

· 临床医学 ·

探讨拮抗剂方案中卵泡期低水平促黄体生成素对累计活产率的影响

姜 薇, 季 慧, 谢奇君, 陈梦茜, 张军强, 凌秀凤*

南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)生殖医学中心, 江苏 南京 210004

[摘要] 目的:探讨拮抗剂方案促排卵过程中低水平促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)对累计活产率(cumulative live birth rate, CLBR)的影响。方法:回顾性分析本中心693例采用拮抗剂方案且首次行体外受精-胚胎移植患者的取卵周期资料,将卵泡期最低LH水平 ≤ 0.8 U/L设为A组,卵泡期最低LH水平 > 0.8 U/L设为B组,分析比较两组的一般临床资料、实验室指标和妊娠结局。结果:A组的基础促卵泡生成素(folliclestimulating hormone, FSH)水平、基础LH水平、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)日LH水平显著低于B组($P < 0.05$)。A组的促性腺激素(gonadotropin, Gn)使用天数、HCG日雌二醇(estradiol, E_2)水平、HCG日孕酮(progesterone, P)水平、获卵数、可移植胚胎数明显高于B组($P < 0.05$)。但两组的CLBR均无统计学差异($P > 0.05$)。LH水平 ≤ 0.8 U/L频次的增加对CLBR无明显影响($P > 0.05$)。应用多因素Logistic回归分析,调整混杂因素后,显示卵泡期最低LH水平对CLBR无明显影响,而获卵数是CLBR的独立预测因子。结论:卵泡期低水平LH可以预测更多的获卵数,但对CLBR无明显影响。

[关键词] 促黄体生成素;拮抗剂方案;体外受精-胚胎移植;累计活产率

[中图分类号] R711.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)02-211-05

doi:10.7655/NYDXBNS20220211

促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)在卵泡发育过程中发挥重要作用,过低的LH水平会降低血清甾体激素水平并影响卵泡质量^[1],而过高的LH水平会促使卵泡提前黄素化^[2]。控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)是体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)的关键步骤,垂体抑制又是其中重要的一环。不同于促性腺激素释放激素激动剂(gonadotropin releasing hormone agonist, GnRH-a),促性腺激素释放激素拮抗剂(gonadotropin releasing hormone antagonist, GnRH-ant)可以迅速、可逆地抑制LH水平,并且显著减少所需的促性腺激素剂量及治疗时间^[3]。因此,探究拮抗剂方案控制性促排卵过程中的LH水平对妊娠结局的影响具有重要意义。

随着胚胎冷冻保存技术的改进,冷冻胚胎移植已经在IVF-ET中得到越来越多的应用。但目前大

部分的研究主要围绕鲜胚移植周期探讨妊娠结局,未能包含冷冻胚胎移植结局,因此有人提出了累计活产率(cumulative live birth rate, CLBR)的概念。CLBR以时间轴为基础,纵向观察多个治疗周期的妊娠结局。对临床工作者来说,CLBR不但可以评估多个治疗周期的成功率,也可以更客观地比较各个中心的治疗情况。而对患者来说,CLBR的高低可以帮助其决定是否继续利用剩余冷冻胚胎或再次行IVF治疗^[4]。

目前有许多研究评估了拮抗剂方案中的LH水平与临床妊娠率、早期流产率、活产率的相关性,但尚未发现关于拮抗剂方案中LH水平与CLBR关系的研究。本文通过比较拮抗剂方案中卵泡期不同的LH水平对CLBR结局的影响,探究合适的卵泡期LH水平。

1 对象和方法

1.1 对象

回顾性分析了2017年1月—2017年12月,在本中心采用拮抗剂方案行IVF-ET/单精子卵胞浆内注射(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)治疗的患

[基金项目] 江苏省卫计委指导性课题(LGY2018004);南京市医学重点科技发展项目(ZKX16063)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lingxiufeng_njfy@163.com

者。患者纳入标准包括:首次行IVF-ET/ICSI治疗;非供卵供精、未进行种植前遗传学诊断或筛查;患者年龄 ≤ 40 岁;促卵泡生成激素(follicle stimulating-hormone, FSH) ≤ 12 U/L。患者排除标准包括:合并有影响胚胎着床的其他疾病,如子宫内膜病变、输卵管积水、宫腔粘连、子宫畸形等;夫妇任意一方染色体异常;多囊卵巢综合征或低促性腺激素性腺功能减退;添加外源性LH;获卵周期未获得胚胎,如促排卵失败、取卵失败、受精失败、治疗中断等;至2019年12月31日仍有剩余胚胎且无活产、未移植胚胎、失访及未至预产期。共纳入患者693例。

