

· 临床论著 ·

# 苍附导痰颗粒对痰湿证多囊卵巢综合征患者 卵巢颗粒细胞基因表达干预的研究

赵 帅<sup>1,2</sup> 连 方<sup>2</sup> 吴海萃<sup>2</sup>

**摘要 目的** 运用高通量测序技术比较痰湿证多囊卵巢综合征(PCOS)患者应用苍附导痰颗粒治疗后与安慰剂用药后卵巢颗粒细胞基因表达的差异,探讨苍附导痰颗粒的疗效机制。**方法** 选取痰湿证 PCOS 行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的患者 120 例,按随机数字表法分为治疗组和安慰剂组,每组 60 例。两组均采用长方案进行控制性超排卵(COH),治疗组同时口服苍附导痰颗粒。对照组口服安慰剂颗粒。提取卵巢颗粒细胞 RNA,观察痰湿证候评分、胰岛素抵抗(HOMA-IR)变化、促性腺激素(Gn)用量、获卵数、优质卵数、正常受精数、优质卵率、优质胚胎率以及临床妊娠率;并进行差异表达基因功能注释和通路分析。**结果** (1)与安慰剂组比较,治疗组痰湿证候积分降低、HOMA-IR 差值升高、优质卵率升高、受精率升高、优质胚胎率升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。(2)两组卵巢颗粒细胞基因表达存在差异,获得差异基因共 38 032 条,表达上调(FC>2)的有 176 条,表达下调(FC<0.5)的有 603 条。GO 功能注释主要涉及到参与细胞因子活性、细胞增殖、免疫反应、炎症应答方面;KEGG 分析涉及细胞因子受体相互作用通路、IL-17 信号通路、p53 信号通路等。**结论** 痰湿证 PCOS 患者经苍附导痰颗粒干预后卵巢颗粒细胞基因组表达谱发生明显变化,其可能机制是通过调节有关细胞因子活性与生物合成、炎症应答与信号传导等基因表达。

**关键词** 苍附导痰颗粒;高通量测序技术;颗粒细胞;多囊卵巢综合征;基因组学

**Cangfu Daotan Granule Intervened Gene Expressions of Ovarian Granulosa Cells of PCOS Patients with Sputum-Dampness Syndrome** ZHAO Shuai<sup>1,2</sup>, LIAN Fang<sup>2</sup>, and WU Hai-cui<sup>2</sup> 1 Department of Gynecology, First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014); 2 Reproductive Center, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011)

**ABSTRACT Objective** To observe the therapeutic mechanism using high-throughput sequencing technologies by comparing differences in ovarian granulosa cells gene expressions between Cangfu Daotan Granule (CFDTG) treatment and placebo treatment in polycystic ovary syndrome (PCOS) patients with sputum-dampness syndrome (SDS). **Methods** Selected were 120 PCOS patients with SDS undergoing *in vitro* fertilization-embryo transferred (IVF-ET). They were assigned to the treatment group and the placebo group by random number table, 60 in each group All patients received controlled ovarian hyperstimulation (COH). Besides, patients in the treatment group took CFDTG, while those in the placebo group took placebos. RNA in ovarian granulosa cells were collected. SDS scores, homeostasis model assessment (HOMA) changes, gonadotropins doses, oocytes obtained, good quality oocytes, normal fertilization number, good quality oocyte rate, high quality embryo rate, and clinical pregnancy rate were observed. Functional annotations of differentially expressed genes and pathway analyses were also observed. **Results** (1) Compared with the placebo group, SDS score decreased, HOMA-IR increased, high quality egg rate, fertilization rate, and high quality embryo rate all increased in the treatment group ( $P<0.05$ ). (2) There were ovarian granulosa cell gene expressions differences between the treatment group and the placebo group. A total of 38 032 genes differentially expressed, 176 up-regulated (FC>2) and 603 down-regulated (FC<0.5). GO annotations mainly

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81774355); 山东省中医药科技发展计划项目(No. 2019-0115)

作者单位: 1. 山东中医药大学第一临床医学院中医妇教研室(济南 250014); 2. 山东中医药大学附属医院生殖中心(济南 250011)

通讯作者: 连 方, Tel: 0531-68617800, E-mail: f\_lian@163.com

DOI: 10.7661/fj.cjim.20201021.364

involved to participating in cytokines activities, cell proliferation, immune response, and inflammation response. KEGG analyses involved interaction pathways of cytokines receptors, IL-17 signaling pathway, P53 signaling pathway, etc. **Conclusions** PCOS patients with SDS had obvious changes in ovarian granular cell genome expression spectrum, which might be mainly manifested by regulating gene expressions such as cytokines activities and biosynthesis, inflammation response and signal transduction.

