

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

評估人類顆粒細胞相關基因表現與胚胎發育之關聯性 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-018-
執行期間：97年08月01日至98年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李茂盛

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：黃梨香
博士後研究：鄭恩惠
其他-兼任助理人員：白依萍

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

中華民國 98年10月30日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

評估人類顆粒細胞相關基因表現與胚胎發育之關聯性

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC — 97 — 2314—B — 040 — 018

執行期間：97年 8 月 1 日至 98年 7 月 31 日

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：-

計畫參與人員：黃梨香、鄭恩惠、白依萍

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：：中山醫學大學

中 華 民 國 98 年 10 月 30 日

目錄

中文摘要及關鍵字	III
英文摘要及關鍵字	IV
報告內容	
一、前言	1
二、目的	1
三、文獻探討	1
四、研究方法	3
五、結果與討論(含結論與建議)	6
六、計畫成果自評部份	7
七、可供推廣之研發成果資料表	8
八、參考文獻	8
九、附表及附圖	10

中文摘要及關鍵詞(keywords)。

我們觀察不同年齡患者在進行常規試管嬰兒療程中，採集卵子周圍欲丟棄的卵泡周圍的顆粒細胞進行可能影響胚胎發育的激素受體基因，包括評估分裂期胚胎品質與這些受體基因的相關性。我們分別萃取端粒細胞的 DNA 及 RNA，以即時定量 PCR 分析基因表現量。我們發現 Progesterone 及 LH receptor 基因在顆粒細胞的相對表現量隨著年齡的增加而表現量降低，發育至第三天的胚胎品質與這三種激素受體的相關性 FSH receptor 及 LH receptor 在品質好的胚胎來源的卵子周邊的顆粒細胞表現量較低，progesterone receptor 則相反且呈現統計上之差異，在這些激素受體對卵子成熟度影響的分析則無顯著差異。端粒相對長度與進行試管嬰兒療程之婦女年齡及胚胎品質之比較，婦女的年紀大小與端粒長度呈現有統計意義的相關，表示我們可以婦女年齡來推斷濾泡細胞老化的情形，而在胚胎的品質良莠的評估，端粒長度在各個年齡層並無顯著差異。這些基因在高齡與年輕婦女表現量的差異期望可以提供臨床治療的參考。

關鍵詞(keywords)

顆粒細胞，端粒，激素受體

English Abstract and keywords

We have tested different gene expression of cumulus cells from advanced and young infertility women. Limited by sample size and physiology age, we cannot evaluate gene expression on cumulus for infertility women completely. In this study we inclusion criteria patients for treated in vitro fertilization (IVF). In order to evaluate the effects of cumulus cells on the quality of oocytes and embryos, we used real-time quantitative PCR to determine the levels of gene expression. We also test telomere length to evaluate the effect on real reproductive age of cumulus and embryo development. We test aging by telomere length and embryo development by LH receptor, FSH receptor, Progesterone receptor. We detect telomere length and gene expression of cumulus cells and analysis the relationship between these data and cleavage stage embryo development. There were positive relationship in women's age and telomere length, but no relative in embryo. Relative amount of LH receptor and FSH receptor gene expression were higher in young age group. Progesterone receptor was lower in young age group. We hope to our find can offer clinical doctors to select good embryos to improve embryo implantation rate.

Key Words: cumulus cells, telomere, hormone receptors

報告內容：

一、前言

篩選最是植入之胚胎以增加著床率並減少多胞胎率是目前生殖醫學所有臨床醫師努力的目標，如何開發出非侵入性的診斷，安全的篩選出好的胚胎標記以供臨床醫師實際治療之參考是很重要的，我們曾利用基因晶片篩選出高齡與年輕婦女卵泡周圍的顆粒細胞基因表現之差異，但是由於採量數量過小及未客觀的評估生殖系統的老化情形，如此易造成以顆粒細胞評估年齡及指標基因表現對卵子成熟、授精及胚胎品質不同的結果，為充分結合基礎研究與臨床應用，我們將觀察不同年齡患者在進行常規試管嬰兒的療程中，採集卵子周圍欲丟棄的卵泡周圍的顆粒細胞進行可能影響卵子成熟的基因以及可能影響胚胎發育的賀爾蒙受體之表現包括評估分裂期胚胎品質的關連性，另外配合端粒表現量的測定分析這些基因在高齡與年輕婦女表現量的差異期望可以提供臨床治療的參考。