1.2 方法

1.2.1 COH方案

所有患者均采用灵活拮抗剂方案,在月经周期第3天起用促性腺激素(gonadotropin, Gn, 果纳芬, 默克雪兰诺, 意大利)促排,起始剂量150~300 U/d不等,当达到以下3项条件之一时添加拮抗剂(思则凯, 默克雪兰诺, 法国)0.125~0.250 mg/d直至扳机日:至少1个卵泡直径 ≥ 14 mm;雌二醇(estradiol, E_2)水平 $> 2\ 202$ pmol/L;LH水平 > 10 U/L。密切监测卵泡发育情况和血清激素水平,及时调整用药。当至少2枚卵泡直径 ≥ 18 mm或至少有3枚卵泡直径 ≥ 17 mm时注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG, 珠海丽珠)1 000 U诱发排卵, HCG日后34~36 h在阴道超声监测下取卵。受精方式根据不孕原因、精液检查结果等选择常规IVF或ICSI。

1.2.2 胚胎移植与妊娠判断

取卵后根据患者具体情况决定是否行囊胚培养,移植1~2枚第3天或第5天胚胎,剩余胚胎行冷冻处理。若患者出现卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)等不适宜胚胎移植的情况时行全胚冷冻。有冷冻胚胎者择期采用自然周期或人工周期进行解冻胚胎后移植。胚胎移植后28 d行B超检查见妊娠囊确定临床妊娠,临床妊娠者继续行黄体支持至第10周,并定期随访。活产定义为妊娠满28周后,分娩至少1个存活新生儿。

1.2.3 LH测定

在月经周期第2天测定基础LH水平,月经周期第3天开始卵泡刺激,4 d后再次测定LH水平,随后1~2 d测量1次LH水平直至HCG日。

1.2.4 分组

既往有文献报道卵泡期最低LH水平 > 0.8 U/L时,临床结局较好^[5]。因此本研究将卵泡期LH水平

分为 ≤ 0.8 U/L(A组)及 > 0.8 U/L组(B组),只要出现卵泡期LH水平 ≤ 0.8 U/L即为A组,整个卵泡期LH水平均 > 0.8 U/L为B组。

1.2.5 观察指标

首要的观察指标是CLBR, CLBR纵向分析了多个周期的治疗结果,根据观察时间的长短,推荐应用的CLBR计算方法有所不同。本文观察时间为2年,采用了短期CLBR算法。定义为:刺激周期获得活产的患者数/进入刺激周期的患者数 $\times 100\%$ 。此外本研究只纳入了首次行IVF-ET的患者。

次要观察指标包括年龄、不孕年限、体重指数(body mass index, BMI)、基础血清FSH水平、基础血清 E_2 水平、基础血清LH水平、Gn总剂量、Gn使用天数、拮抗剂使用天数、HCG日 E_2 水平、HCG日LH水平、HCG日孕酮(progestosterone, P)水平、HCG日子宫内膜厚度、获卵数、正常受精率、可移植胚胎数、优质胚胎率(优质胚胎:取卵后第3天卵裂球 ≥ 6 细胞,碎片数量 $\leq 20\%$,大小比较均匀;取卵后第5天胚胎评分 ≥ 3 BB)、囊胚形成率。

1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0统计软件进行分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验比较;计数资料用率表示,采用 χ^2 检验。应用多因素逻辑回归,纳入可能影响CLBR的因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

收集2017年1月—2017年12月符合本研究纳入标准的共计693个取卵周期,根据卵泡期LH水平分组, ≤ 0.8 U/L(A组)126例, > 0.8 U/L组(B组)567例。

2.1 两组一般资料及妊娠结局的比较

A组的基础FSH水平、基础LH水平、HCG日LH水平明显降低,同时Gn使用天数、HCG日 E_2 水平、HCG日P水平明显增高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$,表1)。两组患者的年龄、不孕年限、基础 E_2 水平、BMI、Gn总剂量、拮抗剂使用天数、HCG日子宫内膜厚度均无统计学差异($P > 0.05$,表1)。A组的获卵数、可移植胚胎数明显高于B组($P < 0.05$,表2),但两组的正常受精率、优质胚胎率、囊胚形成率和CLBR均无明显差异($P > 0.05$,表2)。

2.2 促排过程中低LH水平的频次对CLBR的影响

根据A组出现LH水平 ≤ 0.8 U/L的频次,将A组分为3个亚组,分别为只出现1次LH水平 ≤ 0.8 U/L,出现2次LH水平 ≤ 0.8 U/L以及出现3次及以上LH水平 ≤ 0.8 U/L。结果表明,LH水平 ≤ 0.8 U/L的频次

