

基础血清抗苗勒管激素与新鲜/冷冻胚胎移植周期活产率的相关性分析

李小兰, 黄睿, 方丛, 李晶洁, 梁晓燕
(中山大学附属第六医院生殖中心, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨基础血清抗苗勒管激素(AMH)水平与新鲜周期和冷冻周期活产率的关系及血清AMH水平对胚胎移植的活产率的预测价值。【方法】选取2010年6月-2015年5月在我生殖中心进行第一次新鲜或冷冻胚胎移植周期的不孕患者共2 942例进行回顾性分析。排除多囊卵巢综合征的患者。根据不孕患者的血清AMH水平分为低AMH水平组(< 1.1 ng/mL, 485例), 中AMH水平组($1.1 \sim 7.0$ ng/mL, 1 989例)及高AMH水平组(> 7.0 ng/mL, 468例)。再根据年龄将患者分成不同的年龄亚组:A组: ≤ 29 岁, B组:30~34岁, C组:35~39岁及D组:40岁以上。比较同一年龄组内不同血清AMH水平的种植率、临床妊娠率、流产率及活产率的差异。进一步采用多元回归分析方法分析基础血清AMH对活产率的影响。利用受试者工作特征曲线分析(ROC), 评估血清AMH对活产率的预测价值。【结果】(1)在新鲜胚胎和冷冻胚胎移植周期, 基础血清AMH水平均与临床妊娠结局相关, 血清AMH水平越低, 种植率越低, 同样临床妊娠率越低, 活产率越低, 而流产率则越高, 差异均有统计学意义。(2)年龄亚组分析显示, 在新鲜及冷冻周期, A、B及C组的患者的基础血清AMH与活产率相关, AMH越低, 活产率越低, 差异均有统计学意义。D组患者的基础血清AMH与冷冻周期的活产率相关($P < 0.05$), 与新鲜周期的活产率无关($P = 0.092$)。多元回归分析显示, 在纳入了年龄、不孕年限、不孕原因、移植胚胎数、内膜准备方案等影响结局的因素后, 血清AMH对活产率的影响仍保持有统计学意义。(3)基础血清AMH预测新鲜周期及冷冻周期胚胎移植活产率的受试者工作特征曲线(ROC)下面积分别为0.647、0.633。【结论】基础血清AMH是反映卵巢储备的良好指标之一, 与胚胎移植周期的妊娠结局有相关性, 基础血清AMH水平越低, 活产率越低。基础血清AMH是影响胚胎移植周期活产率的独立影响因素, 但对活产率的预测价值有限。

关键词: 抗苗勒管激素; 新鲜胚胎移植周期; 冷冻胚胎移植周期; 活产率

中图分类号: R71

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)01-0063-09

Correlation Analysis of Baseline Antimullerian Hormone Level and Live Birth Rate of Fresh Embryo Transfer Cycles and Frozen Embryo Transfer Cycles

LI Xiao-lan, HUANG Rui, FANG Cong, LI Jing-jie, LIANG Xiao-yan

(Reproductive Medicine Center, Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: LIANG Xiao-yan, E-mail: lxyzy@263.net

Abstract: 【Objective】To investigate the relationship of baseline antimullerian hormone (AMH) and live birth rate of IVF/ICSI and further explore the prognostic effect of AMH on live birth rate. 【Methods】All non-polycystic ovary patients who underwent their first embryo transfers in our unit and had basal serum AMH evaluated between 2010 and 2015 were evaluated in this retrospective study. Patients were grouped according to their AMH level, i.e. low AMH group with AMH less than 1.1 ng/mL ($n = 485$), middle AMH group with AMH between 1.1 ng/mL and 7.0 ng/mL ($n = 1 989$), and high AMH group with AMH higher than 7.0 ng/mL ($n = 468$). For age subgroup analysis, patients were stratified as follow: group A (age ≤ 29 years), group B (30~34 years), group C (35~39 years) and group D (over 40 years). We compared clinical outcomes between AMH groups in different age groups using

收稿日期: 2016-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(81471507, 81601347)

作者简介: 李小兰, 临床医学八年制博士研究生, 研究方向: 生殖医学, E-mail: 1092117293@qq.com; 梁晓燕, 通信作者, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: lxyzy@263.net

univariate and multivariate analysis. ROC analysis was utilized to assess predictive value of AMH on live birth rate. 【Results】 (1) In both fresh and frozen embryo transfers, baseline AMH was significantly related to clinical outcomes. The lower AMH was, the lower implantation rate, clinical pregnancy rate, and live birth rate. However, higher miscarriage rate was observed. All difference reached statistically significant. (2) In age subgroup analysis, we demonstrated AMH was related to live birth rate in patients in group A, B, and C, regardless of fresh or frozen embryo transferred. In those over 40 years, AMH was related to live birth rate in frozen cycles ($P < 0.05$) but not fresh cycles ($P = 0.092$). The further multivariate analysis confirmed the above results after controlling potential confounding variables. (3) The AUC of ROC analysis for AMH predicting live birth rate were 0.647, 0.633 for fresh and frozen cycles respectively. 【Conclusion】 Baseline AMH as one of excellent ovarian reserve markers, was significantly related to live birth rate in fresh or frozen cycles. Baseline AMH was an independent prognostic factor of live birth rate, but its predictive value on live birth rate was of limited clinical value.

