

IVF 周期中高雌、孕激素水平对着床期子宫整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达及子宫内膜容受性的影响

林娜, 马艳萍, 武泽, 邓波, 李蕾, 董云华, 马蕊, 白云
(云南省第一人民医院生殖一科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨 IVF 超促排卵过程中, 超生理剂量的雌、孕激素对着床期整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达的影响, 从而推测 IVF 超促排卵所致的高雌、孕激素对子宫内膜容受性的影响. **方法** 2012 年 5 月至 2013 年 10 月于云南省第一人民医院生殖一科行 IVF 的 33 例因卵巢过度刺激综合征或过高孕酮水平取消新鲜周期胚胎移植的不孕症妇女为研究组, 根据 HCG 日雌孕激素水平将研究对象分为 3 组: 高 E_2 组 ($E_2 \geq 5210$ pg/mL、 $P < 1.05$ ng/mL); 高 P 组 ($P \geq 1.05$ ng/mL、 $E_2 < 5210$ pg/mL); 高 E_2 并高 P 组 ($P \geq 1.05$ ng/mL、 $E_2 \geq 5210$ pg/mL), 于取卵后 7~8 d 用宫腔负压吸管 (Pipelle 管) 取内膜组织. 对照组为 11 例正常妇女, 于超声监测排卵后 7~8 d 同法取内膜, 采用免疫组化 SP 法和组织学积分 H-score 法对整合素 $\alpha v \beta 3$ 在种植窗期子宫内膜中的表达进行定位和半定量分析, 比较不同雌孕激素水平在着床期对整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达的影响, 从而推测 IVF 超促排卵中高雌、孕激素对子宫内膜容受性的影响. **结果** 种植窗期高 E_2 组、高 P 组、高 E_2 并高 P 组患者与对照组比较整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** 仅仅依靠整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达来推测子宫内膜的容受性是不可靠的.

[关键词] 超促排卵; 整合素 $\alpha v \beta 3$ 雌激素; 孕激素

[中图分类号] R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0048-04

Effect of High Estradiol and Progesterone Levels on the Expression of Integrin $\alpha v \beta 3$ and Endometrial Receptivity in IVF Cycles

LIN Na, MA Yan-ping, WU Ze, DENG Bo, LI Lei, DONG Yun-hua, MA Rui, BAI Yun
(Reproductive Medicine Center, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of high estradiol (E_2) and progesterone (P) levels on the expression of integrin $\alpha v \beta 3$, and analyze the relationship between serum estradiol/progesterone concentrations and endometrial receptivity within the implantation window in the controlled ovarian hyperstimulation cycles. **Methods** 33 infertile women cancelled embryo transfer due to OHSS or much high P level were assigned to three groups according to the concentrations of serum E_2 and P on the day of human chorionic gonadotrophin (HCG) administration: group 1 with high E_2 ($E_2 \geq 5210$ pg/mL, $P < 1.05$ ng/mL), group 2 with high P ($P \geq 1.05$ ng/mL, $E_2 < 5210$ pg/mL), group 3 with high P accompanied with high E_2 ($P \geq 1.05$ ng/mL, $E_2 \geq 5210$ pg/mL). Endometrial biopsies were performed at 7~8 days after oocytes retrieval using Pipelle. 11 healthy fertile women served as control, and their endometrial biopsies were performed at 7~8 days after ovulation by daily transvaginal ultrasonographic evaluation. Endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ was detected by immunohistochemistry and semi-quantitatively analyzed by H-score. The relationship between serum P/ E_2 concentrations and the expression of

[基金项目] 云南省卫生科技项目计划基金资助项目 (2011WS0010)

[作者简介] 林娜 (1978~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事不孕不育生殖内分泌疾病诊治临床工作.

[通讯作者] 武泽. E-mail:wuzes2010@163.com

integrin $\alpha v \beta 3$ within the implantation window was analyzed. **Results** No statistically difference in the expression of integrin $\alpha v \beta 3$ was found between studied groups and control group. **Conclusion** Using integrin $\alpha v \beta 3$ as the target is not a reliable way to evaluate the endometrial receptivity within the implantation window in the controlled ovarian hyperstimulation cycles.

