9. Shawkea DE-T1在不同IVF治疗周期中对囊胚到达率的影响：基于一项队列研究的二次分析

作者：邵辉[1、2] 野崎利晃[1] 山口庸仁[3] 白莉[1] 董曦[3] 焦爽[4] 大月纯子[2] 苔口昭次[2] 盐谷雅英[2]

作者单位：

1、株式会社德润

2、日本英医院

3、复旦大学中山医院

4、中国中医科学院

【摘要】

目的：探讨Shawkea DE-T1的适宜服用周期，为不同女性有针对性地Shawkea DE-T1疗程优化提供依据。

方法：基于前期回顾性队列研究，纳入在英医院接受IVF治疗且年龄≥30岁的患者1014例，按照是否服用Shawkea DE-T1分为服用组（712例）与对照组（302例）。两组患者均实行日本生殖辅助医疗标准化（JISART）干预。在其基础上，服用组按照英医院营养补充支持中心建议服用Shawkea DE-T1。分别比较不同治疗周期（1～3个月、4～6个月、>6个月）的两组患者的囊胚到达率（获得至少1颗囊胚的患者数占该组患者总数的百分比）。并按照年龄分层（≥30岁且＜35岁、≥35岁且＜40岁、≥40岁且＜43岁、≥43岁）对所有实现囊胚到达的患者实际服用周期进行统计分析。

结果：①服用组1～3个月时，服用组囊胚到达率为83.27%，显著高于对照组的55.31%，差异有统计学意义（$P=1.02\times10^{-10}$）；服用4～6个月时，服用组囊胚到达率为69.44%，显著高于对照组的44.44%，差异有统计学意义（$P=4.70\times10^{-4}$）；服用＞6个月时，服用组囊胚到达率为73.35%，与对照组的72.46比较%，差异无统计学意义（P=0.76）。②对获得囊胚的各年龄层患者服用疗程进行分析可见，随着年龄增长，患者服用疗程呈现增长趋势：对于≥30岁且＜35岁女性来说，65.25%可在服用1～3个月内即成功获得囊胚，实现囊胚达成，需要服用＞6个月的仅为9.93%；而对于≥43岁的女性来说，仅有19.75%可在服用1～3个月内即成功获得囊胚。

结论：ShawkeaDE-T1服用1~3个月、3~6个月可显著提升女性IVF治疗中囊胚获得率，高龄女性应适当延长服用周期，以实现更佳疗效。

【关键词】

Shawkea DE-T1；囊胚获得；囊胚到达率；囊胚生成率；活产率；AMH；队列研究；疗程

众所周知，女性的生育能力随着年龄的增长而下降。现代社会女性结婚与生育年龄不断推迟，造成女性生育高龄化加剧，带来了不孕女性人口的增加，其中的难治性不孕也逐渐增多。生殖辅助医疗的目的是采集大量的成熟卵，促性腺激素制剂等是其常规用药。但许多高龄不孕或卵巢功能低下女性因为卵巢低反应(poor ovarian response, POR)即使使用促性腺激素制剂等进行促排卵治疗，仍无法在促排卵治疗中采集到优质卵子，更无法培养成囊胚或成功生育。因此，在体外受精与胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)治疗中，能否成功取到卵子并培育成胚胎，尤其是囊胚，对于成功妊娠具有重要意义。

蒲公英是在日本、中国具有悠久历史且被广泛使用的一味中药。蒲公英多糖（氨基糖链复合物）是近年研究的热点，多项研究发现，蒲公英多糖具有抗氧化、抗自由基、保护肝脏、降血糖、促进生长因子分泌、抗肿瘤等多重功效[1-4]。Shawkea DE-T1的主要原料为蒲公英，其主要成分为一类特殊的氨基多糖复合物。前期研究显示，Shawkea DE-T1可以调节脑下垂体-卵巢生殖轴、调节女性激素分泌，体外研究证实其可以促进颗粒细胞生长并抑制颗粒细胞的凋亡[5-6]。Shawkea DE-T1由株式会社德潤委托中国德州德润生物科技有限公司按照株式会社德潤技术要求与标准生产，经高压高温灭菌形成密封铝箔袋灌装。Shawkea DE-T1在日本辅助生殖领域应用了23年，并获得株式会社德潤授权在中国销售了9年。

