

抗核抗体阳性及干预治疗与反复种植失败 辅助生殖结局相关性研究

肖会^{1*},朱雯^{2,3*},杨帆^{2,3},陈宇鸽^{2,3},王冠雄^{2,3},吴欢^{2,3}

摘要 目的 探讨抗核抗体(ANA)阳性及干预治疗对反复种植失败(RIF)患者辅助生殖结局的影响。方法 回顾性研究344例RIF患者,根据ANA检测结果分为ANA阳性组(294例)和阴性对照组(50例),抗核抗体阳性组分为ANA阳性低滴度组(214例)和ANA阳性高滴度组(80例)。比较阳性组和阴性组患者的一般临床资料、胚胎相关数据以及妊娠结局。采用Wilcoxon秩和检验、Mann-Whitney U检验、Kruskal-Wallis检验和卡方检验的统计学方法来分析ANA对RIF患者辅助生殖结局的影响,并分析了ANA阳性患者进行干预治疗后的临床妊娠情况。结果 ANA阳性低滴度组和高滴度组患者临床妊娠率均显著低于阴性对照组($P < 0.001$);ANA阳性患者卵细胞受精率和卵裂率也均显著低于阴性对照组($P < 0.05$);因ANA阳性胚胎移植后未妊娠患者,经免疫调节剂治疗后的单周期临床妊娠率和累积临床妊娠率均明显提升($P < 0.05$)。结论 与阴性对照组相比,ANA低滴度阳性和高滴度阳性患者的临床妊娠率均下降。经过临床干预治疗后,ANA阳性患者的单周期临床妊娠率和累积妊娠率得到了改善。这表明ANA阳性是RIF的重要原因,而免疫调节剂治疗是改善ANA阳性患者辅助生殖结局的有效措施。

关键词 抗核抗体;不孕症;反复种植失败;临床结局

中图分类号 R 593.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-0947-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.004

不孕症是一种由多种病因导致的生育障碍状

2024-03-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81971441);国家自然科学基金(编号:81901541);安徽医科大学研究生科研项目(编号:YJS20230123)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹风湿免疫科、²妇产科,合肥230032

³ 国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥230032

作者简介:肖会,女,博士,副主任医师;

王冠雄,男,博士研究生,责任作者,E-mail:wgx2xwf@163.com;

吴欢,男,博士,副主任医师,责任作者,E-mail:wu_huan5@163.com

* 对本文具有同等贡献

态,研究^[1]显示不孕症发生率已达16.7%。辅助生殖技术帮助不孕夫妇受孕,全世界已经有800万试管婴儿诞生^[2]。但仍有很大一部分患者在历经多次优质胚胎移植之后仍未能成功妊娠,临床称之为反复种植失败(repeated implantation failure, RIF)。目前,RIF的诊断标准尚未获得统一^[3]。RIF影响因素众多,主要可分为配子及胚胎质量异常、子宫内膜容受性下降等^[4]。近年来,一些研究^[5-7]显示自身免疫性疾病与生殖失败结局之间有一定的关联。抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)是一类自身抗体,ANA与包括复发性流产、不孕症及RIF在内的多种不良妊娠事件关系密切^[8-10]。但目前有关ANA与RIF患者辅助生殖结局的相关性研究甚少。该研究通过回顾性分析不孕症患者各因素与RIF的关系,以期探索ANA及其滴度大小是否会与RIF相关,以及临床干预治疗是否可以改善其结局,从而为RIF患者制定临床治疗策略提供临床依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 于2021年1月至2022年12月在安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科与生殖医学中心收集行辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)治疗后反复种植失败的不孕症患者的临床资料和ANA检测结果。根据患者在研究时间内的ANA检查结果,分为ANA阳性组(包括ANA滴度为1:100的低滴度组和ANA滴度 $\geq 1:320$ 的高滴度组,共294例)、阴性对照组(共50例)。ANA阳性组和阴性对照组排除标准:①男方精液常规检查显示严重少精子症和(或)弱精子症和(或)畸型精子症;②女方高龄(≥ 35 岁)、肥胖($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$)、吸烟5年及以上、严重生殖道解剖结果异常、易栓症、苗勒氏管畸形、子宫内膜异位症、宫腔粘连、输卵管积水、有代谢异常的多囊卵巢综合征;③男方和(或)女方中有染色体异常。ANA阳性组纳入标准:①不符合排除标准中任意一项;②至少经历3个周期,新鲜或冻融移植周期累计至少移植4枚优质卵裂期胚胎或3枚囊胚仍未获得临