[**Key words**] Controlled ovarian hyperstimulation; Estradiol; Progesterone; Integrin $\alpha v \beta 3$

控制性超排卵,通过募集较多的发育卵泡来提高体外受精-胚胎移植(IVF-ET)助孕效率,同时也使胚胎和内膜暴露于超生理剂量的雌、孕激素水平下。而内膜的容受性是目前制约IVF成功率的关键因素。大量研究^[1]证实整合素 $\alpha v \beta 3$ 在子宫内膜表面呈周期性高表达,与子宫内膜“着床窗”期同步,是公认的子宫内膜容受性标志物。笔者通过研究HCG日不同雌、孕激素对种植窗期子宫内膜上皮细胞中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达影响,进一步明确整合素 $\alpha v \beta 3$ 作为子宫内膜容受性标记物的价值,并探讨高雌孕激素环境影响子宫内膜容受性的分子机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2012年5月至2013年10月在云南省第一人民医院生殖一科仅因输卵管因素(无输卵管积水),或因男方因素接受IVF-ET/ICSI的不孕症患者33例为研究组(均采用长方案促排卵),其中原发不孕9例,继发不孕24例,年龄23~37岁。纳入标准如下:(1)年龄<38岁;(2)既往没有附件包块的诊断;(3)基础内分泌正常,月经第2天血清FSH<10IU/L;(4)具有正常的月经周期,周期在25~35d;(5)3个月内无激素使用史及宫腔操作史,无宫内节育器;(6)研究组IVF-ET周期中至少有2个I级或II级胚胎可移植。排外标准如下:子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征、输卵管积水、不明原因不孕。11例要求行输卵管结扎,有正常的孕产史,无流产史的正常女性为对照组,年龄22~36岁。分组标准依据Ze Wu等的研究^[2]:高 E_2 组($E_2 \geq 5\ 210\ \text{pg/mL}$ 、 $P < 1.05\ \text{ng/mL}$);高P组($P \geq 1.05\ \text{ng/mL}$ 、 $E_2 < 5\ 210\ \text{pg/mL}$);高 E_2 并高P组($P \geq 1.05\ \text{ng/mL}$ 、 $E_2 \geq 5\ 210\ \text{pg/mL}$)。该研究是多中心、大样本回顾性分析,对2 921例IVF/ICSI患者,应用ROC曲线分析HCG日血清 E_2 和P水平对IVF结局的影响,确定高P的切点为3.34 nmol/L (1.05 ng/mL),云南省第一人民医院生殖一科单纯高P患者临床以2倍即2.10 ng/mL作为极值,并取消新鲜周期移植。因此,高P组患者,

P值均大于等于2.10 ng/mL。所有患者均签署知情同意书,并经医院伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 外周血的获取 (1)于获取内膜当天抽取空腹静脉血3 mL备查 E_2 、P;(2)内膜的获取:对照组患者,于月经周期的d10开始监测卵泡,于排卵后7~8 d,获取种植窗期子宫内膜。研究组患者于排卵后7~8 d获取种植窗期子宫内膜。研究组患者均因OHSS或过高的雌孕激素而取消新鲜周期胚胎移植。取子宫内膜前用生理盐水冲洗阴道,不扩张宫颈,用子宫内膜取样器Pipelle管吸取子宫内膜组织,内膜如有血,在生理盐水中轻轻漂洗,然后立即放入液氮中保存。标本获取均征得患者的知情同意。

1.2.2 实验方法 (1)病理检查:由有经验的病理医师读片,按Noyes标准^[3]区分子宫内膜周期;(2)采用免疫组化链霉菌抗牛物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)法(试剂盒购自DAKO公司)对子宫内膜中整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达进行定位和半定量检测。整合素 $\alpha v \beta 3$ 二抗试剂盒:EnVision™ FLEX+检测试剂盒(增强型),购自DAKO公司,稀释度1:40,按试剂盒说明书操作。

1.3 结果判断标准

CHK型Olympus显微镜(200×)下观察SP染色切片,每例观察5张切片,每张切片观察5个视野,整合素 $\alpha v \beta 3$ 以细胞膜或胞质染呈黄色或棕色且其染色强度高于背景非特异染色者为阳性细胞。表达程度按Budwit阴性对照片无特异性着色,阳性细胞必须符合下列要求:(1)镜下组织细胞结构清楚;(2)棕色的阳性颗粒定位好;(3)染色明显高于背景。按细胞浆内棕色颗粒染色强度分为4个等级^[4]:阴性(-):无棕色颗粒;弱阳性(+):有较浅的棕色颗粒;阳性(++):棕色颗粒清晰;强阳性(+++):有明显深棕颗粒。同时分别统计阴性、弱阳性、阳性和强阳性的细胞数及待测细胞总数。

用组织学积分H-score法进行半定量分析^[4],计算公式: $H\text{-score} = \sum P_i (i+1)$ 。其中 P_i 代表每一免疫组化染色范围内同一染色强度的阳性细胞数占待测细胞总数的百分比,即 $P_i =$

$\frac{\text{阳性细胞数}}{\text{待测细胞总数}}$ · i 为染色强度, 用 1, 2, 3 分别代表 +, ++, +++ ($i=0$ 时, 染色阴性, 组织学积分为 0, 不计), H-score 最大值为 4, 式中 1 为纠正系数. 免疫组化结果由 2 人采用盲法判断, 其中 1 名为具有丰富经验的病理医师.

