

滋肾育胎丸在体外受精-胚胎移植中效果的研究

柏海燕 王 婷 刘晓娟

(西北妇女儿童医院生殖中心, 西安, 710003)

摘要 目的:探讨滋肾育胎丸对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局的影响。方法:选取2016年1月23日至2016年9月11日西北妇女儿童医院生殖中心接受IVF-ET助孕的女性随机双盲分为滋肾育胎丸药物组及安慰剂组,均采用长方案,降调日起服药,至移植后35 d停药,比较2组起排卵的治疗过程及结局;结果:共入组205例,药物组(103例)和安慰剂组(102例)基础数据没有差异,2组促排卵时间、促排卵药物总量、HCG日子宫内膜厚度、优胚率亦没有统计学意义。药物组HCG日每成熟卵泡对应 E_2 值、新鲜移植胚胎种植率及临床妊娠率均高于安慰剂组,差异有统计学意义($P < 0.05$);结论:IVF-ET过程中配合应用滋肾育胎丸能够改善卵细胞质量,促进胚胎种植,最终可提高IVF-ET助孕效率。

关键词 滋肾育胎丸;不孕症;体外受精-胚胎移植;妊娠结局

Study on Effects of Zishen Yutai Pill on Pregnancy Outcome of Women

Undergoing in vitro Fertilization-embryo Transfer

Bai Haiyan, Wang Ting, Liu Xiaojuan

(Center for Assisted Reproduction, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an 710003, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Zishen Yutai Pill (ZYP) on pregnancy outcomes of women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. **Methods:** Infertile women underwent long protocol IVF cycle in our center from January 23, 2016 to September 11, 2015 were divided into drug group and placebo group randomly. ZYP or placebo was added from the day of down-regulation until 35 days after embryo transfer. **Results:** A total of 205 patients were included in this study. There was no difference in general between the drug group (103 cases) and placebo group (102 cases). During the process of COH, there was no significant difference in the time of stimulation (9.92 vs. 10.06), the dosage of Gn, the endometrial thickness, the number of oocyte retrieval and the rate of top quality embryo between two groups. The E_2 value per mature follicle, rates of implantation, rates of clinical pregnancy in drug group were higher in drug group than those in the placebo group under fresh ET ($P < 0.05$). **Conclusion:** The application of ZYP could improve the quality of oocytes, promote embryo implantation and ultimately could improve the efficiency of IVF-ET.

Key Words Zishen Yutai Pill; Infertility; IVF-ET; Pregnancy outcome

中图分类号:R242 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.028

不孕不育是当今社会高发病,约占育龄夫妇的10%~15%,相当比例不孕只能采用体外受精-胚胎移植(IVF-ET)方法助孕。目前IVF-ET的妊娠率仅有30%~50%^[1],成功妊娠后患者阴道出血、绒毛膜下血肿等先兆流产症状常见,最终有17.79%发展为自然流产^[2]。如何提高IVF成功率、降低流产率,最终提高IVF抱婴回家率一直是生殖领域研究热点。在中医体系中,“肾主生殖”,若肾气不足、冲任不能相资、气血失调,则难以受孕;肾气虚、冲任不固、胎失所系,可导致先兆流产和复发性流产的发生。既然不孕不育及自然流产均与肾气不足密切相关,那么在IVF-ET助孕过程中配合使用滋肾中药是否可提高IVF成功率、降低流产率呢?本研究采用前瞻性双盲随机病例对照设计,观察滋肾育胎丸对

IVF-ET助孕结局的影响,为临床提高IVF-ET助孕效率寻找新路径。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年1月23日至2016年9月11日在西北妇女儿童医院生殖中心接受IVF助孕的妇女作为研究对象,研究获医院生殖伦理委员会审核批准。共有212名妇女参与本研究,途中有7例因未按时服药剔除,共有205名妇女揭盲,其中药物组103例,安慰剂组102例。2组患者的年龄、不孕年限、BMI、AFC及基础FSH差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表1。

