

中药联合脱氢表雄酮预处理对高龄卵巢储备正常患者体外受精 - 胚胎移植结局的影响

李 静 滕 涛 梁 琦 崔 薇

摘要 **目的** 观察中药联合脱氢表雄酮(DHEA)预处理对高龄卵巢储备正常患者体外受精 - 胚胎移植(IVF-ET)周期结局的影响。**方法** 将 233 例 36 ~ 42 岁卵巢储备正常行 IVF 的患者按照随机数字表法分为 3 组。中药联合 DHEA 组(简称联合组)76 例,进入 IVF 周期前给予中药联合 DHEA 预处理 8 周;DHEA 组 82 例,进入 IVF 周期前给予 DHEA 预处理 8 周;对照组 75 例,不给予任何预处理。观察 3 组获卵数、受精率、优质胚胎率、冷冻胚胎数、临床妊娠率、早期自然流产率、活产率、抗苗勒氏管激素(AMH)、周期取消率、绒毛膜促性腺激素(hCG)注射日子宫内膜厚度及 E_2 水平、Gn 使用量和使用天数。**结果** 联合组及 DHEA 组患者优质胚胎率明显高于对照组($P < 0.05$),两治疗组受精率、冷冻胚胎数、临床妊娠率、活产率高于对照组,早期自然流产率低于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。两治疗组患者预处理后 AMH 较治疗前均明显升高($P < 0.05$),对照组无明显变化。获卵数、周期取消率、hCG 注射日子宫内膜厚度及 E_2 水平、Gn 使用量和用药时间 3 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 中药联合 DHEA 预处理可以提高卵巢储备功能正常的高龄患者的优质胚胎率,其机制可能与 AMH 有关。

关键词 中药;脱氢表雄酮;高龄患者;卵巢储备正常;体外受精 - 胚胎移植

Effect of Chinese Herbs Combined DHEA Pretreatment on Pregnancy Outcomes of Elderly Patients with Normal Ovarian Reserve Undergoing IVF-ET LI Jing, TENG Tao, LIANG Qi, and CUI Wei Department of Reproductive Medicine, Second Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250001)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Chinese herbs combined dehydroepiandrosterone (DHEA) pretreatment on pregnancy outcomes of elderly patients with normal ovarian function undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Methods** Totally 233 IVF patients with normal ovarian function scheduled for IVF-ET, 36 - 42 years old, were assigned to the combined group, the DHEA group, the control group according to random number table. Patients in the combined group (76 cases) were pretreated with Chinese herbs plus DHEA before IVF cycle for 8 weeks. Patients in the DHEA group (82 cases) were pretreated with DHEA before IVF cycle for 8 weeks. Those in the control group (75 cases) received no pretreatment. The number of retrieved oocytes, the fertilization rate, the rate of good quality embryos, the number of frozen embryos, clinical pregnancy rate, early spontaneous abortion rate, live birth rate, levels of anti-Müllerian hormone (AMH), the cycle cancellation rate, endometrial thickness and estradiol (E_2) level on human chorionic gonadotropin (hCG) injection day, the dosage and duration of Gn were observed in the 3 groups. **Results** The good quality embryo rate was significantly higher in the combined group and the DHEA group than in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the fertilization rate, the number of frozen embryos, the clinical pregnancy rate, and the live birth rate were higher; the early spontaneous abortion rate was lower in the two pretreatment groups ($P > 0.05$). AMH increased more significantly in the two pretreatment groups after treatment ($P < 0.05$). There was no obvious change in the control group. The post-treatment number of retrieved oocytes, the cycle

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2014WS0435);山东省中医药科技发展计划项目(No. 2015 - 136)

作者单位:山东中医药大学第二附属医院生殖医学科(济南 250001)

通讯作者:崔 薇, Tel: 0531 - 82436156, E-mail: cuiwei9996@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 09. 1046

cancellation rate, E_2 level and endometrial thickness on hCG injection day, the dosage and duration of Gn had no significant difference among the 3 groups ($P > 0.05$). Conclusion Pretreatment of Chinese herbs combined DHEA could improve the good quality embryo rate of elderly patients with normal ovarian reserve, which might be associated with AMH.

