

短效促性腺激素释放激素激动剂在冷冻周期移植中的应用价值

李婷婷, 王艳芳, 方 丛

(中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广东 广州 510655)

摘 要:【目的】比较不同冷冻周期方案(人工周期和自然周期)囊胚移植后1 d应用短效促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)对妊娠结局的影响。【方法】回顾性分析2013年1月至2014年12月在我院行冷冻囊胚移植的患者657个周期,移植失败周期 ≤ 2 次,月经周期规律,年龄在22~40岁之间,基础FSH水平小于10 U/mL,移植至少一个优质囊胚,且移植囊胚总数 ≤ 2 个。根据冷冻周期方案分为4组,自然周期囊胚移植后1 d应用1次GnRH-a 0.1 mg(A组:79例);人工周期囊胚移植后1 d应用1次GnRH-a 0.1 mg(B组:228例);自然周期囊胚移植后1 d不用GnRH-a 0.1 mg(C组:84例);人工周期囊胚移植后1 d不用GnRH-a 0.1 mg(D组:266例)。【结果】4组患者年龄、体质量指数(BMI)、基础FSH、内膜厚度以及移植囊胚数量均无统计学差异,4组的临床妊娠率分别为72.15%、66.23%、59.52%及62.78%,自然周期囊胚移植后1 d应用1次GnRH-a 0.1 mg妊娠率明显高于不用GnRH-a 0.1 mg组,并有统计学差异,人工周期囊胚移植后1 d用和不用GnRH-a 0.1 mg对妊娠结局没有影响。【结论】在移植失败周期 ≤ 2 次、年龄 < 40 岁、基础FSH < 10 U/mL、进行冷冻囊胚移植的优质患者人群,自然周期囊胚移植后1 d应用1次GnRH-a 0.1 mg可明显提高妊娠率,而人工周期无此优势。临床医生应掌握药物使用适应证,为患者高效助孕提供基础。

关键词:促性腺激素释放激素激动剂;体外受精-胚胎移植(IVF-ET);冷冻周期;囊胚移植

中图分类号:R71

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2016)01-0120-05

Luteal Phase Support with GnRH-a Improves Pregnancy Rates in Natural Frozen-Thawed Blastocyst Transfer Cycles

LI Ting-ting, WANG Yan-fang, FANG Cong

(Reproductive Medicine Research Center, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: Fang Cong, E-mail: fangconggd@foxmail.com

Abstract:【Objective】To discuss the impact on pregnant outcomes of luteal phase support with Gonadotrophin releasing hormone agonist (GnRH-a) in different frozen-thawed cycles (natural cycle/ hormone replace treatment (HRT) cycle) of blastocyst transfer.【Methods】Patients underwent first IVF-ET cycle in January 2013 to December 2014, and got their embryos transfer less 2 times, with age below 40 years old, basal FSH below 10 U/L, are involved. The 657 cycles of thawed blastocyst transfer was analyzed, all with at least one good quality blastocysts. All the cycles were divided into 4 groups based on different frozen-thawing cycles and whether use GnRH-a 0.1 mg after 1 day of blastocyst transfer as luteal phase support: natural cycles with GnRH-a as luteal phase support (Group A, $n = 79$), HRT cycles with GnRH-a as luteal phase support (Group B, $n = 228$), natural cycles not with GnRH-a as luteal phase support (Group C, $n = 84$) and HRT cycles not with GnRH-a as luteal phase support (Group D, $n = 266$). The

收稿日期:2015-06-27

基金项目:国家自然科学基金(81070495);广东省自然科学基金(S2013010013404)