床妊娠结局;③在2021年1月至2022年12月于安徽医科大学第一附属医院检测 ANA13 项,结果显示 ANA 阳性。阴性对照组纳入标准:①不符合排除标准中任意一项;②至少经历3个周期,新鲜或冻融移植周期累计至少移植4枚优质卵裂期胚胎或3枚囊胚仍未获得临床妊娠结局;③在2021年1月至2022年12月于安徽医科大学第一附属医院检测 ANA13 项,结果显示 ANA 阴性。

1.2 研究方法

1.2.1 ANA 检测方法 采用间接免疫荧光法对血液中的 ANA 抗体进行检测,实验流程为:采集患者血液标本并离心分离血清;稀释患者血清并与载玻片上的抗原反应;洗涤载玻片以去除未结合的抗体和非特异性成分;加入荧光标记的二抗使其与已结合的抗原-抗体复合物结合;再次洗涤载玻片以去除未结合的二抗;最后,在荧光显微镜下观察载玻片,检查是否存在荧光信号。滴度在1:100及以上判读为阳性。

1.2.2 体外受精/卵胞浆内单精子注射-胚胎移植过程 (*in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer, IVF/ICSI-ET) 过程 研究对象均采用常规的卵巢刺激方案,主要包括黄体期长方案、拮抗剂方案等。通过阴道超声和性激素监测,当两侧卵巢见≥3枚直径18~20 mm 卵泡行人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 或达必佳扳机,32~36 h 后行超声引导下经阴道穿刺取卵术。获得的卵子行 IVF/ICSI。根据患者具体情况行鲜胚移植或冻胚移植。

1.2.3 抗核抗体阳性的临床干预 根据患者的临床表现和其他相关实验室检查,对抗核抗体阳性的患者使用免疫调节剂治疗,具体用药及剂量如下:①羟氯喹:200~300 mg/d 口服;②醋酸泼尼松片:5~10 mg/d 口服。

1.2.4 妊娠结局判断 结合患者的综合情况进行胚胎移植,包括新鲜胚胎移植和冻融胚胎移植。患者于胚胎移植后14 d 测定血清β-hCG,若β-hCG 升高为生化妊娠,移植后30 d 经超声检查可探及宫内孕囊和胎心搏动,则判定为临床妊娠。

1.2.5 观察指标 ①一般临床资料:女方年龄、体质质量指数:(body mass index, BMI),基础性激素[促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成激素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E2)、孕酮 (progesterone, P)、催乳素 (prolactin, PRL)、睾酮 (testosterone, T)];②妊娠结局

相关资料:临床妊娠结局、累积妊娠结局、首次行 IVF/ICSI 治疗后临床结局。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件包进行统计分析。对两组患者的周期数、移植次数、BMI、激素水平以及单周期妊娠率和累积妊娠率进行统计分析,两独立组定量资料比较采用 Wilcoxon 秩和检验、Mann-Whitney U 检验和 Kruskal-Wallis 检验,两独立组定性资料比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入患者数量与基本临床特征 根据纳入排除标准,本研究共纳入294例 ANA 阳性的 RIF 患者,以及50例 ANA 阴性患者作为对照组。为了后续分析的需要,将294例 ANA 阳性患者按滴度的高低分为低滴度组(1:100)和高滴度组($\geq 1:320$)。为了确保分析结果的准确性,本研究采用 Mann-Whitney U 检验分析 ANA 阳性患者和阴性对照组在年龄、BMI、基础性激素水平等方面的差异。结果显示,在阳性患者和阴性对照组之间,除了 E2 之外,其他检验结果差异均无统计学意义。见表1。