1.2 纳入标准 1)年龄<42岁;2)符合国家卫计委规定的IVF-ET适应征^[3];3)采用黄体期降调长方案。

表1 2组基础资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄(岁)	不孕年限(年)	BMI(kg/m ²)	AFC(个)	bFSH(IU/L)
药物组(n=101)	29.41 ± 3.84	3.53 ± 2.20	22.06 ± 3.19	15.21 ± 2.56	6.82 ± 2.47
安慰剂组(n=103)	28.86 ± 3.28	3.32 ± 1.66	22.54 ± 3.23	16.50 ± 2.76	6.32 ± 1.48

1.3 排除标准 1)反复种植失败(既往3次及以上IVF-ET失败者);2)子宫腺肌症、子宫肌瘤压迫宫腔线;3)未处理的双侧输卵管积水;4)未治愈的子宫内膜疾病;5)患有目前不适合进行辅助生殖技术或妊娠的疾病;6)近3个月内服用治疗不孕症相关中药或中成药的患者。

1.4 脱落与剔除标准 因患者个人因素主动要求终止周期治疗者。

1.5 治疗方法

1.5.1 IVF新鲜移植周期 控制性促排卵(COH):从黄体中期起给予患者达必佳(Ferring GmbH)0.1 mg/d皮下注射。14 d后测血清性激素水平,达到降调标准后使用促性腺激素(Gn)促排卵,当3个以上卵泡直径 ≥ 18 mm时给予人绒毛膜促性腺激素(艾泽,美国默克公司)250 μ g,36 h后取卵、40 h授精。按照Peter评分系统评估第3天胚胎质量,I、II、III级胚胎视为可用胚胎,I、II级为优质胚胎。选择可用胚胎进行移植,对剩余胚胎或因各种原因取消新鲜移植的胚胎进行冷冻。

1.5.2 冻融胚胎移植(FET) 采用玻璃化冷冻方法进行胚胎冷冻和复苏,具体步骤同之前文献^[4]。人工周期准备内膜,即从月经周期D5起,予补佳乐(拜耳,广州)6 mg/d口服,内膜厚度 ≥ 8 mm后加用黄体酮(仙璐,浙江)转化内膜,4 d后解冻胚胎移植。从胚胎移植日起,予黄体酮针剂60 mg/d肌肉注射及地屈孕酮(Abbott Biologicals B.V.,荷兰)20 mg口服,补佳乐原量持续至测血HCG日。

1.5.3 滋肾育胎丸用法 患者在降调开始日随机分组,给予滋肾育胎丸或安慰剂(两者的包装及药丸外观一致,均由广州白云山中一药业有限公司生产,研究者和患者双盲)口服,5 g/次,3次/d,淡盐水送服,月经期1~4 d暂停药,直至新鲜移植后35天停药。因各种原因取消移植、移植后未孕及自然流产停药者亦均纳入研究。解冻胚胎移植周期不再服用滋肾育胎丸。

1.5.4 随访 服用滋肾育胎丸/安慰剂后取卵所形成的胚胎移植后(包括新鲜移植和解冻移植)均进行随访。胚胎移植后2周血清HCG, $> 100 \mu$ g/mL者为生化妊娠;移植后35 d超声检查可见孕囊及胎心搏动者为临床妊娠。随访至孕3月记录自然流产及继续妊娠情况。

1.6 观察指标 在新鲜胚胎周期中记录基础FSH值、窦卵泡数(AFC)、促排天数、Gn总量、HCG日总E₂值及每成熟卵泡对应血清E₂值、P值及子宫内膜厚度、获卵数、受精率、优质胚胎率、移植胚胎数、种植率、临床妊娠率、先兆流产率及流产率。在冻融胚胎周期中记录移植胚胎数、移植日内膜厚度、种植率、临床妊娠率、先兆流产率及流产率。随访至孕3月结束研究,全部实验完成后揭盲,对滋肾育胎丸组和安慰剂组的以上数据进行统计分析。

1.7 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验;计数资料以%表示,组间比较采用 χ^2 检验,以P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COH结果 2组Gn用量、Gn天数、HCG日子宫内膜厚度、获卵数、优胚率比较无统计学意义,药物组HCG日每成熟卵泡对应血清E₂水平高于安慰剂组,差异有统计学意义(P < 0.05)。见表2。