二、研究目的

本試驗研究目的為收集常規試管嬰兒療程將進行第三天分裂期胚胎植入的個案，進行激素接受體基因表現量分析與卵泡發育的程度之關連性分析，並進行端粒長度鑑定，觀察顆粒細胞端粒長度與激素接受體是否可應用於胚胎發育的參考。

三、文獻探討

在發育的卵泡中，顆粒細胞已知有三種功能：產生荷爾蒙(經由 cytochrome P450 aromatase 的作用產生 17β -oestradiol ;E2)，產生生長因子 (growth factor) 调控卵細胞生長，與卵泡細胞的凋亡(apoptosis)有關。顆粒細胞所產生的生長因子，例如 transforming growth factor, activin 及 inhibin 調節腦下垂體分泌 FSH 及 LH，由 FSH 刺激顆粒細胞產生 insulin-like growth factor I，II 及 binding protein (刺激 oestradiol 及 androgen 產生)，interleukin I (抑制 luteal cells 產生 progesterone)，此外還有 transferrin (其功能可能不單局限於與鐵離子結合而已，應與卵泡的發育有關)。另外顆粒細胞也能分泌 integrin 2 及 collagen type IV 之

類的細胞間質，這可能與細胞間的訊息傳遞有關。而許多的動物實驗也證實產生於顆粒細胞並進而影響卵泡發育的因子尚有 Kit ligand, Leukemia inhibitory factor(LIF)。再者，來自內分泌系統、其他生殖系統之細胞或卵子本身分泌而作用於顆粒細胞而影響卵泡發育的因子則有 Basic fibroblast growth factor(bFGF), karetioncyte growth factor (KGF), Bone morphogenic protein-4 (BMP-4), Bone morphogenic protein-7 (BMP-7)。Cai 等學者於 2007 報導濾泡刺激素受體表現量與卵巢反應(ovarian response)成正相關，Feuersteiny 等人在 2007 年也提出觀察人類顆粒細胞的數個基因表現與卵子成熟有關，這些基因包括 Acute Regulatory protein(STAR), Cyclooxygenase 2 (COX2), Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 and 5 (SCD1 and SCD5), Amphiregulin (AREG)，但是無法完全對應胚胎發育的品質，McKenziem 於 2004 年提出偵測 108 個人類卵子周邊顆粒細胞的基因表現，發現 PTGS2, HAS2, GREM1 可以預測胚胎的發育情形。Hasegawa 於 2005 年提出採卵時收集的顆粒細胞中，黃體激素受體(progesterone receptor)表現量降低時，胚胎品質較好。

根據我們先前的研究，CKB (creatine kinase, brain)與 PRDX2 (Peroxiredoxins 2) 可能在不同年齡婦女表現不同而影響卵子發育在高齡婦女的顆粒細胞中，不管胚胎型態良好或不良等級的胚胎，CKB 及 PRDX2 的表現量均高於在年輕婦女顆粒細胞中的表現量。而這兩個基因均與能量、代謝及過氧化有關，顯示在高齡婦女與年輕婦女顆粒細胞中的能量維持與代謝有異，進而影響到卵子的品質。

端粒為真核細胞內線性染色體末端一段特殊結構，其 DNA 為簡單的 TTAGGG 重複序列，在人類長度約 5~15kb，不具有編碼任何蛋白質功能，其功能是解決末端複製問題，以防止染色體末端融合、丟失，維持染色體穩定，並確保染色體在減數分裂中順利分離，由於 DNA 的末端複製不完全，使端粒隨每一次細胞分裂而變短，在組織培養中大多數哺乳類細胞經過一定分裂次數後停止複製。1990 年 Harley 等首先提出 細胞衰老的端粒假說，即端粒隨著細胞的分裂增值而逐漸縮短，當端粒短到一定程度而不足以維持其功能時則細胞不再分裂，陸

