

同源组织工程生物补片在阴道重建中的实验研究

李雅倩¹, 周逸丹², 陈娜², 朱兰^{2*}

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(项目编号: 2017-I2M-1-002); 国家自然科学基金(项目编号: 81830043); 北京市自然科学基金(项目编号: 7192154); 中国科学院战略性科技先导专项项目(项目编号: XDA16010102)

作者单位: 100730 北京, 中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院, 1. 医学科学研究中心; 2. 妇产科

作者简介: 李雅倩, 毕业于清华大学, 博士, 研究实习员, 主要研究方向为盆底功能障碍性疾病、组织工程及干细胞治疗

* 通信作者, E-mail: zhu_julie@vip.sina.com

【摘要】目的 探讨猪皮来源的组织工程生物补片对实验猪阴道缺损模型阴道重建的效果。**方法** 建立中国小型实验猪的阴道缺损模型并植入组织工程生物补片重建阴道。在术后1、2、4、6、8周分别取阴道全层, 每次1只, 其中第4周两只。手术前取其中2只实验猪的正常阴道作为对照组。对不同时间段的阴道全层进行HE染色以观察组织的生长情况; 免疫组化检测上皮光谱角蛋白AE1/AE3、层粘连蛋白Laminin和平滑肌肌动蛋白 α -actin, 以表征重建阴道的上皮生长、完整程度和平滑肌生长; VG染色评价胶原纤维的生成情况。**结果** HE染色可见重建阴道2周后出现新生黏膜; 8周后新生阴道上皮结构与正常阴道无明显差异。AE1/AE3蛋白的免疫组化染色表明上皮组织的存在。Laminin的免疫组化染色提示新生阴道黏膜内基底膜成分的生成。VG染色和 α -actin的表达结果显示阴道重建8周后可生成完整的胶原纤维和平滑肌肌束, 且排列整齐。**结论** 同源组织工程生物补片进行阴道重建时可形成完整的阴道黏膜和平滑肌, 与正常阴道结构相似。

【关键词】 脱细胞基质材料; 生物补片; 阴道重建; 动物模型

【中图分类号】R 713.3 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1674-4020(2021)07-050-05

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.07.16

Experimental study on homologous tissue-engineering biological meshes in vaginal reconstruction

Li Yaqian¹, Zhou Yidan², Chen Na², Zhu Lan^{2*}

1. Medical Science Research Center; 2. Departments of Obstetrics and Gynecology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100730, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: zhu_julie@vip.sina.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of a tissue-engineering biological mesh (acellular tissue matrix materials derived from the pig dermal) on vaginal reconstruction in the pig vaginal defect model. **Methods** Vagina excision and vagina reconstruction by acellular tissue matrix materials (ATM) derived from the pig dermal were performed in 6 Chinese experimental miniature pigs. At week 1, 2, 4, 6, 8 after transplantation, the neovaginas were harvested and histopathological evaluation were performed. The vaginas harvested before surgery were used as control groups. Haematoxylin and eosin (HE) staining were performed to investigate the morphological and inflammatory changes. Pancytokeratins (AE1/AE3) and laminin immunohistochemical (IHC) staining were applied to evaluate the regeneration and integrity of epithelium. The expression of α -actin was assessed to demonstrate the regeneration of smooth muscle. VG staining were performed to evaluate the growth of collagen fibers. **Results** HE staining showed that epithelialization was observed 2 weeks after transplantation. After 8 weeks, the neovaginas of P-ATM groups were similar with normal vaginas. AE1/AE3 staining showed the epithelial cells existed and were increased with time. Laminin staining showed the existence of basement membrane components in

the neovaginas. VG staining and α -actin staining suggested the regeneration of collagen fiber and smooth muscles 8 weeks after transplantation. **Conclusion** The whole vaginal epithelium and smooth muscles could be regenerated through homologous tissue-engineering biological meshes.