Key words: antimullerian hormone; fresh embryo transfer cycle; frozen thawed embryo transfer cycle; live birth rate

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1):63-71]

抗苗勒管激素(antimullerian hormone, AMH), 又称为苗勒管抑制物质, 是一种肽类生长因子, 属于转化生长因子 β 超家族成员之一。在女性卵巢, AMH特异性地由始基卵泡池内启动生长后的卵泡中的颗粒细胞产生, 主要由窦前卵泡和小窦状卵泡分泌^[1], 从原始卵泡起持续到卵泡直径约8 mm时停止, 其在较大的窦状卵泡中的水平非常低^[2-4], 在卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)依赖的优势卵泡中和闭锁卵泡中均无AMH形成。它参与卵泡的生长发育, 通过抑制始基卵泡的募集及FSH对卵泡的刺激作用^[5-7], 在卵泡募集及卵泡成熟中发挥重要作用。血清AMH水平与窦卵泡数(antral follicle count, AFC)呈正相关, 与卵泡池中的非生长始基卵泡呈正比, 是反映卵巢储备功能的指标^[8]。AMH是反映卵巢功能的最新也是最好的指标, 关于AMH在辅助生殖技术中运用的研究是目前的研究热点。辅助生殖技术的最终目的是获得活婴分娩, 而AMH与卵巢储备有密切关系, 因而AMH与活产率的相关性研究也是目前人们的关注热点。然而, 尽管目前研究较一致认为, 基础血清AMH与不孕患者超促排卵治疗卵巢反应相关, 但与周期胚胎移植周期活产率的关系仍存有争议^[9-10]。且目前关于AMH与活产率的相关关系研究主要集中于新鲜周期, 对AMH于冷冻周期活产率的相关性的研究较少, 目前仅一篇文章对此问题进行研究^[11]。因此, 本研究通过大样本回顾性分析, 探讨了血清中AMH水平与新鲜和冷冻胚胎移植活产率的关系及评估血清AMH水平对胚胎移植的活产率的预测价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析2010年6月2日至2015年5月30日在中山大学附属第六医院生殖医学研究中心行第一次新鲜或冷冻胚胎移植周期的不孕患者。依据年龄及基础血清AMH纳入患者并分组。根据不孕患者的血清AMH水平分为低AMH水平组(<1.1 ng/mL), 中等AMH水平组($1.1 \sim 7.0$ ng/mL)及高AMH水平组(>7.0 ng/mL)。年龄组分为:A组: ≤ 29 岁, B组:30~34岁, C组:35~39岁, D组:40岁以上。排除标准:①PCOS患者;②合并免疫系统疾病;③反复种植失败病史。

1.2 控制性超排卵方案

控制性超排卵(controlled ovarian hyper-stimulation, COH)方案依据患者年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、基础性激素、AMH、AFC个体化选择合适的促排卵方案及启动剂量。卵巢正常储备的患者主要采用长方案, 对其中体型瘦小、 $AFC \geq 15$ 个患者为预防卵巢过度刺激综合征选择拮抗剂方案;卵巢储备低下的患者如促排周期月经第2天B超观察双侧卵巢 $AFC \leq 3$ 个选择轻微刺激方案, 如 $AFC > 3$ 个可考虑拮抗剂方案。启动剂量主要依据患者年龄、BMI、AMH决定。长方案周期于促排前一次月经周期黄体中期降调节, 14 d后B超结合性激素检查, 达到降调要求后开始皮下注射促性腺激素(gonadotropin, Gn, 果纳芬, 瑞士默克雪兰诺);拮抗剂方案于月经第2日开始使用Gn(果纳芬, 瑞士默克雪兰诺), 依据阴

道B超监测的卵泡直径及性激素水平调整Gn剂量,灵活给予促性腺激素释放激素拮抗剂(gonadotropin-releasing hormone antagonist, GnRH-ant, 思则凯, 瑞士默克雪兰诺)直至使用人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)日;微刺激方案于月经第2天开始给予克罗米芬/来曲唑口服4~5 d,随后依据卵泡发育情况给予促性腺激素,必要时予GnRH-ant(思则凯, 瑞士默克雪兰诺)预防卵泡早排,直至HCG日。当2~3个卵泡直径达到16~18 mm后,肌肉注射hHCG 4 000~10 000 U(丽珠集团),34~38 h后经阴道B超引导下穿刺取卵,穿刺抽吸10 mm以上卵泡,按本中心常规行体外受精(in vitro fertilization, IVF)或卵泡浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)。