**KEYWORDS** Cangfu Daotan Granule; high-throughput sequencing; granulosa cell; polycystic ovary syndrome; genomics

有研究表明,在育龄期不孕妇女中,肥胖型多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 患者多对应中医学痰湿体质,而“痰湿”形成的重要物质基础就是糖脂内分泌代谢紊乱,肥胖人群的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 在 PCOS 中更加显著<sup>[1]</sup>。2015 年 Joham AE 等<sup>[2]</sup>报道,在体外受精—胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transferred, IVF-ET) 治疗过程中,PCOS 患者合并不孕可能会出现排卵障碍、卵巢过度刺激综合征乃至妊娠糖尿病等各种风险,妊娠率比非 PCOS 患者低 4.5 倍。Sigala J 等<sup>[3]</sup>研究发现,与非 PCOS 患者比较,PCOS 患者拥有较多获卵数、优胚数,但优卵率、优胚率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Zhao H 等<sup>[4]</sup>比较不同证型 PCOS 的临床结局发现,痰湿型 PCOS 患者内分泌紊乱以及糖脂代谢异常更为严重,促排效果及妊娠结局明显降低。本课题组采用高通量测序卵巢颗粒细胞基因组学,并与中医学整体观念、辨证论治相结合,探究中药对证型的基因组学的调控机制,现报告如下。

### 资料与方法

#### 1 诊断标准

**1.1 PCOS 诊断标准** 参照中华医学会妇产科学分会妇科内分泌学组行业标准<sup>[5]</sup>,诊断必备条件是闭经或月经稀发或不规则子宫出血,加上以下两项中的任何 1 项,即可诊断为疑似 PCOS。具体:(1)高雄激素的临床表现或高雄激素血症;(2)B 超表现为多囊卵巢(一侧或双侧卵巢内直径 10 mm 的卵泡数  $\geq 12$  枚,或卵巢体积  $\geq 10 \text{ cm}^3$ )。

**1.2 IR 诊断标准** 采用稳态模式评估法 (ho-

meostasis model assessment, HOMA) 及 IR<sup>[6]</sup>,计算公式:  $\text{HOMA-IR} = [\text{空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG, mmol/L)} \times \text{胰岛素 (fasting blood insulin, FIN, mIU/L)}] / 22.5$ ,  $\text{HOMA-IR} \geq 2.69$  为 IR。

**1.3 中医痰湿证辨证标准** 参照《妇产科学》<sup>[7]</sup>中不孕症痰湿证拟定。主症:(1)月经周期拖后,甚或闭经;(2)月经色淡,量少;(3)多年不孕。兼症:(1)体型丰满,甚或肥胖;(2)痞满腹胀;(3)经行泄泻或大便溏泄;(4)带下色白,量多;舌脉象:舌淡胖甚或边有齿痕,苔白腻,脉滑尺弱。主症再加一项或两项兼症即可诊断。

**2 纳入标准** (1)符合 PCOS 诊断标准;(2)中医辨证为痰湿证;(3)已婚女性,25~40 岁;(4)男方既往精液检查未见异常;(5)夫妇双方自愿签署知情同意书。

**3 排除标准** 入组患者促排卵效果不满意未取卵;有激素类药物使用史;伴有急性泌尿、生殖系统感染;严重的精神类疾患者。

**4 一般资料** 120 例均为 2017 年 10 月—2018 年 9 月就诊于山东中医药大学附属医院生殖中心,拟行 IVF-ET 治疗患者,符合纳入标准,并正常完成本周期取卵移植过程。采用随机数字表法分为治疗组[苍附导痰颗粒+促性腺激素 (gonadotropin, Gn)]和安慰剂组(安慰剂颗粒+Gn),每组 60 例。一般资料(表 1)比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。本研究经山东中医药大学附属医院生殖医学伦理委员会审批 (No. 20170228M)。

**5 治疗方法** 两组均采用长方案进行控制性超排卵 (controlled ovarian hyperstimulation, COH): IVF-ET 周期前 1 个月经周期第 3 天口服达英-35(炔雌醇环丙孕酮片,2 mg 醋酸环丙孕酮/0.035 mg 炔雌醇,德国先灵公司生产,批号:366A),1 天 1 片,连

表 1 两组一般资料比较 ( $\bar{X} \pm s$ )

