

褪黑素用于胚胎培养对卵巢储备功能低下患者体外受精-胚胎移植治疗效果的影响

王凯娟¹, 朱琦², 丁丁¹, 张弢¹, 曹云霞¹, 陈蓓丽¹, 章志国¹

摘要 目的 探究褪黑素(MT)应用于胚胎体外培养能否改善卵巢储备功能低下(DOR)患者体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗效果。方法 收集进行辅助生殖治疗的DOR患者共128例,所有患者均采用拮抗剂方案促排卵,根据是否在胚胎培养液中添加MT(MT浓度为 10^{-9} mol/L),将患者分成褪黑素组($n=56$)和对照组($n=72$)。结果 两组患者后期胚胎培养过程中卵子受精率、卵裂率差异均无统计学意义,但褪黑素组的囊胚形成率(65.22% vs 56.16%)及优质囊胚率(52.96% vs 40.94%)均较对照组高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两组患者冻胚移植的种植率(50.00% vs 38.67%)和临床妊娠率(48.39% vs 46.00%)相比较差异均无统计学意义,但褪黑素组获得优质囊胚的周期占比数较对照组高(85.71% vs 69.44%),且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MT应用于早期胚胎的体外培养在一定程度上能促进卵巢储备功能低下患者卵子的发育,提高胚胎质量,最终可以实质性地改善此类患者的治疗效果。**关键词** 卵巢储备功能低下;褪黑素;体外受精-胚胎移植;治疗效果

中图分类号 R 715.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)01-0006-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.002

卵巢储备功能低下(decreasing ovarian reserve, DOR)是指女性卵巢内储备的卵泡数目减少,排出的卵子质量下降,导致患者生育功能减退,常伴有基础卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)水平降低以及窦卵泡数目(antral follicle count, AFC)减少^[1]。DOR患者临床上常表现为月经周期不规律、经量减少、闭经和不孕等。该类患者在辅助生殖技

术助孕过程中常面临获卵数少,周期取消率高的困境,让临床医师和胚胎学家非常棘手。研究^[2-3]报道DOR可能与氧化应激损伤有关,而褪黑素(melatonin, MT)有强大的抗氧化性,研究^[4]显示将MT添加至小鼠的体外培养液中能明显提高其囊胚形成率。该研究探讨了在胚胎培养液中添加MT是否可以改善DOR患者辅助生殖治疗过程中的胚胎发育情况及最终的临床结局。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集2020年8—11月于安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心进行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)的DOR患者128例,通过掷硬币方式将其随机分为褪黑素组($n=56$)和对照组($n=72$)。进一步对采取IVF和ICSI方案的褪黑素组和对照组患者进行分组,分为采取IVF方案的褪黑素A1组患者($n=37$)和对照B1组患者($n=52$),采取ICSI方案的褪黑素A2组患者($n=19$)和对照B2组患者($n=20$)。根据本课题组之前的研究^[5-6]结果,添加 10^{-9} mol/L的MT(美国Sigma公司)可以改善未成熟卵子的后期发育质量,该研究在褪黑素组的胚胎培养液中添加该浓度的MT。两组患者的一般临床资料如年龄、基础FSH值、体重指数(body mass index, BMI)及患者的不孕类型等基本资料差异均无统计学意义,见表1。收集标准:基础FSH水平 >10 IU/L;AMH值 <1.11 μ g/L;卵泡早期经阴道B超提示双侧窦卵泡数 ≤ 7 个,满足上述其中两条即可^[1]。排除患者双方染色体检查异常、复发性流产、子宫内膜异位症、子宫腺肌症及排除男方严重少弱精子症引起的不孕症等。

表1 DOR患者的基本临床资料($\bar{x} \pm s$)

项目	褪黑素组($n=56$)	对照组($n=72$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	32.71 \pm 3.66	33.33 \pm 4.50	0.837	0.404
FSH值(IU/L)	10.26 \pm 3.88	11.06 \pm 5.39	0.938	0.350
BMI(kg/m ²)	22.84 \pm 3.24	23.00 \pm 4.59	0.223	0.824

2021-09-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82001516)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

² 安徽医科大学生物医学工程学院,合肥 230032

作者简介:王凯娟,女,硕士研究生;

陈蓓丽,女,博士,主治医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: cbl0118@126.com;

章志国,男,副教授,副研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: zzg_100@163.com

