

# 卵泡体外激活在早发性卵巢功能不全患者辅助生殖中的研究进展

刘湛傲<sup>1</sup>, 陈晨<sup>2\*</sup>

中国医科大学 1. 临床三系; 2. 生命科学学院 教育部医学细胞生物学重点实验室  
国家卫生健康委员会细胞生物学重点实验室, 辽宁 沈阳 110122

**摘要:**早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是指女性 40 岁之前出现卵巢功能减退,其病理基础是原始卵泡的耗竭或难以激活,这一类患者自然受孕率低,排卵诱导治疗效果不佳,目前尚无有效恢复卵巢功能的方法。针对卵泡的体外激活技术(*in vitro* activation, IVA)是指手术取出部分卵巢组织,在体外进行药物或物理干预来激活残存卵泡,然后回植体内,使之生长至能对促排卵治疗产生反应的阶段。再配合促排卵治疗,可获得用于体外受精-胚胎移植的成熟卵泡。迄今 IVA 技术尚不完善,但为 POI 患者的治疗提供了新的方向。本文总结了卵泡体外激活的原理,相关信号通路及各通路中的药物靶点,并对卵泡体外激活方案在 POI 患者中的应用与优化进行综述,为 POI 患者的诊疗提供依据。

**关键词:** 卵泡体外激活;早发性卵巢功能不全;PTEN/PI3K/Akt;mTOR; Hippo

中图分类号:R711.75 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.04.0538

## *In vitro* follicle activation as a strategy for assisted reproduction in patients with premature ovarian insufficiency: research advances

LIU Zhan'ao<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>2\*</sup>

1. The 3rd Clinical Department; 2. School of Life Sciences, Key Laboratory of Medical Cell Biology,

Ministry of Education; Key Laboratory of Cell Biology, National Health Commission, China Medical University, Shenyang 110122, China

**Abstract:** Premature ovarian insufficiency (POI) refers to ovarian dysfunction in women before the age of 40 years, and its pathological basis is the depletion or difficult activation of primordial follicle. POI patients have a low natural conception rate and poor effect of ovulation induction therapy. At present, there is no effective method to restore ovarian function. *In vitro* activation (IVA) for follicles refers to surgical removal of part of the ovarian tissue, followed by drug or physical intervention *in vitro*, to activate the patient's remaining follicles. Finally, the tissue is rafted back to the same ovary so that it can develop to the stage of responding to ovulation induction. In conjunction with the above procedure, ovulation induction can obtain mature follicles for *in vitro* fertilization and embryo transfer. IVA technology is an innovative therapeutic option for POI, and provides a new direction for the treatment of POI patients. This article summarizes the principle of IVA, related signaling pathways and drug targets in each pathway, and reviews the application and optimization of IVA protocols in POI patients, so as to provide a basis for

收稿日期:2022-07-30 修回日期:2022-12-30

基金项目:中国医科大学大学生创新训练项目(S202210159053)

\* 通信作者 (corresponding author): cchen18@cmu.edu.cn

the diagnosis and treatment of patients with POI.

**Key words:** *in vitro* follicular activation; premature ovarian insufficiency; PTEN/PI3K/Akt; mTOR; Hippo

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 的患者通常于 40 岁之前出现卵巢功能减退, 表现为月经异常 (闭经、月经稀发或频发)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 水平 > 25 U/L、雌激素水平波动性下降。POI 发展至终末阶段, 患者将发生卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF), 表现为 40 岁之前的闭经、FSH 水平 > 40 U/L、雌激素水平降低, 并伴其他围绝经期症状<sup>[1]</sup>。POI 的总体发病率介于 1%~3.7%<sup>[2]</sup>, 30 岁以下女性发病率为 0.1%, 70%~90% 的患者病因不明, 可能的致病因素包括遗传、自身免疫、感染、代谢和医源性因素 (化疗、放疗与手术损伤) 等<sup>[3]</sup>, 由于上述原因导致的原始卵泡耗竭或激活困难, POI 患者难以获得 FSH 诱导的卵泡同步发育, 即卵泡波 (follicular wave) (见后), 因此排卵困难, 自然受孕率低。

尽管 POI 患者有 2.2%~14.2% 的自然受孕率<sup>[4]</sup>, 但对于有生育意愿的 POI 患者, 几乎所有生育治疗方案的成功率都极低, 其根本原因在于卵巢储备耗竭或/和原始卵泡难以发育至能对 FSH 做出应答的高级阶段, 依赖 FSH 刺激的排卵诱导 (ovulation induction, OI) 也无法获得可供体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 的成熟卵泡。通过长期的激素替代治疗 (hormone replacement therapy, HRT) 与定期的卵泡波检测, 可以对 POI 患者的偶发卵泡波进行 OI, 以获得可供 IVF-ET 的成熟卵泡, 但该疗程可能会持续数年<sup>[5]</sup>, 自然受孕可能要等待更久。考虑到随着 POI 病程的延长, 患者卵巢储备的规模和质量会持续下降<sup>[6]</sup>, 卵泡波的频率也会降低<sup>[5-6]</sup>, 因此, 如何在 POI 早期充分利用患者较高质量的卵巢储备获取可用于 IVF-ET 的成熟卵泡, 是 POI 患者辅助生殖的当务之急。