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 进行统计处理, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 连续变量的比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, $\alpha v \beta 3$ 相关性检验采用 Spearman 秩和相关检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 种植窗期子宫内膜发育同步性比较

实验组与对照组比较子宫内膜取材时间差异无统计学意义. 内膜发育同步性的比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1.

2.2 HCG 日及子宫内膜取材日 (种植窗期)

高雌组、高孕组和高雌高孕组两两比较, HCG 日雌、孕激素水平均有显著性差异 ($P < 0.05$). 种植窗期雌激素水平高雌组、高孕组、高雌高孕组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 孕激素水平, 3 个实验组高于对照组, 但差异无统

计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2.

2.3 种植窗期整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达比较

整合素 $\alpha v \beta 3$ 主要表达于内膜腺体, 呈散在弱阳性, 定位于细胞膜, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达总体阳性率为 34%. 高雌组、高孕组和高雌高孕组患者与对照组比较整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达水平, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3、图 1~5.

3 讨论

3.1 整合素 $\alpha v \beta 3$ 在种植窗期子宫内膜上的表达

整合素 $\alpha v \beta 3$ 在“着床窗”期表达于子宫内膜表面, 呈现显著的时空表达特异性, 与子宫内膜容受性形成密切联系, 是被研究得最广泛的一类黏附分子, 是“种植窗”开放的标志物. 杨海燕等^[9]研究发现整合素 $\alpha v \beta 3$ 在子宫内膜分泌中、晚期表达明显增加, 进一步肯定了其在评价“种植窗”期子宫内膜容受性方面的特异性. 整合素 $\alpha v \beta 3$ 还同时表达于滋养细胞, 促进细胞间黏附, 诱导细胞趋化使滋养层迁徙, 从而调节胚胎的定位、黏附和植入.

Germma Casals 等研究^[6]于排卵后 7~8 d 及随后 4 d 取子宫内膜测定整合素 $\alpha v \beta 3$ 和其配体骨桥蛋白 OPN 的表达, 排卵后 7~8 d OPN (+)

表 1 4 组患者子宫内膜取材时间及发育同步性比较 [n (%)]

指 标	对照组 ($n = 11$)	高雌组 ($n = 11$)	高孕组 ($n = 11$)	高雌高孕组 ($n = 11$)
子宫内膜取材时间 (d)	7.09 ± 0.09	7.27 ± 0.14	7.18 ± 0.12	7.27 ± 0.14
内膜同步的例数	10(90.9)	8(72.7)	10(90.9)	9(81.8)

表 2 4 组患者 HCG 日及子宫内膜取材日血清雌、孕激素水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组 ($n = 11$)	高雌组 ($n = 11$)	高孕组 ($n = 11$)	高雌高孕组 ($n = 11$)
HCG 日雌激素水平		6210.81 ± 383.24 ^{△△}	3972.19 ± 313.36 ^{*△}	7432.27 ± 252.07 ^{*△}
HCG 日孕激素水平		0.87 ± 0.07 ^{△△}	2.8 ± 0.37 ^{*△}	1.63 ± 0.12 ^{*△}
取内膜日雌激素水平 (pg/mL)	190.28 ± 18.11 ^{*△△}	1563.55 ± 334.57 [#]	1569.45 ± 385.65 [#]	1830.27 ± 489.45 [#]
取内膜日孕激素水平 (pg/mL)	18.13 ± 1.51	32.69 ± 8.46	31.34 ± 6.14	30.41 ± 4.62

与高雌组比较, * $P < 0.05$; 与高孕组比较, [△] $P < 0.05$; 与高雌高孕组比, [△] $P < 0.05$; 与对照组比较, [#] $P < 0.05$.

