



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106168621 A

(43)申请公布日 2016. 11. 30

(21)申请号 201610576174.1

(22)申请日 2016.07.21

(71)申请人 上海交通大学医学院附属仁济医院
地址 200001 上海市黄浦区山东中路145号

(72)发明人 张丛 童婧

(74)专利代理机构 上海翰信知识产权代理事务
所(普通合伙) 31270

代理人 张维东

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

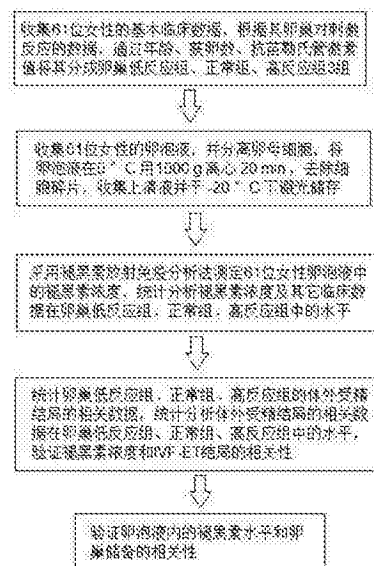
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法与应用

(57)摘要

本发明公开了褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,包括:收集61位女性的基本临床数据,根据其卵巢对刺激反应,主要通过年龄、获卵数、抗苗勒氏管激素值将其分成卵巢低反应组、正常组、高反应组3组。收集61位女性的卵泡液,采用褪黑素放射免疫分析法测定61位女性卵泡液中的褪黑素浓度,分析褪黑素浓度及其它临床数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平;分析体外受精结局的相关数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平,验证褪黑素浓度和体外受精-胚胎移植结局的相关性;验证褪黑素水平和卵巢储备的相关性。本发明可通过检测卵泡液中的褪黑素浓度,预测卵巢储备以及体外受精-胚胎移植结局。



1. 一种褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法,其特征在于,至少通过以下步骤实现:

步骤1,收集61位女性的基本临床数据,根据其卵巢对刺激反应的数据,通过年龄、获卵数、抗苗勒氏管激素值将其分成卵巢低反应组、正常组、高反应组3组。

步骤2,收集61位女性的卵泡液,并分离卵母细胞,将卵泡液在0℃用1000g离心20min,去除细胞碎片,收集上清液并于-20℃下避光储存;

步骤3,采用褪黑素放射免疫分析法测定61位女性卵泡液中的褪黑素浓度,统计分析褪黑素浓度及其它临床数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平;

步骤4,统计卵巢低反应组、正常组、高反应组的体外受精结局的相关数据,统计分析体外受精结局的相关数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平,验证褪黑素浓度和体外受精-胚胎移植结局的相关性;

步骤5,验证卵泡液内的褪黑素水平和卵巢储备的相关性。

2. 根据权利要求1所述的褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法,其特征在于,所述步骤1中,需要收集的基本临床数据包括:年龄、基础卵泡刺激素、基础雌二醇、抗苗勒氏管激素、体重指数、基础促黄体生成素、不孕年限、原发不孕、不孕原因,所述不孕原因包括输卵管因素、男性因素、混合因素。

3. 根据权利要求1所述的褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法,其特征在于,所述步骤2中,所述卵泡液没有被稀释和血液污染,所有卵泡液都在上午8:00到11:00抽取。

4. 根据权利要求1所述的褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法,其特征在于,所述步骤4中,体外受精结局的相关数据包括获卵数、受精卵数、卵裂的合子数、第3天优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数、囊胚率、第3天优胚率。

5. 根据权利要求4所述的褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法,其特征在于,所述步骤4中,验证褪黑素浓度和体外受精-胚胎移植结局的相关性的步骤包括:

A,统计获卵数、受精卵数、卵裂的合子数、第3天优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数、囊胚率、第3天优胚率分别与褪黑素浓度的Spearman等级相关系数;

B,分析获卵数、受精卵数、卵裂的合子数、第3天优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数、囊胚率、第3天优胚率分别与褪黑素浓度的相关性。

6. 根据权利要求1所述的褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法,其特征在于,所述步骤5的具体步骤包括:

步骤5.1,以卵泡液褪黑素浓度为X轴,分别以抗苗勒氏管激素、年龄、基础卵泡刺激素为Y轴,将61位患者的相关数据绘制到坐标系中;

步骤5.2,统计抗苗勒氏管激素、年龄、基础卵泡刺激素分别与褪黑素浓度的Spearman等级相关系数;

步骤5.3,分析抗苗勒氏管激素、年龄、基础卵泡刺激素分别与褪黑素浓度的相关性。

7. 褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中的应用,其特征在于,卵泡液里的褪黑素水平和卵细胞的质量、数量密切相关,通过检测卵泡液中的褪黑素浓度,预测卵巢储备以及体外受精-胚胎移植结局。

8. 根据权利要求7所述的褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中的应用,其特征在于,

卵泡液里的褪黑素水平作为卵巢储备的生化标记分子。

褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及褪黑素在预测卵巢储备和体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中的研究方法与应用。