在前期研究[7]中，我们采用队列研究方法观察Shawkea DE-T1与促排卵药物联合对女性IVF-ET治疗中囊胚获得与活产的影响，发现服用Shawkea DE-T1女性在IVF治疗中的囊胚到达

率为75.98%（541/712），显著高于未服用者的57.28%（173/302）（P=2.4×10^{-9}，OR=2.36），且不同年龄段（≥30岁且＜35岁、≥35岁且＜40岁、≥40岁且＜43岁、≥43岁）及不同AMH值（AMH≤1.1、AMH＞1.1）服用组囊胚到达率均显著高于对照组（P<0.05）；对于接受ET的患者，服用组活产率为57.53%（107/186），对照组活产率为40.00%（18/45）（P<0.05，OR=1.32），为指导Shawkea DE-T1的临床应用提供了循证医学证据。同时，我们在前期研究中也观察到IVF治疗女性能够获得满意疗效，如获得囊胚或活产所需的治疗周期差异很大，且年龄是其中重要的影响因素[8]。为优化Shawkea DE-T1的应用方案，我们探讨Shawkea DE-T1在不同IVF治疗周期中对囊胚到达率的影响，并对服用Shawkea DE-T1且在IVF治疗中成功获得囊胚的女性的Shawkea DE-T1服用实际情况进行总结与分析，以期寻找不同年龄接受IVF治疗女性获得满意疗效时服用Shawkea DE-T1的最佳疗程，为Shawkea DE-T1的疗程优化使用提供依据。本研究经过日本英医院伦理委员会审查。

1. 研究对象

1.1 纳入标准

2012年8月1日至2020年2月29日期间，所有由中国赴日本英医院接受IVF治疗的中国女性；年龄≥30岁；患者不孕原因（如卵巢功能低下、多囊卵巢综合征、子宫肌瘤、子宫腺肌症、输卵管堵塞等）及基础疾病不限；患者知情同意并能配合信息收集。意并能配合信息收集。

1.2 排除标准

患者一般资料不全者；治疗期间自然怀孕者。

1.3 患者总体情况

共纳入在日本英医院接受IVF治疗的中国女性患者1014例，所有患者参照日本生殖辅助医疗标准化（JISART）干预实施治疗，由医生选择适宜的促排卵方案。按照患者意愿自愿选择是否服用Shawkea DE-T1。服用Shawkea DE-T1者作为服用组，共712例，服用时间为1～40个月，中位数（Q25,Q75）为3（0,6）个月。未服用ShawkeaDE-T1者作为对照组。两组患者年龄、AMH值比较，差异均无统计学意义（P<0.05），见表1。

表1 两组接受IVF治疗女性一般情况比较

	服用组		对照组		P 值
	例数		例数		
年龄（岁）(mean ±SD)	712	38.50±4.57	302	38.24±4.83	0.41
≥30 and <35	155	32.28±1.38	74	31.95±1.51	0.10
≥35 and <40	250	37.00±1.41	96	36.76±1.40	0.16
≥40 and <43	155	40.97±0.79	71	41.00±0.85	0.82
≥43	152	44.77±1.72	61	44.97±1.82	0.16
AMH (ng/ml) [Median (Q 25, Q75)]	712	1.60(0.68, 2.92)	302	1.26(0.50, 2.89)	0.11
≤1.1	278	0.47(0.20, 0.80)	136	0.41(0.12, 0.78)	0.20
>1.1	434	2.56(1.74,3.90)	166	2.64(1.70,4.42)	0.58
配偶年龄（年）(mean ±SD)	711	40.97±6.91	295	40.80±7.27	0.72
取卵周期	1523		690		
常规刺激方法		39.86%		38.99%	0.70
微刺激方法		60.14%		61.01%	

2. 研究方法

2.1 研究设计与干预方法

纳入在日本英医院(Hanabusa Women's Clinic)接受IVF治疗的中国女性患者。所有纳入患者按照是否服用Shawkea DE-T1作为暴露因素，按照患者意愿自愿选择是否服用Shawkea DE-T1，服用Shawkea DE-T1者作为服用组，患者按照英医院营养补充支持中心建议量：30～34岁女性每日300ml（3袋）；35～40岁女性每日400ml（4袋）；40岁以上者每日500ml（5袋）。未服用Shawkea DE-T1者作为对照组。所有患者均实行日本生殖辅助医疗标准化（JISART）干预，由同一批胚胎培养师、医师进行诊疗。

