

· 临床研究 ·

# 卵泡液白血病抑制因子浓度对 IVF- ET 妊娠结局的影响

苗本郁, 方 丛, 周灿权, 庄广伦, 李俐琳

(中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】检测卵泡液内白血病抑制因子(LIF)浓度,探讨LIF和体外受精和胚胎移植(IVF-ET)妊娠结局的关系。【方法】接受IVF-ET治疗周期的患者在取卵时留取第1管清亮无血染卵泡液,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定卵泡液内LIF浓度。并对LIF和年龄、性激素、移植胚胎质量以及妊娠率等因素进行分析。【结果】共收集了164个IVF-ET周期(164个病人)的卵泡液。66例妊娠,妊娠率40.2%。卵泡液LIF浓度在妊娠组和未妊娠组间无显著性差别。但在找到卵子的卵泡液内LIF水平显著低于未找到卵子的卵泡液组( $P=0.034$ )。正常妊娠妇女的卵泡液内LIF水平显著高于异常妊娠(流产和宫外孕)妇女( $P=0.006$ )。年龄在妊娠组和未妊娠组间有显著性差异( $P=0.038$ )。【结论】卵泡液内LIF浓度并不影响IVF-ET妊娠结局。正常妊娠妇女卵泡液LIF浓度显著高于发生早期流产和宫外孕的妇女。年龄会显著影响IVF-ET妊娠率。

关键词:白血病抑制因子;卵泡液;IVF-ET;妊娠率

中图分类号:R715.2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)03-0326-04

## Influence of Level of Leukemia Inhibitory Factor in Follicular Fluid on IVF- ET Outcome

MIAO Ben-yu, FANG Cong, ZHOU Can-quan, ZHUANG Guang-lun, LI Li-lin

(Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To determine the levels of leukemia inhibitory factor (LIF) in follicular fluid and to assess the association of LIF with the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET).【Methods】Non-bloody follicular fluid were obtained during oocyte retrieval from patients undergoing IVF-ET therapy. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of LIF in follicular fluid. The other factors investigated were maternal age, hormone levels, the quality of embryo transferred and pregnancy rate per embryo transfer (ET).【Results】164 samples of follicular fluid were collected from 164 IVF-ET cycles (164 patients) from January 2004 to April 2005. The pregnancies were occurred in 66 cycles and the pregnancy rate per ET was 40.2%. LIF levels were similar in pregnancy group and non-pregnancy groups of patients. The LIF levels in follicular fluids obtained from follicles that could be found a oocyte in were significantly lower than those that did not ( $P=0.034$ ). The LIF levels that obtained from the women with normal pregnancy were significantly higher than those that with abnormal pregnancy such as miscarriage or ectopic pregnancy ( $P=0.006$ ). The mean age of the patients with pregnancy were statistically significant younger than that of the patients without pregnancy ( $P=0.038$ ).【Conclusion】Our study suggests that the level of LIF in follicular fluid was not associated with pregnancy rates of IVF-ET. We also find that LIF level were elevated in the patients with normal pregnancy than that those with first trimester miscarriage and ectopic pregnancy. Age of female partners can significantly affect the pregnancy rate of IVF-ET cycles

Key words: leukemia inhibitory factor; IVF-ET; pregnancy rate; age

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):326-329]

1987年 Gearing 等<sup>[1]</sup>研究发现了白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)。随后的研究

表明该因子为一种多功能细胞因子,它不仅能抑制白血病细胞的增殖,而且对多种细胞的增殖、分

收稿日期:2005-10-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200301)

作者简介:苗本郁(1973-),女,安徽蚌埠人,博士生,主治医师。E-mail: miaohk@hotmail.com

化、存活以及胚胎发育都具有重要的作用<sup>[2]</sup>。动物实验证实 LIF 在囊胚种植中起关键作用<sup>[3]</sup>, 因此它是早孕过程中重要的细胞因子。在人的研究中也发现不明原因不孕、反复体外受精和胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF- ET) 种植失败可能和 LIF 的表达改变有关<sup>[4,5]</sup>。因此, 本研究测定 IVF- ET 周期卵泡液内 LIF 浓度, 探讨 LIF 与 IVF- ET 妊娠结局的关系。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

