

二补助育改良方对反复体外受精-胚胎移植失败患者子宫内膜容受性的影响

石 玥¹ 刘雁峰² 穆国华² 武 颖³ 辛明蔚³ 何军琴³

(1 北京市海淀区妇幼保健院,北京,100080; 2 北京中医药大学东直门医院,北京,100700;

3 首都医科大学附属北京妇产医院,北京,100026)

摘要 目的:观察二补助育改良方对反复体外受精-胚胎移植(IVF-ET)失败患者子宫内膜容受性的影响。方法:选取2016年1月至2018年3月东直门医院、北京妇产医院及海淀区妇幼保健院多中心收集的因反复IVF-ET失败而就医患者资料,二补助育改良方药物干预3个月后,与未用药干预组比较,采集2组患者黄体中期子宫内膜活体检查,从分子生物学层面进行研究观察,以qPCR研究同源盒基因(HOX)A10 mRNA表达,以免疫组织化学法检测白血病抑制因子(LIF)、整合素 $\alpha V\beta_3$ 等指标,同时记录妊娠结局。结果:在HOXA mRNA表达中,2组差异有统计学意义($P < 0.05$);在LIF、整合素 $\alpha V\beta_3$ 的表达,2组差异有统计学意义($P < 0.05$);胚胎种植率和临床妊娠率有显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:二补助育改良方可以改善反复IVF-ET失败患者黄体中期子宫内膜HOXA 10mRNA、LIF、整合素 $\alpha V\beta_3$ 的表达。二补助育改良方的药效值得肯定,可以改善反复IVF-ET失败患者的子宫内膜容受性。

关键词 二补助育汤;二补助育改良方;子宫内膜容受性;体外受精-胚胎移植;子宫内膜活体检查;同源盒基因A10;白血病抑制因子;整合素 $\alpha V\beta_3$

Effects of Modified Erbu Zhuyu Formula on Endometrial HOXA10 mRNA, LIF and Integrin $\alpha V\beta_3$ in Patients with Repeated IVF-ET Failure

Shi Yue¹, Liu Yanfeng², Mu Guohua², Wu Ying³, Xin Mingwei³, He Junqin³

(1 Haidian Maternal & Child Health Hospital, Beijing 100080, China; 2 Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3 Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China)

Abstract Objective: To observe effects of modified Erbu Zhuyu Formula on endometrial receptivity in patients with repeated IVF-ET failure. **Methods:** Data of multicenter patients with repeated IVF-ET failure from January 2016 to March 2018 were collected. After 3 months of intervention with modified Erbu Zhuyu Formula, it was compared with non-intervention group. Endometria of patients in the 2 groups were collected during mid-luteal phase for biopsy and they were studied and observed from the perspective of molecular biology. Expression of HOXA10 mRNA was studied by qPCR. Immunohistochemistry was used to detect indexes such as LIF and integrin $\alpha V\beta_3$. Pregnancy outcomes were collected. **Results:** There was obvious difference between the 2 groups in the expression of HOXA mRNA ($P < 0.05$). There were obvious differences between the 2 groups in the expressions of LIF and integrin $\alpha V\beta_3$ ($P < 0.05$). The embryo implantation rate and clinical pregnancy rate were increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Erbu Zhuyu Formula can improve the expressions of endometrial HOXA10 mRNA, LIF and integrin $\alpha V\beta_3$ within mid-luteal phase in patients with repeated IVF-ET failure. Its efficacy should be affirmed that modified Erbu Zhuyu Formula can improve the endometrial receptivity in patients with repeated IVF-ET failure.

