

# 抗苗勒管激素在 IVF 治疗多囊卵巢综合征患者中的应用价值探讨

李惠敏, 吴惠华, 孟庆霞, 邹琴燕, 李建芬, 王 玮, 李 红

(南京医科大学附属苏州医院, 苏州市立医院, 生殖与遗传中心, 江苏 苏州 215002)

[摘要] 比较体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)治疗中多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者与非 PCOS 患者基础血清及卵泡液抗苗勒管激素(anti-müllerian hormone, AMH)水平;分析 AMH 与 PCOS 患者的临床特征、IVF 结局的关系;进一步探讨 AMH 在 IVF 治疗 PCOS 患者中的应用价值。回顾性分析 2010 年 8 月至 2012 年 6 月本生殖中心行 IVF-ET 治疗的 69 例 PCOS 患者和 95 例排卵正常非 PCOS 患者的临床资料,比较两组间血清 AMH 水平、取卵日卵泡液 AMH 水平之间的差异,并对相应的 IVF 结果进行比较。使用 *t* 检验、Spearman 相关系数、多重线性回归方程行统计学分析。结果显示,(1)PCOS 组血清 AMH、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)水平、LH/FSH 比值卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、基础窦卵泡数(antral follicle count, AFC)、体重指数(body mass index, BMI),总获卵数均明显高于对照组( $P<0.05$ );(2)对照组中,血清基础 AMH 水平与基础窦卵泡数、总获卵数及 MⅡ成熟卵数呈正相关( $P<0.05$ ),与年龄呈负相关( $P<0.05$ );PCOS 组血清基础 AMH 水平与基础窦卵泡数呈正相关( $P<0.05$ ),但与总获卵数、MⅡ成熟卵数及年龄均无相关性( $P>0.05$ )。两组患者血清 AMH 水平均与垂体促性腺激素(gonadotropin, Gn)用量呈负相关( $P<0.05$ );(3)两组患者卵泡液 AMH 水平与血清基础 AMH 水平呈明显正相关( $P<0.05$ )。PCOS 组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平低于异常受精者( $P<0.05$ );对照组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平与异常受精者无差异,但低于 PCOS 组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平( $P<0.05$ );(4)两组卵泡液 AMH 水平均与相应的胚胎质量无相关性( $P>0.05$ )。PCOS 患者血清基础 AMH 水平与 AFC 数量有较强的相关性,在 PCOS 患者血清基础 AMH 水平及 AFC 明显升高的情况下,采用相对较低的 Gn 起始剂量,对减少 PCOS 患者卵巢过度刺激综合征的发生及获得理想的卵泡数有重要临床指导意义。另外 PCOS 患者卵泡液 AMH 水平升高可能会影响卵母细胞发育潜能及其正常受精,为预测卵母细胞能否正常受精提供了新的指标。但卵泡液 AMH 水平并不能预测相应胚胎质量及临床妊娠结果。

[关键词] 体外受精-胚胎移植, 多囊卵巢综合征, 卵泡液, 抗苗勒氏管激素

[中图分类号] R711.6 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2018)01-0088-09

## To Investigate the Value of Anti-Müllerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome During *in vitro* Fertilization

Li Huimin, Wu Huihua, Meng Qingxia, Zou Qinyan, Li Jianfen, Wang Wei, Li Hong

(Center of Reproduction and Genetics, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215002, China)

**Abstract:** To compare serum basal and follicular fluid levels of AMH in patients with PCOS and non-PCOS that in the treatment of IVF-ET; analyze the relationship of AMH with clinical characteristics and IVF outcomes of patients with PCOS; further to investigate the value of AMH in patients with PCOS during IVF treatment. A retrospective analysis was performed on patients accepted IVF-ET treatment in our center from August 2010 to June 2012, who were divided into two groups, 69 PCOS patients and 95 non-PCOS patients with normal ovulation to analysis the basal serum and follicular fluid AMH levels and IVF outcomes between the two groups. The results showed that, (1) Levels of serum AMH, LH, T, LH/FSH ratio, AFC, BMI and the total number of retrieved oocytes in PCOS group were significantly higher than these of control group ( $P<0.05$ ). (2) In control group, the serum AMH level has a significantly positive correlation with AFC, the total

收稿日期: 2017-09-30.

基金项目: 苏州市临床医学中心(SXXZ201505)、江苏省妇幼健康重点人才(FRC201725).

通讯联系人: 李红, 主任医师, 博导, 研究方向: 生殖医学的临床与基础研究. E-mail: honglizivf@163.com

number of retrieved oocytes and the number of mature eggs ( $P<0.05$ ), but it has a negative correlation with age ( $P<0.05$ ); in PCOS group, the serum AMH level has a significantly positive correlation with AFC ( $P<0.05$ ), but no correlation was found with the total number of retrieved oocytes, the number of mature eggs and age ( $P>0.05$ ). The serum AMH level has a negative correlation with Gonadotropin dosage in both groups ( $P<0.05$ ). (3) Levels serum of AMH and follicular fluid have a significantly positive correlation ( $P<0.05$ ). The AMH level in follicular fluid of normal fertilized oocytes was lower than that of abnormal fertilized oocytes in PCOS group, no difference was found in follicular fluid AMH level between normal and abnormal fertilized oocytes in control group, but follicular fluid AMH level of normal fertilized oocytes in control group was lower than that of PCOS group ( $P<0.05$ ). (4) No correlation was found between follicular fluid AMH level and corresponding embryo quality in both PCOS and controls ( $P>0.05$ ). The basal serum AMH level in PCOS patients has a strong correlation with the AFC. A relatively low initial dose of Gonadotropin has an important clinical significance in reducing the incidence of OHSS and obtaining an ideal number of oocytes in PCOS patients with high basal serum AMH and AFC. In addition, the elevated follicular fluid AMH level might affect the potential development of oocyte and its normal fertilization, thus, providing a new marker to predict the oocyte normal fertilization. While the levels of AMH in follicular fluid could not predict the embryo quality and clinical pregnancy outcome.

