

超排卵全程应用 225 U 促黄体生成素对取卵及胚胎移植日血清血管内皮生长因子水平的影响

袁媛, 苗本郁, 麦庆云, 徐艳文, 周灿权*

(中山大学附属第一医院生殖医学中心//广东省生殖医学重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨促黄体生成素在控制性超排卵中降低血清血管内皮生长因子水平的有效性。【方法】20 例在超排卵全程添加 225 U 促黄体生成素(实验组)同 50 例未添加患者(对照组)比较超排卵启动日血清血管内皮生长因子水平, 人绒毛膜激素注射日、取卵日及胚胎移植日血清血管内皮生长因子较启动日的升高水平。【结果】试验组及对照组启动日血清血管内皮生长因子水平及人绒毛膜激素注射日血清血管内皮生长因子较启动日的升高水平差异不具有统计学意义; 试验组取卵日($P = 0.017$)及胚胎移植日血清血管内皮生长因子较启动日的升高水平($P = 0.009$)同对照组相比, 差异具有统计学意义。【结论】225 U 促黄体生成素在超排卵全程应用可有效降低取卵及胚胎移植日血清血管内皮生长因子水平。

关键词:超排卵; 促黄体生成素; 血管内皮生长因子

中图分类号: R711.6 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2015)02-0227-04

Whole Course 225 U Recombinant Luteinizing Hormone Application can Decrease Serum Vascular Endothelial Growth Factor Level on Oocyte Pick Up and Embryo Transfer Day

YUAN Yuan, MIAO Ben-yu, MAI Qin-yun, XU Yan-wen, ZHOU Can-quan

(Reproductive Research Center, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University//Key Laboratory of Reproductive Medicine of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China)

Corresponding author: ZHOU Can-quan, E-mail: zhoucanquan@hotmail.com

Abstract:【Objective】To investigate the effectiveness of luteinizing hormone (LH) in decreasing serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level during controlled ovarian hyperstimulation (COH).【Method】Comparing serum VEGF level on COH starting day and comparing elevated serum VEGF level on human chorionic gonadotropin (HCG) administration day, oocyte pick up (OPU) day and embryo transfer (ET) day between 20 patients with whole course 225 U LH application and 50 patients without during COH.【Results】Serum VEGF level on starting day and serum VEGF level elevated on HCG day was comparable of two groups. However, serum VEGF level elevated on OPU day ($P = 0.017$) and ET day ($P = 0.009$) of study group were significantly lower than control group.【Conclusion】Whole course 225 U LH application during COH can effectively decrease serum VEGF level on OPU and ET day.

Key words: controlled ovarian hyperstimulation; luteinizing hormone; vascular endothelial growth factor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(2): 227-230]

自然月经周期中, 促卵泡生成素 (follicular stimulation hormone, FSH) 的作用集中在在卵泡的募集、选择及优势化, 促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 则在卵泡的优势化、最终成熟及排卵中发挥重要作用。有学者研究提示^[1], 通过外源性添加 LH 来人为控制卵泡簇的发育中, LH 的选择

效应也同样存在。当 LH 浓度高于其上限时, 颗粒细胞增殖受到抑制, 非优势卵泡发育欠佳, 甚至闭锁^[2]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 由颗粒细胞分泌, 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 可增加颗粒细胞分泌 VEGF 并升高血清 VEGF 水平, 而 VEGF

收稿日期: 2014-07-10

基金项目: 广州市科技计划项目 (201300000097); 广东省生殖医学站实验室建设项目 (2012A061400003)

作者简介: 袁媛, 医学博士学位, 住院医师, 主要研究方向: 不孕症, E-mail: christy.beauty.yuan@gmail.com; * 通信作者: 周灿权, E-mail: zhoucanquan@hotmail.com

则在卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation hormone, OHSS)的发生中发挥重要作用^[3]。本研究探讨外源性添加大剂量 LH 以降低血清 VEGF 水平的有效性,为减少 OHSS 发生率或降低 OHSS 严重程度提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

