

· 临床论著 ·

温肾活血方联合电针治疗肾虚血瘀型
反复种植失败的随机对照研究林 益¹ 马娟娟² 翁晓晨² 艾 爱³ 张勤华²

摘要 **目的** 观察温肾活血方及电针对肾虚血瘀型反复种植失败(RIF)患者冻融胚胎移植周期妊娠结局的影响,探讨其对子宫内膜蜕膜化标记物的影响。**方法** 选取自2019年5月—2020年5月于上海市第一妇婴保健院生殖医学科行体外授精及解冻胚胎移植的肾虚血瘀证RIF患者,将符合纳入标准的160例患者按随机数字+信封法分为中药组、电针组、针药组及对照组,每组各40例。对照组选用自然周期或来曲唑促排或激素替代方案进行内膜准备,中药组在内膜准备阶段每日口服温肾活血方,电针组在内膜准备阶段隔日1次电针,针药组在内膜准备阶段予中药口服及电针治疗。比较4组种植窗期雌二醇(E₂)和孕酮(P)及子宫内膜厚度、子宫内膜血流、移植后着床率、临床妊娠率及早期流产率,检测4组移植日宫腔组织中孕激素受体(PR)、同源框基因10(Hox10)及骨形态发生蛋白2(BMP2)mRNA表达水平,评价治疗前后生殖质量与中医证候积分。**结果** 针药组临床妊娠率、着床率均显著高于对照组($P<0.05$)。≤35岁患者针药组临床妊娠率、着床率均显著高于对照组($P<0.05$),中药组临床妊娠率明显高于对照组($P<0.05$)。>35岁患者中电针组临床妊娠率、着床率均高于其余3组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。3个中西医结合治疗组流产率均低于对照组,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。治疗后4组种植窗口期E₂及P水平差异均无统计学意义($P>0.05$),子宫内膜厚度3个中西医结合治疗组均显著高于对照组($P<0.05$),其中,针药组子宫内膜较中药组、电针组明显增厚($P<0.05$)。治疗后3个中西医结合治疗组种植窗口期A型内膜比例均高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。3个中西医结合治疗组内膜下血管支数均高于对照组($P<0.05$),其中针药组、电针组血管支数均高于中药组($P<0.05$)。移植日宫腔内组织PR、Hox10、BMP2 mRNA相对表达量均高于对照组($P<0.05$),其中针药组、电针组表达量明显高于中药组($P<0.05$)。治疗前后3个中西医结合治疗组生殖质量评分与中医证候积分的差值均明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 在内膜准备阶段给予温肾活血方联合电针疗法可以改善子宫内膜厚度及血供,中医肾虚血瘀症状及患者生育生活质量,提高RIF患者的着床率及临床妊娠率,降低流产风险。其机制可能与中医药治疗提高种植窗口期PR、Hox10及BMP2的表达,增强子宫内膜蜕膜化程度有关。

关键词 反复种植失败;温肾活血方;电针;蜕膜化;妊娠结局

Effect of Wenshen Huoxue Decoction Combined with Electro-acupuncture in Treating Recurrent Implantation Failure Patients with Shen Deficiency Blood Stasis Syndrome: a Randomized Controlled Trial LIN Yi¹, MA Juan-juan², WENG Xiao-chen², AI Ai³, and ZHANG Qin-hua²
1 Postdoctoral Workstation of Integrated Traditional and Western Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Naval Medical University, Shanghai (200433); 2 Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai (200092); 3 Reproductive Medicine Center, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai (200092)

基金项目:上海市综合医院中西医结合专项重点项目[No. ZY(2018-2020)-FWTX-3003];上海市科委中医引导项目(No.18401971900);上海市卫生健康委员会中医药传承与科技创新项目(No.ZYCC2019009)

作者单位:1.海军军医大学中医系中西医结合博士后工作站(上海 200433);2.同济大学附属第一妇婴保健院中西医结合科(上海 200092);3.同济大学附属第一妇婴保健院生殖医学中心(上海 200092)

通讯作者:张勤华, Tel: 021-20261000, E-mail: shumeier@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220111.395