背景技术

[0002] 女性的卵巢储备包括卵巢中卵母细胞的数量和质量,可以用于评估女性的生殖潜力。虽然每位不孕不育患者接受体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗的结局差异很大,极难预测,但是对她们常规进行卵巢储备的评估有益于制定个体化的治疗方案,以期增加体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的成功率。目前常用的能反映卵巢储备的血清标志物是血清抗苗勒氏管激素(AMH)和基础卵泡刺激素(bFSH)的浓度。但是血清抗苗勒氏管激素(AMH)和胚胎质量不相关,导致它的临床应用价值有限。同样,血清基础卵泡刺激素(bFSH)升高仅仅反应卵巢中卵母细胞的数量下降而并非是质量下降。因此这两个常用指标都不能预测卵母细胞的质量,因而不是最佳的卵巢储备的标记物,更不能用于预测体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的结局。

[0003] 在哺乳动物中,褪黑素是在松果体中合成。褪黑素作为内分泌激素在调节生理周期方面发挥关键作用。

[0004] 在人类血清与唾液中的褪黑素水平表现出显著的生理节律,即白天的水平低,晚上的水平高。已经有报道表明,这种分泌的褪黑素水平变化模式与睡眠失调、时差、沮丧、压力、精神分裂症、下丘脑闭锁、妊娠、神经性厌食症、一些类型的癌症、免疫学紊乱以及青春期内分泌成熟调控是一致的。褪黑素的许多生理作用是通过激活褪黑素受体产生的,而其它的生理作用在于其强有力地清除人体中的自由基。

[0005] 卵巢反应性分组标准:

[0006] A、卵巢低反应poor ovarian response(POR),至少满足以下3条中的2条:

[0007] (1)高龄(≥ 40 岁)或存在卵巢反应不良的其它危险因素;

[0008] (2)前次体外受精(IVF)周期POR,常规方案获卵数 ≤ 3 个;

[0009] (3)卵巢储备下降(窦卵泡数(AFC) $< 5-7$ 个或抗苗勒氏管激素(AMH) $< 0.5-1.1\text{mg/L}$)。

[0010] 如果年龄或卵巢储备功能检测正常,患者连续2个周期应用最大化的卵巢刺激方案仍出现POR也可诊断;若年龄 ≥ 40 岁患者,有一项卵巢储备功能检查异常也可诊断为POR。常见人群为:1)高龄;2)前次超促排卵周期POR者;3)具有影响卵巢储备和卵巢刺激反应性的获得性或遗传性疾病者,如卵巢手术、盆腔感染、化疗及盆腔放疗、遗传免疫性疾病和环境因素等;4)高BMI者。其预测指标包括基础卵泡刺激素(bFSH)、AFC、抑制素B、抗苗勒氏管激素(AMH)、卵巢体积、卵巢刺激实验,其中基础卵泡刺激素(bFSH)、窦卵泡数(AFC)和抗苗勒氏管激素(AMH)是评价卵巢储备功能最常用的指标,是敏感性和特异性均较高的POR预测指标。

[0011] B、卵巢正常反应

[0012] 卵巢正常反应的定义或者诊断,目前尚无统一的共识和指南。目前主要根据年龄、卵巢储备功能以及既往促排卵周期中是否存在卵巢低反应或高反应史,综合评价卵巢是否属于正常反应。单纯输卵管性因素或/和男性因素不孕女性为卵巢正常反应人群。

[0013] 预测卵巢正常反应的指标:

[0014] (1)年龄<35岁;

[0015] (2)卵巢储备功能正常[$1.0\sim 1.4\text{mg/L}$ <抗苗勒管激素(AMH)< $3.5\sim 4.0\text{mg/L}$,窦卵泡数(AFC)为7~14个,基础卵泡刺激素(bFSH)< 10IU/L];

[0016] (3)既往无卵巢低反应或高反应的体外受精(IVF)周期取消史。

[0017] C、卵巢高反应

[0018] 常见的诊断标准为:

[0019] (1)超促排卵周期取卵数目>15个或由于卵泡发育过多取消周期;

[0020] (2)超促排卵后发生中/重度OHSS;

[0021] (3)超促排卵过程中检测到直径>12~14mm的卵泡数>20个;

[0022] (4)超促排卵过程中发生 $E2>5000\text{ng/L}$ 。

[0023] 卵巢高反应的常见人群为PCOS患者、年轻且低BMI患者。预测卵巢高反应的指标:

1)年龄:年轻女性高反应者多,一般<35岁;2)卵巢的窦卵泡数(AFC)(数目、大小、均一度):一般窦卵泡数(AFC)>20为高反应人群;3)激素水平(基础卵泡刺激素(bFSH)、抗苗勒氏管激素(AMH)、抑制素B):抗苗勒氏管激素(AMH)> 4.5mg/L 预测高反应的假阳性和假阴性率均较低;4)月经周期(menstrual cycle length):月经周期长的稀发者发生高反应的几率大。曾有研究者设计预测高反应的模型,结果显示用窦卵泡数(AFC)联合月经周期一起预测高反应准确率较高;5)对促排卵药物的反应:在既往的促排卵周期中有多卵泡(直径12~14mm卵泡>15个)发育,或采卵数目>18个,或既往有OHSS发生。