1.3 胚胎培养观察及移植

依据男方精液情况选择IVF/ICSI。取卵术后16~20 h观察受精情况,72 h观察胚胎卵裂情况。依据国际形态学评分标准^[12]对胚胎进行分级:I级,卵裂球外观均匀,胞质透明均匀,无碎片;II级,卵裂球外观均匀,胞质碎片<20%;III级,卵裂球外观欠均匀,胞质碎片20%~50%;IV级,卵裂球外观欠均匀,胞质碎片>50%;其中I-II级定为优质胚胎,I-III级定义为可移植胚胎。新鲜治疗周期是取卵后第3天或第5天移植可移植胚胎1~2枚,多余胚胎行囊胚培养后玻璃化冷冻保存。冷冻周期则是结合患者意愿,全部胚胎第3天或第5天行全胚冷冻。

1.4 冷冻胚胎移植及黄体支持

依据患者月经周期、不孕原因等个性化选择合适的内膜准备方案,包括自然周期、激素替代周期、降调节加激素替代周期、刺激周期。阴道B超监测子宫内膜厚度,在子宫内膜厚度超过7 mm时移植胚胎。患者黄体支持方案统一为黄体酮40 mg/d肌内注射+黄体酮软胶囊(安琪坦, Capsugel)200 mg/d塞阴。移植后第12天血 β -HCG $\geq$ 25 U/L为生化妊娠;移植后5周B超下见到孕囊者为临床妊娠。

1.5 观察指标及统计数据计算方法

主要观察指标是:活产率。其他观察指标:种植率、临床妊娠率、流产率。依据文献^[13],观察指标的定义为:种植率=孕囊总数/移植胚胎总数 $\times$ 100%;临床妊娠率=临床妊娠患者数/移植周期

数 $\times$ 100%;流产率=妊娠未达20周,自然流产患者数/临床妊娠例数 $\times$ 100%;活产率=活婴分娩例数/移植周期数 $\times$ 100%。

1.6 AMH检测方法

在促排卵开始前3~6个月内,于患者月经3~5天清晨空腹抽血2~3 mL,标本3 000 r/min离心5 min(离心半径 $r=8.6$ cm),抽取上层血清进行检测,避免溶血及止血。血清AMH使用酶联免疫吸附法(ELISA, 美国 Diagnostic system laboratories 公司提供试剂盒)测定。

1.7 统计学处理

采用SPSS 19.0进行统计学分析。计量资料如符合正态分布则以均数 $\pm$ 标准差表示,行方差分析比较组间差别;如不符合正态分布则以中位数(四分位间距)表示,行Kruskal-Wallis H 检验比较组间差别。计数资料用率表示,采用卡方检验比较组间差别。采用Spearman相关分析分析变量间的相关关系。利用受试者工作特征曲线分析(ROC),评估血清AMH对活产率的预测价值。多因素分析采用二变量逻辑回归分析法,控制混杂因素的影响。 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 三组患者的基线资料分析

共纳入患者2 942例,其中低AMH水平组485例,中等AMH水平组1 989例,高AMH水平组468例。三组患者年龄、BMI、不孕年限、基础FSH、窦卵泡数、不孕原因等基础情况见表1。可见,基础血清AMH水平越低,年龄越大(36 vs 32 vs 30岁, $P<0.001$),基础FSH水平越高(9.19 vs 7.10 vs 6.40 IU/L, $P<0.001$),窦卵泡数越少(5 vs 12 vs 21, $P<0.001$),差异均有统计学意义。进一步行相关分析显示,基础血清AMH与年龄、基础FSH呈负相关(r 分别为-0.406和-0.354, P 均小于0.001),与窦卵泡数呈正相关($r=0.776$, P 小于0.001)。各组患者的主要不孕因素不同,低AMH水平组以卵巢储备低下为主要原因,中等AMH水平组及高AMH水平组以盆腔输卵管因素为主。三组患者BMI、不孕年限无统计学差异。

2.2 血清AMH与新鲜胚胎移植周期临床结局的相关性分析

2.2.1 新鲜胚胎移植周期患者的基础临床资料分

表1 患者的临床基本资料

Table 1 Comparison of the general conditions among groups [Median (IQR) or %]