ABSTRACT Objective To observe the effects of Wenshen Huoxue Decoction (WSHXD) combined with electro-acupuncture therap (EA) on the outcomes of frozen thawed embryo transfer and endometrial decidualization in recurrent implantation failure (RIF) patients with Shen deficiency blood stasis syndrome (SDBSS). **Methods** Totally 160 RIF patients with SDBSS at Reproductive Medicine Center of Shanghai First Maternity and Infant Hospital from May 2019 to May 2020 were randomly assigned to four groups: Herb group, EA group, Herb&EA group, and Control group, 40 in each group. Patients in Control group chose natural cycle or letrozole cycle or hormone replacement cycle for endometrium preparation. Those in Herb group received WSHXD every day during endometrium preparation time. Those in EA group received EA therapy once every 2 days during endometrium preparation time. Those in Herb&EA group took WSHXD and received EA in the endometrial preparation stage. Estradiol (E_2) and progesterone (P) levels, endometrial thickness, endometrial blood flow, implantation rate, clinical pregnancy rate, and early abortion rate were compared among the four groups. mRNA expressions of progesterone receptor (PR), homeobox genes10 (Hox10), and bone morphogenetic protein2 (BMP2) in uterine tissue of the four groups on the transplantation day were detected, and reproductive quality and TCM syndrome score before and after treatment were evaluated. **Results** The clinical pregnancy rate and implantation rate of Herb&EA group were significantly higher than those in Control group ($P<0.05$). In patients equal to or younger than 35, they were significantly higher in Herb&EA group than in Control group ($P<0.05$). When patients aged over 35 years, the implantation rate and clinical pregnancy rate were higher in EA group, but with no statistical differences as compared with the rest 3 groups ($P>0.05$). The abortion rate of the three TCM treatment groups was lower than that of Control group, but with no statistical difference ($P>0.05$). There were no significant differences in E_2 or P levels in the four groups during the implantation window after treatment ($P>0.05$). The endometrial thickness in the three TCM treatment groups was significantly higher than that in Control group ($P<0.05$). Among them, endometrial thickness obviously thickened more in Herb&EA group than in Herb and EA group ($P<0.05$). After treatment the proportion of type A endometrium in the three TCM treatment groups was higher than that in Control group in the implantation window period, but with no statistical difference ($P>0.05$). The number of spiral arteries under endometrium in the three TCM groups was higher than that in Control group ($P<0.05$). Among them, the number of blood vessels of Herb and EA group was higher than Herb&EA group ($P<0.05$). The mRNA relative expression levels of PR, Hox10 and BMP2 in intrauterine tissue on transplantation day were higher than those in Control group ($P<0.05$). They were higher in EA group and Herb&EA group than in Herb group ($P<0.05$). Before and after treatment, the difference between reproductive quality score and TCM syndrome score in the three TCM treatment groups were significantly higher than those in Control group ($P<0.05$). **Conclusions** During the endometrial preparation stage, the combination of WSHXD and EA therapy improved the endometrial thickness and blood supply, the symptoms of SDBSS, and patients' reproductive quality and quality of life, elevated the implantation rate and clinical pregnancy rate, and lowered the risk of abortion. The mechanism might be related to enhancing the expressions of PR, Hox10, and BMP2 during the implantation window period and accelerating decidualization of endometrium.

KEYWORDS recurrent implantation failure; Wenshen Huoxue Decoction; electro-acupuncture; decidualization; pregnancy outcome

自从 1978 年第 1 例试管婴儿诞生以来, 体外受精-胚胎移植技术 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 已成为解决不孕不育的重要手段。尽管技术的不断革新带来前所未有的突破性进展。但目前全世界 IVF-ET 的胚胎种植成功率仅为 30%~45%, 临床妊娠率为 29%~40%, 活产率也仅有 17.6%~28.4%^[1]。部分患者经历了多次移植后仍未获得临床妊娠, 反复移植失败 (recurrent

implantation failure, RIF) 是指 40 岁以下不孕症患者在经历 3 次以上新鲜或冷冻的优质胚胎移植, 或胚胎移植总数达 4 枚以上仍未能获得临床妊娠者^[2]。目前报道的 RIF 发生率在 IVF-ET 移植周期中占 10%~15%^[3, 4], 成为了辅助生殖治疗中无法避开的难题。

母体子宫内膜是承载胚胎发育及负责胎盘形成的重要组织。子宫内膜在分泌期为了“迎接”胚胎会出

现一系列变化。其中, 子宫内蜕膜化是子宫为了适应妊娠而做出的最早改变之一^[5]。宫内膜蜕膜化缺陷可能影响胚胎滋养层细胞向内膜的侵入, 导致胚胎着床障碍或反复流产。因此, 研究子宫内蜕膜化调控机制对治疗 RIF 具有指导意义^[6]。蜕膜化的启动主要受到孕激素的调控, 孕激素与其特异性的孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 结合, 进入细胞核并与靶基因上的特异 DNA 序列结合, 与此同时招募辅助转录因子, 以此激活下游基因的转录表达^[7]。同源框基因 10 (homeobox genes10, Hox10) 及骨形态发生蛋白 2 基因 (bone morphogenetic protein2, BMP2) 都是 PR 的靶基因。Hox10 及 BMP2 缺失的小鼠均因为蜕膜化缺陷而导致不孕。其中 Hox10 可能是通过调控细胞周期蛋白 D3 的表达来介导蜕膜细胞多倍化过程^[8], 而 BMP2 可能通过调控 Wnt 信号通路及环加氧酶的表达影响蜕膜化及血管重塑^[9]。随着中医药现代化研究的不断拓展, 中医学治疗手段不断被引入辅助生殖领域。中西医结合的治疗方案逐渐彰显其独特优势^[10, 11]。本课题组前期研究发现, 在冻胚移植周期服用复方温肾活血方或接受电针治疗能够提高 RIF 着床率及临床妊娠率^[12, 13]。且中西医结合治疗可以明显改善子宫内蜕膜容受性标记物“胞饮突”的数量及成熟度。本研究拟探索中药联合针灸治疗对子宫内蜕膜化的影响, 为支持中西医结合辅助生殖方案提供有力证据。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 女性不孕症的诊断标准 参照《妇产科学》^[14]。即: 婚后未避孕、有正常性生活、同居 1 年未受孕者。

1.2 RIF 的诊断标准 年龄 ≤ 40 岁的女性, 在经历 ≥ 3 次新鲜周期或冻融移植周期, 且累积移植 4 枚或以上优质胚胎而未获得临床妊娠者^[15]。优质胚胎定义为 (卵裂期 7~9 细胞 I 级或 II 级胚胎, 囊胚评分为 3AB 及以上胚胎)^[16, 17]。

1.3 肾虚血瘀证诊断标准 参照《中医妇科学》^[18] 及《中药新药临床研究指导原则》^[19] 制定。主症: 婚久不孕; 兼症: (1) 经行腰腹疼痛, 后期加重, 阴部空坠; (2) 头晕失眠, 性欲减退; (3) 月经量少, 色黯淡, 质稀; (4) 舌淡黯体胖, 或边有瘀点; 主证必备, 兼证 4 条中符合 2 条即可。