[0024] ^{125}I 放射免疫测定法是一种直接定量检测人体血清与血浆中褪黑素含量的方法。该方法依据放射免疫测定法的基本原则,即包括放射性抗原与非放射性抗原竞争大量的抗体结合位点。当体系均衡时,具有结合放射性活性物质的抗体与二抗在聚乙烯乙二醇的条件下发生沉淀反应。将上清液离心分离后,沉淀以微克计量。 ^{125}I 标记的连接抗体的抗原量与样本中被测物浓度呈正比。对于未知样本的定量,可以根据其活性对比已知标准的参考曲线即可。

发明内容

[0025] 本发明公开了一种褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法及其应用,通过研究卵泡液内的褪黑素浓度和相关临床数据的相关性,可以预测女性卵巢储备和体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗的结局。

[0026] 本发明公开了一种褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,至少通过以下步骤实现:

[0027] 步骤1,收集61位女性的基本临床数据,根据其卵巢对刺激反应,主要通过年龄、获卵数、抗苗勒氏管激素(AMH)值将其分成卵巢低反应组、正常组、高反应组3组。

[0028] 步骤2,收集61位女性的卵泡液,并分离卵母细胞,将卵泡液在 0°C 用 1000g 离心

20min,去除细胞碎片,收集上清液并于-20℃下避光储存;

[0029] 步骤3,采用褪黑素放射免疫分析法测定61位女性卵泡液中的褪黑素浓度,统计分析褪黑素浓度及其它临床数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平;

[0030] 步骤4,统计卵巢低反应组、正常组、高反应组的体外受精(IVF)结局的相关数据,统计分析体外受精结局的相关数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平,验证褪黑素浓度和体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局的相关性;

[0031] 步骤5,验证卵泡液内的褪黑素水平和卵巢储备的相关性。

[0032] 上述的褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,其中,所述步骤1中,需要收集的基本临床数据包括:年龄、基础卵泡刺激素(bFSH)、基础雌二醇(bE2)、抗苗勒氏管激素(AMH)、体重指数、基础促黄体生成素(bLH)、不孕年限、原发性不孕、不孕原因,所述不孕原因包括输卵管因素、男性因素、混合因素。

[0033] 上述的褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,其中,所述步骤2中,所述卵泡液没有稀释和血液污染,所有卵泡液都在上午8:00到11:00抽取。

[0034] 上述的褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,其中,所述步骤4中,体外受精(IVF)结局的相关数据包括获卵数、受精卵数、卵裂的合子数、第3天优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数、囊胚率(%)、第3天优胚率(%)。

[0035] 上述的褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,其中,所述步骤4中,验证褪黑素浓度和体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局的相关性的步骤包括:

[0036] A,统计获卵数、受精卵数、卵裂的合子数、第3天优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数、囊胚率(%)、第3天优胚率(%)分别与褪黑素浓度的Spearman等级相关系数;

[0037] B、分析获卵数、受精卵数、卵裂的合子数、第3天优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数、囊胚率(%)、第3天优胚率(%)分别与褪黑素浓度的相关性。

[0038] 上述的褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法,其中,所述步骤5的具体步骤包括:

[0039] 步骤5.1,以卵泡液褪黑素浓度为X轴,分别以抗苗勒氏管激素(AMH)、年龄、基础卵泡刺激素(bFSH)为Y轴,将61位患者的相关数据绘制到坐标系中;

[0040] 步骤5.2,统计抗苗勒氏管激素(AMH)、年龄、基础卵泡刺激素(bFSH)分别与褪黑素浓度的Spearman等级相关系数;

[0041] 步骤5.3,分析抗苗勒氏管激素(AMH)、年龄、基础卵泡刺激素(bFSH)分别与褪黑素浓度的相关性。

[0042] 本发明还提供了褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中的应用,其中,通过检测卵泡液中的褪黑素浓度,并通过研究卵泡液中的褪黑素浓度和相关临床数据的相关性,发现卵泡液里的褪黑素水平和卵细胞的质量、数量密切相关,通过检测卵泡液中的褪黑素浓度,可以预测卵巢储备以及体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局。卵泡液里的褪黑素水平还可以作为卵巢储备的生化标记分子。

[0043] 综上所述,本发明通过研究卵泡液内的褪黑素浓度和相关临床数据的相关性,可以预测女性卵巢储备和体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗的结局,操作简单易行,有利于对

患者制定个性化的治疗方案,提高体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗的成功率。

附图说明

[0044] 图1是本发明褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法的流程图;

[0045] 图2是本发明的取卵日卵泡液里褪黑素水平和抗苗勒氏管激素(AMH)的相关性图;

[0046] 图3是本发明的取卵日卵泡液里褪黑素水平和年龄的相关性图;

[0047] 图4是本发明的取卵日卵泡液里褪黑素水平和基础卵泡刺激素(bFSH)的相关性图。

具体实施方式

[0048] 下面根据具体的实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细介绍。

[0049] 本发明收集了61名接受体外受精(IVF)或者卵泡浆内单精子显微注射技术-胚胎移植治疗的女性患者的数据进行研究。根据她们对卵巢刺激的反应,主要通过年龄,获卵数,抗苗勒氏管激素(AMH)值分成卵巢低反应组,正常组,高反应组3组。

[0050] 收集61位女性的卵泡液,方法为:在阴道超声波的引导下,从每个患者的优势卵泡(直径19-24mm)通过卵泡穿刺抽取第一管卵泡液,卵泡液要求没有被稀释和血液污染,所有卵泡液都是在上午8:00到11:00抽取。将卵母细胞分离出去后,将卵泡液在0℃用1000g离心20min以去除细胞碎片。之后收集上清液并于-20℃储存,但要在试剂盒有效期内尽快测定,整个操作过程都要避光。

