

成熟卵泡比例与 HCG 注射时机的选择及对卵子发育潜能的影响

李 轶, 李瑞岐, 区颂邦, 张宁锋, 王文军, 李 予, 张清学, 杨冬梓*
(中山大学孙逸仙纪念医院生殖医学中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨采用成熟卵泡比例来决定 HCG 注射时机的可行性, 研究在不同成熟卵泡比例的情况下注射 HCG 对卵子发育及妊娠结局的影响, 摸索最适合的成熟卵泡比例。【方法】本回顾性研究共纳入 198 例需行单精子胞浆注射 (ICSI) 助孕治疗的女性不孕患者。按照 HCG 日成熟卵泡 (≥ 18 mm) 的不同比例将患者分成 3 组: ①低比例组: 成熟卵泡比例 $\leq 20\%$; ②中比例组: $20\% < \text{成熟卵泡比例} \leq 40\%$; ③高比例组: 成熟卵泡比例 $> 40\%$, 注射 HCG 后 36h 取卵, 将获得的卵丘复合物剥除卵丘颗粒细胞用于检测 GREM1 和 HAS2 基因的 mRNA 表达水平。分别统计和比较 3 组患者卵子成熟、受精、胚胎发育及临床妊娠情况。【结果】卵子成熟率在低比例组显著低于中比例组和高比例组 ($P < 0.05$)。正常受精率在 3 组间无显著差异 ($P > 0.05$)。异常受精率在低比例组显著低于中比例组和高比例组 ($P < 0.05$)。卵裂率、可利用胚胎数在低比例和中比例组之间无显著差异, 但均高于高比例组 ($P < 0.05$)。优质胚胎率、种植率、妊娠率在低比例组均显著高于中比例组和高比例组 ($P < 0.05$)。卵丘颗粒细胞 GREM1 和 HAS2 基因 mRNA 表达水平在低比例组显著高于中比例组和高比例组 ($P < 0.05$)。【结论】采用成熟卵泡比例决定 HCG 的注射时机可以更全面地反映卵泡的整体发育状态, 并为把握 HCG 注射时机提供更为准确的依据。随着成熟卵泡比增加卵子的发育潜能逐渐降低, 因此注射 HCG 时应将成熟卵泡的比例控制在一定范围较合适。

关键词: HCG 注射; 卵泡经线; 促排卵刺激; 体外受精-胚胎移植

中图分类号: R711.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)04-0552-07

Proportion of Dominant Follicles as the Guidance of HCG Triggering and Its Effect on the Oocyte Developmental Competence

LI Yi, LI Rui-qi, OU Song-bang, ZHANG Ning-feng, WANG Wen-jun, LI Yu, ZHANG Qing-xue, YANG Dong-zi
(Reproduction Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, 510120, China)

Abstract: 【Objective】To discuss the feasibility of using proportion of dominant follicles as the guidance of HCG triggering, and investigate the effect of HCG triggering by different proportion of dominant follicles on the oocyte developmental competence and pregnancy outcome so as to investigate the suitable proportion for HCG triggering. 【Methods】In the present retrospective study, one hundred and ninety-eight women who underwent intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were divided into three groups according to the proportion of dominant follicles: (1) low proportion: $< 20\%$; (2) middle proportion: $20\% - 40\%$; (3) high proportion: $> 40\%$. The collection of cumulus-oocyte complexes (COCs) was conducted 36 h after HCG injection. The cumulus granulosa cells were stripped off for detecting the mRNA expression of GREM1 and HAS2. The parameters of oocyte developmental and pregnancy outcome were compared between the three groups. 【Results】Oocyte maturation rate in the low proportion group was lower than that in the middle and high proportion group ($P < 0.05$). The normal fertilization rate was not different between the three group ($P > 0.05$). The abnormal fertilization rate in the low proportion group was lower than that in the middle and high proportion group ($P < 0.05$). The cleavage rate and available embryo number in the low proportion group were not significantly different from those in the middle proportion group, and were higher than those in the high proportion group ($P < 0.05$). The high-quality embryo rate, implantation rate

收稿日期: 2014-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(81200417); 教育部博士点新教师基金(20120171120093); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2012040007621); 广东省医学科研基金(B201204); 中山大学青年教师培育项目(B002012002); 中山大学孙逸仙纪念医院“逸仙医学人才培养计划”; 广州市珠江科技新星专项基金(2014J2200044)

作者简介: 李轶, 博士, 主治医师, E-mail: liyi820920@126.com; * 通信作者: 杨冬梓, 教授, 博士生导师, E-mail: yangdz@mail.sysu.edu.cn

and pregnancy rate in the low proportion group were higher than those in the middle and high proportion group ($P < 0.05$). The mRNA expression level of GREM1 and HAS2 in the low proportion group were higher than that in the middle and high proportion group ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The proportion of dominant follicle number may reflect thoroughly the global state of all the follicles in ovaries and serve as the objective basis for HCG triggering. The oocyte developmental competence may be impaired as the proportion of dominant follicle increased, so the proportion would better be controlled under certain range.