表1 ANA 阳性和阴性患者的基本临床资料($\bar{x} \pm s$)

变量	ANA 阳性组	ANA 阴性组	P 值
患者数(n)	294	50	-
总周期数(次)	458	67	-
平均移植次数	1.81 ± 0.93	1.58 ± 1.07	0.116
女方年龄(岁)	29.91 ± 2.91	30.24 ± 2.55	0.957
BMI	22.29 ± 2.71	23.04 ± 2.76	0.707
FSH(IU/L)	6.99 ± 3.00	6.25 ± 2.22	0.984
LH(IU/L)	5.93 ± 4.67	4.40 ± 2.32	0.777
E ₂ (pmol/L)	164.16 ± 102.28	102.92 ± 82.02	0.032
P(nmol/L)	1.82 ± 1.64	1.40 ± 1.32	0.316
PRL(ng/ml)	13.18 ± 9.64	12.48 ± 8.75	0.066
T(nmol/L)	1.53 ± 2.79	2.56 ± 5.86	0.356

2.2 ANA 阳性患者和阴性对照组辅助生殖结局比较 本研究比较了 ANA 阳性组患者和阴性对照组的临床妊娠率。在50例 ANA 阴性对照组中,有33例首次移植后获得临床妊娠,临床妊娠率为66.00%。而在214例 ANA 低滴度组中,仅有78例(36.43%)首次移植后获得临床妊娠;在80例 ANA 高滴度组中,仅有23例(28.75%)获得临床妊娠。部分患者在 ANA 阳性检测后接受免疫调节剂治疗,为了准确评估 ANA 对反复种植失败患者的影响,研究将未接受临床干预的阳性患者单独列出,共161例。其中,ANA 阳性低滴度组为115例,ANA 阳性

表2 抗核抗体对辅助生殖结局的影响[% (n/n)]

变量	ANA 阴性组 (n = 50)	ANA 低滴度组 (n = 214, 115)	ANA 高滴度组 (n = 80, 46)	P 值
第一周期移植临床妊娠率	66.00 (33/50)	36.45 (78/214)	28.75 (23/80)	<0.001
第一周期移植前未干预患者临床妊娠率 ^a	66.00 (33/50)	18.26 (21/115)	19.57 (9/46)	<0.001

