

血清 25-OH-VD、Hcy 和免疫细胞水平与卵巢反应性的研究

郭楠 吴莉

摘要 目的 探讨卵巢反应性与 25-羟基维生素 D(25-OH-VD)、同型半胱氨酸(Hcy)及免疫细胞亚群(T细胞、B细胞、NK细胞)之间的关系。方法 选取接受体外受精/卵泡浆内单精子注射-胚胎移植(IVF/ICSI-ET)治疗的 179 例患者作为观察对象,根据获卵数目分为卵巢低反应组和正常反应组,比较两组的 25-OH-VD、Hcy、T细胞、B细胞、NK细胞表达情况。结果 两组患者降调后的促卵泡生长激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)、子宫内膜厚度、窦卵泡直径比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);卵巢低反应组中 Hcy 水平高于正常反应组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组的促排天数、促排用量、25-OH-VD 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);卵巢低反应组中 T 细胞、Th 细胞水平均稍高于正常反应组,差异无统计学意义($P > 0.05$),但 NK 细胞比例显著高于正常反应组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Hcy 与 NK 细胞比例升高可能与卵巢低反应存在密切的相关性,可能会危害女性的生殖健康,应引起临床重视。

关键词 卵巢低反应; 25-羟基维生素 D; 同型半胱氨酸; 免疫细胞; 体外受精-胚胎移植

中图分类号 R 711.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0793-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.028

卵巢低反应是指在控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)过程中卵巢对促性腺激素(gonadotropins, Gn)反应过低甚至无反应,导致获卵数少、周期取消率高以及临床妊娠率降低。卵巢低反应会在一定程度上危害患者的生殖健康,已经成为辅助生殖技术领域中最具挑战性的难题之一。卵巢低反应受多种因素影响,除了年龄以外,通常认为卵巢反应性的好坏主要取决于卵巢储备情况^[1]。而越来越多的临床研究发现,相当一部分年

轻、卵巢储备功能良好的妇女也会发生低反应。近年来,部分研究认为卵巢反应与体内的免疫微态有关,而 25-羟基维生素 D(25-OH-VD)、同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)、免疫细胞亚群(T细胞、B细胞、NK细胞)均是参与机体免疫的重要指标。该研究旨在探讨卵巢反应性与 25-OH-VD、Hcy 及 T 细胞、B 细胞、NK 细胞的关系,为临床上对于卵巢低反应的诊断和治疗提供可靠的参考依据。

1 材料与方法

1.1 基础资料 选取 2017 年 9 月~2018 年 2 月在安徽省立医院生殖医学中心体外受精/卵泡浆内单精子注射-胚胎移植(*in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer, IVF/ICSI-ET)治疗的 179 例患者作为观察对象,根据获卵数目分为 2 组,其中将获卵数 ≤ 3 个的 61 例患者作为卵巢低反应组,将获卵数在 4~18 个的 118 例患者作为正常反应组^[2]。两组患者的年龄、不孕年限、体质量指数(body mass index, BMI)、窦卵泡数(antral follicle count, AFC)、基础促卵泡生长激素(basic follicle-stimulating hormone, bFSH)、基础黄体生成素(basic luteinizing hormone, bLH)、基础雌二醇(basic estradiol, bE2)等指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组患者的临床基础资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	低反应组 (n=61)	正常反应组 (n=118)	t 值	P 值
年龄(岁)	29.44 ± 3.57	28.78 ± 3.19	1.259	0.207
不孕年限(年)	3.57 ± 2.56	3.40 ± 2.40	0.439	0.661
BMI(kg/m ²)	22.39 ± 3.08	21.70 ± 2.42	1.644	0.102
AFC(个)	11.46 ± 5.09	12.37 ± 5.16	1.123	0.263
bFSH(U/L)	8.10 ± 2.62	7.90 ± 3.57	0.387	0.699
bLH(U/L)	4.34 ± 2.25	4.97 ± 2.60	1.606	0.110
bE2(pg/ml)	43.06 ± 26.71	49.04 ± 37.11	1.117	0.265

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 年龄 ≤ 35 岁;卵巢储备功能正常;单纯因输卵管因素或男方因素行 IVF-ET/ICSI-ET 者;本人或家属知情并签署同意书。

2019-01-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81601353);安徽省自然科学基金(编号:1608085MH202)

作者单位:安徽省立医院生殖医学中心,合肥 230001

作者简介:郭楠,女,主治医师,硕士;