KEYWORDS Chinese herbs; Dehydroepiandrosterone; elderly patient; normal ovarian reserve; *in vitro* fertilization-embryo transfer

体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术的发展为生殖领域带来了重大突破,近年来,其临床妊娠率也在不断提升,但随着不孕不育人群的高龄化,IVF-ET 临床妊娠率及活产率的提高受到了限制。因此,探寻提高妊娠率及活产率的预处理方法具有更重要的临床意义。已有报道中药治疗、脱氢表雄酮(DHEA)补充可提高卵巢功能下降患者的妊娠率,并降低其流产率^[1,2]。本研究主要观察中药联合 DHEA 预处理是否会改善高龄卵巢储备功能正常不孕患者的 IVF 结局,现报告如下。

资料与方法

1 诊断标准 根据《妇产科学》^[3]中有关不孕症标准。即:有正常性生活,未经避孕 1 年未妊娠者。

2 纳入标准 (1)符合不孕症诊断标准;(2)年龄 36~42 岁;(3)卵巢储备正常;(4)月经规律;(5)因女方输卵管梗阻或不完全梗阻行长方案 IVF-ET 的患者。

3 排除标准 (1)子宫内膜异位症;(2)生殖器畸形;(3)输卵管积水未处理者;(4)行卵泡浆内单精子显微注射技术(ICSI)者;(5)高泌乳素血症;(6)多囊卵巢综合征(PCOS);(7)近 3 个月内应用激素类药物。

4 一般资料 233 例均为 2011 年 5 月—2014 年 10 月于山东中医药大学第二附属医院生殖医学中心接受 IVF 治疗的患者,按照随机数字表法分为中药联合 DHEA 组(简称联合组,76 例)、DHEA 组(82 例),对照组(75 例),3 组患者年龄、不孕年限、BMI、基础促卵泡激素(FSH)、抗苗勒氏管激素(AMH)、双侧窦卵泡数比较(表 1),差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 3 组患者一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (75 例)	DHEA 组 (82 例)	联合组 (76 例)
平均年龄(岁)	37.7 ± 3.6	37.7 ± 3.5	38.2 ± 3.6
不孕年限(年)	5.7 ± 2.3	5.5 ± 2.1	5.6 ± 2.2
BMI	22.0 ± 1.7	21.9 ± 1.6	22.1 ± 1.7
基础 FSH((IU/L)	7.1 ± 2.0	7.1 ± 1.8	7.2 ± 1.9
AMH(ng/mL)	5.0 ± 1.9	4.8 ± 2.0	4.9 ± 1.9
双侧窦卵泡数(个)	12.8 ± 2.1	13.3 ± 1.9	13.1 ± 2.2

5 方法

5.1 预治疗 符合纳入标准患者均于月经周期第 2~3 天测血基础内分泌,并行阴道 B 超检查记录双侧卵巢窦卵泡数。联合组:给予补益肝肾、活血养血中药(紫石英 30 g 肉桂 10 g 桃仁 10 g 红花 10 g 熟地 20 g 鸡血藤 30 g 干姜 10 g 赤芍 10 g 泽泻 10 g 牛膝 15 g 补骨脂 10 g 川断 10 g 香附 10 g 丹参 10 g 甘草 6 g),每天 1 剂(月经期不用),同时联合 DHEA(美国 GNC 公司,25 mg/片)75 mg/d,连用 2 个月经周期。DHEA 组:给予 DHEA(美国 GNC 公司)75 mg/d,连用 2 个月经周期。对照组:不给予任何预处理。

5.2 超促排卵方案 所有患者均给予常规长方案超促排卵:于月经第 3 天开始给予雌二醇片雌二醇地屈孕酮片复合包装(雌二醇片含雌二醇 2mg;雌二醇地屈孕酮片含雌二醇 2mg 和地屈孕酮 10 mg,雅培贸易有限公司),1 片/天,口服,连服 24 天。月经第 21 天复查 B 超,若无异常,开始给予促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a,辉凌国际制药有限公司)进行降调节,每天 0.1 mg,皮下连续注射 10 天,然后减量至每天 0.05 mg,连续注射至绒毛膜促性腺激素(hCG)注射日。降调节 14~16 天测血 FSH、促黄体生成素(LH)、雌激素(E_2)、孕酮(P),达到降调节标准后,开始给予果纳芬(Gonal-F,75 IU/支,瑞士 Sero-no 公司)225 IU/天启动超促排卵,随后根据卵巢反应情况调整剂量。当有至少 2~3 个主导卵泡平均直径达 18~20 mm 时,给予重组人绒毛膜促性腺激素注射液(艾泽,250 μg/支,默克雪兰诺有限公司)250 μg 皮下注射,36 h 后 B 超引导下穿刺取卵、授精。取卵后给予黄体酮注射液(20 mg/支,浙江仙琚制药股份有限公司)60 mg/d。72 h 后 B 超下移植优质胚胎 2 枚。

