

自体血小板富集血浆宫腔灌注在反复种植失败患者中的应用研究

王巍 马海兰

(广西桂平市人民医院生殖医学中心, 桂平市 537200)

【摘要】 人类辅助生殖技术在临床的成功应用给越来越多的不孕症夫妇带来福音。然而,在体外受精联合胚胎移植辅助治疗过程中仍有 50% 左右治疗周期出现反复种植失败(repeated implantation failure, RIF), 原因与子宫内膜容受性有关。如何改善子宫内膜容受性, 提高人类辅助生殖技术的有效性是目前研究的热点。近年有研究表明: 血小板富集血浆(platelet-rich plasma, PRP) 宫腔灌注治疗具有促进子宫内膜增殖, 改善薄型子宫内膜患者临床妊娠结局的作用, 可作为提高 RIF 患者临床妊娠率的一种安全、经济、有效方法。

【关键词】 血小板富集血浆; 宫腔灌注; 子宫内膜容受性; 临床妊娠率

【中图分类号】 R 71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-6575(2018)04-0497-03

DOI:10.11864/j.issn.1673.2018.04.27

不孕症正成为一种能够造成全球性影响的人类生殖健康问题。在全世界育龄妇女中, 不孕症的发病率达 8.0% ~ 10.0%, 并呈逐年上升趋势^[1]。随着辅助生殖技术的快速发展, 体外受精/胞质内单精子注射-胚胎移植术(IVF/ICSI-ET) 已成为治疗不孕症的重要助孕方式, 但胚胎反复种植失败(RIF) 的问题也非常严峻。借助适当的临床干预, 改善、提升 RIF 患者的临床妊娠率, 是现代生殖医学研究工作的热点与难点。有研究报告^[2-3] 显示, 在 IVF/ICSI-ET 种植失败患者中, 其宫腔组织及子宫内膜组织的病理性异常发生率为 84.38%, 包括子宫内膜发育不良、宫腔粘连、宫腔畸形等。将胚胎植入到具备良好形态特征和稳定生理状态的宫腔内, 是一个同时涉及局部生物活性因子因素、免疫因素、解剖因素以及生化因素等的复杂过程。研究发现, 血小板富集血浆(PRP) 的血小板含量平均为全血的 4~5 倍, 激活后的血小板可分泌多种生长因子, 这些生长因子可有效改善子宫内膜容受性, 提高临床妊娠率^[4]。本文对自体 PRP 宫腔灌注治疗在 RIF 患者中的应用进展进行综述。

1 RIF 与子宫内膜容受性

RIF 是指经过反复胚胎移植而却未能达到临床妊娠。Meta 分析建议将 RIF 定义为连续 2 个 IVF/ICSI 或 FET 周期移植卵裂期胚胎累计数 ≥ 4 或囊胚数 ≥ 2 而未获得临床妊娠, 而且所有移植胚胎均有较好的质量及适当的发育阶段^[5]。RIF 受多种因素的影响, 包括子宫内膜容受性、超促排卵药物方案、胚胎发育异常或染色体异常以及移植技术等。RIF 的发生尚未得到明确的阐述, 特别是对于移植了优质胚胎而出现反复植入失败更令人不解。子宫内膜容受性是指子宫内膜组织处于一

种能够支持受精胚胎完成黏附、侵入、定植等生理过程, 且能够因子宫内膜组织间质改变, 而支持胚胎顺利实现着床的状态, 与子宫内膜厚度、血流情况、内膜微环境以及种植窗胞饮突的数量等相关。子宫内膜组织作为胚胎着床和发育过程中需要依赖的基本“土壤”, 是支持和保证人类胚胎种植成功的关键因素。因此容受性良好的子宫内膜组织是胚胎种植成功的重要因素。胚胎植入失败, 在很大程度上受子宫内膜容受性影响所致。