**Key words:** *in vitro* fertilization-embryo transfer, polycystic ovary syndrome, follicular fluid, anti-Müllerian hormone

多囊卵巢综合征是育龄期妇女常见的内分泌代谢紊乱性疾病,是无排卵性不孕的最常见病因,以偶发排卵或持续无排卵、临床和(或)生化高雄激素血症、胰岛素抵抗和超声下卵巢多囊样改变为主要临床特征。

PCOS 具体发病机制尚不明确,目前普遍认为 PCOS 导致不孕的原因是由于卵泡初始募集异常造成小窦卵泡过多及优势卵泡的选择障碍造成不排卵。近年来的研究发现,卵巢局部颗粒细胞、卵泡膜细胞及卵母细胞产生的生物活性因子,能通过自分泌/旁分泌的形式参与周期性优势卵泡的形成、排卵及性激素的生成,并通过对促性腺激素受体量的调节影响促性腺激素对卵巢的作用。卵巢内这些调节因子的紊乱,可能与 PCOS 的发病有关。其中卵巢颗粒细胞分泌的因子-AMH 被认为在调控卵泡生长和发育中起到了重要的作用。因而推测 PCOS 患者窦前卵泡数目增加及无优势卵泡生长可能与 AMH 的分泌异常有关。

在女性,胎龄 36 周的胎儿卵巢中开始有 AMH 分泌<sup>[1]</sup>,出生后 AMH 由卵巢颗粒细胞少量分泌,在整个婴儿期保持极低水平,青春发育开始后逐渐上升至基础水平,并维持整个生育期,峰值出现在青春期和成年期,但随着年龄的增长其表达量逐渐降低,绝经后女性血液中检测不到 AMH。有研究显示<sup>[2]</sup>,AMH 在不同发育阶段的卵泡中表达有差异,AMH 在始基卵泡中无表达,在窦前卵泡和小窦卵泡(直径 $<4$  mm)的颗粒细胞中表达量最高,而在较大的窦卵泡(直径 $4$  mm~ $8$  mm)中表达量逐渐降低,在直径 $>8$  mm 的卵泡中几乎无表达,且 AMH 在卵母细胞周围的卵丘颗粒细胞中表达量最高,其表达量的差异可能反映了颗粒细胞功能的不同。近年来研究表明,AMH 参与卵泡发育的调节,是目前发现的唯一在始基卵泡募集过程中起抑制作用的调节因子。AMH 的作用机制主要是<sup>[3]</sup>:(1)抑制原始卵泡的起始募集,调节原始卵泡池中生长卵泡的数量,保护始基卵泡不被过早过快消耗;(2)在卵泡继续生长的过程中,降低大窦卵泡对 FSH 的敏感性,参与优势卵泡的选择。

PCOS 患者血清 AMH 水平是正常排卵女性的 2~3 倍,这与 PCOS 患者卵泡数目增多 2~3 倍相一致。但目前关于较高的 AMH 水平与 PCOS 早期较多的小窦卵泡数量之间的因果关系还不确定,AMH 在 PCOS 患者排卵障碍发生机制中的具体作用尚不清楚。

在实施辅助生殖技术时,正确评价卵巢的储备能力及其对控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)的反应性,将有助于指导临床医生筛选患者,制定合理的、个体化的促排卵用药方案,减少卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)和卵巢低反应的发生,预测 ART 的成功率及其预后。目前大多数的研究证实,AMH 是可以预测卵巢储备能力及 COH 治疗后卵巢反应的一个重要因子。但对于 AMH 能否反映 IVF-ET 治疗中 PCOS 患者卵子及胚胎的质量、预测 IVF 的治疗结果还有争议。目前国内外研究多集中在血清中 AMH 水平,对于卵泡液中 AMH 水平的研究仍较少。本研究的目的是通过比较 IVF/ICSI-ET 治疗中 PCOS 患者与非 PCOS 患者基础血清及卵泡液 AMH 水平,分析 AMH 与 PCOS 患者的临床特征、IVF 结局的关系,进一步探讨 AMH 在 IVF 治疗 PCOS 患者中的应用价值。

## 1 材料与方法

## 1.1 研究对象

选取2010年8月至2012年6月在我院生殖医学中心行IVF/ICSI-ET治疗的患者共164例,分为两组,第一组为PCOS不孕患者(共69例,收集卵泡液43份),第二组为对照组患者(共95例,收集卵泡液151份)。

69例PCOS不孕患者,年龄24~35岁,BMI  $16.77\text{ kg/cm}^2 \sim 31.64\text{ kg/cm}^2$ 。除外由少精、精子异常及其他排卵障碍引起的不孕。PCOS的诊断根据2003年鹿特丹会议ESHRE/ASRM的诊断标准:(1)稀发排卵或无排卵;(2)高雄激素血症的临床和生化特征(排除其他疾病引起的高雄激素血症:如先天肾上腺皮质增生症,分泌雄激素的肿瘤,库欣氏综合征等);(3)B超表现为卵巢呈多囊样改变,超声提示卵巢体积 $\geq 10\text{ mL}$ ,或同一个切面上直径 $2\text{ mm} \sim 9\text{ mm}$ 的卵泡数 $\geq 12$ 个。以上三项中具备两项即可诊断为PCOS。