组别	例数	年龄 (年)	病程 (年)	BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	不孕病史[例(%)]		FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	T (ng/mL)
					原发	继发			
治疗	60	32.22±4.35	2.98±2.00	28.05±1.88	26(43.33)	34(56.67)	7.04±1.59	9.94±2.60	0.65±0.47
安慰剂	60	30.80±4.69	3.60±2.55	28.63±2.78	33(55.00)	27(45.00)	7.02±1.49	9.78±4.98	0.65±0.63
$t/\chi^2$ 值		1.715	1.477	-1.345		1.634	0.091	0.219	-0.049
P		0.089	0.142	0.181		0.201	0.927	0.827	0.961

注:FSH 为促卵泡生成素;LH 为促黄体素;T 为睾酮

服 21 天。治疗组同时口服苍附导痰颗粒。苍附导痰颗粒出自于《叶天士女科诊治秘方》<sup>[8]</sup>,组成如下:茯苓 12 g (批号:18025281、18024511、18017581)、法半夏 9 g (批号:18025761)、陈皮 12 g (批号:18016601)、生甘草 6 g (批号:18024562)、麸炒苍术 12 g (批号:18025832)、醋香附 12 g (批号:18021402)、胆南星 9 g (批号:18017471)、麸炒枳壳 9 g (批号:18026232)、生姜 6 g (批号:18007141)、炒神曲 9 g (批号:17021982),由北京康仁堂药业有限公司提供,每袋 3 g,含生药量 21.42 g,每次 3 g,每天 2 次,直至注射人绒毛膜促性腺激素日;安慰剂组口服安慰剂颗粒,由北京康仁堂药业有限公司提供(5%原药,95%糊精,每袋 3 g,批号:1702683、1801427、1702684、1802012),每次 3 g,每天 2 次,直至注射人绒毛膜促性腺激素日。

两组服用达英-35 至当月的月经周期第 21 天,给予达菲林(注射用醋酸曲普瑞林,每支 3.75 mg, IpsenPharma Biotech,批号:T11404) 0.9~1.2 mg, 单次皮下注射 14 天后判断是否符合垂体降调节标准[血清促卵泡生成素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体素(luteinizing hormone, LH)均 < 5 mIU/mL,血清雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>) < 30 pg/mL, 子宫内膜厚度 ≤ 0.5 cm, 双侧卵泡最大直径 ≤ 0.8 cm]<sup>[9]</sup>。依据年龄、体重指数、双侧窦卵泡数目、基础内分泌给予适量果纳芬(r-FSH, 450IU, Merck Serono S.p.A.,批号:S20160040),每日皮下注射控制性超促排卵,同时根据反应性适时肌肉注射尿促性素(menotrophin, HMG, 75 IU, 丽珠集团丽珠制药厂,批号:H10940097)。当 B 超监测优势卵泡直径 > 1.7 cm, 结合 E<sub>2</sub> 当晚肌肉注射绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotrophin, HCG) 1 万 U 扳机,扳机 36 h 后取卵,收集优势卵泡的卵泡液。

6 卵细胞收集、体外培养、胚胎移植和颗粒细胞提取<sup>[12]</sup> 参照参考文献[10-12],HCG 扳机 36 h 后在超声引导下穿刺取卵术,收集入组患者不含血且直径在 1.8~2.0 cm 优势卵泡的卵泡液,立即进行卵巢颗粒细胞 RNA 的提取<sup>[13]</sup>,常规精液处理、受精、移植、黄体支持。

7 RNA 样品的提取、质检以及 RNA-seq 高通量测序数据分析 采用 Trizol (美国英杰生命技术有限公司)方法对样本总 RNA 进行分离、纯化。具体实验步骤由杭州联川生物技术股份有限公司实施。以 P 值和差异倍数(fold change, FC)作为筛选差异基因的依据, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 8 观测指标及方法

8.1 两组于治疗前、取卵日分别检测血清 FBG 及 FIN 水平后计算 HOMA-IR 数值 嘱患者 8~10 h 禁食、水后于清晨抽取 3~5 mL 肘静脉血,采用葡萄糖氧化酶法测定 FBG,用化学发光法测定血清 FIN,均由山东中医药大学中西医结合生殖与遗传中心检验室完成。

8.2 证候改善程度 采用自拟痰湿证 PCOS 量化评分表,计算治疗前、取卵日的痰湿证候积分。

8.3 COH 过程中 Gn 的用量。

8.4 获卵数、优质卵数、正常受精数、优质卵率(优质卵数/获卵总数)、正常受精率[(双原核(2 gonadotropins, 2PN)受精卵数/卵母细胞总)]、优质胚胎率(I 级胚胎数/I + II 级胚胎总数)及临床妊娠率(临床妊娠例数/移植总例数)。

