

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.005

扁豆过敏原 Len c 3 蛋白 B 细胞抗原表位预测及同源建模*

郭予和 何颖 邹泽红 刘雪婷 许晨霞 陶爱林[△]

(广州市过敏反应与临床免疫重点实验室 / 呼吸疾病国家重点实验室变态反应研究室 /

广州医学院第二附属医院 广东 广州 510260)

摘要 目的:通过应用生物信息学软件模拟、分析预测扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的结构、性质及 B 细胞抗原表位,为探索基于扁豆过敏原 Len c 3 抗原表位的改造提供依据。**方法:**从 Uniprot 蛋白质数据库中得到扁豆过敏原 Len c 3 的氨基酸序列,通过生物信息学软件 Swiss-Model 及 Swiss-PdbViewer 4.0 模拟和分析扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的结构,使用 DNASTar 软件对其 B 细胞抗原表位进行模拟、分析预测。**结果:**扁豆过敏原 Len c 3 蛋白为疏水性蛋白,在氨基酸残基第 7-26 位有一跨膜区,Ramachandran 图评估扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的三维结构显示其空间构象稳定,Len c 3 蛋白潜在的 B 细胞抗原表位为 35-36,48-50,66-71,87-90。**结论:**本研究通过对扁豆过敏原 Len c 3 蛋白进行生物信息学分析获得了该过敏原的结构、性质及潜在的 B 细胞抗原表位,为进一步了解和掌握扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的结构功能以及抗原性改造、单克隆抗体制备、表位疫苗设计等提供重要的线索。

关键词:扁豆过敏原;Len c 3;结构;抗原表位

中图分类号:R392.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)06-1017-05

Prediction of the B Cell Antigenic Epitopes and Homology Modeling Study of Lentil Allergen Len c 3*

GUO Yu-he, HE Ying, ZOU Ze-hong, LIU Xue-ting, XU Chen-xia, TAO Ai-lin[△]

(Guangzhou Municipal Key Laboratory of Allergy & Clinical Immunity, Allergy Research Branch of the State Key Laboratory of Respiratory Disease, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China)

ABSTRACT Objective: To predict and analyze the structure, biological characteristics and B cell antigenic epitopes of lentil allergen Len c 3 by using bioinformatics software, so as to provide clues for modifying the antigenic epitopes of lentil allergen Len c 3. **Methods:** The amino sequence of lentil allergen Len c 3 was acquired from Uniprot protein database. The structure of lentil allergen Len c 3 was simulated and analyzed by the bioinformatics software Swiss-Model and Swiss-PdbViewer 4.0, and the B cell antigenic epitopes of lentil allergen Len c 3 were predicted and analyzed by using DNASTar. **Results:** Lentil allergen Len c 3 with a transmembrane domain belongs to a hydrophobic protein. The Ramachandran plot showed the spatial conformation of Lentil allergen Len c 3 was stable. The potential B cell antigenic epitopes of Len c 3 were at the region of 35-36, 48-50, 66-71, 87-90. **Conclusion:** This study predicted and analyzed the structure, biological characteristics and potential B cell antigenic epitopes of lentil allergen Len c 3, which provided important clues for further understanding and mastering the structure and biological characteristics even antigen modification, monoclonal antibody preparation and epitope vaccine design of Lentil allergen Len c 3.

Key words: Lentil allergen; Len c 3; Structure; Antigenic epitopes

Chinese Library Classification: R392.8 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)06-1017-05

前言

过敏是一个被高度关注的问题。近几十年,过敏性疾病的发病率在不断地增加,近 20%-30%的人口不同程度受到各种变态反应性疾病的影响^[1,2]。食物过敏反应是其中非常突出的部分。不断增加的食物过敏性疾病影响着人们特别是儿童的生活,甚至有致命性的危险^[3-5]。在我国,食物过敏一般人群发病率为 1-2%,儿童则为 8%,由此可见食物过敏问题相当突出^[6]。

