

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 探討接受不同荷爾蒙試管嬰兒療程的卵丘細胞中的 *
* 名稱 : OHSS 相關基因表現與臨床表徵的關聯性 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳凱琪

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-026-B

研究期間： 105 年 07 月 01 日至 106 年 02 月 28 日止，計 8 個月

指導教授： 曾淑玲

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學研究所

中華民國

106 年 03 月 31 日

一、 摘要

隨著現代人的生活趨勢改變，無論是後天性或先天性不孕患者也日益漸增。醫學上對於不孕症患者的治療多伴隨排卵刺激，給予患者服用或是注射促性腺激素釋放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、人類絨毛膜性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin, hCG)使它能夠讓促進黃體生成激素(Luteinizing hormone, LH)、促濾泡激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)的分泌讓濾泡發育成熟。但也因過量的排卵藥刺激卵巢容易產生卵巢過度症候群(Ovarian Hyperstimulation Syndrome, OHSS)症狀。但目前對 OHSS 的調控機轉還不清楚，許多學者推測這可能是與體內的荷爾蒙有關。

在人類顆粒細胞中，VEGF、inhibin β 、CYP19A1、CYP11A1 及 HSD3B 的基因表現已被證實與在排卵所觸發的 OHSS 有顯著的影響；另外，在類固醇荷爾蒙的生物合成中，STAR 扮演著關鍵的影響因子；在表皮生長因子家族中，AREG、EREG、EGFR 都被證實與 LH、FSH 荷爾蒙有著相互作用，其中 AREG、EREG 被證實是 LH 的目標基因影響著卵丘細胞的增生與卵母細胞的成熟，EGFR 的轉活化是 FSHR 作為訊號傳遞的重要機制。而卵巢對 FSH、LH 的反應取決於 FSHR 及 LHCGR 的表現型，FSHR 與 LHCGR 的表現量皆會影響著卵母細胞的成熟及黃體的發育。

但在人類卵丘細胞(Cumulus cells, CCs)的研究鮮少，因為卵丘與卵母細胞在卵子成熟過程中關係密不可分。因此我們與中山醫學大學附設醫院生殖醫學中心合作，招募接受試管嬰兒療程的婦女，收集了 45 個卵丘細胞且成功萃取 RNA，並反轉成 cDNA，利用定量即時聚合酶鏈鎖反應(QPCR)檢測其 VEGF、inhibin β 、CYP11A1、CYP19A1、STAR、HSD3B1、FSHR、LHCGR、AREG、EREG、EGFR 等 11 個基因，發現在顆粒細胞中表現的 OHSS 相關基因也會在卵丘細胞中表現，並將結果依有無 OHSS 症狀分成兩組分別做比對，發現在有 OHSS 現象組的 inhibin β 和 AREG 的表現量明顯較低，且這些有 OHSS 現象的患者多數為 32-34 歲；接著，我們再依年齡分成小於 35 歲非高齡組及大於等於 35 歲高齡組，觀察年齡與 OHSS 基因間的關係，發現除了 FSHR 會隨著年齡增長而隨之增加外，其餘基因皆無顯著的差異；最後依照患者受精卵著床成功與否與 OHSS 基因表現作分析，發現並無相關基因影響著受精卵的成功與否。

綜合上述，我們首先證實在人類卵丘細胞中也有 OHSS 相關基因的表現，其中 inhibin β 和 AREG 在卵丘細胞中的研究發現有別於先前文獻中所提顆粒細胞的結果，因此推論這些基因的活性在卵丘細胞中可能扮演著不同以往在其他細胞模組中，如人類顆粒細胞中所認知的調控角色，需待我們進一步研究釐清。

二、 研究動機與研究問題

隨著現代人的生活趨勢改變，人們對於婚姻的價值觀念和以往有所不同，導致現代男女對於婚姻的需求降低，造成晚婚現象，隨之牽連以致於女性的生產年

齡往後，越來越多高齡產婦尋求生殖問題。根據統計，民國 102 年婦女第一胎平均生育年齡延後為 30.4 歲，遲育趨勢相當明顯。因此呈現不孕或想生育卻無法生育的問題。根據統計也可知道，年齡超過 35 歲的婦女，懷孕能力明顯下降。現代夫婦遲育造成的不孕，是導致現今少子化所面臨的一大問題。因此，不孕症也是現今夫婦迫切需要解決的重要課題。

這些遲育夫婦為了解決不孕問題，最常見的就是尋求試管嬰兒療程。但試管嬰兒只是在體外讓精子、卵子結合成受精卵，最終還是要將體外受精卵送至婦女子宮內成功著床，才是完整的受孕。良好的子宮受孕環境是需要促濾泡激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH)、促進黃體生成激素 (Luteinizing hormone, LH)、抗穆勒氏賀爾蒙 (Anti-Mullerian Hormone, AMH) 等許多荷爾蒙調控的。在臨床上可以用抗穆勒氏賀爾蒙 (Anti-Mullerian Hormone, AMH) 的濃度來區別症患者接受試管嬰兒療程時，卵巢反應是否正常或過度的指標。根據先前研究指出，高濃度的 AMH 患者接受試管嬰兒療程時容易發生卵巢過度症候群 (Ovarian Hyperstimulation Syndrome, OHSS)，造成試管嬰兒療程的受精卵在母體內的著床、胚胎品質有影響。

因此本研究與中山醫學大學附設醫院生殖醫學中心合作，收集 61 個不同荷爾蒙治療的試管嬰兒療程的卵丘細胞，進一步探討接受不同荷爾蒙治療患者的卵丘細胞中，其 OHSS 相關基因表現的差異，釐清 OHSS 發生的可能調控機轉並分析這些基因的表現與試管嬰兒療程之胚胎品質關係，作為在醫學上用來有效評估患者接受試管嬰兒療程狀況，希望未來能夠降低或改善卵巢過度刺激症候群的發生及提高受孕成功率。