[Key words] acellular tissue matrix; biological mesh; vaginal reconstruction; animal model

临床上许多生殖道疾病包括先天性生殖道畸形、外伤肿瘤等,都会造成阴道正常解剖和功能的异常,严重影响患者身心健康。目前利用其他组织进行阴道重建手术是主要治疗方法,其中包括自体组织移植,但自体组织阴道重建有体表切口、感染、影响外观等缺点^[1-3],因此,临床急需可替代患者自体组织的修复材料。随着组织工程技术的发展,通过脱细胞技术得到的同种异体(人尸体来源)及异种(通常是猪小肠黏膜下组织或牛心包)脱细胞基质生物补片逐渐引入修复手术^[4-5]。同种异体生物补片由于伦理等问题而使其来源受限,异种移植物因种属来源、组织部分等因素影响其体内的降解、并发症和治疗效果,研究报道其临床研究效果尚有争议^[6-9]。本研究旨在探讨一种猪皮来源的脱细胞基质(acellular tissue matrix, ATM)补片在小型猪阴道重建中的作用,通过在小型猪阴道缺损模型中的实验研究,一方面评价该生物补片在体内的降解情况和炎症反应,另一方面评价其使阴道组织再生的能力,从而为人工阴道成形手术提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 实验动物 本研究所用实验动物为中国小型实验猪,共6只,雌性,4~6月龄,均性成熟,未孕未产,体重为(25±5)kg。由北京协和医院实验动物中心提供,单圈饲养。

1.1.2 实验材料 研究中使用的组织工程生物补片是一种国产脱细胞基质材料,来源于猪皮,通过脱细胞处理后去掉细胞成分且天然细胞外基质成分及其三维空间构象被保留;包装在无菌生理盐水中,保存在4℃。

1.1.3 主要试剂 AE1/AE3 单克隆抗体, α -actin 单克隆抗体,Laminin 单克隆抗体购自 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标二抗,组织固定液,HE 染液,VG 染色购自中杉金桥生物技术有限公司;其他常用化学试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 小型猪阴道缺损模型的构建和补片的植入

小型猪在麻醉状态下行阴道切除术以制备阴道缺损模型。之后,阴道外口环切,向上分离阴道“袖口”;同时将生物补片裁成合适大小,并制成一端闭合,另一端敞开的“套袖”,在补片表面间断性做6处1cm长度的纵形切口,以利于引流。将补片塞入阴道腔穴内并保证补片和腔穴的粗糙面无间隙地紧贴,最后补片顶端缝合于子宫体段端,下端缝合于阴道前庭黏膜周围,完成阴道缺损和重建的模型。

1.2.2 HE 染色观察阴道组织大体形态和炎症反应的

情况 在术后1、2、4、6、8周时分别取材阴道全层并用组织固定液固定,进行石蜡包埋后切片,每片厚度约5 μ m,以用于组织形态学评价。组织切片按照常规步骤进行脱蜡后分别进行苏木精和伊红染色,并于镜下进行组织形态的观察。

1.2.3 VG 染色观察阴道组织胶原纤维和弹力纤维的生成情况 不同时间段的组织切片进行脱蜡后按照 VG 染色试剂盒的方法染色,组织经 VG 染色后胶原纤维呈现鲜红色,肌纤维、细胞胞质和红细胞呈现黄色,细胞核呈现黑色。

1.2.4 免疫组化染色评价上皮层和平滑肌的生长情况

不同时间段的组织切片分别进行上皮光谱角蛋白 AE1/AE3 抗体,层粘连蛋白 Laminin 抗体和平滑肌肌动蛋白 α -actin 抗体的免疫组织化学的染色,以表征上皮层,基质膜成分和平滑肌肌束的生成。

2 结果

2.1 大体观察及生物补片降解情况

实验动物手术后未见感染、血肿等并发症发生,不同时间段取材时均未见瘘和排斥等发生,阴道组织的生长状态良好。手术1周后可观察到阴道空穴内有补片的明显残留,补片与阴道空穴贴合较紧密,不易分离,阴道黏膜的生长不明显。2周后,阴道黏膜的生长明显可见,生物补片不完整。4周后新生黏膜较厚和完整,肉眼观察其外观与正常的阴道相似;生物补片不可见。6周后新生阴道的外观结构接近于正常的阴道黏膜,肉眼不可见未黏膜化的部位。8周后,从外观观察其与6周的新生阴道无明显差异,整个阴道黏膜的形态完整均一。结果初步提示该组织工程生物补片可促进阴道黏膜再生。详见表1。