作者简介:李婷婷,医师,硕士,研究方向:生殖医学,E-mail:qingqingwenyuan@126.com;方丛,通信作者,副教授,硕士生导师,研究方向:生殖医学,E-mail:fangconggd@foxmail.com

clinical pregnant outcomes were compared among four groups. 【Results】 There were no significantly differences found in age, BMI, basal FSH level, endometrium thickness and number of transferred blastocysts among the four groups. And clinical pregnancy rates were 72.15%, 66.23%, 59.52% and 62.78%, respectively. The pregnancy rates of Group A was higher than Group B and Group C, though there were no significance between the two groups (Group C vs Group D, and Group B vs Group D). Furthermore, The pregnancy rates of Group A compared with Group B, showed significantly higher ($P < 0.05$). 【Conclusion】 In the cycles of frozen-thawed blastocyst transfer, the pregnancy rate of use GnRH-a 0.1 mg after 1 day of blastocyst transfer as luteal phase support in natural cycles is significantly higher than no use. However, it's useless in HRT cycles. Maybe the reason is that have luteal or not. Clinical doctors should get hold of indication of using GnRH-a 0.1 mg after 1 day of blastocyst transfer as luteal phase support.

Key words: gonadotropin releasing hormone agonist; IVF-ET; frozen-thawed cycle; blastocyst transfer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2016,37(1):120-124]

自然月经周期中,黄体期生理改变是成功妊娠的前提,颗粒细胞转化为黄体细胞,在体内各项激素参与下,黄体细胞产生孕酮,子宫内膜在孕酮作用下,发生转变并分泌各种利于胚胎着床的细胞因子,以使母体成功受孕^[1]。但在体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)助孕过程中,黄体功能缺陷却常常不可避免,如各种促排卵方案中使用促性腺激素释放激素激动剂(Gonadotrophin releasing hormone agonist, GnRH-a)降调节以抑制早发促黄体生成素(Luteining Hormone, LH)峰,目的是减少 IVF-ET 周期取消率^[2],并可获得更均匀更多的卵子数量。但使用大剂量或长期使用 GnRH-a 后,因抑制了内源性 LH,随之也影响了黄体期 LH 的生理作用。同样,辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)各促排方案由于多卵泡发育,相应有多多个黄体形成,合成并分泌超生理量的雌孕激素负反馈下丘脑-垂体,抑制内源性 LH、取卵后颗粒细胞的丢失等因素,会导致黄体功能的缺陷,发生率几乎达 100%^[3]。因黄体支持对 IVF-ET 妊娠率有很大提高,所以黄体支持在 IVF-ET 中必不可少,常用黄体支持药物有雌二醇、孕酮、人绒毛膜促性腺激素(HCG)等等,用药途径也有口服、肌肉注射、塞肛、塞阴道等^[4]。为了补充黄体功能,除了补充雌孕激素、HCG 等,目前很多学者提出了一个新的积极有效的方法,即在黄体期使用小剂量 GnRH-a,并且 GnRH-a 用于黄体支持不增加 OHSS 风险。2004 年 Tesarik^[5]最早使用此方案,即供卵周期卵泡浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)后 6 d 皮下注射 0.1 mg 曲普

瑞林,可以明显提高临床妊娠率和胚胎种植率。2011 年的 meta 分析^[6],显示在长方案或拮抗剂方案中黄体期使用短效 GnRH-a 活产率提高了 16%。但目前所有研究都仅在长方案可拮抗剂方案新鲜周期,并无冷冻周期的研究,冷冻周期中人工周期并没有黄体存在,使用短效 GnRH-a 观察临床效果,可更直接研究短效 GnRH-a 可以提高妊娠率的机制。在本研究就短效 GnRH-a 在不同冷冻周期移植方案中的应用进行了如下探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2013 年 1 月至 2014 年 12 月在我院行冷冻囊胚移植的患者 657 个周期,移植失败周期 ≤ 2 次,月经周期规律(28~32 d),年龄在 22 岁至 40 岁之间,基础 FSH 水平小于 10 U/mL,移植至少一个优质囊胚,且移植囊胚总数 ≤ 2 个。并排除以下情况:夫妻双方任一方染色体异常、子宫内膜异位症、子宫畸形、免疫异常、结核等。根据冷冻周期方案分为 4 组,自然周期囊胚移植后 1 d 应用 1 次 GnRH-a 0.1 mg(A 组:79 例);人工周期囊胚移植后 1 d 应用 1 次 GnRH-a 0.1 mg(B 组:228 例);自然周期囊胚移植后 1 d 不用 GnRH-a 0.1 mg(C 组:84 例);人工周期囊胚移植后 1 d 不用 GnRH-a 0.1 mg(D 组:266 例)。