2 纳入及排除标准 纳入标准: (1) 符合不孕症及 RIF 的诊断标准且中医辨证为肾虚血瘀证; (2)

年龄 25~40 岁; (3) 体重指数 (body mass index, BMI) 为 18.5~28; (4) 已在本院生殖中心建档并有 ≥ 2 枚卵裂期优质胚胎或 ≥ 1 枚优质囊胚者; (5) 患者知情同意并签署知情同意书。排除标准: (1) 合并有子宫畸形、黏膜下子宫肌瘤 >4 cm 以上的肌壁间子宫肌瘤、宫腔重度粘连、子宫腺肌病或子宫内膜异位症、子宫内膜息肉、子宫内膜结核、输卵管积水; (2) 合并有自身免疫系统疾病者; (3) 甲状腺功能异常; (4) 对试验用药或已知药物成分过敏; (5) 生殖系统恶性肿瘤疾病史。

3 一般资料 病例来源于 2019 年 5 月—2020 年 5 月于上海市第一妇婴保健院生殖医学科行 IVF-ET 的不孕症女性患者。样本量估算参考张琦等^[12] 文献, 两组有效率分别为 40% 和 24%, 计算样本量为 126 例, 按照脱落率 20% 计算得出需要纳入 160 例患者。按照纳入的时间先后对每位试验者进行编号 (001-160), 统计员用 SPSS 22.0 软件产生 160 个随机数字, 对随机数字进行排序后, 经过转换和重新编码后再分为 4 组, 每组各 40 例, 并且将分配信息放入 160 个信封中。研究员按患者入组顺序拆开信封并获取分组信息。中药组平均年龄 (32.38 ± 3.86) 岁, 针药组平均年龄 (33.90 ± 4.22) 岁, 电针组平均年龄 (32.38 ± 4.37) 岁, 对照组平均年龄 (33.50 ± 3.80) 岁。4 组患者一般资料 [包括年龄、BMI、不孕年限、孕次、产次、不孕原因、移植失败次数、血清抗穆勒氏管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH) 水平、解冻胚胎移植 (frozen-thawed embryo transfer, FET) 内膜准备方案、移植胚胎的分期及个数] 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。本临床试验已通过上海市第一妇婴保健院伦理委员会审查和批准 (No. KS1946), 本试验方案在中国临床试验注册中心注册 (No. ChiCTR1900025932)。

4 治疗方法

4.1 内膜准备方案 (1) 自然周期方案: 受试者于月经周期第 10~12 天进行阴道超声监测, 当主卵泡直径 >17 mm, 内膜 >7 mm 且 $E_2>150$ pg/mL, $P<1$ ng/mL, 于当晚 21:00 肌肉注射人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG, 5 000 IU, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号: 20180805) 5 000 IU 诱发排卵, 在 HCG 注射后 3 天开始用黄体酮软胶囊 (安琪坦, 0.1 g, 贝森比利时药厂产品, 批号: 226543) 2 粒, 每天 2 次, 阴道用药。诱发排卵后 5 天移植卵裂期胚胎 1~2 枚或 7 天后移植囊胚期胚胎 1~2 枚。移植后予黄体酮胶囊 2 粒, 每天 2 次, 阴道用药黄体支

持。(2) 来曲唑促排方案: 从月经周期第 3 天口服来曲唑(芙瑞, 2.5 mg, 江苏恒瑞医药有限公司, 批号: 180912) 每天 2.5 mg, 共 5 天, 月经第 10 天监测卵泡, 如果主卵泡 ≥ 8 mm, 每 2 天监测 1 次直至诱发排卵日, 若主卵泡 <14 mm, 每天予注射用尿促性腺激素(乐宝得, 75 IU, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号: 180709) 75 IU, 每天 1 次促卵泡生长。诱发排卵、FET 安排和黄体支持的时间与上述自然周期相同。(3) 激素替代周期方案: 受试者于月经周期第 2~3 天进周, 第 1 次 B 超排除卵巢囊肿后当日予戊酸雌二醇(芬吗通红片, 2 mg, 荷兰雅培药厂, 进口药品注册号: H20150345, 批号: 365645), 每次 2 粒, 每天 2 次, 连续口服 12 天后进行第 2 次 B 超监测内膜厚度, 若当天内膜厚度 ≥ 8 mm 且血清 E_2 值 >200 pg/mL 时改用地屈孕酮(芬吗通黄片, 10 mg, 荷兰雅培药厂, 进口药品注册号: H20150345, 批号: 365645), 每次 2 粒, 每天 2 次, 连续口服 3 天进行内膜转化, 转化后 3 天可移植卵裂期胚胎 1~2 枚或 5 天后移植囊胚期胚胎 1~2 枚。移植后予地屈孕酮 2 粒, 每天 2 次, 口服及黄体酮胶囊 2 粒, 每天 2 次, 阴道用药黄体支持。

4.2 干预措施 中药组: 受试者内膜准备阶段

加用中药温肾活血颗粒剂(紫河车 6 g 紫石英 15 g 鹿角胶霜 9 g 红花 6 g 巴戟天 15 g 熟地黄 15 g 当归 9 g 炒白芍 15 g, 广州一方药业生产, 生产批号: J1901012), 自月经周期第 2~3 天开始, 每天 1 次冲服, 连续服用至胚胎移植后 14 天。