8.5 RNA 样品质量检测结果 分光光度计检测 RNA 样品 A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub> 吸收值, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ≥ 2 为质量合格,琼脂糖凝胶电泳检测合格 RNA 样品的完整性。

8.6 RNA-seq 高通量测序数据分析 差异基因使用生信 Bowtie 2 软件分析,使用 Ensemble 分析得到差异基因名称,使用 GO 数据库功能注释,KEGG 数据库通路分析。

9 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件包进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组资料组间采用 t 检验;用构成百分比描述计数资料,采用  $\chi^2$  检验;所有的统计检验均采用双侧检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1 两组患者治疗前后 HOMA-IR 比较(表 2) 与本组治疗前比较,治疗组治疗后 HOMA-IR 显著降低( $t = -1.141, P < 0.05$ );安慰剂组 HOMA-IR 亦下降,但差异无统计学意义( $t = 0.473, P > 0.05$ )。两组治疗前后 HOMA-IR 差值比较,差异有统计学意义( $t = -2.554, P < 0.05$ )。

表 2 两组患者治疗前后 HOMA-IR 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	HOMA-IR		
		治疗前	治疗后	差值
治疗	60	3.538±1.306	3.060±1.412*	-0.478±0.937 <sup>△</sup>
安慰剂	60	3.432±1.156	3.329±1.158	-0.103±0.648

注:与本组治疗前比较,\* P < 0.05;与安慰剂组比较,<sup>△</sup> P < 0.05

2 两组患者治疗前后痰湿证候积分比较(表 3) 治疗组取卵日证候积分较治疗前显著降低( $t = -12.762, P < 0.01$ ),且两组治疗前后积分差值比较,

治疗组较安慰剂组差值下降明显 ( $t = -19.183, P < 0.01$ )。

表 3 两组治疗前及取卵日证候积分 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	证候积分		
		治疗前	取卵日	差值
治疗	60	34.22±4.76	22.43±4.59*	-11.78±4.40 <sup>△</sup>
安慰剂	60	34.22±5.20	33.63±5.02	-0.58±1.06

注:与本组治疗前比较, \*  $P < 0.01$ ;与安慰剂组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.01$

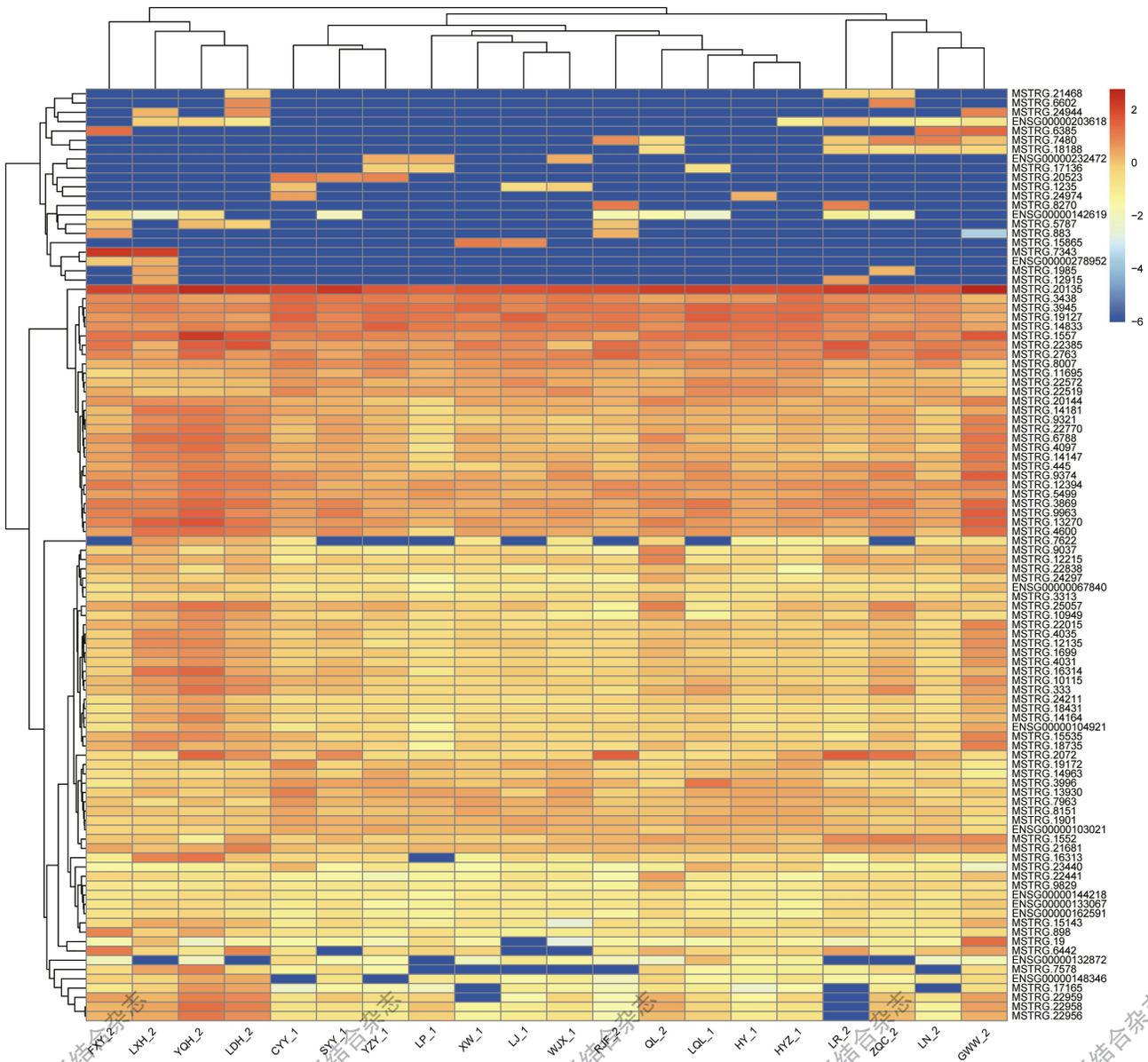
3 两组患者 Gn 用量及使用天数、获卵数、优质卵数及受精卵数比较(表 4) 治疗组较安慰剂组 Gn 用量、Gn 天数稍有减少,差异无统计学意义( $t$  值分别为 -0.354、-0.790,  $P > 0.05$ )。两组患者获卵数、优质