对照组由95例不孕患者组成,年龄23~35岁,BMI  $16.59\text{ kg/cm}^2 \sim 26.17\text{ kg/cm}^2$ 。对照组患者纳入标准:(1)行IVF/ICSI-ET治疗双侧卵巢均存在;(2)月经周期规律;(3)过去或现在无内分泌疾病,基础内分泌检测结果正常;(4)阴道超声检查子宫及卵巢无器质性病变且卵巢无多囊改变;(5)不孕原因为单纯输卵管因素。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 月经第3 d血清标本采集

月经第3 d患者抽取静脉血监测基础内分泌水平。激素指标包括AMH( $\text{ng/mL}$ )、FSH( $\text{mIU/mL}$ )、LH( $\text{mIU/mL}$ )、雌二醇(Estradiol,  $\text{E}_2$ ,  $\text{pg/mL}$ )、T( $\text{ng/mL}$ )。

### 1.2.2 超促排卵

根据患者情况选择长方案或拮抗剂方法促排卵。卵巢储备功能正常者常规选择长方案;卵巢储备功能下降,部分PCOS患者、上周期长方案卵巢反应差者选择拮抗剂。(PCOS组长方案48例,拮抗剂21例;对照组长方案71例,拮抗剂方案24例)。

长方案超促排卵,于IVF/ICSI-ET治疗前一周期口服避孕药,停药前5 d~7 d使用GnRH-a降调节,在月经来潮第2 d~3 d测定血激素水平和行B超监测。降调节标准:B超监测双侧卵巢卵泡直径 $<10\text{ mm}$ ,子宫内膜厚度 $\leq 5\text{ mm}$ ,血清 $\text{E}_2 < 50\text{ pg/mL}$ ,FSH、LH均 $< 5\text{ mIU/mL}$ 。达到垂体降调节后启用人基因重组促卵泡激素(r-FSH,商品名果纳芬,75 IU/支,瑞士Serono公司产品)或国产尿促性腺激素(HMG,75 IU/支,中国丽珠制药厂)。在GnRH拮抗剂方案中,月经第2 d~3 d启用人基因重组促卵泡激素(r-FSH,商品名果纳芬,75 IU/支,瑞士Serono公司产品)或国产尿促性腺激素(HMG,75 IU/支,中国丽珠制药厂),根据血激素水平和卵泡大小适时加用GnRH拮抗剂。两种方案中Gn起始剂量根据患者年龄、体重指数、血清基础AMH水平、基础窦状卵泡数确定,当直径 $\geq 18\text{ mm}$ 、卵泡 $> 2 \sim 3$ 个时,当晚肌肉注射人绒毛膜促性腺激素艾泽 $250\text{ }\mu\text{g}$ 或艾泽 $250\text{ }\mu\text{g} + \text{HCG } 2\,000\text{ IU}$ (艾泽,瑞士Serono公司产品;HCG丽珠公司产品),36 h后在阴道超声引导下穿刺取卵行IVF或ICSI。

### 1.2.3 卵泡液标本收集

静脉全身麻醉后,阴道超声指引下穿刺取卵,保留穿刺第一个卵泡直径 $\geq 18\text{ mm}$ 、清亮、无血染、含有卵母细胞的卵泡液,3 800 r/min离心,离心5 min去除颗粒细胞,标记后置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测。

### 1.2.4 检测方法

血清FSH、LH、 $\text{E}_2$ 、T由本医院检验科采用化学发光法测定(德国罗氏公司的ELECSYS试剂盒)。AMH采用酶联免疫吸附法检测(美国Beckman公司,ELISA试剂盒),检测浓度范围 $0\text{ ng/mL} \sim 22.5\text{ ng/mL}$ ,仪器采用瑞士TECAN酶标仪,均严格按试剂盒及仪器说明书操作。

### 1.2.5 获卵数、正常受精及胚胎质量评定

记录每例患者取卵日抽吸卵泡数、总获卵数、受精情况、第3 d优质胚胎数。加入精子16 h~19 h后,显微镜下观察卵子的受精情况。每个卵泡液所对应的卵母细胞单独体外受精,卵子正常受精标准:出现第二极体,卵细胞内出现2个原核。第3 d胚胎发育情况评分:(1)细胞数,每个胚胎的卵裂球数目;(2)细胞碎片,1级=没有细胞碎片;2级=少于10%细胞碎片;3级=15%~25%细胞碎片;4级=25%~50%细胞碎片;5级=大于50%细胞碎片;(3)均质性,1级=所有的卵裂球是等体积;2级=卵裂球轻微的体积不等;3级=卵裂球明显的体积不等。第3 d 7~9个细胞的1、2级胚胎为优质胚胎。

### 1.3 统计学方法

建立 Excel 表数据库,利用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,PCOS 组和对照组两组之间比较采用独立样本  $t$  检验(Mann-Whitney  $U$  检验);两变量间的相关性用 Spearman 相关系数表示;AMH 结合 AFC 预测卵巢反应应用多重线性回归方程表示(卵巢反应:获卵数和 Gn 用量用反应变量  $Y$  表示,AMH 和 AFC 分别用自变量  $X_1$ 、 $X_2$  表示),以  $P<0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组患者一般临床资料及基础内分泌比较

PCOS 组血清 AMH、LH、T 水平、LH/FSH 比值、基础窦卵泡数目、BMI、总获卵数均明显高于对照组,血清 FSH 水平低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );在促排卵过程中,PCOS 组 Gn 的用量少于对照组差异有统计学意义( $P<0.05$ );PCOS 组与对照组比较患者年龄、优质胚胎率差异无统计学意义( $P>0.05$ ) (见表 1)。