2.2 妊娠结局 新鲜移植共104周期(药物组54周期,安慰剂组50周期),2组移植胚胎数无统计学意义,药物组胚胎种植率及临床妊娠率均高于安慰剂组,差异有统计学意义(P < 0.05);先兆流产率及自然流产率均低于安慰剂组,差异无统计学意义(P > 0.05)。解冻移植(FET)周期共151周期,包括第一次及多次FET,其中药物组79周期,安慰剂组72周期。2组的移植胚胎数、胚胎种植率及临床妊娠率均没有明显差异,药物组的先兆流产率及自然流产率均低于安慰剂组,差异无统计学意义(P > 0.05)。见表3、表4。

表2 2组IVF超促排卵结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Gn总量(支)	Gn时间(天)	E ₂ 值/成熟卵子(ng/L)	内膜厚度(mm)	获卵数(个)	优胚数(个)
药物组	29.17 ± 11.00	10.06 ± 1.72	407.17 ± 141.25*	11.52 ± 2.14	13.27 ± 6.35	4.14 ± 3.32
安慰剂组	27.40 ± 8.88	9.92 ± 1.81	337.83 ± 140.06	11.29 ± 2.29	13.91 ± 6.92	4.51 ± 3.93

注:* P < 0.05 ,差异有统计学意义

表3 新鲜移植周期2组助孕结局比较

组别	移植胚胎数(个)	临床妊娠率(%)	种植率(%)	先兆流产率(%)	流产率(%)
药物组(n=54)	1.72 ± 0.67	80.00(40/50)*	56.98(49/86)*	12.12(4/33)	6.06(2/33)
安慰剂组(n=50)	1.78 ± 0.54	53.70(29/54)	38.30(36/94)	24.14(7/29)	13.79(4/29)

注: * $P < 0.05$, 差异有统计学意义

表4 解冻移植周期2组助孕结局比较

组别	移植胚胎数(个)	临床妊娠率(%)	种植率(%)	先兆流产率(%)	流产率(%)
药物组(n=79)	1.86 ± 0.69	65.28(47/72)	48.53(66/136)	14.89(7/47)	10.64(5/47)
安慰剂组(n=72)	1.85 ± 0.78	63.29(50/79)	48.63(71/146)	24.00(12/50)	16.00(8/50)

3 讨论

IVF-ET 技术发展 30 余年来, 尽管成功率逐步上升, 但似乎也到达瓶颈, 很难再有所提升。另外 IVF 后自然流产率也比较高, 进一步影响了 IVF 的助孕效率。中医理论认为, 肾为先天之本, 藏精系胞, 为生殖之本, 因此不孕不育及自然流产均与肾气不足密切相关。根据广州中医药大学罗元凯教授验方研发的补肾成药滋肾育胎丸, 为国家中药保护品种, 已广泛用于临床治疗复发性流产、先兆流产, 疗效确切。近年来, 随着中西医结合治疗在辅助生殖领域的延伸, 逐渐有作者将 ZYP 用于 IVF, 但多为观察性研究, 证据等级不高。本研究采用前瞻性双盲 RCT 设计, 探讨滋肾育胎丸对 IVF-ET 的影响和 value。

研究表明, COH 过程中滋肾育胎丸对促排卵用药剂量和天数、获卵数及优胚率无影响, 但能增加每成熟卵泡 E_2 水平, 表明滋肾育胎丸与 Gn 合用, 能提高患者对超促排卵药的反应性, 结合后面胚胎种植率的提高, 提示可能最终改善了卵子质量。这一点有可能是药物通过调解卵母细胞分泌因子而发挥作用。卵母细胞分泌的因子在调节卵泡的发育和衰退、影响优势卵泡选择以及闭锁卵泡的形成方面发挥重要作用, 其中卵母细胞分泌的 TGF- β 最为重要^[5]。有基础研究应用大鼠模型发现应用高剂量 ZYP 可明显上调卵母细胞 TGF- β 水平, 改善卵母细胞功能^[6]。

本研究中, 药物组胚胎种植率的升高更可能与 ZYP 改善子宫内膜容受性有关。在新鲜移植周期、应用滋肾育胎丸的情况下, 药物组胚胎种植率升高; 而在解冻移植周期、未再应用药物的情况下, 药物组的胚胎着床率与安慰剂组差异无统计学意义, 也从反面证明滋肾育胎丸有改善子宫内膜容受性效果。在研发阶段的药理实验表明, 滋肾育胎丸具有改善实验兔卵巢和子宫血液供应的作用, 用药后实