扁豆是一种易于引发 I 型超敏反应的豆类食品,在地中海

地区和众多亚洲国家,很多人特别是儿童食用扁豆后常出现系统性过敏症状,比如哮喘,鼻液溢,全身性荨麻疹等^[7,8]。虽然避免食用扁豆是解决其过敏性问题的最好方法,但扁豆等豆类具有非常高的营养价值,长时间限制饮食会导致营养不均衡,也是不现实的。不仅如此,过敏原与一些同源蛋白之间易于引起交叉反应^[9],也就是说对扁豆过敏的患者,食用其它相关的豆类食品时也有可能引起过敏,有研究指出扁豆与花生,大豆,豌豆等食品之间存在交叉反应^[10,11]。目前已知的扁豆过敏原有 Len c 1.01, Len c 1.02 和 Len c 2, Len c 3 等几种蛋白^[12-14]。其中,

* 基金项目:国家重大科技专项重大课题(2011ZX08011-005);国家自然科学基金项目(30771240)

作者简介:郭予和(1987-),男,硕士研究生,主要从事分子免疫学方面的研究,E-mail: 277833665@qq.com

△ 通讯作者:陶爱林(1968-),男,博士,教授,硕士生导师,主要从事分子免疫学方面的研究,

E-mail: AerobiologiaTao@163.com, allergylab@126.com

(收稿日期:2013-06-27 接受日期:2013-07-22)

Len c 3 蛋白是近期发现的一种属于脂质转移蛋白家族的扁豆过敏原^[4],目前对 Len c 3 蛋白的其他功能研究还比较缺乏。

随着食物过敏原检测技术的发展,过敏患者已可明确其过敏的食物具体成分^[5],传统上的特异性免疫治疗主要是对过敏患者逐渐增加过敏原的注射剂量从而达到免疫耐受的目的,但这种方法往往是基于过敏原蛋白的粗提,其粗提液成分复杂,既有致敏蛋白,也有非致敏蛋白及其他生物大分子^[6],并且这种方法存在很高的风险性,有可能引发强烈的过敏反应,甚至可能导致死亡。因此,为了降低脱敏治疗的风险,通过基因工程方法获得低致敏原性的免疫治疗蛋白将是未来特异性免疫治疗的一个非常重要的方向。表位是过敏原的物质基础,表位定位技术是过敏原表位研究的工具,包括表位定位和表位预测^[7],因此,笔者以扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的氨基酸序列为基础,分析 Len c 3 蛋白的理化性质,并结合计算机软件模拟、分析预测其结构、性质及 B 细胞抗原表位,为扁豆过敏原 Len c 3 的过敏原性改造及其抗体设计等进一步研究奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 扁豆过敏原 Len c 3 的氨基酸序列

从 Uniprot 蛋白质数据库(<http://www.uniprot.org/>)检索扁豆过敏原 Len c 3 的氨基酸序列,得到(登录号:A0AT29): MARGMKLACVVLVICMVVIAIPMAEAGAI SCGAVTSDLSPLCLTYLTGGPGPSPQCCGGVKLLAAANTTPDRQAACNCLKS-AAGSITKLNNTNAAALPGKCGVNIPIKYKISTTTNCNTVKF。

1.2 扁豆过敏原 Len c 3 蛋白理化性质分析

通过利用 ProtParam 在线软件(<http://web.expasy.org/prot-param/>)预测其氨基酸组成、等电点、分子量、亲水性等基本理化性质,并运用 SignalP 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)软件预测其蛋白信号肽和跨膜区域。

1.3 扁豆过敏原 Len c 3 蛋白结构预测

利用在线分析软件 GOR 4(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)对扁豆过敏原 Len c 3 蛋白二级结构进行预测。通过将 Len c 3 蛋白的序列提交到

Swiss-Model(<http://swissmodel.expasy.org/>)服务器^[8]进行自动建模,得到其三维空间结构。模型查看运用 Swiss-Pdb Viewer 软件,并利用 Swiss-Viever 4.0 对建模的结构进行检测,并获得 Ramachandran 图,评估所模拟的蛋白质三维结构的稳定性。

