular steroids to AMH ratios on oocyte yield and maturation rate in women with or without polycystic ovary undergoing in vitro fertilization [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(6): 413-417.
- [11] Capkin SI, Ozyer S, Karayalcin R, et al. Serum and follicular fluid Anti-Mullerian hormone concentrations at the time of follicle puncture and reproductive outcome [J]. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2012, 13(1): 21-26.
- [12] Kim JH, Lee JR, Chang HJ, et al. Anti-Müllerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(9): 1266-1270.
- [13] Desforges-Bullet V, 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]. *Fertil Steril*, 2010, 94(1): 198-204.
- [14] Sehested A, Juul AA, Andersson AM, et al. Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(4): 1634-1640.
- [15] Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, et al. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? [J]. *BJOG*, 2005, 112(10): 1384-1390.
- [16] Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(11): 3178-3183.
- [17] Yding Andersen C. Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle [J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23(1): 16-24.
- [18] Chang HM, Qiao J, Leung PC. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 23(1): 1-18.
- [19] Myllymaa S, Pasternack A, Mottershead DG, et al. Inhibition of oocyte growth factors in vivo modulates ovarian folliculo genesis in neonatal and immature mice [J]. *Reproduction*, 2010, 139(3): 587-598.

(编辑 余菁)