^aANA 阳性患者中,去除自行服用免疫调节剂的患者 133 例

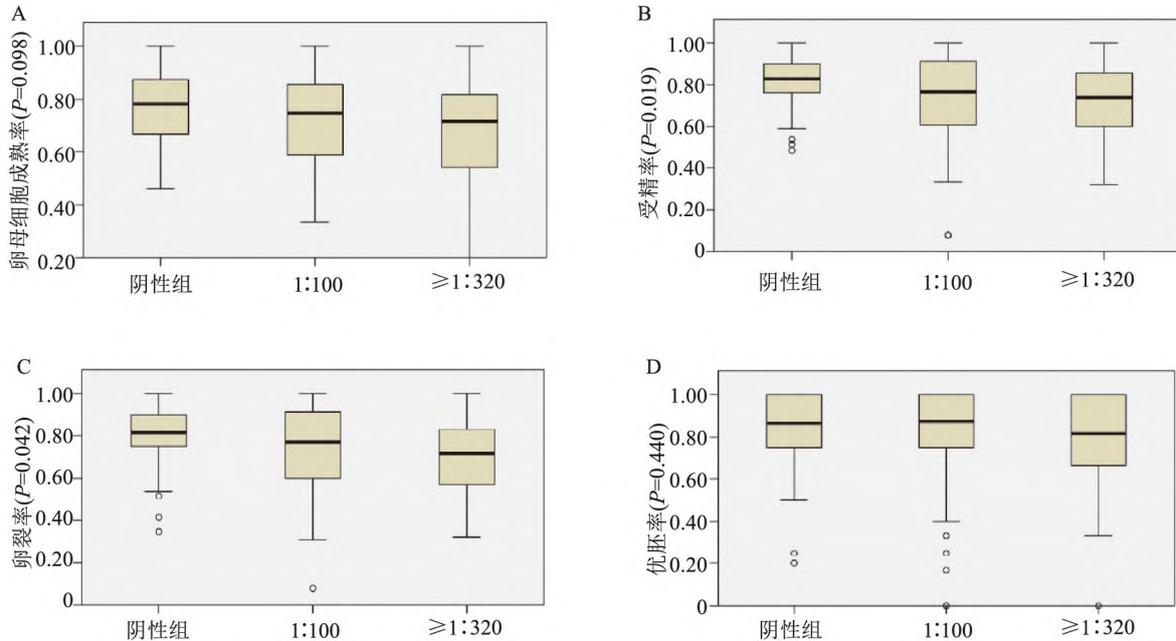


图1 ANA 对卵母细胞及胚胎发育的影响

A:ANA 滴度对卵母细胞成熟率的影响;B:ANA 滴度对受精率的影响;C:ANA 滴度对卵裂率的影响;D:ANA 滴度对优胚率的影响

高滴度组为 46 例。排除临床干预后,两组妊娠率进一步降低,分别为 18.26% 和 19.57%。通过卡方检验发现,无论采用何种分类方法,与阴性对照组相比,ANA 阳性患者的临床妊娠率均明显降低,且差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 2。

2.3 ANA 阳性患者和阴性对照组辅助生殖相关指标比较 为了进一步分析 ANA 对辅助生殖结局的影响方式,本研究对 ANA 阴性对照组、ANA 低滴度组和 ANA 高滴度组的辅助生殖相关指标进行了比较,根据 ANA 滴度分为阴性组、1 : 100 组和 $\geq 1 : 320$ 组。采用独立样本 Kruskal-Wallis 检验比较各成分之间的差异。独立样本 Kruskal-Wallis 检验显示与阴性对照组相比,ANA 阳性患者的卵母细胞成熟率、受精率、卵裂率以及优胚率随着 ANA 滴度的增高而下降。其中,受精率和卵裂率的下降显著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 免疫调节剂干预对 ANA 阳性患者辅助生殖结局的影响 为了评估免疫调节剂对 ANA 阳性患者辅助生殖临床结局的影响,本研究进行了回顾性分析。研究对象为所有首次移植前未使用药物的

ANA 阳性患者,分为后期干预组和未干预组。比较两组患者在下一移植周期的临床妊娠率以及多周期的累积临床妊娠率。卡方检验显示,与未干预组相比,进行干预后的 ANA 阳性患者在首次移植失败后的下一周期妊娠率从 41.7% 提升至 70.7%,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。在经过系统的免疫调节剂治疗后,未干预组的累积临床妊娠率仅为 23.8%,而干预组的累积妊娠率显著提升至 70%,两组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 3。

表3 首次移植未成功 ANA 阳性患者再次移植临床结局
[$\bar{x} \pm s, \% (n/n)$]

变量	未干预组 (n = 12, 21)	干预组 (n = 82, 110)	P 值
女方年龄(岁)	30.24 ± 2.55	29.92 ± 2.92	0.627
BMI	23.04 ± 2.76	22.30 ± 2.71	0.292
FSH (IU/L)	6.56 ± 1.74	7.46 ± 2.46	0.108
PRL (ng/ml)	15.41 ± 6.90	15.76 ± 8.38	0.930
单周期临床妊娠率 ^a	41.7 (5/12)	70.7 (58/82)	0.045
累积临床妊娠率 ^b	23.8 (5/21)	70.0 (77/110)	<0.001

a:首次移植未成功 ANA 阳性患者免疫调节剂未干预组与干预组下一移植周期临床妊娠率;b:首次移植未成功 ANA 阳性患者免疫调节剂未干预组与干预组累积临床妊娠率

