

靶向 CIP2A 的 shRNA 对人结肠癌细胞生物学特征的影响

陈伟, 梁景琳, 叶俊文, 汪建平, 黄美近

(中山大学附属第六医院//胃肠肛门医院 结直肠外科, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨 shRNA 介导的 CIP2A 基因表达对结肠癌 HT29 细胞生物学特性的影响。【方法】采用 RT-PCR 及 Western blot 检测重组质粒转染结肠癌 HT29 细胞前后 mRNA 和蛋白的变化;分别采用 CCK8、Transwell 小室法、流式细胞术及裸鼠成瘤实验 ($n = 20$) 测定其对结肠癌 HT29 细胞增殖、克隆形成、凋亡及侵袭能力的影响。【结果】shRNA-CIP2A 转染结肠癌 HT29 细胞后, 结肠癌 HT29 细胞内 CIP2A mRNA 和蛋白的表达明显下降。实验组结肠癌 HT29 细胞增殖明显受到抑制, 侵袭出的细胞数量明显少于对照组 (453.0 ± 7.5 vs. 152.0 ± 4.7 , $n = 3$, $P = 0.001$), 结肠癌 HT29 细胞的增殖、克隆形成能力、侵袭能力及成瘤能力明显下降, 凋亡细胞比例 (%) 增加 (11.09 ± 0.32 vs. 14.25 ± 0.04 , $n = 3$, $P = 0.001$)。【结论】shRNA-CIP2A 可以下调 mRNA 和蛋白的表达, 有效抑制结肠癌 HT29 细胞的增殖、侵袭及诱导凋亡, 提示 CIP2A 基因可能成为一个潜在的结肠癌治疗靶标。

关键词: CIP2A; 结肠癌; 增殖; 凋亡; 侵袭

中图分类号: R73 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2018)06-0854-06

Effects of shRNA Targeting CIP2A Gene on Biological Characteristics of Human Colorectal Cancer HT29 Cells

CHEN Wei, LIANG Jing-lin, YE Jun-wen, WANG Jian-ping, HUANG Mei-jin

(Department of Colorectal Surgery, The Six Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: HUANG Mei-jin; E-mail: 13924073322@139.com

Abstract: 【Objective】To study the effects of shRNA-mediated CIP2A gene silencing on the proliferation, apoptosis and invasion of human colorectal cancer HT29 cells. 【Methods】The shRNA-CIP2A was transfected into human colorectal cancer HT29 cells. The expression levels of CIP2A mRNA and protein were determined by real-time PCR and Western blot, respectively. Cell proliferation, apoptosis and invasion were determined by transwell assay, flow cytometry (FCM), tumor implantations experiment ($n = 20$) and CCK8, respectively. 【Results】The mRNA and protein expression of CIP2A in human colorectal cancer HT29 cells was reduced in HT29 cells transfected with shRNA targeting CIP2A gene. The HT29 cells transfected with shRNA targeting CIP2A gene showed a significant decrease of cell proliferation, clonogenic ability, invasiveness and tumorigenicity (453.0 ± 7.5 vs 152.0 ± 4.7 , $n = 3$, $P = 0.001$) when compared with the control. The apoptotic rate (%) of control group was lower than in the CIP2A shRNA group (11.09 ± 0.32 vs 14.25 ± 0.04 , $n = 3$, $P = 0.001$). 【Conclusion】CIP2A knockdown led to substantial reductions of proliferation and invasion of HT29 cells and induced their apoptosis, indicating that CIP2A may be a potential target for colorectal cancer therapy.

Key words: CIP2A; colorectal cancer; proliferation; apoptosis; invasion

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6): 854-859]

CIP2A (cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A) 蛋白由 KIAA1524 基因编码, 该基因位于染色体 3q13.13, 由 21 个外显子组成, 蛋白产物

为 905 个氨基酸, 主要定位在细胞质。CIP2A 被认为是一种癌蛋白, 在一些肿瘤中高表达(包括肝癌、胃癌、结肠癌及头颈鳞细胞癌等)^[1-3]。CIP2A

收稿日期: 2018-05-28

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(2014A030310021)

作者简介: 陈伟, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: chenw47@mail.sysu.edu.cn; 黄美近, 通信作者, 主任医师, 研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: 13924073322@139.com

能抑制PP2A介导的c-Myc去磷酸化活性,进而稳定c-Myc,在维持细胞表型转化、促进细胞增殖和体内肿瘤生长方面起关键作用^[4]。CIP2A可通过调控ERK1/2信号通路从而调节乳腺癌细胞的生物学行为^[5]。c-Myc和CIP2A间的正反馈、幽门螺杆菌感染及ETS1对CIP2A转录水平的调控可以引起CIP2A的高表达^[6-7]。查阅大量文献,国内有关构建了CIP2A基因的shRNA重组腺病毒载体的文献很少。本研究拟通过抑制肠癌细胞中CIP2A基因的表达,探讨CIP2A基因沉默对肠癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响,期望为肠癌的基因治疗提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验中的肠癌细胞HT29由本室保存;ShRNA-CIP2A重组质粒前期已构建成功;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG及兔多克隆抗体CIP2A购于Santa Cruz公司;Transwell小室(24孔,8 μm)购自美国Corning公司;小鼠单克隆抗体β-actin及CCK8购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒mb-chem公司。

1.2 方法

1.2.1 Real-time PCR检测 将shRNA-CIP2A及shRNA-con质粒转染入HT29细胞。收集转染后24、48、72 h的HT29细胞,采用TRIZOL试剂提取总RNA并进行定量。以基因特异性引物进行PCR扩增,以β-actin作为内参。反应条件:95℃变性3 min,95℃12 s,62℃40 s,共40个循环,实验重复3次。引物序列:CIP2A/F,CCATATGCTCACTCAGATGATGT;CIP2A/R,GTGTATCATCTC-CACAGAGAGTT。

1.2.2 Western blot检测 提取转染后72 h的细胞总蛋白并进行SDS-PAGE电泳,电泳后封闭60 min,加入稀释的抗CIP2A抗体4℃孵育过夜。TBST漂洗3次后加入羊抗兔37℃孵育30 min。TBST漂洗后使用ECL化学发光试剂检测,图像应用GEL-PRO Analyzer软件进行灰度分析。

1.2.3 CCK8检测及克隆形成实验 将细胞分成2组:shRNA-CIP2A组及对照组,每组设置6个复孔。取各组细胞安排说明书进行试验。细胞生长

抑制率 = $(A_{450 \text{ nm, 对照}} - A_{450 \text{ nm, 实验}}) / A_{450 \text{ nm, 对照}} \times 100\%$ 。将转染后24 h的细胞按 2×10^2 细胞接种到6孔板,轻轻转动使细胞分散均匀。置细胞培养箱中培养2周,PBS小心浸洗2次,然后用体积分数为95%的乙醇固定10 min,风干;用终浓度为0.1%结晶紫染色10 min,自来水冲洗3次,空气干燥。计数大于30个细胞的克隆数。