吴莉,女,博士,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wuli.0722@163.com

1.2.2 排除标准 既往多囊卵巢综合征; 存在卵巢反应不良高危因素者; 合并子宫内膜异位症或其他内分泌疾病; 既往不良妊娠史; 中途退出研究者。

1.3 方法

1.3.1 控制性超促排卵 全部入组研究对象均采用经典黄体期降调节长方案, 方法如下: 月经周期第2~4天开始口服避孕药(炔雌醇环丙孕酮片, 商品名达英-35, 拜耳医药保健有限公司广州分公司) 1片/次, 每天1次, 口服用药21d, 在服用第14~17天时采用超声检查有无大卵泡, 如无大卵泡, 即日开始皮下注射促性腺激素释放激素激动剂醋酸亮丙瑞林微球(批准文号: 国药准字 H20093852; 生产单位: 上海丽珠制药有限公司; 药品规格: 3.75 mg), 根据患者 BMI 值, 调整降调节药物剂量 1.250~1.875 mg, 待14d后抽血检测促卵泡生长激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E2) 同时阴道超声检查卵泡情况, 适时加用促性腺激素(批准文号: 国药准字 H20052130; 生产单位: 丽珠集团丽珠制药厂; 药品规格: 以尿促卵泡素效价计 75 IU) 150~300 IU, 当至少有一个卵泡直径达18mm以上或至少有两个卵泡直径达17mm时, 注射重组人绒毛膜促性腺素(注册证号: S20110045; 生产单位: Merck Serono Europe Limited; 药品规格: 250 μg) 250 μg。36h后在超声引导下经阴道穿刺取卵。

1.3.2 标本收集 ① 在 IVF 治疗前一个月经周期第2~5天清晨留取患者空腹静脉血5ml, 用来检测 FSH、LH、E2、25-OH-VD、Hcy 等指标; ② 在 GnRHa 降调节后14d, 再次空腹来院留取静脉血3ml, 检测 FSH、LH、E2 等指标; ③ 注射重组人绒毛膜促性腺素日抽取空腹静脉血3ml, 检测免疫细胞亚群。

1.3.3 标本检测 ① 采用免疫化学发光法检测 FSH、LH、E2 水平, ACCESS 全自动微粒子化学发光免疫分析系统购自美国 Beckman 公司; ② 采用 ELISA 法检测 Hcy 水平, 试剂盒及相关配套检测试剂均购自北京百奥莱博科技有限公司; ③ 采用 ELISA 法检测 25-OH-VD 水平, 试剂盒及相关配套检测试剂均购自美国 R&D 公司; ④ 采用 FACSCalibur 流式细胞仪检测 T、B、NK 细胞亚群, 流式细胞仪及相关的配套检测设备均购自美国 BD 公司。全部数据均取平均值, 剔除异常数据。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料数据呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的降调结果比较 两组患者降调后的 FSH、LH、E2、子宫内膜厚度、窦卵泡直径比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表2。

2.2 两组的促排天数、促排用量、Hcy、25-OH-VD 表达水平比较 卵巢低反应组中 Hcy 水平均高于正常反应组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两组的促排天数、促排用量、25-OH-VD 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表3。

表2 两组患者的降调结果比较($\bar{x} \pm s$)

指标	低反应组 (n=61)	正常反应组 (n=118)	t 值	P 值
FSH(U/L)	4.03 ± 1.06	4.07 ± 1.03	0.244	0.808
LH(U/L)	1.45 ± 0.78	1.39 ± 0.73	0.509	0.611
E2(pg/ml)	40.61 ± 7.37	41.60 ± 7.96	0.808	0.420
子宫内膜厚度(mm)	3.77 ± 0.81	3.87 ± 0.72	0.844	0.400
窦卵泡直径(mm)	4.70 ± 0.67	4.83 ± 0.78	1.107	0.270

表3 两组患者的 Hcy、25-OH-VD 水平、促排天数比较($\bar{x} \pm s$)

项目	低反应组 (n=61)	正常反应组 (n=118)	t 值	P 值
促排天数(d)	12.26 ± 5.91	10.98 ± 3.12	1.899	0.059
促排用量(IU)	2301 ± 1081	2264 ± 1002	0.228	0.820
Hcy(μmol/L)	7.95 ± 3.06	6.96 ± 2.31	2.425	0.016
25-OH-VD(ng/ml)	17.19 ± 5.49	17.38 ± 5.42	0.221	0.825

2.3 两组患者免疫细胞亚群表达情况比较 卵巢低反应组中 T 细胞、Th 细胞水平均稍高于正常反应组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), NK 细胞比例显著高于正常反应组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表4。

表4 两组患者的免疫细胞亚群表达情况比较(% $\bar{x} \pm s$)

项目	低反应组 (n=61)	正常反应组 (n=118)	t 值	P 值
CD3+(%)	71.63 ± 7.02	70.26 ± 6.83	1.260	0.209
CD3+CD4+(%)	38.58 ± 7.19	36.57 ± 6.49	1.892	0.060
CD3+CD8+(%)	28.33 ± 6.33	28.63 ± 6.83	0.285	0.776
CD16+CD56+(%)	16.95 ± 5.74	13.32 ± 5.63	4.062	0.000
CD19+(%)	11.23 ± 3.82	11.28 ± 3.73	0.084	0.933