2.2 阴道重建后上皮生成情况的评价

2.2.1 HE 染色观察新生上皮细胞、新生血管情况及炎症反应情况 从 HE 染色结果可见,该生物补片重建阴道后,1周时没有明显看到上皮组织的存在,可观察到粒细胞和淋巴细胞。2周后阴道上皮层较薄,呈不规则的排列且疏松,可观察到淋巴细胞;4周后阴道上皮层较厚,可见多层结构的出现,多见上皮脚钉突,淋巴细胞有减少;6周后阴道上皮层较厚,可见多层结构,出现上皮极性,多见上皮脚钉突,炎症细胞较少见;8周时,新生阴道的上皮结构与正常黏膜相似,炎症细胞较少见。结果表明,该组织工程生物补片可有效生成阴道上皮层。详见下页表1和图1。

2.2.2 上皮光谱角蛋白 AE1/AE3 的免疫组化染色

植入补片2周后 AE1/AE3 的表达呈现阳性,且随着阴道重建的时间延长,阳性表达程度也相应增加。结果

与 HE 染色的观察一致。结果表明,在植入生物补片重建阴道后上皮细胞的生成。见图 2。

2.2.3 层粘连蛋白 Laminin 的免疫组化染色 阴道在手术重建 1 周后,在表皮层下的基质中可以观察到不连续棕色条带,表明 Laminin 染色结果阳性,提示阴道内形成了基底膜。随着阴道重建的时间延长,Laminin 的阳性表达增强。层粘连蛋白属非胶原糖蛋白,主要在基底膜结构中,其在阴道重建后的基质中表达,间接反映了新生阴道中上皮层的完整性。见图 3(见彩插 1)。

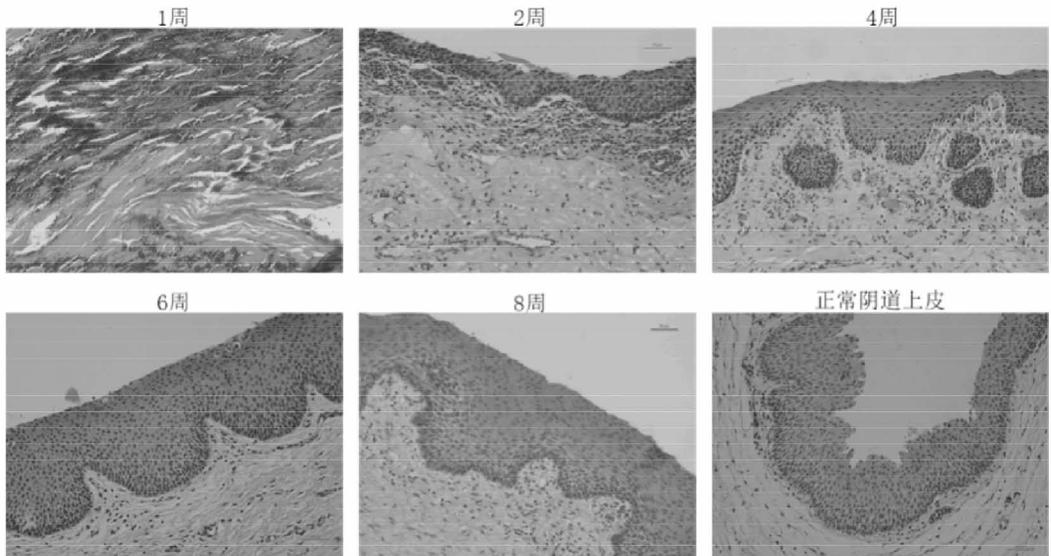
2.3 阴道重建后平滑肌和胶原纤维生成情况的评价

2.3.1 平滑肌肌动蛋白 α -actin 的免疫组化染色 在阴道植入生物补片重建 8 周后,可观察到较完整的阴道平滑肌肌束,且肌束排列较整齐。结果表明该组织工程生物补片的植入可有效生成阴道平滑肌层。见图 4。