电针组: 受试者在内膜准备阶段加用电针治疗, 于月经周期 2~3 天开始, 电针操作由同一医师完。取穴: 参照 Paulus WE 等^[20] 方案, 关元、气海、归来(双)、子宫(双)、足三里(双)、三阴交(双)、地机(双)、血海(双)、太溪(双)。操作: 受试者仰卧位, 暴露选穴部位并用 75% 乙醇进行消毒, 用一次性无菌针灸针(0.25 mm $\times$ 40 mm, 江苏无锡佳健医疗器械公司)直刺或斜刺进针 0.5~1.2 cm, 进针后采用平补平泻手法, 小幅度均匀提插捻转 3 次, 局部出现酸胀感为得气; 若患者无得气感可重复上述操作 1~3 次, 若重复施针后仍无针感者, 可不强求针感; 留针 30 min, 留针期间取足三里、三阴交接电针, 采用英迪 KWD-808I 脉冲针灸治疗仪(常州英迪电子医疗器械有限公司), 波形: 疏密波, 频率 4 Hz。针刺治疗隔日 1 次至移植日当天结束疗程, 移植后不予针刺。

表 1 各组患者一般资料比较 [$(\bar{x} \pm s)$ / $M(IQR)$]

临床项目	中药组 (40 例)	针药组 (40 例)	电针组 (40 例)	对照组 (40 例)
年龄 (岁)	32.38 $\pm$ 3.86	33.90 $\pm$ 4.22	32.38 $\pm$ 4.37	33.50 $\pm$ 3.80
BMI (kg/m ²)	22.78 $\pm$ 2.70	22.31 $\pm$ 2.99	22.13 $\pm$ 3.38	21.61 $\pm$ 2.76
不孕年限 (年)	2 (5)	3 (3)	3 (2)	3 (3)
孕次 (次)	1 (1)	0.5 (1.75)	0.5 (2)	1 (2)
产次 (次)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
不孕原因 [例 (%)]				
输卵管因素	22 (55.00)	22 (55.00)	20 (50.00)	26 (65.00)
排卵障碍	3 (7.50)	4 (10.00)	6 (15.00)	5 (12.50)
男方因素	6 (15.00)	8 (20.00)	7 (17.50)	4 (10.00)
不明原因	9 (22.50)	6 (15.00)	7 (17.50)	5 (12.50)
移植失败数 (次)	3 (1)	4 (3)	3 (1)	4 (2)
AMH (ng/mL)	3.12 (2.59)	1.98 (2.46)	3.10 (2.65)	2.18 (2.63)
内膜准备方案 [例 (%)]				
自然周期	20 (50.00)	19 (47.50)	14 (35.00)	13 (32.50)
来曲唑周期	7 (17.50)	8 (20.00)	10 (25.00)	10 (25.00)
激素替代周期	13 (32.50)	13 (32.50)	16 (40.00)	17 (42.50)
移植的胚胎分期 [例 (%)]				
卵裂期	28 (70.00)	29 (72.50)	28 (70.00)	25 (62.5)
囊胚期	12 (30.00)	11 (27.50)	12 (30.00)	15 (37.5)
胚胎移植数 [例 (%)]				
1	5 (12.50)	3 (7.50)	3 (7.50)	1 (2.50)
2	35 (87.50)	37 (92.50)	37 (92.50)	39 (97.50)

针药组：受试者在内膜准备阶段同时加用中药及电针治疗。

对照组：仅接受西药内膜准备后进行解冻胚胎移植。

5 检测指标及检测方法

5.1 妊娠结局 参照 Chen ZJ 等^[21]方法。(1) 临床妊娠率(%) = 临床妊娠的患者例数 / 治疗患者的总数 (移植后 28 天行阴道超声检查, 宫内见孕囊及胎心为临床妊娠) × 100%; (2) 着床率(%) = 种植成功患者例数 / 治疗患者的总数 (移植后 14 天尿 HCG 试纸阳性者或血清 HCG 升高者) × 100%; (3) 早期流产率(%) = 流产患者例数 / 临床妊娠人数 (流产是指妊娠 12 周内发生的流产) × 100%。

5.2 子宫内膜容受性指标 (1) 内膜转化日子宫内膜厚度; (2) 子宫内膜类型 (A 型: 典型三线型, 内膜与肌层交界处及中央内膜线均为强回声, 外层线与中央线之间区域为低回声; B 型: 弱三线型, 宫腔强回声中线不明显或有断续; C 型: 均为均质强回声, 无强回声的宫腔中线); (3) 子宫内膜血流 (I 型: 内膜区无明显血流信号, 血流支数为 0; II 型: 内膜区见稀疏血流信号, 血流支数 ≤ 2; III 型: 内膜区见较多血流信号, 血流支数 ≥ 2 且 ≤ 4; IV 型: 内膜区见丰富血流信号, 血流支数 ≥ 5); (4) 移植日用化学发光法检测血清 E₂、P。

5.3 子宫内膜蜕膜化标记物表达量 移植日采集移植管内的子宫内膜组织, 采用 RT-PCR 法检测内膜中 PR、Hox10、BMP2 mRNA 表达量。

5.4 生殖质量评分及中医证候积分 (1) 中医证候积分: 采用《新药 (中药) 临床研究指导原则》^[19]中中医证候积分方法: 重度: 症状显著或持续存在, 计 6 分; 中度: 症状时轻时重或间断出现, 计 4 分; 轻度: 症状轻或偶尔出现, 计 2 分; 无: 无症状出现, 计 0 分。分析时剔除受主观影响较大的患者舌象和脉象。生育质量评分使用 Jacky Boivin 教授研制 FertiQOL (中文版)^[22], 生育质量量表共有 36 条项目, 其中 2 项条目不计入总分, 其余 34 条项目由中心模块和治疗模块两部分组成, 中心模块评价不孕患者的情绪、夫妻关系、社会关系、精神 / 身体因素, 包括 4 个维度, 24 个条目; 治疗模块主要评价患者对治疗依从性, 耐受性及治疗环境, 共 10 个条目。全表采用 5 级评分 (0~4 分), 总分为 100 分, 得分高者, 生活质量越高。