Key words: HCG triggering; follicle size; ovarian hyperstimulation; in vitro fertilization and embryo transfer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4):552-558]

体外受精-胚胎移植技术已经成为治疗不孕症的一项重要技术。通过促排卵治疗获得优质的卵子是该技术成功的关键环节。在促排卵过程中需要通过注射人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 模拟生理性促黄体激素 (Luteinizing Hormone, LH) 峰促进卵子成熟并排出第一极体, 因此 HCG 注射的时机选择尤为重要。临床上常参考成熟卵泡的径线来决定 HCG 的注射时机, 当少数几个成熟卵泡达到一定径线时注射 HCG^[1-2]。事实上, 促排卵过程中通常会刺激多个卵泡同时发育, 此时若仅根据少数几个成熟卵泡的发育情况决定 HCG 的注射时机将存在一定的缺陷。最主要的问题是仅凭几个成熟卵泡无法反映卵巢中卵泡发育的整体状态。在某些情况下促排卵药物刺激后卵泡发育不同步^[3], 仅有少量卵泡达到成熟卵泡的标准, 而其余卵泡发育都相对滞后, 若此时注射 HCG 则可能导致许多卵泡并未充分生长, 最终无法获得足够数量的优质卵子。此外, 目前各家生殖中心对于成熟卵泡究竟达到多少个时可以注射 HCG 也没有达成完全一致, 这也造成 HCG 注射标准不统一^[4-6]。由于促排卵会诱发多个卵泡同时生长, 而其目的也是为了获得尽可能多的优质卵子, 从而增加可移植胚胎的数量提高妊娠率。因此, HCG 注射的最佳时机应该是有大部分卵泡都能达到成熟状态, 这样才能获得更多的优质卵子。本研究中, 我们将采用成熟卵泡占卵泡总数的比例来决定 HCG 注射的时机, 并对患者进行分组研究在成熟卵泡不同比例的情况下注射 HCG 时对卵子发育及妊娠结局的影响, 从而摸索最适合的成熟卵泡比例。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本回顾性研究共纳入 198 例来本生殖中心就

诊的女性不孕患者, 这些患者主要因男方严重少弱精症 (精子总数 $< 1 \times 10^6/\text{mL}$ 或精子活动力 $< 5\%$) 需行单精子胞浆注射 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)。本研究已经过中山大学伦理委员会批准, 所有参与研究的患者均签署了知情同意书。患者的纳入标准为: ①长方案 ICSI 妇女; ②年龄 ≤ 42 岁; ③BMI (Body Mass index) = $17 \sim 28 \text{ kg}/\text{m}^2$; ④基础卵泡刺激系 (Follicular stimulating hormone, FSH) $\leq 12 \text{ U}/\text{L}$; ⑤达到 HCG 注射日的标准 (3 个主导卵泡直径 $\geq 18 \text{ mm}$)。排除标准为: ①反复种植失败 (既往 3 次及以上胚胎种植失败者); ②黏膜下子宫肌瘤、宫腔粘连、纵隔子宫等; ③明确的输卵管积水; ④子宫内膜异位症; ⑤多囊卵巢综合征。

1.2 促排卵方案及分组

所有患者促排卵均采用标准长方案。于黄体晚期注射达菲林 1.25 mg 进行垂体降调节。降调节两周后, 给予果纳芬 $150 \sim 300 \text{ U}$ 刺激卵泡生长, HCG 日的注射标准为成熟卵泡 ($\geq 18 \text{ mm}$) 大于 2 个。本研究按照成熟卵泡的比例将患者分成 3 组, 分组依据为将所有患者卵泡比例进行升序排列, 采用 3 分位法确定上、下 $1/3$ 界限分别为 20% 和 40%, 据此将患者分为 3 组。①低比例组: 成熟卵泡比例 $\leq 20\%$; ②中比例组: $20\% <$ 成熟卵泡比例 $\leq 40\%$; ③高比例组: 成熟卵泡比例 $> 40\%$ 。注射 HCG 后 36 h 在 B 超引导下使用 17G 取卵针经阴道穿刺取卵。