卵泡的体外激活 (*in vitro* activation, IVA) 是指取出部分卵巢皮质, 进行体外干预 (药物孵育、切割与划痕等) 后植回输卵管浆膜层下方、卵巢或卵巢附近的腹膜囊中继续发育, 帮助激活早期卵泡 (early follicles, EFs), 使之发育为能对 FSH 做出充

分应答的高级卵泡<sup>[7]</sup>。EFs 包括原始卵泡 (始基卵泡)、初级卵泡与次级卵泡 (合称窦前卵泡)<sup>[6]</sup>。值得注意的是, 仅对卵巢皮质进行活检/划痕的体内操作, 也属于 IVA 的范畴。截至 2022 年 4 月, 至少有 161 例 POI 患者、34 例潜在 POI 患者接受了 IVA 治疗, 累计妊娠 27 例<sup>[8-9]</sup>, 妊娠率 13.8%。因此, 对于 POI 患者而言, IVA 可能是一种有前景的辅助生殖策略。本文从 IVA 技术原理、操作方法、分子机制、优化方案等方面, 对 IVA 在早发性卵巢功能不全患者中应用的研究进展进行综述。

## 1 IVA 的原理: 干预卵泡发育相关通路

### 1.1 卵泡发育机制

生理状态下, 原始卵泡发育至排卵前卵泡需要经历两个阶段, 分别为初步募集和循环募集<sup>[10]</sup>。

1.1.1 初步募集阶段: 原始卵泡被激活, 经历初级、次级卵泡阶段, 随后发生闭锁, 长期闭锁的卵泡将走向凋亡。该阶段的发育卵泡将分泌抗缪勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)<sup>[11]</sup>, AMH 可以抑制原始卵泡的激活, 降低卵泡对 FSH 的敏感性, 避免卵巢储备的过快消耗与循环募集阶段的过早发生<sup>[12]</sup>。而晚期次级卵泡则开始分泌雌二醇 (estradiol, E2), AMH 的分泌量骤降<sup>[13]</sup>, 这一阶段需要约 290~335 日, 约 10~11.5 个月经周期<sup>[11, 14]</sup>。

原始卵泡的激活应当维持在稳定而连续的程度, 大规模、高强度的激活将导致原始卵泡的大量丢失, 常见于化疗诱导的 POI<sup>[15]</sup>。由于卵泡发育至初级卵泡时, 颗粒细胞才开始表达 FSH 受体, 接受 FSH 的抗凋亡与促发育作用, 因此原始卵泡的激活与早期发育并不依赖 FSH, 固有的旁分泌和自分泌因子被认为是决定原始卵泡休眠与否的重要因素<sup>[11]</sup>。

1.1.2 循环募集阶段: 垂体分泌 FSH 诱发循环募集, 升高的 FSH 水平可激活一批闭锁卵泡, 使之开始发育。对 FSH 更为敏感的卵泡将发育得更快, 释放更多的 E2 与抑制素, 这些卵泡分泌物将反馈作用于垂体, 抑制 FSH 分泌并促进黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 的分泌, FSH 水平的走低将抑制

同批次卵泡的生长与存活,最终只会存留一个优势卵泡继续发育<sup>[10-11]</sup>。FSH 也将诱导卵泡的颗粒细胞表达 LH 受体,随着 FSH 受体的减少与 LH 受体的增加,优势卵泡对 FSH 的依赖将转向对 LH 的依赖,卵泡的优势活动也将由 FSH 介导的生长转向 LH 介导的成熟<sup>[16]</sup>。随后的 LH 骤升将诱导卵母细胞发生第一次减数分裂,排出第一极体<sup>[17]</sup>,发生排卵,该阶段需要约 15 日<sup>[11]</sup>。

基于 FSH 升高的卵泡同步发育现象,称为卵泡波(follicular wave)<sup>[18]</sup>。对于育龄期女性,只有起始于卵泡期的卵泡波才能以排卵为结局。排卵时由于大量 E2 随卵泡液被排入体腔,血液中 E2 水平骤降,FSH 水平随之骤升,会诱发黄体期的卵泡波,然而随着黄体分泌 E2 和孕酮(progesterone, P),FSH 快速回落,卵泡波也随之闭锁凋亡。月经周期较长(29 日)的女性可能会在黄体溶解后(月经期)出现卵泡波,这类卵泡波也将走向闭锁,部分卵泡可能会汇入下一个月经周期的卵泡期,卵泡波继续发育<sup>[19]</sup>。

## 1.2 卵泡体外激活的信号通路及相应的 IVA 药物

IVA 通过药物和/或机械手段干扰卵泡活化相关通路,诱导卵泡的活化,目前已应用于临床的卵泡激活相关通路主要有 PTEN/PI3K/Akt 通路、mTOR 通路与 Hippo 通路。

1.2.1 PTEN/PI3K/Akt 通路及 IVA 药物:卵泡由卵母细胞和被覆的颗粒细胞群组成<sup>[11]</sup>,颗粒细胞产生细胞因子 Kit,Kit 作为配体与卵母细胞表面的酪氨酸激酶受体 c-kit 结合后,该通路被激活,磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositol-3-kinase, PI3K)的作用增强,促使磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, PIP2)转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP3),这一过程可被磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)抑制,PIP3 作为第二信使,激活磷脂酰肌醇依赖性激酶 1(phosphatidylinositol-dependent kinase 1, PDK1),导致丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt,又称蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)被 PDK1 磷酸化后激活,激活的 Akt 将磷酸化转录因子 FOXO3(forkhead box O3),磷酸化的 FOXO3 由细胞核内转移至细胞质,转录抑制作用减弱,卵泡活动得以增强<sup>[20-23]</sup>。