3 讨论

RIF 是指接受辅助生殖治疗的患者,在经历多次移植周期后仍未能实现临床妊娠,影响全球约 10% 的体外受精-胚胎移植患者,给不孕症夫妇带来了一定的经济和心理负担^[11]。然而,RIF 的精确定义目前仍尚未达成共识,通常基于未能获得妊娠的 IVF-ET 周期次数、移植胚胎的数目或两者的结合^[12]。目前被广泛接受的定义是 2014 年 Coughlan et al^[12] 提出的 40 岁以下接受 IVF-ET 的患者在至少 3 个新鲜或冷冻周期内移植至少 4 枚优质胚胎后未能实现临床妊娠。胚胎成功植入是一个复杂的过程,涉及到两个主要参与者:母体和胚胎。因此导致反复种植失败的病因十分复杂,包括:母体因素、男性因素和胚胎因素。母体因素包括免疫异常、血栓前状态、子宫内膜容受性不良、感染、生殖系统解剖结构异常和内分泌稳态失衡等。免疫功能与生殖之间的关系越来越受到重视。自身免疫问题涉及到生殖领域的许多方面。自身抗体的存在通常表明自身免疫异常,而自身免疫异常可能导致 RIF 患者体内存在组织特异性或组织非特异性自身抗体^[13]。然而,关于 ANA 和辅助生殖结局之间的关系报道较少。因此,本研究回顾了 2021-2022 年间就诊于安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科和生殖中心的 RIF 患者,分析了 ANA 对 RIF 患者辅助生殖结局的影响。

本研究通过比较 ANA 阳性的 RIF 患者和阴性对照组的临床妊娠率与累积妊娠率发现:与阴性对照相比,ANA 阳性患者的临床妊娠率均有所降低,且随着 ANA 滴度的升高,降低趋势更加明显,且差异有统计学意义。既往也有文献^[14]表明,在不孕症患者中 ANA 阳性患者的不孕率高于阴性对照组。

本研究从胚胎实验室的指标进一步分析了 ANA 阳性对胚胎的影响,与阴性对照组相比,随着 ANA 滴度的增高,反映辅助生殖治疗过程中的相关指标如卵母细胞成熟率、受精率、卵裂率、优胚率均有所下降,其中受精率和卵裂率下降显著,差异结果有统计意义。因此,本研究推测 ANA 阳性组可能通过影响卵母细胞的质量而降低其受精率,从而导致与阴性对照组相比,更差的辅助生殖结局。

随着对 ANA 作用认识的加深,临床工作中面对 RIF 且 ANA 阳性的患者往往会予以醋酸泼尼松、羟氯喹等临床干预治疗。本研究首次分析了临床干预

治疗对 ANA 阳性患者妊娠结局的影响,发现不论是 ANA 低滴度组,还是 ANA 高滴度组与首次移植前未干预组相比,接受临床干预治疗后患者的妊娠率均有所提升,这也提示醋酸泼尼松等药物可能通过抑制 ANA 阳性患者局部母体免疫反应来提高胚胎着床率。

本研究也存在以下不足之处:由于 RIF 的病因复杂,IVF/ICSI 患者的治疗周期长且妊娠结局的不确定性较高。在排除其他导致种植失败的原因后,可纳入的患者样本量相对较少。因此,后续研究需要通过扩大样本量来进行更深入研究。

综上所述,ANA 阳性可能是导致 IVF/ICSI 患者发生 RIF 的原因之一。此外,ANA 阳性可能通过影响卵母细胞质量和受精率导致 RIF。因此,免疫调节剂可以提高这类患者的妊娠率,对于改善 ANA 阳性患者的临床结局具有重要意义。

参考文献

- [1] Jiao S Y, Yang Y H, Chen S R. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice[J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(1): 154-89.
- [2] Harper J C, Schatten G. Are we ready for genome editing in human embryos for clinical purposes? [J]. *Eur J Med Genet*, 2019, 62(8): 103682.
- [3] He Y, Tang R, Yu H, et al. Comparative effectiveness and safety of 36 therapies or interventions for pregnancy outcomes with recurrent implantation failure: a systematic review and network meta-analysis[J]. *Assist Reprod Genet*, 2023, 40(10): 2343-56.
- [4] Günther V, Otte S V, Freytag D, et al. Recurrent implantation failure-an overview of current research [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(7): 584-90.
- [5] Jarne-Borràs M, Miró-Mur F, Anunciación-Llunell A, et al. Antiphospholipid antibodies in women with recurrent embryo implantation failure: A systematic review and meta-analysis[J]. *Autoimmun Rev*, 2022, 21(6): 103101.
- [6] Guo L, Wang X, Wang Y, et al. Impact of thyroid autoimmunity on pregnancy outcomes in euthyroid patients with recurrent implantation failure [J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 47(3): 103229.
- [7] Kuroda K, Matsumura Y, Ikemoto Y, et al. Analysis of the risk factors and treatment for repeated implantation failure: optimization of thyroid function, immunity, and uterine milieu (OPTIMUM) treatment strategy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 85(5): e13376.
- [8] Pisetsky D S, Lipsky P E. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(10): 565-79.
- [9] Satoh M, Ceribelli A, Hasegawa T, et al. Clinical significance of