	Low AMH(<i>n</i> = 485)	Middle AMH (<i>n</i> = 1 989)	High AMH(<i>n</i> = 468)	χ^2	<i>P</i>
Age/years	35(7) ¹⁾	32(7) ²⁾	30(5)	303.61	< 0.001
AFC	5(4) ¹⁾	12(7) ²⁾	21(11)	262.46	< 0.001
Basal FSH/(IU/L)	9.19(3.98) ¹⁾	7.10(2.07) ²⁾	6.40(1.46)	276.88	< 0.001
BMI/(kg/m ²)	21.92(3.75)	21.53(3.56)	21.32(4.11)	10.19	0.321
Duration of infertility/years	4(2)	4(4)	4(3.5)	2.32	0.895
Etiologies of infertility					< 0.001 ³⁾
Tubal factors	14.43%	48.06%	57.91%		
Man factors	4.54%	22.32%	28.42%		
Unknown factors	2.68%	6.03%	4.27%		
Endometriosis	8.04%	15.43%	8.76%		
Deceased ovarian reserve	70.31%	7.84%	0.00%		
Cervical factors	0.00%	0.30%	0.64%		

1) indicated $P < 0.05$ for comparison between low AMH group and middle AMH group, while 2) for comparison between low AMH group and middle AMH group; 3) indicated Fisher's exact test

析 如表2所示,新鲜周期共1 448例,其中低AMH水平组270例,中等AMH水平组1 030例,高AMH水平组148例。三组的Gn总剂量(2 475 vs 2 200 vs 1 550 U, $P < 0.05$)、获卵数(4 vs 9 vs 11, $P < 0.05$)、优质胚胎数(2 vs 3 vs 5, $P < 0.05$)、HCG日雌激素水平(1 343 vs 2 373 vs 2 926 pg/mL, $P < 0.05$)的差异均有统计学意义。进一步行相关分

析显示,基础血清AMH与Gn总剂量呈负相关($r = -0.35$, $P < 0.001$),与获卵数($r = 0.57$, $P < 0.001$)、优质胚胎数($r = 0.4$, $P < 0.001$)及HCG日雌激素水平($r = 0.51$, $P < 0.05$)呈正相关,相关关系均有统计学意义,提示AMH与卵巢反应有关,AMH水平越高,患者对促性腺激素促排的反应性越高。

表2 全年龄组新鲜胚胎移植周期患者的临床结局

Table 2 Clinical outcomes of fresh embryo transfers for all age group [Median (IQR) or %]

	Low AMH (<i>n</i> = 270)	Middle AMH(<i>n</i> = 1 030)	High AMH(<i>n</i> = 148)	χ^2	<i>P</i>
Dose of Gn/U	2 475(1 369) ¹⁾	2 200(900) ²⁾	1 550(600)	137.40	< 0.001
Number of oocyte retrieval	4(4) ¹⁾	9(6) ²⁾	11(4)	334.13	< 0.001
Number of high-quality embryo	2(2) ¹⁾	3(3) ²⁾	5(4)	187.13	< 0.001
Number of embryo transferred	2(1)	2(0)	2(0)	40.96	0.935
Thickness of endometrium/mm	11(3)	12(3)	12(3)	34.22	0.128
E2 level on HCG day/(pg/mL)	1 343(1 079) ¹⁾	2 373(1 479) ²⁾	2 926(1 350)	280.16	< 0.001
Progesterone on HCG day/ (pg/mL)	0.50(0.45)	0.70(0.40)	0.60(0.40)	27.37	0.412
Stage of embryo					0.855
Cleavage-stage embryo	88.00%	88.60%	86.40%		
Blastocyst embryo	12.00%	11.40%	13.60%		
Implantation rate	21.87%(98/488) ¹⁾	41.92%(792/1 889) ²⁾	48.70%(132/271)		< 0.001
Clinical pregnancy rate	30.37%(82/270) ¹⁾	57.57%(593/1 030) ²⁾	67.56%(100/148)		< 0.001
Miscarriage rate	29.26%(24/82) ¹⁾	14.50%(86/593) ²⁾	7.00%(7/100)		< 0.001
Live birth rate	21.11%(57/270) ¹⁾	45.82%(472/1 030) ²⁾	57.43%(85/148)		< 0.001

1) indicated $P < 0.05$ for comparison between low AMH group and middle AMH group, while 2) for comparison between low AMH group and middle AMH group

2.2.2 全年龄组血清 AMH 与新鲜胚胎移植周期临床结局的相关性分析 关于新鲜胚胎移植治疗的临床结局,由表2可见,低 AMH 水平组新鲜胚胎移植共 270 例,82 例(30.37%)临床妊娠,57 例(21.87%)分娩活婴,胚胎种植率是 21.87%,均低于中等 AMH 水平组(临床妊娠率 57.57%,活产率 45.82%,种植率 41.92%)和高 AMH 水平组(临床妊娠率 67.56%,活产率 57.43%,种植率 48.70%),差异均有统计学意义。但流产率显著高于其余两组(29.26% vs 14.50% vs 7.00%, $P < 0.001$)提示基础血清 AMH 水平与胚胎移植的临床结局相关,血清 AMH 水平越低,新鲜胚胎移植的临床结局越差。