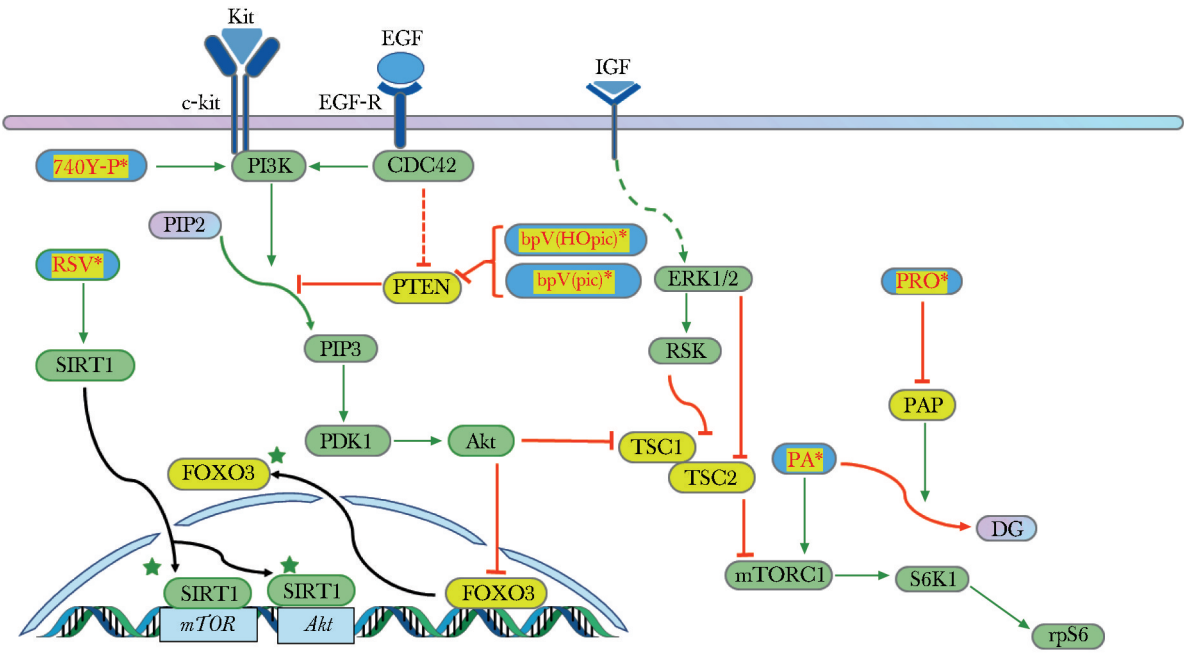
目前一些活化 PTEN/PI3K/Akt 通路的尝试都已在人类卵泡实验室培养或临床治疗中得到认可(图 1):应用钒化合物 bpV(pic)或 bpV(HOpic)抑制 PTEN<sup>[24-25]</sup>,应用 740Y-P 激活 PI3K<sup>[24-25]</sup>;应用表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)激活 CDC42(cell division cycle 42),CDC42 通过与 PI3K 的催化亚单位  $\beta$ (p110 $\beta$ )结合,活化 PI3K,并下调 PTEN 的表达<sup>[26-27]</sup>。

1.2.2 mTOR 通路及 IVA 药物:哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种调节细胞生长与增殖的丝氨酸/苏氨酸激酶,也是 mTOR 复合体 1(mTOR complex 1, mTORC1)和 mTOR 复合体 2(mTOR complex 2, mTORC2)的关键亚基。mTORC1 参与了卵泡激活过程中颗粒细胞的活动,而 mTORC2 与卵泡存活相关<sup>[23,28]</sup>。

TSC1(hamartin)与 TSC2(tuberin)的复合物 TSC1/TSC2 是 mTORC1 的抑制物。活化后的细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、p90 核糖体 S6 激酶(p90 ribosomal S6 kinase, RSK)等激酶使 TSC1/TSC2 磷酸化后失活, mTORC1 的活性增强,对核糖体蛋白 S6 激酶  $\beta$ -1(ribosomal protein s6 kinase beta-1, S6K1)的磷酸化增强, S6K1 被激活,增强了核糖体蛋白 S6(ribosomal protein S6, rpS6)的磷酸化程度, rpS6 的磷酸化增强了核糖体的翻译效率,促进了卵泡的发育<sup>[22-23, 28-29]</sup>。

值得一提的是,前述“PTEN/PI3K/Akt 信号通路”中 Akt 激酶也可以磷酸化 TSC1/TSC2 复合物<sup>[28]</sup>,进而激活 mTORC1 及下游基因,两个通路存在串扰(crosstalk),对 PTEN/PI3K/Akt 通路的激活也将提升 mTOR 通路的活化程度。