3 讨论

3.1 卵巢激素、子宫内膜厚度、窦卵泡直径的检测意义 COH 是体外受精胚胎移植技术的重要组成部分, 该疗法可增加在同一周期的卵泡募集, 避免机体内在的选择单个卵泡的机制以及主导卵泡对其他

卵泡生长发育的抑制作用,从而使多个卵泡同步生长发育并达到成熟,提高同一周期的获卵数,进而提高妊娠率。由于不同患者的卵巢对 Gn 的敏感度不同,因此药物的疗效存在一定的差异性。临床上准确预测卵巢反应性,有助于降低周期取消率及减少相关医源性并发症,但卵巢高反应的高低目前尚无统一标准,其中 FSH、LH、E₂、子宫内膜厚度、窦卵泡直径等指标均是预测卵巢反应性的重要指标,而本研究中两组患者降调后的 FSH、LH、E₂、子宫内膜厚度、窦卵泡直径比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),导致上述结果可能与患者的年龄有关,国内学者李丽娟等^[3]的临床研究中证实,年龄超过 35 岁患者中血 FSH、LH 等指标对卵巢低反应有较好预测价值,而在年龄低于 35 岁患者中则无预测价值。

3.2 25-OH-VD、Hcy 与卵巢反应性

3.2.1 25-OH-VD 与卵巢反应性 近年来,随着生殖领域研究的不断深入,维生素 D 在生殖领域中引起了越来越广泛的关注。国外的一项研究指出维生素 D 可参与钙磷代谢、机体免疫及生殖等生理过程,是生殖过程中的一个关键因素^[4]。25-OH-VD 是维生素 D 在机体内主要循环形态,主要是由维生素 D 在肝脏中通过羟基化作用转化而来,是目前公认的能够客观评价维生素 D 营养状况的最佳指标。维生素 D 参与生殖过程可能与以下几方面因素有关:25-OH-VD 可在肾脏中转化为具有活性的 1,25(OH)₂D₃,卵巢是 1,25(OH)₂D₃ 的靶器官,因此维生素 D₃ 活性代谢产物可能在调节卵巢活动中发挥重要作用;另有文献^[5]报道,人抗穆勒管激素 (AMH) 基因启动子区存在一种功能性的维生素 D 反应素,直接影响 AMH 的表达,而 1,25(OH)₂D₃ 可改变颗粒细胞对 AMH 的敏感性,促进颗粒细胞的分化与发育。这一理论与 Irani et al^[6]提出的维生素 D 可以下调 AMH 基因的表达,上调促卵泡激素受体基因的表达相符。结果提示维生素 D 水平可能影响着卵泡发育和卵巢的反应性。同时有研究^[7]结果表明,白种人维生素 D 水平和 IVF 结局呈正相关,然而在亚洲人群中并未观察到这种现象。本结果也显示 25-OH-VD 水平在卵巢低反应组与正常反应组无显著差异。

3.2.2 Hcy 与卵巢反应性 Hcy 是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的重要中间产物,近些年国内外一些研究^[8]表明,体内 Hcy 水平升高会对男性和女性的生育力产生一定的影响。本研究结果显示,卵巢低反应组中 Hcy 水平均高于正常反应组,差异有统

计学意义($P < 0.05$),提示 Hcy 可能与卵巢低反应有关。Hcy 对卵巢低反应的影响机制目前尚不十分明确,但大量的研究^[9-10]显示基因的多态性可能会影响 Hcy 的表达,而 Hcy 的高表达可能通过减少细胞分裂、产生相关的炎性细胞因子而导致卵泡发育、胚胎发育、激素分泌等生殖功能受损。

3.3 T 细胞、B 细胞、NK 细胞与卵巢反应性 在 IVF 周期中,为了募集到更多的卵泡而使用大量的外源性 Gn,会引起雌二醇及其他激素处于高生理水平状态,免疫微环境也随之改变。一般认为 Gn 刺激可改变卵泡液中免疫细胞形态及卵泡液和外周血中免疫细胞比例,改变患者机体内的免疫状态。研究^[11-12]显示 μ NK 细胞可分泌血管内皮生长因子、趋化因子-10、白细胞介素-8、基质细胞衍生因子-1 等多种促血管生成因子,调节血管发生。血管发生的调节在女性生殖生理中扮演着重要的角色,可影响卵泡的生长、优势卵泡及黄体的形成、子宫内膜的分化及胚胎的植入等重要的生理过程,是诱发卵巢低反应的高危因素。Jimmy et al^[13]的相关临床研究中显示,在卵巢血流显示欠佳的患者中,至少 36% 的患者表现出了卵巢低反应,仅有 16% 的患者表现为正常的卵巢反应。另有研究^[14]证实,在反复种植失败的患者中外周血 pNK 细胞比例增加,pNK 呈活化状态,细胞毒性增强。本研究中,两组 T 细胞与 B 细胞比例间存在差异但无统计学意义,而 NK 细胞比例的差异,具有统计学意义($P < 0.05$),推测 NK 细胞或许可通过调控卵巢周围血管的生成及改变卵巢周围的免疫微环境,通过产生细胞毒性来影响卵巢反应,造成卵巢反应不良。