5.5 安全性指标 记录临床试验开始至结束后 3 个月内期间患者发生的不良反应、不良事件或药物

副作用, 详细描述不良事件的发生时间、症状、体征、后续的治疗以及缓解的时间。

6 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学处理。计量资料符合正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 4 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。不符合正态分布用 [Median (inter-quartile range), M (IQR)] 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 计数资料频数 (构成比 / 率) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 多重比较采用分割 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例完成情况 本研究最终纳入可评价 160 例受试者, 随机分为中药组、针药组、电针组、对照组各 40 例, 治疗期间各组无患者脱落或退出, 具体流程见图 1。

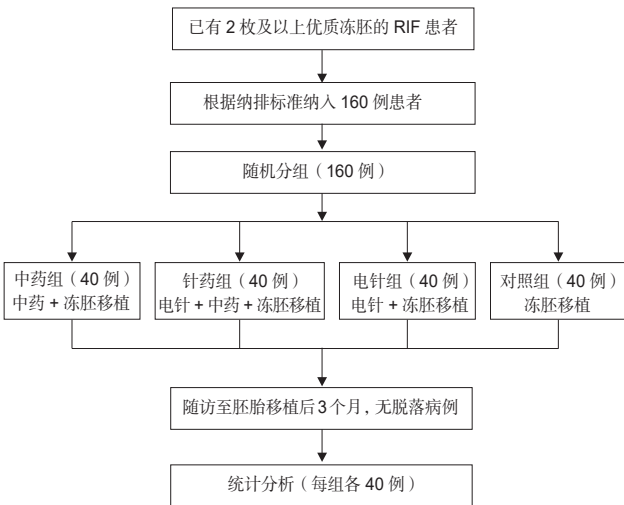


图 1 病例流程图

2 4 组妊娠结局比较 (表 2, 图 2、3) 针药组临床妊娠率、着床率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。中药组、电针组较对照组临床妊娠率、着床率有增高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。将患者年龄段分层后进行比较, ≤ 35 岁患者中, 针药组、中药组临床妊娠率均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 电针组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); > 35 岁患者中,

表 2 4 组全年龄层患者的妊娠结局比较 [例 (%)]

组别	例数	临床妊娠率	着床率	早期流产率
中药	40	15 (37.50)	17 (42.50)	2 (13.33)
针药	40	22 (55.00)*	22 (55.00)*	1 (4.55)
电针	40	17 (42.50)	18 (45.00)	1 (5.88)
对照	40	9 (22.50)	11 (27.50)	3 (33.33)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

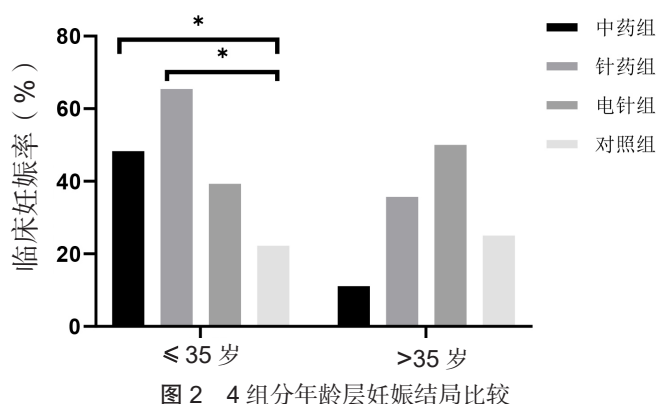


图2 4组分年龄层妊娠结局比较

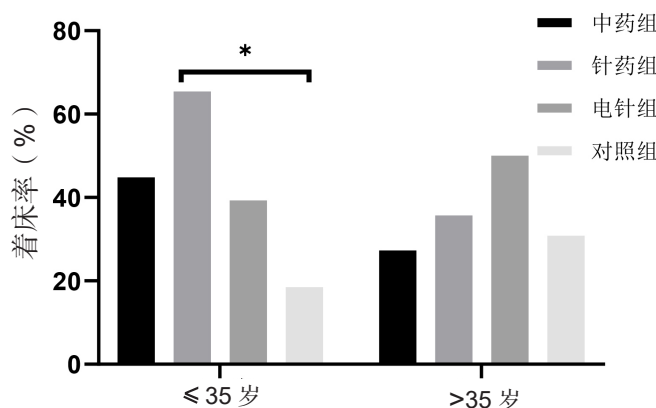


图3 4组分年龄层妊娠结局比较

电针组妊娠率均高于其余3组,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。3个中西医结合治疗组早期流产率均低于对照组,差异亦无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 4组患者子宫内膜容受性指标比较 (表3) 3个中西医结合治疗组内膜较对照组均明显增厚 ($P<0.05$),其中,针药组内膜厚度明显高于中药组、电针组 ($P<0.05$)。内膜类型方面,A型内膜在3个中西医治疗组中的占比均高于对照组,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。3个中西医结合治疗组Ⅲ型+Ⅳ型内膜较对照组均明显增多 ($P<0.05$),其中,针药组、电针组Ⅲ型+Ⅳ型内膜比中药组明显增多 ($P<0.05$)。移植日4组血清 E_2 、P 比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