1.4 扁豆过敏原 Len c 3 蛋白 B 细胞抗原表位分析预测

运用 DNASTar Protean 软件的 protean 程序,根据 Kyte-Doolittle 方案、Karplus-Schulz 方案、Emini 方案和 Jameson-Wolf 方案,分别预测其蛋白的亲水性、可塑性、可及性和抗原性指数,并选取亲水性好、可塑性好、可及性高、抗原性强的片段作为候选表位。综合扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的结构预测结果和其亲水性、可塑性、可及性和抗原性指数,取预测结果的重叠区域,作为扁豆过敏原 Len c 3 蛋白潜在的 B 细胞抗原表位。

1.5 Lenc 3 蛋白的同源进化树构建

利用 Uniprot 在线服务器,搜索与 Len c 3 蛋白同源性高的氨基酸序列,运用 ClustalX1.83 软件对其同源蛋白氨基酸序列进行比对分析,然后采用 Mega 3.1 软件中的 N-J 法构建进化树。

2 结果与分析

2.1 Len c 3 蛋白基本理化性质

通过 ProtParam 网络服务器分析得到 Len c 3 蛋白的分子式为 C508H854N142O155S14,原子总数为 1673 个,分子量约为 11.88 KD,理论等电点约为 9.01,在氨基酸组成上,Ala(A) 16 个,占 13.6%,含量最高,其次是 Gly(G)和 Thr(T),均为 11,占 9.3%;带负电荷残基总数(Asp + Glu):3 个,带正电荷残基总数(Arg + Lys):10 个。不稳定系数为 31.99,低于阈值 40,因此,可认为该蛋白为稳定蛋白。脂 肪 酸 数 为 88.56,亲 水 性 评 估 值 为 0.408,预测该蛋白为疏水性蛋白。

2.2 Len c 3 蛋白信号肽、跨膜区分析

利用在线软件 SignalP 4.0 预测 Len c 3 蛋白的氨基酸序列,结果显示有一段信号肽,在 25-26 之间存在分割位点(图 1)。采用 TMHMM 软件预测 Len c 3 蛋白跨膜区段,发现该蛋白在 7-26 位间存在一明显的跨膜区(图 2)。