6 观察项目及检测方法 胚胎移植后第 14 天测血 β-hCG 值确定生化妊娠,第 35 天行 B 超检查,见到妊娠囊诊断为临床妊娠。

6.1 获卵数:获取卵子的数量;冷冻胚胎数:冷冻胚胎的数量。

6.2 受精率[(受精数/获卵数) × 100%];优质

胚胎率 $[(\text{优质胚胎数}/\text{胚胎数}) \times 100\%]$; 周期取消率 $[(\text{取消移植周期数}/\text{患者总周期数}) \times 100\%]$; 临床妊娠率 $[(\text{临床妊娠周期数}/\text{鲜胚移植周期数}) \times 100\%]$; 早期自然流产率 $[(\text{早期自然流产周期数}/\text{临床妊娠周期数}) \times 100\%]$ 。

6.3 hCG 日子宫内膜厚度、Gn 用量及用药时间。

6.4 E₂ 及 AMH 测定 均采用酶联免疫法。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内治疗前后比较, 采用 t 检验; 3 组间比较采用方差分析; 计数资料用百分比 (%) 表示, 采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 脱落情况 共纳入患者 233 例, 其中 2 例因服用 DHEA 未 8 周; 5 例未坚持服用中药。

2 3 组患者获卵数及冷冻胚胎数比较(表 2) 3 组患者获卵数无明显差异; 联合组与 DHEA 组冷冻胚胎数高于对照组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 3 组患者获卵数及冷冻胚胎数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	获卵数	冷冻胚胎数
对照	75	10.1 ± 3.5	1.95 ± 1.50
DHEA	81	9.5 ± 3.4	2.38 ± 1.60
联合	70	9.7 ± 3.6	2.39 ± 1.70

3 3 组患者受精率、优质胚胎率、周期取消率、临床妊娠率、早期自然流产率及活产率比较(表 3) 联合组与 DHEA 组患者优质胚胎率明显高于对照组($P < 0.05$); 联合组与 DHEA 组受精率高于对照组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组临床妊娠率与活产率较对照组高, 早期自然流产率较对照组低, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 3 组患者受精率、优质胚胎率、周期取消率、临床妊娠率、早期自然流产率及活产率比较 (%)

组别	例数	受精率	优质胚胎率	周期取消率	临床妊娠率	早期自然流产率	活产率
对照	75	75.43(571/757)	52.00(286/550)	5.33(4/75)	39.44(28/71)	10.71(3/28)	82.14(23/28)
DHEA	81	78.83(607/770)	58.56(342/584) *	6.17(5/81)	47.37(36/76)	2.78(1/36)	91.67(33/36)
联合	70	79.09(537/679)	59.64(300/503) *	4.29(3/70)	49.25(33/67)	3.03(1/33)	93.94(31/33)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

表 4 3 组患者 Gn 用量及用药时间、hCG 注射日子宫内膜厚度及 E₂ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Gn 用量 (IU)	Gn 用药时间 (d)	hCG 日 E ₂ 水平 (pmol/L)	hCG 日子宫内膜厚度 (mm)
对照	75	2 210.8 ± 665.5	9.8 ± 1.7	11 085.6 ± 4 095.6	10.3 ± 1.4
DHEA	81	2 190.5 ± 653.4	9.5 ± 1.5	10 155.8 ± 4 125.3	10.5 ± 1.5
联合	70	2 195.8 ± 659.7	9.7 ± 1.7	10 718.5 ± 4 222.7	10.1 ± 1.4

4 3 组患者 Gn 用量及用药时间、hCG 注射日子宫内膜厚度及 E₂ 水平比较(表 4) 3 组患者 hCG 注射日子宫内膜厚度及 E₂ 水平、Gn 使用量和 Gn 使用时间比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

5 3 组患者治疗前后 AMH 水平比较(表 5) 与本组治疗前比较, 联合组与 DHEA 组患者预治疗后 AMH 明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 5 3 组患者治疗前后 AMH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	例数	AMH (pmol/L)
对照	治疗前	75	5.0 ± 1.9
	治疗后	75	5.1 ± 2.0
DHEA	治疗前	82	4.8 ± 2.0
	治疗后	81	5.5 ± 1.9 *
联合	治疗前	76	4.8 ± 1.9
	治疗后	70	5.6 ± 2.0 *