1.2 控制性促排卵方案 月经来潮第 2~4 天根据性激素水平和卵巢情况启动促性腺激素释放激素拮抗剂(gonadotropin releasing hormone antagonist, GnRH-ant)方案(丽申宝、HMG 或果纳芬),药物使用 5 d 后开始监测卵泡发育情况。当 ≥ 3 个主导卵泡直径达 18 mm,平均每成熟卵泡 E2 水平为 200~300 ng/L,注射 hCG(5 000~10 000)IU 或 rhCG 250 μ g, 36 h 后 B 超引导下阴道穿刺取卵术。

1.3 胚胎培养 取卵后根据精子质量行常规体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)或卵胞质内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)受精,IVF 受精后 5 h 拆除卵周颗粒细胞,在倒置显微镜下观察卵母细胞是否排出第二极体以确认受精,若受精将其移至卵裂期培养液(澳大利亚 COOK 公司)中(褪黑素组于卵裂期培养液添加 MT);ICSI 受精后立即移至卵裂期培养液中(褪黑素组于卵裂期培养液添加 MT),置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养。所有卵裂期胚胎均在受精后第 3 天移至囊胚期培养液(澳大利亚 COOK 公司)中(褪黑素组置于囊胚期培养液添加 MT),受精第 5~6 天观察囊胚形成情况,囊胚期胚胎评分标准参照 Gardner 囊胚分级法。

1.4 胚胎冷冻及解冻 胚胎评分第 5 天(D5)囊胚等级大于等于 3BC 和第 6 天囊胚等级(D6)大于等于 4BC 者可冷冻。取卵术后第 2 次或第 3 次月经来潮后可准备移植冷冻胚胎。

1.5 胚胎移植 该研究纳入的所有患者均选择冻融周期进行胚胎移植,当患者子宫内膜厚度 ≥ 8 mm 且形态较好时,肌注黄体酮或人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG),数天后行胚胎移植。移植后继续予以黄体支持,移植第 14 天检测血或尿 hCG 值,若为阳性则继续支持治疗。并于移植后第 28~30 天行阴道超声检查宫腔内有无孕囊以明确临床妊娠的诊断。

1.6 统计指标 比较两组间卵子成熟率、受精率、卵裂率、第 3 天(D3)优质胚胎率、囊胚形成率、优质囊胚率、囊胚种植率及临床妊娠率是否存在差异。

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据统计分析。正态分布计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验法或 Fisher 精确概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 褪黑素组与对照组的胚胎发育情况及临床结

局比较 两组的卵子成熟率、受精率和卵裂率,差异无统计学意义,但褪黑素组的 D3 优质胚胎率、囊胚形成率及优质囊胚率均较对照组增高,且差异有统计学意义;褪黑素组获得优质囊胚的周期占比数较对照组高,且差异有统计学意义。见表 2。已移植周期中褪黑素组($n = 31$)和对照组($n = 50$)的着床率和临床妊娠率差异均无统计学意义(目前未出现流产情况)。见表 3。

表 2 DOR 患者卵子的成熟、受精及胚胎早期发育状况[%(n/N)]

项目	褪黑素组($n = 56$)	对照组($n = 72$)	χ^2 值	<i>P</i> 值
成熟率	88.22(292/331)	84.86(314/370)	1.676	0.195
受精率	90.41(264/292)	89.50(281/314)	0.142	0.707
卵裂率	95.83(253/264)	98.22(276/281)	2.722	0.099
D3 优质胚胎率	72.73(192/253)	56.23(158/276)	20.490	<0.001
囊胚形成率	65.22(165/253)	56.16(155/276)	4.532	0.033
优质囊胚率	52.96(134/253)	40.94(113/276)	7.665	0.006
优质囊胚周期占比	85.71(48/56)	69.44(50/72)	4.647	0.031

表 3 DOR 患者移植后的妊娠结局[%(n/N)]

项目	褪黑素组($n = 31$)	对照组($n = 50$)	χ^2 值	<i>P</i> 值
着床率	50.00(21/42)	38.67(29/75)	1.413	0.235
临床妊娠率	48.39(15/31)	46.00(23/50)	0.044	0.834

2.2 采取 IVF 方案的褪黑素组和对照组患者的卵子受精及胚胎早期发育结果 A1 组和 B1 组的受精率、卵裂率、囊胚形成率差异均无统计学意义,A1 组 D3 优质胚胎率和优质囊胚率均较 B1 组高,且差异有统计学意义。见表 4。

表 4 褪黑素组和对照组 IVF 患者受精及胚胎早期发育状况比较[%(n/N)]

项目	A1 组($n = 37$)	B1 组($n = 52$)	χ^2 值	<i>P</i> 值
成熟率	91.74(200/218)	89.96(215/239)	0.435	0.509
受精率	92.50(185/200)	94.88(204/215)	1.003	0.317
卵裂率	97.84(181/185)	97.55(199/204)	- [#]	>0.999
D3 优质胚胎率	77.35(140/181)	56.78(113/199)	18.010	<0.001
囊胚形成率	64.64(117/181)	56.78(113/199)	2.449	0.118
优质囊胚率	52.49(95/181)	41.71(83/199)	4.422	0.036