2.2.1 Len c 3 蛋白的二级结构预测 通过 GOR4 在线软件预

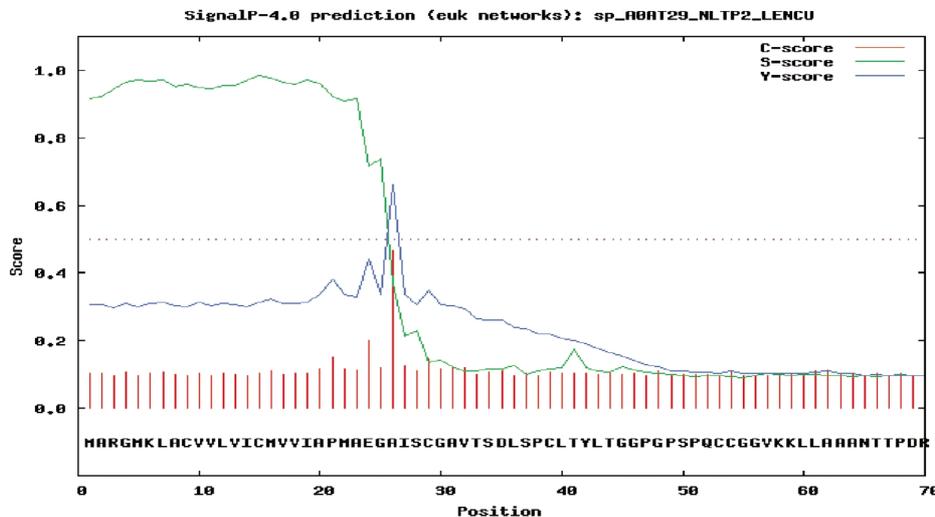


图 1 SignalIP 4.0 预测 Len c 3 蛋白信号肽

Fig.1 Signal peptide of Len c 3 protein predicted by SignalIP 4.0

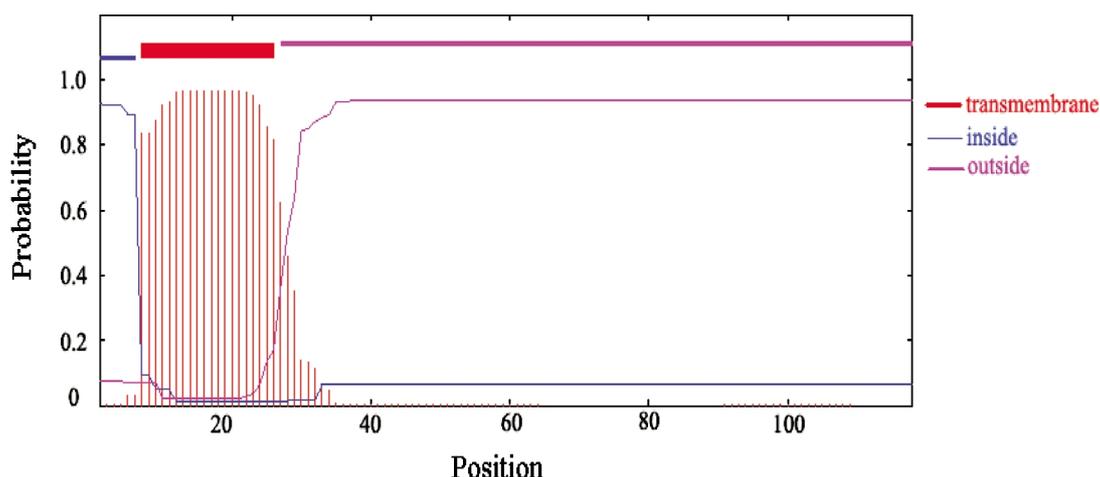


图 2 TMHMM 预测 Len c 3 蛋白跨膜区

Fig.2 Transmembrane region of Len c 3 protein predicted by TMHMM

测 Len c 3 蛋白的二级结构, 结果显示该蛋白氨基酸 α - 螺旋 26.27%; 无规则卷曲区域有 11 个, 占 61.86% (表 1)。集中在 3 个区域, 占 11.86%; 延伸链主要分布在 7 个区域, 占 2.2.2 Len c 3 蛋白的三级结构预测 利用 Swiss-Model 在线

表 1 GOR4 对 Len c 3 蛋白的预测结果

Table 1 Secondary structure of Len c 3 protein predicted by GOR4

Secondary structure (Relative content)	Prediction results(AA)
Alpha helix(11.86%)	60-63, 70-75, 85-88
Extended strand(26.27%)	7-19, 27-28, 31-32, 40-43, 93-94, 105-109, 115-117
Random coil(61.86%)	1-6, 20-26, 29-30, 33-39, 44-59, 64-69, 76-84, 89-92, 95-104, 110-114, 118

服务器模拟 Len c 3 蛋白的三级结构, 通过 Swiss-PdbViewer 4.0 软件评估 Len c 3 蛋白三级结构, 结果如图 3 所示, 该蛋白主要由无规则卷曲和 α - 螺旋组成。图 4 显示, 模拟所得到的 Len c 3 蛋白三维结构的 Psi(ψ) 角和 Phi(ϕ) 角约有 94% 位于 Ramachandran 图中的允许区 (即黄线内以及黄线与蓝线之间), 从理论上讲所模拟的三维结构图是可靠的。

2.3 B 细胞抗原表位预测

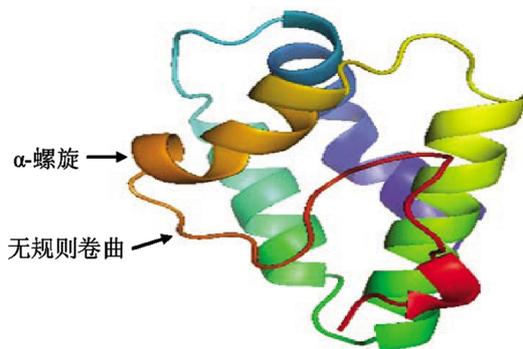


图 3 Len c 3 蛋白三级结构

Fig.3 Tertiary structure of Len c 3

通过 DNASTar 软件中的 protein 模块, 对 Len c 3 蛋白相关参数进行预测, 综合分析结果显示 Len c 3 蛋白 B 细胞抗原表位区域为 35-36, 48-50, 66-71, 87-90 (表 2)。