4 4组患者子宫内膜蜕膜化标记物表达量比较

(表4、5) 妊娠患者移植日子宫内膜组织中蜕膜化标记物的表达量 (PR、Hox10、BMP2 mRNA) 均明显高于未妊娠患者 ($P<0.05$)。各治疗组间比较,3个中西医结合治疗组移植日 PR、Hox10、BMP2 mRNA 相对表达量均明显高于对照组 ($P<0.05$)。3组间比较,针药组、电针组 PR、Hox10、BMP2 mRNA 表达量均明显高于中药组 ($P<0.05$)。

表4 妊娠与未妊娠患者子宫内膜蜕膜化标记物表达量比较 [$M(IQR)$]

组别	例数	PR mRNA	Hox10 mRNA	BMP2 mRNA
妊娠	63	3.29 (6.15) *	4.60 (4.23) *	3.87 (3.55) *
未妊娠	97	1.05 (1.19)	1.72 (1.86)	1.53 (1.43)

注:与未妊娠患者比较, * $P<0.05$

表5 各组患者子宫内膜蜕膜化标记物表达量比较 [$M(IQR)$]

组别	例数	PR mRNA	Hox10 mRNA	BMP2 mRNA
中药	40	1.11 (0.79) *	2.45 (3.02) *	2.00 (1.67) *
针药	40	3.00 (7.11) * Δ	3.74 (3.36) * Δ	2.75 (3.43) * Δ
电针	40	3.39 (4.17) * Δ	3.57 (2.49) * Δ	2.98 (2.71) * Δ
对照	40	0.57 (0.84)	0.83 (0.53)	0.93 (1.15)

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与中药组比较, $\Delta P<0.05$

5 妊娠与未妊娠患者生殖质量评分与中医证候积分的比较 (表6、7) 与未妊娠患者比较,妊娠患者治疗前生殖质量评分明显高于对照组 ($P<0.05$),而中医证候积分明显低于对照组 ($P<0.05$)。治疗前4个治疗组间生殖质量评分、中医证候积分比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$),3个中西医结合治疗组治疗前后生殖质量评分差值均高于对照组 ($P<0.05$),中医证候积分的差值均高于明显对照组 ($P<0.05$)。其中针药组、电针组生殖质量评分及中医证候积分的差值均高于中药组 ($P<0.05$)。

表6 妊娠与未妊娠患者生殖质量评分及中医证候积分的比较 [分, $M(IQR)$]

组别	例数	生殖质量评分	中医证候积分
妊娠	63	59.56 (2.94) *	22 (10) *
未妊娠	97	55.15 (5.51)	30 (12)

注:与未妊娠患者比较, * $P<0.05$

表3 4组患者子宫内膜容受性指标比较 [例 (%), ($\bar{x} \pm s$) / $M(IQR)$]

组别	例数	内膜厚度 (mm)	内膜形态		血流支数		E_2 (pg/mL)	P (ng/mL)
			A型	B型+C型	I型+II型	III型+IV型		
中药	40	10.95 $\pm$ 1.33*	15 (37.50)	25 (62.50)	26 (65.00)	14 (35.00) *	209.50 (267.00)	15.55 (13.43)
针药	40	12.04 $\pm$ 1.50* Δ	18 (45.00)	22 (55.50)	14 (35.00)	26 (65.00) * Δ	177.50 (185.75)	11.20 (11.10)
电针	40	10.74 $\pm$ 1.66*	15 (37.50)	25 (62.50)	19 (47.50)	21 (52.50) * Δ	172.00 (90.25)	13.40 (8.85)
对照	40	9.97 $\pm$ 1.61	9 (22.50)	31 (77.50)	30 (75.00)	10 (25.00)	217.00 (134.75)	22.39 (20.33)

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与中药组比较, $\Delta P<0.05$

表 7 4 组患者治疗前后生殖质量评分与中医证候积分比较 [分, ($\bar{x} \pm s$) / $M(IQR)$]

组别	例数	时间	生殖质量评分	中医证候积分
中药	40	治疗前	55.46 ± 4.83	26.00 (12.00)
		治疗后	63.08 ± 4.95	18.00 (8.00)
		差值	7.62 ± 5.19*	-8.00 (4.00)*
针药	40	治疗前	56.54 ± 4.20	26.00 (12.00)
		治疗后	69.17 ± 4.88	14.00 (6.00)
		差值	12.63 ± 4.40* [△]	-12.00 (5.50)*
电针	40	治疗前	56.18 ± 3.90	24.00 (14.00)
		治疗后	66.42 ± 5.25	16.00 (12.00)
		差值	10.24 ± 3.74* [△]	-8.00 (4.00)*
对照	40	治疗前	57.72 ± 5.15	26.00 (12.00)
		治疗后	59.01 ± 4.42	24.00 (10.00)
		差值	2.30 ± 3.74	0.00 (2.00)

注:与对照组差值比较,* $P < 0.05$;与中药组差值比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

RIF 是限制辅助生殖技术发展的瓶颈问题, 解决 RIF 的问题不仅能提高临床不孕症的治愈率, 缓解因生育问题带来的家庭、社会矛盾, 还能为各生殖中心和国家节约医疗资源^[23]。本课题组前期研究发现温肾活血法可以提高 RIF 患者在解冻胚胎移植周期的临床妊娠率, 其机制可能通过调控 Wnt 信号通路, 增强子宫内膜对胚胎的黏附能力^[24]。而部分 RIF 患者在接受中药及电针治疗后不但临床妊娠率显著提高, 早期流产率与单纯西医对照组比较也有明显的下降^[25]。因此本实验通过对比中药温肾活血方、电针及针药结合治疗对 RIF 妊娠结局及 3 种中医治疗方法对子宫内膜蜕膜化的影响, 验证不同中医疗法在辅助生殖领域的疗效, 同时探索了 3 种疗法的作用机制, 为中医药改善女性生育能力的研究提供直接有力的证据。