2.3.2 VG 染色 在阴道重建 8 周后可观察到呈现黄色染色的肌纤维以及呈现红色染色的胶原纤维,且二者的排列较整齐。与平滑肌肌动蛋白 α -actin 的染色结果一致。见图 4(见彩插 1)。

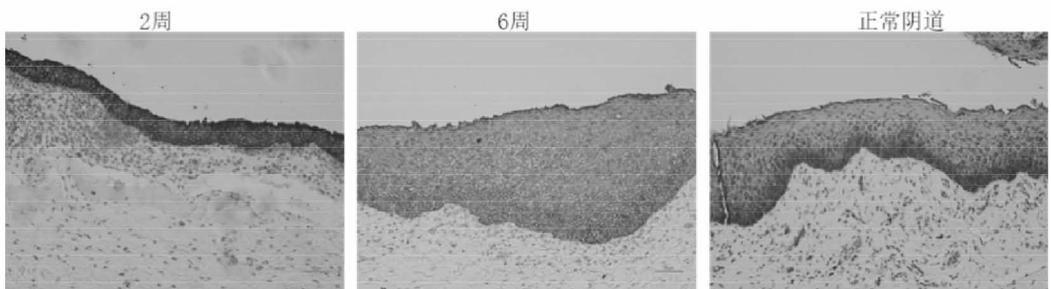
表 1 生物补片植入到体内后的降解和炎症反应等情况评价

术后时间	生物补片	新生上皮	血管	炎症反应
1 周	明显残留,补片与阴道空穴贴合较紧密	几乎找不到	散在小血管和毛细血管	粒细胞,淋巴细胞可见
2 周	不完整	较薄,上皮细胞排列不规则,疏松	散在小血管和毛细血管	可见淋巴细胞
4 周	不可见	较厚,呈现多层结构,多见上皮脚钉突	生成较多清晰血管	较少
6 周	不可见	较厚,多层结构,上皮极性出现,多见上皮脚钉突	大小、数量增多	少见
8 周	不可见	结构与正常黏膜已无分别	基本同 6 周,数量趋于恒定	少见



注:植入 2 周后,新生阴道的上皮层较薄;4 周后新生阴道的上皮呈现多层结构,且上皮极向恢复,排列较为松散;6 周后新生阴道的上皮呈现多层结构且上皮极向恢复,上皮呈现紧密排列;8 周后新生阴道的上皮排列情况及结构与正常阴道黏膜类似。

图 1 组织工程生物补片重建阴道的不同时间段的 HE 染色, $\times 200$



注:AE1/AE3 蛋白的阳性染色在植入补片第 2 周后出现,且随着阴道重建的时间延长,阳性表达的程度也相应增加。

图 2 重建阴道的上皮光谱角蛋白 AE1/AE3 的免疫组化染色, $\times 200$

3 讨论

目前临床上应用于阴道重建的方式有很多,包括最早应用的刃厚皮片移植以及来源于大阴唇、大腿内侧皮片、腹膜、肠管等部位的阴道成形术,但往往有阴道再狭窄,移植物缩短,瘢痕,润滑不足,鳞状细胞癌等并发症的发生^[10-11]。最常用的乙状结肠代阴道成形术的性生活满意率很好,但由于需要腹部手术而有肠管阻塞、炎症性肠病、脱垂、二次手术等风险^[12-14]。近来,研究较多的自体口腔黏膜阴道成形术有较好的阴道重建效果,但仍需进一步的临床验证^[11,15]。鉴于现有阴道成形术的不足,临床上仍需研究开发新的阴道替代和重建方法。随着组织工程技术的发展,其为临床上的各种阴道缺失缺陷提供了新的治疗方法。有研究报道活检取得的阴道细胞经体外培养数周后形成上皮组织并置于阴道模具上,患者携带模具4~6周后可见阴道组织的形成,然而该方法仍需进一步研究和临床验证^[16]。近年来,ATM材料在骨骼肌重塑、心肌梗塞的血管再生等的研究尤其是在皮肤损伤的临床应用,给阴道重建带来启示^[17-20]。目前临床上应用的ATM材料有同种异体(人新鲜尸体)和异种(猪小肠和牛心包等)来源^[21],二者在阴道重建的作用是否有差异,目前尚不明了。既往研究表明人尸体来源的脱细胞生物补片在小型猪阴道重建中疗效可行^[21]。本研究对猪皮来源的脱细胞生物补片在小型猪阴道缺损模型中的阴道组织再生的性能进行了初步评价,结果提示同源组织工程生物补片进行阴道重建时可形成完整的阴道黏膜和平滑肌,与正常阴道结构相似,为后续临床研究提供了实验依据。