1.2.4 细胞凋亡及周期检测 肠癌细胞行转染48 h后收集并使用PBS洗涤加入1 mL结合缓冲液,离心去上清后加入400 μL结合缓冲液,重悬后再加入5 μL Annexin V-FITC,混匀后4℃避光孵育15 min,再加入10 μL PI避光孵育5 min,在1 h内上流式细胞仪检测。75%乙醇、4℃固定消化好的单细胞悬液过夜,RNase A(1 g/L)200 μL,37℃孵育30 min,与800 μL碘化丙啶染色液混匀后,4℃避光染色30 min,使用FACS Calibur流式细胞仪检测。

1.2.5 Transwell小室侵袭实验及裸鼠成瘤实验 细胞转染24 h后采用体积分数为2%的FBS培养液进行培养,洗涤并消化后加入2 mL DMEM培养液,制成单细胞悬液接种于Transwell小室中,加入700 μL培养液于下室,培养箱中培养30 h后使用甲醇固定10 min,采用棉签刮去小室的Matrigel胶,FBS洗涤后并风干。使用结晶紫染色后洗涤3次并风干后放入孔中,拍照计数。人肠癌HT29细胞裸鼠皮下移植瘤实验6周龄SPF级BALB/c裸鼠20只,雌性,分2组,每组10只。培养2组细胞(shRNA-CIP2A组及阴性对照组),2组处对数生长期细胞 $1\ 500\ \text{r/min}$ ($r = 15\ \text{cm}$),离心5 min,收集,RPMI 1640培养液(无血清)洗涤2次,RPMI 1640重悬并调整细胞浓度,按组皮下接种于BALB/c-nu/nu裸鼠皮下,每只0.1 mL,细胞数约 5×10^6 个,构建裸鼠移植瘤模型,常规饲养,每隔5 d,肿瘤大小采用游标卡尺测量,肿瘤体积(V/mm^3) = $(\text{长径} \times \text{短径}^2) / 2$ 。动态连续观察8周,每周记录1次各组裸鼠的生存情况和瘤体生长情况,2个月后引颈法处死裸鼠。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,数值数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对资料组间应用t检验,多组间比较应用one-way ANOVA分析,先进行方差齐性检验,方差齐选用LSD (least significant difference)法;方差不齐采用校正

的 F 检验, 进行统计学分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIP2A shRNA 对肠癌 mRNA、蛋白表达水平、细胞增殖及克隆的影响

将 CIP2A shRNA 转染至肠癌 HT29 细胞, 采用 Real-time PCR 及 Western blot 检测后发现, 实验组细胞 CIP2A mRNA 和蛋白表达明显下降, 与阴性对照组差异明显 ($P < 0.05$)。实验结果表明, shRNA 转染后可以有效地下调 mRNA 及蛋白的表达 (图 1)。此外, CCK8 结果显示: 72 h 后 2 组细胞活性分别为干扰组 (3.74 ± 0.20) 和阴性对照组 (3.06 ± 0.22), CIP2A shRNA 转染组肠癌细胞的增殖及克隆明显受到抑制, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2, 图 3)。

2.2 CIP2A shRNA 对肠癌细胞凋亡及周期的影响

细胞凋亡率包右上象限 (凋亡晚期细胞) 及括右下象限 (早期凋亡细胞) 凋亡百分数之和。结果显示: 转染后, 干扰组和阴性对照的凋亡率分别为 (14.25 ± 0.04)% 和 (11.09 ± 0.32)%。与阴性组比, 实验组的凋亡率明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 4)。阴性对照组细胞 G_0/G_1 、S 和 G_2/M 期分别占 56.46%、27.75% 和 15.79%, CIP2A-shRNA 组细胞 G_0/G_1 、S 和 G_2/M 期分别占 67.32%、16.11% 和 16.57%。与空白对照组和阴性对照组比较, CIP2A-shRNA 组 G_0/G_1 期细胞比例增高 ($P < 0.05$; 图 5)。

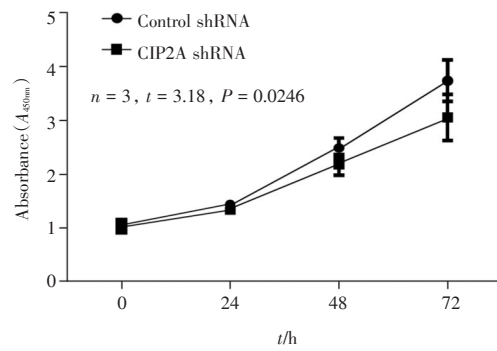


图 2 两组细胞的细胞增殖曲线图

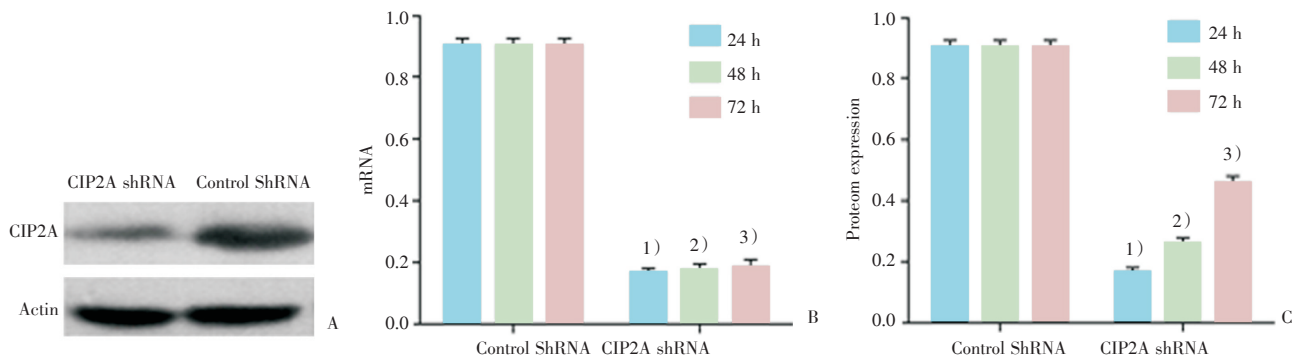
Fig.2 The cell proliferation curve of both group

2.3 CIP2A shRNA 对肠癌细胞侵袭能力及成瘤的影响

Transwell 小室侵袭实验检测 CIP2A shRNA 对肠癌细胞侵袭能力的影响, 结果显示: 阴性对照组侵袭细胞数目为 (453.0 ± 7.5) 个, 干扰组为 (152.0 ± 4.7) 个, 表明转染 CIP2A shRNA 后, 肠癌细胞的侵袭能力及成瘤能力下降 ($P < 0.05$; 图 6)。