2.2.3 血清 AMH 与新鲜胚胎移植周期活产率的年龄亚组分析 进一步行年龄的亚组分析,结果如表3所示。结果显示,在 A、B 及 C 组,血清 AMH 水平越低,新鲜胚胎移植的活产率越低(A 组:

57.14% vs 52.79% vs 29.73%, $P = 0.012$; B 组: 62.50% vs 53.48% vs 26.67%, $P < 0.001$; C 组: 45.00% vs 32.74% vs 20.65%, $P = 0.006$)差异均有统计学意义。尽管差异未达统计学意义,在 D 组的患者也有相同的趋势。为了排除其他因素的影响,我们进一步行多元回归分析,结果如表4所示。在回归方程中纳入了年龄、基础 FSH、窦卵泡数、不孕原因、Gn 用量、HCG 日 E2、移植胚胎发育天数、移植胚胎数。结果提示,在 A、B 及 C 组,低 AMH 水平组的活产率均比中等 AMH 水平组低,差异有统计学意义。而高 AMH 水平组的活产率并未较中等 AMH 水平组显著增高,两组在多元回归分析中无统计学差异。血清 AMH、年龄、窦卵泡数及 FSH 预测新鲜胚胎移植周期活产率的受试者工作特征曲线(ROC)下面积分别为 0.647、0.634、0.637、0.565,均有统计学意义。

表3 各年龄组基础血清 AMH 与活产率的关系—单因素分析

Table 3 Univariate analysis of correlation between live birth rate and AMH in age subgroups

Age group	Low AMH < 1.1 ng/mL	Middle AMH 1.1 ~ 7.0 ng/mL	High AMH > 7.0 ng/mL	P
A group	29.73%(11/37) ¹⁾	52.79%(142/269) ²⁾	57.14%(40/70)	0.012
B group	26.67%(24/90) ¹⁾	53.48%(246/460) ²⁾	62.50%(35/56)	< 0.001
C group	20.65%(19/92) ¹⁾	32.74%(74/226) ²⁾	45.00%(9/20)	0.006
D group	5.88%(3/51) ¹⁾	13.33%(10/75)	50.00%(1/2)	0.092 ³⁾

1) indicated $P < 0.05$ for comparison between low AMH group and middle AMH group, while 2) for comparison between low AMH group and middle AMH group. 3) Fisher exact test.

表4 各年龄组基础血清 AMH 与活产率的关系—多因素分析

Table 4 Multivariate analysis of correlation between live birth rate and AMH in age subgroups

Age groups	Low AMH		Middle AMH	High AMH	
	OR _a (95%CI)	P		OR _a (95%CI)	P
A group	0.44 (0.32,0.78)	< 0.001	1	3.15 (0.98,5.12)	0.058
B group	0.34 (0.23,0.67)	0.021	1	2.58 (0.81,3.08)	0.071
C group	0.40 (0.25,0.89)	< 0.001	1	1.68 (0.91,3.10)	0.06
D group	0.38 (0.17,0.60)	0.177	1	1.03 (0.89,1.23)	0.05

2.3 血清 AMH 与冷冻胚胎移植周期临床结局的相关性

2.3.1 全年龄组血清 AMH 与冷冻胚胎移植周期临床结局的相关性分析 如表5所示,冷冻周期共 1 494 例,其中低 AMH 水平组 215 例,中等

AMH 水平组 959 例,高 AMH 水平组 320 例。在冷冻胚胎移植周期,低 AMH 水平组的种植率、临床妊娠率、活产率分别为 21.57%、32.09%、16.74,均低于中等 AMH 水平组(种植率 43.60%,临床妊娠率 56.20%,活产率 44.73%)和高 AMH 水平组(种植

率58.07%,临床妊娠率68.43%,活产率53.43%),差异有统计学意义。但流产率显著高于其余两组(39.13% vs 16.32% vs 17.80%, $P < 0.001$),提示基础血清AMH水平与胚胎移植的临床结局相关,血清AMH水平越低,冷冻胚胎移植的临床结局越差。

2.3.2 血清AMH与冷冻胚胎移植周期活产率的年龄亚组分析 进一步行年龄的亚组分析,结果如表6所示,在所有年龄组内,血清AMH水平越低,冷冻胚胎移植的活产率越低,差异有统计学意义。为了排除其他因素的影响,我们进一步行多元回归分析。在回归方程中纳入了年龄、基