三、 文獻回顧與探討

依據國民健康署 101 年人工生殖施行結果分析報告資料顯示，不孕原因以女性輸卵管因素以外之其他女性因素所佔的比例 38.0% 為最高，包含排卵功能異常、荷爾蒙失調等。因此常見的不孕症婦女的治療方式之一就是給患者服用、注射 GnRH 或 hCG 使它能夠促進 LH、FSH 荷爾蒙的分泌讓濾泡發育成熟，有助於卵子成熟完成排卵的動作。OHSS 是指不孕症婦女使用排卵藥，如 hCG 時，卵巢受藥物刺激後反應太過強烈引起的相關併發症，依其卵巢大小、胸腹腔積水情形作分級，輕度 OHSS 症狀：肚子脹、下腹痛、噁心、嘔吐、瀉肚子、卵巢腫大(5-12 公分)；中度 OHSS 症狀：上述症狀加上超音波下有腹水；重度 OHSS 症狀：中度症狀加上腹水、肋膜腔積水、呼吸困難或呼吸喘、血液流量改變、血凝功能異常等，嚴重者導致腎功能受損。常見好發於多囊性卵巢症候群患者。雖然一般醫師認為若有 OHSS 的產生，表示排卵的狀況良好，可能受孕率還會稍微提高；但對患者身體健康而言，卻是個潛在的威脅。

目前對 OHSS 的調控機轉還不清楚，許多學者推測這可能是與體內的荷爾蒙有關，如：AMH。AMH 在臨床上可做為卵巢功能的評估指標之一，AMH 一直以來扮演著胎兒性別發育的重要角色，現在更發現在人體細胞中，只有卵巢中的

顆粒細胞才會分泌 AMH，而且只有較小的濾泡才會分泌 AMH[1]，因此可藉由偵測血液中 AMH 的量，做為評估卵巢庫存水位的指標。經研究發現，AMH 的濃度在青春期時達到最高峰，之後則是逐年下降，且進入更年期後濃度幾乎測不到[2]。在 PCOS 患者中，由於腦下垂體分泌較多 LH，進而引發較多的小濾泡生長，這些小濾泡產生較多的 AMH[3]，而過多的 AMH 反而會抑制 FSH 對於濾泡生長的促進作用，使卵巢囊濾泡無法進行到排卵階段。

根據文獻報導，VEGF-mRNA 會存在於人類黃體顆粒細胞，且 VEGF 可以促進人類黃體的部分血管生成[4]。而 VEGF 在 OHSS 症狀中扮演重要的角色，卵巢被 hCG 刺激後，會產生大量的 VEGF 及 VEGFR，這些大量的 VEGF 釋放並結合卵巢血管內皮系統上的 VEGFR，導致血管通透性增加，使得血管內液體滲漏至腹腔導致腹水等症狀[5, 6]。inhibin B 屬於 TGF- β (轉化生長因子- β)的家族成員之一，inhibin B 複合物會抑制來自腦下垂體的 FSH 賀爾蒙分泌。有研究指出，在給予 hCG 治療前，inhibin B 的量的增減可以做為 OHSS 的預測因子，而 inhibin A 則是在 OHSS 疾病發生後作為監測疾病的觀察因子[7]，也有研究指出，PCOS 患者血清中 AMH 及 Inhibin 的水平會隨著 PCOS 患者卵巢反應的增加而有顯著的增加[8]。

在生物體中，許多生化反應所依靠的是受質與受體的結合而產生的一系列訊號途徑，在人類的卵子發育、排卵系統中，亦是如此。根據報導指出，FSHR 是濾泡刺激激素的受體和調節性腺發育的功能，卵巢對 FSH 的反應取決於 FSHR 的表現型[9]，FSHR 的突變早成失去活性可能導致不孕或卵巢早衰，且施打外源性 FSH 激活 FSHR 功能則易造成 OHSS 的發生[10]；此外，LHCGR 為促黃體激素和絨毛膜促性腺激素的受體，能與 LH 及 hCG 相互作用，LHCGR 的表現水平多寡會影響著卵母細胞的成熟、黃體的發育及排卵[provided by RefSeq, Jul 2008]。在表皮生長因子家族中，AREG、EREG、EGFR 都被證實與 LH、FSH 荷爾蒙有著相互作用，在女性生理週期中，LH 量的波動在黃體形成中起著重要的作用，且 LH 有關的目標基因有一系列的 EGF-like ligands，如：AREG、EREG 啟始一些由 LH 所觸發的型態、生化反應發生，如：卵丘細胞的增生和卵母細胞的成熟[11, 12]；另外，EGFR 的轉活化在目標細胞中也與 FSH 的訊號傳遞有著重要的關聯，且也有研究證實，EGFR 的轉活化是 FSHR 作為訊號傳遞的重要機制[13]。

此外，在生物體內許多生理機制是由各種固醇類荷爾蒙，如：雌二醇、孕酮素……等相互作用調節的，固醇類荷爾蒙也需要依靠不同的類固醇轉化酶在彼此間協助合成、轉化。其中已有文獻指出，孕酮素的形成依賴於類固醇生成基因的活化，如：STAR，為固醇類間最重要的轉換酶之一，在類固醇荷爾蒙合成第一步，膽固醇轉換成孕烯醇酮扮演重要的關鍵作用，且 STAR 蛋白允許膽固醇切割酶從外部粒線體膜進入內部粒線體膜將膽固醇切割成孕烯醇酮[14]；在 cytochrome P450 superfamily 中 CYP11A1 及 CYP19A1 與類固醇的生化合成息息相關，CYP11A1 與催化許多藥物代謝、類固醇及其他酯質的合成相關，CYP11A1 的蛋白質位於粒線體內膜，並且催化膽固醇轉化成類固醇激素合成中的重要元素