2.2 观察指标与方法

2.2.1 Shawkea DE-T1不同服用周期的两组患者囊胚到达率

能否成功获得囊胚与患者能否移植成功有直接关系，因此我们观察了Shawkea DE-T1不同服用周期的两组患者的囊胚到达率。由于卵子的发育与成熟的周期为3个月，我们将服用周期分为1～3个月、4～6个月、>6个月3个亚组。

囊胚到达率为获得至少1颗囊胚的患者数占该组患者总数的百分比。囊胚到达率=治疗期间获得了至少1颗囊胚的患者数/该组所有患者数×100%。

2.2.2 成功实现囊胚到达的不同年龄女性Shawkea DE-T1服用周期分析

研究[8]发现，女性生殖功能随年龄增长下降，且以35岁、40岁、43岁下降较为明显，因此我们将所有患者按年龄分为：①≥30岁且<35岁、②≥35岁且<40岁、③≥40岁且<43岁、④≥43岁。分析成功实现囊胚到达的不同年龄层女性服用Shawkea

DE-T1的实际情况，为Shawkea DE-T1应用周期提供参考。

2.3 统计学方法

采用SPSS 23.0 对所有数据进行分析。符合正态分布且方差齐的计量资料采用（均值±标准差）表示，两组间比较采用独立样本t检验。不符合正态分布或方差不齐的计量资料采用中位数（Q25，Q75）表示，两组间比较采用非参数检验。计数资料采用例数与百分比表示，采用Pearson卡方检验。以P<0.05表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1 不同服用周期患者囊胚到达率组间比较

表2、图1示，服用组与对照组患者囊胚到达率组间比较，疗程为1～3个月、4～6个月时，服用组囊胚到达率均显著高于对照组，差异均有统计学意义（P<0.05）。疗程>6个月时，两组差异未显示出统计学意义（P>0.05）。

表2 不同服用周期的两组IVF治疗女性囊胚到达率比较[例（%）]

服用周期	分组	例数	囊胚到达	x^2 值	*P* 值	OR 值
1~3 个月	服用组	269	224（83.27）	41.78	1.02×10^{-10}	4.02
	对照组	179	99（55.31）			
4~6 个月	服用组	252	175（69.44）	12.222	4.70×10^{-4}	2.84
	对照组	54	24（44.44）			
>6 个月	服用组	191	142（74.35）	0.093	0.76	1.1
	对照组	69	50（72.46）			

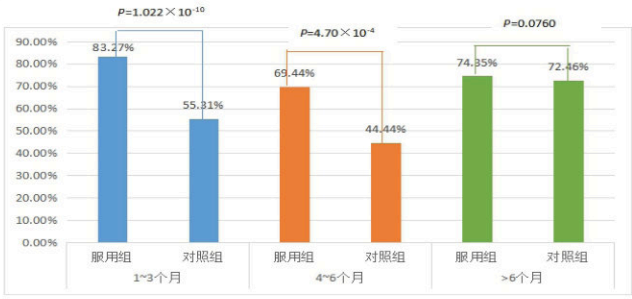


图1 不同服用周期的两组IVF治疗女性囊胚到达率比较

3.2 实现囊胚到达的不同年龄层女性Shawkea DE-T1服用周期分析

表3、图2示，对获得囊胚的各年龄层患者服用疗程进行分析可见，随着年龄增长，患者服用疗程呈现增长趋势。

表3 不同年龄层女性实现囊胚到达的Shawkea DE-T1服用周期

年龄	例数	1~3 个月（224 例）	4~6 个月（175 例）	>6 个月（142 例）
≥30 岁且<35 岁	141	92（65.25）	35（24.82）	14（9.93）
≥35 岁且<40 岁	206	92（44.66）	77（37.38）	37（17.96）
≥40 岁且 <43 岁	113	24（21.24）	41（36.28）	48（42.48）
≥43 岁	81	16（19.75）	22（27.16）	43（53.09）