2 改善子宫内膜容受性现状

Raziel 等^[6] 报道机械性搔刮子宫内膜组织, 能够促进患者的子宫内膜组织蜕膜化, 提高子宫内膜容受性, 但是这一操作通常在盲视条件下进行, 存在较高的风险性。近期也有研究^[7] 揭示宫腔镜微创手术的临床应用, 可有效改善患者的子宫内膜容受性, 为胚胎的顺利着床创造条件, 提升临床妊娠成功率, 但该法存在机械性损伤, 需要抗感染治疗及长时间恢复。王巍等^[8] 在皮下组织注射适量的来自配偶或第三方的外周血淋巴细胞, 以此为患者开展主动免疫治疗干预, 能够显著提升临床妊娠率和新生儿活产率, 但该法存在注射部位持续疼痛、需要反复多次注射、引发血源性病毒交叉感染, 以及诱导发生母胎变态反应等副作用。2006 年 Yoshioka 等^[9] 在新鲜周期采用自体外周血单个核细胞(PBMCs) 宫腔灌注能显著提高 RIF 患者的胚胎着床率及临床妊娠率, 该法的提出为提高 RIF 患者胚胎着床提供了有效途径。高明霞等^[10-15] 研究表明, RIF 患者在冻融胚胎移植前宫腔灌注人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、绒毛膜促性腺激素(HCG)、自体外周血单个核细胞、自体淋巴细胞等, 可改善子宫内膜容受性, 有效提高临床妊娠率, 但此类方法仍存在疗效不确定等问题。常亚杰等^[4] 认为, 自

体 PRP 宫腔灌注具有促进子宫内膜增殖,改善薄型子宫内膜患者临床妊娠结局的临床疗效,可作为提高 RIF 患者临床妊娠率的一种安全、经济、有效的方法。

3 PRP 成分及相关作用机制

3.1 PRP 成分 PRP 为自体外周血经细胞分离,采用人外周血血小板分离液和密度梯度离心法分离提取得到的浓缩血小板血浆。PRP 中血小板含量为全血的 4~5 倍^[4]。PRP 主要包含血小板和血浆蛋白质(PBPP)两种成分。血小板含有多种糖蛋白,其中血小板衍生生长因子(PDGF)是一种碱性糖蛋白,存在于血小板细胞器的 α 颗粒中。一方面,在凝血酶作用下,PDGF 从血小板释放,刺激成纤维细胞核肌细胞的生长和分裂;另一方面,PDGF 与肝素结合,刺激 DNA 合成和细胞增殖,促进细胞生长,促进单核细胞的化学趋化^[16]。PBPP 的主要作用:①对组织蛋白起修补作用,如白蛋白和前蛋白;②组成体液免疫对组织细胞构成防御系统,如免疫球蛋白和补体;③对组织细胞具有代谢调节作用的生长激素和蛋白酶抑制物,如 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、 $\alpha 1$ -抗糜蛋白酶、 α -巨球蛋白等。其中白蛋白,是血浆含量最丰富的蛋白质,占血浆总蛋白的 57%~68%,是由 585 个氨基酸组成的单链多肽,是最重要的血浆营养蛋白和重要的血浆载体蛋白质。白蛋白由胞饮作用进入组织细胞后分解氨基酸用于合成组织蛋白,对组织细胞起到补充和修复作用^[17]。

3.2 PRP 促子宫内膜组织生长的机制 血小板的 α 颗粒含有大量无活性的、合成的生长因子,在血小板激活状态下可释放并发挥其促组织生长作用。Marx^[18]认为,采用凝血酶和 CaCl_2 作为 PRP 激活剂,可以最大限度地激活血小板。血小板被激活后, α 颗粒中所包含的 PDGF、转化生长因子 β (TGF- β)、表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等,通过脱颗粒方式经血小板胞膜释放出来,并通过跨膜受体结合到细胞膜表面,促进子宫内膜组织生长。

3.3 PRP 促子宫内膜增殖的机制 PRP 促增殖作用依赖于多种生长因子的协同作用,激活 PDGF 受体苏氨酸蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3-激酶、丝氨酸、核因子 κB 信号通路,参与血管内皮的再生和修复,提高旁分泌水平,使细胞耐受不良环境的能力更强,减缓细胞凋亡,促进细胞增殖^[19]。与单一的颗粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、VEGF 等生长因子宫腔灌注治疗相比,PRP 具有明显优势:①发挥多种生长因子的协同效应。Amable 等^[20]研究发现,单一的生长因子不会促进细胞增殖与修复,只有多种因子结合在一起时才能发挥其增殖、修复作用。②能较长时间发挥功效:PRP 是天然的生长因子缓释系统,储存在血小板的多种生长因子缓慢释放,可以使作用于靶细胞的时间延长,比常规的一次性给药更合理有