表1 两组的一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	A组(n=126)	B组(n=567)	P值
年龄(岁)	28.63 ± 3.86	29.07 ± 3.58	0.222
不孕年限(年)	2.99 ± 2.02	3.08 ± 2.23	0.690
BMI(kg/m ²)	21.95 ± 3.31	22.25 ± 3.46	0.374
基础FSH(U/L)	6.96 ± 1.68	7.76 ± 2.21	<0.001
基础E ₂ (pmol/L)	39.57 ± 21.58	42.12 ± 22.52	0.247
基础LH(U/L)	3.95 ± 1.75	4.59 ± 2.10	0.002
Gn总剂量(U)	2 089.84 ± 439.68	2 133.10 ± 419.81	0.300
Gn使用天数(d)	9.87 ± 0.95	9.54 ± 1.09	0.001
拮抗剂使用天数(d)	4.48 ± 1.32	4.33 ± 1.15	0.216
HCG日E ₂ (pmol/L)	5 987.70 ± 3 256.31	4 673.68 ± 2 742.36	<0.001
HCG日LH(U/L)	1.02 ± 0.97	2.56 ± 2.05	<0.001
HCG日P(nmol/L)	2.00 ± 1.07	1.62 ± 0.74	<0.001
HCG日子宫内膜厚度(mm)	10.33 ± 2.38	10.31 ± 2.22	0.959

表2 两组的实验室指标及妊娠结局比较 [($\bar{x} \pm s$),%(n/N)]

指标	A组(n=126)	B组(n=567)	t/χ ² 值	P值
获卵数(枚)	12.88 ± 5.25	10.02 ± 5.14	5.627	<0.001
IVF正常受精率[n/N(%)]	944/1 215(77.7)	3 267/4 142(78.9)	0.777	0.378
ICSI正常受精率[n/N(%)]	284/366(77.6)	953/1 233(77.3)	0.015	0.903
可移植胚胎数(枚)	8.56 ± 5.43	6.79 ± 4.73	3.714	<0.001
优质胚胎率[n/N(%)]	756/1 240(61)	2 659/4 337(61.3)	0.047	0.827
囊胚形成率[n/N(%)]	557/1 060(52.5)	1 746/3 410(51.2)	0.586	0.444
累计活产率[n/N(%)]	93/126(73.8)	390/567(68.8)	1.233	0.267

对活产率无明显影响($P > 0.05$,表3)。

2.3 CLBR的多因素Logistic回归

应用多因素Logistic回归分析可能影响CLBR的因素,调整了年龄、BMI、不孕年限、基础FSH水平、Gn使用天数、拮抗剂使用天数、卵泡期最低LH水平后,发现获卵数是CLBR的独立预测因子,此外不孕年限 ≥ 6 年时获得活产的概率明显小于不孕年限 ≤ 2 年的患者,而卵泡期最低LH水平不影响CLBR(表4)。

3 讨论

足量的LH对促进卵泡发育至关重要。在卵泡发育早期,LH通过刺激雄激素合成,协同促进E₂合

成;在卵泡发育中晚期,LH刺激颗粒细胞增殖,诱导卵母细胞的最终成熟并诱发排卵。LH也可以通过抗凋亡机制改善卵子质量^[6]。此外,研究发现子宫内膜腺细胞膜上存在大量LH/HCG受体,并调节促性腺激素对细胞内功能的影响,提示LH可能影响子宫内膜容受性,参与胚胎植入过程^[7]。LH水平过低,可能造成E₂合成不足、卵泡生长受损、卵子质量下降以及子宫内膜容受性被破坏。但由于促排方案、患者个体差异等原因,LH的具体阈值尚无统一结论。

Ramachandran等^[8]的研究表明刺激第1天、第5天和HCG日LH水平的变化不影响最终的妊娠结局。季慧等^[9]研究认为Gn使用第8天LH水平、扳机日LH水平以及扳机后24hLH水平的高低对妊娠结局无明显影响,但低水平LH组的获卵数明显增高。此外,AN-CONG等分析了多种因素对IVF结局的影响,结果表明HCG日LH水平与临床妊娠结局无明显相关性^[10]。这些研究结果与本文研究结果一致,提示低LH水平对妊娠结局无明显影响。但这些研究只关注了某几个特定时间点的LH水平,