3 讨论

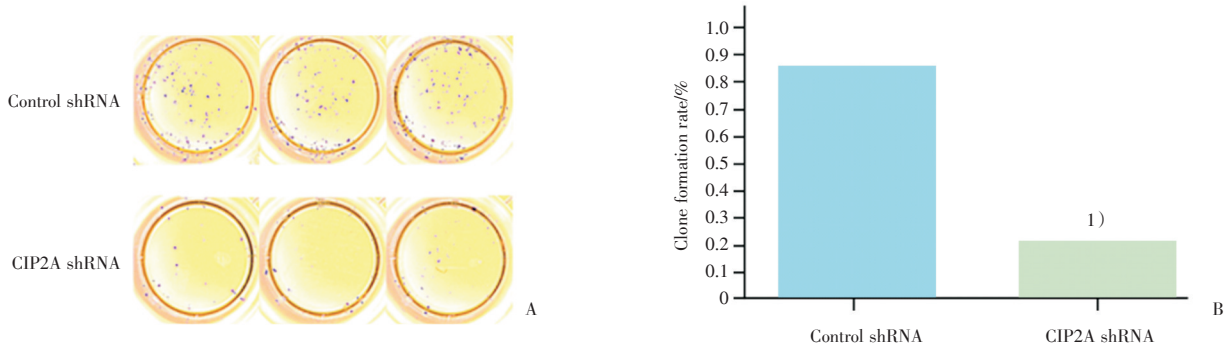
结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是国内外最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率高居世界恶性肿瘤前列, 病死率位于癌症死因排序第 3 位^[8]。尽管术前同期放化疗及靶向药物的应用在一定程度上提高了部分患者的术后生存时间, 但其总体 5 年生存率仍然较低, 发生浸润转移是导致结直肠癌患者死亡的主要原因。因此, 探索



A: Comparison of CIP2A protein expression in both cells after transfection; B: The expression of CIP2A mRNA at 24, 48 and 72 h after transfection; C: The expression of CIP2A protein at 24, 48 and 72 h after transfection, $n = 3$, $t = 4.624$, $P = 0.0013$

图 1 CIP2A shRNA 对肠癌细胞 CIP2A 表达的影响

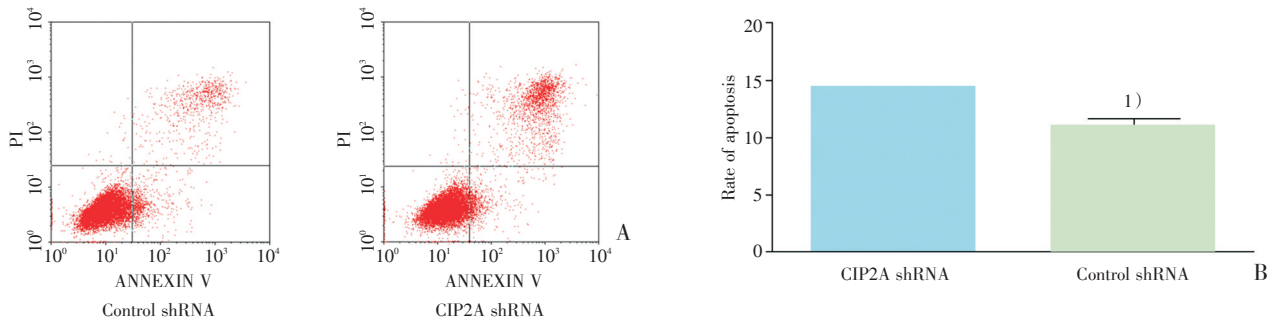
Fig.1 Effect of CIP2A shRNA on the expression of CIP2A in colorectal cancer cells



A: Comparison of cell clones in HT-29 after transfection; B: The number of cell clones from control shRNA and CIP2A shRNA group, $n = 3$, $1)t = 3.389$, $P = 0.0194$ vs control.

图3 CIP2A shRNA 对肠癌细胞克隆形成的影响

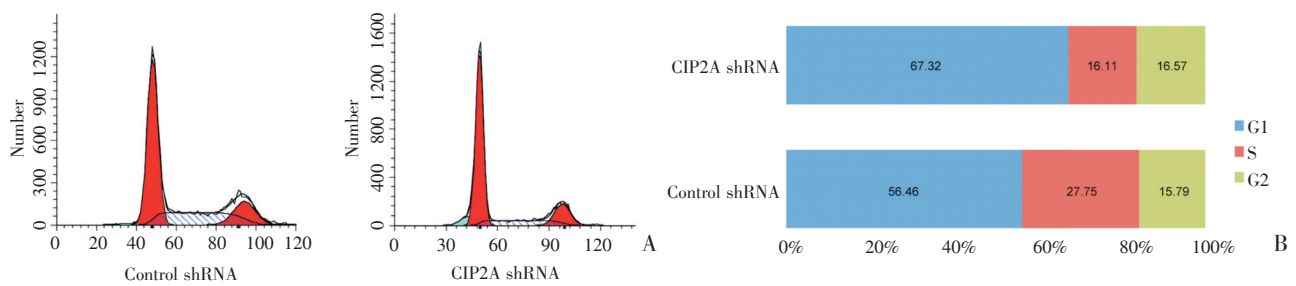
图3 Effect of CIP2A shRNA on the formation of colorectal cancer cell clones



A: Comparison of cell apoptosis in HT-29 after transfection; B: The rate of cell apoptosis from control shRNA and CIP2A shRNA group, $n = 3$, $1)t = -7.86$, $P = 0.001$ vs CIP2A.