[0051] 采用褪黑素放射免疫分析法测定女性卵泡液中褪黑素的浓度:

[0052] 在检测前,使所有的试剂(可以有沉淀的试剂)达到室温后彻底而轻柔的来回颠倒。按照顺序将离心管编号,做2次检测实验。

[0053] 褪黑素放射免疫分析法包括以下步骤:

[0054] A、试剂准备

[0055] 酶溶液:

[0056] 在检测之前用3mI的酶缓冲液重悬瓶中的组分。通过涡旋进行混合并放在涡旋仪上涡旋30分钟,确保充分溶解。

[0057] 平衡试剂:

[0058] 平衡试剂必须用10mI水(去离子水、蒸馏水或超纯水)重悬。重悬好的平衡水如果不立即使用的话,必须在-20℃下冷冻最多一个月,只能解冻一次。

[0059] B、褪黑素检测:

[0060] (1)取15uI的标准品与对照品至各自的离心管中。

[0061] (2)取150uI的平衡试剂至含有非特异性结合(NSB)、标准品与对照品的离心管中。

[0062] (3)取150uI的样品至各自的离心管中。

[0063] (4)取50uI的酶溶液至所有离心管中(不计总量)后涡旋。

[0064] (5)在室温(20-25℃)下孵育一个小时。

[0065] (6)取100uI的检测缓冲液至所有的离心管中(不计总量)之后快速混匀。

[0066] (7)取25uI的¹²⁵I Melatonin至所有离心管中。

[0067] (8)取50uI的抗血清褪黑素至所有离心管中(不计总量与NSB),彻底混合均匀。

[0068] (9)盖上离心管盖,在室温(20-25℃)下孵育20-24小时。

[0069] (10)彻底混合冷冻了的(2-8℃)沉淀试剂,向所有的离心管中吸入1000uI(不计总量),在涡旋仪上混匀。

[0070] (11)在2-8℃下孵育20分钟。

[0071] (12)在3000g下离心20分钟。

[0072] (13)倒出或吸出上清液(不计量),将离心管吸干,朝上放置2分钟。

[0073] (14)将所有离心管在Y计数器上计数1分钟。

[0074] C、结果计算:

[0075] 褪黑素检测范围:2.3-1000pg/ml,批内、批间平均变异系数分别为9.7-13.4%和8.0-13.3%,褪黑素值计算方法为:从标准品、对照品、样品的平均cpm值中减去NSB的平均cpm值。

[0076] 从读出来的样本浓度得到的标准曲线,可以通过绘制(B-NSB)/(B0-NSB)比例图获得。标准检测为Y轴,对应的标准浓度为X轴。绘制非线性回归曲线,样本与对照组浓度可以直接从校准曲线中读取。在样本中若发现浓度高于最大标准值(G标准),应该用平衡试剂(BA R-0028)稀释后再次检测。

[0077] 总褪黑素的浓度等于卵泡液样品的单个卵细胞的褪黑素值乘以每个人的卵母细胞数。61位患者的基本情况及卵泡液中褪黑素浓度如表1所示。

[0078] 表1

[0079]

卵巢反应性	低反应 (21 例)	正常反应 (21 例)	高反应 (19 例)	P 值 *P
变量	均值和标准差 中位数(四分位距)	均值和标准差 中位数(四分位距)	均值和标准差 中位数(四分位距)	
年龄 (岁)	40.57 ± 2.561 40 (39 - 43)	28 ± 2.864 27 (25.5 - 30.5)	27.2 ± 2.396 27 (26 - 28)	0.000 0.000 ^{a, b}
基础卵泡刺激素 (bFSH) (IU/L)	10.11 ± 3.136 8.87 (7.8 - 12.65)	6.825 ± 1.155 6.97 (5.96 - 7.405)	6.009 ± 1.578 5.45 (4.6 - 8.03)	0.000 0.000 ^{a, b}
基础雌二醇(bE2) (pg/ml)	80.39 ± 83.61 45 (32.59 - 101)	36.45 ± 14.34 33.54 (28.19 - 46.07)	34.08 ± 10.07 30.64 (26.08 - 39.92)	0.007 0.006 ^a 0.011 ^b
抗苗勒氏管激素 AMH (ng/ml)	0.7373 ± 0.7755 0.51 (0.25 - 0.8515)	2.671 ± 0.8956 2.74 (1.875 - 3.58)	10.18 ± 4.275 10.3 (5.57 - 12.3)	0.000 0.000 ^{a, b, c}
卵泡液中褪黑素浓度 (pg/ml)	23.26 ± 19.06 16.14 (8.69 - 40.4)	113.7 ± 102.4 82.17 (43.64 - 137.7)	237.4 ± 197.1 187.2 (64.8 - 382.4)	0.000 0.000 ^{a, b} 0.049 ^c
体重指数	22.37 ± 2.808	22.88 ± 4.168	21.51 ± 3.174	NS

[0080]