1.2 IVF-ET 过程

超排卵方案、卵泡的监测、取卵、授精和移植均采用本中心常规方法,以促性腺激素释放激素

表 1 患者基本情况比较
Table 1 Comparison of the general conditions among 4 groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	A	B	C	D	F	P
n	79	228	84	266		
Age /years	31.7 ± 2.8	31.5 ± 3.2	31.7 ± 2.6	31.8 ± 3.6	0.25	0.91
Basal FSH/(U/L)	6.5 ± 1.7	6.7 ± 2.1	6.3 ± 2.6	6.8 ± 2.3	0.88	0.48
BMI/(kg/m ²)	21.6 ± 2.9	21.5 ± 2.8	21.7 ± 2.6	22.1 ± 2.7	0.37	0.83
Endometrium Thickness/mm	9.5 ± 0.2	9.4 ± 0.4	9.6 ± 0.3	9.5 ± 0.4	0.74	0.53
No. Of Transferred Embryos	1.7 ± 0.5	1.7 ± 0.5	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.5	0.43	0.72

激动剂(GnRHa)长方案为例^[7];B超监测卵泡发育,在月经周期黄体期肌内注射长效 GnRHa(醋酸曲普瑞林,法国益普生生物制药公司)1.3 mg 1 次,使垂体降调节,下次月经周期第 3 ~ 5 天根据患者的具体情况开始给予 75 ~ 225 U/d 重组人促卵泡激素(rhFSH,Gonal-F,瑞士雪兰诺公司)的启动剂量,肌内注射,随后根据卵泡生长调整每天用量。当超声监测有 2 个以上优势卵泡直径 ≥ 18 mm 时给予人绒毛膜促性腺激素(HCG,丽珠制药厂)10 000 U 肌内注射或重组人绒毛膜促性腺激素(瑞士雪兰诺公司)250 μ g 皮下注射,36 ~ 40 h 后超声引导下卵泡穿刺取卵。精液洗涤采用常规梯度离心法,体外受精、卵胞浆内单精子注射(ICSI)后,胚胎培养至 D5 或 D6 行囊胚冷冻。囊胚质量评分采用辅助生殖技术指南的评分标准^[8]。冷冻移植周期分为自然周期和人工周期,自然周期在月经第 10 天开始 B 超监测卵泡发育,根据卵泡发育情况随访 B 超,适时结合性激素变化判断排卵日,并于排卵日给予相应黄体支持,用药剂量及途径根据患者情况决定,排卵后 5 d 行囊胚移植;人工周期在月经第 3 天开始补佳乐口服,根据患者子宫内膜具体情况调整用药,孕酮用药剂量及途径根据患者情况决定,加用孕酮第 5 天行囊胚移植。每周期移植至少有 1 枚优质胚胎,且移植囊胚总

数 ≤ 2 个。临床妊娠为孕 7 周胎心搏动阳性。

1.3 内分泌激素测定

在启动日采血进行 FSH、LH、E2 测定,HCG 注射日进行 FSH、LH、E2 和 P 的测定,采用化学发光法检测。

1.4 统计学分析

以均数 $\pm$ 标准差为统计数值,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,采用方差分析统计分析患者基本信息的计量数据,采用卡方检验统计分析实验组与对照组之间率的差异。设 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者基本情况比较

患者年龄、体质量指数(BMI)、基础 FSH、内膜厚度以及移植囊胚数量均无统计学差异,4 组之间均无统计学差异($P > 0.05$;表 1)。

2.2 妊娠结局比较

4 组的临床妊娠率分别为 72.15%、66.23%、59.52% 及 62.78%,自然周期囊胚移植后 1d 应用 1 次 GnRH-a 0.1 mg(A 组)妊娠率明显高于不用 GnRH-a(C 组),并有统计学差异,人工周期囊胚移植后 1d 用和不用 GnRH-a 0.1 mg 对妊娠(B 组