2004 年 12 月 1 日到 2005 年 4 月 30 日, 在本中心接受 IVF- ET 的不孕症患者。IVF- ET 过程根据本中心常规进行, 其过程简述如下: 患者于黄体中期接受促性腺激素释放激素类似物(gonadotropin releasing hormone analogue, GnRHa) (Diphereline, Ipsen) 1.25 mg 肌肉注射。等待月经来潮后第 3~5 天开始予卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)(Gonal- F, Serono) 150 IU- 375 U/d 肌肉注射, 阴道 B 超监测卵泡发育。当至少有 1 个卵泡直径达到 18 mm 或 2 个卵泡直径达到 17 mm, 当晚予人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG) (Profasi, Serono) 10 000 U 肌肉注射, 36 h 后取卵。采用经阴道 B 超介导下穿刺取卵术。根据精液情况决定进行常规 IVF- ET 或者单精子显微注射。取卵后第 3 天移植胚胎。移植 14 d 后验尿 HCG, 尿 HCG 阳性且 B 超监测到妊娠囊为临床妊娠。常规记录患者接受 IVF- ET 治疗过程的各项指标, 包括年龄、获卵数、移植胚胎数和胚胎形态学分析, 并记录基础卵泡刺激素、雌二醇(estrodial,  $E_2$ )水平以及 HCG 注射日黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、 $E_2$ 、黄体酮(progesterone, P)水平。

### 1.2 卵泡液的收集和 LIF 的测定

首先穿刺径线 16 mm 的卵泡, 仅留取第 1 管清亮、不含血液的卵泡液, 在显微镜下检查有无卵子, 随即将液体以 2 000 r/min ( $r=15$  cm) 离心 5 min, 收集上清液, 放置-20 °C 冰箱内保存待测。用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)集中检测卵泡液 LIF 浓度。试剂盒为武汉博士德公司产品, 按产品说明操作。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件包进行统计学分析。统计学方法包括独立样本 t 检验、chi-square 检验、相关分析等。检验水准,  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 一般结果

共留取 164 份卵泡液, 分别来自 164 个接受 IVF- ET 治疗的妇女(164 个周期), 其中 66 个妇女获得妊娠, 妊娠率 40.2%。患者年龄 22~42 (31.2±4.4) 岁; 移植胚胎 1~3 (2.39±0.6)个/周期。卵泡液内 LIF 浓度为 10.4~2 065(662±458)pg/mL。将移植周期分为妊娠组和未妊娠组, 比较 LIF 浓度等多个因素在两组之间的差别(见表 1)。

### 2.2 LIF 对妊娠率的影响

在妊娠组和未妊娠组卵泡液中 LIF 浓度分别为(772±449)pg/mL 和(663±459)pg/mL, 没有统计学差异(见表 1)。对年龄和 LIF 浓度进行相关分析, 没有显著性相关( $r=0.085$ ,  $P=0.342$ )。66 例妊娠中, 59 例为正常妊娠, 7 例异常妊娠, 包括 5 例早期流产, 2 例宫外孕。在正常妊娠组卵泡液 LIF 浓度为(743±463)pg/mL, 异常妊娠组为(460±180)pg/mL。两组间有显著性差异( $t=-3.080$ ,  $P=0.006$ )。根据卵泡液中是否可以找到卵子分为 2 组, 找到卵子组, LIF 浓度为(600±408)pg/mL, 在找不到卵子组 LIF 浓度为(786±534)pg/mL, 两组间有显著性差异( $t=2.141$ ,  $P=0.034$ )。

### 2.3 其它影响妊娠率的因素

妊娠和未妊娠组间年龄有显著性差别(表 1)。在注射 HCG 日抽血检测 LH、 $E_2$ 、P 水平, 其中在妊娠组和未妊娠组  $E_2$  水平有显著性差异(表 1)。而 LH、P 水平在两组间没有显著性差别。164 个周期中, 除移植胚胎外仍有优质胚胎冷冻的周期有 98 个, 其中 48 周期获得新鲜胚胎妊娠, 而没有冷冻胚胎者为 66 周期, 其中 18 个妊娠。卡方检验比较有无冷冻胚胎组间的妊娠率, 发现有冷冻胚胎的患者妊娠率显著高于没有冷冻胚胎的患者( $\chi^2=7.727$ ,  $P=0.005$ )。妊娠组中, 卵裂球数目 6 的胚胎在移植胚胎中比例要显著高于未妊娠组, (89.4±30.0)% vs (69.7±41.6)%, 独立样本 t 检验,  $t=-3.364$ ,  $P=0.001$ 。