目前一些药物处理 IVA 方案的效果已在实验或临床治疗中得到肯定(图 1):应用白藜芦醇(resveratrol, RSV)激活沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silencing information regulator 2 related enzyme 1, SIRT1), SIRT1 发挥转录因子作用,与 Akt 和 mTOR 的启动子结合,增强 Akt 与 mTOR 的表达<sup>[30]</sup>;应用磷脂酸(phosphatidic acid, PA)激活 mTOR<sup>[9, 31]</sup>;应用普萘洛尔(propranolol, PRO)抑制磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphatase, PAP)的活性,进而抑制 PA 转化为二酰甘油(diacylglycerol, DG),间接激活 mTOR<sup>[31]</sup>。



注：“\*”表示用于 IVA 的药物，“↑”表示激活，“T”表示抑制，实线表示直接的调控，虚线表示潜在/间接的调控；标记为“★”的“↑”表示转录因子在细胞质与细胞核之间的移动方向

Note: “\*” indicates drugs used for IVA, “↑” indicates activation, “T” indicates repression, solid line indicates direct regulation, dashed line indicates potential/indirect regulation; “↑” marked with “★” indicates the direction of transcription factor movement between cytoplasm and nucleus

图 1 PTEN/PI3K/Akt 通路与 mTOR 通路在卵泡激活中的作用机制

Fig 1 Mechanisms of PTEN/PI3K/Akt pathway and mTOR pathway in follicular activation

1.2.3 Hippo 通路与 IVA 过程中的机械刺激：Hippo 通路与器官大小和细胞增殖相关，该通路的过度激活将导致黑腹果蝇出现巨大器官的表型，外观形似河马，因此称为 Hippo 通路<sup>[32]</sup>。

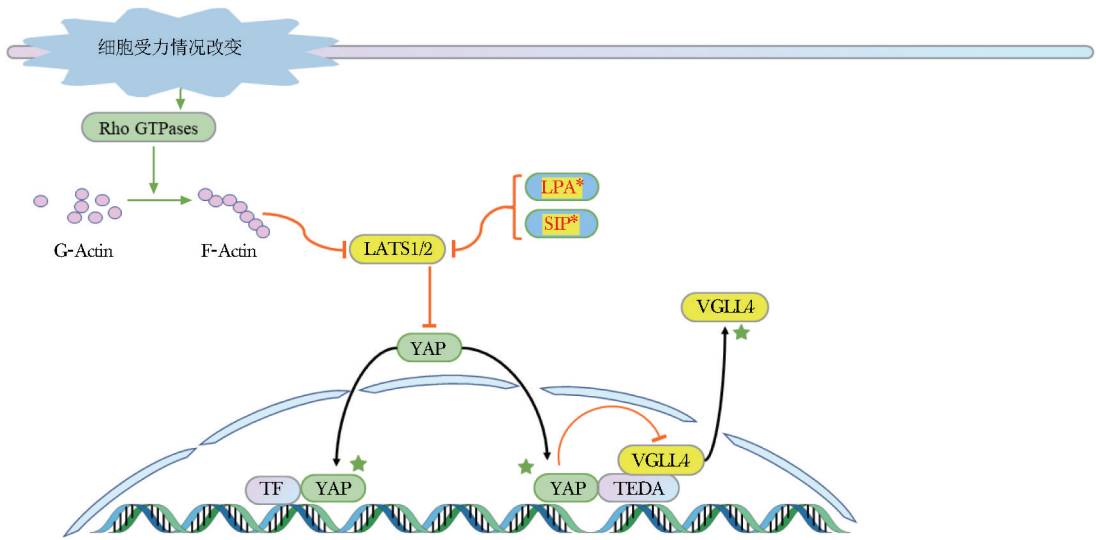
机械信号（细胞受力改变）将改变 Rho GTP 酶（Rho GTP-ases）的活性，进而引起肌动蛋白细胞骨架的重塑，G-肌动蛋白（G-actin）聚合为 F-肌动蛋白（F-actin）后，降低了 LATS1/2 激酶（large tumor suppressor kinase 1/2）的磷酸化水平，LATS1/2 的活性被抑制，对 yes-相关蛋白（yes-associated protein, YAP）的磷酸化减弱，YAP 的活性增强；F-肌动蛋白也可以通过其他途径激活 YAP，活化后的 YAP 由胞质转移至核内，与 VGLL4（vestigial like family member 4）竞争性结合转录增强相关结构域（transcriptional enhanced associate domain, TEAD），从而使 VGLL4-TEAD 的转录抑制转向 YAP-TEAD 的转录增强；同时 YAP 与其他转录因子的结合也将发挥转录增强作用，生长因子与抗凋亡因子的表达量增加<sup>[21-22, 32]</sup>。

溶血磷脂酸（lysophosphatidic acid, LPA）和鞘氨醇-1-磷酸（sphingosine-1-phosphate, SIP）等信号也具有抑制 LATS1/2 的活性和关闭 Hippo 通路的功能<sup>[32]</sup>。上述信号通路共同参与早期卵泡的激活发育，然而应用 SIP 抑制 LATS1/2 活性并未促进卵泡的激活和生长<sup>[33]</sup>。

考虑到 Hippo 通路对机械作用的敏感性，近几年出现了卵巢皮质碎片化<sup>[34]</sup>和卵巢活检/划痕<sup>[35]</sup>抑制 Hippo 通路的非药物 IVA 方案，因其操作便捷、可避免培养阶段的潜在损伤、无需两次手术和高效激活等优势获得更多临床医生的关注。