验兔子宫内膜腺体数目明显增多^[7]。子宫内膜容受性在宏观方面没有特异指标, 但在微结构方面, 子宫内膜容受性改善与新生血管的支持密切相关, 而 VEGF 是迄今为止发现的最重要的具有促血管增生和增强血管通透性功能的血管生长因子。有研究表明, 滋肾育胎丸能促进子宫内膜血管内皮生长因子(VEGF)、孕激素受体(PR)的表达, 从而改善子宫内膜的容受性^[8]。HOXA10 基因产物是衡量子宫内膜容受性的另一分子标志物^[9], 它参与调节胚胎成长发育和子宫内膜增殖、分化及蜕膜化等过程, 其表达下降可能导致着床失败和蜕膜化障碍, 使胚胎植入率下降^[10]。整合素 $\beta 3$ 也是反映子宫内膜容受性的黏附分子, 它参与早期胚胎与子宫内膜的黏附反应、促进胚胎黏附和植入^[11]。有研究采用大鼠模型发现滋肾育胎丸可以上调 HOXA10 及其下游靶基因整合素 $\beta 3$ 的表达, 改善促排卵后子宫内膜的容受性^[12]。

不孕不育及自然流产均与肾气不足密切相关, 本研究中, 在行 IVF 助孕的患者中, 安慰剂组早期先兆流产率为 24.06%, 自然流产率为 15.19%, 均高于一般人群的 12%^[13], 也证明不孕和流产密不可分。IVF 助孕患者因为妊娠不易, 一旦发生阴道出血或超声提示有绒毛膜下血肿时往往精神高度紧张, 而这种不良情绪发过来又会加重流产风险^[14], 事实上大面积绒毛膜下血肿最终导致自然流产率高达 49%^[15]。在本研究中, 当配合应用滋肾育胎丸后, 尽管没有统计学意义, 药物组无论是先兆流产还是最终自然流产的发生率均低于安慰剂组。肾虚或脾肾两虚是自然流产的主要证型, 滋肾育胎丸恰能适用于肾虚、脾虚、气血虚弱或脾肾两虚型的先兆流产、反复自然流产, 也因此是全国高等院校十二五规划教材《中医妇科学》收录的用于治疗脾肾两虚、冲任不固所致的胎漏、胎动不安(早期先兆流产)及滑胎(习惯性流产)的常规方剂。

降低先兆流产和最终的自然流产率可以减轻患者焦虑,提高抱婴回家率,对于最终提升IVF助孕效率有重要意义。

综上所述,在行IVF助孕的不孕不育妇女中配合应用滋肾育胎丸,能够提高卵巢反应性、优化卵子质量进而优化胚胎质量,提高子宫内膜容受性,最终提高了IVF-ET的临床妊娠率,降低了流产发生率。在不孕不育治疗领域,中药配合辅助生殖技术相得益彰,是一个极具发展前景的研究方向。

参考文献

[1] Kannan A, Fazleabas AT, Bagchi IC, et al. The transcription factor C/EBP β is a marker of uterine receptivity and expressed at the implantation site in the primate[J]. *Reprod Sci*. 2010, 17(5):434-443.

[2] 高晓红,孙晓溪,石林特,等. 体外受精-胚胎移植术后妊娠结局回顾性分析[J]. *生殖与避孕*, 2004, 24(1):39-42.

[3] 中华人民共和国卫生部. 人类辅助生殖技术规范[J]. *中国生育健康杂志*, 2004, 15(1):4-9.

[4] 李明昭,赵小利,任文娟,等. Y染色体AZFc区完全缺失患者ICSI治疗妊娠结局分析[J]. *生殖医学杂志*, 2015, 24(11):948-951.

[5] Oron G, Fisch B, Ao A, et al. Expression of growth-differentiating factor 9 and its type 1 receptor in human ovaries[J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(1):109-117.

[6] 张晓丽,赵晓勇. 滋肾育胎丸对免疫性不孕模型大鼠卵母细胞生物学行为的调节作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(3):351-355.