Key Words Erbu Zhuyu Decoction; Modified Erbu Zhuyu Formula; Endometrial receptivity; Repeated IVF-ET failure; Endometrial biopsy; HOXA10; LIF; Integrin $\alpha V\beta_3$

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.09.066

随着体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术在辅助生殖领域的日益进步,胚胎移植率得到显著提高。

但最终妊娠率仍不理想。国内外临床研究发现,胚

泡着床障碍是导致IVF-ET妊娠率低的主要原因之

一,而子宫内膜容受性降低又是阻碍胚泡着床的主要因素之一。子宫内膜容受性的调控机制需要诸多因素的参与。其中,同源盒基因(HOX)中 HOXA10 是子宫内膜容受性建立和着床成功的必需调节因子,可能是影响子宫内膜容受性更深层次的起源^[1];白血病抑制因子(Leukemia Inhibitory Factor, LIF)目前被认为是种植着床预测的金标准^[2];整合素 $\alpha V \beta_3$ 是目前公认的、影响子宫内膜容受性的指标之一^[3]。

二补助育汤是名老中医肖承棕教授调治子宫内膜容受性低的经验方,全方“补肾气,通胞脉”,从而改善子宫内膜容受性^[4]。该方中“二补”是指以补骨脂、骨碎补为君药。目前补骨脂的肝肾毒性存在争议^[5-6],临床应用时常去除,故在干预药物上,本研究改用二补助育改良方(去补骨脂)进行深入研究。前期工作中,本课题组已对该类患者的中医证型、相关症状评分、女性激素水平并结合超声等各项指标进行了临床研究^[7-9],同时对改良方进行了相关实验研究^[10-11]。在上述基础上,我们采用子宫内膜活体检查的方法,采集反复 IVF-ET 失败肾虚血瘀证患者黄体中期子宫内膜,以 qPCR 研究 HOXA10 mRNA 表达,以免疫组织化学法检测 LIF、整合素 $\alpha V \beta_3$ 等指标,研究二补助育改良方对子宫内膜容受性在分子生物学方面的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2018 年 3 月就诊于东直门医院、北京妇产医院及海淀区妇幼保健院,因子宫内膜容受性低下致 IVF-ET 反复失败而欲再行 IVF-ET 的患者 31 例。观察组的样本来自因反复 IVF-ET 失败而于东直门医院就诊寻求中医治疗诊断为肾虚血瘀证的患者,对照组的样本来自北京妇产医院及海淀区妇幼保健院。患者皆因反复 IVF-ET 失败而求子宫内膜活体检查,未经中医药干预,肾虚血瘀证病例共 16 例。

对照组 16 例,年龄 27 ~ 42 岁,平均年龄 (36.13 ± 1.01) 岁,其中 35 ~ 42 岁有 12 例,占 75%;观察组 15 例,年龄 30 ~ 43 岁,平均年龄 (38.60 ± 0.83) 岁,其中 35 ~ 42 岁有 13 例,占 86%。2 组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。具有可比性。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 对于反复 IVF-ET 失败患者,子宫内膜容受性低下的诊断标准,参照相关文献^[12-14]制定。1)婚后未避孕,有正常性生活 1 年而

未受孕者;2)行 2 次及以上 IVF-ET 技术失败,拟再行 IVF-ET 治疗者;3)月经周期规律(21 ~ 35 d),月经量少;4)子宫形态正常;5)基础体温(BBT)双相和(或)超声监测有正常排卵;6)超声 Salle 评分 ≤ 13 分;7)男方精液常规正常。

1.2.2 中医证候诊断标准 肾虚血瘀证的证候诊断标准,参照《中医病证诊断疗效标准》^[15]、《中医妇科学》^[16]不孕症中肾虚证和血瘀证、月经过少中的血瘀证等相关标准制定:主症:1)婚久不孕;2)月经量少或行经时间不足 2 d。次症:1)腰酸膝软;2)经色紫黯有血块;3)头晕耳鸣;4)性欲淡漠或阴中干涩;5)经行腹痛;6)面唇暗斑。典型舌脉:舌质淡黯,舌边有瘀点,脉沉细或涩。凡具备主症及 3 项次症参考典型舌脉即可诊断。

1.3 纳入标准 1)符合上述诊断标准;2)同意并接受子宫内膜活体检查;3)能够坚持口服中药并积极配合完成治疗者。

1.4 排除标准 1)因甲状腺、肾上腺、垂体等器质性病变及其他内分泌疾病导致月经过少者;2)患有输卵管积水、子宫肌瘤、腺肌症、内异症等;3)治疗前 3 个月内使用过激素类药物治疗者;4)严重的精神及心理疾患;5)患有性传播疾病或泌尿生殖系统急性炎症反应者;6)资料不完整;7)私自改用其他治疗,影响疗效评定者。