卵数、受精卵数比较,差异亦无统计学意义( $t$  值分别为 0.040、1.447、1.167,  $P > 0.05$ )。

4 两组患者优质卵率、受精率、优质胚胎率及临床妊娠率比较(表 5) 治疗组比安慰剂组的优质卵率、受精率、优质胚胎率明显提高,差异有统计学意义( $\chi^2$  分别为 27.543、7.038、5.738,  $P < 0.05, P < 0.01$ )。治疗组临床妊娠率略高于安慰剂组,但差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.143, P > 0.05$ )。

### 5 RNA-seq 高通量测序数据分析

5.1 两组表达差异基因筛选结果(图 1) 筛选出  $P < 0.05$  的基因 779 条,表达上调( $FC > 2$ ) 的 176 条,表达下调( $FC < 0.5$ ) 的 603 条。



注: x 轴为不同样本, y 轴为差异基因;蓝色经由白色至红色表示表达量从低到高

图 1 差异表达基因的表达量变化热图

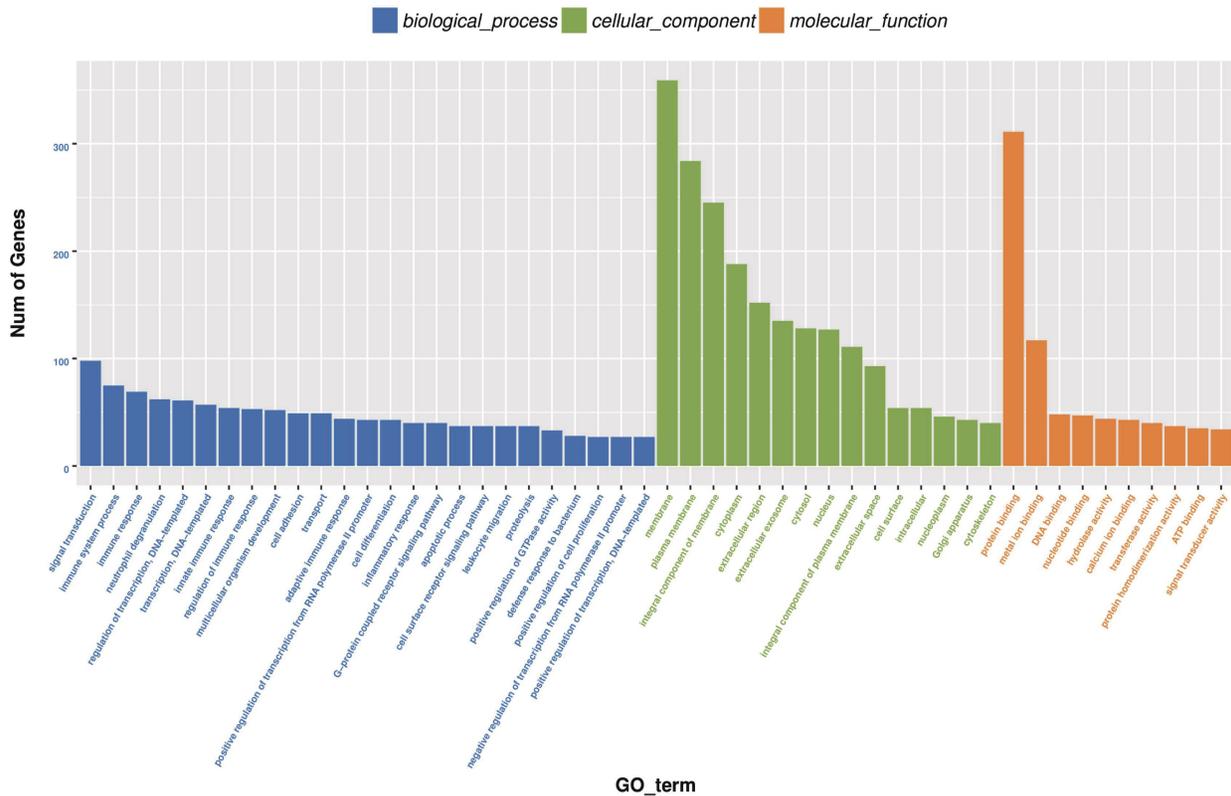
表 4 两组患者 Gn 用量及使用天数、获卵数、优质卵数及受精卵数比较 (x±s)