表 3 4 组患者种植窗期子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达比较 [n (%)]

Tab. 3 Comparison of the expression of integrin $\alpha v \beta 3$ within the implantation window among four groups [n (%)]

项 目	对照组 ($n = 11$)	高雌组 ($n = 11$)	高孕组 ($n = 11$)	高雌高孕组 ($n = 11$)	P
阳性例数	4(36.36)	3(27.27)	6(54.54)	2(18.18)	
H-SCORE	0.54 ± 0.23	0.27 ± 0.18	0.45 ± 0.18	0.29 ± 0.19	> 0.05

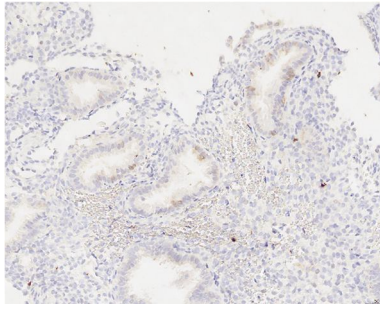


图1 $\alpha v \beta 3$ 在高雌激素组着床期子宫内膜中的表达 ($\times 200$)

Fig. 1 The expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in the implantation period in group ($\times 200$)

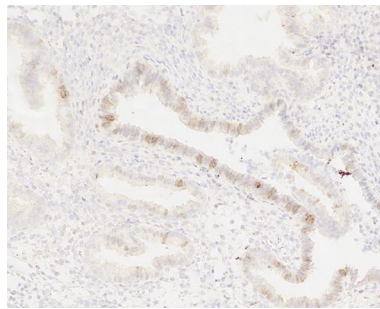


图2 $\alpha v \beta 3$ 在高孕激素组着床期子宫内膜中的表达 ($\times 200$)

Fig. 2 The expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in the implantation period in group ($\times 200$)

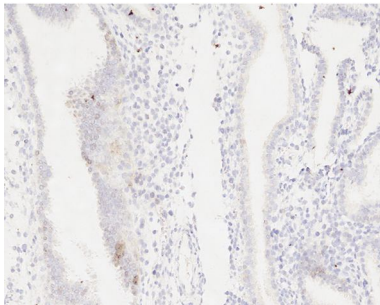


图3 $\alpha v \beta 3$ 在高孕激素组着床期子宫内膜中的表达 ($\times 200$)

Fig. 3 The expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in the implantation period in group ($\times 200$)

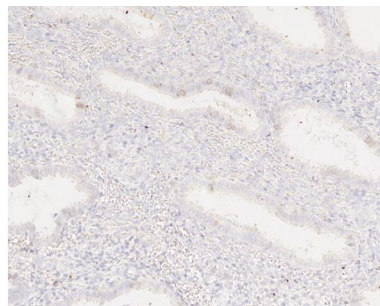


图4 $\alpha v \beta 3$ 在对照组着床期子宫内膜中的表达 ($\times 200$)

Fig. 4 The expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in the implantation period in control group ($\times 200$)

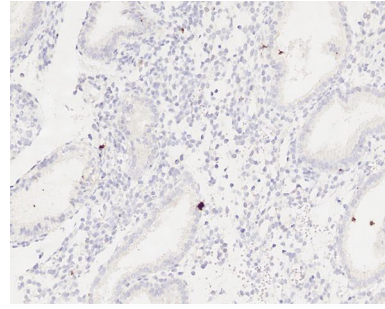


图5 阴性对照 ($\times 200$)

Fig. 5 Blank control ($\times 200$)

$\alpha v \beta 3$ (+) 患者仅 35%, 而排卵后 11~12 d OPN (+) $\alpha v \beta 3$ (+) 患者达 98%. 可见伴随内膜由分泌中期向分泌晚期转变, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 逐渐完全表达.

3.2 整合素 $\alpha v \beta 3$ 在种植窗期子宫内膜中表达的调节

现已证实整合素 $\alpha v \beta 3$ 由多种激素尤其是甾体激素、HOXA10 基因和多种细胞因子等共同调控. 程琰等认为^[7], 滋养细胞分泌的性激素, 如雌孕激素、人绒毛膜促性腺激素共同调节 $\alpha v \beta 3$ 在子宫内膜中的浓度. 目前普遍认为孕激素诱导子宫内膜表达整合素, 而雌激素抑制整合素表达. 雌孕激素同时作用使整合素 $\alpha v \beta 3$ 浓度产生周期性变化.