1.5 干预方法 观察组给予口服二补助育改良方(去补骨脂),主要药物组成为:骨碎补、巴戟天、桑寄生、川牛膝、川续断、郁金、鸡血藤等,并随辨证加减,制成颗粒剂,每日 1 剂,1 剂 2 袋,早晚各 1 袋开水冲服。连续服用中药 3 个月经周期(月经期间不停药)。服满 3 个周期中药且同意子宫内膜活体检查患者。

对照组患者皆因反复 IVF-ET 失败而求子宫内膜活体检查,未经中医药干预,肾虚血瘀证患者。

1.6 观察指标 3 个月经周期后,于黄体中期取患者子宫内膜活体检查。以试纸测定月经周期中尿黄体生成素(LH),以 LH 高峰日确定排卵日(LH 0 d),视为黄体期开始,于黄体中期(LH + 7 d)取子宫内膜活体检查。或结合超声,明确排卵后 7 d 采集子宫内膜标本。内膜检测当月月经周期禁同房一个月。

治疗结束患者再行 IVF-ET 治疗,判定胚胎种植率和临床妊娠情况。胚胎移植后 2 周抽血测定血 β -人类绒毛膜性腺激素(β -hCG),阳性结果确定为生化妊娠,即为种植成功;胚胎移植后 5 周妇科

超声发现子宫内孕囊和胎心搏动即确诊为临床妊娠。

采用一次性使用内膜取样管负压吸取少量内膜组织，以 4 ℃ 生理盐水快速洗去血污，用无菌干纱块吸去水分，分成 2 份，一份置于无菌 EP 管于 -80 ℃ 冰箱冻存，以备 qPCR 实验；另一份存放于 4% 多聚甲醛固定液中，以备免疫组织化学染色。

1.7 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件处理上述所采集的数据。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用独立 *t* 检验，非正态数据用中位数 (M) (min, max) 表示，采用非参数检验；计数资料以率表示，采用 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 IVF-ET 失败次数比较 对照组 IVF-ET 失败中位数为 3(2,5)；观察组 IVF-ET 失败中位数 3(2,4)。差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.2 二补助育改良方对反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达的影响 2 组患者子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达比较，观察组患者子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达明显提高。与对照组比较，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1，图 1~2。

表 1 2 组患者子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)	
组别	HOXA10 mRNA
对照组(<i>n</i> = 16)	2 938.37 ± 965.00
观察组(<i>n</i> = 15)	10 292.66 ± 2 653.38 *

注：与对照组比较，* *P* < 0.05

2.3 二补助育改良方对反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜 LIF 表达的影响 2 组患者子宫内膜 LIF 表达比较，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 2，图 3。

2.4 二补助育改良方对反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜整合素 $\alpha v \beta_3$ 表达的影响 2 组患者子宫内膜整合素 $\alpha v \beta_3$ 表达比较，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 3，图 4。

2.5 2 组胚胎种植率和临床妊娠率比较 对照组胚胎种植率(25%)，低于观察组(40%)，对照组临床妊娠率(6.25%)，明显低于观察组(40%)，*P* = 0.014 < 0.05，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 4。

表 2 2 组患者子宫内膜 LIF 表达比较($\bar{x} \pm s$)	
组别	LIF
对照组(<i>n</i> = 16)	11.438 ± 0.704
观察组(<i>n</i> = 15)	16.375 ± 1.523