效。③除生长因子外,PRP 还富含蛋白质、纤维蛋白、纤维结合蛋白等,形成纤维网络,起到承接促进细胞黏附、组织修复细胞、防止细胞流失的支架作用。

3.4 PRP 促子宫内膜生长 成纤维细胞、间充质干细胞、内皮细胞均表达 PRP 所分泌生长因子的胞膜受体,受体活化内在信号蛋白,促进细胞增殖、胶原合成、基质合成等一系列基因的表达。基于以上理论基础,Intin 的研究^[21]也证实了 PRP 具有促进子宫内膜生长、改善薄型子宫内膜容受性、有效提高临床妊娠率的作用,为临床治疗提供了新的方法和思路。

4 自体 PRP 宫腔灌注主要技术流程

4.1 RIF 患者病因筛查 对行 IVF/ICSI-ET 助孕治疗,移植失败 2 次或以上,要求行 FET 治疗的患者进行病因筛查。纳入标准:①已移植卵裂期优质胚胎 2 次或以上;既往周期胚胎移植(ET)前日子宫内膜 Salle 评分 ≥ 13 分;②基础血清促卵泡激素(FSH) < 15 U/L;③夫妇双方染色体核型正常,无子宫畸形、子宫内膜异位症等盆腔器质性病变;④抗心磷脂抗体阴性,NK 细胞活性正常。针对患者全面系统地讲解,告知开展自体 PRP 宫腔灌注治疗的必要性,还要告知患者该种技术干预过程中可能发生的风险事件,以及需要支付的经济费用;预先确认和排除患者是否存在治疗的禁忌证,遵循临床规范为患者实施 PRP 宫腔灌注治疗。

4.2 自体 PRP 的制备 所有操作均在超净工作台中进行,严格无菌操作。治疗日上午抽取患者空腹静脉血 15 mL,用细胞分离专用抗凝剂充分抗凝,在梯度离心管(Falcon2099)中,要严格遵循 1:2 的数量比例将抗凝血样本加到标准制备的人外周血血小板分离液的液面空间结构上,以 400 g 离心 20.0 min。离心管中的细胞由上至下可被划分为四层:第一层为血小板血浆层,第二层为环状乳白色细胞层,第三层为透明分离液层,第四层为红细胞层。选取标准制备的无菌巴氏吸管吸取第一层至 14 mL 试管待用。

4.3 宫腔灌注 患者于月经第三天开始人工周期,5 d 后于子宫内膜黄体转化日前 3 d 接受自体 PRP 宫腔灌注治疗。取膀胱截石位,以 0.1% 碘伏冲洗外阴及阴道后,腹部 B 超监测下观察到内膜,用 5 mL 注射器抽取 5 mL 制备好的 PRP,连接到人工授精管后,在腹部 B 超监测下,缓慢推注入宫腔内停留 15 s,取出人工授精管,嘱患者卧床 10~20 min。

4.4 临床妊娠结局的判定 接受移植后 28 d,经阴道 B 超检查,确认患者宫腔内存在孕囊,且能够检测出原始胎心搏动,可诊断为临床妊娠。

5 PRP 宫腔灌注治疗的安全性

PRP 由患者自体外周静脉血分离提取获得,无变态

反应及无血源性病毒交叉感染,同时其分泌的多种生长因子还具有抗炎、止血的潜在作用,因此不会发生免疫排斥反应等相关问题。一项对口腔下颌骨术后应用自体 PRP 治疗的随访研究^[22]显示,PRP 治疗并不增加临床感染等相关风险。García-Martínez 等^[23]研究将人的成骨细胞和自体 PRP 共培养后经流式细胞术检测,结果成骨细胞的细胞周期没有发生改变,而且 PRP 促进细胞增殖的作用随时间延长慢慢消失,不会引起细胞的无序增殖,说明 PRP 不会改变细胞的性状、不会导致细胞恶性变。上述报道均验证了自体 PRP 临床应用的安全性。

6 展 望

IVF/ICSI-ET 及其相关辅助生殖技术的临床妊娠成功率与患者的年龄、胚胎质量、子宫内膜容受性及宫腔内基础生理环境等因素有关。自体 PRP 宫腔灌注治疗具有促进子宫内膜增殖、改善薄型子宫内膜患者临床妊娠结局的临床疗效。如何更好地应用自体 PRP 宫腔灌注改善子宫内膜容受性,使子宫内膜的分化与胚胎发育同步,有效提高 RIF 患者临床妊娠率,目前临床及实验室处理方法仍处在摸索中,还需要进一步深入研究,而且应该将评价与治疗紧密相结合,实施个体化治疗,才能得出合理的评价标准,并提供更好的临床治疗方案。