1.3 卵丘颗粒细胞的收集及检测

共获得卵丘复合物共 2 048 个, 卵丘颗粒细胞体外培养 4 h 后在倒置显微镜下用透明质酸酶消化剥除卵丘颗粒细胞, 剥除的卵丘颗粒细胞用 PBS (phosphate buffer solution) 冲洗两遍, 离心后去除杂质用于定量 PCR 检测, 检测方法按之前文献报道的方法进行^[7-8]。将收集的卵丘颗粒细胞加入 Trizol 细胞裂解液, 提取卵丘颗粒细胞总 RNA, 采

用 Superscript III (Invitrogen, CA) 将其逆转录为 cDNA。PCR 定量测定采用 Taqman 荧光探针法, 仪器为 ABI Prism 7700 检测系统。GREM1 和 HAS2 基因 PCR 引物序列请见表 1。两种基因 PCR 反应条件均为: 93 °C 3 min, 然后 93 °C 45 s, 55 °C 1 min, 共 40 个循环。卵丘复合物评分共分为 3 级: I 级: 卵母细胞形态规则, 周围卵丘颗粒细胞较完整, 与卵母细胞紧密连接, 卵母细胞胞浆透明; II 级: 卵母细胞形态规则, 周围卵丘颗粒细胞较完整, 与卵母细胞连接较疏松, 卵母细胞胞浆较暗; III 级: 卵母细胞形态欠规则, 周围卵丘颗粒细胞不完整或缺如, 卵母细胞发黑。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The primers for PCR

Primer	Primer sequence
GREM1 probe	5'-FAM-AACCGCTTCTGTTACGGCCAGTGCA-TAMRA-3'
GREM1 sense	5'-TGCAACAGTCGCACCATCAT-3'
GREM1 antisense	5'-TGCAGAAGGAGCAGGACTGA-3'
H-HAS2 probe	5'-FAM-AAATCATGGGCAGACAGAAATCAGCCA-TAMRA-3'
H-HAS2 sense	5'-ATGGGAAGTCAAGATGACCTTT-3'
H-HAS2 antisense	5'-CTGTCTCACCCGGGACCCTTT-3'
GAPDH probe	5'-FAM-CATCCATGACAACCTTTGGTATCGTG-TAMRA-3'
GAPDH sense	5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'
GAPDH antisense	5'-CAGTCTTCTGGTGGCAGTGA-3'

1.4 卵子及胚胎发育指标

在倒置显微镜下观察卵子成熟情况, 若镜下可见第一极体则定义为成熟期卵子(MII)。HCG 注射后 38 ~ 42 h, 采用 ICSI 方法将单个精子注射至卵子胞浆中促使其受精, 受精后 18 ~ 19 h 观察卵子受精情况并进行原核评分, 观察到 2 个原核定义为正常受精(2PN), 若观察到 1 个或多个原核则定义为异常受精。受精后 43 ~ 45 h 观察卵裂情况, 正常受精的胚胎进一步发育为 4 ~ 6 细胞定义为正常卵裂, 若停止发育为未卵裂。受精后 67 ~ 69 h 观察胚胎发育情况并进行卵裂期评分, 若卵裂球数目 ≥ 4 , 大小较均匀, 碎片比例 $< 20\%$ 的胚胎则评为可利用胚胎。若卵裂球数目为 7 ~ 9, 大小均匀, 碎片比例 $< 10\%$ 的胚胎则评为优质胚胎。将受精后第 3 天胚胎移植(不超过 3 个)入宫腔, 5 周后在 B 超下显示孕囊及胎心搏动定义为临床妊娠。

1.5 统计学方法

采用 One-sample K-S 法对所有数据进行正态检验, 对非正态数据采用对数法进行正态转化。数据比较采用方差分析 (Least Significant Difference, LSD) 和卡方检验, 统计软件采用 SPSS 11.5, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者基本资料比较

198 例患者共分为 3 组: 低比例组 108 例, 中比例组 60 例, 高比例组 30 例。3 组患者的基本资料如年龄、BMI、卵巢体积、基础窦卵泡数以及基础性激素水平之间无显著差异 ($P > 0.05$, 表 2)。