图4 流式细胞仪检测 CIP2A shRNA 转染对肠癌 HT29 细胞的影响

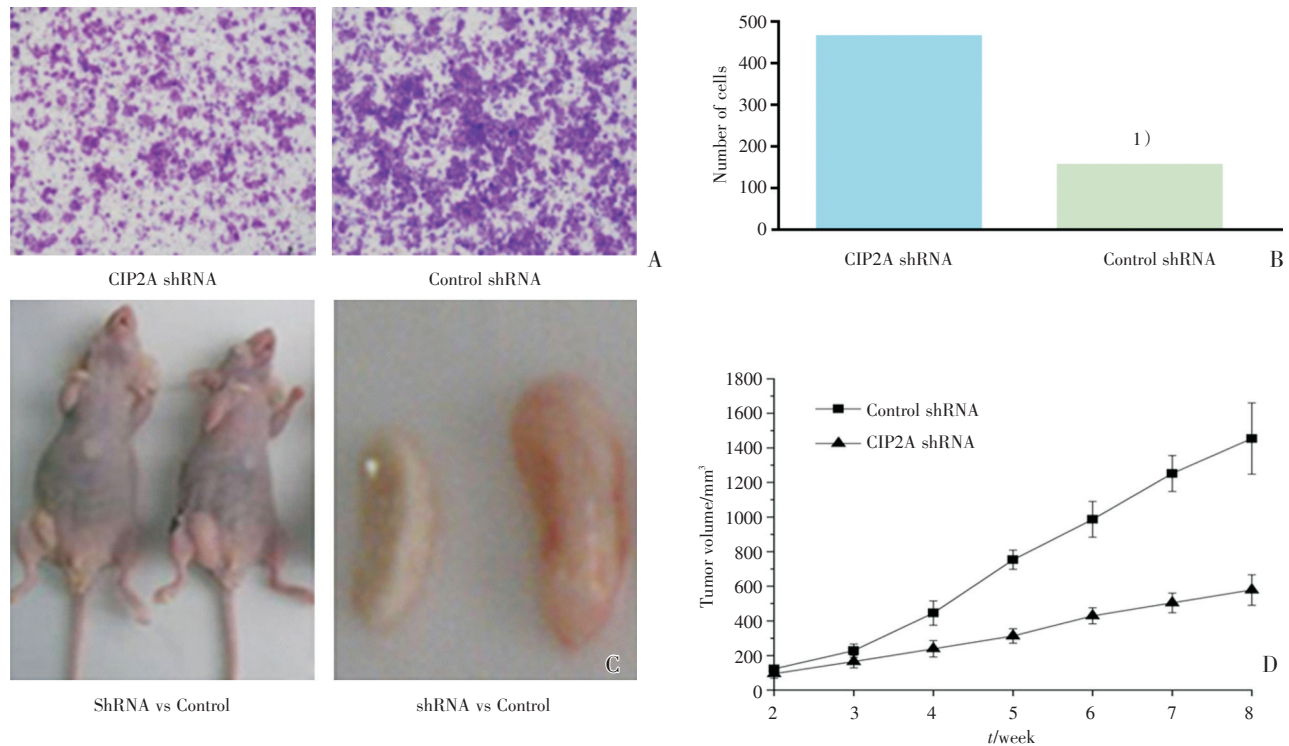
Fig.4 Flow cytometry analysis of the effects of CIP2A shRNA transfection on the apoptosis of HT29 cells



A: Comparison of cell cycle in HT-29 after transfection; B: The rate of cell cycle from control shRNA and CIP2A shRNA group, $n = 3$, $t = -5.91$, $P = 0.0041$

图5 CIP2A shRNA 转染对肠癌 HT29 细胞细胞周期的影响

Fig.5 Analysis of the effects of CIP2A shRNA transfection on the cell cycle of HT29 cells



A: Comparison of cell invasiveness in HT-29 after transfection; B: The rate of cell invasiveness from control shRNA and CIP2A shRNA group, $n = 3$, $t = -9.43$, $P = 0.001$; C: Comparison of cell tumorigenesis in HT-29 after transfection; D: The different tumor growth curves from control shRNA and CIP2A shRNA group, $n = 10$, $t = 3.263$, $P = 0.001$.

图6 Transwell 侵袭实验检测 CIP2A 对 HT29 细胞侵袭能力及成瘤的影响

Fig.6 Transwell assay analysis of the effects of CIP2A shRNA transfection on the invasion and tumorigenesis of HT29

有效的新的生物治疗途径成为近年来结直肠癌基础研究热点。

CIP2A 是定位于染色体 3q13.13, 其在肠癌等多种肿瘤中高表达, 在正常肠组织中不表达或少量表达。笔者之前通过免疫组化方法检测结直肠癌组织芯片中 CIP2A 的表达, 发现 CIP2A 高表达与肿瘤组织分型、腹膜种植、TNM 分期及肝转移有关, CIP2A 阴性表达患者的总体生存率高于阳性表达患者, 与国外的文献相类似^[9]。既往的研究表明, 它可诱导肿瘤组织新生血管形成, 促进肿瘤细胞生长、侵袭与转移^[10-11]。近年来, 靶向抑制 CIP2A 表达已成为多种肿瘤基因治疗的新策略。而新兴的 RNAi 技术, 可以利用 siRNA 或 shRNA 表达载体快速、经济、简便的以序列特异方式剔除目的基因表达, 已经成为探索基因功能和肿瘤基因治疗的重要研究手段。

我们通过人工设计的靶向抑制 CIP2A 的 shRNA 作为干扰片段, 并构建慢病毒表达载体, 尝试

在结肠癌细胞中实现对 CIP2A 基因表达的调控, 分析了 CIP2A 的表达下调对结肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响。探讨以该基因为靶点进行结肠癌基因治疗的可行性。实验结果证实, 该种 shRNA 慢病毒载体构建成功, 可以满足使用需要。设计的靶向抑制 CIP2A 的 shRNA 能够显著降低结肠癌细胞 CIP2A 基因的 mRNA 和蛋白的表达水平, 成功实现了其基因沉默效应。

我们研究发现, 伴随着 CIP2A 的下调, 结肠癌的增殖和侵袭能力也受到了明显的抑制。从生长曲线的比较可以显示: 干扰实验组结肠癌细胞的生长增殖能力与对照组细胞相比较受到了明显的抑制, 有显著差异, 与 Teng 等^[12]的观察结果类似。细胞周期的检测也证实: 实验组结肠癌 G₀/G₁ 期细胞百分率及凋亡百分率与对照组相比较显著增加, 而 S 期细胞百分率显著降低。对结肠癌细胞的侵袭性检测结果也显示: 转染实验组结肠癌细胞侵袭能力显著减弱, 与对照组比较, 均有显著

性差异。这说明,CIP2A基因可能参与了调控结肠癌细胞增殖和侵袭等生物学行为的过程,也提示CIP2A有可能作为评价结肠癌侵袭和增殖能力的一个分子标记物。

近些年来,CIP2A相关信号通路的研究逐渐增加,有研究发现CIP2A的促癌作用与P-AKT密切相关,RNA干扰骨肉瘤细胞中的CIP2A后可以明显减少其增殖和侵袭^[13-16]。此外,幽门螺杆菌(HP)可以通过上调CIP2A的表达促进胃癌细胞

的增殖,shRNA可以下调CIP2A mRNA和蛋白的表达,可有效抑制BGC-823细胞的侵袭、增殖及诱导细胞凋亡^[17]。因此,进一步研究CIP2A的作用机制有可能为肠癌的病因学增添新的理论依据,从而为肠癌的基因治疗提供新的思路。