[7] 邹琦,王如萍. 滋肾育胎丸[J]. *今日药学*, 2002, 12(2):56-56.

[8] 廖慧慧,胡晓文,赵颖,等. 滋肾育胎丸对人流术后患者子宫内膜血管内皮生长因子、雌激素受体、孕激素受体表达的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(4):22-25.

[9] Cermik D, Selam B, Taylor HS. Regulation of HOXA10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88:238-243.

[10] Chen Q, Zhang Y, Elad D, et al. Navigating the site for embryo implantation: biomechanical and molecular regulation of intrauterine embryo distribution[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34:1024-1042.

[11] Zaslava D, Dimitrov R, Stamenova M, et al. Endometriosis and the role of the integrins in the pathogenesis of the endometriosis[J]. *Akush GInekol (sofiia)*, 2007, 46:37-48.

[12] 高琦,王春华,蔡霞. 滋肾育胎丸对促排卵小鼠着床期子宫内膜HOXA10及下游基因整合素 β 3表达的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2015, 24(7):578-582.

[13] Gold R, Stefkoski D, Selmaj K, et al. Pregnancy Experience: Nonclinical Studies and Pregnancy Outcomes in the Daclizumab Clinical Study Program[J]. *Neurol Ther*, 2016, 5(2):169-182.

[14] Lédée-Bataille N, Koeppel B, Frydman R, et al. The impact of stress in the maternofetal relationship: an immunological approach[J]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2003, 31(9):778-781.

[15] Koifman A, Levy A, Zaulan Y, et al. The clinical significance of bleeding during the second trimester of pregnancy[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2008, 278(1):47-51.

(2018-01-10 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第657页)

[3] Browning J, Bigrigg A, Taylor I. Symptomatic and incidental mammary duct ectasia[J]. *J R Soc Med*, 1986, 79:715-716.

[4] Meguid MM, Oler A, Numann PJ, et al. Pathogenesis based treatment of recurring subareolar breast abscesses[J]. *Surgery*, 1996, 118:775-782.

[5] 刘蕾,倪毅,刘伟. 乳管镜冲洗治疗急性期及亚急性期浆细胞性乳腺炎30例效果观察[J]. *中国当代医药*, 2011, 18(3):180.

[6] 张云,徐红. 浆细胞性乳腺炎的研究进展[J]. *武警后勤学院学报:医学学报*, 2010, 19(6):506-508.

[7] 林仁志,林立忠. 浆细胞性乳腺炎32例诊治体会[J]. *全科医学临床与教育*, 2011, 9(3):350-351.

[8] 耿翠芝,吴祥德. 浆细胞性乳腺炎的诊断与治疗[J/CD]. *中华乳腺病杂志(连续型电子期刊)*, 2008, 2(1):20-23.

[9] 孔凡立,孙素红,曾峰,等. 浆细胞性乳腺炎27例治疗体会[J/CD]. *中华普通外科学文献(连续型电子期刊)*, 2010, 4(6):573-574.

[10] ZY/T001.1~001.9-94. 中华人民共和国中医药行业标准:中医病证诊断疗效标准[S]. 南京:南京大学出版社,1994:46.

[11] 赵红梅,雷玉涛,侯宽永,等. 乳腺导管扩张症和浆细胞性乳腺炎差异的探讨[J]. *中国现代普通外科进展*, 2005, 8(4):235-237.

[12] 唐文,何山,郑轲,等. 浆细胞性乳腺炎的临床研究[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2008, 22(11):810-811.

[13] 徐鲲,刘小丰,杨德同. 浆细胞性乳腺炎的外科治疗[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 12(12):2524-2526.

[14] 卜彤文,王自辉,张雅兰,等. 西黄丸配合消肿散结汤治疗浆细胞性乳腺炎的临床分析[C]. 西黄丸临床应用研究论文集, 2009:61-62.

[15] 区烈烈,易东生,李栋,等. 他莫昔芬联合小金结胶囊治疗乳腺增生症[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2014, 1(35):84-85.

[16] 赵钢,郭瑞亚,贾振. 巴曲酶小金胶囊联合抗生素治疗丹毒20例[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2014, 4(2):211,214.

(2018-01-10 收稿 责任编辑:徐颖)