表3 促排过程中低LH水平的频次与累计活产的关系

LH ≤ 0.8 U/L的频次	活产(例)	未活产(例)
0	390	177
1	68	24
2	20	6
≥ 3	5	3

$\chi^2=1.838, P=0.607$ 。

表4 关于CLBR的多因素Logistic回归分析结果

因素	β 值	P 值	OR(95%CI)
年龄(岁)		0.883	
≤30	—	—	1
31~34	-0.049	0.827	0.952(0.610~1.484)
≥35	0.133	0.697	1.142(0.584~2.233)
不孕年限(年)		0.103	
≤2	—	—	1
3~5	-0.203	0.319	0.816(0.548~1.216)
≥6	-0.613	0.036	0.542(0.305~0.961)
体重指数(kg/m ²)		0.166	
<24	—	—	1
24≤BMI<28	0.043	0.876	1.044(0.606~1.798)
≥28	-1.046	0.062	0.351(0.117~1.055)
基础FSH(U/L)	-0.097	0.060	0.907(0.820~1.004)
Gn使用天数(d)	0.077	0.443	1.080(0.887~1.315)
拮抗剂使用天数(d)	0.106	0.256	1.112(0.926~1.336)
卵泡期最低LH水平	0.270	0.289	1.310(0.795~2.157)
获卵数(枚)		<0.001	
≤5	—	—	1
6~10	1.268	<0.001	3.553(2.114~5.972)
11~15	1.881	<0.001	6.559(3.653~11.780)
16~20	2.899	<0.001	18.155(6.790~48.546)
≥21	3.441	0.001	31.224(3.841~253.829)

未考虑整个卵泡期低水平LH对妊娠结局的影响。

本研究将卵泡期LH水平分为两组,LH水平最低值≤0.8 U/L组及LH水平均>0.8 U/L组,结果显示两组的CLBR均无明显差异,并且LH水平≤0.8 U/L的频次对CLBR无明显影响。Chen等^[5]研究认为认为卵泡期LH水平≤0.8 U/L会影响卵泡质量或子宫内膜容受性,从而造成早期流产率升高,并且发现卵泡期LH水平≤0.8 U/L的次数越多,早期流产率越高。而本研究结果表明,低LH水平可能对卵子受精能力、胚胎活力无明显影响。LH只需占据不到1%的LH受体就可以合成足量的类固醇激素,因此可能非常低的LH水平就足以满足卵泡的正常生长发育^[11]。此外Chen等^[5]只关注了鲜胚移植的结果,本研究的主要指标是CLBR且大部分病例都进行了全胚冷冻,因此低LH是否会影响子宫内膜容受性仍有待进一步研究。

值得关注的一点是,在本研究中低水平LH组的基础FSH、基础LH明显低于对照组,而获卵数明显增高($P<0.05$)。垂体分泌LH主要受E₂和促性腺激素平抑因子(gonadotropin surge-attenuating factor, GnSAF)的影响^[12]。正常卵泡发育过程中,E₂提高了

垂体对促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的敏感性,而GnSAF可以抑制LH分泌,保证卵泡发育早中期的低LH状态,避免早发LH峰的发生^[13]。本研究中低水平LH组基础FSH、基础LH明显降低,考虑低水平LH组的卵巢储备功能可能较好。募集的卵泡数量增加刺激卵泡分泌更多的GnSAF,GnSAF对LH的抑制作用超过了血清E₂对LH的促进作用,从而造成卵泡期LH水平降低。因此本研究中LH水平较低可能归因于募集卵泡增多的负反馈作用。

目前有很多研究探讨了CLBR与获卵数的关系。Toftager等^[14]研究表明,当获卵数>15枚时,CLBR明显增高。Malchau等^[15]的研究结果显示,获卵数为15~16枚时CLBR到达平台期,而获卵数进一步增加时,CLBR的变化趋势无法判断。Hu等^[16]的研究对年龄进行了分层,表明在高龄患者中CLBR随着获卵数的增高而增高,但在年龄≤35岁的患者中,获卵数为16~20枚时CLBR最高。本文关于CLBR的Logistic回归分析结果也提示了获卵数是CLBR的独立影响因子。然而在本研究中低水平的LH可以预测更多的获卵数却不影响CLBR,这可能是因为大部分患者获得活产时未消耗完所有胚胎,且获卵数与CLBR并不是呈直线相关。

本研究的局限性在于回顾性研究,样本量较小。并且由于条件限制本研究未能在卵泡期每天测量LH水平。尚需要大样本、多中心的前瞻性临床研究进一步探讨卵泡期合适的LH水平。此外,本研究中LH水平≤0.8 U/L多集中在拮抗剂使用后至扳机日之前,不同时间点LH水平≤0.8 U/L是否会对妊娠结局有影响仍需进一步研究。