综上所述,CIP2A基因表达下调导致肠癌细胞增殖、侵袭及成瘤能力等的下降。CIP2A基因可能是肠癌侵袭、转移的相关基因之一,其可能作为肠癌潜在的治疗靶点之一。

参考文献

- [1] Ward MP, Spiers JP. Protein phosphatase 2A (PP2A) regulation of markers of extracellular matrix remodelling in HCC cells: functional consequences for tumour invasion [J]. *Br J Pharmac*, 2017, 174(10):1116-1130.
- [2] Ji J, Zhen W, Si Y, et al. Increase in CIP2A expression is associated with cisplatin chemoresistance in gastric cancer[J]. *Cancer Biol*, 2017, 21(2):1-10.
- [3] Pang X, Fu X, Chen S, et al. Overexpression of CIP2A promotes bladder cancer progression by regulating EMT [J]. *Clin Trans Oncol*, 2016, 18(3): 289-295.
- [4] Junttila, Melissa R, Puustinen, et al. CIP2A Inhibits PP2A in human malignancies [J]. *Cell*, 2007, 130(1): 51-62.
- [5] Liu X, Peng B, Li Y, et al. p90/CIP2A mediates breast cancer cell proliferation and apoptosis [J]. *Mol Biol Reports*, 2014, 41(11):7471-7478.
- [6] Böckelman C, Koskensalo S, Hagström J, et al. CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(5): 289-295.
- [7] Khanna A, Böckelman C, Hemmes A, et al. MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer [J]. *J Nat Cancer Instit*, 2009, 101(11):793-805.
- [8] Zhang G, He Z, Xiao H, et al. MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(1): 98-107.
- [9] Böckelman C, Koskensalo S, Hagström J, et al. CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(5): 289-295.
- [10] Liu X, Chai Y, Li J, et al. Autoantibody response to a novel tumor-associated antigen p90/CIP2A in breast cancer immunodiagnosis [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3): 2661-2667.
- [11] Guo Z, Liu D, Su Z. CIP2A mediates prostate cancer progression via the c-MYC signaling pathway [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 3583-3589.
- [12] Teng HW, Yang SH, Lin JK, et al. CIP2A is a predictor of poor prognosis in colon cancer [J]. *J Gastr Sur*, 2012, 16(5):1037-1045.
- [13] Tseng LM, Liu CY, Chang KC, et al. CIP2A is a target of bortezomib in human triple negative breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(2): R68.
- [14] Lin YC, Chen KC, Chen CC, et al. CIP2A-mediated Akt activation plays a role in bortezomib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(7):585-593.
- [15] Yu HC, Chen HJ, Chang YL, et al. Inhibition of CIP2A determines erlotinib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Pharmac*, 2013, 85(3):356-366.
- [16] Zhai M, Cong L, Han Y, et al. CIP2A is overexpressed in osteosarcoma and regulates cell proliferation and invasion. [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(2): 1123-1128.
- [17] Shi HR. Construction of eukaryotic expression vector of shRNA targeting CIP2A gene and its inhibition effect on BGC-823 cell proliferation [J]. *Basic Clin Med*, 2015, 66(1-3): 281-284.

(编辑 徐杰)

·临床研究·

不同刺激方案对卵巢低反应患者体外受精结局影响的比较

刘晓娉, 王波, 李婷婷, 黄睿
(中山大学附属第六医院生殖医学中心, 广东广州 510655)

摘要:【目的】比较常规控制性卵巢刺激(COS)和微刺激方案在卵巢低反应(POR)患者行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)中的临床结局。【方法】前瞻入组行体外受精/卵胞浆内单精子注射(ICSI)治疗的卵巢低反应患者随机分为两组, COS组选择促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)修饰长方案, 微刺激方案组选择来曲唑(LE)添加小剂量促性腺激素(Gn)行卵巢刺激, 比较两组患者促排效果及临床妊娠结局差异。【结果】COS组患者扳机日子宫内膜厚度(mm)和扳机日血清雌二醇(E₂)水平(pg/mL)显著高于微刺激组, 分别为 11.4 ± 2.5 vs. 9.6 ± 2.5 、 1200 ± 710 vs. 560 ± 470 , 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 两组扳机日血清黄体生成素(LH)、孕激素(P)水平差异无统计学意义($P > 0.05$); COS组患者获卵数(4.1 ± 2.8 vs. 2.8 ± 1.9)和可利用胚胎数(2.0 ± 1.6 vs. 1.5 ± 1.4)均多于微刺激组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 两组的胚胎种植率, 每移植周期、每取卵周期以及每启动周期的临床妊娠率, 流产率, 活产率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】在POR患者促排治疗中, 微刺激方案和COS方案相比有相近的临床妊娠率。而微刺激方案可节约Gn用量、缩短促排卵时间。因此微刺激方案是POR患者较理想的促排卵方案。

关键词:控制性卵巢刺激; GnRH-a 修饰长方案; 微刺激方案; 卵巢低反应; 临床妊娠率

中图分类号: R715.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2018)06-0860-06

Comparison of Different Stimulation Protocols on Pregnancy Outcome of Poor Ovarian Responders

LIU Xiao-ping, WANG Bo, LI Ting-ting, HUANG Rui

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

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

Abstract: 【Objective】 To compare the effect of the conventional controlled ovarian stimulation (COS) and mild stimulation protocol in poor ovarian responders (POR) undergoing IVF/ICSI. 【Methods】 A prospective randomized study was performed in 191 patients with POR undergoing in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The patients were randomized into two groups, modified long protocol was applied in COS group, while letrozole compensated with low dose gonadotropin protocol was applied in mild stimulation group. The clinical outcomes were compared between these two groups. 【Results】 Comparing with COS group, both endometrium thickness and serum E₂ level on the trigger day were significantly lower in the mild stimulation group [(9.6 ± 2.5) vs. (11.4 ± 2.5) mm, (560 ± 470) vs. (1200 ± 710) pg/mL, $P < 0.05$]. No significant difference was found between the two groups in the serum LH and P levels on the trigger day ($P > 0.05$). Although the number of oocytes retrieved [(4.1 ± 2.8) vs. (2.8 ± 1.9) , $P < 0.05$] and the number of available embryos [(2.0 ± 1.6) vs. (1.5 ± 1.4) , $P < 0.05$] were significantly higher in the COS group, similar embryo implantation rate, clinical pregnancy rate per embryo transfer, per OPU and per initiation cycle, abortion rate and live birth rate were observed in both groups. 【Conclusion】 For POR patients, the COS protocol and the mild stimulation protocol yield a similar clinical pregnancy rate. Considering the fewer Gn dosage and shorter ovarian stimulation length associat-

收稿日期: 2018-05-12

基金项目: 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: 刘晓娉, 硕士研究生, 研究方向: 生殖医学, E-mail: 476086262@qq.com; 黄睿, 通信作者, 副教授, 副主任医师, 博士, 研究方向: 生殖医学, E-mail: drhuangr@sina.com

ed with the letrozole mild stimulation, it can be concluded that the letrozole mild stimulation protocol is an ideal ovulation induction regimen for POR patients.