表 1 PCOS 组与对照组临床特征比较

Table 1 Comparison of clinical characteristics between PCOS and control group

	PCOS 组( $n=69$ )	对照组( $n=95$ )	$t$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	29.61±3.23	29.95±3.61	-0.64	0.521
体重指数(kg/cm <sup>2</sup> )	23.16±3.46	21.27±2.26	-3.62	<0.001 *
基础窦卵泡数(个)	28.63±8.84	15.20±6.44	-8.85	<0.001 *
血清 AMH(ng/mL)	8.16±4.24	3.96±2.72	-6.81	<0.001 *
Gn 用量(IU)	1 668.84±727.64	1 800.00±1 022.36	-2.69	0.007 *
使用 Gn 的天数(天)	11.35±2.23	10.00±1.64	-3.26	0.001 *
总获卵数(个)	17.47±9.03	14.63±7.66	-2.08	0.037 *
优质胚胎率(%)	37.67±27.17	39.20±28.77	-0.111	0.912
卵母细胞成熟率(%)	81.48±16.08	84.96±15.94	-1.641	0.101
血清 FSH(mIU/mL)	6.96±1.43	8.83±2.93	-4.62	<0.001 *
血清 LH(mIU/mL)	7.35±4.28	5.11±3.79	-3.98	<0.001
血清 T(ng/mL)	0.45±0.20	0.35±0.20	-3.24	0.001 *
血清 LH/FSH	1.07±0.63	0.61±0.50	-6.19	<0.001 *

备注:(1)数据表示方式为(均数±标准差),\*代表  $P<0.05$  有统计学意义;(2)卵母细胞成熟率表示成熟卵母细胞数与总获卵数的比例。

### 2.2 两组患者血清 AMH 水平与临床特征相关性

对照组中,血清 AMH 水平与 AFC 呈明显正相关( $r=0.629$ , $P=0.000$ ),与总获卵数及 M II 成熟卵数呈正相关(总获卵数  $r=0.502$ , $P=0.000$ ;M II 成熟卵数  $r=0.436$ , $P=0.000$ ),与年龄呈负相关( $r=-0.415$ , $P=0.000$ );在 PCOS 组血清基础 AMH 水平与 AFC 呈正相关( $r=0.298$ , $P=0.015$ ),但与总获卵数、M II 成熟卵数及年龄均无相关性( $P>0.05$ )。两组患者血清 AMH 水平均与 Gn 用量呈负相关(PCOS 组  $r=-0.253$ , $P=0.039$ ;对照组  $r=-0.604$ , $P=0.000$ ) (见表 2)。

表 2 两组患者血清 AMH 水平与临床资料相关性

Table 2 Correlation of serum anti-Müllerian hormone levels and clinical data in PCOS and control groups

	对照组血清 AMH(ng/ml) ( $n=69$ )		PCOS 血清 AMH(ng/ml) ( $n=95$ )	
	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值
基础窦卵泡数(个)	0.629	0.000 *	0.298	0.015 *
年龄	-0.415	0.000 *	-0.027	0.830
Gn 总量	-0.604	0.000 *	-0.253	0.039 *
总获卵数	0.502	0.000 *	0.039	0.758
M II 成熟卵数	0.436	0.000 *	0.069	0.584

\*代表  $P<0.05$  有统计学意义。

### 2.3 AMH 预测卵巢反应

在对照组中,随着血清基础 AMH 水平和 AFC 的升高,获卵数增加,Gn 用量减少,且 AMH 预测卵巢反应的灵敏度优于 AFC(见如下回归方程)。

(1) 获卵数  $Y=7.76+0.91X^1+0.22X^2$ ; (2) Gn 用量  $Y=3615.94-138.15X^1-59.24X^2$ .  
获卵数和 Gn 用量用反应变量  $Y$  表示, AMH 和 AFC 分别用自变量  $X_1$ 、 $X_2$  表示.

2.4 两组患者血清、卵泡液中 AMH 水平比较

PCOS 组血清和卵泡液 AMH 水平均高于对照组血清和卵泡液 AMH 水平, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ). 两组患者血清 AMH 水平均高于卵泡液中 AMH 水平, 且两组患者血清 AMH 水平与卵泡液 AMH 水平呈明显正相关 (对照组  $r=0.515$ ; PCOS 组  $r=0.587$ ), 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (见表 3).

表 3 PCOS 组与对照组血清及卵泡液 AMH 水平比较

Table 3 Comparison of serum basal and follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone between PCOS and control group				
	PCOS 组 ( $n=43$ )	对照组 ( $n=151$ )	$t$ 值	$P$ 值
血清 AMH (ng/mL)	8.16±4.24	3.96±2.72	-6.81	<0.001 *
卵泡液 AMH (ng/mL)	6.63±5.10	2.98±2.33	-5.93	<0.001 *

\* 代表  $P<0.05$  有统计学意义.

2.5 卵泡液中 AMH 水平与 IVF 结局

PCOS 组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平低于异常受精者 (正常受精组 AMH ( $5.44\pm4.04$ ), 异常受精组 AMH ( $8.83\pm6.21$ ),  $t=-2.117$ ,  $P=0.033$ ); 对照组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平与异常受精者无差异 (正常受精组 AMH ( $3.14\pm2.58$ ), 异常受精组 AMH ( $2.733\pm1.84$ ),  $t=-0.518$ ,  $P=0.604$ ), 但低于 PCOS 组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平 ( $t=-3.973$ ,  $P=0.000$ ); 两组患者卵泡液 AMH 水平均与相应的胚胎质量无相关性 ( $P>0.05$ ). (见表 4)

表 4 PCOS 组和对照组正常受精者与异常受精者卵泡液 AMH 水平比较

Table 4 Comparison of follicular fluid anti-Müllerian hormone levels between normal fertilization and abnormal fertilization in PCOS and control groups				
	正常受精	异常受精	$t$ 值	$P$ 值
PCOS 卵泡液 AMH (ng/mL)	5.44±4.04	8.83±6.21	-2.117	0.033 *
对照组卵泡液 AMH (ng/mL)	3.14±2.58	2.733±1.84	-0.518	0.604

备注: (1) \* 代表  $P<0.05$  有统计学意义; (2) 正常受精标准: 出现第二极体, 卵细胞内出现 2 个原核.