卵巢皮质碎片化也能破坏较为坚韧的皮质，减少卵泡的空间限制，促进卵泡的扩张与进一步发育<sup>[36]</sup>。IVA 本身造成的卵巢机械性损伤与无菌性炎症反应也将产生类似碎片化的效果，同时产生大量细胞因子与生长因子，改善卵泡所处的内分泌环境，这些改变对未接受 IVA 的卵泡活化也有促进作用，这一过程类似于正常排卵的良性刺激<sup>[35]</sup>。关于 Hippo 通路的作用机制参见图 2。





注：“\*”表示用于 IVA 的药物，“↑”表示激活，“T”表示抑制，实线表示直接的调控，虚线表示潜在/间接的调控；标记为“★”的“↑”表示转录因子在细胞质与细胞核之间的移动方向  
Note：“\*” indicates drugs used for IVA，“↑” indicates activation，“T” indicates repression，solid line indicates direct regulation，dashed line indicates potential/indirect regulation；“↑” marked with “★” indicates the direction of transcription factor movement between cytoplasm and nucleus

图 2 Hippo 通路在卵泡激活中的作用机制  
Fig 2 Hippo pathway in follicular activation

2 IVA 的优化:减轻痛苦与提高效率

2.1 常规的 IVA 流程

常规的 IVA 的流程包括组织获取、体外激活与组织回植,卵巢皮质活检/划痕不在本节讨论范畴之内。

2.1.1 通过腹腔镜手术获取卵巢皮质:不同方案的组织需求量差异很大,早期的药物处理 IVA 方案 [bpV(HOpic) 与 740Y-P 孵育] 需要单侧<sup>[25, 37]</sup>或双侧卵巢<sup>[24]</sup>的全部皮质,改良后的方案(磷脂酸与 740Y-P 孵育)则可减少至单侧卵巢 1/3 的皮质<sup>[9]</sup>。而仅应用皮质碎片化的非药物处理 IVA 方案则需要单侧卵巢 2/3 的皮质<sup>[38-39]</sup>或全部皮质<sup>[40]</sup>。由于 POI 患者残存的小卵泡大多位于皮质表面下 1~2mm 深的范围之内<sup>[37]</sup>,因此对切除组织进行皮髓分离时,仅保留表面 1~2 mm 厚的皮质即可,取出皮质后需要采样活检,以评估患者的卵巢储备情况。

2.1.2 基于药物孵育和碎片化的体外激活:常规的药物孵育液含有人血清白蛋白、抗坏血酸、抗生素与特定的 IVA 药物<sup>[24]</sup>,考虑到药物孵育的效率,药物处理 IVA 方案对皮质碎片化的要求更高,需要将皮质切割为边长 1 mm 左右的立方体<sup>[24-25, 37]</sup>,以保证

表面积与体积之比的最大化,随后进行药物孵育。非药物处理 IVA 方案则更加简便,只需将皮质切割为边长 3~5 mm 的正方形碎片<sup>[39]</sup>即可,甚至边长 5~10 mm 的正方形碎片<sup>[38]</sup>也可以取得较为良好的效果。当然,更完全的切割(边长 1 mm 左右的立方体)<sup>[40]</sup>同样可行。

2.1.3 组织回植的位点选择:考虑到输卵管浆膜下的血运较为丰富,易于移植物成活,也便于经阴道的超声监测和取卵,因此可以将组织碎片回植到输卵管浆膜层下<sup>[24]</sup>,也可以移植到卵巢附近的腹膜囊内<sup>[38-39]</sup>,移植到卵巢同样可行<sup>[9, 40]</sup>。对于边长1 mm 左右的皮质立方体,移植量为 20~100 个<sup>[24-25, 37]</sup>,正方形皮质碎片应当全部移植。

2.2 流程的简化与提效

早期的药物处理 IVA 需要将卵巢皮质体外孵育 2 d,患者接受两次腹腔镜手术,第一次进行卵巢取材,第二次进行组织回植,给患者造成较大的痛苦<sup>[24-25]</sup>。对流程的简化与提效将提高患者的依从性,扩大 IVA 的受众群体。

2.2.1 单次手术内 IVA:将卵巢皮质的处理时间压缩在单次手术的时长极限之内,可以避免第二次的

回植手术。单纯的皮质碎片化处理可于 1 h 内完成<sup>[34]</sup>,而采用 PA 与 740Y-P 可将药物孵育时间压缩至 1 h<sup>[9]</sup>,采用 RSV<sup>[30]</sup>或 EGF<sup>[26]</sup>则可能将孵育时间压缩至 30 min 内。单次手术内 IVA 能减轻患者的痛苦,也能避免长时间体外培养对皮质的潜在损伤,然而采用单次手术内 IVA 的前提是保证较高的卵泡激活效率,这需要临床医生做出审慎的决策。

**2.2.2 个性化 IVA 方案:**由于病因和病程的不同,POI 患者之间存在较大异质性。过度 IVA 将引发早期卵泡的过度活化,对患者的卵巢储备造成浪费。而活化不足将难以获得可供 IVF-ET 的成熟卵泡。此外,手术、漫长繁重的后续治疗(通常 2 个周期,总计约 42 d 的 OI、为期 1 年的随访<sup>[39-40]</sup>)以及失败的结局也给患者带来沉重的身心负担,因此个性化的 IVA 方案很有必要。