本研究为前瞻性研究,选择 2012 年 1 月至 2012 年 6 月于中山大学附属第一医院生殖中心行体外受精(in vitro fertilization, IVF)或单精子卵胞浆内注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 治疗的潜在卵巢高反应患者 70 名。

纳入标准为:①使用长效促性腺激素释放激素类似物(gonadotropin releasing hormone analog, GnRHa)长方案降调节进入 IVF/ICSI 周期的患者;②年龄 ≤ 35 岁;③非多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)患者体质量指数(body mass index, BMI) ≤ 22 Kg/m²及超排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)启动日双侧窦卵泡(3~10 mm)计数 ≥ 13 个;④PCOS 患者(2003 版鹿特丹标准);⑤第 1 周期 IVF/ICSI 治疗或第 1 周期发生 OHSS 的进行第 2 周期 IVF/ICSI 治疗的患者;⑥近 3 个月内未接受 IVF/ICSI 治疗;⑦签署知情同意书并愿意按时接受随访。

排除标准为:①肝脏、肾脏、血液系统疾病;②内分泌系统(甲状腺、肾上腺)疾病;③下丘脑或垂体肿瘤;④卵巢肿瘤、子宫肿瘤或乳腺癌;⑤性传播疾病未治愈;⑥非 PCOS 患者的月经周期 > 42 d 或 < 26 d;⑦子宫畸形或宫腔异常,盆腔结构解剖位置改变;⑧对果纳芬、乐芮或其赋形剂过敏;⑨本试验的既往参与者。所有入组患者都必须满足所有入选标准,并且不符合任何一项排除标准。根据患者自身意愿,愿意接受干预治疗的 20 名患者进入实验组,不愿意接受干预治疗的 50 名患者进入对照组。本研究通过了中山大学附属第一医院伦理委员会的审查,并得到参与患者的知情同意。

1.2 方 法

1.2.1 超排卵方案 所有研究对象均采用长方案进行卵巢刺激。确认排卵或使用口服避孕药第 15~16 天的黄体中期,根据患者的 BMI 情况,一次性给予达菲林(曲普瑞林,伊普生,法国)1.0 mg 或

0.8 mg 皮下注射降调节,确认降调节水平后(血清 FSH < 5 mU/mL, LH < 5 mU/mL,雌二醇(estradiol, E₂) < 50 pg/mL),当阴道 B 超下卵巢内可见窦卵泡直径为 5~6 mm 时,启动卵巢刺激。试验组患者给予重组 FSH(recombined FSH, rFSH) 112.5 U(果纳芬,雪兰诺,瑞士)+重组 LH(recombined LH, rLH) 225 U(乐芮,雪兰诺,瑞士)进行卵巢刺激,对照组患者给予 rFSH 112.5 U 进行卵巢刺激。其后每隔 3~5 d 根据需要进行经阴道 B 超及血清 FSH、LH、E₂ 水平检测监测卵泡发育情况,根据卵泡发育情况可适当增加 FSH 剂量。

1.2.2 取卵、受精、移植、黄体支持及妊娠确认 当 ≥ 3 个卵泡的平均直径 ≥ 18 mm,于当天停用促性腺激素,于外源性促性腺激素最后一次给药后的 36 h 注射重组 HCG (recombined HCG, rHCG) 250 μ g(艾泽,雪兰诺,瑞士),36 h 后行经阴道超声显像引导下穿刺取卵术。受精、胚胎培养及胚胎移植均按照本中心工作常规进行。取卵当天即开始黄体支持,阴道用黄体酮(雪诺酮,雪兰诺,瑞士)90 mg q·d。胚胎移植后第 14 天,血清 β -HCG 检测确定生化妊娠状态。血清 β -HCG 为阳性,则继续黄体支持至胚胎移植后 4~5 周行超声检查确认临床妊娠状态,计数胚囊数、胚芽数、有无胎心活动,其后宫腔内活胎的患者黄体支持至妊娠 10 周。