3 讨论

3.1 AMH 与 PCOS 的关系

PCOS 是育龄期妇女最常见的生殖内分泌疾病. 目前研究认为<sup>[4]</sup>, PCOS 病变之一是卵巢原发性功能障碍, 主要表现为 AFC 是非 PCOS 卵巢的 2~3 倍, 且卵泡发育停滞.

本研究中 PCOS 患者血清 AMH 水平及 AFC 均明显高于对照组, 而且两组患者血清 AMH 水平均与 AFC 呈正相关, 提示 PCOS 患者血清 AMH 水平的升高可能与其 AFC 增多有关. 在 PCOS 患者, 血清基础 AMH 水平的升高与月经紊乱程度<sup>[5]</sup>及超声下 2 mm~5 mm 小卵泡数量过多密切相关<sup>[6]</sup>. PCOS 患者血清 AMH 水平是正常排卵女性的 2~3 倍, 这与 PCOS 患者卵泡数目增多 2~3 倍相一致. 研究显示<sup>[7]</sup> PCOS 患者的血清 AMH 浓度与 AFC、T 及 LH 水平呈正相关, 与年龄呈负相关, 正常人和 PCOS 患者血清 AMH 浓度随年龄增长而降低, 但 PCOS 患者在 40 岁时血 AMH 仍保持较高水平. 另外, 本研究还发现 PCOS 患者 IVF 超促排卵后单个卵泡液中 AMH 水平明显高于对照组, 血清 AMH 水平与卵泡液 AMH 水平呈正相关, PCOS 患者的单个卵泡液中 AMH 水平显著升高, 推测 PCOS 患者血清 AMH 的升高除了与小窦卵泡数目增多相关外, 也与每个卵泡分泌的 AMH 增多有关, 这与早前的报道<sup>[8-9]</sup>相一致, 但具体发生机制还不明确. 然而, 目前对 AMH 受体的研究尚未发现始基卵泡上的表达, 推测 PCOS 患者小卵泡持续分泌的高水平 AMH 不直接作用于始基卵泡, 不能直接抑制始基卵泡的募集, 导致始基卵泡进入生长卵泡池, 进一步分泌高水平 AMH. AMH 在始基卵泡表达的缺乏, 以及 AMH 旁分泌机制异常可能是导致多囊卵巢综合征早期卵泡发育过多的原因之一.

文献也有报道<sup>[10]</sup>, 血清 AMH>5 ng/mL 可以作为多囊卵巢的预测因子, 当用 AMH>5 ng/mL 来代替鹿特丹标准中的多囊卵巢时, PCOS 的发病率降低为 4.7%, 此结果支持应用与年龄相关的不同的窦卵泡数和 AMH 的临界值来诊断 PCOS, 以避免对于年轻患者的过度治疗, 说明 AMH 对 PCOS 有很好的诊断价值. 作为小窦

卵泡的标志,AMH 还可以用来提示 PCOS 的严重程度,以及预测减肥后月经是否会恢复正常<sup>[11]</sup>。

### 3.2 AMH 与 PCOS 卵泡发育异常有关

PCOS 是多基因、多因素共同作用的结果,目前普遍认为 PCOS 导致不孕的原因是由于卵泡初始募集异常造成小窦卵泡过多及优势卵泡的选择障碍造成不排卵。卵泡形成要经历两次重要募集:起始募集(卵泡从静止状态募集进入生长池)和周期募集(生长的卵泡被选择继续生长直到排卵前阶段),只有那些对 FSH 敏感的窦前卵泡和小的窦状卵泡才能继续生长<sup>[12]</sup>。

本实验中 PCOS 患者血清 AMH 水平明显升高且 PCOS 患者血清 AMH 水平升高与 AFC 数目增多密切相关,提示升高的 AMH 可能参与了 PCOS 早期卵泡的募集。Durlinger<sup>[13]</sup>通过研究 AMH 基因敲除小鼠发现,雌性的 AMH 基因敲除小鼠出生前始基卵泡生成无明显异常,出生后始基卵泡募集过早,其进入生长池的比率较野生型显著增加,原始卵泡池过早耗尽,生长卵泡增多,说明缺少 AMH 抑制作用,会导致原始卵泡募集增加,证实了 AMH 抑制始基卵泡募集的作用。在体外实验中也得出相同的结论,在体外培养刚出生 2 d 的小鼠卵巢组织(此时卵巢组织内全部是始基细胞),加入 AMH 2 d~4 d 后显示卵巢组织内生长卵泡数较对照组减少,卵泡募集受阻<sup>[14]</sup>。另外在体外培养人类卵巢皮质的研究<sup>[15]</sup>也证实了 AMH 在原始卵泡募集中的抑制作用,在早期发育的卵巢卵泡中加入浓度 100 ng/mL 的重组 AMH,会导致原始卵泡生长减少,初始募集受阻。Piltonen 等<sup>[4]</sup>报道正常人和 PCOS 患者血清 AMH 浓度随年龄增长而降低,但 PCOS 组降低不显著,仍明显高于对照组,表明 PCOS 患者卵巢老化减慢,可能由于增高的 AMH 水平抑制了卵泡的起始募集。这与本实验结果相符。