综上所述,Hcy、NK 细胞与卵巢反应性存在密切的相关性,二者的高表达或可引起卵巢低反应,进而影响生殖健康。当然本研究也存在一定的局限性,由于研究时间有限,加上卵巢低反应组内患者的病例数较少,因此试验结果可能存在一定偏差,今后逐步完善试验方案,扩大试验规模,进一步探讨血清 25-OH-VD、Hcy 和免疫细胞水平与卵巢反应性的相关性,为临床治疗提供参考依据。

参考文献

- [1] Broekmans F J, Kwee J, Hendriks D J, et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome[J]. Hum Reprod, 2006, 12(6): 685-718.
- [2] Ferraretti A P, La Marca A, Fauser B C, 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): 1616–24.
- [3] 李丽娟 孟昱时 范文等. 尿卵泡刺激素、黄体生成素全定量测定在促性腺激素释放激素激动剂降调节后的应用价值[J]. 生殖医学杂志 2014 23(1): 33–6.
- [4] Blomberg J M. Vitamin D and male reproduction [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(3): 175–86.
- [5] Merhi Z, Doswel A D, Krebs K, et al. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 99(6): E1137–45.
- [6] Irani M, Merhi Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(2): 460–8.
- [7] Rudick B, Ingles S, Chung K, et al. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(11): 3321–7.
- [8] Boxmeer J C, Smit M, Utomo E, et al. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage [J]. *Fertil Steril*, 2009 92(2): 548–56.
- [9] Market Velker B A, Denomme M M, Mann M R. Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(5): 1–16.
- [10] Saffarian L, Najmi Z, Aleyasin A, et al. Recurrent IVF failure and hereditary thrombophilia [J]. *Iran J Reprod Med*, 2014, 12(7): 467–70.
- [11] Almasry S M, Elmansy R A, Elfayomy A K, et al. Ultrastructure alteration of decidual natural killer cells in women with unexplained recurrent miscarriage: a possible association with impaired decidual vascular remodelling [J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(1): 67–78.
- [12] Ratsep M T, Felker A M, Kay V R, et al. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis [J]. *Reproduction* 2015, 149(2): R91–102.
- [13] Jimmy E J, Moshe B, Sami H, et al. Prospective evaluation of early follicular ovarian stromal blood flow in infertile women undergoing IVF-ET treatment [J]. *Informa*, 2012, 28(5): 356–9.
- [14] Karami N, Boroujerdnia M G, Nikbakht R, et al. Enhancement of peripheral blood CD56(dim) cell and NK cell cytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortion or *in vitro* fertilization failure [J]. *J Reprod Immunol* 2012 95(1/2): 87–92.

Study on serum 25-OH-VD , Hcy and immune cell level and ovarian responsiveness

Guo Nan , Wu Li

(Center for Reproductive Medicine Anhui Provincial Hospital Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the relationship between ovarian responsiveness and 25-OH-VD , homocysteine(Hcy) and immune cell subsets(T cells , B cells , NK cells) . **Methods** 179 patients who received *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer (IVF/ICSI-ET) treatment were divided into ovarian hyporesponsiveness group and normal responsiveness group according to the number of eggs. The expression of 25-OH-VD , Hcy , T cells , B cells and NK cells in the two groups were compared. **Results** There was no significant difference in follicle-stimulating hormone (FSH) , luteinizing hormone (LH) , estradiol (E2) , endometrial thickness and sinus follicle diameter between the two groups($P > 0.05$) . The level of Hcy in the ovarian hyporesponsiveness group was higher than that in the normal responsiveness group($P < 0.05$) , but there was no significant difference in the days and the dose of ovarian hyperstimulation , the level of 25-OH-VD between the two groups. The levels of T cells and Th cells in ovarian hyporesponsiveness group were slightly higher than those in normal responsiveness group($P > 0.05$) , but the proportion of NK cells in ovarian hyporesponsiveness group was significantly higher than that in normal responsiveness group($P < 0.05$) . **Conclusion** The increase of the ratio of Hcy and NK cells may be closely related to ovarian hyporesponsiveness , which may endanger the reproductive health of women and should be paid more attention in clinic.

Key words poor ovarian response; 25-OH-VD; Hcy; immune cells; *in vitro* fertilization embryo transfer