(kg/m ²)	22.86 (19.73 - 24.95)	23.03(19.05 - 25.72)	21.22 (18.59 - 24.03)	
基础促黄体生成素 (bLH) (IU/L)	6.986 ± 11.19 3.79 (2.7 - 6.845)	4.426 ± 1.752 4.08 (2.72 - 5.9)	5.071 ± 1.291 4.82 (4.19 - 6.03)	NS
不孕年限 (年)	7.143 ± 6.421 5 (2.5 - 9)	3.667 ± 2.106 3 (2 - 5)	3.267 ± 2.492 2 (2 - 4)	NS
原发不孕 [% (n/n)] [#]	33.33 (7/21)	47.62 (10/21)	66.66 (10/15)	NS
指征 [% (n/n)] [#]				NS
输卵管因素	52.38 (11/21)	19.05 (4/21)	13.33 (2/15)	
男性因素	14.29 (3/21)	38.10 (8/21)	40.00 (6/15)	
混合因素	33.33 (7/21)	42.85 (9/21)	46.67 (7/15)	

[0081] P:秩和检验,*P:组间比较,^a:卵巢低反应/卵巢高反应,^b:卵巢低反应/卵巢正常反应,^c:卵巢高反应/卵巢正常反应,NS:无统计学差异,[#]:卡方检验。

[0082] 从表1可知,和卵巢储备负相关的指标如年龄、基础卵泡刺激素(bFSH)、bE2,在卵巢低反应组是最高的,并且差异非常显著。而卵巢储备的另一个关键分子抗苗勒氏管激素(AMH)趋势正好相反,在高反应组最高,而低反应组值最低($p < 0.01$)。同时,取卵日卵泡液内褪黑素水平在不同组间显著不同($p < 0.01$),低反应组是 23.26 ± 19.06 (pg/ml),正常反应组是 113.7 ± 102.4 (pg/ml),而高反应组是 237.4 ± 197.1 (pg/ml)。其它的基础指标,如BMI、bLH、不孕的时间、不孕的原因包括输卵管因素、男性及混合性因素在3个组间没有差别。

[0083] 本发明通过分析褪黑素水平和卵巢刺激方案的相关性来研究治疗方案对卵泡液里褪黑素水平的影响。

[0084] 卵泡液里褪黑素水平和卵泡刺激参数的相关性如表2所示($n = 41$):

[0085] 表2

[0086]

参数	卵泡液内褪黑素含量 (pg/ml)	
	Spearman 等级相关系数 (r_s)	p 值
E ₂ -dhCG (pg/ml)	0.636	0.000
P-dhCG (ng/ml)	0.473	0.000
LH-dhCG (IU/L)	-0.382	0.002
FSH-dhCG (IU/L)	-0.007	NS
卵巢刺激的时限 (天)	0.143	NS
Gn 总剂量 (IU)	-0.077	NS
Gn 起始剂量 (IU)	-0.297	NS
子宫内膜厚度 (mm)	0.103	NS

[0087] E₂-dhCG:hCG注射日血清中雌激素(E₂)水平。P-dhCG:hCG注射日血清中孕酮(P)的水平。LH-dhCG:hCG注射日血清中LH水平。FSH-dhCG:hCG注射日血清中FSH水平。NS:无统计学差异。

[0088] 由表2可知,褪黑素水平和hCG日血清E2($rs=0.636, p=0.000$)及孕酮(P)($rs=0.473, p=0.000$)水平正相关,和LH($rs=-0.382, p=0.002$)负相关,和FSH(FSH-dhCG),使用方案(长方案,短方案及拮抗剂方案)带来的促性腺激素注射时长、起始剂量、总剂量及子宫内膜的厚度(mm)没有相关性。

[0089] 本发明卵巢低反应组、正常组、高反应组的体外受精结局情况如表3所示。

[0090] 表3

[0091]

卵巢反应性	低反应	正常反应	高反应	P 值
	(21 例)	(21 例)	(19 例)	*p
变量	均值和标准差 中位数 (四分位距)	均值和标准差 中位数 (四分位距)	均值和标准差 中位数 (四分位距)	
周期数	21	21	19	
获卵数	2.095 ± 0.9952 2 (1 - 3)	10 ± 2.864 11 (8 - 12)	22 ± 5.438 20 (18 - 24)	< 0.0001 $0.000^{a,b,c}$
受精卵数	1.476 ± 0.8136 1 (1 - 2)	6.19 ± 2.804 7 (4.5 - 7)	14.2 ± 4.539 15 (10 - 19)	< 0.0001 $0.000^{a,b,c}$
卵裂的合子数	1.667 ± 0.7958 2 (1 - 2)	7.095 ± 3.048 8 (4.5 - 9.5)	16.67 ± 4.655 18 (13 - 21)	< 0.0001 $0.000^{a,b,c}$
第 3 天优胚数	1.048 ± 0.8646 1 (0 - 2)	2.762 ± 1.7 3 (1.5 - 4)	7.067 ± 4.367 6 (4 - 9)	< 0.0001 0.000^a $0.001^{b,c}$
囊胚数	0.1905 ± 0.5118 0 (0 - 0)	2.143 ± 2.175 1 (0.5 - 3.5)	6.533 ± 3.182 7 (4 - 9)	< 0.0001 $0.000^{a,b,c}$
适合移植的胚胎数	1.19 ± 0.9284 1 (0 - 2)	3.571 ± 2.461 4 (2 - 5.5)	6.733 ± 2.685 7 (4 - 10)	< 0.0001 0.000^a 0.001^b 0.002^c
囊胚率 (%)	13 ± 32 0 (0 - 0)	26 ± 22 25 (5 - 42)	40 ± 17 33 (29 - 50)	0.000 0.000^a 0.002^b