表 1 妊娠组和未妊娠组的临床资料

Table 1 Clinical results in the pregnancy group and the non-pregnancy group

	Pregnancy(n=66)	Non-pregnancy(n=98)	t	P <sup>1)</sup>
Age (yr)	31.4 ±4.2	32.8 ±4.3	2.093	0.038
LIF of follicular fluid (pg/mL)	772 ±449	663 ±459	-0.634	0.527
Basal level FSH (U/L)	7.0 ±2.7	6.4 ±2.1	-1.512	0.133
E <sub>2</sub> (pg/mL)	61 ±39	58 ±28	-0.501	0.617
Day of HCG E <sub>2</sub> (pg/mL)	2 256 ±1 318	2 712 ±1 432	2.059	0.041
P (ng/mL)	0.97 ±0.6	1.0 ±0.75	0.162	0.872
Endometrial thickness (mm)	11.6 ±2.4	11.4 ±2.4	-0.613	0.541
Oocytes retrieved per cycle (n)	12.4 ±5.5	11.7 ±5.7	-0.826	0.410
Blastomeres in transferred embryos (total n)	17.2 ±4.4	16.2 ±5.9	-1.301	0.195
Embryos transferred per cycle (n)	2.4 ±0.5	2.4 ±0.6	0.784	0.434

1) independent-samples t test

### 3 讨 论

#### 3.1 LIF 对 IVF-ET 周期结局的影响

接受 IVF-ET 治疗的妇女卵泡液里可以检测到 LIF 的存在<sup>[6,7]</sup>。有文献报道,含有成熟卵母细胞的卵泡液内 LIF 浓度也显著高于未成熟卵母细胞的卵泡液,提示 LIF 可能也参与了卵子的成熟,而且卵泡液 LIF 浓度显著高于血清里 LIF 浓度,但没有相关性,认为卵泡液内 LIF 来源于卵巢自身分泌<sup>[8]</sup>。和未成熟卵泡相比,HCG 注射后的排卵前卵泡的卵泡液中 LIF 水平显著升高。在卵巢基质细胞培养和颗粒黄体细胞培养中都有 LIF 的少量表达。在排卵时 LIF 浓度增加而且和胚胎发育正相关<sup>[9]</sup>。但本研究却发现,找到卵子的卵泡液内 LIF 浓度低于没有找到卵子的卵泡液。本中心进行取卵手术者及拾卵者均操作熟练。卵泡液内没有卵子,有可能是因为卵子未成熟,与卵泡壁结合较紧密,未被吸取。LIF 可能参加排卵和/或卵子的最后成熟,但仍需继续研究。本文结果亦显示妊娠组和非妊娠组间卵泡液内 LIF 浓度没有显著性差异。这也和其他研究结果一致<sup>[7]</sup>。ELISA 检测方法不同也可能导致不同研究中卵泡液中 LIF 浓度差别较大。人 LIF 是高糖基化的蛋白,糖分大概占了 50% 左右。因此一些肽的抗原决定簇可能被标记,而蛋白就不能被那些抗体所识别。ELISA 试剂盒效价差别很大,主要是由于它们检测 E.coli 来源的非糖基化的 LIF 蛋白的能力近似,但检测糖基化蛋白的能力有显著不同<sup>[9]</sup>。目前尚无明确的标准界定 ELISA 试剂盒测定糖基化蛋白的能力。研究发现,LIF 可

以促进人囊胚发育并调控滋养细胞的分化<sup>[10]</sup>。习惯性流产患者,其子宫蜕膜和胚胎绒毛组织上 LIF 基因的表达显著低于正常妇女,提示 LIF 基因表达缺陷可能导致胚胎流产<sup>[11,12]</sup>。本研究也发现,异常妊娠组患者卵泡液内 LIF 水平显著低于正常组。因此卵泡液内 LIF 对胚胎发育的影响仍然有待继续研究。