[#]表示该组数据运用 Fisher 精确概率法

2.3 采取 ICSI 方案的褪黑素组和对照组患者的卵子受精及胚胎早期发育结果 A2 组和 B2 组的受精率、D3 优质胚胎率、囊胚率和优质囊胚率差异均无统计学意义,A2 组卵裂率较 B2 组低,且差异有统计学意义。见表 5。

表5 褪黑素组和对照组 ICSI 患者受精及胚胎
早期发育状况比较[%(n/N)]

项目	A2组(n=19)	B2组(n=20)	χ^2 值	P值
成熟率	81.42(92/113)	75.57(99/131)	1.218	0.270
受精率	85.87(79/92)	77.78(77/99)	1.221	0.269
卵裂率	91.14(72/79)	100.00(77/77)	- [#]	0.014
D3 优质胚胎率	72.22(52/72)	58.44(45/77)	3.110	0.078
囊胚形成率	66.67(48/72)	54.55(42/77)	2.286	0.131
优质囊胚率	54.17(39/72)	38.96(30/77)	3.460	0.063

[#]表示该组数据运用 Fisher 精确概率法

3 讨论

卵巢储备功能减退是一个渐进的过程,早期 DOR 若未及时诊治,可能进一步发展到早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI),甚至卵巢早衰^[7]。在该研究中,通过在 DOR 患者的胚胎培养液中添加 MT,观察其胚胎发育情况及临床治疗结局以了解 MT 是否能改善胚胎发育。

该研究显示胚胎培养液添加 MT 后, DOR 患者的卵子受精率和卵裂率与对照组差异无统计学意义,而褪黑素组的 D3 优质胚胎、囊胚和优质囊胚均较对照组高,且差异有统计学意义。Gao et al^[8]在小鼠胚胎培养液中添加 MT,其囊胚形成和胚胎中的平均细胞数均有明显提高。Batioğlu et al^[9]在女性不孕症患者培养液中补充 MT,卵子成熟率呈提升趋势,但差异无统计学意义。这些结果均提示 MT 可以改善人类卵子的后期发育,作用机制可能与 DOR 致病机制及 MT 特性相关。Ma et al^[10]发现氧化应激参与 POI 的发生。而卵母细胞发生氧化应激后可能导致卵子受精后胚胎体外发育异常。Park et al^[11]发现 MT 可以通过减少卵子体外成熟过程中的内质网应激改善猪卵母细胞的成熟。以上结果提示 DOR 患者的卵巢功能减退可能与氧化应激相关,在胚胎培养液中添加一定浓度的 MT 能对抗氧化应激对胚胎造成的损伤,促进胚胎的后期发育。

IVF 方案两组患者的受精率、卵裂率、囊胚形成率的差异均无统计学意义,但 A1 组 D3 优质胚胎率和优质囊胚率均高于 B1 组,且差异有统计学意义。另外,ICSI 方案两组患者的受精率、D3 优质胚胎率、囊胚形成率和优质囊胚率的差异均无统计学意义,但卵裂率差异有统计学意义。以上结果表明,在精子质量有保障的前提下,MT 可以提高卵子发育潜力,改善胚胎发育质量。

胚胎质量是影响胚胎着床的决定性因素之一,获得更多优质囊胚的 DOR 患者受孕概率增加^[12-13]。Asgari et al^[14]在小鼠胚胎培养液中分别添加 10 和 100 nmol/L 的 MT,卵裂率、囊胚的总细胞数及胚胎植入均有显著改善。Tamura et al^[15]在 2020 年发表的系统性综述中分析了 13 份动物培养液中添加 MT 的实验报导,5 份关于人类不孕症和 1 份关于 DOR 患者口服 MT 的病例报导,结果显示 MT 能改善动物卵母细胞的质量和胚胎发育,并促进不孕症患者卵子成熟及提高胚胎质量。但褪黑素组所获得优质囊胚的周期数较对照组高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。目前对于人类胚胎培养液中直接添加 MT 的研究尚少,该研究的结果证明了在胚胎培养液中添加 MT 能够促进 DOR 患者的胚胎发育,获得更多的优质胚胎,从而为 DOR 患者的生育力改善提供更多的保证。该研究中,褪黑素组和对照组的着床率和临床妊娠率差异均无统计学意义,说明两组优质囊胚质量是相当的。因此,改善 DOR 患者临床结局的关键就是尽可能获得更多优质囊胚。该研究结果显示褪黑素组所获优质囊胚的周期占比数较对照组高,且差异有统计学意义,这说明 MT 应用于早期胚胎的体外培养能提高 DOR 患者卵子的发育潜力,使更多治疗周期获得优质囊胚,进而改善 DOR 患者的治疗效果。