2.4 Len c 3 蛋白同源树的构建

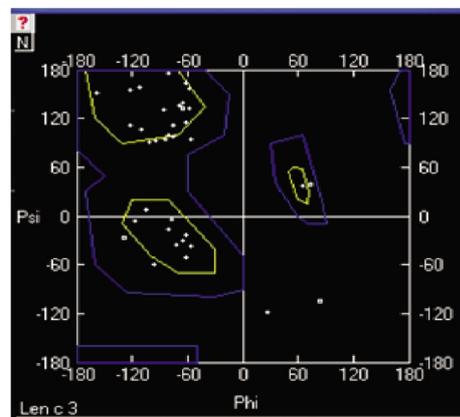


图 4 Len c 3 蛋白 Ramachandran

Fig.4 Ramachandran plot of Len 3

以 Len c 3 蛋白序列为基础, 通过在 Uniprot 数据库搜索其同源序列, 结果显示扁豆 Len c 3 蛋白 (A0AT29) 与苜蓿 (G7JI87)、鹰嘴豆 (O23758)、大豆 (C6TFC1)、墨西哥棉 (11T4C4)、菜豆(D3W147)相关蛋白的氨基酸序列具有较高的相似性, 分别为 74.0%、73.0%、61.0%、64.0%、67.0%。运用 ClusterX1.83 软件对上述同源序列对齐后, 采用 Mega 3.1 软件构建系统进化树, 可发现有两个聚类簇, 扁豆、鹰嘴豆、苜蓿和大豆的同源蛋白为一簇, 而菜豆和墨西哥棉的同源蛋白为另一簇, 且这两簇分枝明显 (图 5)。

3 讨论

表 2 DNASTar 软件预测 Len c 3 的 B 细胞抗原表位
Table 2 DNASTar prediction results of B cell antigenic epitopes of Len c 3

Parameter	Position(AA)
Hydrophilicity	45-52, 54-55, 65-74, 82, 86-90, 92-94, 100, 102, 106-116
Flexibility	33-37, 43-53, 56-60, 66-71, 79-91, 96-99, 106-116
Accessibility	35-36, 48-50, 65-71, 87-91, 106-109
Antigenic Index	3-6, 23, 27, 33-38, 45-53, 55-59, 61, 65-73, 75-77, 79-92, 95-99, 111-115
Comprehensive epitope analysis	35-36, 48-50, 66-71, 87-90

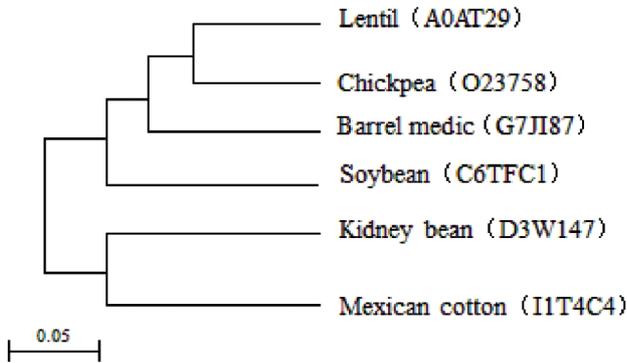


图 5 扁豆 Len c 3 蛋白与其它物种同源蛋白的系统进化树 (N-J 法)
Fig.5 Hylogenetic tree of Len c 3 protein and homologous proteins of other species(N-J method)