[0092]

第 3 天优胚率	58 ± 44	40 ± 23	41 ± 20	NS
(%)	67 (0 - 100)	38 (27 - 53)	40 (24 - 61)	

[0093] 囊胚率是囊胚数/卵裂的合子数;第3天优胚率为第3天优胚数/卵裂合子数。P:单因子方差分析,*P:组间比较,a:卵巢低反应/卵巢高反应,b:卵巢低反应/卵巢正常反应,c:卵巢高反应/卵巢正常反应,NS:无统计学差异。

[0094] 由表3可知,卵泡液里褪黑素水平最低的低反应组的体外受精(IVF)结局最差。如

表3显示,体外受精(IVF)结局的一些标准如获卵数、受精卵数、卵裂数、第3天(D3)优胚数、囊胚数、适合移植的胚胎数及囊胚率随着褪黑素水平的升高而显著升高。这些指标在正常组中比低反应组中高,而高反应组中数值最高。卵泡液中褪黑素浓度高的患者通过体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗能获得更多的卵母细胞、受精卵、卵裂的受精卵、优质的卵裂期胚胎、囊胚和更多的可用于移植的胚胎。

[0095] 为了验证取卵日卵泡液里褪黑素水平预测妊娠结局的作用,本发明研究了褪黑素水平和体外受精(IVF)结局的相关性。取卵日卵泡液里褪黑素水平和体外受精(IVF)结局参数的相关性($n=61$)如表4所示:

[0096] 表4

[0097]

参数	卵泡液里褪黑素水平	p 值
	Spearman 等级相关系数(r_s)	
获卵数	0.67	0.000
受精数	0.653	0.000
卵裂的合子数	0.646	0.000
第3天的优胚数	0.587	0.000
培养的胚胎数	0.559	0.000
囊胚数	0.533	0.000
可移植的胚胎数	0.607	0.000
囊胚率(%)	0.36	0.005
第3天优胚率 (%)	0.028	NS

[0098] 囊胚率是囊胚数/卵裂的合子数。第3天优胚率为第3天优胚数/卵裂合子数。

[0099] 通过表4的结果显示,褪黑素水平和体外受精(IVF)指标显著正相关,包括获卵数($r_s=0.67, p=0.000$)、受精卵数($r_s=0.653, p=0.000$)、卵裂数($r_s=0.646, p=0.000$)、第3天优胚数($r_s=0.587, p=0.000$)、培养胚胎数($r_s=0.559, p=0.000$)、囊胚数($r_s=0.533, p=0.000$)、适合移植的胚胎数($r_s=0.607, p=0.000$)及囊胚率($r_s=0.36, p=0.005$);而和D3优胚率没有显著相关性。因此,卵泡液里褪黑素的水平和体外受精(IVF)结局具有显著的相关性。

[0100] 为了研究取卵日卵泡液内的褪黑素水平和卵巢储备的相关性,本发明以卵泡液褪黑素浓度为X轴,分别以抗苗勒氏管激素(AMH)、年龄、基础卵泡刺激素(bFSH)为Y轴,将61位患者的相关数据绘制到坐标系中,并统计分析其Spearman相关系数,来分析其相关性。

[0101] 如图2、图3、图4所示,取卵日卵泡液里褪黑素水平和抗苗勒氏管激素(AMH)、年龄及基础卵泡刺激素(bFSH)水平的相关性($n=61$)分别为:

[0102] (A)卵泡液里褪黑素和抗苗勒氏管激素(AMH)水平显著正相关(Spearman-Rho $r_s=0.593, p=0.000$)。

[0103] (B)褪黑素水平和女性年龄显著负相关(Spearman-Rho $r_s=-0.632, p=0.000$)。

[0104] (C)褪黑素水平和基础卵泡刺激素(bFSH)水平显著负相关(Spearman-Rho $r_s=0.507, p=0.000$)。

[0105] 因此,卵泡液中的褪黑素水平可以成为一个很好的预测卵巢储备的标志。在与卵巢储备的其它标志物对比,褪黑素是一种内源性稳定化合物。对卵巢储备不良的患者,补充褪黑素对胚胎培养基或卵母细胞成熟培养基有一定的有益效果,可促进胚胎或卵母细胞成熟,可在临床试验中作为一种新的策略。

[0106] 综上所述,本发明通过检测卵泡液中的褪黑素浓度,并通过研究卵泡液中的褪黑素浓度和相关临床数据的相关性,发现卵泡液里的褪黑素水平和卵细胞的质量、数量密切相关。通过检测卵泡液中的褪黑素浓度,可以预测卵巢储备以及体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局,卵泡液里的褪黑素水平还可以作为卵巢储备的生化标记分子。本发明有利于对患者制定个性化的治疗方案,提高体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗的成功率。

[0107] 以上所述的实施例仅用于说明本发明的技术思想及特点,其目的在于使本领域内的技术人员能够了解本发明的内容并据以实施,不能仅以本实施例来限定本发明的专利范围,即凡依本发明所揭示的精神所作的同等变化或修饰,仍落在本发明的专利范围内。