础FSH、窦卵泡数、不孕原因、移植胚胎发育天数、内膜准备方案、内膜厚度、移植胚胎数。结果提示,在A、B、C及D组内,低AMH水平组的活产率均较中等AMH水平组低,差异有统计学意义。在小于35岁的患者中(A及B组),高AMH水平组的活产率较中等AMH水平组显著增高,而在35岁以上患者中(C及D组),差异无统计学意义(表7)。

血清AMH、年龄、窦卵泡数及FSH预测新鲜胚胎移植周期活产率的受试者工作特征曲线(ROC)下面积分别为0.633、0.635、0.630及0.569,均有统计学意义。

表5 全年龄组冷冻胚胎移植周期患者相关临床参数及临床结局

Table 5 Clinical outcomes of frozen embryo transfers for all age group [Median (IQR) or % (n/N)]

	Low AMH(n = 215)	Middle AMH(n = 959)	High AMH(n = 320)	χ^2	P
Endometrium preparation protocols					< 0.001 ³⁾
Hormone replace therapy(HRT)	21(9.8)	50(5.2)	5(1.8)		
Natural cycles	109(51)	528(55)	241(75.4)		
GnRH-a/HRT	76(35.3)	355(37.1)	51(15.8)		
Stimulation cycles	8(3.9)	26(2.7)	23(7.0)		
Stage of embryo					< 0.001
Cleavage-stage embryo	72.5(156/215)	27.2(260/959)	13.2(42/320)		
Blastocyst embryo	27.5(59/215)	72.8(699/959)	86.8(278/320)		
Number of embryo transferred	2(1)	2(1)	1(1)	40.39	0.375
Thickness of endometrium/mm	10(2.5)	10(3.0)	9.5(2.0)	23.14	0.063
Implantation rate/%	21.57(74/343) ¹⁾	43.60(644/14 772)	58.07(277/477)		< 0.001
Clinical pregnancy rate/%	32.09(69/215) ¹⁾	56.20(539/959) ²⁾	68.43(219/320)		< 0.001
Miscarriage rate/%	39.13(27/69) ¹⁾	16.32(88/539) ²⁾	17.80(39/219)		< 0.001
Live birth rate/%	16.74(36/215) ¹⁾	44.73(429/959) ²⁾	53.43(171/320)		< 0.001

1) indicated $P < 0.05$ for comparison between low AMH group and middle AMH group, while 2) for comparison between low AMH group and middle AMH group; 3) Fisher's exact test.

表6 各年龄组基础血清AMH与活产率的关系—单因素分析

Table 6 Univariate analysis of correlation between live birth rate and AMH in age subgroups % (n/N)

Age groups	Low AMH < 1.1 ng/mL	Middle AHM 1.1 ~ 7.0 ng/mL	High AMH > 7.0 ng/mL	P
A group	23.81(5/21) ¹⁾	58.14(150/258) ²⁾	56.52(78/138)	0.009
B group	19.23(10/52) ¹⁾	45.41(173/381) ²⁾	50.00(71/142)	0.001
C group	20.00(15/75) ¹⁾	36.44(86/236) ²⁾	57.14(20/35)	0.001
D group	8.96(6/67) ¹⁾	23.81(20/84) ²⁾	40.00(2/5)	0.017 ³⁾

1) indicated $P < 0.05$ for comparison between low AMH group and middle AMH group, while 2) for comparison between low AMH group and middle AMH group; 3) Fisher's exact test.

表7 各年龄组基础血清AMH与活产率的关系—多因素分析

Table 7 Multivariate analysis of correlation between AMH and AMH in age subgroups

Age groups	Low AMH		Middle AMH	High AMH	
	OR _a (95%CI)	P	Reference	OR _a (95%CI)	P
A group	0.52(0.43,0.87)	0.002	1	1.54(1.29,1.76)	0.017
B group	0.33(0.21,0.56)	0.001	1	1.28(1.12,2.04)	0.025
C group	0.24(0.17,0.34)	0.008	1	1.12(1.03,3.78)	0.59
D group	0.35(0.27,0.54)	0.016	1	1.26(1.09,1.67)	0.48

