

Metnrl 在子宫内膜容受性调控中的作用及其 表达异常与反复种植失败的关联*

关艳丽, 罗朵朵

(黄河三门峡医院 妇产科, 河南 三门峡 472400)

摘要: **目的** 分析镍纹样蛋白 (Metnrl) 表达与不孕症患者子宫内膜容受性及反复种植失败 (RIF) 的关联。**方法** 本文为回顾性研究, 选取 2020 年 10 月至 2022 年 12 月黄河三门峡医院收治的 113 例不孕症患者, 所有患者均采用体外受精/卵细胞浆内单精子注射-胚胎移植 (IVF/ICSI-ET) 进行辅助生殖 (ART) 治疗, 根据 ART 治疗结果, 将种植成功的 60 例患者列为成功组, 将 RIF 的 53 例患者列为失败组, 检测并对比两组患者的子宫内膜容受性相关指标及 Metnrl 表达情况, 经 Spearman 相关性系数验证 Metnrl 表达与子宫内膜容受性的相关性, 通过绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线并参考线下面积 (AUC) 验证 Metnrl 表达对不孕症患者 RIF 结局的预测效能。**结果** 经检测, 失败组的子宫内膜厚度为 (10.25 ± 3.41) mm, 子宫内膜容积为 (4.14 ± 2.26) mL, 均低于成功组 [(12.33 ± 3.24) mm、 (5.77 ± 2.38) mL], 子宫内膜血流阻力指数 (RI) 为 (2.44 ± 0.75) , 高于成功组 (1.88 ± 0.27) ($P < 0.05$)。经检测, 失败组的胎盘蛋白 14 (PP14) 表达水平为 (23.44 ± 5.28) μ g/L, 半乳糖凝集素-1 (GAL-1) 表达评分为 (4.15 ± 1.26) 分, 骨桥蛋白 (OPN) 分子表达量为 (38.24 ± 10.46) kDa, 均低于成功组 [(26.25 ± 5.16) μ g/L、 (5.44 ± 1.76) 分、 (45.33 ± 10.37) kDa] ($P < 0.05$)。失败组的 Metnrl 表达水平为 (95.25 ± 20.61) pg/mL, 高于成功组 (78.24 ± 20.16) pg/mL ($P < 0.05$)。经 Spearman 相关性系数检验, Metnrl 表达与子宫内膜厚度、子宫内膜容积、PP14、GAL-1、OPN 负相关, 与 RI 正相关。经 ROC 曲线验证, Metnrl 高表达对不孕症患者 RIF 的预测灵敏度为 80.25%、特异度为 78.33%, 截断值为 90.45 pg/mL, AUC 值为 0.855。**结论** Metnrl 表达水平与子宫内膜容受性密切相关, 高表达 Metnrl 为导致不孕症患者 RIF 结局的危险因素, 当 Metnrl 表达 ≥ 90.27 pg/mL, 不孕症患者更易出现 RIF。

关键词: 不孕症; 反复种植失败; 镍纹样蛋白; 子宫内膜容受性; 相关性分析

中图分类号: R711.6

Role of Metnrl in regulation of endometrial receptivity and the association between its abnormal expression and repeated implantation failure*

GUAN Yanli, LUO Duoduo

(Department of Obstetrics and Gynecology, Yellow River Sanmenxia Hospital, Sanmenxia, Henan 472400, China)

Abstract: **[Objective]** To analyze the association between Metnrl expression and endometrial receptivity and repeated implantation failure (RIF) in infertility patients. **[Methods]** This article is a retrospective study, with cases included from October 2020 to December 2022. The study subjects were 113 infertile patients, all of whom were treated with *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer (IVF/ICSI-ET) for assisted reproductive technology (ART). Based on the results of ART treatment, 60 patients with successful implantation were classified as the success group, and 53 patients with RIF were classified as the failure group. The endometrial receptivity related indicators and Metnrl expression of the two groups of patients were tested and compared. The correlation between Metnrl expression and endometrial receptivity was verified by Spearman correlation coefficient, and the predictive efficacy of Metnrl expression on RIF outcomes in infertile patients was verified by plotting receiver operating characteristic (ROC) curve and referencing the area under the curve (AUC). **[Results]** After testing,