1.2.3 试验出口 当研究对象偏离预期,出现下列情况时,从研究组中退出,并给予相应处理:①卵巢反应不良:卵巢刺激 > 14 d 时双侧卵巢无优势化卵泡(直径 > 10 mm)出现则取消该周期;②卵巢过度刺激:当 1 个卵泡直径 > 16 mm 时,血清 E₂ $> 4 500$ pg/mL,行 Coasting 治疗;③达到 HCG 日标准前,血清孕酮(progesterone, P)水平 > 1.5 ng/mL 需提早注射 HCG;④获卵数 > 30 个或 HCG 日血清 P > 1.5 ng/mL 及出现超声下子宫内膜形态改变的患者取消新鲜周期胚胎移植,前者给予预防性阿司匹林或其他对症治疗;⑤移植日前出现 OHSS 症状的患者取消新鲜周期胚胎移植,同时给予对症治疗。

1.2.4 OHSS 评估 轻度:客观标准:子宫直肠凹陷积液;主观标准:腹胀,盆腔不适,卵巢增大,伴或不伴气促、腹痛、恶心呕吐;中度:客观标准:盆腔积液(主要集中于子宫周围),红细胞压积(hematocrit, Hct) $> 45\%$,伴或不伴白细胞计数(white blood cell, WBC) $> 15 \times 10^9/L$ 、尿量 < 600

mL/24 h、血肌酐 > 1.5 mg/dL、转氨酶升高;主观标准:腹胀,盆腔不适,卵巢增大,伴或不伴气促、腹痛、恶心呕吐;重度:客观标准:临床腹水表现(盆腔及肠管周围积液),Hct > 45%,WBC > 15 × 10⁹/L,尿量 < 600 mL/24 h, 伴或不伴血肌酐 > 1.5 mg/dL、转氨酶升高、凝血功能障碍、胸腔积液;主观标准:腹胀,盆腔不适,卵巢增大,气促,伴或不伴腹痛、恶心呕吐。所有 OHSS 评估均只采用客观标准^[4]。

1.2.5 血清 VEGF 试剂盒标准及检测方法 VEGF 试剂盒:人血管内皮细胞生成素(VEGF)ELISA kit,美国, RayBiotech, ELH-VEGF-001。检测范围:10 ~ 2000 pg/mL; 批内变异: < 10%, 批间变异: < 12%。试验组 20 名患者及对照组 50 名患者,启动卵巢刺激日以无抗凝干燥管留取 2 mL 血液一管, HCG 日、取卵(ovum pick up, OPU)日及胚胎移植(embryo transfer, ET)日分别以无抗凝干燥管留取 2 mL 血液一管,常温下静置 3 ~ 4 h,待血液自然凝固,其后以 1 000 r/min(半径 = 12 cm)低速离心 10 min,吸取上清,-70 °C 冷冻保存以备用。血清样本的检测按照 ELISA 试剂盒操作指南执行。

1.3 统计学分析

利用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料采用均数 ± 标准差表示,根据条件采用 *t* 检验及两两比较的方差分析;计数资料采用 χ^2 检验;取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 研究对象的基本特征

20 名对照组患者及 50 名试验组患者年龄、BMI 及基础内分泌水平差异不具有统计学意义(表 1)。

2.2 血清 VEGF 水平

试验组及对照组启动日血清 VEGF 水平及 HCG 日血清 VEGF 较启动日的升高水平差异不具有统计学意义;试验组 OPU 日及 ET 日血清 VEGF 较启动日的升高水平低于对照组,差异具有统计学意义(表 2)。

2.3 临床结局比较

试验组及对照组获卵数、正常受精卵细胞数、可利用胚胎数差异不具有统计学意义(表 3)。试验组 20 名患者,2 名患者反应不良(均为 PCOS 患者),18 名患者成功取卵,16 名患者成功 ET,12 名患者获得妊娠,其中 10 名临床妊娠,获得 12 名活产儿,2 名患者中度 OHSS;对照组 50 名患者,3