2.2 促排卵资料比较

三组患者果纳芬总剂量和促排卵时间之间无显著差异 ($P > 0.05$)。 ≥ 18 mm 卵泡比例在低比例组 (11.83%) 显著低于中比例组 (29.94%), 中比例组又显著低于高比例组 (54.11%)。 ≥ 18 mm 平均卵泡数在低比例组 (2.35 ± 1.45) 显著低于中比例组 (4.03 ± 2.07), 中比例组又显著低于高比例组 (5.79 ± 1.92)。HCG 日最大卵泡径线在低比例组 (20.41 ± 2.04) 显著低于中比例组 (21.61 ± 1.99), 中比例组又显著低于高比例组 (22.07 ± 2.31)。HCG 日雌二醇/成熟卵泡数在低比例组 (537.16 ± 108.07) 显著高于中比例组 (261.67 ± 96.32) 和高比例组 (211.85 ± 85.53), 中比例组又显著高于高比例组。3 组患者的平均获卵数无显著差异 (表 2)。

2.3 胚胎培养指标比较

共获得卵丘复合物 2 048 只, 其中低比例组 1 234 只, 中比例组 583 只, 高比例组 231 只。I 级卵丘复合物百分比在低比例组 (26.67%) 显著高于中比例组 (17.32%) 和高比例组 (15.15%), 后两组间无显著差异。II 级卵丘复合物百分比在低比例组 (73.18%) 显著低于中比例组 (80.44%) 和高比例组 (79.22%), 后两组间无显著差异。III 级卵丘复合百分比在低比例组 (0.16%) 显著低于中比例组 (2.23%), 中比例组又显著低于高比例组 (5.63%)。卵子成熟率在低比例组 (80.60%) 显著低于中比例组 (84.38%) 和高比例组 (91.49%), 后两组间无显著差异。正常受精率在 3 组间并无显著差异。异常受精率在低比例组 (6.51%) 和中比例组 (6.62%) 之间无显著差异,

表2 各组患者基本资料和临床指标比较

Table 2 Comparison of general information and clinical parameters

General parameters	Low proportion	Middle proportion	High proportion
Case	108	60	30
Age/years	32.63 ± 4.46	32.57 ± 4.95	32.45 ± 6.67
Body mass index/(kg/m ²)	21.66 ± 3.42	21.15 ± 2.91	21.26 ± 3.08
Ovarian volume/cm ³	5.80 ± 3.28	5.68 ± 2.72	5.28 ± 2.69
Antral follicle count (per ovary)	6.53 ± 3.41	6.25 ± 2.99	6.28 ± 3.53
Follicular stimulating hormone/(U/L)	8.70 ± 3.44	8.27 ± 2.82	8.63 ± 2.13
Luteinizing hormone/(U/L)	5.15 ± 3.29	5.28 ± 3.34	4.97 ± 3.19
Estradiol/(pg/mL)	14.97 ± 4.38	18.56 ± 7.18	16.11 ± 4.56
Testosterone/(ng/L)	1.69 ± 0.83	1.92 ± 0.62	1.47 ± 0.64
Prolactin/(pg/mL)	16.59 ± 8.33	16.33 ± 8.90	16.11 ± 9.16
Gonadotropin dose/IU	2 113 ± 907	2 284 ± 1 022	2 041 ± 1 179
Gonadotropin time/d	11.06 ± 2.94	10.76 ± 3.12	10.21 ± 4.77
Follicular proportion(≥18 mm)	11.83% ¹⁾	29.94% ³⁾	54.11% ²⁾
Average follicular number(≥18 mm)	2.35 ± 1.45 ¹⁾	4.03 ± 2.07 ³⁾	5.79 ± 1.92 ²⁾
Maximum follicle diameter/cm	20.41 ± 2.04 ¹⁾	21.61 ± 1.99 ³⁾	22.07 ± 2.31 ²⁾
E2/dominant follicles number/(pg/mL)	537.16 ± 108.07 ¹⁾	261.67 ± 96.32 ³⁾	211.85 ± 85.53 ²⁾
Progesterone/(ng/mL)	1.33 ± 0.63	1.38 ± 0.59	1.32 ± 0.58
Average number of retrieved oocytes	10.03 ± 2.29	10.88 ± 2.61	9.07 ± 2.98

The variance analysis and chi-square analysis were used for data comparisons. 1) low proportion group compared with middle proportion group, $P < 0.05$, 2) low proportion group compared with high proportion group, $P < 0.05$, 3) middle proportion group compared with high proportion group, $P < 0.05$.