收稿日期: 2023-07-28

* 基金项目: 河南省医学科技攻关项目 (LHGJ202101273)

the endometrial thickness and volume of the failed group were 10.25 ± 3.41 mm and 4.14 ± 2.26 mL, respectively, which were lower than those of the successful group (12.33 ± 3.24 mm and 5.77 ± 2.38 mL). Endometrial blood flow resistance index (RI) of the failed group was 2.44 ± 0.75 , which was higher than that of the successful group (1.88 ± 0.27) ($P < 0.05$). After testing, the expression level of PP14 was 23.44 ± 5.28 $\mu\text{g/L}$, GAL-1 expression score was 4.15 ± 1.26 points, and OPN molecular expression level was 38.24 ± 10.46 kDa in the failed group, which were lower than those in the successful group (26.25 ± 5.16 $\mu\text{g/L}$, 5.44 ± 1.76 points, and 45.33 ± 10.37 kDa ($P < 0.05$). The expression level of Metrnl in the failed group was 95.25 ± 20.61 pg/mL, which was higher than that in the successful group (78.24 ± 20.16 pg/mL ($P < 0.05$). After Spearman correlation coefficient test, the expression of Metrnl was negatively correlated with endometrial thickness, endometrial volume, PP14, GAL-1, OPN, and positively correlated with RI. The ROC curve showed that the sensitivity, specificity, cut-off value and AUC value of Metrnl high expression for predicting RIF in infertile patients were 80.25%, 78.33%, 90.45 pg/mL and 0.855 respectively. **【Conclusion】** The expression level of Metrnl is closely related to endometrial receptivity, and high expression of Metrnl is a risk factor for RIF outcomes in infertile patients. When Metrnl expression is not lower than 90.27 pg/mL, infertile patients are more likely to develop RIF.

Keywords: infertility; repeated planting failure; Nickel like secretory protein; endometrial receptivity; correlation analysis

目前认为,当女性在无任何避孕措施的规律性生活下持续 12 个月仍未受孕时即可诊断为不孕症,此病可由多种生理性因素导致,盆腔结构、功能异常,排卵障碍,或先天性染色体基因异常均为其常见致病原因,除此之外,不孕症还考虑与患者吸烟、酗酒、吸毒等不良生活习惯密切相关^[1-2]。人类辅助生殖技术(ART)为一项替代正常人类受孕过程的生殖医学技术,目前较为常见的 ART 技术主要包括人工受精 AI、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)等两种类型,其中体外受精/单精子卵胞浆内显微注射(IVF/ICSI)为一常见 IVF-ET 技术^[3]。以上 ART 技术均可多个不孕不育家庭带去生育福音,经 ART 治疗后临床不孕症患者的胚胎着床率可超过 60%^[4]。但实践表明,有部分患者经多次优质胚胎移植后仍无法成功妊娠,反复种植失败(RIF)已成为阻碍 ART 技术的主要瓶颈问题^[5]。镍纹样蛋白(Metrnl)为一种由骨骼肌及白色脂肪组织合成、分泌的细胞因子,可参与人体脂肪、黏膜、皮肤组织及神经系统多种生理功能,研究指出^[6],高表达 Metrnl 或可通过活化不孕症患者生殖神经系统而损伤子宫受容性。本研究旨在分析 Metrnl 表达与不孕症患者子宫内膜受容性及 RIF 的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本文为回顾性研究,病例纳入 2020 年 10 月至 2022 年 12 月黄河三门峡医院收治的 113 例不孕症患者,所有患者均接受辅助生殖(ART)治疗,根据治疗结果,将患者分为成功组(60 例,

胚胎种植成功)、失败组(53 例,胚胎种植失败)。成功组患者年龄 22~30 岁,平均(26.33 ± 5.16)岁;不孕年限 3~6 年,平均(4.52 ± 1.33)年;不孕类型:31 例为原发型不孕,29 例为继发型不孕。失败组患者年龄 23~29 岁,平均(26.55 ± 5.23)岁;不孕年限 4~5 年,平均(4.55 ± 1.28)年;不孕类型:26 例为原发型不孕,27 例为继发型不孕。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本次研究已获得医院伦理委员会批准(U02939)。

纳入标准:①入组患者均符合不孕症诊断要点^[7];②符合 ART 治疗指征,具体治疗方案为 IVF/ICSI-ET^[8];③均知悉此次研究试验目的及内容,同意获取并公开既往临床资料。