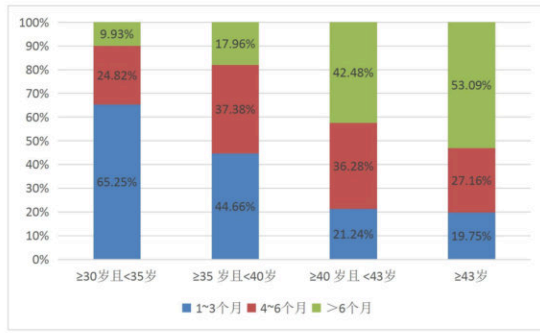


图2 不同年龄层女性实现囊胚到达的Shawkea DE-T1服用周期示意图

4. 讨论

4.1 Shawkea DE-T1的作用机制

我们通过多年临床观察发现，服用ShawkeaDE-T1可提高IVF-ET治疗的成功率。FSH受体是唯一存在于卵子颗粒细胞的受体，通过前期研究已证实，Shawkea DE-T1可提高卵子颗粒细胞表面受体活性及FSH、LH等相关生殖激素受体活性[5,9]。有研究[10]指出，生长激素(growth hormone，GH)也参与了人类生殖的诸多过程。在卵子发育过程中，其可以促进细胞的成熟度，提高颗粒细胞的受体活性。进一步研究[11]发现，GH对生殖方面的影响主要是通过其促进分泌胰岛素生长因子(insulin like growth factor，IGF）引起的，IGF是促进卵子颗粒细胞活性增强的有效物质。现有研究[1-4]显示，蒲公英多糖成分可增加IGF相关受体活性，还具有降血糖、保护肝脏、抗氧化等功效。研究[8]表明，随年龄增长，高龄妇女接受IVF治疗后的胚胎种植率和活产率明显下降，40岁以后下降更为明显，≥40岁，年龄每增加1岁即对IVF-ET的结局有显著影响，≥43岁获得妊娠和活产的概率极低。女性年龄增加导致卵子质量下降通常是由于卵子减数分裂染色 体不分离，导致早期胚胎的非整倍体率增加，自然流产率也随之升高，最常见的常染色体三 体即因高龄女性卵母细胞减数分裂时，纺锤体的染色体排列和纺锤丝基质组成出现异常所致 [12-13]。

本次研究纳入的胚胎移植患者年龄30～46岁，平均（36.10±3.97）岁，且两组患者年龄差异无统计学意义，均为较高生育年龄女性。我们前期研究[7]比较了服用Shawkea DE-T1与未服用的女性的活产率，结果显示服用组活产率为57.53%，显著高于对照组的40.00%（x^2=4.48，P=0.045），提

示Shawkea DE-T1可显著改善IVF女性的活产率；考虑其机制，一方面，Shawkea DE-T1可显著提高患者囊胚获得，使患者有更多囊胚可供胚胎移植；另一方面，前期研究证实，卵巢、子宫存在多种受体，Shawkea DE-T1可上调多种受体活性，平衡女性生殖激素分泌[6]，蒲公英多糖还具有促进生长激素分泌及相关受体活性的作用[1-4]，在卵子成长、胚胎着床、胎儿发育中发挥作用，故ShawkeaDE-T1可提高IVF治疗中女性卵子质量，促进优质受精卵生成。结合上述两点，结合前期研究[7]与本研究结果，我们认为Shawkea DE-T1可显著增加IVF接受治疗的女性的囊胚获得，其机制可能与促进生长激素分泌，从而发挥增加卵子颗粒细胞数量、延迟颗粒细胞衰亡及促进排卵有关，其作用途径涉及降血糖、抗氧化、保护肝脏等多器官、多通路、多靶点；而Shawkea DE-T1对活产率的改善是经由其提升囊胚获取数量与改善囊胚质量两方面作用实现的。生殖是复杂的生理过程，Shawkea DE-T1对下丘脑、垂体、卵巢、子宫等不同器官的多靶点协同作用机制还有待进一步研究深入探讨。