注：与对照组比较，* *P* < 0.05

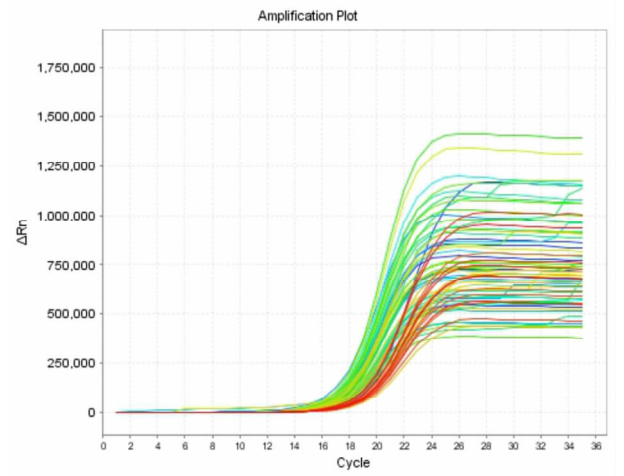


图 1 HOXA10 扩增曲线

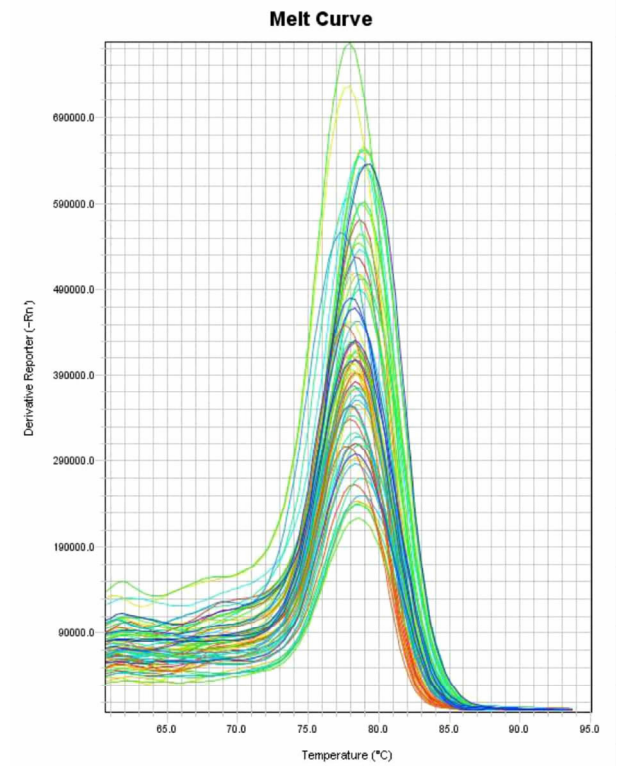


图 2 HOXA10 溶解曲线

表 3 2 组患者子宫内膜整合素 $\alpha v \beta_3$ 表达比较($\bar{x} \pm s$)	
组别	整合素 $\alpha v \beta_3$
对照组(<i>n</i> = 16)	7.878 ± 0.385
观察组(<i>n</i> = 15)	11.163 ± 1.062

表 4 2 组患者胚胎种植率和临床妊娠率比较						
组别	生化妊娠 (例)	种植率 (%)	临床妊娠 (例)	妊娠率 (%)	未着床 (例)	失败率 (%)
对照组(<i>n</i> = 16)	4	25.00	1	6.25	11	68.75
观察组(<i>n</i> = 15)	6	40.00	6	40.00	3	20.00

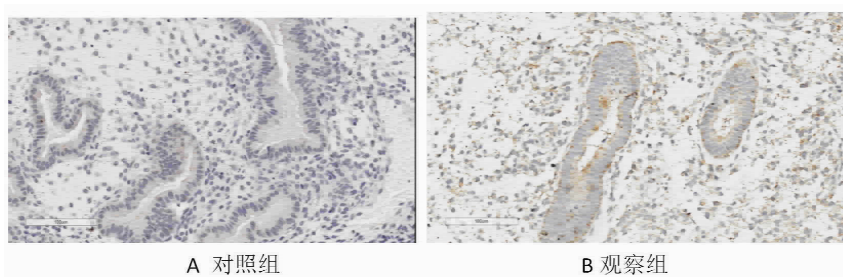


图 3 2 组患者子宫内膜 LIF 的表达(组织化学染色, $\times 200$)