表 2 4 组妊娠率比较
Table 2 Comparison of pregnancy rate between 2 groups

Group	GnRH-a	No GnRH-a	P
NC/%	72.15(57/79)	59.52(50/84)	0.047
HRT/%	66.23(151/228)	62.78(167/266)	0.45

vs D组)结局并没有影响(表2)。

3 讨论

GnRHa是促性腺激素释放激素(GnRH)的类似物,为十肽化合物。与GnRH相比,其6位和10位都进行了修饰,由其他氨基酸、酰胺替代,从而获得更高的受体结合力以及更强的抗蛋白水解性。因此,与GnRH相比,GnRHa具有更长的半衰期,同时更易与GnRH受体结合。当GnRHa与垂体GnRH受体结合后,首先是引起Gn的大量分泌,即flare-up效应。在近数年的研究中,GnRHa也成为黄体支持的另外一种选择,并且使用方法有多种,使用时间(ICSI后6d、移植后6d)、频率(1、2次及多次)、使用剂量(0.1、0.2 mg)等等,并且使用的有效性也存在争议。2011年meta分析^[6]显示,黄体支持加用GnRH-a可使IVF-ET活产率增加16%,数据使医学学者振奋,大量的研究发现,GnRH-a可使IVF-ET妊娠率和活产率增加的原因可能有:①直接作用于子宫内膜,使得子宫内膜容受性增加,Casan等研究^[9]提示GnRH mRNA和蛋白在人整个月经期子宫内膜均有表达,并且分泌期比月经期明显增高,分泌中期又高于分泌早期。②直接作用于胚胎,利于胚胎发育,Yang等^[10]将分裂至两细胞的鼠胚胎分组,培养液中加入不同浓度的GnRH-a,发现添加GnRH-a组随着添加浓度的升高其达到孵化囊胚的胚胎数目明显升高。③调节胚胎滋养层HCG的分泌,促进胚胎发育的同时,HCG作用又于黄体,达到黄体支持作用。GnRH可明显增加滋养层细胞分泌来普汀(Leptin),来普汀可明显增加滋养层细胞分泌HCG,采用胎盘移植培养系统,以不同浓度的GnRH刺激胎盘细胞,检测分泌到培养液中HCG的量,发现在一定浓度范围内,随着GnRH刺激浓度的升高,细胞分泌的HCG量亦随着升高^[11]。④GnRH-a有免疫调节的作用,Wong等^[12]将从正常妇女及患子宫内膜异位症妇女的子宫内膜中分离的NK细胞进行培养,并分组,在其中一组中加入GnRH-a,后检测NK细胞活性,发现GnRH-a可以明显降低NK细胞的细胞毒性。⑤直接作用于

垂体,引起Gn的大量分泌,LH作用于黄体,更重要的是,GnRH-a给药期间所释放的LH可能具有外源性hCG无法提供的生物学效应,GnRH-a使得LH分泌,不仅仅可以刺激黄体产生雌激素和孕激素,也会刺激黄体产生松弛素^[13],LH本身也可刺激子宫内膜分泌相关辅助胚胎种植细胞因子^[14]。

目前一些RCT研究证实,移植第3天胚胎后3d使用1次GnRH-a 0.1 mg和移植第3天胚胎后3、6d各使用1次GnRH-a 0.1 mg,均可以增加IVF-ET的种植率,但使用1和2次的妊娠结局相似,因此本研究为节约治疗成本及时间,选择单次治疗方案,这与Tesarik等^[5]的研究方案类似,即自然周期排卵后6d,人工周期加用黄体酮第6天。因IVF-ET的妊娠率受多方面因素影响,尤其是患者本身的助孕基本情况,因此本研究选择了移植失败周期 ≤ 2 次,月经周期规律,年龄在22岁至40岁之间,基础FSH水平小于10 U/mL,移植至少一个优质囊胚,且移植囊胚总数 ≤ 2 个,尽量控制影响统计数据的干扰因素。2008和2012年各有一项RCT研究显示,用GnRH-a作为黄体支持在长方案中并没有显示有效性,原因可能为长方案对于垂体、下丘脑GnRH-a受体的降调作用引起。本研究也有相似的结论,即自然周期有黄体存在,GnRH-a可刺激LH分泌以加强黄体功能,而HRT周期并无黄体存在,GnRH-a虽对小丘脑、垂体有刺激,但缺乏黄体的终端反应,H-P-O轴(下丘脑-垂体-卵巢轴)不能发挥相应作用。