4.2 Shawkea DE-T1不同服用周期对女性囊胚到达率的影响

随着人类辅助生殖技术不断发展，囊胚培养的应用更加广泛。与初期胚相比，移植囊胚阶段的胚胎可以提高胚胎与子宫内膜容受的同步性，增加对胚胎的体外筛选并获得更好的妊娠率和着床率[14-15]。囊胚培养可以有效剔除卵裂期至囊胚期发育过程中潜能差或部分染色体异常的胚胎，因此囊胚移植的妊娠结局更好[16-18]。在全球范围内，囊胚移植在过去几年一直在不断增加，目前占所有胚胎移植的50％以上[19-20]。因此，本研究着重观察了ShawkeaDE-T1不同服用周期对女性IVF-ET治疗中囊胚获得的影响。囊胚到达率反映的是经过治疗最终能获得至少一颗囊胚的患者占该组患者总数的百分比，提示患者有囊胚移植机会，有较初期胚胎移植更高妊娠率的可能性，对患者治疗结局有重要的预测价值。

由于伦理学及充分尊重患者意愿原因，本研究未人为设置观察周期，而只是对服用Shawkea DE-T1的患者进行了服用剂量的指导与服用情况的随访。服用组大部分患者是取卵前1～3 个月开始服用，根据取卵与胚胎培养结果自行决定服用疗程。一般情况下，取卵与囊胚培养较为困难的患者多进行了多次取卵，其疗程也相应较长。故我们将不同疗程（1～3个月、4～6个月、>6个月）服用组患者与同疗程对照组患者的囊胚到达率进行了比较。本研究结果显示，服用疗程为 1～个月、4～6个月时，服用组囊胚到达率均显著高于对照组，差异均有统计学意义（P<0.05），提示在相同治疗周期时，服用Shawkea DE-T1 的患者能获得更高的囊胚到达率。

从另一个角度来看，服用组服用疗程为1～3个月的患者囊胚到达率为83.27%，而服用4～6个月的患者囊胚到达率为69.44%，囊胚到达率似随着服用疗程延长有所下降，我们认为这是由相应疗程患者的基础生理条件决定的，基础条件好的患者在服用1～3个月时即已获得囊胚，而未获得囊胚的患者才进入4～6个月的服用周期，故服用1～3个月与服用4～6个月患者的基础生理条件存在差异，其囊胚获得率不能进行直接比较。

服用组疗程>6个月时，两组差异未显示出统计学意义（P>0.05）。分析其原因：对囊胚到达率的分析本应以3个月为一个疗程进行分析，但由于本研究所纳入的服用组患者服用时间为1～40个月，随着疗程的延长，每个疗程中的患者例数均较少，且分布差异较大，不适于进行统计学分析，故对疗程>6个月所有患者进行了合并分析，但这就导致了相应数据异质性大，组间比较结果的临床意义并不确切，有待扩大样本量继续观察。

4.3 不同年龄女性获得满意疗效的Shawkea DE-T1服用周期方案优化

本研究结果显示，对于成功实现囊胚到达的女性来说，不同年龄层ShawkeaDE-T1服用周期存在差异。对于≥30岁且＜35岁女性来说，65.25%可在服用1～3个月内即成功获得囊胚，实现囊胚达成，而需要服用＞6个月的仅为9/93%。而对于≥43岁的女性来说，仅有19.75%可在服用1～3个月内即成功获得囊胚，而53.09%女性需服用＞6个月才可实现囊胚达成。因此，我们认为ShawkeaDE-T1服用周期应根据女性年龄等基础情况进行设定，不可一概而论。而对于高龄备孕女性，充足的服用周期则更有助于实现囊胚达成。

综上所述，本研究通过分析Shawkea DE-T1不同服用周期这个影响因素对女性囊胚达成率与活产率的影响，进一步分析不同年龄层实现囊胚到达女性ShawkeaDE-T1的实际服用周期。结果显示，不同ShawkeaDE-T1服用周期均可增加女性囊胚到达率，服用1～3个月、4～6个月时，服用组与对照组比较差异有统计学意义（P<0.05）；服用>6个月时，由于样本量不足，服用组囊胚到达率虽显示出增高趋势，但差异尚未显示统计学意义（P＞0.05）。进一步分析成功实现囊胚达成的女性的服用

周期，认为高龄女性应适当延长服用周期，以实现更佳疗效。

【参考文献】

[1] ZHENG Y, HUAN D, LEI L et al. Dandelion polyphenols protect against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via activation of the Nrf-2/HO-1 pathway and inhibition of the JNK signaling pathway. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(2): 103-113.