另一方面,AMH 可能对影响 FSH 敏感性的因子起到抑制作用。随着卵泡的生长发育,AMH 表达降低,抑制作用得以解除,卵泡继续生长发育。然而在 PCOS 患者,颗粒细胞过度表达 AMH,血清 AMH 水平过高降低了卵泡对 FSH 的敏感性,影响了卵泡的周期募集,使卵泡停滞在窦前和小窦卵泡阶段。La Marca 等<sup>[16]</sup>报道 PCOS 患者血清中 AMH 水平显著升高与血清 T 和雄烯二酮呈正相关,并且提出 AMH 在 PCOS 中的作用机制假说,认为 AMH 通过抑制 FSH 诱导的颗粒细胞芳香化酶活性影响雌激素合成,致使雄激素向雌激素转化受阻,造成底物堆积,从而导致卵泡局部高雄激素环境,超过一定临界水平就抑制优势卵泡的形成,使小窦状卵泡发育停滞,并产生过多的 AMH,进一步加重局部高雄激素环境,形成恶性循环。与其观点相同,Pellatt 等<sup>[17]</sup>通过比较 PCOS 排卵者、无排卵者及正常对照组女性同等大小卵泡颗粒细胞内分泌 AMH 的含量,发现排卵者、无排卵者颗粒细胞 AMH 水平较对照组分别高 4 倍和 75 倍,他认为升高的 AMH 可能抑制 FSH 刺激下的芳香化酶的活性,致使雄激素升高,影响优势卵泡发育,产生大量 AMH,形成恶性循环。本实验中 PCOS 患者血清 AMH 和 T 水平明显高于对照组,提示高的 AMH 水平可能影响卵泡发育成熟,但本研究未证实血清 AMH 水平与 T 水平有相关性。

### 3.3 AMH 反映卵巢储备及卵巢对 Gn 的反应性

卵巢储备功能取决于原始卵泡池的大小和卵母细胞质量,卵巢储备功能决定了女性的生育能力。不同原因的不孕患者卵巢储备功能不同,对外源性促排卵药物的反应差异很大。例如年龄 $\geq 40$ 岁、有盆腔子宫内膜异位症、卵巢手术及放化疗史等,其卵巢储备功能降低,对促性腺激素反应不良,导致周期取消率增加、取卵数量减少、促性腺激素用量增加及时间延长<sup>[18]</sup>。

众多研究已证实<sup>[19]</sup>,AMH 是可以预测卵巢储备及 COH 治疗后卵巢反应的一个重要因子。研究显示<sup>[20-21]</sup>,对于月经规律、有正常排卵的女性而言,血清 AMH 水平随时间的推移、年龄的增长而降低,并且在其他一些与年龄相关的因素,比如血清 FSH、INHB 水平和 AFC 发生变化之前变化,更能准确反应卵巢生殖功能的下降和预测绝经过渡期的即将到来。据报道<sup>[22-23]</sup>,血清和卵泡液 AMH 水平能很好地预测卵巢对 COH 的反应性,和 FSH、INHB、E2 及 AFC 相比,血清 AMH 水平与获卵数的相关性最高,血清 AMH 水平可更准确地预测 ART 中的卵巢反应性。本实验中,两组患者血清 AMH 水平均与基础窦卵泡数呈正相关,说明 AMH 可以预测卵巢储备功能;两组患者血清 AMH 水平均与 Gn 总量呈负相关,并且在对照组中,随着血清基础 AMH 水平和 AFC 的升高,获卵数增加,Gn 用量减少,且 AMH 预测卵巢反应的灵敏度优于 AFC,证明血清 AMH 水平可更准确地预测 ART 中的卵巢反应性。本研究中,PCOS 组获卵数与 AFC 正相关,而与其血清 AMH 水平无明显相关性,可能与我们在 COH 时为防止 OHSS 的发生,人为地控制 Gn 起始剂量有关。

血清 AMH 水平可以预测 OHSS 的发生. 发生 OHSS 的患者基础血清 AMH 水平较正常人高 6 倍,提示 AMH 可能提前预测 OHSS<sup>[24]</sup>. Lee 等<sup>[25]</sup>分析 262 个促排卵周期发生 OHSS 的情况,提出基础血清 AMH 水平较年龄及 BMI 能更好地预测 OHSS,灵敏度为 90.5%,特异度为 81.3%. 可通过检测基础血清 AMH 水平制定个性化促排卵方案,减少 OHSS 的发生,尤其是 PCOS 患者.

### 3.4 AMH 预测 IVF 结局

在 IVF 治疗中妊娠受多因素影响,包括回收卵子数量、成熟卵子数量、卵母细胞质量、可供移植胚胎数量和质量、以及“窗口期”时子宫内膜容受性等,AMH 作为行 ART 前卵巢储备功能的预测指标得到认可,但其是否能预测 IVF 治疗中卵母细胞的质量、胚胎质量及妊娠结局仍存在争议.