表 1 研究对象的基本特征

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients ($\bar{x} \pm s$)

Characteristic	Study group	Control group	<i>P</i>
Female age/years	27.05 ± 4.16	27.38 ± 2.70	0.696
BMI/(kg/m ²)	20.62 ± 3.83	20.22 ± 2.26	0.597
Basal FSH/(mU/mL)	5.33 ± 1.09	4.89 ± 1.19	0.158
Basal LH/(mU/mL)	3.82 ± 1.44	4.64 ± 3.18	0.273
Basal PRL/(μg/mL)	17.03 ± 6.62	18.78 ± 9.78	0.467
Basal E ₂ /(pg/mL)	34.05 ± 12.36	31.23 ± 11.38	0.367
Basal T/(ng/mL)	0.62 ± 0.22	0.64 ± 0.39	0.825

表 2 血清 VEGF 水平

Table 2 Serum VEGF level ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Characteristic	Study group	Control group	<i>P</i>
VEGF at stimulation	660 ± 121	763 ± 148	0.121
VEGF elevated on HCG day	63 ± 43	185 ± 64	0.136
VEGF elevated on OPU day	49 ± 74	386 ± 98	0.017
VEGF elevated on ET day	277 ± 50	494 ± 83	0.009

名患者反应不良(均为 PCOS 患者),47 名患者成功取卵,30 名患者成功 ET,21 名患者获得妊娠,20 名患者临床妊娠,获得 15 名活产儿,5 名患者轻度 OHSS,1 名患者中度 OHSS,11 名患者重度 OHSS。试验组妊娠率、临床妊娠率及每移植周期活产率与对照组差异无统计学意义;对照组与试验组轻、中度 OHSS 发病率相近,而试验组重度 OHSS 发生率低于对照组($P < 0.05$,表 4)。

表 3 临床结局比较

Table 3 Type 1 clinical outcomes of participants $\bar{x} \pm s$

Outcome	Study group	Control group	<i>P</i>
Oocytes retrieved	19.47 ± 8.32	21.80 ± 12.89	0.468
Oocytes fertilized	13.68 ± 6.01	14.10 ± 8.34	0.843
Embryos utilizable	8.95 ± 5.07	10.62 ± 5.89	0.278

表 4 临床结局比较

Table 4 Type 2 clinical outcomes of participants [*n*/*N*(%)]

Outcome	Study group	Control group	<i>P</i>
Pregnancy rate	12/16 (75.0)	21/30(70.0)	0.720
Clinical pregnancy rate	10/16 (62.5)	20/30(66.7)	0.777
Live birth rate per ET	12/16 (75)	15/30(50)	0.126
Mild OHSS rate	0	5/47(10.6)	0.311
Medium OHSS rate	2/18 (11.1)	1/47(2.1)	0.183
Severe OHSS rate	0	11/47(23.4)	0.027