组别	例数	Gn 用量(IU)	Gn 天数(天)	获卵数(个)	优质卵数(个)	受精卵数(个)
治疗	60	2 551.04±701.38	11.38±2.01	16.82±4.96	13.72±4.77	12.73±3.27
安慰剂	60	2 593.13±596.14	11.75±2.98	16.77±8.48	12.02±7.75	11.82±5.13

表 5 两组患者优质卵率、受精率、优质胚胎率、临床妊娠率比较 [% (例数比)]

组别	例数	优质卵率	受精率	优质胚胎率	临床妊娠率
治疗	60	81.57 (823/1 009) **	75.72 (764/1 009) **	60.94 (259/425) *	60.00 (36/60)
安慰剂	60	71.67 (721/1 006)	70.47(709/1 006)	52.47(191/364)	46.67(28/60)

注:与安慰剂组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01



注:GO 富集性柱状图反映在生物过程、细胞组分和分子功能富集的 GO term 上差异基因分布情况

图 2 两组差异基因 GO 富集性柱状图

5.2 两组表达差异基因的 GO 功能注释(图 2) 筛选出有统计学意义(P<0.05)的基因 779 个,GO 注释发现涉及生物学过程和分子功能的共有 673 个(P<0.05)。

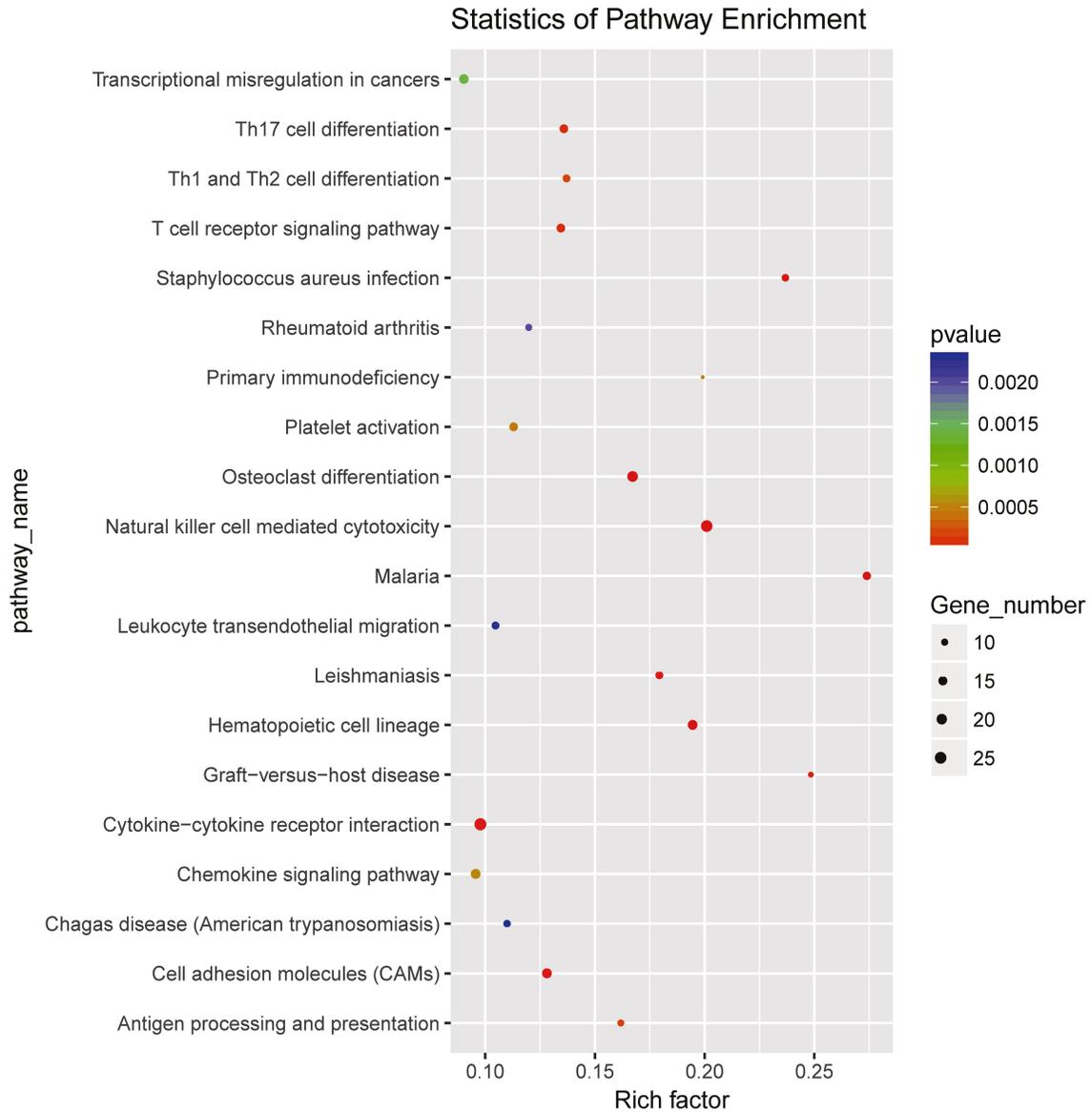
5.3 两组表达差异基因的 KEGG 通路分析(图 3) 筛选出差异有统计学意义(P<0.05)的基因 779 个,KEGG 通路分析发现涉及的生物学过程共有 37 个(P<0.05,FDR<10%)。

5.4 两组差异基因表达在通路上的变化(图 4) 与安慰剂组比较,治疗组 KEGG 富集通路中,粒细胞 CXCL5 表达下调、TNFRSF13C 表达下调、Leptin 表达下调、STAT4 表达下调、SOCS2 表达下调、TNFRSF11A 表达上调、AMHR2 表达上调。痰湿证

PCOS 患者,IR 状态有所恢复。

### 讨论

临床肥胖型 PCOS 患者以痰湿证多发,卵巢被痰湿阻滞,对卵子的生成、排出产生影响,从而对女性生殖功能和内分泌系统造成持久的干扰<sup>[14]</sup>。脾为生痰之源,肺为储痰之器,脾虚运化失司以致痰湿互结,故燥湿化痰应启于脾。黄海平等<sup>[14]</sup>研究表明脾虚痰湿证候与 IR 等代谢失调疾病之间有相关性,梁宝珠等<sup>[15]</sup>研究显示脾虚痰湿证是 IR 型 PCOS 最典型的致病因,中医治疗以燥湿化痰、理气调经为治疗大法。郭乃君等<sup>[16]</sup>以苍附导痰汤为代表治疗 IR 型可改善 PCOS 女性体型、月经、卵巢功能及 IR。