Key words: controlled ovarian stimulation; GnRH-a modified long-term protocol; mild stimulation protocol; poor ovarian response; clinical pregnancy rate

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(6):860-865]

卵巢低反应(poor ovarian response, POR)是在控制性卵巢刺激(controlled ovarian stimulation, COS)中出现的卵巢对外源性促性腺激素(gonadotropin, Gn)刺激反应不佳的一种病理状态,发生率为9%~24%^[1],主要表现为获卵数少、取消率高及妊娠率低等。卵巢低反应患者是辅助生殖领域的困难人群。随着育龄妇女婚育年龄增高趋势的发展和计划生育政策的改革,越来越多高龄妇女求助于辅助生殖技术助孕治疗,因此我国POR患者的比例也随之升高。POR患者的不良妊娠结局无疑给不孕不育夫妇造成较大的经济负担与心理压力,为其选择合理的促排卵方案已成为临床工作关注的焦点。目前针对卵巢低反应患者的处理通常是在常规控制卵巢刺激中提高外源性Gn的剂量。有研究^[2]指出,当Gn剂量超过每天225~300 U时,再提高Gn的剂量没有任何意义,且高剂量的Gn可能损害卵子质量。微刺激方案与COS相比,Gn用量少、治疗时间短、可在短期内重复进行等,但更难控制,且得到的卵子和胚胎数目可能更少。因此关于微刺激和COS在卵巢低反应患者的使用疗效,尤其是妊娠率孰高孰低,尚无定论。为此,本研究旨在比较COS方案与微刺激方案对POR患者的临床疗效。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

本研究为前瞻随机对照研究,筛选2014年1月至2017年1月在中山大学附属第六医院生殖中心接受体外受精/卵胞浆内单精子注射-胚胎移植(IVF/ICSI-ET)助孕治疗的POR患者。

POR诊断依据2011年欧洲人类生殖和胚胎学会(ESHRE)博洛尼亚标准^[3]:①高龄(≥ 40 岁)或有引起卵巢低反应的任何危险因素;②前次常规促排卵低反应(获得卵子 ≤ 3 个);③卵巢功能

下降[如窦卵泡(antral follicle count, AFC) $< 5 \sim 7$ 个或抗苗勒氏管激素(anti-müllerian hormone, AMH) $< 0.5 \sim 1.1$ ng/mL]。以上3条至少符合2条者定义为POR。

排除标准:①反复IVF失败(失败次数 > 2 次);②严重的子宫腺肌症或子宫内膜严重破坏者;③多囊卵巢综合征患者;④对Gn过敏或是禁忌;⑤同时期参与其他的临床试验。

共筛选患者350名,纳入符合标准并同意入组的POR患者共191例,按随机数字表随机分成两组,A组为激动剂修饰长方案组($n = 94$),B组为微刺激方案组($n = 97$)。

本研究通过中山大学附属第六医院医学伦理委员会的伦理审核,于中国临床试验注册中心注册(ChiCTR-TRC-13003454),所有研究对象均自愿参与,并签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 促排卵方案 所有患者均于月经周期第2天通过阴道B超及性激素检验结果评估卵巢基础状态。利用随机数字表随机分入COS组和微刺激方案组。①COS组选择激动剂修饰长方案促排卵,于黄体中期给予短效促性腺激素释放激素激动剂GnRH-a(注射用曲普瑞林,达必佳,辉凌制药,每支0.1 mg)每天0.05 mg皮下注射,连用14 d。14 d后复查阴道B超及性激素水平,确认降调达标后(雌激素 $E_2 < 50$ pg/mL,黄体生成素 $LH \leq 5$ U/L,子宫内膜厚度 ≤ 5 mm),给予Gn(注射用重组人促卵泡激素,果纳芬,默克雪兰诺,每支75 U)每天300 U皮下注射,连用5 d。以后依据阴道B超监测情况及激素水平调整Gn使用天数及用量,直至人绒毛膜促性腺激素HCG注射日。②微刺激方案组均于月经周期第3天起给予来曲唑(letrozole, LE)5 mg连服5 d,月经第4天、第6天加用每天150 U果纳芬皮下注射。以后依据阴道B超监测情况及激素水平调整Gn使用天数,当雌

激素 E_2 水平达到 200 pg/mL 时加用每天 0.25 mg 的促性腺激素释放激素拮抗剂 GnRH-ant (注射用醋酸西曲瑞克, 思泽凯, 默克雪兰诺, 每支 0.25 mg) 或 (醋酸加尼瑞克注射液, 加尼瑞克, 默沙东, 每支 0.25 mg), 直至 HCG 注射日。扳机标准为主导卵泡直径 ≥ 18 mm 或 3 个卵泡直径 ≥ 17 mm, 扳机药物为重组人绒毛膜促性腺激素 (艾泽, 默克雪兰诺, 每支 250 μ g), 扳机后 36 ~ 37 h 行经阴道超声引导下穿刺取卵。根据男方精液情况, 采用体外受精 (IVF) 或卵胞浆内单精子显微注射技术 (ICSI) 授精。在取卵后第 3 天或 5 天进行胚胎/囊胚移植, 移植后给予黄体支持。

1.2.2 胚胎质量的实验室评估 胚胎培养按本中心常规进行。卵裂期胚胎评价采用 Racowsky 评分系统^[4], 根据细胞数、碎片、卵裂球均一度 3 个指标进行评分, 将 6 细胞 2 级以上胚胎定义为优质胚胎。根据患者意愿及第 3 天胚胎形态学评分符合可利用胚胎标准 (5 细胞及以上, 碎片 < 25%) 的胚胎进行囊胚培养。囊胚评分按照 Gardner 评分系统^[5]进行, 根据囊胚的扩张状态、内细胞团以及滋养层细胞进行评估, ≥ 3 BB 的囊胚定义为优质。

1.2.3 妊娠判断标准 移植后 12 d/14 d 测血人绒毛膜促性腺激素 β -hCG 值 > 50 U/L 且 28 d 后 B 超见孕囊及原始心管搏动者确定为临床妊娠。

1.2.4 样本收集及激素测定 收集月经第 2 天和 HCG 注射日的血液样本, 电化学发光法 (电化学发光全自动免疫分析系统, 罗氏 cobas e 601, 瑞士) 检测卵泡刺激素 (follicle stimulation hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E_2)、孕激素 (progesterone, P) 水平。

1.3 评价指标

本研究的主要评价指标为临床妊娠率, 次要

指标为获卵数、可利用胚胎数、胚胎种植率、流产率、活产率、扳机日子宫内膜厚度、激素水平等。

1.4 样本量计算及统计学分析

样本量计算: 本临床研究为非劣性研究, 根据前期研究及文献报道, POR 患者每移植周期妊娠率为 35%, 非劣效性界值为 0.15, α (I 类错误) 为 0.025, $1-\beta$ (检验效能) 为 0.8, 计算样本量为每组 119 名患者, 考虑到 POR 患者 40% 的取消移植率, 每组 199 人, 两组共需募集 398 名患者。

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以率 (%) 表示。均数比较采用 t 检验, 率之间比较采用卡方检验, 非劣效性检验两组临床妊娠率采用 U 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义或判断为非劣效。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入患者 191 人, 其中 POR 患者 (既往常规促排方案下获卵数 < 4 个) 47 人, 预计 POR 患者 144 人, 将入组患者随机分入两组, 其中 COS 组 94 例, 微刺激方案组 97 例。两组患者间年龄、不孕年限、体质量指数 (body mass index, BMI)、AMH 水平、基础窦卵泡数、基础 FSH 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 促排卵情况与促排周期取消率