續有學者証實端粒長度可以表現出細胞或組織器官的複製潛能與增殖能力，Kang 等學者提出，正常人的口腔角化細胞端粒隨著年齡的增長而縮短，Yang 亦發現將不同年齡的腎上腺組織進行體外培養，發現端粒隨年齡增加而縮短，皮膚、肝臟、腎臟、骨骼肌也都呈現端粒隨年齡增加而縮短的現象。研究發現端粒具有組織特異性，同一個體不同細胞的長度差別也很大，而以往我們只單純的用年齡來判定進行試管嬰兒療程婦女的劑量，通常認為越年輕的婦女卵子品質越好，而每個個體的實際年齡是否與真正生殖系統的細胞所表現的端粒長度有關？我們先前的研究發現與年齡有關數個基因，在不同個體的變異很大，如果我們可以應用比較科學且客觀的方式分析生殖系統的細胞的衰老現象，對於評估生殖細胞甚至胚胎的品質，據以作為未來給藥劑量的參考，或篩選最適植入的胚胎應可以達到極高的臨床價值。

四、研究方法、

本研究收集常規試管嬰兒合併單一精蟲顯微注射的療程且將進行第三天分裂期胚胎植入的個案，不同年齡層(小於 29 歲、介於 30 歲至 39 歲及大於 40 歲三個族群，每族群預定收集 50 名受試者)的顆粒細胞，但是根據受試者的意願實際每組約收集到 30 個案收集及資料完整可供統計

科利細胞檢體分為二部分，第一部份萃取 RNA 進行基因表現量分析，轉錄成 cDNA 後取一部份 DNA 檢體分析濾泡刺激激素接受體(follicle stimulating hormone receptor)、黃體激素接受體 (progesterone receptor)及促黃體生成激素接受體(luteinizing hormone; receptor)，第二部分則萃取 DNA 進行端粒長度鑑定，並經受試者同意調閱其胚胎發育的病例紀錄等資料予以紀錄存檔，觀察顆粒細胞端粒長度是否可應用於胚胎發育的參考。

(1) 比較的顆粒細胞激素受體基因表現之差異

(A)、顆粒細胞的取得與貯存

我們徵得在”李茂盛試管嬰兒中心”進行試管嬰兒療程之病人的同意

後，分別收集年輕(30 歲以下)30 個個案，居中組(30~39 歲)各 30 個個

案，年齡高齡(40歲以上)30個共三組的不孕症婦女顆粒細胞，將檢體上的紅血球用 RBC lysis buffer 去除後，分成二部分，第一部分置於冷凍小管中，凍於液氮中，直到抽取其 RNA，第二部分置於冷凍小管中，凍於液氮中，直到抽取其 DNA。

(B)、抽取顆粒細胞之 RNA

取一部分細胞以使用 Dynabeads mRNA purification kit，利用帶有 oligo-dT 的磁珠，直接從細胞中分離純化 mRNA，先用 lysis buffer 溶解胚胎中之物質，再加入等量的 binding buffer，同時取混合均勻的 Dynabeads Oligo(dT)，將其加入 1.5ml 空的微量離心管中，再將微量離心管靜置於磁座 1 分鐘，之後吸去上清液，加入 100ul binding buffer 清洗一次，再以 100ul binding buffer 溶磁珠，將先前溶於 lysis buffer 的胚胎檢體加入 Dynabeads solution 中，在室溫下均勻混合約 3-5 分鐘，之後將微量離心管靜置磁座 1 分鐘，移除上清液，加入 200ul washing buffer 清洗磁珠 2 次，不將 mRNA 沖出，直接以磁珠保存於 -80°C，經過 RNA 的反轉錄合成 DNA 後以 Trizol 萃取 RNA。為了增加 RNA 的品質，再將 RNA 的萃取液通過 bromo-3-chloropropane 使沉澱，再以 75% ethanol (Sigma) 洗滌。純化後的 RNA (約 0.5mg) 加水後保存於 -70°C。純化後的 RNA 進行反轉錄用來合成第一股互補 cDNA。