注:KEGG 富集程度以散点图展示:Rich factor=该 KEGG 的差异基因数/该 KEGG 的总基因数

图 3 两组差异基因 KEGG 富集性散点图

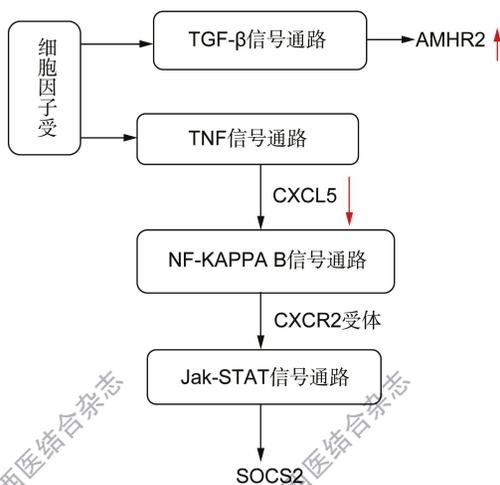


图 4 两组差异基因表达在通路上的变化

卵巢颗粒细胞是卵泡内重要的功能细胞,通过复杂的连接机制调控卵母细胞的成熟发育<sup>[17]</sup>。颗粒细胞与卵母细胞的质量紧密相连,不仅影响卵母细胞的发育成熟,而且颗粒细胞的分化增殖直接影响着卵子的发育排出、甾体激素的生成分泌、黄体的形成等卵巢相关功能<sup>[18]</sup>,甚至对胚胎发育潜能也有一定程度的干预。通过检测不同人群中卵巢颗粒细胞 RNA 的基因差异,借以推测在某一病理过程中卵巢内微环境的改变,探讨这些改变对卵母细胞的生长发育可能存在的上调/下调机制,可反应不同疾病中颗粒细胞的信息变化和生殖机能<sup>[19]</sup>。

对于痰湿证 PCOS 患者来讲,药物干预前后机体内环境势必存在某种差别,对于遗传信息的 RNA 表达亦势必存在着某种差别,从基因层面上阐释“燥

湿化痰促生殖”理论在卵巢上的体现。本研究是利用基因组学研究,观察运用中药干预后发现,苍附导痰颗粒对痰湿证 PCOS 患者证候及 HOMA-IR 有明显改善,并提高优质卵率、受精率、优质胚胎率及临床妊娠率。痰湿证 PCOS 患者经苍附导痰颗粒干预后卵巢颗粒细胞基因组表达谱中 CXCL5 表达下调、SOCS2 表达下调、AMHR2 表达上调,表明燥湿化痰中药苍附导痰颗粒改善痰湿证 PCOS 患者生殖功能及妊娠结局的原因之一可能是通过调节有关细胞因子活性与生物合成、炎症应答与信号传导等表达。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] Behboudi-Gandevani S, Ramezani Tehrani F, Rostami Dovow M, et al. Insulin resistance in obesity and polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(5): 343-353.
- [2] Joham AE, Teede HJ, Ranasinha S, et al. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: data from a large community-based cohort study[J]. *Women's Health (Larchmt)*, 2015, 24(4): 299-307.
- [3] Sigala J, Sifer C, Dewailly D, et al. Is polycystic ovarian morphology related to a poor oocyte quality after controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection? Results from a prospective, comparative study[J]. *Fertil Steril*, 2014, 103(1): 112-118.
- [4] Zhao H, Wang XE, Zhang T, et al. Correlation between Chinese medicine syndrome types of polycystic ovary syndrome and ovulation induction effect[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2011, 31(7): 896-898.
- [5] 陈子江, 张以文, 刘嘉茵, 等. 多囊卵巢综合征诊断中华人民共和国卫生行业标准[J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(1): 74-75.
- [6] 李玉婷, 何援利. 多囊卵巢综合征糖脂代谢异常与胰岛素抵抗的关系[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(18): 2880-2882.
- [7] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 369.
- [8] 清·叶天士. 叶天士女科诊治秘方[M]. 上海: 文益书局, 民国三年卷二十三.
- [9] 庄广伦主编. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 157-164.
- [10] 白晓红, 糜若然, 岳天孚, 等. 体外培养人卵巢黄素化颗粒细胞的鉴定及其分泌功能变化[J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 40(5): 351-352.
- [11] Vanden Driesche S, Smith VM, Myers M, et al. Expression and regulation of estrogen receptors in the human corpus luteum[J]. *Reproduction*, 2008, 135(4): 509-517.
- [12] Duncan WC, Gay E, Maybin JA. The effect of human chorionic gonadotrophin on the expression of progesterone receptors in human luteal cells *in vivo* and *in vitro*[J]. *Reproduction*, 2005, 130(1): 83-93.
- [13] Sasson R, Rimón E, Dantes A, et al. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(5): 299-311.
- [14] 黄海平, 李小芳. 多囊卵巢综合征不同中医证型与胰岛素抵抗之间的关系[J]. *吉林中医药*, 2015, 35(9): 889-892.
- [15] 梁宝珠, 钟春华, 李彩娟. 多囊卵巢综合征所致复发性流产与体重指数、胰岛素抵抗及疗效相关性研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2015, 23(4): 77-79.
- [16] 郭乃君, 许小凤. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的中西医疗[J]. *吉林中药*, 2013, 33(11): 1100.
- [17] Smith SD, Mikkelsen A, Lindenberg S. Development of human oocytes matured *in vitro* for 28 or 36 hour [J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(3): 541-544.
- [18] Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 228(1-2): 67-78.
- [19] 沈浣. 颗粒细胞与卵母细胞发育[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2012, 31(5): 344-347.

(收稿: 2019-06-29 在线: 2020-12-11)

责任编辑: 段碧芳  
英文责编: 张晶晶