- antinuclear antibodies: biomarkers for autoimmune diseases, malignancies, and others[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2022, 63(2): 210–39.
- [10] Vomstein K, Voss P, Molnar K, et al. Two of a kind Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage[J]. *J Reprod Immunol*, 2020, 141:103166.
- [11] Cimadomo D, Craciunas L, Vermeulen N, et al. Definition, diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure: an international survey of clinicians and embryologists[J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(2): 305–17.
- [12] Coughlan C, Ledger W, Wang Q, et al. Recurrent implantation failure: definition and management[J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(1):14–38.
- [13] Kolanska K, Dabi Y, Dechartres A, et al. Unexplained recurrent miscarriages: predictive value of immune biomarkers and immunomodulatory therapies for live birth[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 86(2): e13425.
- [14] Sun S, Li C, Kou X, et al. Association of prednisone and antinuclear antibodies with pregnancy outcomes in women with unexplained recurrent pregnancy loss [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2021, 154(3): 492–9.

Study on the correlation between positive antinuclear antibody and intervention therapy and assisted reproductive outcome of repeated implantation failure

Xiao Hui¹, Zhu Wen^{2,3}, Yang Fan^{2,3}, Chen Yuge^{2,3}, Wang Guanxiong^{2,3}, Wu Huan^{2,3}

(¹*Dept of Rheumatology and Immunology*, ²*Dept of Obstetrics and Gynecology*, *The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032*; ³*NHC Key Laboratory of Abnormal Gametes and Reproductive Tract, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the impact of positive antinuclear antibody (ANA) and subsequent intervention therapy on the assisted reproductive technology outcomes among the patients experiencing recurrent implantation failure (RIF). **Methods** A retrospective study was conducted on 344 RIF patients. Based on ANA test results, the patients were divided into ANA-positive group (294 cases) and negative control group (50 cases). The ANA-positive group was further divided into a low titer group (214 cases) and a high titer group (80 cases). Comparative statistical analyses such as the Wilcoxon rank-sum test, Mann-Whitney U test, Kruskal–Wallis test and chi-square test, etc. were employed to evaluate differences in general clinical data, embryo-related parameters, and pregnancy outcomes between the positive and negative groups. The impact of ANA on the assisted reproductive outcomes of patients with recurrent implantation failure was analyzed, and the outcomes of ANA-positive patients after intervention therapy were also analyzed. **Results** Notably, the clinical pregnancy rates of patients in the ANA-positive low titer group and high titer group were significantly lower than those in the negative control group ($P < 0.001$). Similarly, the rates of fertilization and cleavage of oocytes in ANA-positive patients were also significantly lower than those in the negative control group ($P < 0.05$). For patients who did not achieve pregnancy after embryo transfer due to ANA positivity, immunomodulatory therapy significantly improved both the clinical pregnancy rate and cumulative clinical pregnancy rate ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with the negative control group, the clinical pregnancy rates decrease in both ANA-positive low titer subgroup and high titer subgroup. However, clinical intervention therapy enhances the single-cycle clinical pregnancy and cumulative pregnancy rates among ANA-positive patients, indicating that ANA positivity is an important factor in RIF. Immunomodulatory therapy is an effective measure to improve recurrent implantation failure among ANA-positive patients.

Key words antinuclear antibody; infertility; repeated implantation failure; clinical outcome