[2] LI CL, ZHAO L. Protective effect of dandelion polysaccharide on liver injury of mice with carbon tetrachloride[J]. Chinese Journal of Applied Neurological Diseases, 2010, 13(17): 33-35.

[3] GUO HJ, ZHANG WD, JIANG Y, et al. Physicochemical, Structural, and Biological Properties of Polysaccharides from Dandelion. Molecules. , 2019,24(8): 1485.

[4] REN FENG,WU KAIXUAN,YANG YUN, et al. Dandelion Polysaccharide Exerts Anti-Angiogenesis Effect on Hepatocellular Carcinoma by Regulating VEGF/HIF-1α Expression. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11:460.

[5] XU Z, KEN-ICHI H, KOJI O, et al. Dandelion T-1 extract up-regulates reproductive hormone receptor expression in mice [J]. Inter J Molecu med, 2007, 20(3): 287-292.

[6] WANG T, XUE B , SHAO H, et al. Effect of Dandelion extracts on the proliferation of ovarian granulosa cells and expression of hormone receptors[J]. Chinese Medical Journal, 2018, 131(14): 1694-1701.

[7] Hui Shao, Yoji Yamaguchi1, Toshiaki Nozaki, et al. DE-T1 on the Blastocyst obtained Rate and Live Births Rates in Women Receiving IVF-ET Treatment. J Womens Health Dev, 2022(5): 69-80. doi:10.26502/fjwhd.2644-28840078.

[8] Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner:a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated withcomprehensive chromosomal screening [J]. Fertil Steril, 2014,101(3):656-663.

[9]中村絵里，大塚文男.卵胞ステロイド分泌における成長ホルモンの影響：顆粒膜細胞におけるBMPとIGF-Iのクロストーク.日本生殖内分泌学会雑誌，2012,17:33-37

[10] MAGALHÃES-PADILHA DM, DUARTE ABG, ARAÚJO VR, et al. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles.Theriogenology.2012 Jan 1;77(1):206-213.

[11] EMINA IPSA, VINICIUS F. CRUZAT, JACKOB N. KAGIZE, et al. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. Front Endocrinol (Lausanne) ,2019, 10: 777.

[12] EMINA IPSA, VINICIUS F. CRUZAT, JACKOB N. KAGIZE, et al. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. Front Endocrinol (Lausanne) ,2019, 10: 777.

[13] QIAO J, WANG ZB, FENG HL, et al. The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: current status and future prospects [J]. Mol Aspects Med, 2014:38:54-85.

[14] SHAPIRO BS, RICHTER KS, HARRIS DC, et al. Implantation and pregnancy rates are higher for oocyte donor cycles after blastocyst-stage embryo transfer[J]. Fertil Steril, 2002, 77(6):1296-1297.

[15] REH A, FINO E, KREY L, et al. Optimizing ermryo selection with day 5 transfer[J]. Fertil Steril, 2010,93(2): 609-615.

[16] ROQUE M, LATTES K, SERRA S, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles ：a systematic review and meta-analysis[J]. Fertil Steril, 2013,99(1):156-162.

[17] DE CROO I, COLMAN R, DE SUTTER P, et al. Blastocyst transfer for all higher cumulative live birth chance in a blastocyst-stage transfer policy compared to a cleavage-stage transfer policy[J]. Facts Views Vis Obgyn，2019, 11(2):169-176.

[18] HEALY MW, PATOUNAKIS G, CONNELL MT, et al. Doesa frozen embryo transfer ameliorate the effect of evaluated progesterone seen in fresh transfer cycles?[J]. Fertil Steril, 2016,

105(1): 93-99.

[19] DYER S, CHAMBERS GM, DE MOUZON J, et al. Internatioal committee for monitoringassisted reproductive technologies world report: assisted reproductive technology 2008，2009 and 2010[J]. Hum Reprod, 2016, 31(7): 1588-1609.

[20] PEREIRA N, ROSENWAKS Z. A fresh(er) perspectiveon frozen embryo transfers[J]. Fertil Steril, 2016, 106(2): 257-258.