之一，孕烯醇酮[provided by RefSeq, Jul 2008]，CYP11A1 是所有類固醇中的上游原料，其多寡影響著女性的賀爾蒙、生理期的調節；雌二醇（Estradiol，E2）是卵巢分泌的類固醇激素。是主要的雌性激素，負責調節女性特徵、附屬性器官的成熟和月經-排卵周期，促進乳腺導管系統的產生。而負責調節 E2 的重要基因為 CYP19A1，其與催化許多藥物代謝、類固醇及其他酯質的合成相關，其表現位於內質網中並催化雌激素合成的最後步驟，將雄烯二酮轉化為對子宮內膜的形成重要的因子雌二醇[14]。孕酮素(progesterone，P4)，是一種女性荷爾、內源性類固醇和孕激素性激素，並且是在體內的主要孕激素，參與人類與其他動物的雌性月經週期，支援懷孕與胚胎形成。調節孕酮素重要的基因為 HSD3B1，HSD3B1 是一種雙功能酶，可以催化 Delta(5)-ene-3-beta-hydroxy 基類固醇和酮類固醇的轉化。HSD3B1 酶在所有類別的賀爾蒙類固醇的生物合成中起關鍵作用，並且有效地催化孕烯醇酮轉化為孕酮素[provided by RefSeq, Jun 2016]。

其中在人類顆粒細胞中，VEGF、inhibin β 、CYP19A1、CYP11A1 及 HSD3B 的基因表現已被證實與在排卵所觸發的 OHSS 有顯著的影響[14]。血管內皮生長因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是對血管內皮細胞具有特異性的肝素結合生長因子（heparin-binding growth factor），可在體內誘導血管新生。VEGF-mRNA 會存在於人類黃體顆粒細胞，且 VEGF 可以促進人類黃體的部分血管生成[4]。而 VEGF 在 OHSS 症狀中扮演重要的角色，卵巢被 hCG 刺激後，會產生大量的 VEGF 及 VEGFR，這些大量的 VEGF 釋放並結合卵巢血管內皮系統上的 VEGFR，導致血管通透性增加，使得血管內液體滲漏至腹腔導致腹水等症狀[5]。另外在接受 GnRH agonist 治療的患者在取卵手術時，顆粒細胞(granulosa cell)中的類固醇合成相關基因，如 CYP11A1、CYP19A1、VEGF 及 HSD3B 的表現量會有效的降低。在 GnRH agonist 組中，VEGF、inhibin β 的低表現量可以解釋早期 OHSS 預防的機制[4]。而在齧齒動物中也可證實 VEGF 和 VEGFR-2 的 mRNA 會在卵巢受刺激後增加其表現量[6]，且經過 GnRH 治療後，VEGF 的表現量會有效的降低[15]。但在人類的卵丘細胞中，尚未有實驗證實 OHSS 相關基因的表現關係。

卵丘細胞(Cumulus cells，CCs)，是屬於顆粒細胞的一部分，在卵子成熟的過程中，卵丘細胞會包覆在卵子的外圍形成卵丘卵母細胞複合體(Cumulus-Oocyte Complex，COC)，存在卵巢裡，在卵子成熟前包覆在卵子周圍。此外，為了研究卵子的品質與受精、懷孕的相關性，但女性在排卵時能產生的卵子數目鮮少，目前在臨床上受限於樣本得來不易，因此對於卵子的研究難以進行，因此為了能對卵子加以研究，我們找了一群最靠近卵子的周圍細胞 - 卵丘細胞的體積很小，通常會提供養分及保護發育中的卵子。在排卵的過程中，大腦的下視丘會釋放 LH、FSH 使卵丘細胞增生及產生黏液的過程[16, 17]，稱為卵丘擴展(cumulus expansion)，在卵子排出後有時還會黏在卵子表面。目前也有足夠的證據證明卵丘細胞的代謝能力對於卵子的發育能力是有影響的[18, 19]。已知的 OHSS 相關基因大多都是以顆粒細胞為模型或以老鼠、兔子的黃體細胞(corpus luteum)為研究，而在人類卵丘細胞的研究鮮少，尚未有實驗證實其 OHSS 相關

基因的表現關係。因此，本計畫目的希望藉由偵測不同荷爾蒙治療患者其卵丘細胞中 OHSS 相關基因的表現，作為接受試管嬰兒療程前的評估和預防 OHSS 症狀發生，及事後追蹤其胚胎發育成功率的指標。

四、 研究方法及步驟

1. 卵丘細胞來源及保存

與中山醫學大學附設醫院生殖醫學中心合作，通過中山醫大附設醫院醫學倫理審查(CS2-14033)，招募接受試管嬰兒療程的婦女，知情同意取得受試者同意書之後，在取卵手術過程中收集卵丘細胞。將取下的卵丘細胞加入 1000ul PBS，以 4°C 500 g 離心 15 分鐘，重複兩次；去除 PBS 後，加入 500ul Trizol 混合均勻，於-20°C 冰箱內保存。

2. RNA 抽取

將保存於-20°C 冰箱內的卵丘細胞樣本解凍，混合均勻，以 4°C 12000rpm 離心 15 分鐘；抽取上清液加入 40ul BCP，用手劇烈搖晃混合，此時呈現乳白色，靜置冰上 5 分鐘，以 4°C 12000rpm 離心 15 分鐘；此時呈現分層三層，取最上層上清液加入取最上層上清液加入 0.8 倍樣品體積的無水酒精，移至上面放有 RB Column 之 2c.c 離心管後離心 12000rpm 90 秒，並去除下方廢液；加入 400µl 之 RPE Buffer 至 Column 中後離心 12000rpm 1 分鐘，並去除下方廢液；加入 50ul DNase 1 加入至 Column 中並室溫反應 15 分鐘，並去除下方廢液；加入 400µl 之 RW1 Buffer 至 Column 中後離心 12000rpm 1 分鐘，並去除下方廢液；加入 600µl 之 RPE Buffer 至 Column 中後離心 12000rpm 1 分鐘重複 2 次，並去除下方廢液；air dry 3 分鐘，最後將 Column 移至新的離心管並加入 25µl RNase-free Water 至 RB Column 中，靜置 3 分鐘，離心 12000rpm 1 分 30 秒鐘，得到純化 RNA。