表3 各组卵子及胚胎发育指标比较

Table 3 Comparison of oocyte and embryo developmental parameters

Parameters	Low proportion	Middle proportion	High proportion
Total number of retrieved oocytes	1234	583	231
Cumulus-oocyte complex grade			
Grade I	26.67% ¹⁾	17.32%	15.15% ²⁾
Grade II	73.18% ¹⁾	80.44%	79.22% ²⁾
Grade III	0.16% ¹⁾	12.23% ³⁾	5.63% ²⁾
Maturation rate	80.60% ¹⁾	84.38%	91.49% ²⁾
Normal fertilization rate	70.05%	70.58%	72.56%
Abnormal fertilization rate	6.51%	6.62% ³⁾	12.13% ²⁾
Cleavage rate	89.80%	89.23% ³⁾	78.08% ²⁾
Available embryo number	6.46 ± 2.82	5.50 ± 1.18 ³⁾	4.34 ± 1.21 ²⁾
Good embryo rate	60.19% ¹⁾	46.67% ³⁾	41.93% ²⁾
Implantation rate	41.41% ¹⁾	31.58%	29.27% ²⁾
Pregnancy rate	56.60% ¹⁾	48.33% ³⁾	40.74% ²⁾

The variance analysis and chi-square analysis were used for data comparisons. 1) low proportion group compared with middle proportion group, $P < 0.05$, 2) low proportion group compared with high proportion group, $P < 0.05$, 3) middle proportion group compared with high proportion group, $P < 0.05$.

两组均显著低于高比例组(12.13%)。卵裂率在低比例组(89.80%)和中比例组(89.23%)之间无显著差异,两组均显著低于高比例组(78.08%)。

可利用胚胎数在低比例组(6.46 ± 2.82)和中比例组(5.50 ± 1.18)之间无显著差异,两组均显著高于高比例组(4.34 ± 1.21)。优质胚胎率在低比

例组(60.19%)显著高于中比例组(46.67%),中比例组又显著高于高比例组(41.93%)。种植率在低比例组(41.41%)显著高于中比例(31.58%)和高比例组(29.27%),后两组间无显著差异。妊娠率在低比例组(56.60%)显著高于中比例组(48.33%),中比例组又显著高于高比例组(40.74%)。具体请见表3。

2.4 卵丘颗粒细胞 GREM1 和 HAS2 基因 mRNA 相对表达水平比较

卵丘颗粒细胞 GREM1 基因 mRNA 相对表达水平在低比例组(11.90 ± 1.51)显著高于中比例组(7.51 ± 0.80)和高比例组(6.72 ± 0.61),后两组间无显著差异。卵丘颗粒细胞 HAS2 基因 mRNA 相对表达水平在低比例组(139 ± 16)显著高于中比例组(103 ± 10)和高比例组(92 ± 6),后两组间无显著差异(图1)。

3 讨论

促排卵过程中 HCG 的注射时机将直接影响卵子成熟及后续的发育。传统的方法常根据少数几个成熟卵泡的发育情况确定 HCG 的注射时机,该方法存在一定片面性。本研究首次采用成熟卵泡数占卵泡总数的比例作为 HCG 注射的参考依据,同时研究在成熟卵泡不同比例的情况下注射 HCG 对卵子发育潜能及妊娠结局影响,进一步摸

索 HCG 注射最适合的成熟卵泡比例。

本研究中,我们按照不同的成熟卵泡比注射 HCG,将患者分为低比例组、中比例组、高比例组。随着成熟卵泡比例的增加,患者的平均成熟卵泡经线、最大卵泡经线均依次增大,差异具有显著性。但如果按传统的方法计算成熟卵泡的数量,3组间成熟卵泡的数量波动较大且相互重叠。事实上,这3组患者之间卵子发育、胚胎质量以及最终的妊娠结局均存在显著差异。因此,仅根据成熟卵泡的数量确定 HCG 的注射时机并不适合所有的患者,主要因为某些患者促排卵过程中卵泡发育不同步,这时少数几个成熟卵泡是无法代表卵泡的发育整体状态,此时若注射 HCG 会使得一些卵泡无法充分生长,最终无法获得足够数量的优质卵子。