注: 与本组治疗前比较, * $P < 0.05$

6 不良反应 治疗过程中未见明显的不良反应。

讨 论

在针对提高高龄患者 IVF-ET 临床妊娠率及活产率的各种治疗方法中, DHEA 预治疗越来越得到关注^[1,2]。DHEA 是一种来自于卵巢膜细胞和肾上腺皮质的内源性肾上腺激素, 是人体血循环中含量最为丰富的甾体物质, 具有弱雄激素作用, 在外周组织主要转化成 T 和 E₂ 发挥间接生物学效应^[1]。循环中 DHEA 水平随年龄增长明显下降: 在人类 20 ~ 30 岁时处于高峰期, 30 岁以后每年大约以 2% 的水平下降, 到 80 岁时达最低值, 大约为峰值的 10% ~ 20%^[4]。2000 年 Casson PR 等^[5]首次报道了 DHEA 补充对卵巢低反应患者的治疗作用。随后越来越多的报道证实 DHEA 补充可以改善卵巢低反应患者的卵巢功能^[6-11]。中医药对卵巢早衰、卵巢储备功能降低有较

好的疗效。但是中药及 DHEA 补充对于高龄卵巢功能正常患者 IVF-ET 结局是否有积极的影响,本研究在目前为止各项研究中首次提及。

本研究以 36~42 岁高龄卵巢功能正常患者为研究对象,在 IVF 前给予 8 周中药联合 DHEA 或 DHEA 预治疗,对比分析发现,接受中药联合 DHEA 或 DHEA 预治疗的患者较对照组有更高的优质胚胎率 ($P < 0.05$),但获卵数无较大差异 ($P > 0.05$)。3 组患者结果说明通过补充中药治疗及 DHEA 可提高高龄患者的卵子质量而不是数量来改善其妊娠结局。

《素问·上古天真论》曰:“女子七岁肾气盛,齿更发长,二七而天癸至,任脉通……五七阳明脉衰,面始焦,发始堕……”,肾主生殖,主津液,主系胞的功能是基于肾乃藏精之处,施精之所,为天癸之源,气血之根,冲任之本。始基卵泡形成于胚胎时期,为先天之精。35 岁以后,女性肾气开始下降,先天之精出现衰退,随之影响生殖机能,这与临床 IVF 过程中 35 岁以上患者临床妊娠率开始下降是相符的。因此肾气不足、肾精亏虚是高龄患者临床妊娠率下降的主因。本方以“紫石英、肉桂、熟地、牛膝、补骨脂、川断”补肾填精;“桃仁、红花、鸡血藤、丹参”活血养血;“赤芍、泽泻”清热凉血,活血祛瘀,利水渗湿制约上述诸药火热之性。叶天士在《临证指南医案》中说“女子以肝为先天,阴性凝结,易于佛郁,郁则气滞血亦滞”,《辨症奇闻》云:“肾非肝气之相通,则肾气不能开”,因此本方加香附疏肝解郁,增强补益之功效。本研究以补益肝肾、活血养血中药联合 DHEA 作为 IVF 临床治疗前预处理以补肾填精,提高高龄患者的卵子质量。

以往的观点认为,雄激素对于卵泡的发育成熟是不利的^[12],但近年来的研究发现雄激素在卵泡生长发育及女性生育过程中是必不可少的^[13-15]。诸多报道证实补充 DHEA 可改善卵巢功能,并能提高 IVF-ET 患者妊娠率及降低自然流产率,但其作用机制目前仍不清楚,有以下几方面的观点:(1) DHEA 是类固醇激素合成必需的底物。雄烯二酮(A)、T 和 E_2 在卵泡生长发育、成熟、排卵过程中必不可少,具有重要的作用。DHEA 水平正常,这些激素才能正常合成,卵泡正常发育^[16]。(2) 雄激素作为雄激素受体(AR)的配体或通过其他非经典机制发挥作用^[17]。另有观点认为:卵泡内雄激素含量增加,促进颗粒细胞分泌 AMH 和抑制素 B^[18]。(3) 降低胚胎非整倍体率,降低自然流产率;随着年龄增加,非整倍体发生率增加^[19,20],自然流产的发生主要归因为非整倍体^[21]。Gleicher N 等^[22]研究证实 DHEA 补充可明显降低卵巢低反应患