RIF 并无对应的中医病名, 其临床表现为久婚不孕 (多次胚胎移植未获得妊娠)、或屡孕屡堕 (多次胚胎移植后生化妊娠或流产), 闭经或月经稀少, 畏寒肢冷、腰膝酸软、性欲减退、带下清稀、发稀齿枯^[26]。根据其临床表现可将其归为“不孕”或“滑胎”论治。中医学认为“肾主生殖”, 肾中精气为生殖功能的原动力, 肾之精气有赖于肾阳对肾阴的蒸化而产生。因此肾阳虚衰可导致肾的精气衰竭进而影响生殖功能, 肾阳为“元阳”, 是肾气中温煦、推动的一部分, 为一身阳气之本, 肾阳失于温煦则五脏皆可感寒, 肾阳失于推动, 则血脉皆可凝泣而至血瘀。有调查显示肾阳虚的患者经常处于疾病或亚健康状态, 而血瘀可导致患者情绪出现焦虑、抑郁或易怒的表现^[27]。这与

临床上经历多次移植失败女性的特征相符合, 她们更容易受到不良情绪的影响^[28]。温肾活血方由紫河车、紫石英、鹿角胶霜、红花、巴戟天、熟地黄、当归、炒白芍组成, 全方具有温肾阳, 填肾精、养气血、通胞络。针刺是中医治疗手段之一, 其操作手法简便, 治疗成本低廉, 在辅助生殖过程中可用来缓解取卵时疼痛、增强卵巢对促排卵药物的反应, 改善移植前后子宫内膜容受性等^[29, 30]。本试验治疗方案中选取了任脉、足太阴脾经、足少阴肾经、足阳明胃经的穴位不仅增强了补肾健脾、养血固精的功效, 还有调畅气机, 疏理冲任的作用。

本研究结果显示在内膜准备阶段进行针药结合干预能够提高 RIF 的着床率、临床妊娠率, 并且降低早期流产风险。年龄对女性的生育能力至关重要, 以 35 岁为分界, 高龄女性 (>35 岁) 接受 IVF-ET 活产率低于非高龄患者 (≤35 岁患者) 而流产率高于非高龄患者^[31, 32]。本研究提示 3 个中西医结合治疗组均能改善 RIF 患者的妊娠结局, 其中针药结合疗效最佳, 电针组在高龄患者疗效优于中药组, 而中药组则在非高龄患者中更占优势。在子宫内膜容受性检测方面, 3 个中西医结合治疗组均能增加内膜厚度, 优化内膜形态, 但电针组及针药组在改善内膜下血供方面更具优势。这与笔者之前的研究结果相符, 说明中药及针灸可能影响内膜准备的不同环节。为了进一步验证中药及针灸的作用机制, 本试验从移植管内获取少量宫腔组织对其进行检测发现, PR、Hox10、BMP2 的表达量在妊娠患者移植日内膜组织中表达高于未妊娠组, 3 个中西医结合治疗组患者内膜组织中 PR、Hox10、BMP2 的表达量较对照组上调。而其中针药组、电针组疗效优于中药组, 由此说明蜕膜化的程度与 RIF 的妊娠结局相关, 通过中西医结合治疗可能及时的启动或者增强蜕膜化的反应, 帮助着床。另外, 本研究发现中药和针灸的不同作用机制, 中药温肾活血方可能通过增强胚胎与内膜上皮组织之间的定位及黏附作用, 而针灸可能是因为诱导蜕膜化使胚胎成功植入, 并促进螺旋动脉的重塑为胚胎发育提供营养物质。针药结合疗法可以取长补短, 在 3 种中医治疗中显示出明显优势。此外, 中西医结合治疗方案对 RIF 患者的负面情绪起到了积极作用, 治疗后患者生殖质量评分升高, 中医证候积分下降。其中, 电针及针药结合组效果优于中药组。该结果与王肖等^[33]研究发现一致, 电针可以通过调理周身经络, 调和气血阴阳, 达到“五脏安定, 血脉和利, 精神乃居”的效果。在本研究中, 各组移植日血清 E₂ 和 P 水平无统计学差

异,该结果与 Creus M 等^[34]观察结果类似,即子宫内膜对雌、孕激素的反应能力可以独立于血清性激素水平而变化,即使在生理性水平,组织学种植窗延迟或蜕膜化的缺陷也可能发生。