大量研究证实从大卵泡获得的卵子质量优于小卵泡,因此大多数观点倾向于从较大卵泡获取卵子易于形成优质的胚胎^[9-11]。本研究中高比例组的成熟卵泡无论是径线和数量均显著高于其它两组,与先前的报道相一致的是该组卵子成熟率最高,尽管正常受精率有轻微地增加,但异常受精率却显著增加^[12]。但该组卵子的胚胎形成率、优质胚胎率、种植率以及最终的妊娠率反而有所下降,这说明当卵泡经线过大反而会对卵子质量造成负面影响,最主要的问题可能是卵泡已黄素化^[13]。卵丘复合物的分级一定程度可以反映卵子的成

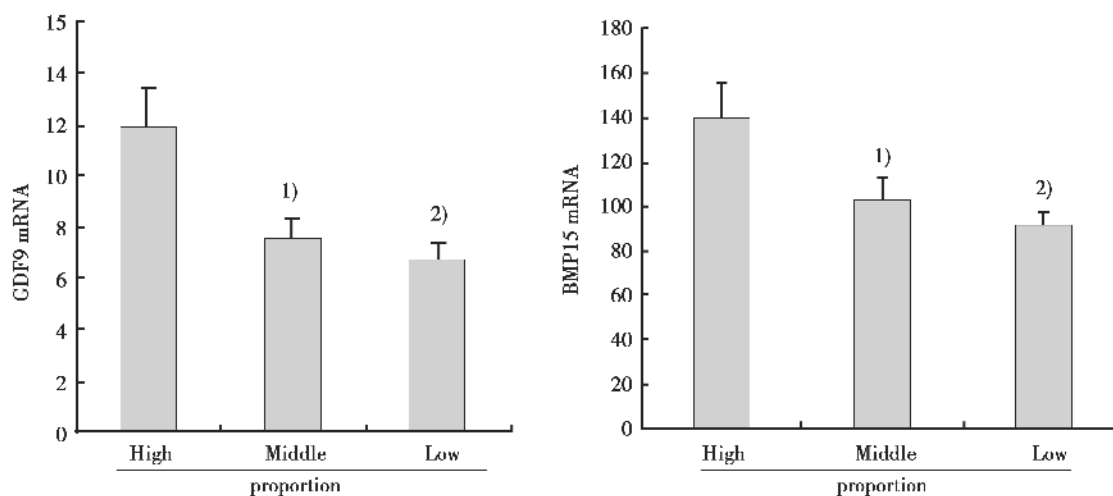


图1 不同卵泡比例组 GDF9 和 BMP15 mRNA 表达水平比较

Fig.1 Comparison of GDF9 and BMP15 mRNA levels between the groups of different follicular proportion

The variance analysis were used for data comparisons. 1) low proportion group compared with middle proportion group $P < 0.05$, 2) low proportion group compared with high proportion group $P < 0.05$.

熟情况^[14-15]。随着成熟卵泡比例的增加成熟卵丘复合物(Ⅱ级)比例也增高,但是一些老化的卵丘复合物(Ⅲ级)比例也随之增加。另外,研究显示卵泡颗粒细胞的激素功能也可以间接反映卵子的质量^[16-17]。通过比较HCG日雌二醇/成熟卵泡比例可以发现随着成熟卵泡比例增加雌二醇的分泌水平也逐渐下降。如果以每个成熟的成熟卵泡分泌的雌二醇约为250 pg/mL,高比例组平均每个成熟卵泡分泌雌二醇仅为40 pg/mL。需要说明的是成熟卵泡是分泌雌二醇的主要来源,但也不排除其他小卵泡也能分泌雌二醇,本研究采用雌二醇/成熟卵泡比例大致代表每个成熟卵泡的雌二醇分泌水平以协助临床判断HCG的注射时机。成熟卵泡平均雌二醇的分泌水平下降预示着卵泡功能减退以及卵子质量下降。因此,平均每个成熟卵泡分泌的雌二醇水平也是决定HCG注射的重要参考指标。