综上所述,MT 应用于早期胚胎的体外培养在一定程度上能促进 DOR 患者卵子的发育,提高胚胎质量,改善 DOR 患者的治疗效果,为 DOR 患者的临床治疗提供了一种新思路,具有重要的临床应用价值。

参考文献

- [1] 陈子江,田秦杰,乔杰,等.早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2017,52(9):577-81.
- [2] Toffol E, Kalleinen N, Himanen S L, et al. Nighttime melatonin secretion and sleep architecture: different associations in perimenopausal and postmenopausal women[J]. Sleep Med, 2021, 81: 52-61.
- [3] Clérico G, Taminelli G, Veronesi J C, et al. Mitochondrial function, blastocyst development and live foals born after ICSI of immature vitrified/warmed equine oocytes matured with or without melatonin[J]. Theriogenology, 2021, 160: 40-9.
- [4] Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, et al. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice[J]. J Pineal Res, 2000, 28(1): 48-51.

- [5] Zhang Z, Mu Y, Ding D, et al. Melatonin improves the effect of cryopreservation on human oocytes by suppressing oxidative stress and maintaining the permeability of the oolemma [J]. *J Pineal Res*, 2020, 70(2): e12707.
- [6] 韩丹. 不同浓度褪黑素对 ICSI 周期中未成熟卵子体外培养成熟及后续胚胎发育的影响[D]. 合肥:安徽医科大学, 2016.
- [7] Jankowska K. Premature ovarian failure [J]. *Prz Menopauzalny*, 2017, 16(2): 51-6.
- [8] Gao C, Han H B, Tian X Z, et al. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos [J]. *J Pineal Res*, 2012, 52(3): 305-11.
- [9] Batoğlu A S, Sahin U, Gürlek B, et al. The efficacy of melatonin administration on oocyte quality [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(2): 91-3.
- [10] Ma M, Chen X Y, Gu C, et al. Biochemical changes of oxidative stress in premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8855-61.
- [11] Park H J, Park J Y, Kim J W, et al. Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during *in vitro* maturation [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(2): e12458.
- [12] Gomes P R L, Motta-Teixeira L C, Gallo C, et al. Maternal pineal melatonin in gestation and lactation physiology, and in fetal development and programming [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2021, 300: 113633.
- [13] 王芳芳, 李君, 李彩华, 等. PCOS 患者冷冻胚胎移植后双胎妊娠结局分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(8): 1237-40.
- [14] Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, et al. The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos [J]. *Cell J*, 2012, 14(3): 203-8.
- [15] Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, et al. Importance of melatonin in assisted reproductive technology and ovarian aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1135.

Effect of melatonin on *in vitro* fertilization embryo transfer treatment in patients with decreasing ovarian reserve

Wang Kaijuan¹, Zhu Qi², Ding Ding¹, Zhang Chao¹, Cao Yunxia¹, Chen Beili¹, Zhang Zhiguo¹

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate whether the application of melatonin (MT) in embryo culture *in vitro* can improve the treatment effect of *in vitro* fertilization embryo transfer (IVF-ET) in patients with decreasing ovarian reserve (DOR). **Methods** 128 DOR patients receiving assisted reproductive therapy were collected. All patients were treated with an antagonist scheme of super-ovulation. Patients were divided into melatonin group ($n = 56$) and control group ($n = 72$) according to whether melatonin (melatonin concentration 10^{-9} mol/L) was added into embryo culture medium. **Results** There was no statistically significant difference in oocytes fertilization rate and cleavage rate between the two groups during later embryo culture, but blastocyst formation rate (65.22% vs 56.16%) and high-quality blastocyst rate (52.96% vs 40.94%) in the melatonin group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There were no significant differences in the implantation rate (50.00% vs 38.67%) and clinical pregnancy rate (48.39% vs 46.00%) of blastocysts after freezing-thawing between the two groups, but the cycle number of high-quality blastocysts obtained in the melatonin group was higher than that in the control group (85.71% vs 69.44%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** In a way, the application of melatonin in the *in vitro* culture of early embryos can promote the development of oocytes in patients with DOR, improve the quality of embryos, and finally substantially improve the therapeutic effect of such patients.

Key words decreasing ovarian reserve; melatonin; *in vitro* fertilization and embryo transfer; treatment effect