(C)、RNA 的反轉錄

合成 first-strand cDNA，加入 Total RNAs (0.5 mg) 與 CDS primer mix (1 mL; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) 混合並加入含有 AMV reverse transcriptase (18.5 units; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 的 Dig cDNA master buffer 進行反轉錄 (15 uL in total volume)。First-strand cDNA 的反轉錄在 48°C 進行 50 分鐘，最後加入 stop solution (1 mL) 結束反應。

(D)、Primer 的設計

從基因庫中找出表二所列之基因的序列，針對 cDNA 序列設計 primers，先

用 Perkin Elmer 2400 PCR system 檢查 primers 的專一性，再應用到 real-time quantification PCR 中使用，本研究所設計使用的 primer 序列列於表一 (Table 1)。

(E)、Real-time quantification PCR

採用 ABI Prism 7300 Sequence System 來進行 real-time PCR。選用 SYBR Green I 當螢光來源。將反轉錄後所得到 cDNA 與各基因專一之 primers、反應試劑混合後上機，將每次的結果與 house keeping gene)GAPDH, beta-actin 及 18S rRNA 做比較。記錄每次實驗數據，彙整後分析結果，本研究結果以 beta-actin 為校正基因各組基因相對於 beta-actin 的表現量帶入 $2^{\Delta ct}$ 統計結果。

(2)、比較的顆粒細胞端粒長度基因之差異

(A)、萃取細胞 DNA (Extraction of cell DNA)

首先將顆粒細胞株以 PBS 緩衝溶液清洗二次，然後加入 0.5 ml lysis buffer [20 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% SDS], 置入微量小管，離心 (12000 rpm, 4°C, 10 分鐘)，取上清液，加入 25 μ l Proteinase K (40 mg/ml)，放置水浴作用 (50°C, 6h)，然後加入 10 μ l RNAase (10 mg/ml)水浴 2 小時，再加入 500 μ l Phenol (pH=8)/chloroform (1:1) 混合均勻，離心 (12000 rpm, 4°C, 20 分鐘)，將水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol，混合均勻後放到 -20°C 冰箱靜置 1 小時，之後離心 (12000 rpm, 4°C, 40 分鐘)，取沉澱物加入 1 ml 75% ethanol 混合完全，離心 (12000 rpm, 4°C, 30 分鐘)後，自然乾燥 1 小時，加入適量的 TE buffer 溶解乾燥物，測量其吸光值已得到 DNA 濃度。DNA 濃度 (μ g/ml) = 稀釋倍數 \times DNA (OD260 值) \times (50 μ g/ml/ OD260)

(B)、PCR

取 1 μ l (0.5 μ g/ μ l) DNA 加入 14.9 μ l ddH₂O 混合，primer 為 5'CCCTAA3' 及 5'TTAGGG3'，再加入 2.5 μ l dNTP (10 mM)以及 2.5 μ l 10 \times PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100)，和 0.1 μ l Taq DNA polymeras, 及 PfuDNA polymeras (Super-Therm, 5U/ μ l)於溫度循環機前處理 94°C, 5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94°C 1 分鐘, 57°C 1 分鐘, 並

於 72°C 反應 2 分鐘，進行 30 個循環次數，最後再處理 72°C 反應 20 分鐘，4°C 保存。

(C)、以時定量 PCR 測定端粒長度

以電泳方法分析端粒長度比較之差異不明顯，故改以 Cawthon 於 2002 年發表以時定量 PCR 測定端粒長度相對於 36B4 基因之方法測定端粒的長度，測定端粒的序列組如下 GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT, TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA, 而 36B4 基因在體內只有一套複製體(one copy)故可用於作為評估端粒重複數樣之依據其偵測序列為 TCCCTACAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC, CCCATTC TATCATCAACGGGTACAA, 每一組基因之表現量經三次重複測定。將測定之 Ct 值帶入 $2^{\Delta Ct}$ 統計。

(3)、統計方法

端粒長度、基因表現量校正後，比較胚胎發育情形、年齡等因素以 one way ANOVA 及 t-test, Mann-Whitney's U-test, 來統計期表現量是否有統計意義，並定義 P 值, $P < 0.05$ 時具有統計之差異。