3. cDNA 製備

將溶在 DEPC 水中的 RNA 加入 oligo dT、dNTP 加熱 60°C 5 分鐘，馬上置於冰上；加入 RT buffer、DEPC 水混合後，置於 37°C 環境反應 2 分鐘，馬上置於冰上；加入 reverse transcriptase、DEPC 水混合後，至於 37°C 環境反應 70 分鐘，再加熱 70°C 15 分鐘，即可獲得 cDNA。

4. 聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase chain reaction)

取 cDNA 於微量離心管中，分別加入設計好的 primer、緩衝液、dNTP、DNA polymerase，再置於聚合酶連鎖反應機器中反應，可獲得大量的 DNA 產物，並以 2% agarose gel 進行 DNA 電泳及 nucleic acid stain 染色方式偵測基因的表現強度。

5. 定量即時聚合酶連鎖反應(QPCR, Quantitative real time polymerase chain reaction)

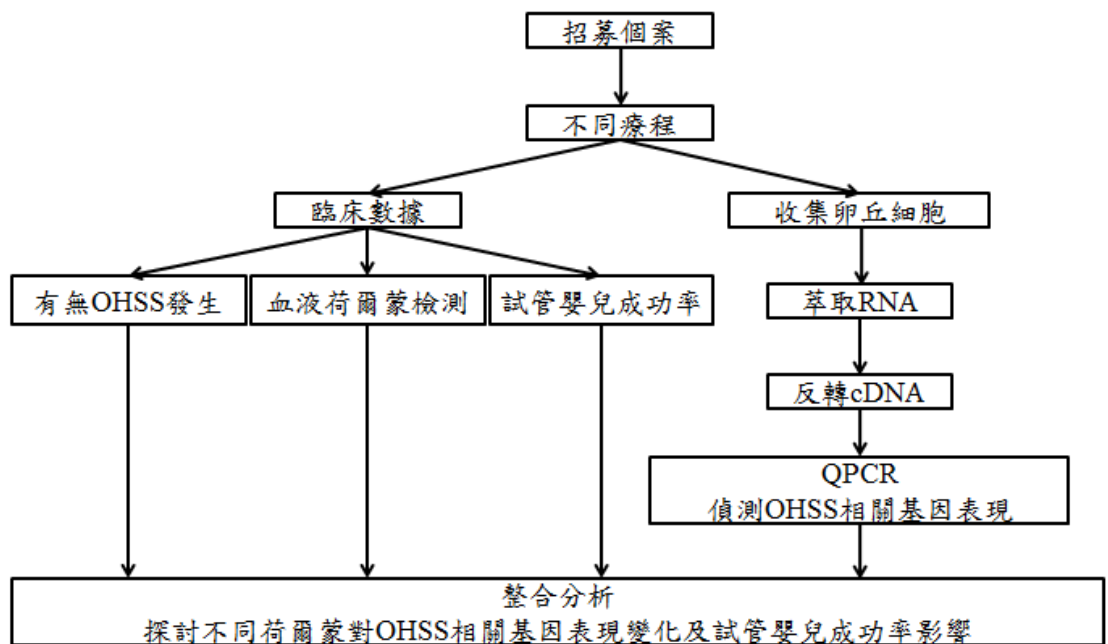
取 cDNA 於為量離心管中，分別加入設計好的 primer (表一)、SYBR

Green(Applied Biosystems™)混合均勻，再置於定量即時聚合酶鏈鎖反應機器(ABI Step One Plus)中反應 95°C 10 分鐘 → 95°C 15 秒、60°C 1 分鐘(持續 40 個循環) → 95°C 15 秒 → 60°C 1 分鐘 → 95°C 15 秒，可獲得大量的 DNA 產物，即可定量數據，進行 T test 分析。

6. 統計分析(T Test)

用於兩個平均值差異程度的檢驗方法。它是用 T 分佈理論來推斷差異發生的概率，從而判定兩個平均數的差異是否顯著，定義 $p < 0.05$ 具有顯著差異。

7. 實驗流程：



表一 偵測 OHSS 相關基因訊息 RNA 表現所用的引子對

Gene	Sequences	Size	Accession Number
VEGF	sense 5'- TGGGCCTTGCTCAGAGCGGA antisense 5'- GCTCACCGCCTCGGCTTGTC	150	NM_001025366.2
Inhibin β	sense 5'- GCGCGTTTCCGAAATCATCA antisense 5'- TTCTGGTTGCCTTCGTTGGA	96	NM_002193.2
FSHR	sense 5'- GGTGCATTTTCAGGATTTGG antisense 5'- TTGGGAAGGTTGGAGAACAC	98	NM_000145.2
LHCGR	sense 5'- TGGAGAAGATGCACAATGGA antisense 5'- GGCAATTAGCCTCTGAATGG	122	NM_000233.3
AREG	sense 5'- AGCCGACTATGACTACTCAG antisense 5'-CTTAACTACCTGTTCAACTCTGAC	94	NM_001657
EREG	sense 5'- AATGGCTATTGTTGCATGG antisense 5'- CTAAAGGTTGGTGGACGGT	128	NM_001432.2
EGFR	sense 5'- GCCTCCAGAGGATGTTCAAT antisense 5'- GACATAACCAGCCACCTCCT	119	NM_005228.3
STAR	sense 5'- ATCAAGCTGTGCGCTGGGAGC antisense 5'- TGGCCATCACAGCCTGTTGCC	77	NM_000349.2
HSD3B1	sense 5'- AAGCCGATTCCTTTCTGCTA antisense 5'- GCCACATTGCCAACATAGAC	108	NM_000862.2
CYP11A1	sense 5'- TGGGTCGCCTATCACCAGTAT antisense 5'- CCACCCGGTCTTTCTTCCA	82	NM_000781.2
CYP19A1	sense 5'- TGCAAAGCACCCCTAATGTTG antisense 5'- TGGTACCGCATGCTCTCATA	135	NM_000103.3