目前, 重组低致敏原蛋白免疫治疗法成为治疗过敏的热点, 这种方法极大的降低了脱敏治疗的风险性^[9], 而通过生物信息学与分子生物学相结合更是取得了很好的效果, 特别是通过生物信息学软件预测蛋白性质、结构及功能等有助于提高实验设计上的合理性^[9]. 因此, 本研究以扁豆过敏原 Len c 3 蛋白为基础, 通过各种生物信息学软件分析了 Len c 3 蛋白的性质和结构。通过 ProtParam 网络服务器预测得到扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的理化性质, 可作为该蛋白后续表达、鉴定等实验的依据。利用 TMHMM 软件预测 Len c 3 蛋白跨膜区段可知该蛋白为膜蛋白, 不溶于水, 分离纯化困难(图 2)。Ramachandran 图可反映蛋白结构立体化学质量参数, 通过 Psi(ψ)角和 Phi(ϕ)角可反映蛋白结构转角的易变程度。在稳定的蛋白质结构中, 主链中要有合理的 Psi(ψ)角和 Phi(ϕ)角, 即骨架的集合需分布在 Ramachandran 图可接受区域内, 否则会形成空间结构位阻障碍。因此, (ψ)角和 Phi(ϕ)角最理想的分布区域是在黄线内, 为一般允许区, 而黄线与蓝线之间为最大允许区, 蓝线外为不允许区, 如果预测的蛋白结构 90%以上的 Psi(ψ)角和 Phi(ϕ)角位于一般允许区, 则说明模拟所得的三维结构与自然结构趋势大致相同。本研究通过模拟所得到的 Len c 3 蛋白三维结构的 Psi(ψ)角和 Phi(ϕ)角约有 94%位于 Ramachandran 图中的允许区(图 4), 这显示 Len c 3 蛋白是稳定蛋白。

过敏原引起的由 IgE 介导的过敏反应的基础是 B 淋巴细胞的活化, 而 B 淋巴细胞的活化需要双信号, 其中第一信号为 B 淋巴细胞受体(BCR)与抗原分子中决定抗原特异性的化学基团, 即抗原表位相结合, 这也是最终刺激机体产生免疫反应的基础, 倘若弱化 BCR 与抗原表位的结合, 将降低过敏反应的产生。因此, 在此理论基础上, 针对 Len c 3 蛋白是一种过敏原

这种性质, 笔者通过软件各种参数的综合预测得到其 B 细胞抗原表位区域为 35-36, 48-50, 66-71, 87-90(表 2), 可作为后续过敏原性改造的突变选点依据。

此外, 通过同源序列的比对我们发现, 扁豆过敏原 Len c 3 蛋白与苜蓿、鹰嘴豆、大豆、墨西哥棉和菜豆相关蛋白的氨基酸残基序列之间具有高度的相似性(图 5), 至少在 61.0% 以上。而目前大多学者认为, 若蛋白质的氨基酸超过 80 个, 其序列的同源性大于 35%或有 6 个连续相同的氨基酸序列, 则这些蛋白之间发生交叉反应可能性就很大^[20], 因此, 扁豆过敏原 Len c 3 蛋白与上述物种相关蛋白之间发生交叉反应的概率很大, 这对于扁豆过敏患者避免接触这些同源蛋白起了一定的提示作用。

过敏性疾病的免疫反应是一个复杂的多细胞、多分子相互作用的过程。B 细胞表位的也是许多学者在运用并认可的^[21, 22]。本研究利用生物信息学方法, 预测了扁豆过敏原 Len c3 的 B 细胞抗原高亲和力表位, 获得其 B 细胞优势抗原表位, 这些表位亦将成为下一步基因突变定点技术选点的依据, 不仅如此, 这种重组低致敏原蛋白免疫治疗的方法也克服了传统免疫治疗的危险^[9], 很大程度上提高了免疫治疗的安全性。

本研究通过生物信息学软件对扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的性质及结构及结构的预测及分析, 为蛋白克隆表达及纯化提供理论支持, 而 B 细胞抗原表位的预测分析及同源构模为今后扁豆过敏原 Len c 3 蛋白的过敏原性改造、单克隆抗体设计, 抗原表位疫苗设计乃至脱敏治疗等深入研究提供了非常重要的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Van Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(1): 111-118
- [2] Gerez I, Shek L, Chng H, et al. Diagnostic tests for food allergy [J]. Singapore Medical Journal, 2010, 51(1): 4-9
- [3] Mahoney EJ, Veling MC, Mims JW. Food allergy in adults and children [J]. Otolaryngologic Clinics of North America, 2011, 44(3): 815-832
- [4] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125(2): S116-S125
- [5] Li X-M, Srivastava K, Grishin A, et al. Persistent protective effect of heat-killed Escherichia coli producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003, 112(1): 159-167
- [6] Jesenak M, Rennerova Z, Babusikova E, et al. Food allergens and respiratory symptoms [J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59 (Suppl 6):