3 讨 论

COH过程中, 卵泡的募集和发育持续发生于促排卵的全过程, 高剂量 LH 添加, 增加卵泡膜细胞雄激素的分泌, 雄激素对于卵泡存在低剂量促进发育, 高剂量抑制发育的作用^[5]。本研究根据 LH 水平高于其上限时存在对卵泡的抑制作用, 在潜在的卵巢高反应人群中, 从启动卵巢刺激开始, 即在试验组添加大剂量 LH(225 U)以抑制卵泡发育从而降低可分泌 VEGF 的颗粒细胞数量。而 VEGF 在 OHSS 的病理生理机制中作用尤为特殊, 其水平与 OHSS 严重程度相关^[6]。并且, 多数其他血管生成因子, 如肾素原、肾素、前列腺素、血管紧张素 II、VEGF、肿瘤坏死因子 α 、胰岛素样生长因子 1、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、肿瘤生长因子 α/β 、白介素 1 β /2/6 等在 OHSS 发病机制中的作用也是直接或间接通过 VEGF 介导。体外实验表明^[7], VEGF 通过重排血管内皮间隙连接蛋白, 如增加钙粘蛋白, 减少封闭蛋白 5, 改变肌动蛋白的纤维排列改变血管通透性。出于降低血液中活性 VEGF 的预防性白蛋白静脉滴注及多巴胺受体激动剂静脉灌注或口服均能有效预防 OHSS 发生。前者可非特异性的结合血浆 VEGF 同时提高血液胶体渗透率, 后者则可能通过多巴胺受体 2 诱导 VEGFR2 内在化, 阻断卵巢大量分泌的 VEGF 作用, 降低血管紧张素的分泌, 从而减轻血管通透性的改变^[8-9]。本研究监测了患者启动卵巢刺激日、HCG 注射日、OPU 日及 ET 日血清 VEGF 水平, 试验组及对照组启动卵巢刺激日及 HCG 注射日血清 VEGF 水平相当, 但对照组患者 OPU 日及 ET 日血清 VEGF 较启动日的升高水平显著高于试验组。这验证了颗粒细胞 VEGF 分泌增加需要 HCG 的诱导, 多卵泡发育存在大量具有分泌 VEGF 的颗粒细胞, 当其受到 HCG 作用后, 具有黄素化能力的颗粒细胞 VEGF 的分泌也随之增加。本研究试验组添加大剂量 LH, 当血清 LH 水平高于其上限时, 具有抑制颗粒细胞增殖, 促进其凋亡的作用, 试验组 OPU 日及 ET 血清 VEGF 较启动日的升高水平显著低于对照组, 验证了大剂量 LH 添加对颗粒细胞的作用。血清 VEGF 水平与 OHSS 严重程度相关, 与本研究中试验组重度 OHSS 发生率显著低于对照组的相符。

本研究初步探讨了在潜在卵巢高反应患者 COH 过程中卵巢刺激全程添加大剂量 LH 的作用, 证实了大剂量 LH 可有效降低颗粒细胞 VEGF 分泌, 降低重度 OHSS 发生率, 同时不带来降低临床妊娠率的不利影响。

参考文献

- [1] Bühler KF, Fischer R. Recombinant human LH supplementation versus supplementation with urinary hCG -based LH activity during controlled ovarian stimulation in the long GnRH -agonist protocol: a matched case-control study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(5): 345-350.
- [2] Munoz E, Bosch E, Fernandez I, et al. The role of LH in ovarian stimulation [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(3): 409-416.
- [3] Naredi N, Talwar P, Sandeep K. VEGF antagonist for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: Current status[J]. *Med J Armed Forces India*, 2014, 70(1): 58-63.
- [4] Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(2): 389-400.
- [5] Gervásio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sú MF, et al. The role of androgen hormones in early follicular development [J]. *ISRN Obstet Gynecol*, 2014, Apr 10;2014: 818010.
- [6] Lainas GT, Kolibianakis EM, Sfontouris IA, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels following luteal gonadotrophin -releasing hormone antagonist administration in women with severe early ovarian hyperstimulation syndrome[J]. *BJOG*, 2014, 121(7): 848-855.
- [7] Rodewald M, Herr D, Duncan WC, et al. Molecular mechanisms of ovarian hyperstimulation syndrome: paracrine reduction of endothelial claudin 5 by hCG in vitro is associated with increased endothelial permeability [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(5): 1191-1199.
- [8] Nouri K, Haslinger P, Szabo L, et al. Polymorphisms of VEGF and VEGF receptors are associated with the occurrence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) -a retrospective case -control study [J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7: 54.
- [9] Ferrero H, García-Pascual CM, Gómez R, et al. Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in vitro: implications for treatment of ovarian hyperstimulation syndrome with dopamine receptor 2 agonists [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(5): 1411-1418.

(编辑 徐杰)