五、 研究目標

根據本此科技部大專生專題研究計畫，我們對「探討接受不同荷爾蒙試管嬰兒療程的卵丘細胞中的 OHSS 基因表現與臨床表徵的關聯性提」提出三個研究目標，如下：

1. 在顆粒細胞中被證實的 OHSS 相關基因表現是否也會在卵丘細胞表現？
2. 卵丘細胞中的 OHSS 相關基因表現與不同荷爾蒙療程，以及 OHSS 的發生是否有相關性？
3. 卵丘細胞中的 OHSS 相關基因表現是否與卵子的發育成功或受精卵著床成功率有相關性？

六、 研究結果

(一)樣本收集狀況

(1) 目前本實驗和中山醫學大學附設醫院生殖醫學中心合作，截至 2017 年 3 月 11 日止已收集了 61 個進行試管嬰兒療程女性患者的卵丘細胞，已將 61 個樣本反轉 cDNA 完畢，排除個案數包括 RNA 萃取失敗或無法對應臨床病例者共 16 個，最後確定收案數共 45 個進行實驗結果與臨床數據分析 (表二)。

表二 截至 2017 年 3 月 11 日止收集的樣本數量及已反轉 cDNA 的樣本數。

項目	已收集個案數(個)	排除個案數(個)	確定收案數(個)
臨床檢體卵丘細胞	61	16	45

(2) 我們將確定收案的 45 位女性患者之臨床資料進行分析，身高介於 151cm 至 170cm，平均身高 160.3cm，中位數 160cm；體重介於 44kg 至 95kg，體重平均 57.9kg，中位數 57kg；BMI 位於 17.19 至 34.89，BMI 平均 22.54，中位數 21.76；年齡介於 26 歲至 43 歲間，平均年齡 35.02 歲，中位數 35 歲(表三 A)。在臨床治療上分有三種療程，Elonva 療程屬於 GnRH antagonist 類型，Meruper 療程屬於 GnRH agonist，Letrozol 療程為短期刺激療程，其中接受 Elonva 治療有 42 人，Meruper 治療有 2 人，Letrozole 治療有 1 人(表三 B)。其中治療後未產生 OHSS 現象有 37 人 (88.1%)，產生 OHSS 現象者有 5 人(11.9%)(表三 C)；在療程中，進行植入受精卵且成功著床的有 14 人(31.11%)，進行植入受精卵但未著床成功的有 20 人(44.44%)，未進行植入受精卵的有 10 人，另有 1 人中斷療程無進行後續追蹤(表三 D)。

表三 確定收案之 45 名患者的臨床資料特性分析

A

項目	最低值	最高值	平均	中位數
身高(cm)	151	170	160.3	160
體重(KG)	44	95	57.9	57
BMI(KG/(cm/100) ²)	17.19	34.89	22.54	21.76
年齡(歲)	26	43	35.02	35

B

項目	Elonva	Meruper	Letrozole
臨床治療(人)	42	2	1

C

項目	negative	positive
OHSS 現象(人)	37 (88.1%)	5(11.9%)

D

項目	植入且著床	植入但未著床	未植入受精卵	中斷療程
植入受精卵(人)	14(31.11%)	20(44.44%)	10	1

(二)在顆粒細胞中被證實的 OHSS 相關基因也會在卵丘細胞中表現

為了探討卵丘細胞中是否會表現 OHSS 相關基因，我們將臨床檢體卵丘細胞萃取 RNA 在反轉成 cDNA，利用 QPCR 進行基因檢測，發現在 Haas, J., et al.研究的顆粒細胞中被證實與 OHSS 相關的基因，如：VEGF、inhibin β 、CYP19A1、CYP11A1 及 HSD3B，這些基因在我們的研究中也被證實會在卵丘細胞中表現。雖然從 QPCR 數據中可以發現有些基因在個案中是未偵測到的，但能確定的是其 actin 是有表現的，且所有結果都進行 2 次以上的實驗所應證，因此可以知道為該樣本本身不表現其基因，但在普遍卵丘細胞中，這些 OHSS 相關基因是存在於卵丘細胞中且會被表現的。