Hazout<sup>[26]</sup>、Somayeh<sup>[27]</sup>研究发现血清基础 AMH 水平与 M II 成熟卵母细胞数呈明显正相关. Ebner<sup>[28]</sup>认为血清 AMH 值在 1.66 ng/mL~4.52 ng/mL 之间时,月经第 3 d 的基础 AMH 水平与获卵数、卵子质量呈相关性,但与受精率、卵裂率和囊胚形成率无相关性,推测 AMH 水平较 FSH 更能预测获卵数目及卵子质量. 另有报道<sup>[29]</sup>卵泡液中 AMH 水平高的卵母细胞更易于受精,受精卵母细胞的卵泡液 AMH 水平较未受精者高 3 倍以上. 而且,多项研究证实,随着卵泡液中 AMH 水平的升高,受精率、胚胎着床率和临床妊娠率明显提高,妊娠组卵泡液 AMH 水平显著高于未妊娠组<sup>[30-31]</sup>. 相反,有研究却认为<sup>[32]</sup>单个卵泡的 AMH 水平与卵母细胞的成熟和发育潜能呈负相关. Bullet 等<sup>[33]</sup>通过比较 PCOS 患者与非 PCOS 患者卵泡液中 AMH 水平,发现妊娠组卵泡液 AMH 水平显著低于未妊娠组,提示卵泡液中过高的 AMH 水平影响卵子质量及其最终的成熟. 研究<sup>[34]</sup>显示,无肥胖及高雄激素血症的 PCOS 患者卵泡液中 AMH 水平并不能预测卵子质量、胚胎质量及妊娠结局.

本研究中,PCOS 组正常受精的卵母细胞卵泡液中 AMH 水平低于异常受精者,提示高水平的 AMH 可能影响卵母细胞质量,不利于其正常受精;另外发现卵泡液中 AMH 水平存在以下变化趋势:对照组异常受精者<对照组正常受精者<PCOS 组正常受精者<PCOS 组异常受精者,由此可以推测卵泡液中 AMH 水平过高或过低都不利于卵母细胞的正常受精,而是有一个合适的临界值. 本研究发现,两组患者卵泡液 AMH 水平均与相应的胚胎质量无相关性,说明单个卵泡液中 AMH 水平并不能预测胚胎质量,原因可能是 AMH 颗粒细胞产生,其受体在颗粒细胞和卵泡内膜上表达,并不能直接反映胚胎质量. 总之,AMH 预测 IVF 卵子质量、胚胎质量及妊娠结果的作用仍需进一步探讨.

综上所述,AMH 与卵泡发育、窦卵泡数量及卵巢的储备都有很强的相关性. 在辅助生殖技术中 AMH 结合 AFC 能更好地预测卵巢反应,在正常排卵妇女中,随着血清基础 AMH 水平和 AFC 的增加,获卵数增多,而 Gn 用量减少,这对临床治疗方案的选择和调整用药剂量有重要指导意义;在 PCOS 患者血清基础 AMH 水平及 AFC 明显升高的情况下,AMH 结合 AFC 预测卵巢反应,采用较低的 Gn 起始剂量,对减少 PCOS 患者卵巢过度刺激综合征的发生及获得理想的卵泡数有重要临床指导意义. AMH 在人类 ART 中显示出极大的优越性,可能成为理想的血清标志物. 本研究通过分析行 IVF/ICSI-ET 治疗的 PCOS 患者基础血清及卵泡液中的 AMH 水平与 PCOS 临床特征的关系,发现 AMH 水平的增高和 PCOS 的发生有关,AMH 水平能直接反应 PCOS 基础卵泡数目增多的这一临床特征,为 PCOS 的临床诊断及治疗效果评价提供参考. 研究发现 PCOS 组正常受精的卵母细胞卵泡液 AMH 水平低于异常受精者,说明 PCOS 患者 AMH 水平增高可能会影响卵母细胞质量及其正常受精,为预测卵母细胞能否正常受精提供了新的指标. 但由于样本量小及促排卵方案不统一,PCOS 组成熟卵母细胞数、卵母细胞成熟率、卵母细胞正常受精率及优质胚胎率 and 对照组比较无统计学差异. 这也可能与 PCOS 患者不同的临床表现有关,原发卵巢功能不全,胰岛素抵抗或肥胖都会导致 PCOS 患者生殖功能障碍,影响其临床特征及 IVF 结果. 因此,目前对于血清和卵泡液 AMH 水平能否反应 IVF 治疗中 PCOS 患者卵子及胚胎的质量、预测 IVF 治疗结果仍充满争议,有待于大量的临床实验进一步研究 AMH 与 PCOS 的关系.

### [参考文献]

- [1] RAJPERT D M E, JORGENSEN N, GRAEM N, et al. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development; association with differentiation of Sertoli and granulosa cells[J]. Journal of clinical endocrinology and