卵丘颗粒细胞与卵子之间通过缝隙连接存在着密切的信息交流,先前的研究发现卵丘颗粒细胞中某些基因的表达水平可以反映卵子发育潜能^[18-20]。GREM1作为骨形态蛋白15(bone morphogenetic protein, BMP15)的拮抗剂通过参与卵丘对话之间的信号交流调节卵泡的生长^[21]。HAS2主要参与调控细胞外基质的形成^[22]。这两种基因在卵丘颗粒细胞上均有表达并且已被证实与卵子发育潜能密切相关^[23-25]。因此本研究选取这两种基因用于间接反映卵子的发育潜能,结果显示随着成熟卵泡比例增加这两种基因mRNA的表达水平显著降低,相应的胚胎形成率、种植率和临床妊娠率也下降趋势。该结果进一步说明当卵泡径线超过一定程度时卵子的发育潜能将呈现下降趋势,这也可能与卵子的过度成熟和老化有关。

综上所述,HCG注射时机是促排卵过程中的一个关键环节,正确把握注射时机将对卵子质量及妊娠结局产生重要的影响。与传统方法不同,本研究通过评估成熟卵泡数占总卵泡数的比例决定HCG的注射时机,该方法可以更全面地反映卵泡的整体发育状态,并为HCG注射时机的把握提供更为准确的依据。此外,当按照不同成熟卵泡比注射HCG时发现随着成熟卵泡比增加卵子的发育潜能显著降低,由此可见应将成熟卵泡的比例控制在一定范围。本研究将为今后促排卵过程中判断HCG的注射时机提供新的参考依据,但由于各

个中心在成熟卵泡的定义及测量方面存在差异,因此各中心还需根据自身的条件决定最合适的成熟卵泡比。

参考文献

- [1] Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L, et al. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection[J]. *Fertil Steril*, 1994, 62(6): 1205-1210.
- [2] Ectors FJ, Vanderzwalmen P, Van Hoeck J, et al. Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection [J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(9): 2002-2005.
- [3] Erickson GF, Danforth DR. Ovarian control of follicle development[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 172(2 Pt 2): 736-47.
- [4] Fluker M, Grifo J, Leader A, et al. North American Ganirelix Study Group. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation [J]. *Fertil Steril*, 2001, 75(1): 38-45.
- [5] Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, et al. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix)[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(12): 2533-2539.
- [6] de Jong D, Macklon NS, Eijkemans MJ, et al. Ganirelix dose-finding study group. dynamics of the development of multiple follicles during ovarian stimulation for in vitro fertilization using recombinant follicle-stimulating hormone (puregon) and various doses of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (orgalutran/antagon)[J]. *Fertil Steril*, 2001, 75(4): 688-693.
- [7] Wei LN, Liang XY, Fang C, et al. Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(2): 464-468.
- [8] Li Y, Wei LN, Liang XY. Follicle-stimulating hormone suppressed excessive production of antimullerian hormone caused by abnormally enhanced promoter activity in polycystic ovary syndrome granulosa cells[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(7): 2354-2358.
- [9] Miller KF, Goldberg JM, Falcone T. Follicle size and

- implantation of embryos from in vitro fertilization [J]. *Obstet Gynecol*, 1996, 88(4 Pt 1): 583-586.
- [10] Ectors FJ, Vanderzwalmen P, Van HJ, et al. Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection [J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(9): 2002-2005.
- [11] Haines CJ, Emes AL. The relationship between follicle diameter, fertilization rate, and microscopic embryo quality [J]. *Fertil Steril*, 1991, 55(1): 205-207
- [12] Rosen MP, Shen S, Dobson AT, et al. A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(3): 684-690.
- [13] Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, et al. Prolongation of the follicular phase in in vitro fertilization results in a lower ongoing pregnancy rate in cycles stimulated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(1): 102-107.
- [14] Boni R, Cuomo A, Tosti E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(3): 836-842.
- [15] De WAA, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex [J]. *J Anim Sci*, 2000, 78(5): 1277-1283.
- [16] Wunder DM, Mueller MD, Birkhäuser MH, et al. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2005, 22(6): 257-264.
- [17] Xia P, Younglai EV. Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment [J]. *J Reprod Fertil*, 2000, 118(2): 229-233.
- [18] Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals [J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82-83(1): 431-446. Review.
- [19] Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(4): 399-413.
- [20] Canipari R. Oocyte: granulosa cell interactions [J]. *Hum Reprod Update*, 2000, 6(3): 279-289. Review.
- [21] Pangas SA, Jorgez CJ, Matzuk MM. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31): 32281-32286.
- [22] Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex [J]. *Hum Reprod Update*. 2007, 13(3): 289-312. Review.
- [23] McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(12): 2869-2874.
- [24] Assou S, Haouzi D, De VJ, et al. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(8): 531-538.
- [25] Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(10): 715-725.

(编辑 徐杰)