五、結果與討論 (含結論與建議)

本研究共分為三組，於每組年齡層收集 30 位受試者，共收集 90 位受試者的顆粒細胞檢體，這些受試者進行試管嬰兒的基本資料整理於附表二，總 E2 值在年輕族群最高，因其誘導出之總卵子數也最高，而每個卵子相對應 E2 值則隨著年齡的增加而增加，Progesterone 及 LH 在不同年齡族群變化不，而 FSH 則在高齡組明顯上升。

我們將各組激素受體進行相對定量分析，發現將激素與三組 house keeping gene GAPDH, beta-actin 及 18S rRNA 做比較比值呈現相同之趨勢，故以 beta-actin 為對照基因，計算各組激素受體的表現量。我們發現 FSH receptor 基因在顆粒細胞的相對表現量隨著年齡的增加而表現量增加，且出現統計上之差異，Progesterone 及 LH receptor 則呈現相反的趨勢，及此兩組激素受體

在顆粒細胞相對表現量隨著年齡的增加而表現量減少(附圖一)。如果高齡婦女的 LH receptor 及 progesterone receptor 相對低,臨床醫師應重新評估誘發高婦女進行試管嬰兒療程時,此二種激素劑量的調整,是否應適度的增加劑量以應映數量不足的受體對該二種激素的刺激方可得到較佳的誘發排卵的效果。

我們可以在圖二 A~C 發現,發育至第三天的胚胎品質與這三種激素受體的相關性 FSH receptor 及 LH receptor 在品質好的胚胎來源的卵子周邊的顆粒細胞表現量較低,progesterone receptor 則相反且呈現統計上之差異,Yang 等學者曾在 2005 年發表以 FSH receptor 及 LH receptor 評估 PCOS (polycystic ovarian syndrome)卵子的成熟度較高較高比率發育為囊胚的組別其濾泡周圍的顆粒細胞 LH receptor 表現量越高,而我們觀察到的情況為年齡越輕的組別顆粒細胞 LH receptor 及 FSH receptor 表現也越少,是否也意味著年輕的卵子較年長著成熟度高,這其間是否有關聯性是值得進一步探索的問題。而經統計,在這些激素受體對卵子成熟度影響的分析則無顯著差異。

而端粒相對長度與進行試管嬰兒療程之婦女年齡及胚胎品質之比較(表三及附圖二(D)),婦女的年紀大小與 T/S ratio 呈現有統計意義的相關,表示我們可以婦女年齡來推斷濾泡細胞老化的情形,而在胚胎的品質良莠的評估,T/S ratio 在各個年齡層並無顯著差異。

六、計畫成果自評

本實驗已完成第一年許可的的進度並達成預期目標,研究內容與原計畫相符,研究成果之學術或應用價值很適合在學術期刊發表,此結果幫助我們了解不同年齡層婦女之顆粒細胞基因的激素受體及端粒長度表現情形,並且配合第三天胚胎發育的情形,我們發現 FSH receptor 在品質不良的胚胎的來源卵子周圍的顆粒細胞表現量較高,而 progesterone receptor 則在品質較好的胚胎來源卵子周圍的顆粒細胞表現量較高,這可能影響臨床醫師進行誘導性排卵激素劑

量評估的數據，並作為不孕症婦女進行試管嬰兒胚胎發育的參考，此外藉由端粒長度之測定，可以推測生殖系統年齡與婦女實際年齡，以了解老化過程中卵丘顆粒細胞基因表現的改變，發現生殖系統老化的程度與生理年齡及胚胎品質之間皆成正比。而此種資訊將有助於提供臨床醫師在不孕症治療方面的參考，提昇高齡婦女卵子的品質，以增加篩選良好胚胎的機率並提高病患之懷孕率，減少病患屢次進行不孕症治療的心理及經濟壓力，造福不孕症的患者，對國家社會的發展則可以使許多求子者一圓心願，減少因子嗣引發的家庭問題。

對於參與之工作人員，已獲得預期之訓練如下 (1). 收集及保存細胞 DNA 及 RNA 檢體，(2). RNA 之萃取及反轉錄等分子生物技術建立 (3) 設計專一性高之 primers 的能力 (4). Real-time PCR 原理的了解與技術建立(5) 端粒長度測定之技術(6). 定量結果之分析與統計方法的操練。