排除标准:①患者本人或伴侣存在先天性染色体异常者;②伴严重心脑血管疾病者;③恶性肿瘤者;④伴其他内分泌异常疾病者;⑤临床资料缺失者。

1.2 研究方法

所有患者均采用体外受精/卵细胞浆内单精子注射-胚胎移植(IVF/ICSI-ET)治疗,根据治疗结果,将种植成功的 60 例患者列为成功组,将 RIF 的 53 例患者列为失败组,检测并对比两组患者的子宫内膜受容性相关指标及 Metrnl 表达情况。RIF 判定标准^[9]:经过 3 个周期 ET 治疗或累积优质卵裂期胚胎移植数 ≥ 4 枚或优质囊胚移植数 ≥ 3 枚但认为成功妊娠者。

Metrnl 检测方法:统一采集患者外周静脉血作抗凝处理后,按转速 3 000 r/min、半径 10 cm 离心

5 min 后，将血清样本送入 AU5800 型全自动生化分析仪 [美国，贝克曼库尔特公司，国食药监械（进）字 2010 第 2402510 号] 中检测并对比 MetrnI 表达水平，检测方法为酶联免疫吸附试验。

1.3 观察指标

①采用荷兰飞利浦 EPIQ7C 型多普勒超声（南京恒腾电子科技有限公司，国械注进 20193062262）检测并对比两组患者的子宫内膜厚度、子宫内膜容积及子宫动脉血流阻力指数（RI）。②以患者外周静脉血清为检测样本，经 AU5800 型全自动生化分析仪（美国贝克曼库尔特）检测并对比两组患者的胎盘蛋白 14（PP14）表达水平；将子宫体切片进行常规石蜡切片进行脱蜡处理，后加入 0.01 mmol/L 的柠檬酸钠缓冲溶液修复切片组织中抗原；应用磷酸盐缓冲液对样本进行反复冲洗，后加入 1：10 的半乳糖凝集素-1（GAL-1）单抗稀释后孵育 120 min；反复冲洗 3 次后加入二氨基联苯胺 [北京沃凯生物科技有限公司，沪食药监械（准）字 2013 第 1401615 号] 进行原位杂交显色反应并依次采用苏木素复染，于显微镜下随机观察并评估阳性细胞比例及染色强度，未着色记 0 分，着色范围<30% 记 1 分，着色范围 30%~<70% 记 2 分，若着色范围 70%~100% 记 3 分，未染色、淡黄色、黄色、棕黄色评分依次记为 0 分、1 分、2 分、3 分，表达评分=着色范围评分×染色评分^[10]；取外周静脉血为检测样本，经抗凝、离心后在-80℃下保存备用，经 Trizol 法提取血清样本中总 RNA，并取 5 μL 总 RNA 加入至浓度为 2% 的琼脂糖凝胶中电泳检测 RNA 纯度及完整性；将 RNA 逆转录为 cDNA 后检测血清骨桥蛋白（OPN）mRNA 表达情况，通过实时荧光定量分析法在 95℃ 环境下预变性 10 min 后，参考引物序列计算 OPN mRNA 的分子表达量。

1.4 统计学方法

数据均采用软件 SPSS 22.0 处理，计数资料以百分率（%）表示，用 χ^2 检验；计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，用 t 检验；经 Spearman 相关性系数验证 MetrnI 表达水平与子宫内膜受容性参数间的相关性；通过绘制受试者工作特征（ROC）曲线并参考曲线下面积（AUC）验证 MetrnI 表达水平对不孕症患者 RIF 结局的预测效能。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的子宫内膜受容性超声指标比较

经检测，失败组的子宫内膜厚度、子宫内膜容积均低于成功组，RI 高于成功组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。见表 1。

表 1 两组患者的子宫内膜受容性超声指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	子宫内膜厚度/mm	子宫内膜容积/mL	RI
失败组	53	10.25±3.41	4.14±2.26	2.44±0.75
成功组	60	12.33±3.24	5.77±2.38	1.88±0.27
<i>t</i>		3.323	3.720	3.612
<i>P</i>		0.001	<0.001	0.001

2.2 两组患者的子宫内膜受容性生物学指标比较

经检测，失败组的 PP14 表达水平、GAL-1 表达评分、OPN 分子表达量均低于成功组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。见表 2。

表 2 两组患者的子宫内膜受容性生物学指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PP14/(μg/L)	GAL-1/分	OPN/kDa
失败组	53	23.44±5.28	4.15±1.26	38.24±10.46
成功组	60	26.25±5.16	5.44±1.76	45.33±10.37
<i>t</i>		2.858	4.426	3.612
<i>P</i>		0.005	<0.001	0.001