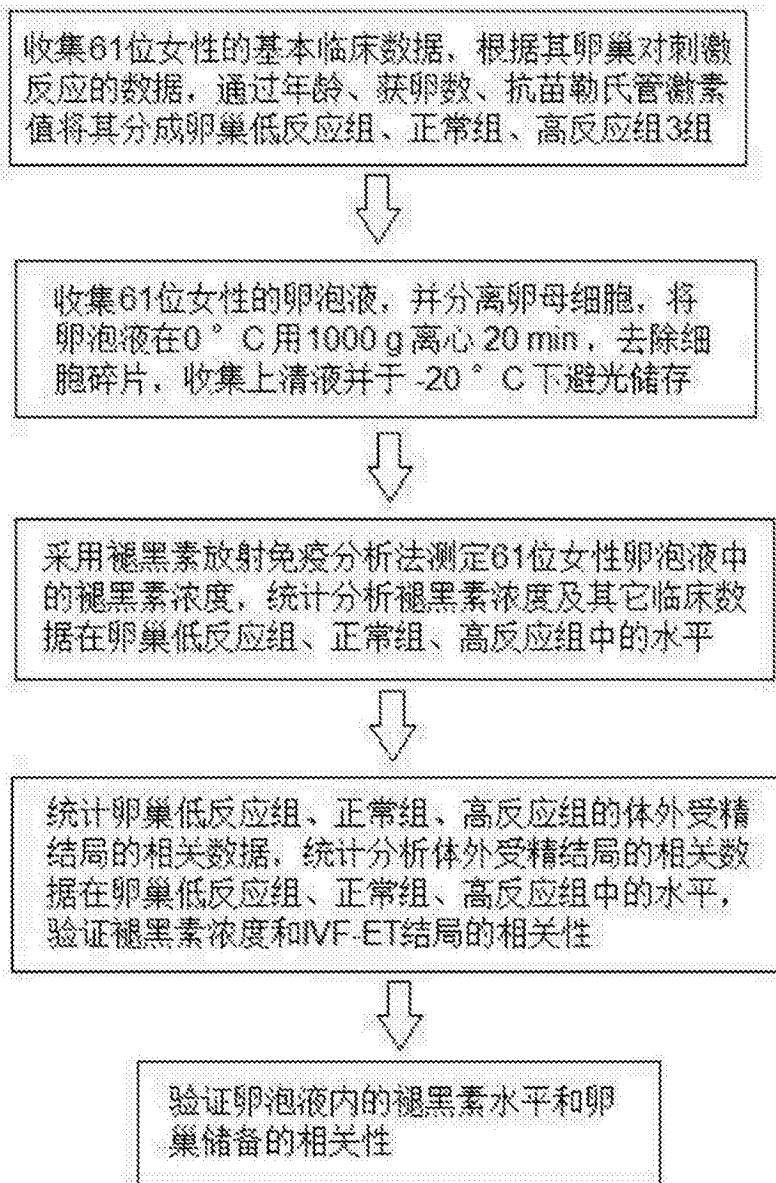


图1

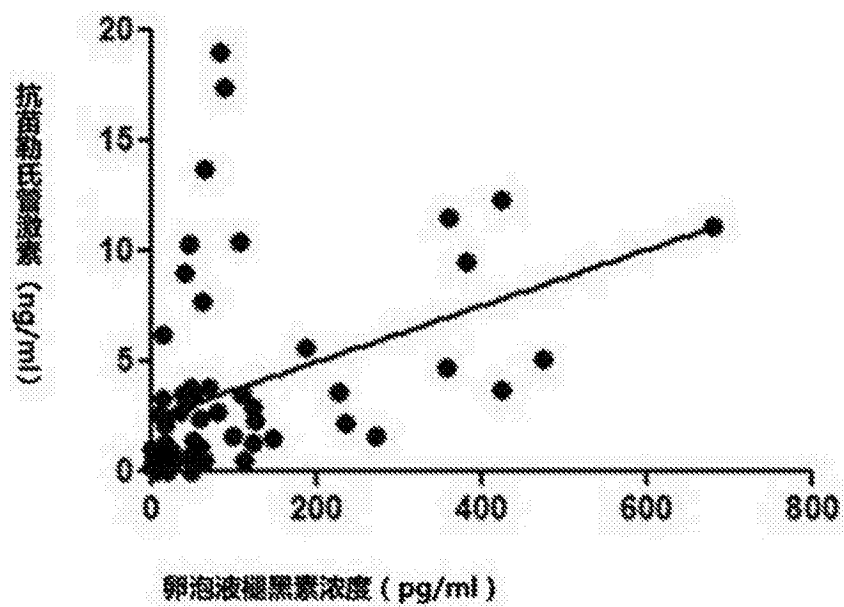


图2

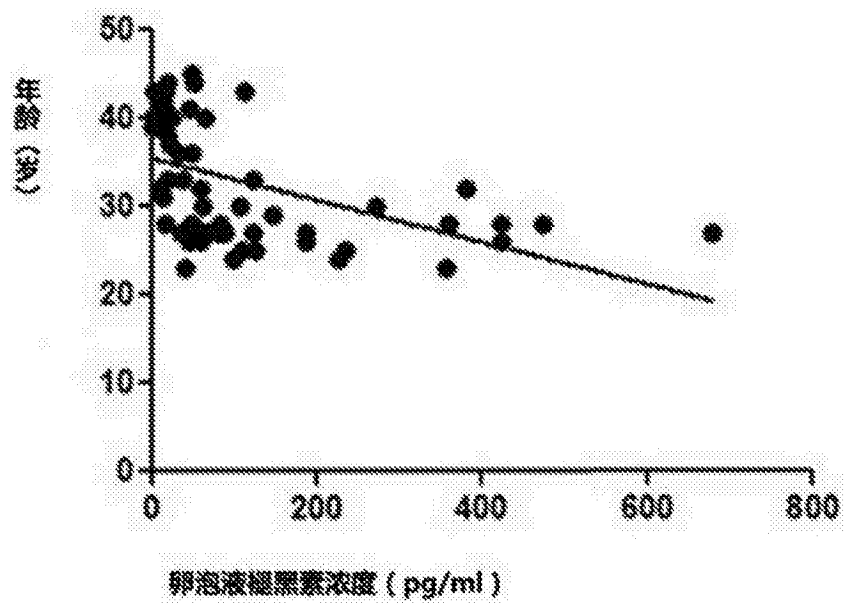


图3

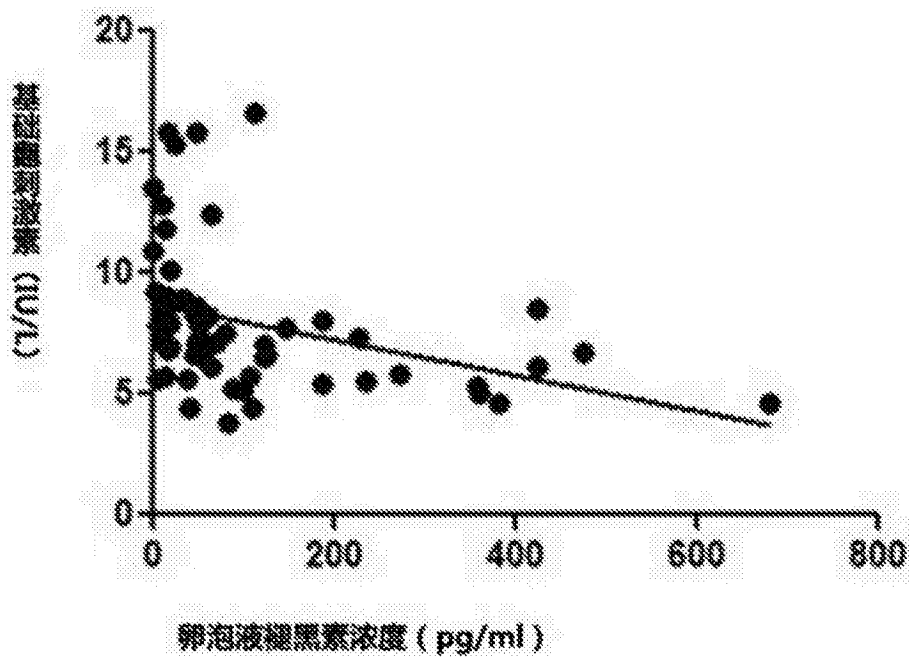


图4

专利名称(译)	褪黑素在预测卵巢储备、IVF-ET结局中作用的研究方法与应用		
公开(公告)号	CN106168621A	公开(公告)日	2016-11-30
申请号	CN201610576174.1	申请日	2016-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属仁济医院		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属仁济医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属仁济医院		
[标]发明人	张丛 童婧		
发明人	张丛 童婧		
IPC分类号	G01N33/53 A61B5/00		
CPC分类号	G01N33/5308 A61B5/4306 A61B5/4325		
代理人(译)	张维东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了褪黑素在预测卵巢储备、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局中作用的研究方法，包括：收集61位女性的基本临床数据，根据其卵巢对刺激反应，主要通过年龄、获卵数、抗苗勒氏管激素值将其分成卵巢低反应组、正常组、高反应组3组。