七、可供推廣之研發成果資料表

根據此次結論，目前積極撰寫論文中。未來臨床醫師應可根據顆粒細胞上激素之受體表現量來推估篩選胚胎之良莠以供胚胎植入之參考。

八、參考文獻

- 張明揚、李國光、蔡鴻德、曾啓瑞、楊友壁、李茂盛、宋永魁。不孕症及生殖內分泌學，p.10-13, p.22-27。2003 年二版，合記圖書出版社
- Briggs D.A., Sharp D.J., Milled. r and Gosden R.G. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. *Mol.Hum. Reprod.* 5: 1107-1114, 1999.
- Cai J, Lou HY, Dong MY, Lu XE, Zhu YM, Gao HJ, Huang HF. Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. *Fertil Steril* 87:1350-6, 2007
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR *Nucleic Acids Research*, 30: e47 1-6, 2002.
- Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 22:3069-77, 2007

- Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, Otsuka Y, Negishi M, Akahane T, Okai T. Reduction of progesterone receptor expression in human cumulus cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. *Hum Reprod* 20:2194-200, 2005
- Keith E. Latham, F. Dale M. Bautista, Yuji Hirao, Marilyn J. O'Brien, and John J. Eppig. Comparison of protein synthesis patterns in mouse cumulus cells and mural granulosa cells: effects of follicle-stimulation hormone and insulin in granulosa cell differentiation in vitro. *Bio. Reprod* 61, 482–492, 1999
- Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 192:1256-60; discussion 60-1, 2005
- L Speroff; R. H. Glass and N. G. Kase. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, sixth edition, Lippincott Williams & Wilkins, 1999, 201-246.
- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869-74.
- Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol. Reprod.*;66:237-46, 2003
- Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 15:326-37, 2007
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 11:461-71, 2005
- Thomas FH, Armstrong DG, Telfer EE. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 3,:76, 2003.
- Yamada S., Fujiwara H., Honda T., Higuchi T., Nakayama T., Inoue T., Maeda M. and Fujii S. Human granulosa cells express integrin α_2 and collagen type IV: possible involvement of collagen type IV in granulosa cell luteinization. *Mol Hum Repro.* 5: 607-617, 1999.
- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y and Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles *Human Reproduction* 20: 2097–2103, 2005
- Zhang H., Vollmer M., De Geyter M., Litzistorf Y., Ladewig A., Dürrenberger M., Guggenheim R., Miny P., Holzgreve W. and De Geyter C. Characterization of an immortalized human granulosa cell line. *Mol Hum Repro.* 6: 146-153, 2000

附表一

Table 1. The primer sets used in real-time quantitative PCR

Gene name	Length (bp)	Primer (5'-3')
FSH receptor	110	F: GAGATCTCTCAGAATGATGTC R: TTGATGTAGAGCAGGTTGTTG
LH receptor	206	F: GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC R: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
Pregesterone receptor	98	F: CTTGCATGATCTTGTCAAAC R: CTTCAGACAGCATTCTGG
GAPDH	111	F: TTCCGCGAGGATCCATTGGA R: CAAGATCCAACCTCAGAGCTT
18srRNA	122	F: CGGCGATGCGGCGGCGTTATTCC R: CTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCC
β -Actin	Forward-1	CTGAGGCACTCTTCCAGCCTT
	Reverse-1	CACATCTGCTGGAAGGTGGAC
	Forward-2	CTGGCACCCAGCACAATG
	Reverse-2	GCCGATCCACACGGAGTACT

附表二

Table 2. Results of basic character and fertilization rate of patients from different age group