POI 的病程与生育力有关。早期 POI 患者的血清 E2 尚能维持在正常水平<sup>[41]</sup>,大多数 POI 患者的自然妊娠发生在确诊后 1 年<sup>[3]</sup>。这种现象可归因于早期 POI 患者仍具有一定的代偿能力,较低的 AMH 水平与较高的 FSH 水平增强了初级募集阶段中卵泡的活化程度,POI 前驱期时产生的窦前卵泡也尚未耗尽,因此窦前卵泡的数量得到扩增,尚能弥补由于循环招募阶段缺失而引发的 E2 不足,也以加速卵巢储备消耗为代价,补充生育力的损失。随着病程的延长,可供活化的卵泡群规模缩小,患者进入失代偿阶段,患者的 E2 水平和生育力也将显著下降,当原始卵泡的数量少于 1 000 时<sup>[23]</sup>,卵巢将彻底进入更年期状态。

考虑到窦前卵泡在 POI 进程中的重要地位,一些研究者建议结合病程、血清 E2 水平与超声下窦卵泡计数(antral follicle counts, AFC)制定个性化的 IVA 策略。对于病程较短、E2 水平尚高、提示存在晚期次级卵泡及窦卵泡的患者,提供仅包含皮质碎片化的单次手术内 IVA;而对于病程较长、E2 水平低的患者,提供结合碎片化的 2 日药物孵育方案<sup>[7]</sup>。然而这种方法的局限在于仅考虑到晚期次级卵泡与窦卵泡,未考虑到原始卵泡与初级卵泡的活化潜力,该方法也基于两个朴素的假设:一是卵泡的发育程度越高,对 IVA 的反应越强烈,二是复杂的 IVA 程序具有更强的活化作用,但这些假设缺乏研究支持。

将初级卵泡与活化后原始卵泡的评估结果纳入策略制定依据,可以对经验方法进行改善,并对 IVA 预后做出更准确的预测。AMH 主要由直径 5~8 mm 的卵泡分泌,血清 AMH 水平或许是较可靠的评估标准。尽管 AMH 水平与初级/次级卵泡的密度仅呈中等相关(Pearson's  $r = 0.34$ )<sup>[42]</sup>,然而在综合卵泡群的活化程度与总体规模后,相关程度可能会更高,血清 AMH 水平在 POI 前驱期和早期将发生骤降,随后维持在极低水平<sup>[41]</sup>,这种现象可能反映了代偿阶段内初级/原始卵泡的大量损失。对于长期 AMH 阴性的患者,偶发的 AMH 阳性提示体内出现卵泡生长,是 OI 的良好时机<sup>[43]</sup>。然而 AMH 水平在不同种群、不同病因的 POI 患者之间存在较大差异<sup>[13, 41]</sup>,因此 AMH 水平在纳入策略依据前,需要经过病因分析与人群背景的校正

综合病因分析、POI 病程、AMH 水平、E2 水平与 AFC 的评估能更全面地反映患者的卵巢活动程度,有助于制定更适合患者的策略,并且能对预后做出更好的预测。而 AMH、FSH 和 E2 等标志物的变化趋势也有望揭示 POI 病情进展中的深层机制,并为 IVA 的方案选择提供理论基础。

## 2.3 内分泌层面的月经周期重建

**2.3.1 IVA 术前 HRT 治疗为回植组织提供月经期的初始环境:**患者在 IVA 术前接受一段时间的 HRT 治疗,将血清 FSH 与 LH 控制在较低水平,在 IVA 术后<sup>[38-39]</sup>或回植组织血运恢复(术后 10~15 日)后<sup>[40]</sup>,终止 HRT,诱发停药性的子宫内膜脱落出血,随后配合 OI、IVF-ET 与随访。

以上方案将为回植组织提供月经期的初始环境(HRT 结束后的低 E2、低 FSH、低 LH 状态),断药后,患者的负反馈机制与 OI 将联合推高 FSH 的水平,模拟了循环招募阶段中 FSH 自低位逐步升高的过程,可以避免活化后的卵泡受到 POI 患者的极低 AMH、极高 FSH 与 LH 的不良影响。

**2.3.2 IVA 术前 HRT 治疗可能有助于提高卵泡波质量:**对于已经表达 FSH 受体的活化 EFs,POI 患者的极高 FSH、极低 AMH 可能会导致这些卵泡过早进入循环招募阶段<sup>[12]</sup>。极高 FSH 也可能导致窦卵泡过早发生 FSH/LH 的优势受体转换,在高水平 LH 作用下发生早熟<sup>[16-17]</sup>。因此内分泌层面的月经周期重建可能有助于提高卵泡波质

量,以及OI与IVF-ET的成功率<sup>[16]</sup>。考虑到HRT的成本较低,并且HRT也有助于改善POI患者的身心状态<sup>[3]</sup>,因此内分泌层面的月经周期重建有较大的推广价值。