随着辅助生殖技术的不断发展,RIF 的发病机制、诊断方法、评价标准,治疗手段研究也在不断推陈出新,但由于 RIF 是一类病因高度异质性的疾病,且各种病因牵连交错,十分复杂,因此无法用一种治疗手段取得显著的疗效,中西医结合治疗为 RIF 的治疗提供了一种新的思路,虽在一部分 RIF 患者中收效显著,但是仍需扩大样本量进行验证,其作用机制仍有待深入挖掘。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Adamson GD, de Mouzon J, Chambers GM, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011[J]. Fertil Steril, 2018, 110 (6): 1067–1080.
- [2] Bashiri A, HalPer KI, Orvieto R. Recurrent implantation failure—update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16 (1): 121.
- [3] Mak JSM, Chung CHS, Chung JPW, et al. The effect of endometrial scratch on natural-cycle cryopreserved embryo transfer outcomes: a randomized controlled study[J]. Reprod BioMed Online, 2017, 35 (1): 28–36.
- [4] Busnelli A, Reschini M, Cardellicchio L, et al. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence[J]. Reprod Biomed Online, 2019, DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.10.014.
- [5] Liu H, Huang X, Mor G, et al. Epigenetic modifications working in the decidualization and endometrial receptivity[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77 (11): 2091–2101.
- [6] Ni T, Zhang Q, Li Y, et al. CircSTK40 contributes to recurrent implantation failure via modulating the HSP90/AKT/FOXO1 axis[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 2 (26): 208–221.
- [7] 高玥,王雅琴,杨菁.子宫内膜蜕膜化的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 39 (12): 1037–1043.
- [8] Nallasamy S, Kaya OH, Bhurke A, et al. Msx homeobox genes act downstream of BMP2 to regulate endometrial decidualization in mice and humans[J]. Endocrinology, 2019, 160 (7): 1631–1644.
- [9] Lee KY, Jeong J, Wang J, et al. BMP2 is critical for the murine uterine decidual response[J]. Molec Cell Biol, 2007, 27 (15): 5468–5478.
- [10] 周月希,张娟,王立群.中医药在治疗反复移植失败中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (9): 4002–4005.
- [11] Zhong Y, Zeng F, Liu W, et al. Acupuncture in improving endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Complement Alternat Med, 2019, 19 (1): 61–72.
- [12] 张琦,张勤华.温肾活血方对反复移植失败患者种植窗子宫内膜形态及血流的影响[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26 (12): 1217–1222.
- [13] 马娟娟,张勤华.针刺改善肾虚肝郁型 IVF-ET 反复移植失败患者子宫内膜容受性、焦虑抑郁状态及妊娠结局的临床研究[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33 (5): 32–38.
- [14] 曹泽毅,乔杰,陈春玲,等主编.妇产科学[M].北京:人民卫生出版社,2014: 592.
- [15] Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management[J]. Reprod Biomed Online, 2014, 28 (1): 14–38.
- [16] Zhao YY, Yu Y, Zhang XW. Overall blastocyst quality, trophectoderm grade, and inner cell mass grade predict pregnancy outcome in euploid blastocyst transfer cycles[J]. Chin Med J, 2018, 131 (11): 1261–1267.
- [17] Sun Y, Li E, Feng G, et al. Influence of cleavage-stage embryo quality on the *in-vitro* fertilization outcome after single embryo transfer in fresh cycles[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2020, 59 (6): 872–876.
- [18] 马宝璋主编.中医妇科学[M].北京:中国中医药出版社,2012: 106–121.
- [19] 郑筱萸主编.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2002: 177–189.
- [20] Paulus WE, Zhang M, Strehler E, et al. Influence of acupuncture on the pregnancy rate in patients

- who undergo assisted reproduction therapy[J]. *Fertil Steril*, 2002, 77 (4): 721–724.
- [21] Chen ZJ, Shi Y, Sun Y, et al. Fresh versus frozen embryos for infertility in the polycystic ovary syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (6): 523–533.
- [22] Boivin J, Takefman J, Braverman A. The fertility quality of life (FertiQoL) tool: development and general psychometric properties[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26 (8): 2084–2091.
- [23] Mrozikiewicz AE, Ozarowski M, Jedrzejczak P. Biomolecular markers of recurrent implantation failure—a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (18): 10082.
- [24] 张琦, 张勤华, 贾亚楠. 温肾活血方改善胚胎着床障碍小鼠子宫内膜容受性的研究 [J]. *生殖与避孕*, 2016, 36 (11): 875–881.
- [25] 马娟娟, 张勤华, 翁晓晨, 等. 温针灸对 IVF-ET 肾阳虚型反复移植失败患者子宫内膜容受性及妊娠结局的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2018, 37 (12): 1339–1344.
- [26] 王立婧, 谈勇. 反复种植失败的中西医治疗进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25 (5): 995–1001.
- [27] Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, et al. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21 (12): 3036–3043.
- [28] Li J, Long L, Liu Y, et al. Effects of a mindfulness-based intervention on fertility quality of life and pregnancy rates among women subjected to first *in vitro* fertilization treatment[J]. *Behav Res Ther*, 2016, 77 (2): 96–104.
- [29] Smith CA, de Lacey S, Chapman M, et al. Effect of acupuncture vs sham acupuncture on live births among women undergoing *in vitro* fertilization: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2018, 319 (19): 1990–1998.
- [30] Ng EH, So WS, Gao J, et al. The role of acupuncture in the management of subfertility[J]. *Fertil Steril*, 2008, 90 (1): 1–13.
- [31] Zeadna A, Son WY, Moon JH, et al. A comparison of biochemical pregnancy rates between women who underwent IVF and fertile controls who conceived spontaneously dagger[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30 (4): 783–788.
- [32] ShaPiro BS, Daneshmand ST, Desai J, et al. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF[J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 33 (1): 50–55.
- [33] 王肖, 黄鲜菊. “预培其损” 针灸疗法治疗反复种植失败患者的临床观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (3): 1573–1575.
- [34] Creus M, Ordi J, Fabregues F, et al. The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study[J]. *Hum Reprod*, 2003, 18 (4): 683–693.
- (收稿: 2021–10–27 在线: 2022–02–10)
- 责任编辑: 段碧芳
- 英文责编: 张晶晶