者非整倍体发生率。(4) 在卵泡成熟过程中改善卵巢微环境。DHEA 具有降低和反转年龄影响的潜力,可能是通过改善卵巢微环境,使其功能更年轻化,从而提高卵子、胚胎质量,进一步提高临床妊娠率并降低流产率。另有研究发现,影响卵巢内各种细胞的线粒体功能,也可能改善卵巢环境^[2]。

AMH 是由卵巢窦卵泡或小窦卵泡的颗粒细胞产生,与窦卵泡和年龄有关,而与 FSH 水平的关系小,因而它比其他反应卵巢衰竭的标志物出现的更早^[23]。本研究发现,联合组及 DHEA 组患者给予 DHEA 预治疗前后血清 AMH 变化明显,推测中药及 DHEA 提高胚胎质量的作用机制可能是通过促进颗粒细胞分泌 AMH 来实现的。下一步将扩大样本量,并进一步深入对机制的研究。

参 考 文 献

- [1] 赵红翠,朱亮. 脱氢表雄酮在辅助生殖技术中的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2012, 32(2): 118-123.
- [2] 江华峰,孙晓溪. 脱氢表雄酮在卵巢储备功能低下妇女中的应用进展[J]. 生殖与避孕, 2014, 33(4): 306-310.
- [3] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:351.
- [4] Walker ML, Anderson DC, Hemdon JG, et al. Ovarian aging in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) [J]. Reproduction, 2009, 138(5): 793-799.
- [5] Casson PR, Lindsay MS, Pisarska MD, et al. Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series [J]. Hum Reprod, 2000, 15(10): 2129-2132.
- [6] Barad D, Brill H, Gleicher N. Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function[J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(12): 629-634.
- [7] Barad D, Gleicher N. Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF [J]. Hum Reprod, 2006, 21(11): 2845-2849.
- [8] Barad DH, Gleicher N. Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone [J]. Fertil Steril, 2005, 84(3): 756.
- [9] Mamas L, Mamas E. Premature ovarian failure and dehydroepiandrosterone [J]. Fertil Steril, 2009, 91(2): 644-646.
- [10] Mamas L, Mamas E. Dehydroepiandrosterone supplementation in assisted reproduction: rationale and results [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2009, 21(4): 306-308.
- [11] Wiser A, Gonen O, Ghetler Y, et al. Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-re-

- sponder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: a randomized prospective study [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(10): 2496–2500.
- [12] Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects [J]. *Reprod Domest Anim*, 2010, 45(1): 180–187.
- [13] Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Improvement in diminished ovarian reserve after dehydroepiandrosterone supplementation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(3): 360–365.
- [14] Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment? [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9(1): 116.
- [15] Gleicher N, Weghofer A, Lee IH, et al. Association of FMR1 genotypes with *in vitro* fertilization (IVF) outcomes based on ethnicity/race [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18781.
- [16] McNatty KP, Makris A, Reinhold VN, et al. Metabolism of androstenedione by human ovarian tissues *in vitro* with particular reference to reductase and aromatase activity [J]. *Steroids*, 1979, 34(4): 429–443.
- [17] Moon YS, Armstrong DT. Estradiol 17[β] biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats stimulation by follicle stimulating hormone [J]. *Endocrinology*, 1975, 97(5): 1328–1331.
- [18] Andersen CY, Lossi K. Increased intrafollicular androgen levels affect human granulosa secretion of anti-Müllerian hormone and inhibin-B [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(6): 1760–1765.
- [19] Morales C, Sanchez A, Bruguera J, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities [J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 146A(1): 66–70.
- [20] Pal L, Santoro N. Age-related decline in fertility [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2003, 32(3): 669–688.
- [21] Bettio D, Venci A, Levi Setti PE. Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures [J]. *Placenta*, 2008, 29(Suppl B): 126–128.
- [22] Gleicher N, Ryan E, Weghofer A, et al. Miscarriage rates after dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in women with diminished ovarian reserve: a case control study [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7(7): 108.
- [23] Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, et al. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after *in vitro* fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(2): 291–301.

(收稿:2015-09-14 修回:2016-06-03)

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号,可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息,同时可查看两本期刊的全文信息,欢迎广大读者订阅。