### 3 IVA的结语:改进、困境与展望

IVA的预后追踪可以纳入更多指标。AMH的变化可能反映患者IVA后EFs群体的活化程度,可用于预后预测与IVA效果评估。应用生长因子、植回位点预处理<sup>[44]</sup>、血管内皮细胞共植<sup>[45]</sup>等手段可以加快回植组织的血运重建,减少因缺血缺氧和再灌注损伤而引发的原始卵泡损失<sup>[46]</sup>。结合抗凋亡物质的培养则有助于减少因机械损伤造成的卵泡损失<sup>[47]</sup>。IVA的流程仍有较大的改进空间。

IVA的有效性依然值得讨论。目前接受IVA后的患者妊娠率(13.8%)低于自然妊娠率的最乐观估计(14.2%)。尽管IVA已经在POI患者的生殖辅助中得到应用,然而这些临床实验都是单臂研究,缺乏对照组的设置<sup>[8]</sup>,同时考虑到POI患者间的异质性,部分患者依然存在低频/偶发的卵巢活动,卵

巢功能也可能出现自发恢复<sup>[3]</sup>,因此难以对IVA效果进行评价。

IVA的伦理学问题仍未解决。由于卵巢储备的不可恢复,卵巢皮质移植对卵泡池有较大损害,血供恢复期间的缺血缺氧与再灌注损伤可对移植体内50%~90%的卵泡储备造成影响<sup>[48]</sup>,超过70%的卵泡可能因此消失<sup>[49]</sup>,考虑到POI患者几近耗竭的卵巢储备与IVA所需的组织量,以如此大的原始卵泡潜在损失换取尚不明确的效果是否性价比过低?不同方案的效果与不良反应也需要更多的临床实验加以明确,对IVA的应用需更为谨慎。

尽管IVA依然存在争议,然而考虑到IVA的理论价值与研究进展,应当对它的临床实践价值抱有信心,未来的IVA研究需要更多的临床实验和更全面详细的预后追踪。同时也应该意识到目前的POI诊断、分类与分级具有局限性,对患者卵巢状态也缺乏更精确的评估方法,这严重阻碍了POI生殖辅助的研究进程。如上述问题得到充分研究和深入了解,IVA将在POI生殖辅助领域发挥更大价值。

### 参考文献:

- [1] 陈子江,秦杰,乔杰,等.早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2017,52:577-581.
- [2] Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, *et al.* The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis[J]. Climacteric, 2019, 22: 403-411.
- [3] Panay N, Anderson RA, Nappi RE, *et al.* Premature ovarian insufficiency: an International Menopause Society White Paper[J]. Climacteric, 2020, 23: 426-446.
- [4] Fraison E, Crawford G, Casper G, *et al.* Pregnancy following diagnosis of premature ovarian insufficiency: a systematic review[J]. Reprod Biomed Online, 2019, 39: 467-476.
- [5] Maruyama T. A woman with primary ovarian insufficiency had two live births resulting from intrauterine inseminations during 10 years of ovarian follicle monitoring[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46: 2159-2163.
- [6] Vo KCT, Kawamura K. *In vitro* activation early follicles: from the basic science to the clinical perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 3785.
- [7] Hsueh AJW, Kawamura K. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients[J]. Fertil Steril, 2020, 114: 458-464.
- [8] Wang W, Todorov P, Isachenko E, *et al.* *In vitro* activation of cryopreserved ovarian tissue: A single-arm meta-analysis and systematic review[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2021, 258: 258-264.
- [9] Zhai J, Zhang J, Zhang L, *et al.* Autotransplantation of the ovarian cortex after in-vitro activation for infertility treatment: a shortened procedure[J]. Hum Reprod, 2021, 36: 2134-2147.
- [10] McGee EA, Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles[J]. Endocrine Rev, 2000, 21: 200-214.
- [11] Lew R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure