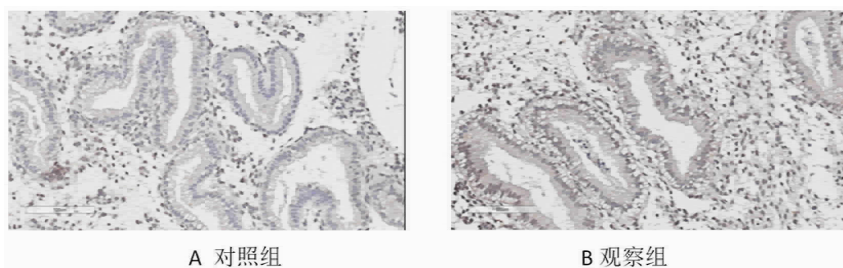


图 4 2 组患者子宫内膜整合素 $\alpha v \beta_3$ 的表达(组织化学染色, $\times 200$)

3 讨论

3.1 一般情况分析 因教育水平提高、生活压力增大、社会环境改变等原因,女性孕育年龄推后,加上正值二胎政策开放,此年龄段患者的生育欲望强烈,考虑到年龄因素及身体原因等,求助于辅助生殖技术的患者较多,但成功率较低,失败次数增多。正如《素问·上古天真论》中言“女子七岁,肾气盛,齿更发长;二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下,故有子……五七阳明脉衰,面始焦,发始堕;六七三阳脉衰于上,面皆焦,发始白;七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也”。考虑该年龄患者正处于“五七”至“六七”之间,天癸渐衰,又可能因多次孕产而损伤肾气,致肾气亏虚;同时因患者求孕心切,多次试管经历,使得精神压力较大,可能导致心气亏损,心血不足。如《素问·评热病论》中言,“胞脉者,属心而络于胞中”,心气亏损,心血不足,气血运行受阻而瘀滞,致胞脉不畅。此类患者符合子宫内膜容受性低的主要病机-肾气不足,胞脉不畅^[4],亦合于二补助育改良方补肾气、通胞脉^[4]的立法。通过 2 组间年龄分布和 IVF-ET 失败次数的比较,差异均无统计学意义,具有可比性。年龄(35 ~ 42 岁)、IVF-ET 失败次数(2 次及以上)在本研究纳入的患者中具有一定的代表性。

3.2 HOXA10 mRNA、LIF 及整合素 $\alpha V \beta_3$ 与子宫内膜容受性 对照组与观察组在 HOXA10 mRNA 表达上有明显差异。相关研究表明,已普遍认同 HOXA-10 的表达与子宫内膜容受性之间的关系,其可能是影响子宫内膜容受性更深层次的起源。

HOXA-10 是胞饮突形成、子宫内膜容受性和胚胎植入等成功建立的必需调节因子^[1]。结果表明二补助育改良方能明显改善反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达,作用机制为可能通过上调 HOXA-10 mRNA,从而使子宫内膜容受性得到改善。

本研究中对照组与观察组 LIF 表达有明显差异。LIF 在胚胎移植中起着重要的作用,参与子宫转变为接受状态、蜕膜化、胚泡生长、胚胎-子宫内膜相互作用、滋养层细胞侵入,以及免疫调制,在胚胎着床期高水平表达,在子宫内膜的 LIF 水平可以作为胚胎着床的预测指标^[2]。结果表明二补助育改良方能明显改善反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜 LIF 表达,改善子宫内膜容受性,促进胚胎着床。

对照组与观察组整合素 $\alpha V \beta_3$ 表达亦有明显差异。 $\alpha V \beta_3$ 是整合素的两个亚单位,两者通过共价键连接,在子宫内膜“着床窗口期”(排卵后第 6 ~ 10 d),两者可同时表达于子宫内膜的腺上皮和腔上皮,此时子宫内膜容受状态最佳^[2]。子宫内膜中低水平的整合素 $\alpha V \beta_3$ 与子宫内膜容受性下降有关,整合素表达上调可促进早期胚泡的黏附,反之,表达下降则不利于胚泡的植入^[3]。本研究结果表明二补助育改良方能明显改善反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜整合素 $\alpha v \beta_3$ 表达,改善子宫内膜容受性,有助于胚泡对子宫内膜的黏附。

在本研究统计结果中,观察组与对照组 HOXA10 mRNA、LIF、整合素 $\alpha v \beta_3$ 表达,胚胎种植率及临床妊娠率有明显差异。表明二补助育改良方