- metabolism,1999,84(10):3 836-3 844.
- [2] WEENEN C, LAVEN J S, VON BERGH A R, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment[J]. *Mol Hum Reprod*,2004,10:77-83.
- [3] DURLINGER A L, VISSER J A, THEMME A P, et al. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone[J]. *Reproduction*,2002,124(5):601-609.
- [4] DIAMANTI K E, KOULI C, TSIANATELI T, et al. Therapeutic effects of metformin on insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome[J]. *Eur J Endocrinol*,1998,138(3):269-274.
- [5] PIGNY P, JONARD S, ROBERT Y, et al. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome.[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2006,91(3):941-945.
- [6] LAVEN J S, MULDER A G, VISSER J A, et al. Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2004,89(1):318-323.
- [7] PILTONEN T, MORIN P L, KOIVUNEN R, et al. Serum Anti-mullerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Hum Reprod*,2005,20(7):1 820-1 826.
- [8] FALLAT M E, SIOW Y, MARRA M, et al. Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis[J]. *Fertil Steril*,1997,67(5):962-965.
- [9] DAS M, GILLOTT D J, SARIDOGAN E, et al. Anti-Müllerian hormone is increased in follicular fluid from unstimulated ovaries in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Hum Reprod*,2008,23:2122-26.
- [10] DEWAILLY D, GRONIER H, PONCELET E, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome(PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries[J]. *Hum Reprod*,2011,26(11):3 123-3 129.
- [11] MORAN L J, NOAKES M, CLIFTON P M, et al. The use of anti-Müllerian hormone in predicting menstrual response after weight loss in overweight women with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2007,92(10):3796-802.
- [12] MCGEE E A, HSUEH A J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles[J]. *Endocr Rev*,2000,21(2):200-214.
- [13] DURLINGER A L, KRAMER P, KARELS B, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary[J]. *Endocrinology*,1999,140(12):5 789-5 796.
- [14] DURLINGER A L, GRUIJTERS M J, KARELS B, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary[J]. *Endocrinology*,2002,143(3):1 076-1 084.
- [15] CARLSSON I B, SCOTT J E, VISSER J A, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*[J]. *Hum Reprod*,2006,21(9):2 223-2 227.
- [16] La MARCA A, ORVIETO R, GIULINI S, et al. Müllerian-inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics[J]. *Fertil Steril*,2004,82(4):970-972.
- [17] PELLATT L, HANNA L, BRINCAT M, et al. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries[J]. *Clin Endocrinol Metab*,2007,92(1):240-245.
- [18] MCLLVEN M, SKULL J D, LEDGER W L. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population[J]. *Hum Reprod*,2007,22(3):778-785.
- [19] TSEPELIDIS S, DEMEESTERE I, DELBAERE A. Anti-Müllerian hormone and its role in the regulation of ovarian function[J]. *Rev Med Brux*,2007,28(3):165-171.
- [20] VISSER J A, de JONG F, LAVEN J S, et al. Anti-mullerian hormone: a new marker for ovarian function[J]. *Reproduction*,2006,131(1):1-9.
- [21] van ROOIJ I A, BROEKMANS F J, SCHEFFER G J. Serum anti-Müllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study[J]. *Fertil Steril*,2005,83(4):979-987.
- [22] RIGS R M, DURAN E H, BAKER M W, et al. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone: a comparison of the predictive value of anti-Müllerian hormone, follicle-Stimulating hormone, inhibin B, and age[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2008,199(2):202.e1-8.
- [23] La MARCA A, SIGHINOLFI G, RADI D, et al. Anti-Müllerian hormone(AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology(ART)[J]. *Hum Reprod Update*,2010,16(2):113-130.
- [24] NAKHUDA G S, CHU M C, WANG J G, et al. Elevated serum müllerian-inhibiting substance may be a marker for ovarian hyperstimulation syndrome in normal women undergoing *in vitro* fertilization[J]. *Fertil Steril*,2006,85(5):1 541-1 543.
- [25] LEE T H, LIU C H, HUANG C C, et al. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstim-

- ulation syndrome in assisted reproduction technology cycles[J]. Hum Reprod, 2008, 23(1): 160–167.
- [26] HAZOUT A, BOUCHARD P, SEIFER D B, et al. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol[J]. Fertil Steril, 2004, 82(5): 1 323–1 329.
- [27] SOMAYEH A, GHAMARTAJ H, BATOOL H R. Comparing serum basal and follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone as a predictor of *in vitro* fertilization outcomes in patients with and without polycystic ovary syndrome[J]. Ann Saudi Med, 2010, 30(6): 442–447.
- [28] EBNER T, SOMMERGRUBER M, MOSER M, et al. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles[J]. Hum Reprod, 2006, 21(8): 2 022–2 026.
- [29] TAKAHASHI C, FUJITO A, KAZUKA M, et al. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2008, 89(3): 586–591.
- [30] FANCHIN R, MENDEZ LOZANO D H, FRYDMAN N, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by *in vitro* fertilization[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(5): 1 796–1 802.
- [31] PABUCCU R, KAYA C, CAGLAR G S, et al. Follicular-fluid anti-Müllerian hormone concentrations are predictive of assisted reproduction outcome in PCOS patients[J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(5): 631–637.
- [32] CUPISTI S, DITTRICH R, MUELLER A, et al. Correlations between anti-Müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes[J]. Eur J Med Res, 2007, 12(12): 604–608.
- [33] DESFORGES B V, GALLO C, LEFEBVRE C, et al. Increased anti-Müllerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2010, 94(1): 198–204.
- [34] YILMAZ N, UYGUR D, DOGAN M, et al. The effect of follicular anti-Müllerian hormone levels of non-obese, non-hyperandrogenemic polycystic ovary syndrome patients on assisted reproduction outcome[J]. Gynecol Endocrinol, 2012, 28(3): 162–165.

[ 责任编辑:黄 敏 ]

(上接第82页)

- [24] 祝文婷, 陈为京, 陈建爱, 等. 丛枝菌根真菌提高植物抗盐碱胁迫能力的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 2 061–2 062.
- [25] ALTINTAS A, MARTINI J, MORTENSEN U H, et al. Quantification of oxidative stress phenotypes based on high-throughput growth profiling of protein kinase and phosphatase knockouts[J]. FEMS Yeast Research, 2016(16): fov101.
- [26] BOLISSETTY S, JAIMES E A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology[J]. International journal of molecular sciences, 2013, 14: 6 306–6 344.
- [27] NEWINGTON J T, RAPPON T, ALBERS S, et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid beta and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production[J]. J Biol Chem, 2012, 287(44): 37 245–37 258.
- [28] ABHISHEK S, RAMAKRISHNAN S. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* via mechanisms other than the high-osmolarity glycerol pathway[J]. Microbiology, 2016, 162: 1 511–1 513.
- [29] PEREIRA R R, CASTANHEIRA D, TEIXEIRA J A, et al. Detailed search for protein kinase(s) involved in plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity regulation of yeast cells[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 15: 15–19.
- [30] PORTILLO F. Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants[J]. Biochimica et biophysica acta(BBA)-reviews on biomembranes, 2000(1 469): 31–42.

[ 责任编辑:黄 敏 ]