两组患者总取消周期 6 例, 其中 COS 组 4 例 (4.3%, 4/94); 微刺激方案组 2 例 (2.1%, 2/97), 两组的周期取消率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。取消周期中 COS 组 1 例促排无反应, 3 例卵泡发育不良; 微刺激方案组 1 例已排卵, 1 例促排无反

表 1 两组患者一般情况比较

Table 1 Comparison of the general conditions between two groups

	COS group ($n = 94$)	Mild Stimulation group ($n = 97$)	t	P
Age/years	37 \pm 6	37 \pm 5	0.278	0.781
Duration of infertility/years	4.5 \pm 3.4	5.1 \pm 4.1	-1.083	0.280
BMI/(kg/m ²)	23.0 \pm 3.3	22.2 \pm 3.2	1.734	0.085
AMH/(ng/mL)	0.86 \pm 0.57	0.76 \pm 0.48	1.246	0.214
AFC	4.8 \pm 1.1	4.5 \pm 1.4	1.701	0.091
Basal FSH/(U/L)	9.1 \pm 3.4	9.1 \pm 4.1	-1.473	0.142

Values are means \pm SD. There were no statistically significant differences between the groups.

表2 两组患者促排卵情况、实验室情况及临床结局比较
Table 2 Comparison of the treatment characteristics and clinical outcomes between two groups

	COS group	Mild stimulation group	t/χ^2	P
No. of initiation cycle	94	97		
Duration of Gn use/d	10.8 ± 2.4	6.4 ± 1.8	14.713 ¹⁾	< 0.001 ⁴⁾
Dose of Gn use/U	3100 ± 750	940 ± 270	26.946 ¹⁾	< 0.001 ⁴⁾
Cancellation rate/%	4.3(4/94)	2.1(2/97)		0.440 ³⁾
HCG day				
No. of opu cycle	90	95		
Endometrial thickness/mm	11.4 ± 2.5	9.6 ± 2.5	4.939 ¹⁾	< 0.001 ⁴⁾
E ₂ level/(pg/mL)	1200 ± 710	560 ± 470	7.252 ¹⁾	< 0.001 ⁴⁾
LH level/(U/L)	35 ± 170	21 ± 83	0.717 ¹⁾	0.475
P level/(ng/mL)	0.71 ± 0.42	0.61 ± 0.46	1.624 ¹⁾	0.106
No. of follicles larger than 14 mm in diameter	4.4 ± 2.5	3.4 ± 1.9	3.327 ¹⁾	0.001 ⁴⁾
No. of oocytes retrieved	4.1 ± 2.8	2.8 ± 1.9	3.547 ¹⁾	< 0.001 ⁴⁾
No. of oocytes fertilized	2.5 ± 2.1	1.7 ± 1.5	3.016 ¹⁾	0.003 ⁴⁾
The oocyte retrieval rate/%	91.4(361/395)	83.2(263/316)	10.897 ²⁾	0.001 ⁴⁾
The oocyte fertilization rate/%	63.2(228/361)	62.4(164/263)	0.042 ²⁾	0.838
No. of embryos transferred	2.0 ± 1.6	1.5 ± 1.4	2.094 ¹⁾	0.038 ⁴⁾
No. of good-quality embryos	1.4 ± 1.3	1.3 ± 1.3	0.880 ¹⁾	0.380
Embryo implantation rate/%	21.7(23/106)	27.3(24/88)	0.814 ²⁾	0.367
Clinical pregnancy rate per embryo transfer/%	32.8(20/61)	37.5(21/56)	0.285 ²⁾	0.593
Clinical pregnancy rate per OPU cycle/%	22.2(20/90)	22.1(21/95)	< 0.001 ²⁾	0.985
Clinical pregnancy rate per initiation cycle/%	21.3(20/94)	21.6(21/97)	0.004 ²⁾	0.950
Abortion rate/%	30.0(6/20)	38.1(8/21)	0.299 ²⁾	0.585
Live birth rate/%	23.0(14/61)	23.2(13/56)	0.001 ²⁾	0.973

Values are means ± SD or $n(\%)$. 1) t -test. 2) Chi-square test. 3) Fisher's exact test. 4) $P < 0.05$.

应。促排卵周期中, COS组的Gn使用天数[(10.8 ± 2.4) vs. (6.4 ± 1.8)d, $P < 0.05$]、Gn用量[(3100 ± 750) vs. (940 ± 270)U, $P < 0.05$]均多于微刺激方案组; COS组的扳机日子宫内膜厚度[(11.4 ± 2.5) vs. (9.6 ± 2.5)mm, $P < 0.05$]厚于微刺激方案组; 扳机日E₂水平[(1200 ± 710) vs. (560 ± 470)pg/mL, $P < 0.05$]也高于微刺激方案组, 且以上的差异均有统计学意义。而两组间扳机日的LH水平与P水平的差异无统计学意义($P > 0.05$, 表2)。

2.3 实验室情况

COS组的获卵数[(4.1 ± 2.8) vs. (2.8 ± 1.9)个]、2PN受精数[(2.5 ± 2.1) vs. (1.7 ± 1.5)个]、可移植胚胎数[(2.0 ± 1.6) vs. (1.5 ± 1.4)个]以及获卵率[91.4%(361/395) vs. 83.2%(263/316)]均高于微刺激方案组, 且差异均有统计学意义($P <$

0.05)。两组的2PN受精率和优质胚胎数的差异无统计学意义($P > 0.05$, 表2)。

2.4 临床结局

两组患者新鲜胚胎移植取消周期共68例, 其中COS组取消周期29例(32.2%, 29/90), 微刺激方案组取消周期39例(41.0%, 39/95)。两组取消周期的差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组的胚胎种植率、每移植周期临床妊娠率、每取卵周期临床妊娠率、每启动周期临床妊娠率、流产率以及活产率分别为[21.7%(23/106) vs. 27.3%(24/88)]、[32.8%(20/61) vs. 37.5%(21/56)]、[22.2%(20/90) vs. 22.1%(21/95)]、[21.3%(20/94) vs. 21.6%(21/97)]、[30.0%(6/20) vs. 38.1%(8/21)]、[23.0%(14/61) vs. 23.2%(13/56)], 差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表2); 根据非劣效性界值0.15, 两组临