3 讨 论

辅助生殖技术是现阶段治疗不孕不育症的有效手段,其最终目的是获得活婴分娩。迄今为止,年龄、窦卵泡计数、基础FSH、血清抑制素、雌激素等都是作为预测IVF/ICSI助孕活产率的重要参数。AMH是近几年发现的新型卵巢储备指标,其临床应用仍有待探索。AMH主要由窦前卵泡和小窦卵泡周围的颗粒细胞产生,反映较小的生长卵泡的情况,进而可以体现出卵泡池中剩余卵泡的水平。同时,AMH参与了卵泡的生长发育,AMH本质上能反映卵巢的储备状态。血清AMH较其他储备指标有明显优势。首先,随着年龄的增加,卵巢储备减少,血清AMH被认为是最早揭示这一生理现象的指标。其次,血清AMH在整个月经周期保持相对的稳定性,它的测定不受月经周期的限制,方便临床检测^[14]。其外,相对于基础FSH,AMH周期间的波动性更小^[15]。而窦卵泡数受操作者的主观因素影响较大,AMH则是客观指标,受主观因素影响少。因此,目前认为AMH是优于年龄、FSH、甚至窦卵泡数等参数的卵巢储备功能指标。卵巢储备主要包括卵子的数量和质量两方面。AMH作为反应卵巢储备功能的良好指标之一,因此,有人推测AMH可通过反映出卵子数量和质量的情况,从而影响妊娠结局。目前研究较一致认为,AMH与卵子数量呈正比。在本研究中,新鲜周期治疗中AMH与窦卵泡数、获卵数呈正比,证实AMH与卵子数量相关。AMH越高,获卵数越多,可能获得更多优质胚胎可供选择以及更好的临床结局。但目前关于卵子、胚胎质量的评估目前主要以形态

性评价为主,形态评估并不完全与质量对等。尽管大部分研究表明AMH与胚胎形态评价相关,但尚无实验能证实AMH与卵子质量的直接相关性。

目前关于血清中AMH水平与新鲜周期胚胎移植的活产率的关系仍存在争议。部分研究者认为血清AMH与IVF/ICSI的活产率并无相关性,并且不能预测IVF/ICSI-ET活产率^[16-17],但大多数的研究结果显示基础血清AMH水平可以与妊娠结局相关,能预测卵巢反应性及活产率^[18-19]。也有研究指出,AMH与临床结局的相关性与年龄相关^[20],在35~41岁年龄段之间,AMH与妊娠结局呈正相关,而在两个年龄极端则不存在相关性。由于AMH与年龄密切相关,为排除年龄影响,本研究根据患者年龄,将患者分成不同年龄组。研究结果发现,在新鲜周期,各个年龄组内低AMH水平组的活产率较中AMH水平组低,即使校正了年龄等其他因素的影响,差异仍有统计学意义。但在高AMH水平组与中等AMH水平组相比,尽管活产率相对较高,但校正其他因素影响后,差别没有统计学差异。由此我们推测AMH水平处于一定水平可以提高活产率,但如果高出一定的阈值后高水平的AMH可能不利于卵母细胞成熟。这可能与Laura^[21]提出的高AMH水平对卵母细胞的成熟产生抑制作用有关。其次,Steward等^[22]在研究获卵数与活产率相关性的时候指出,获卵数小于16个时,活产率与获卵数呈正相关,在获卵数超过16个时,该相关关系消失,他们认为这是由于高雌激素水平影响子宫内膜容受性,从而影响活产率。在本研究中,基础血清AMH水平与HCG日雌激素水平成正相关,基础AMH水平越高,HCG日雌激素水平越高。因此我们推

测超过一定的阈值的高AMH水平患者的子宫内膜容受性可能较低水平AMH的患者的差,从而影响活产率。

目前关于AMH于临床妊娠结局的相关性研究主要集中于新鲜周期,关于AMH与冷冻周期活产率的相关性的研究较少。目前仅有一篇文章对此问题进行阐述^[11]。该研究指出窦卵泡数及AMH均与冷冻周期活产率相关,但不是影响活产率的独立影响因子。但该研究样本量较少。本研究通过大样本量回顾性分析,结果显示,排除年龄、基础FSH、窦卵泡数、不孕原因、移植胚胎发育天数、内膜准备方案、内膜厚度、移植胚胎数等其他因素的影响后,在各年龄组,低AMH水平组的活产率均比中等AMH水平组低,差异有统计学意义。在小于35岁的患者中,高AMH水平组的活产率较中等AMH水平组增高,差异有统计学意义。提示基础血清AMH与冷冻周期的活产率存在相关性,是影响活产率的独立影响因素。对于小于35岁的患者,高AMH组在新鲜周期与中AMH组的活产率差异无统计学意义,而在冷冻周期中两组的活产率差异则有统计学差异,我们推测与新鲜周期高雌影响子宫内膜容受性相关。由于冷冻周期的子宫内膜环境接近自然状态,子宫内膜容受性良好,胚胎质量对结果影响占主导位置,因而活产率随着AMH增加而增加。