综上,本研究数据表明,GnRH激动剂在冷冻周期移植中有相应的适应证,自然周期移植的患者可能更加适合被选择为适用人群,临床医生应掌握适应证和适用人群。酌情考虑在自然周期冷冻胚胎移植周期中使用GnRH-a,以提高IVF-ET的助孕成功率。

参考文献

- [1] BOURGAIN C, DEVROEY P, VAN WAESBERGHE L, et al. Effects of natural progesterone on the morphology of the endometrium in patients with primary ovarian failure[J]. Hum Reprod, 1990, 5(1): 537-543.

- [2] PORTER RN, SMITH W, CRAFT IL, et al. Induction of ovulation for in vitro fertilization using buserelin and gonadotropins[J]. *Lancet*, 1984, 2(1): 1284-1285.
- [3] FATEMI HM. The luteal phase after 3 decades of IVF: what do we know? [J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19(4): 4331-4337.
- [4] 孙赞, 刘平, 叶虹, 等. 黄体支持与孕激素补充共识 [J]. *生殖与避孕*, 2015, 35(1): 1-8.
SUN Y, LIU P, YE H, et al. Consensus of luteal support and progesterone supplementary [J]. *Reprod Contracep*, 2015, 35(1): 1-8.
- [5] TESARIK J, HAZOUT A, MENDOZA C. Enhancement of embryo developmental potential by a single administration of GnRH agonist at the time of implantation [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(4): 1176-1180.
- [6] KYROU D, KOLIBIANAKIS EM, FATEMI HM, et al. Increased live birth rates with GnRH agonist addition for luteal support in ICSI/IVF cycles: a systematic review and meta-analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2011, 17(6): 734-740.
- [7] 梁晓燕, 马文红, 杨刚. 控制的卵巢刺激中 HCG 注射后雌二醇浓度下降对妊娠结局的影响分析[J]. *中山大学学报*, 2010, 31(4): 530-534.
LIANG XY, MA WH, YANG G. Analysis of a decreased Serum estradiol level after human chorionic gonadotropin administration during controlled ovarian hyperstimulation [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2010, 31(4): 530-534.
- [8] 中华医学会, 临床诊疗指南-辅助生殖技术与精子库分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 157-159.
Chinese Medical Association, Clinical Guidelines, booklet of assisted reproductive technology and sperm bank [M]. Beijing: People's Medical Publishing House. 2009: 157-159.
- [9] CASAN EM, RAGA F, BONILLA-MUSOLES F, et al. Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(4): 1377-1381.
- [10] YANG BC, UEMURA T, MINAGUCHI H. Effects of a gonadotropin releasing hormone agonist on oocyte maturation, fertilization, and embryonal development of mice [J]. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12(10): 728-732.
- [11] SLAMI D, BISCHOF P, CHARDONNENS D. Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG) [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 110(2): 169-175.
- [12] WONG KH, SIMON JA. In vitro effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on natural killer cell cytotoxicity in women with and without endometriosis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(1): 44-49.
- [13] LOUMAYE E, DEPREESTER S, DONNEZ J, et al. Immunoreactive relaxin surge in the peritoneal fluid of women during the mid-luteal phase [J]. *Fertil Steril*, 1984, 43(1): 856-860.
- [14] LICHT P, RUSSU V, WILDT L. On the role of human chorionic gonadotropin (HCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation [J]. *Semin Reprod Med*, 2001, 19(1): 37-47.

(编辑 徐杰)