2.3 MetrnI 表达与子宫内膜受容性相关性分析

失败组的 MetrnI 表达水平为 (95.25 ± 20.61) pg/mL，高于成功组 (78.24 ± 20.16) pg/mL，差异有统计学意义 ($t=4.429$ ； $P<0.001$)。经 Spearman 相关性系数检验，MetrnI 表达与子宫内膜厚度、子宫内膜容积、PP14、GAL-1、OPN 负相关，与 RI 正相关。见表 3。

表 3 MetrnI 表达与子宫内膜受容性相关性分析

指标	<i>r</i>	<i>P</i>
子宫内膜厚度	-0.154	0.005
子宫内膜容积	-0.151	0.009
RI 指数	0.252	0.012
PP14	-0.155	0.011
GAL-1	-0.153	0.007
OPN	-0.152	0.008

2.4 MetrnI 表达对 RIF 预测效能分析

经 ROC 曲线验证，MetrnI 水平越高，不孕症患者发生 RIF 的风险越高，高表达对不孕症患者 RIF 的预测灵敏度为 80.25%（95%CI：72.30~

88.40)、特异度为 78.33% (95%CI: 70.30~85.50), 截断值为 90.45 pg/mL, AUC 值为 0.855 (95%CI: 0.792~0.895), 见图 1。

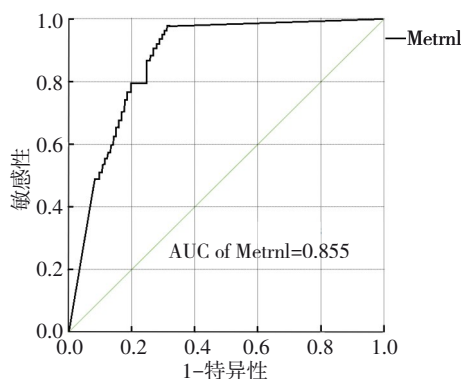


图 1 Metrnl 表达与 RIF 的 ROC 图

3 讨论

女性不孕症为一种常见生育障碍,其发病考虑与生殖系统畸形、子宫机能不全、子宫结构异常、子宫病变、输卵管及其周围组织病变等多种因素密切相关,而体内雌激素水平紊乱为导致上述病理、生理变化的重要原因^[11]。ART 技术能满足广大不孕不育家庭的生育需求,但 RIF 为 ART 技术的主要瓶颈,在所有 RIF 患者中,30% 左右患者着床失败是因胚胎质量不佳导致,另有超过 60% 患者着床失败是由子宫内受容性低下引起^[12]。子宫内膜受容性为子宫内膜允许囊胚定位、吸附并植入使其成功着床的状态,一般在女性排卵第 6~8 日及成功受精 1 周内其子宫内膜受容性可达到最高值,目前临床会通过应用超声技术及分子生物学技术实现对女性子宫内膜受容性的客观评估^[13]。

本研究结果显示,ART 失败组子宫内膜厚度、子宫内膜容积均低于成功组,RI 指数高于成功组,PP14 表达水平、GAL-1 表达评分、OPN 分子表达量均低于成功组,提示在不孕症患者接受 ART 治疗后,子宫内膜受容性差异为影响患者治疗效果及种植成功率的重要因素。PP14 为一种由子宫内膜表面分泌的糖蛋白因子,可通过抑制子宫内自然杀伤细胞活性而避免胚胎被母体免疫系统所排斥,PP14 评估子宫内膜功能的指标,但即便在激素水平达峰后,不孕症患者的 PP14 仍处于较低水平^[14]。研究指出^[15],GAL-1 可通过诱导 T 细胞凋亡而参与调节子宫内膜受容性的形成及胚泡着床等生物学过程并维持整个妊娠,若 GAL-1 表达下