Group	Patient no	Average Age	FR	LH	E2	E2/total oocytes	E2/mature oocytes	P4	FSH
≤29	30	26.6±	67.6%	1.00	3357	162.5	192.6	1.95	4.15
		2.0*	(220/328)	±0.14	±1654 ^{a,b}	±60.0 ^d	±69.1 ^f	±0.89	±2.2 ^g
30-39	30	33.6	86.9%	1.00	2598	171.1	204.6	1.81	3.87
		±3.2	(220/235)	±0.12	±1138 ^{a,c}	±68.0	±108.8	±0.80	±1.95 ^h
≥40	30	41.9	89.2%	1.22	1113	224.2	290.5	1.28	5.7
		±2.0	(338/37)	±1.03	±846 ^{b,c}	±271.1 ^d	±27.4 ^f	±0.62	±3.12 ^{g,h}

Mean±SD

FR: fertilization rate

a~h: t-test, P<0.05

附表三

Table 3. Results of relative telomere length in cumulus cells from different age group

Group	Patient no	Total cumulus number No.	Average Age	T/S ratio/ patient	T/S ratio/cumulus
≤29	28	175	26.6±2.0*	5.54±0.93 [#]	8.96±1.97 ^a
30-39	27	169	33.4±3.3	4.48±0.96	3.94±0.52
≥40	22	96	42.6±2.4	2.12±0.68	2.84±0.41 ^a

*Mean±SD, [#]Mean±SEM

T/S ratio: relative telomere to single copy gene (T/S) ratio.

a: Mann–Whitney’s U-test, P<0.05

附圖一 (Figure 1)