本研究使用的小型猪模型的阴道黏膜由上皮、固有层和肌层等构成,这与人阴道黏膜极为类似^[22],因此本研究选用小型猪作为实验动物具备可比性。此外,本研究采用的组织工程生物补片来源于猪皮。已有研究表明,除角质层外,猪在表皮的组织学结构、角蛋白的特征、胶原纤维的纤维束和真皮厚度等方面,与人均相似。本研究结果表明,阴道在植入补片后无明显粘连、狭窄等并发症的发生。植入生物补片2周后,大体观察可见上皮层的出现,提示该组织工程生物补片的上皮化时间较短。人工阴道重建的一个重要评价指标是能否快速诱导上皮化,本研究进一步从组织形态学染色和上皮角蛋白AE1/AE3的染色证明,植入生物补片2周后上皮细胞标志物呈阳性表达,且随着重建时间的延长,阳性表达增强,4周后上皮层的极性恢复,8周时上皮层呈现多层结构,与正常阴道黏膜相似。此外,基底膜成分可使上皮细胞的附着、迁移和分化能力增强,从而有利于补片的上皮化^[18,23-25]。本研究结果显示,基质膜重要成分层粘连蛋白Laminin在补片植入2周后即呈阳性表达,随着时间的延长,阳性表达趋于均一,提示阴道重建后基底膜成分的生成,一定程度上证明了新生阴道上皮的完整性。与以往研究的人尸体来源的生物补片相比^[26],该组织工程生物补片在阴道黏膜上皮化的速度和上皮层的形态结构再生方面达到相似结果。

正常阴道由表面的复层鳞状上皮,内环外纵排列的平滑肌层和外膜构成。研究表明,平滑肌和成纤维细胞在维持阴道结构和功能中起到重要作用。而结缔组织

中大量存在的细胞外基质成分尤其是胶原纤维和弹力纤维等与阴道支持作用和组织弹性相关^[27-28]。因此,利用生物补片再生的完整新生阴道组织应有平滑肌束和细胞外基质成分。为了评价再生阴道的组织结构完整性,本研究通过评价平滑肌肌动蛋白 α -actin的表达表明,植入生物补片4周后可见散在的肌纤维,8周后可见较为连续的平滑肌;同时8周后胶原纤维的排列较为紧密和整齐,该组织工程生物补片在平滑肌再生方面的性能较好,与以往研究的人尸体来源的ATM材料达到类似结果。

在临床应用时生物补片的免疫源性也是评价指标之一,以往研究报道ATM材料由于去掉细胞成分而大大降低了免疫源性,在本研究的实验过程中无明显免疫排斥反应发生,植入生物补片1周后可观察到炎症细胞,但4周后炎症细胞明显减少;表明该组织工程生物补片无明显的免疫排斥。但本研究采用的动物模型与生物补片的来源属同种,因此在研究补片免疫源性问题上有了一定局限性,后续可在其他动物模型上验证并延长观察时间。

本研究构建小型猪阴道缺损和重建模型,从实验动物的围手术期和手术后的不同时间点进行结果观察以及新生阴道的大体和组织形态学评价,阐述了生物补片上皮化的时间过程,首次证明猪皮来源的组织工程生物补片在猪阴道重建术后8周即有效快速再生阴道上皮层和平滑肌层,新生阴道结构完整,可作为阴道重建的材料,为同源组织工程生物补片在临床上的应用提供实验依据。此外,本研究采用的是小型猪作为研究对象,其与临床仍有一定差距,后续工作将进一步扩大样本量和在更接近人体的动物身上验证其有效性和安全性,进而到人体进行临床实验研究。本研究不足之处在于实验动物例数偏少和缺少定量结果的评价,后续研究中需增加功能评价。