参 考 文 献

- [1] Carbonnel M, Goetgheluck J, Frati A, et al. Robot-assisted Laparoscopy for Laparoscopy for infertility treatment: current views [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(3): 621 - 626.
- [2] 胡肖玲, 马海兰, 王 巍, 等. 宫腔镜在体外受精 - 胚胎移植失败再次胚胎移植中的应用价值 [J]. *生殖医学杂志*, 2013, 22(2): 106 - 109.
- [3] Momeni M, Rahbar MH, Kovanci E. A meta-analysis of the relationship between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization cycles [J]. *J Hum Reprod Sci*, 2011, 4(3): 130 - 137.
- [4] 常亚杰, 张晓莉, 杨 星, 等. 富血小板血浆促子宫内膜增殖对妊娠结局的影响 [J]. *实用妇产科杂志*, 2016, 32(6): 445 - 449.
- [5] Polanski LT, Baumgarten MN, Quenby SA, et al. What exactly do we mean by recurrent implantation failure? A systematic review and opinion [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(4): 409 - 423.
- [6] Raziell A, Schachter M, Strassburger D, et al. Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure [J]. *Fertil Steril*, 2007, 87(1): 198 - 201.
- [7] 马海兰, 王 巍, 陆兰英, 等. 288 例助孕失败患者宫腔镜微创术后再次妊娠结局分析 [J]. *腹腔镜外科杂志*, 2016, 21(6): 417 - 421.
- [8] 王 巍, 马海兰, 蓝雪琴, 等. 淋巴细胞免疫治疗不明原因反复流产 115 例妊娠结局分析 [J]. *中国妇幼保健*,

- 2015, 30(11): 1720 - 1724.
- [9] Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T, et al. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer [J]. *Human Reproduction*, 2006, 21(12): 3290 - 3294.
- [10] 高明霞, 陈思同, 李丽斐, 等. 人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 宫腔灌注改善子宫内膜容受性的临床研究 [J]. *生殖与避孕*, 2014, 34(7): 531 - 533.
- [11] 文 娅, 李 予, 倪仁敏, 等. 宫腔灌注绒毛膜促性腺激素对反复着床失败后冻融胚胎移植妊娠结局的作用 [J]. *生殖与避孕*, 2015, 35(2): 91 - 94.
- [12] 林 奇, 连若纯, 陈 现, 等. 外周血单个核细胞宫腔内灌注治疗对反复种植失败患者妊娠结局的影响 [J]. *生殖医学杂志*, 2013, 22(12): 922 - 926.
- [13] 史亚兰, 张 婧, 刘 恋, 等. 自体外周血单个核细胞 (PBMCs) 治疗改善反复种植失败患者妊娠结局的免疫学机制 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(10): 849 - 854.
- [14] 刘洋虹, 张 婧, 刘 恋, 等. 宫腔灌注自体外周血单个核细胞治疗对反复种植失败患者妊娠结局的影响及相关机制 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(7): 539 - 544.
- [15] 曹 芳, 黄晓阳, 于春梅, 等. 自体淋巴细胞宫腔灌注对反复种植失败患者妊娠结局的影响 [J]. *中国全科医学*, 2015, 18(35): 4317 - 4329.
- [16] 丛玉隆, 尹一兵, 陈 瑜. 检验医学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2013: 382 - 384.
- [17] 府伟灵, 徐克前. 临床生物化学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 5 - 8.
- [18] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use [J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2004, 62(4): 489 - 496.
- [19] Peng Y, Huang S, Wu Y, et al. Platelet rich plasma clot releasate preconditioning induced p13K/AKT/NFκB signaling enhances survival and regenerative function of rat bone marrow mesenchymal stem cells in hostile microenvironments [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 24: 3236 - 3251.
- [20] Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3): 67.
- [21] Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone Reconstruction therapy [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(28): 4956 - 4966.
- [22] Schepull T, Kvist J, Norrman H, et al. Autologous platelets have no effect on the healing of human Achilles tendon ruptures a randomized Single-Blind study [J]. *American Journal of Sports Medicine*, 2011, 39(1): 38 - 47.
- [23] García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, et al. Effect of platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its clinical impact [J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2012, 70(7): 1558 - 1564.