床妊娠率非劣效性检验 U 值为 2.235, 查表得 $P < 0.05$, 可以认为微刺激方案不差于 COS 方案。

3 讨论

IVF 临床常用的卵巢刺激方案为常规控制性卵巢刺激(COS), 包括激动剂长方案、短方案、拮抗剂方案等^[6]。但 POR 患者在常规 COS 方案中, 表现为对外源性 Gn 刺激反应低下, 获卵数少、可利用胚胎数少及妊娠率低。因此, 这类患者的治疗仍是辅助生殖领域的研究热点及难点。Jevic 等^[7]通过系统性回顾分析 61 个随机对照实验共 4997 个周期发现, 对于 POR 患者而言, 常规 COS 方案仍为首选, 但无论是拮抗剂方案还是 GnRH-a 激动剂方案, POR 患者的妊娠结局均没有显著性改善。近年来, 微刺激方案在用于 POR 患者的治疗上越来越受到推崇, 因其 Gn 使用时间短、剂量小, 患者依从性会更好。配合 GnRH-ant 使用, 可有效防止 LH 峰过早出现, 降低周期取消率。Abdel Mohsen 等^[8]比较了常规 COS 方案与微刺激方案对于 POR 患者的临床疗效, 结果显示两组的获卵数、可移植胚胎数、周期取消率和临床妊娠率均没有统计学差异, 同时微刺激方案组的 Gn 使用天数及用量显著低于常规 COS 组。但 Revelli 等^[9]和 Siristatidis 等^[10]的研究却显示, 与常规 COS 方案相比, 微刺激方案的获卵数和可移植胚胎数更少, 且周期取消率较高。这两种相悖的结果与不同研究纳入患者的标准不同有关, 同时目前大多数研究所涉及的样本量均较少。因此, 关于 COS 方案和微刺激方案的疗效孰优孰劣, 尚无定论, 需要更多的研究进一步探究。

本研究旨在比较常规 COS 方案和微刺激方案对 POR 患者的临床疗效。研究中 COS 组所采用的激动剂修饰长方案由 Faber 等^[11]首次提出。修饰长方案经过降调节, 卵泡发育同步性提高, 同时在 Gn 启动前停用 GnRH-a, 这时垂体仍然持续处于抑制状态, 既避免早发 LH 峰的发生, 又防止了垂体的过度抑制, 可以减少外源性 Gn 的用量, 缩短促排时间。Garcia-Velasco 等^[12]的研究表明在 POR 患者中, 修饰长方案与长方案相比, 前者可以获得更多的卵子数量且没有卵泡早排的现象。本研究结果也显示修饰长方案组无因早发 LH 峰而取消周期的发生。

我们的前瞻性随机对照研究显示, 对于 POR 患者, 微刺激方案有着和修饰长方案相似的胚胎种植率、临床妊娠率、流产率及活产率; 同时, Gn 使用天数及使用剂量都显著减少。这一结果与徐捷荧等^[13]的回顾性分析研究结果一致, 该研究显示微刺激方案组 Gn 使用时间 & 总剂量均显著低于常规 COS 方案组, 两组的每移植周期临床妊娠率、胚胎种植率和流产率相似。该回顾性研究与我们的前瞻性随机对照研究均提示微刺激方案和常规 COS 方案对于 POR 患者有着相似的临床结局, 且我们的研究样本量较大, 随机分组设计也避免了混杂因素对结果的影响。此外, 本研究还发现, 尽管微刺激组的获卵数与可移植胚胎数均明显低于 COS 组, 但两组的优质胚胎数相同。这一结果提示, 与 COS 组相比, 微刺激方案所获得卵子发育潜能可能更高。动物实验^[14]已发现过度的卵巢刺激损害小鼠早期胚胎的发育潜能并增加其染色体非整倍体发生率。人类卵子研究也证实^[15]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, 但卵子染色体非整倍体发生率和 Gn 用量呈现剂量依赖的正相关关系。体外实验^[16]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。因此, 我们研究中 COS 方案优质胚胎形成率低于微刺激组, 可能与 COS 方案中高剂量的 Gn 使用有关。另外, 有研究^[17]表明, 大剂量 Gn 的使用可能会影响子宫内膜容受性, 使胚胎种植率降低, 流产率升高。但我们的研究并没有发现 COS 组的种植率降低。

鉴于修饰长方案组可移植胚胎数显著高于微刺激组, 因此, 单个取卵周期的累计妊娠率是否高于后者, 尚需要进一步探究。值得注意的是, 本研究的纳入样本量未达到统计学计算所需样本量, 仍需扩大样本量进行研究, 有必要时可考虑多中心前瞻随机对照研究。另本研究的评价指标未包括持续妊娠率和多胎妊娠率等, 对常规 COS 方案与微刺激方案的临床疗效评价具有一定的局限性。

综上所述, 我们的研究表明 POR 患者使用微刺激方案不差于常规 COS 方案, 且可以获得与常规 COS 方案相同的临床妊娠率, 同时, 使用微刺激方案可以减少 Gn 用量, 缩短促排时间, 提高患者的依从性。因此, 微刺激方案是 POR 患者较为理想的促排方案。

参考文献

- [1] Ubaldi F, Vaiarelli A, D Anna R, et al. Management of poor responders in IVF: Is there anything new? [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 14(1): 1-10.
- [2] Centre for Clinical Effectiveness. In women labelled as poor responders to ovulation stimulation in an assisted reproduction program, is there evidence for the effectiveness of increasing the total dose of FSH above 3000 IU? [EB/OL]. *Cochrane Database Syst Rev* 2000, HTA-20030660. <http://www.crd.york.ac.uk/CRDWeb/ShowRecord.asp?ID=32003000660>
- [3] Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, 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] Racowsky C, Ohno-Machado L, Kim J, et al. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(9): 2104-2113.
- [5] Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1155-1158.
- [6] Surrey ES, Schoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(4): 667-676.
- [7] Jevc YB, Bhandari HM. Effective treatment protocol for poor ovarian response: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Hum Reprod Sci*, 2016, 9(2): 70-81.
- [8] Abdel Mohsen I, Ezz El Din R. Minimal stimulation protocol using letrozole versus microdose flare up GnRH agonist protocol in women with poor ovarian response undergoing ICSI [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29(2): 105-108.
- [9] Revelli A, Chiado A, Dalmaso P, et al. "Mild" vs. "long" protocol for controlled ovarian hyperstimulation in patients with expected poor ovarian responsiveness undergoing in vitro fertilization (IVF): a large prospective randomized trial [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(7): 809-815.
- [10] Siristatidis C, Salamalekis G, Dafopoulos K, et al. Mild versus conventional ovarian stimulation for poor responders undergoing IVF/ICSI [J]. *In Vivo*, 2017, 31(2): 231-238.
- [11] Faber BM, Mayer J, Cox B, et al. Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders [J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(5): 826-830.
- [12] Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, et al. High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(11): 2292-2296.
- [13] 徐捷荧, 杨桂艳, 杨端玉, 等. 来曲唑促排卵在卵巢低反应患者中的应用 [J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(7): 561-564.
Xu JY, Yang GY, Yang CY, et al. Application of letrozole for ovulation induction in patients with poor ovarian response [J]. *J Reproduct Med*, 2014, 23(7): 561-564.
- [14] Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(6): 1237-1243.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Ma W, Song H, Das SK, et al. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation [J]. *Physiology*, 2003, 100(5): 2963-2968.

(编辑 余菁)