年龄也是影响妊娠的独立危险因素之一,主要与原始卵泡池内卵子的数量减少和质量下降有关^[23]。随着年龄的增加,在卵泡池中,能够被募集的始基卵泡随之减少,AMH水平随之下降。但患者的生理年龄并不能完全与卵巢的衰老程度和卵巢的储备状态一致。卵巢储备降低除了受年龄相关的生理性因素影响,还可能受到与年龄无关的非生理性因素影响。本研究结果显示,年轻的不孕患者,当AMH低于1.1 ng/mL时,即使获得了胚胎,其活产率仍然显著低于同年龄组内AMH高于1.1 ng/mL的患者,在年龄超过40岁的不孕患者中,AMH高于1.1 ng/mL的患者的活产率仍高于AMH低于1.1 ng/mL的患者,差异有统计学意义。我们认为,AMH比年龄更能反映卵巢的生理状态。AMH低不仅反映卵巢内卵子数量减少,也可能代表着卵子质量下降。

但是,关于AMH与卵子质量的关系,目前主要为临床证据,尚无实验能证实AMH与卵子质量的直接相关性。

尽管AMH是新鲜及冷冻胚胎移植活产率的独立影响因子,但是AMH预测活产率的ROC曲线下面积均小于7,提示无论是新鲜周期还是冷冻周期,AMH对活产率的预测价值有限。这与一项荟萃分析结果一致^[24]。这是因为,影响活产率的因素很多,例如年龄、移植胚胎数等,AMH仅是其中一个影响因素。因此在临床工作中,仍需要结合患者年龄、窦卵泡数等其他卵巢储备功能指标,给病人提供最佳的咨询。

综上所述,基础血清AMH是反映卵巢储备的良好指标之一,与胚胎移植周期的妊娠结局有相关性,基础血清AMH水平越低,活产率越低。基础血清AMH是影响胚胎移植周期活产率的独立影响因素,但对活产率的预测价值有限。

参考文献

- [1] Robeva R, Ts M, Tomova A, et al. The anti-müllerian hormone— physiology and application into clinical practice [J]. *Akush Ginekol*, 2006, 45(7): 50–54.
- [2] Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, et al. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection [J]. *Mol Human Reprod*, 2013, 19(8): 519–527.
- [3] Weenen C, Laven JSE, Bergh ARMV, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in human ovary: potential implications for initial and cyclic recruitment [J]. *Mol Human Reprod*, 2004, 10(2): 77–83.
- [4] Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(91): 4064–4069.
- [5] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 4891–4899.
- [6] Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone [J]. *Reproduction*, 2002, 124(5): 601–609.

- [7] Knight PG, Glistner C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development [J]. *Reproduction*, 2006, 132(2):191-206.
- [8] Kelsey TW, Anderson RA, Wright P, et al. Data-driven assessment of the human ovarian reserve[J]. *Mol Human Reprod*, 2012, 18(2):79-87.
- [9] Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, et al. A systematic review of test predicting ovarian reserve and IVF outcome [J]. *Human Reprod Update*, 2006, 12(6):685-718.
- [10] Honnma H, Baba T, Sasaki M, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels affect the rate of ongoing pregnancy after in vitro fertilization[J]. *Reprod Sci*, 2012, 20(1):51-59.
- [11] Li R, Lee V, Lau E, et al. Role of baseline antral follicle count and anti-Müllerian hormone in the index stimulation cycle of IVF treatment in predicting outcome of subsequent frozen-thawed embryo transfers [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(7):490-493.
- [12] Balaban B, Brison D, Calderón G, et al. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting [J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 22(6):632-646.
- [13] Zegers F. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(5):1520-1524.
- [14] La MA, Stabile G, Arsenio AC, et al. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle [J]. *Human Reprod*, 2006, 21(12):3103-3107.
- [15] La Marca A, Giulini S, Tirelli A, et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology [J]. *Human Reprod*, 2007, 22(3):766-771.
- [16] Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, et al. Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6):1602-1608.
- [17] Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, et al. Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6):1602-1608.
- [18] Lehmann P, Vélez MP, Saumet J, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF [J]. *J Assist Reprod Genetics*, 2014, 31(4):493-498.
- [19] Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-müllerian hormone and FSH. Prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles—implications for individualization of therapy [J]. *Human Reprod*, 2007, 22(9):2414-2421.
- [20] Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, et al. The association between anti-Müllerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(6):757-761.
- [21] Laura P, Suman R, Mason HD. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high? [J]. *Reproduction*, 2010, 139(5):825-833.
- [22] Steward RG, Lan L, Shah AA, et al. Oocyte number as a predictor for ovarian hyper stimulation syndrome and live birth: an analysis of 256, 381 in vitro fertilization cycles [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(4):967-973.
- [23] Verhagen TEM, Hendriks DJ, Bancsi LFJMM, et al. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis [J]. *Human Reprod Update*, 2008, 14(2):95-100.
- [24] Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, et al. The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: a systematic review and meta-analysis of the literature [J]. *Human Reprod Update*, 2014, 20(4):560-570.

(编辑 刘清海)