- 311-320
- [7] Pascual CY, Fernandez-Crespo J, Sanchez-Pastor S, et al. Allergy to lentils in Mediterranean pediatric patients [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 103(1): 154-158
- [8] Martínez San Ireneo M, Ibanez Sandin M, Fernandez-Caldas E. Hypersensitivity to members of the botanical order Fabales (legumes) [J]. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 2000, 10(4): 187-199
- [9] O'Neil CE, Zanovec M, Nicklas TA. A review of food allergy and nutritional considerations in the food-allergic adult [J]. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 2011, 5(1): 49-62
- [10] Sanchez Monge R, Lopez Torrejón G, Pascual C, et al. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2004, 34(11): 1747-1753
- [11] Misra A, Kumar R, Mishra V, et al. Partial characterization of red gram (*Cajanus cajan* L. Millsp) polypeptides recognized by patients exhibiting rhinitis and bronchial asthma [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(10): 2725-2736
- [12] Sánchez-Monge R, Pascual CY, Diaz-Perales A, et al. Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, 106(5): 955-961
- [13] López-Torrejón G, Salcedo G, Martín-Esteban M, et al. Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, 112(6): 1208-1215
- [14] Akkerdaas J, Finkina E, Balandin S, et al. Lentil (*Lens culinaris*) lipid transfer protein Len c 3: a novel legume allergen [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2011, 157(1): 51-57
- [15] 郑义成, 华萍, 杨安树, 等. 食物中过敏原检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(21): 417-420
Zheng Yi-cheng, Hua Ping, Yang An-shu, et al. Research Advance in Detection Technologies for Allergen in Food[J]. *Food Science*, 2010, 31(21): 417-420
- [16] Pauli G, Malling H-J. Allergen-Specific Immunotherapy with Recombinant Allergens [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2011, 352: 43-54
- [17] 武涌, 李欣, 陈红兵, 等. 食物过敏原表位定位技术的研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 406-410
Wu Yong, Li Xin, Chen Hong-bing, et al. Research Progress on the Epitope Mapping Technology for Food Allergens [J]. *Food Science*, 2010, 31(23): 406-410
- [18] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl 1): D387-D392
- [19] Korber B, LaBute M, Yusim K. Immunoinformatics comes of age[J]. *PLoS Computational Biology*, 2006, 2(6): 484-492
- [20] Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches [J]. *Molecular Nutrition&Food Research*, 2006, 50(7): 655-660
- [21] Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes[J]. *Immunome Res*, 2006, 2: 2
- [22] Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. *Proteins*, 2006, 65 (1): 40-48

(上接第 1011 页)

- [15] Papanikolaou EG, Verpoest W, Fatemi H, et al. A novel method of luteal supplementation with recombinant luteinizing hormone when a gonadotropin-releasing hormone agonist is used instead of human chorionic gonadotropin for ovulation triggering: a randomized prospective proof of concept study [J]. *Fertil Steril*, 2011, 1, 95(3): 1174-1177
- [16] 郑利平, 朱旭, 覃海燕, 等. 不育男性患者和健康男性血液与精浆中微量元素含量的对比分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(4): 681-683
Zheng Li-ping, Zhu Xu, Qin Hai-yan, et al. The Comparative Analysis of Trace Elements in Blood and Seminal Plasma of Infertile and Healthy Male [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(4): 681-683
- [17] Caserta D, Lisi F, Marci R, et al. Does supplementation with recombinant luteinizing hormone prevent ovarian hyperstimulation syndrome in down regulated patients undergoing recombinant follicle stimulating hormone multiple follicular stimulation for IVF/ET and reduces cancellation rate for high risk of hyperstimulation? [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2011, 27(11): 862-866
- [18] Durmusoglu F, Elter K, Yoruk P, et al. Combining cycle day 7 follicle count with the basal antral follicle count improves the prediction of ovarian response [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81 (4): 1073-1078
- [19] Bancsi LF, Broekmans F, Eijkemans MJ, et al. Predictor of poor ovarian response in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve[J]. *Fertil Steril*, 2002, 77: 328-333
- [20] Gerli S, Di Renzo GC. Establishing a combined stimulation protocol hFSH followed by rFSH might represent a breakthrough in the IVF practice[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(15): 2091-2096