(三)卵丘細胞中的 OHSS 相關基因表現與不同荷爾蒙療程，以及 OHSS 的發生是否有相關性

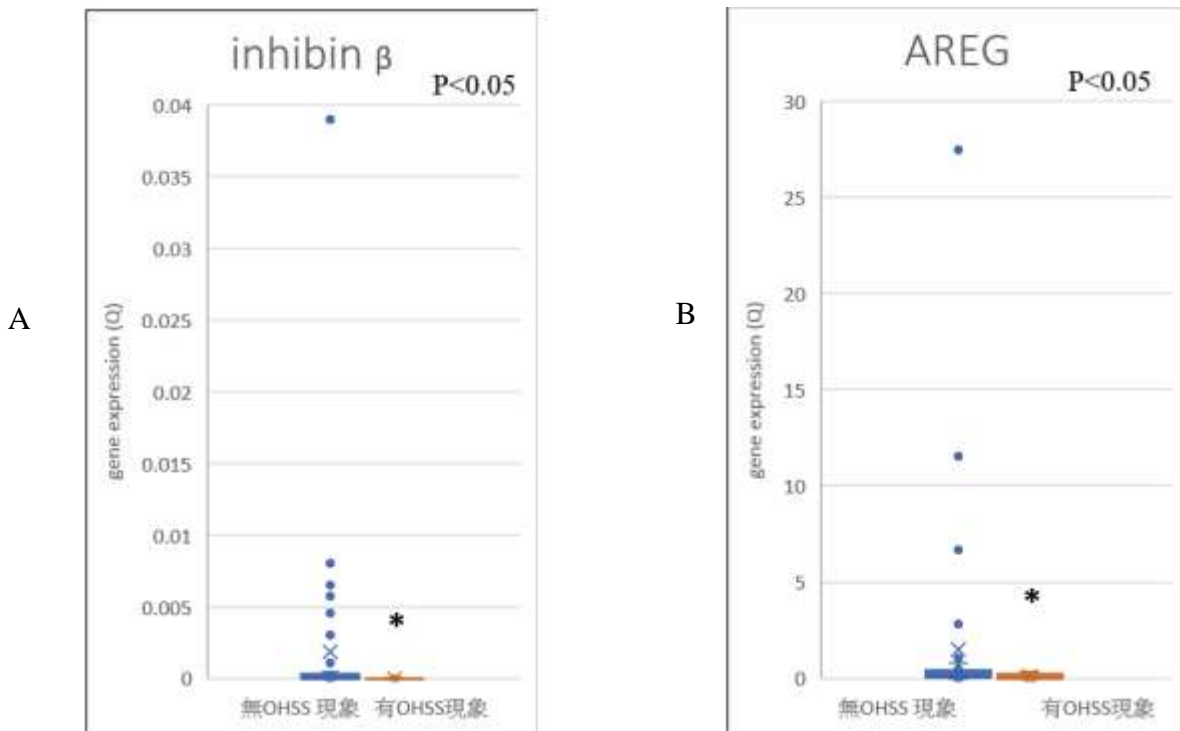
- (1) 目前收案的這 45 個樣本中，受 Elonva 治療有 42 人，Meruper 治療有 2 人，Letrozole 治療有 1 人，因臨床用藥取決於醫師評估患者本身狀況後所給予治療，在目前的收案中，可知接受 Elonva 以外的不同療程個案只有 1~2 個，因此無法對卵丘細胞的 OHSS 基因表現與不同荷爾蒙療程進行分析。
- (2) 即使如此，我們將收案的 45 個樣本依照 OHSS 發生的有無分成「無產生 OHSS」及「有產生 OHSS」兩群組，觀察 OHSS 發生與基因間的關

係(表四)，可以發現相較於無產生 OHSS 組而言，有產生 OHSS 組的 inhibin β 及 AREG 兩基因表現量較低(圖一)，且有顯著差異具統計意義 ($p < 0.05$)，並可發現有產生 OHSS 現象的患者多為 32 歲至 34 歲年輕女性(表五)。

- (3) 另外，根據前面結果發現 OHSS 現象與年齡較低的女性相關，根據統計，年齡超過 35 歲的婦女，懷孕能力明顯下降，因此我們將這 45 個樣本依照衛生福利部定義高齡產婦年齡以 35 歲為界線做分群，小於 35 歲者為「非高齡組」，大於等於 35 歲者為「高齡組」，觀察年齡與 OHSS 基因表現關係(表六)，可以發現相較於非高齡組，高齡組中 FSHR 的表現量較高且有顯著差異(圖二)，因此可以知道年齡越高其 FSHR 活性也隨之增高的趨勢。

表四 依 OHSS 現象發生有無將 45 個樣本分群，計數各基因在各組間的表現量。

Gene	VEGF	Inhibin β	FSHR	LHCGR	AREG	EREG	EGFR	STAR	HSD3B1	CYP11A1	CYP19A1
無 OHSS 現象	範圍	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
	中位數	0.00349	0.03898	5.71583	3.41580	27.44071	3.63721	0.36852	4.02447	20.14878	850.48022
有 OHSS 現象	範圍	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00038	0.00000	0.00000
	中位數	0.00228	0.00002	6.15943	0.71357	0.38204	0.00315	0.00008	1.08925	1.32999	30.59744
P value	0.44464	0.03992*	0.26186	0.36761	0.03533*	0.1195	0.14701	0.36759	0.19878	0.21195	0.12083



圖一 無 OHSS 現象及有 OHSS 現象兩組的卵丘細胞個案進行 QPCR 之結果。

(A) 將卵丘細胞之 cDNA 進行 QPCR 偵測 actin 及 inhibin β 基因表現，計算

所偵測到的基因之 Cycle Threshold (CT)值，以 actin 的 CT 值當作組間控制組算出 ΔCT ，並計算其基因表現量 $2^{(-\Delta CT)}$ ，得到 inhibin β 的 Quantification(Q)值進行統計分析群組間的分布現象。(B)將卵丘細胞之 cDNA 進行 QPCR 偵測 actin 及 AREG 基因表現，計算所偵測到的基因之 Cycle Threshold (CT)值，以 actin 的 CT 值當作組間控制組算出 ΔCT ，並計算其基因表現量 $2^{(-\Delta CT)}$ ，得到 AREG 的 Quantification(Q)值進行統計分析群組間的分布現象。所有的實驗接重複進行 2 次以上， $n>2$ 。
*表示 $p<0.05$ 。

表五 將年齡、排卵刺激種類、受精卵著床與否分別計數 OHSS 有無發生的個數。

		OHSS	
		0	1
		Count	Count
年齡	26	1	0
	29	1	0
	30	2	0
	31	1	0
	32	4	2
	33	6	1
	34	2	1
	35	6	0
	36	2	0
	37	4	1
	38	5	0
	39	2	0
	40	1	0
	42	2	0
	43	1	0
排卵刺激	1	37	5
	2	2	0
	3	1	0
受精卵著床	A	1	0
	0	8	2
	1	12	2
	2	19	1