- [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2019, 55: 2-13.
- [12] Dewailly D, Andersen CY, Balen A, *et al.* The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women[J]. Hum Reprod Update, 2014, 20: 370-385.
- [13] Anderson RA, Nelson SM. Anti-Mullerian hormone in the diagnosis and prediction of premature ovarian insufficiency [J]. Semin Reprod Med, 2020, 38: 263-269.
- [14] Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human; a model from preliminary results[J]. Hum Reprod, 1986, 1: 81-87.
- [15] Mauri D, Gazouli I, Zarkavelis G, *et al.* Chemotherapy associated ovarian failure [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 572388.
- [16] Lawrenz B, Coughlan C, Melado L, *et al.* Step-down of FSH- dosage during ovarian stimulation - basic lessons to be learnt from a randomized controlled trial[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 661707.
- [17] Arroyo A, Kim B, Yeh J. Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact [J]. Reprod Sci, 2020, 27: 1223-1252.
- [18] Baerwald A, Pierson R. Ovarian follicular waves during the menstrual cycle: physiologic insights into novel approaches for ovarian stimulation[J]. Fertil Steril, 2020, 114: 443-457.
- [19] Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review[J]. Hum Reprod Update, 2012, 18: 73-91.
- [20] Maidarti M, Anderson RA, Telfer EE. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt signalling and DNA damage in the oocyte: implications for primordial follicle activation, oocyte quality and ageing[J]. Cells, 2020, 9: 200.
- [21] Masciangelo R, Hossay C, Chiti MC, *et al.* Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37: 101-108.
- [22] Terren C, Munaut C. Molecular basis associated with the control of primordial follicle activation during transplantation of cryopreserved ovarian tissue [J]. Reprod Sci, 2021, 28: 1257-1266.
- [23] Ford EA, Beckett EL, Roman SD, *et al.* Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency[J]. Reproduction, 2020, 159: 15-29.
- [24] Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: 17474-17479.
- [25] Zhai J, Yao G, Dong F, *et al.* *In vitro* activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101: 4405-4412.
- [26] Zhang J, Yan L, Wang Y, *et al.* *In vivo* and *in vitro* activation of dormant primordial follicles by EGF treatment in mouse and human[J]. Clin Transl Med, 2020, 10: 182.
- [27] Yan H, Zhang J, Wen J, *et al.* CDC42 controls the activation of primordial follicles by regulating PI3K signaling in mouse oocytes[J]. BMC Biol, 2018, 16: 73.
- [28] Correia B, Sousa MI, Ramalho-Santos J. The mTOR pathway in reproduction: from gonadal function to developmental coordination [J]. Reproduction, 2020, 159: 173-188.
- [29] Condon KJ, Sabatini DM. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance[J]. J Cell Sci, 2019, 132: 222570.
- [30] Zhang T, Du X, Zhao L, *et al.* SIRT1 facilitates primordial follicle recruitment independent of deacetylase activity through directly modulating Akt1 and mTOR transcription[J]. FASEB J, 2019, 33: 14703-14716.
- [31] Sun X, Su Y, He Y, *et al.* New strategy for *in vitro* activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators[J]. Cell Cycle, 2015, 14: 721-731.
- [32] Ma S, Meng Z, Chen R, *et al.* The Hippo pathway: biology and pathophysiology[J]. Annu Rev Biochem, 2019, 88: 577-604.
- [33] Pors SE, Harethardottir L, Olesen HO, *et al.* Effect of sphingosine-1-phosphate on activation of dormant follicles in murine and human ovarian tissue [J]. Mol Hum Reprod, 2020, 26: 301-311.
- [34] Tanaka Y, Hsueh AJ, Kawamura K. Surgical approaches of drug-free *in vitro* activation and laparoscopic ovarian incision to treat patients with ovarian infertility [J]. Fertil Steril, 2020, 114: 1355-1357.
- [35] Zhang X, Han T, Yan L, *et al.* Resumption of ovarian function after ovarian biopsy/scratch in patients with premature ovarian insufficiency[J]. Reprod Sci, 2019, 26: 207-213.
- [36] Ouni E, Bouzin C, Dolmans MM, *et al.* Spatiotemporal changes in mechanical matrisome components of the human ovary from prepuberty to menopause[J]. Hum Reprod, 2020, 35: 1391-1410.



- [37] Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, *et al.* Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30: 608-615.
- [38] Fabregues F, Ferreri J, Calafell JM, *et al.* Pregnancy after drug-free *in vitro* activation of follicles and fresh tissue autotransplantation in primary ovarian insufficiency patient: a case report and literature review[J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11: 76.
- [39] Ferreri J, Fabregues F, Calafell JM, *et al.* Drug-free *in vitro* activation of follicles and fresh tissue autotransplantation as a therapeutic option in patients with primary ovarian insufficiency[J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40: 254-260.
- [40] Kawamura K, Ishizuka B, Hsueh AJW. Drug-free *in vitro* activation of follicles for infertility treatment in poor ovarian response patients with decreased ovarian reserve [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40: 245-253.
- [41] Jiao X, Meng T, Zhai Y, *et al.* Ovarian reserve markers in premature ovarian insufficiency: within different clinical stages and different etiologies [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 601752.
- [42] von Wolff M, Roumet M, Stute P, *et al.* Serum anti-Müllerian hormone (AMH) concentration has limited prognostic value for density of primordial and primary follicles, questioning it as an accurate parameter for the ovarian reserve[J]. *Maturitas*, 2020, 134: 34-40.
- [43] Kasahara Y, Osuka S, Bayasula, *et al.* Very low levels of serum anti-müllerian hormone as a possible marker for follicle growth in patients with primary ovarian insufficiency under hormone replacement therapy [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28: 31-36.
- [44] Piver P, Sallee C, Durand LM, *et al.* Robot-assisted laparoscopic auto-graft of patchwork ovarian cortex in two steps [J]. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, 2020, 49: 101730.
- [45] Man L, Park L, Bodine R, *et al.* Co-transplantation of human ovarian tissue with engineered endothelial cells: a cell-based strategy combining accelerated perfusion with direct paracrine delivery [J]. *J Vis Exp*, 2018, 135:57472.
- [46] Lim M, Thompson JG, Dunning KR. HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH: Hypoxia and ovarian function: follicle development, ovulation, oocyte maturation [J]. *Reproduction*, 2021, 161: F33-F40.
- [47] Guzel Y, Bildik G, Oktem O. Sphingosine-1-phosphate protects human ovarian follicles from apoptosis *in vitro* [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018, 222: 19-24.
- [48] Dolmans MM, Donnez J, Cacciotola L. Fertility preservation: the challenge of freezing and transplanting ovarian tissue[J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27: 777-791.
- [49] Olesen HO, Pors SE, Jensen LB, *et al.* N-acetylcysteine protects ovarian follicles from ischemia-reperfusion injury in xenotransplanted human ovarian tissue [J]. *Hum Reprod*, 2021, 36: 429-443.