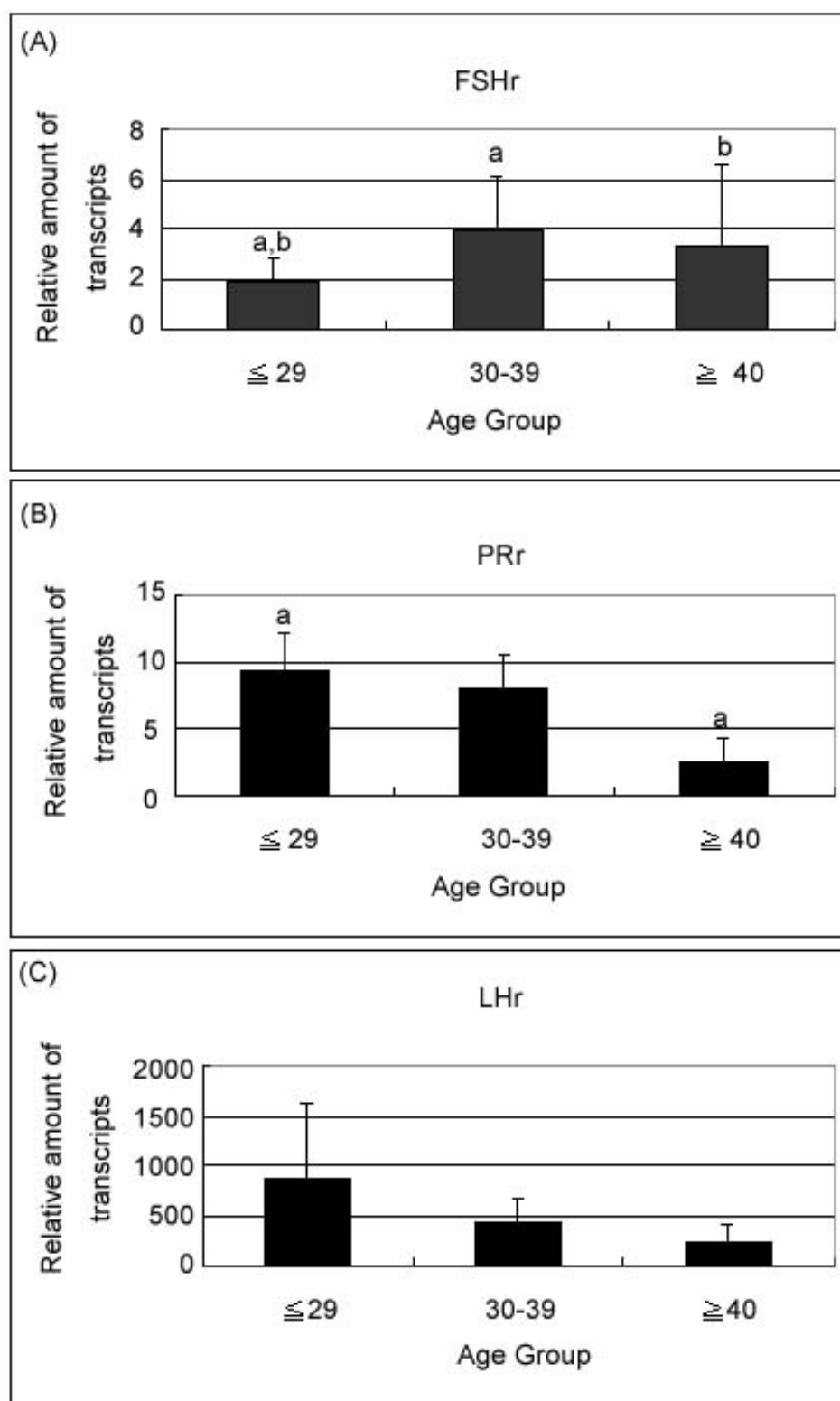


Figure 1. Relative amount of (A) FSH receptor (FSHr), (B) Pregesterone receptor (PRr) and (C) luteinizing hormone receptor (LHR) to beta actin gene expression in cumulus cells in three different age groups. Statistics analysis by Mann–Whitney’s U-test, a,b mean $P < 0.05$.

附圖二

Figure 2

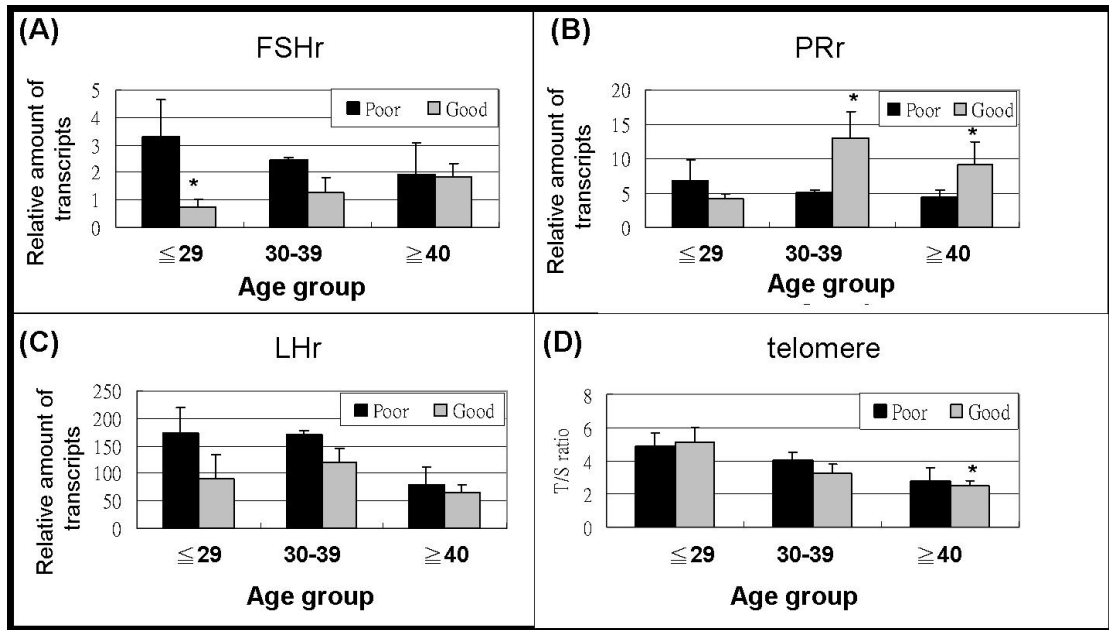


Figure 2. Results of different hormone receptor gene expression or telomere analysis compared from good and poor quality embryo on day 3. Relative amount of (A) FSH receptor (FSHr), (B) Pregesterone receptor (PRr) and (C) luteinizing hormone receptor (LHr) to beta actin gene expression in cumulus cells in three different age groups. (D) Telomere analysis of cumulus cells in different quality embryos. Statistics analysis by t-test, stat marks indicated poor comparison with good quality embryos in each age group, $P < 0.05$.