调则提示内膜中胚胎延迟或未成功着床。除上述分泌蛋白外,OPN 作为一种复合识别无,在子宫内膜表面也可呈特异性表达,可在子宫内膜种植窗期明显上升^[16]。Metrnl 为一种可广泛存在于人体骨骼肌、脂肪、黏膜、皮肤组织及神经系统中的细胞因子,除可作为脂肪因子调节机体能量代谢外,Metrnl 还可通过介导巨噬细胞 M2 受体而促使炎症反应发生,且 Metrnl 还可在 Janus 激酶/信号传导/转录激活子 3 以及有丝分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶等两种通路介导下,通过参与中枢神经母细胞迁移、突起等生命过程而影响胚胎生长发育^[17]。本研究结果显示,失败组患者的 Metrnl 表达水平明显高于成功组。曹阳阳等^[18]研究指出,多囊卵巢综合征(PCOS)患者的 Metrnl 表达水平较健康女性明显更高,该学者认为,Metrnl 可作为脂肪因子参与女性肥胖、诱发 PCOS,并最终导致女性不孕。本研究经 Spearman 相关性系数检验后得知,Metrnl 表达与子宫内膜厚度、子宫内膜容积、PP14、GAL-1、OPN 负相关,与 RI 正相关,提示 Metrnl 高表达或可加剧子宫内受容性异常并引起 RIF 结局。

综上所述,Metrnl 高表达可严重影响不孕症患者的子宫内膜受容性,Metrnl 表达水平越高,不孕症患者 ART 治疗期间发生 RIF 的风险也越高。

参考文献

- [1] ROMEIRO J, CALDEIRA S. The human responses and nursing diagnoses of those living with infertility: a qualitative systematic review[J]. Int J Nurs Knowl, 2019, 30(3): 173-189.
- [2] 黎欣盈,张念樵,钟筱华,等. 人类辅助生殖技术应用的伦理问题及工作实践[J]. 中国医学伦理学, 2021, 34(7): 856-860.
- [3] 付景丽,丁秋霞,黄燕. 人类辅助生殖技术的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2019, 28(5): 418-421.
- [4] 陈丹,唐莉,龙艳喜,等. 辅助生殖助孕捐卵患者临床问题分析和对策研究[J]. 医学争鸣, 2021, 12(6): 39-43.
- [5] 李红真. 反复着床失败患者种植窗研究新进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022, 42(5): 509-512.
- [6] 李蕾,范英英,李净羽,等. 子宫内膜损伤在辅助生殖中应用的研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2021, 37(1): 32-35.
- [7] 陈子江,刘嘉茵,黄荷凤,等. 不孕症诊断指南[J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(8): 505-511.
- [8] 彭清妹,周志军,黄筱金. 体外受精或卵胞浆内单精子显微注射的 GnRH 拮抗剂方案中应用 rLH 与 rFSH 的有效性及安全性 Meta 分析[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(11): 958-963.
- [9] 何生燕,鲜红. 胚胎反复种植失败不孕症患者血清抗凝血酶活性、D 二聚体水平及血小板聚集率变化[J]. 血栓与止血学, 2020, 26(1): 15-17.

[10] 江娜,王秀虹. 半乳糖凝集素-1、p16蛋白表达与宫颈癌患者临床特征的关系[J]. 癌症进展, 2019, 17(14): 1707-1709.

[11] BEDENK J,VRTAČNIK-BOKAL E, VIRANT-KLUN I. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37(1): 89-100.

[12] 韩逸凡,张颖,刁红录,等. 辅助生殖技术子宫内腔容受性评估方法研究进展[J]. 湖北医药学院学报, 2021, 40(5): 548-553.

[13] 余彩茶,水旭娟,焦岩,等. 子宫动脉及内膜血流在评估子宫内腔容受性及预测妊娠结局中的应用价值[J]. 医学研究杂志, 2022, 51(3): 75-79.

[14] 杨曦,李慕军. 子痫前期患者胎盘蛋白 14 与 Th17/Treg 平衡的相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(12): 2142-2146.

[15] 诸静,冒丽静. 子宫内膜异位症患者血清中 Gal-1 和 CRH 水平变化及临床意义[J]. 天津医药, 2022, 50(9): 965-969.

[16] 梅忆媛,王晓博,谢青贞. 骨桥蛋白在体外对小鼠子宫内膜蜕膜化的调节作用[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022, 42(1): 65-71.

[17] JUNG TW, LEE SH, KIM HC, et al. METRNL attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance via AMPK or PPARδ-dependent pathways in skeletal muscle of mice[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(9): 1-11.

[18] 曹阳阳,宋秀英,赵莉,等. 多囊卵巢综合征患者血清镍纹样蛋白水平检测的临床意义及与实验室指标的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(2): 111-113, 125.

(张咏 编辑)