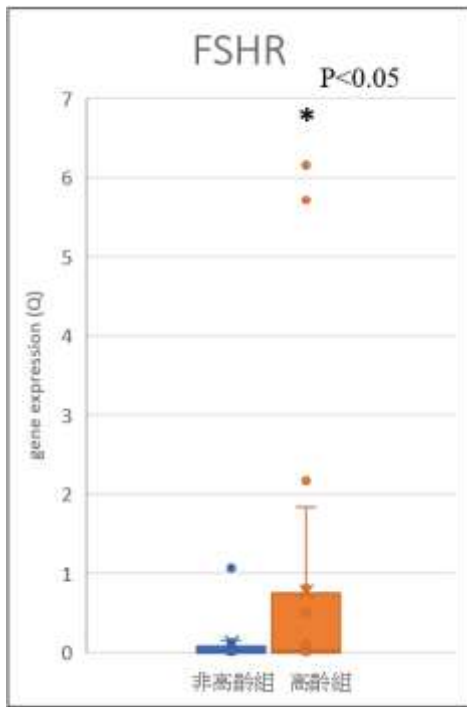
OHSS：0 表示無 OHSS 發生，1 表示有 OHSS 發生

排卵刺激：1 表示 Elonva 療程，2 表示 Meruper 療程，3 表示 Letiozole 療程

受精卵著床：A 表示無記錄，0 表示未植入，1 表示植入後懷孕，2 表示植入後未懷孕。

表六 依年齡現象發生有無將 45 個樣本分群，計數各基因在各組間的表現量。

Gene	VEGF	Inhibin β	FSHR	LHCGR	AREG	EREG	EGFR	STAR	HSD3B1	CYP11A1	CYP19A1
非高齡 <35 歲	範圍	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	中位數	0.00349	0.03897	1.10989	3.41579	11.52869	0.03188	0.15764	1.24667	20.14878	30.59743
高齡 ≥ 35	範圍	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00008	0.00000	0.00000
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	中位數	0.00288	0.00456	6.15943	1.92066	27.44071	3.63721	0.36852	4.02446	10.23791	850.48021
P value	0.12369	0.09265	0.04222*	0.46594	0.48527	0.13090	0.16179	0.20763	0.39867	0.14813	0.20575



圖二 依 35 歲為界，分為 <35 歲非高齡組， ≥ 35 歲高齡組兩組的卵丘細胞個案進行 QPCR 之結果。

將卵丘細胞之 cDNA 進行 QPCR 偵測 actin 及 FSHR 基因表現，計算所偵測到的基因之 Cycle Threshold (CT) 值，以 actin 的 CT 值當作組間控制組算出 ΔCT ，並計算其基因表現量 $2^{-(\Delta CT)}$ ，得到 FSHR 的 Quantification (Q) 值進行統計分析群組間的分布現象。所有的實驗接重複進行 2 次以上， $n > 2$ 。* 表示 $p < 0.05$ 。

(四) 卵丘細胞中的 OHSS 相關基因表現是否與卵子的發育成功或受精卵著床成功率有相關性

收集的 45 個個案中，進行植入受精卵且成功著床的有 14 人 (31.11%)，進行植入受精卵但未成功著床的有 20 人 (44.44%)，將這兩組患者進行觀察受精卵著床成功與否與 OHSS 基因表現關係，可以發現在這 11 個基因中並沒有顯著的統計意義 (表七)。

表七 依受精卵著床與否將 45 個樣本分群，計數各基因在各組間的表現量。

Gene 表現 (Q 值)		VEGF	Inhibin β	FSHR	LHCGR	AREG	EREG	EGFR	STAR	HSD3B1	CYP11A1	CYP19A1
無著床	範圍	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000-	0.00410	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	中位數	0.00096	0.03898	5.71583	1.92067	27.44071	3.63721	0.36852	4.02447	10.23792	850.48022	0.01265
有著床	範圍	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00050	0.00000	0.00000
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	中位數	0.00349	0.00330	1.07094	3.41580	0.36341	0.09470	0.00348	1.08925	20.14878	30.59744	0.11617
P value		0.13685	0.17895	0.12444	0.31140	0.06194	0.16595	0.16409	0.27167	0.25847	0.17765	0.20164

七、 討論

在我們的研究中，發現在顆粒細胞中表現的 OHSS 相關基因也會在卵丘細胞中表現，並且在 OHSS 患者的卵丘細胞中，inhibin β 和 AREG 的表現與 OHSS 的發生呈現負相關；另外，從年齡分布可以發現 OHSS 患者多為非高齡產婦族群(平均年齡 33.6 歲)，但在 OHSS 相關基因與年齡間並沒有發現任何顯著關聯性。

在先前研究中發現將 OHSS 患者分成高反應與低反應兩組，其 inhibin A 及 inhibin β 都不能利用血清或濾泡液中的濃度作為獨立預測 OHSS 發生的因子[20]。另外在 Ulcova-Gallova, Z., et al.的研究中發現有 OHSS 症狀的患者在收集卵母細胞以及胚胎移植時，其血清中的 inhibin A 會明顯升高，inhibin β 僅在收集卵母細胞時有增加，但在濾泡液中的 inhibin A 及 inhibin β 是沒有統計學意義上的差異[21]。我們的研究顯示在卵丘細胞中，inhibin β 普遍都不表現，結果表明在排卵前之末期濾泡期 (ate follicular phase) 會逐漸下降，並在有 inhibin β 表現的個案中，可發現相較於 OHSS 現象群組，有 OHSS 現象之群組的 inhibin β 表現量明顯較低。另有文獻也指出，在利用 GnRH agonist 治療的女性患者顆粒細胞中，相較於 hCG 治療，其 inhibin β 有較低的表現量，可作為預防 OHSS 發生的重要關鍵[14]。有趣的是，我們的這次的研究有不同於先前研究的結果，這可以推測在卵丘細胞中，inhibin β 可能扮演著不同的調控角色，需有待進一步釐清。