收集61位女性的卵泡液，采用褪黑素放射免疫分析法测定61位女性卵泡液中的褪黑素浓度，分析褪黑素浓度及其它临床数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平；分析体外受精结局的相关数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平，验证褪黑素浓度和体外受精-胚胎移植结局的相关性；验证褪黑素水平和卵巢储备的相关性。本发明可通过检测卵泡液中的褪黑素浓度，预测卵巢储备以及体外受精-胚胎移植结局。

收集61位女性的基本临床数据，根据其卵巢对刺激反应的数据，通过年龄、获卵数、抗苗勒氏管激素值将其分成卵巢低反应组、正常组、高反应组3组



收集61位女性的卵泡液，并分离卵母细胞，将卵泡液在0 ° C用1000 g离心20 min，去除细胞碎片，收集上清液并于-20 ° C下避光储存



采用褪黑素放射免疫分析法测定61位女性卵泡液中的褪黑素浓度，统计分析褪黑素浓度及其它临床数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平



统计卵巢低反应组、正常组、高反应组的体外受精结局的相关数据，统计分析体外受精结局的相关数据在卵巢低反应组、正常组、高反应组中的水平，验证褪黑素浓度和IVF-ET结局的相关性



验证卵泡液内的褪黑素水平和卵巢储备的相关性