本研究表明在拮抗剂方案促排过程中低水平的LH可以预测更多的获卵数,但不影响患者的正常受精率、优质胚胎率和累计活产率。尽管LH水平不影响最终的妊娠结局,但在拮抗剂方案超促排过程中仍需密切监测LH水平,避免早发性LH峰的发生,以期得到满意的获卵数。然而本研究的结果仅适用于一般人群,在特殊人群中低水平的LH是否会影响妊娠结局仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] HOSEIN RASHIDI B, KABODMEHRI R, SHARIAT M, et al. Luteinizing hormone changes in gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in in vitro fertilization cycles: a cross-sectional study [J]. Int J Reprod Biomed(Yazd), 2019, 17(3)209-216

- [2] ZHANG D, ZHANG D, SUN Z, et al. The effect of a transient premature luteinizing hormone surge without elevated serum progesterone on *in vitro* fertilization outcomes in a gonadotropin-releasing hormone antagonist flexible protocol[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(6): 550-553
- [3] 董 丽,张娟娟,李 欣,等. 添加拮抗剂后 E₂变化对 IVF-ET 妊娠结局的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(11): 1672-1675
- [4] MCLERNON D J, MAHESHWARI A, LEE A J, et al. Cumulative live birth rates after one or more complete cycles of IVF: a population-based study of linked cycle data from 178, 898 women [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(3): 572-581
- [5] CHEN C D, CHIANG Y T, YANG P K, et al. Frequency of low serum LH is associated with increased early pregnancy loss in IVF/ICSI cycles [J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 33(4): 449-457
- [6] CASARINI L, RICCETTI L, DE PASCALI F, et al. Estrogen modulates specific life and death signals induced by LH and hCG in human primary granulosa cells *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 926
- [7] SACCHI S, SENA P, DEGLI ESPOSTI C, et al. Evidence for expression and functionality of FSH and LH/hCG receptors in human endometrium [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(9): 1703-1712
- [8] RAMACHANDRAN A, JAMDADE K, KUMAR P, et al. Is there a need for luteinizing hormone (LH) estimation in patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH)? [J]. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8(1): 90-92
- [9] 季 慧,陈梦茜,赵 纯,等. 拮抗剂方案促排卵过程中促黄体生成素水平对体外受精妊娠结局的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(10): 972-977
- [10] WANG A C, WANG Y, WU F X, et al. Assessing predictors for the success of GnRH antagonist protocol in reproductive women in IVF/ICSI - in fresh cycles [J]. *Biomed Rep*, 2017, 7(5): 482-486
- [11] CHAPPEL S C, HOWLES C. Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process [J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(9): 1206-1212
- [12] VANETIK S, BECK-FRUCHTER R, SEGAL L, et al. The importance of mid-follicular phase luteinizing hormone rise in GnRH antagonist-based ovarian stimulation for IVF [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2020, 85(2): 184-188
- [13] 代红梅,谢铁男. 促性腺激素平抑因子(GnSAF)生理功能的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2012, 21(12): 984-985
- [14] TOFTAGER M, BOGSTAD J, LOSSL K, et al. Cumulative live birth rates after one ART cycle including all subsequent frozen-thaw cycles in 1050 women: secondary outcome of an RCT comparing GnRH-antagonist and GnRH-agonist protocols [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(3): 556-567
- [15] MALCHAU S S, HENNINGSEN A A, FORMAN J, et al. Cumulative live birth rate prognosis based on the number of aspirated oocytes in previous ART cycles [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(1): 171-180
- [16] HU K L, LIU F T, XU H, et al. Association of serum anti-Mullerian hormone and other factors with cumulative live birth rate following IVF [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40(5): 675-683
- [收稿日期] 2021-09-30
(本文编辑:唐 震)

(上接第 193 页)

- by tumor cells [J]. *Adv Experimental Med Biol*, 2011, 714: 141
- [13] SUGEMURA K, MIYATA H, TANAKA K, et al. High infiltration of tumor associated macrophages is associated with a poor response to chemotherapy and poor prognosis of patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2015, 111(6): 752-759
- [14] DUN E C, HANLEY K, WIESER F, et al. Infiltration of tumor-associated macrophages is increased in the epithelial and stromal compartments of endometrial carcinomas [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2013, 32(6): 576-584
- [15] LIN C N, WANG C J, CHAO Y J, et al. The significance of the coexistence of osteopontin and tumor-associated macrophages in gastric cancer progression [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 128
- [16] KELLY M G, FRANCISCO A M, CIMIC A, et al. Type 2 Endometrial cancer is associated with a high density of tumor associated macrophages in the stromal compartment [J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(8): 948-953
- [收稿日期] 2021-11-23
(本文编辑:唐 震)