能明显改善反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜 HOXA10 mRNA、LIF、整合素 $\alpha v \beta_3$ 表达,并改善妊娠结局。可认为二补助育改良方的药效值得肯定,作用机制可能为通过上调 HOXA10 mRNA、LIF、整合素 $\alpha v \beta_3$ 的表达,从而改善子宫内膜容受性,有利于胚胎对子宫内膜的黏附。同时显著提高患者成功妊娠率,降低流产率,为临床提高 IVF-ET 受孕率提供一定的试验依据,为苦恼于“试管婴儿”反复失败的家庭带来希望。

3.3 不足与展望 本研究采集的样本数目较少。试验群体皆为 IVF-ET 失败 2 次以上的患者,采集的子宫内膜为珍稀样本。该群患者大多受孕意愿较迫切,而再次失败的代价较高,使得患者对子宫内膜活检及再次活检的接受度不高。尽管子宫内膜活检的相关技术已比较成熟,且机械性刺激有助于改善子宫内膜容受性^[17],但毕竟属于有创检查,患者依从性较差;另外,采集时间又必须在黄体中期,患者有自然受孕及移植周期安排等相关顾虑。但对于评估二补助育汤及其改良方对反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜的影响,在前期动物实验及临床观察的基础上,内膜的直接检测是更有说服力的,其结果能作为依据更好地为临床服务。在今后的研究中,将尽可能收集自身前后对照,并进一步扩大样本量。

参考文献

- [1] Bagot CN, Kliman HJ, Taylor HS. Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation[J]. Dev Dyn, 2001, 222(3): 538-544.
- [2] Salleh N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception [J]. ScientificWorld-Journal, 2014, 2014: 201514.
- [3] Tan G, Guo W, Zhang B, et al. Temporary reduction and slow recovery of integrin $\alpha v \beta_3$ in endometrium after uterine arterial embolization

- [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 160(1): 66-70.
- [4] 肖承棕, 刘雁峰, 江媚. “补肾气, 通胞脉”改善子宫内膜容受性[J]. 生殖与避孕, 2014, 34(7): 595-598.
- [5] 穆国华, 石玥, 申萌萌, 等. 补骨脂主要不良反应的研究与思考[J]. 世界中医药, 2018, 13(4): 1038-1042.
- [6] 赵子婧, 巩政, 史少泽, 等. 补骨脂及其与甘草配伍单次给药大鼠的毒代动力学及肝肾毒性初探[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2221-2226.
- [7] 江媚, 刘雁峰, 黄羚. 子宫内膜容受性低中医证型特点初探[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 3836-3839.
- [8] 刘雁峰, 江媚, 孙天琳, 等. 二补助育汤对子宫内膜容受性影响的临床研究[J]. 世界中医药, 2012, 7(3): 195-197.
- [9] 江媚, 刘雁峰, 贾超敏, 等. 二补助育汤对反复 IVF-ET 失败患者子宫内膜容受性影响的临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4875-4878.
- [10] 石玥, 吴丽婷, 穆国华, 等. 二补助育汤及改良方对小鼠子宫内膜整合素 $\alpha v \beta_3$ 、SCF mRNA 及 HOXA-10 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 1997-2000.
- [11] 石玥, 穆国华, 吴丽婷, 等. 二补助育改良方对小鼠子宫内膜胞饮突、LIF、ER 和 PR 表达的影响[J]. 环球中医药, 2017, 10(4): 425-429.
- [12] 丰有吉等. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 27, 448.
- [13] 尹倩, 侯丽辉, 葛军, 等. 补肾化痰方对肥胖型多囊卵巢综合征不孕患者子宫内膜容受性的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(11): 1541-1544, 1558.
- [14] 耿会转, 周忠明, 贺漪, 等. 解郁育胞丸对 107 例肝郁型不明原因不孕患者子宫内膜容受性及妊娠的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(17): 1492-1496.
- [15] 中医病证诊断疗效标准编审委员会. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 60-72.
- [16] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 94-329.
- [17] 黄柳静, 李荣, 羊海涛, 等. 改善子宫内膜容受性的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(21): 4204-4209.

(2018-09-04 收稿 责任编辑: 杨觉雄)