【参考文献】

- [1] Dorin RP, Atala A, Defilippo RE. Bioengineering a vaginal replacement using a small biopsy of autologous tissue [J]. *Semin Reprod Med*, 2011, 29(1):38-44.
- [2] 黄向华,张明乐. 各种阴道成形术的临床应用及其评价 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2012, 4(6):5-8, 15.
- [3] Shen F, Zhang XY, Yin CY, et al. Comparison of small intestinal submucosa graft with split-thickness skin graft for cervicovaginal reconstruction of congenital vaginal and cervical aplasia [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(11):2499-2505.
- [4] Boennelycke M, Gras S, Lose G. Tissue engineering as a potential alternative or adjunct to surgical reconstruction in treating pelvic organ prolapse [J]. *Int Urogynecol J*, 2013, 24(5):741-747.
- [5] 章艺群,丁景新,华克勤. 组织工程技术在人工阴道成形术的应用新进展 [J]. *现代妇产科进展*, 2015, 24(7):556-558.
- [6] Zhu L, Zhou H, Sun Z, et al. Anatomic and sexual outcomes after vaginoplasty using tissue-engineered biomaterial graft in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a new minimally invasive and effective surgery [J]. *J Sex Med*, 2013, 10(6):1652-1658.
- [7] Callens N, De Cuyper G, De Sutter P, et al. An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia [J]. *Hum Reprod*

Update,2014,20(5):775-801.

[8] Ding JX,Chen LM,Zhang XY,et al. Sexual and functional outcomes of vaginoplasty using acellular porcine small intestinal submucosa graft or laparoscopic peritoneal vaginoplasty: a comparative study [J]. *Hum Reprod*,2015,30(3):581-589.

[9] Nguyen JN. The use of grafts for anterior vaginal prolapse repair: pros and cons [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2008, 20 (5) : 501-505.

[10] Banister JB,McIndoe AH. Congenital absence of the vagina,treated by means of an indwelling skin-graft [J]. *Proc R Soc Med*,1938, 31(9):1055-1056.

[11] van Leeuwen K, Baker L, Grimsby G. Autologous buccal mucosa graft for primary and secondary reconstruction of vaginal anomalies [J]. *Semin Pediatr Surg*,2019,28(5):150843.

[12] Hensle TW, Shabsigh A, Shabsigh R, et al. Sexual function following bowel vaginoplasty [J]. *J Urol*, 2006, 175 (6) : 2283-2286.

[13] Parsons JK, Gearhart SL, Gearhart JP. Vaginal reconstruction utilizing sigmoid colon: Complications and long-term results [J]. *J Pediatr Surg*,2002,37(4):629-633.

[14] Ozkan O,Ozkan O, Cinpolat A, et al. Vaginal reconstruction with the modified rectosigmoid colon: surgical technique, long-term results and sexual outcomes [J]. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*,2018,52(4):210-216.

[15] Grimsby GM, Baker LA. The use of autologous buccal mucosa grafts in vaginal reconstruction [J]. *Curr Urol Rep*,2014,15(8):428.

[16] Panici PB, Bellati F, Boni T, et al. Vaginoplasty using autologous in vitro cultured vaginal tissue in a patient with Mayer-von-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22 (7) : 2025-2028.

[17] Freytes DO, Tullius RS, Badylak SF. Effect of storage upon material properties of lyophilized porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006, 78 (2) : 327-333.

[18] Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns [J]. *Burns*,1995,21(4):243-248.

[19] Sicari BM, Rubin JP, Dearth CL, et al. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6 (234) : 234ra58.

[20] Burdick JA, Mauck RL, Gorman JH, et al. Acellular biomaterials: an evolving alternative to cell-based therapies [J]. *Sci Transl Med*,2013,5(176):176ps4.

[21] 朱兰,周慧梅,郎景和. 组织工程医用补片在人工阴道成形术中的应用 [J]. *中国实用妇科与产科杂志* 2006, 22 (12) : 953-954.