#### 3.2 其他影响 IVF-ET 周期结局的因素

大量研究显示新鲜胚胎移植周期中随着患者年龄的增长,妊娠率逐渐下降。本文结果也提示如此。关于注射日 E<sub>2</sub> 水平对妊娠率的影响,文献报道并不一致。有研究认为,当日 E<sub>2</sub> 水平过高(>20 000 pmol/L)则会显著降低妊娠率和种植率<sup>[13]</sup>,主要认为高 E<sub>2</sub> 水平影响了子宫内膜接受性从而降低妊娠率。文献亦报道,在高 E<sub>2</sub> 水平组,其子宫内膜螺旋动脉的血流信号检出率也显著低于中等 E<sub>2</sub> 水平组<sup>[14]</sup>。本文结果也提示注射 HCG 日 E<sub>2</sub> 水平妊娠组要显著低于未妊娠组。因此在 IVF-ET 周期中调控卵巢反应,避免过多卵泡发育,有利于提高妊娠率。

大多数学者认为移植胚胎的数目越多,妊娠率越高,但多胎妊娠率也显著升高。因此,提高胚胎质量,限制移植胚胎个数已成为共识。根据我国卫生部条例规定,最多可移植 3 个胚胎。本研究发现,妊娠组和未妊娠组间移植胚胎的数目并没有显著性差异,但妊娠组移植胚胎中有较多卵裂球的胚胎比例显著高于未妊娠组。这也说明,移植的胚胎质量越好,获得妊娠的机会越大。有冷冻胚胎者其妊娠率显著高于没有冷冻胚胎者,也提示,若患者至少有 3 个以上优质胚胎可供挑选进行新鲜

胚胎移植,其妊娠机会亦较高。

参考文献:

- [1] GEARING D P, GOUGH N M, KING J A, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)[J]. EMBO J, 1987, 6(13) 3995- 4002.
- [2] MAKINO H, HASUDA H, ITO Y. Immobilization of leukemia inhibitory factor (LIF) to culture murine embryonic stem cells[J]. J Biosci Bioeng, 2004, 98(5): 374- 379.
- [3] STEWART C L, KASPAR P, BRUNET L J, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor [J]. Nature, 1992, 359(6390):76- 79.
- [4] STECK T, GIESS R, SUETTERLIN M W, et al. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004, 112(1):69- 73.
- [5] CHEN H F, CHAO K H, SHEW J Y, et al. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor is not altered in the decidua and chorionic villi of human anembryonic pregnancy[J]. Hum Reprod, 2004, 19(7):1647- 1654.
- [6] ARICI A, ORAL E, BAHTIYAR O, et al. Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells[J]. Hum Reprod, 1997, 12(6):1233- 1239.
- [7] OZOMEK M H, BIELFELD P, KRUSSEL J S, et al. Epidermal growth factor and leukemia inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with in vitro fertilization outcome[J]. J Reprod Med, 1999, 44(4): 367- 369.
- [8] 赵海波,何亚绒,李爱莉,等. 人卵泡液中白血病抑制因子浓度及其对卵母细胞发育的影响[J].第四军医大学学报, 2004,25(6): 554- 556.
- [9] TAUPIN J L, GUALDE N, MOREAU J F. A monoclonal antibody based ELISA for quantitation of human leukaemia inhibitory factor[J]. Cytokine,1997,9(2):112- 118.
- [10] WARE C B, KARIAGINA A, ZONIS S, et al. Leukemia inhibitory factor signaling is implicated in embrionic development of the HPA axis[J]. FEBS Lett, 2005, 579(20):4465- 4469.
- [11] 黎刚,王应雄,刘学庆,等. 原因不明性习惯性流产患者子宫蜕膜白血病抑制因子基因表达研究[J].遗传, 2002, 24(3):251- 253.
- [12] 王应雄,何俊琳,翁亚光,等. 习惯性流产胚胎绒毛细胞 LIF 基因的表达[J].遗传,2001, 23(2): 111- 113.
- [13] YU-NG E H, YEUNG W S, YEE LAN LAU E, et al. High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen- thawed embryo transfer cycles [J]. Hum Reprod,2000,15(2): 250- 255.
- [14] BASIR G S, LAM T P, CHAU M T, et al. Colour Doppler analysis of peri -implantation utero - ovarian haemodynamics in women with excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation [J]. Hum Reprod, 2001,16 (10): 2114- 2117.

(编辑 张恩健)