有報導指出，LH 是透過刺激誘導 AREG、EREG 及 β -cellulin 這些表皮生長因子表達，來調控卵丘細胞的增長及卵母細胞的成熟[11, 12]，相較於外加 hCG 治療的 GnRH 組，其顆粒細胞中的 AREG 表現量有顯著升高[14]，因為 AREG 調控著卵丘細胞的擴增，因此也被證實 AREG 表現量高能提高卵子的發育品質[22]，使卵丘細胞有效保護、支持卵子生長。而在我們的研究中，AREG 的表現與受精卵著床與否並未顯示有相關性，因此我們推論，在卵丘細胞中 AREG 扮演的角色有別於顆粒細胞，這也需待我們後續進一步釐清。另外，在 Cheng, J.C., et al.文獻中提到，Sprouty2 (SPRY2) 是表皮生長因子在 ERK1/2 途徑中的重要內調因子，體外人工受精的 OHSS 患者顆粒細胞中 SPRY2 的表現量顯著升高，又證實 SPRY2 可有效調節減弱 AREG 誘導的 COX-2 和 PGE2 的表達 [23]，因此可以推論，顆粒細胞中的 AREG 表現越低其 OHSS 發生率越高。有趣的是，我們的實驗結果可以發現在 OHSS 患者中的卵丘細胞中，其 AREG 表現量相較於無 OHSS 患者來的低，與上述結果一致，因此我未來我們可以進一步詳細探討是否 AREG 在卵丘細胞中的調控路徑也與 SPRY2 相關以佐證本次實驗結果。

在我們預計探討的第二點「卵丘細胞中的 OHSS 相關基因表現與不同荷爾蒙療程，以及 OHSS 的發生是否有相關性」現有臨床資料大部分皆以 Elonva 療程為主，因病患的用藥治療取決於醫師對病患的身體狀況做評估而

選擇適當的藥劑，且受限於不同療程收集分布不均的情況(61 例中有 58 例為 Elonva)，因此暫時無法進行分析。未來將持續與院方合作並持續收集更多臨床檢體以累積不同療程的數量，以便後續能有更完整的數據做分析統整。另外，雖然目前實驗數據只有 inhibin β 及 AREG 的表現有顯著差異，但因我們的臨床樣本收案數只有 45 個樣本，數量需要再持續努力的收集，增加母體群集數以便進行更確實、據統計意義的結果分析。

八、 未來計畫

因目前受限於現有可分析的樣本數略少，因此計畫未來將持續與院方合作，收集臨床病人之卵丘細胞檢體，並進行個基因檢測，期望能達成原計畫目標 150 個樣本數。在臨床數據整合方面，也將多考量不同變數如：BMI 值、血清中 FSH 及 LH 等荷爾蒙濃度進行整合分析。

九、 參考文獻

1. Durlinger, A.L., et al., *Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary*. *Endocrinology*, 2002. **143**(3): p. 1076-84.
2. Kelsey, T.W., et al., *A Validated Model of Serum Anti-Mullerian Hormone from Conception to Menopause*. *PLoS ONE*, 2011
3. Bhide, P., et al., *Each small antral follicle in ovaries of women with polycystic ovary syndrome produces more antimullerian hormone than its counterpart in a normal ovary: an observational cross-sectional study*. *Fertil Steril*, 2015. **103**(2): p. 537-41.
4. Yan, Z., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. **77**(6): p. 1723-5.
5. McClure, N., et al., *Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome*. *Lancet*, 1994. **344**(8917): p. 235-6.
6. Soares, S.R., et al., *Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome*. *Hum Reprod Update*, 2008. **14**(4): p. 321-33.
7. Enskog, A., L. Nilsson, and M. Brannstrom, *Peripheral blood concentrations of inhibin B are elevated during gonadotrophin stimulation in patients who later develop ovarian OHSS and inhibin A concentrations are elevated after OHSS onset*. *Hum Reprod*, 2000. **15**(3): p. 532-8.
8. Zhang, F., et al., *Clinical value of serum anti-mullerian hormone and inhibin*

- B* in prediction of ovarian response in patients with polycystic ovary syndrome. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2017. **37**(1): p. 70-73.
9. Perez Mayorga, M., et al., *Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(9): p. 3365-9.
 10. Lussiana, C., et al., *Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene: clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene*. Obstet Gynecol Surv, 2008. **63**(12): p. 785-95.
 11. Conti, M., et al., *Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(4): p. 715-23.
 12. Park, J.Y., et al., *EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle*. Science, 2004. **303**(5658): p. 682-4.
 13. Cottom, J., et al., *Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7167-79.
 14. Haas, J., et al., *GnRH agonist vs. hCG for triggering of ovulation--differential effects on gene expression in human granulosa cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90359.
 15. Tong, X.M., et al., *Effects of gonadotropin-releasing hormone antagonists on the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(23): p. 2434-9.
 16. Liu, L., et al., *Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption*. Reprod Fertil Dev, 2013. **25**(3): p. 463-71.
 17. Eppig, J.J., *Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro*. J Exp Zool, 1979. **208**(1): p. 111-20.
 18. Sutton, M.L., R.B. Gilchrist, and J.G. Thompson, *Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(1): p. 35-48.
 19. Dunning, K.R., et al., *Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development*. Biol Reprod, 2010. **83**(6): p. 909-18.
 20. Moos, J., et al., *Comparison of follicular fluid and serum levels of Inhibin A and Inhibin B with calculated indices used as predictive markers of Ovarian Hyperstimulation Syndrome in IVF patients*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 86.

21. Ulcova-Gallova, Z., et al., *Hyperstimulation syndrome: the levels of inhibin A and B in sera and follicular fluids*. *Gynecol Endocrinol*, 2014. **30**(4): p. 298-301.
22. Humaidan, P., et al., *Levels of the epidermal growth factor-like peptide amphiregulin in follicular fluid reflect the mode of triggering ovulation: a comparison between gonadotrophin-releasing hormone agonist and urinary human chorionic gonadotrophin*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(6): p. 2034-8.
23. Cheng, J.C., et al., *hCG-induced Sprouty2 mediates amphiregulin-stimulated COX-2/PGE2 up-regulation in human granulosa cells: a potential mechanism for the OHSS*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 31675.