[22] 柳朋生,郑家润. 用猪作人透皮实验动物模型的有关资料 [J]. *国际皮肤性病学期刊*,2001,27(4):243-244.

[23] Kim JP,Chen JD,Wilke MS, et al. Human keratinocyte migration on type IV collagen. Roles of heparin-binding site and alpha 2 beta 1 integrin [J]. *Lab Invest*,1994,71(3):401-408.

[24] Rousselle P, Montmasson M, Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization [J]. *Matrix Biol*, 2019, 75-76 : 12-26.

[25] Yap L, Tay HG, Nguyen MTX, et al. Laminins in cellular differentiation [J]. *Trends Cell Biol*,2019,29(12):987-1000.

[26] 周慧梅,郎景和,朱兰. 组织工程医用生物补片用于阴道重建的动物实验研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2009, 44 (11) : 846-850.

[27] Vetusch A, D'Alfonso A, Sferra R, et al. Changes in muscularis propria of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse [J]. *Eur J Histochem*,2016,60(1):2604.

[28] Clark GL, Pokutta-Paskaleva AP, Lawrence DJ, et al. Smooth muscle regional contribution to vaginal wall function [J]. *Interface Focus*,2019,9(4):20190025.

(收稿日期:2021-05-14 编辑:舒砚)

(上接第 49 页)

[25] 刘嘉茵. 高龄妇女卵巢储备功能减退的再生育策略 [J]. *中国计划生育和妇产科*,2017,9(6):1-3.

[26] Revelli A, Casano S, Salvagno F, et al. Milder is better? Advantages and disadvantages of "mild" ovarian stimulation for human in vitro fertilization [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 2011, 9 : 25.

[27] 柳雪琴,梁雪飞,王书佳. 微刺激促排卵在卵巢功能正常患者体外受精-胚胎移植中的应用效果 [J]. *广西医学*,2016, 11 (38) : 1564-1567.

[28] 韦静. 来曲唑和克罗米芬联合低剂量促性腺激素对卵巢储备功能减退患者接受体外受精-胚胎移植结局的影响 [J]. *中国医药科学*,2020,10(21):114-116,126.

[29] 张红,吴艺佳,邹姮,等. 微刺激方案与 PPOS 方案对卵巢储备功能减退患者的助孕效果 [J]. *山东医药*, 2020, 60 (16) : 55-58.

[30] 禹果,项云改,李艳,等. 高效孕激素下超促排卵和微刺激方案在卵巢功能减退患者中应用效果分析 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*,2017,33(5):502-506.

[31] 李建华,徐野,安育林,等. 自然周期和微刺激方案对高龄卵巢功能低下患者临床结局的影响 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24 (8) : 104-105, 138.

[32] 刘珊,包莉莉,冯晓哗,等. 高龄卵巢功能低下女性采取改良的自然周期体外受精-胚胎移植的临床结局 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*,2018,37(4):281-284.

[33] 张焕焕,费小阳. 改良自然周期方案用于卵巢储备功能低下患者行体外受精胚胎移植助孕的临床研究 [J]. *浙江医学*,2018, 40 (18) : 2024-2027.

[34] 王琳琳,郭薇,杨蕊,等. 促性腺激素释放激素激动剂联合重组人绒毛膜促性腺激素双扳机在体外受精卵母细胞低成熟率患者中的应用 [J]. *中华生殖与避孕杂志*,2020,40(6):439-446.

[35] 张雨,刘雨生,张娉,等. 不同扳机方案在卵巢储备功能减退患者中的应用 [J]. *安徽医科大学学报*,2017,52(9):1323-1326.

[36] Chern CU, JY L, Tsui KH, et al. Dual-trigger improves the outcomes of in vitro fertilization cycles in older patients with diminished ovarian reserve: A retrospective cohort study [J]. *PLOS One*, 2020, 15 (7) : e0235707.

[37] Lin MH, Wu FS, Hwu YM, et al. Dual trigger with gonadotropin releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin significantly improves live birth rate for women with diminished ovarian reserve [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*,2019,17(1):7.

(收稿日期:2021-02-22 编辑:向晓莉)