3.3 HCG 日高雌激素 / 孕激素水平对着床期整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达的影响

控制性超促排卵治疗周期中, 胚胎移植的妊娠率较低, 这可能与促排卵所致高雌孕激素水平, 影响子宫内膜形态、分泌功能及着床因子的表达, 使子宫内膜发育与胚胎发育非同步化, 降低子宫内膜容受性有关^[8]. 张翠莲等^[9]对小鼠的实验研究显示, 超促排卵使小鼠子宫内膜着床窗口期前移, 使内膜与胚胎发育不同步. 因此超促排卵对内膜容受性产生负面影响. 2004 年 Kosmas 等^[10]的 Meta 分析, 2 项研究认为超生理剂量的雌激素利于妊娠, 2 项研究认为降低了妊娠率, 大部分的其他研究认为高雌激素水平对妊娠率、着床率没有影响. 李蕊蕊等^[11]认为晚卵泡期血清 P 升高可降低卵裂期胚胎移植的临床妊娠率, 并增加其异位妊娠风险. Papanikolaou 等^[12]研究发现血清 P 升高只影响 Day 3 移植胚胎的妊娠率, 并不影响 Day 5 胚胎移植后的妊娠率, 推测 P 升高通过影响母胎对话影响胚胎妊娠率.

到目前为止, 关于 HCG 日高雌、孕激素水平对内膜容受因子整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达影响的文章几

乎没有. 本研究发现高雌激素组与对照组相比整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达没有差异, 分泌期呈散在弱阳性表达, 说明高雌激素并不影响整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达. 超促排卵中高雌激素水平可能并不影响胚胎的质量, 对子宫内膜容受性影响也不大, 但高雌激素水平必然伴随过多卵泡的发育, 移植后 OHSS 的风险增加. 本研究发现高孕激素组、高雌合并高孕激素组整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达与对照组比较差异无统计学意义. 高孕、高雌合并高孕激素对妊娠结局的负面影响的原因可能是多方面的.

综上所述, 在超促排卵周期高雌和或高孕的情况下, 着床期整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达与对照组比较没有统计学差异, 因此通过着床期整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达来明确内膜是否容许胚胎着床的作用和预见性是非常有限的. 胚胎种植是一个复杂的, 多因素调控的过程, 内膜容受性的影响因素也是非常多的, 高孕激素, 高雌激素伴高孕激素水平对子宫内膜容受性的损害原因还需通过扩大样本量, 更加深入的研究来阐明.

[参考文献]

- [1] CREUS M, ORDI J, FABREGUES F, et al. $\alpha v \beta 3$ integrin expression and pinopod formation in normal and out of phase endometrial of fertile and infertile women [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17: 2 279 - 2 286.
- [2] ZE W U, RONG L I, YANPING M A, et al. Effect of HCG day serum progesterone and oestradiol concentrations on pregnancy outcomes in GnRH agonist cycles [J]. *Reproductive Bio Medicine Online*, 2012, 24 (5): 511 - 520.
- [3] NOYES R W, HERTIG A T, ROCK J. Dating the endometrial biopsy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1975, 122: 262 - 263.
- [4] BUDWIT-NOVOTNY D A, MCCARTY K S, COX E B, et al. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody [J]. *Cancer Res*, 1986, 46: 5 419 - 5 425.
- [5] 杨海燕, 倪吴花, 余蓉, 等. 子宫内膜骨桥蛋白和整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达与 IVF-ET 反复种植失败的关系 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 2(17): 3 127 - 3 129.
- [6] CASALS G, ORDI J, CREUS M, et al. Expression pattern of osteopontin and $\alpha v \beta 3$ integrin during the implantation window in infertile patients with early stages of endometriosis [J]. *Human Reproduction*, 2012, 18 (3): 111 - 120.
- [7] 程琰, 胡蓉, 马开东. 滋养细胞分泌 14-3-3 τ 蛋白对子宫内膜基质细胞表达整合素 $\alpha v \beta 3$ 蛋白的影响 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2009, 36(5): 505.
- [8] NIKAA G, PSYCHOYOS A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium: Clinical relevance [J]. *Anil NY Acad Sci*, 1997, 17: 129 - 142.
- [9] 张翠莲, 谢娟珂, 张少娣, 等. 控制性卵巢刺激中黄体期添加激素对小鼠子宫内膜组织细胞凋亡变化和白血病抑制因子表达的影响 [J]. *中华妇产科杂志*, 2008, 43 (12): 937 - 941.
- [10] KOSMAS I, KOLIBIANAKIS E, DEVROEY P. Association of estradiol levels on the day of hCG administration and pregnancy achievement in IVF: a systematic review [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19: 2 446 - 2 453.
- [11] 李蕊蕊, 郭艺红, 孙莹璞, 等. 晚卵泡期血清孕酮升高对卵裂期胚胎移植的临床妊娠结局的影响 [J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29 (7): 533 - 535.
- [12] PAPANIKOLAOU E G, KOLIBIANAKIS E M, POZZOBO-N C, et al. Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 single-embryo transfer, while it has no effect on day 5 single blastocyst transfer [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91: 949 - 952.

(2015-02-16 收稿)