

经皮穴位电刺激对IVF中POI患者卵母细胞质量及FSHR表达的影响

帅振虹¹, 李雪梅¹, 张婉菁¹, 杨卓欣²

1. 南方医科大学附属深圳妇幼保健院生殖医学中心, 广东 深圳 518017;

2. 深圳市中医院, 广东 深圳 518021

【摘要】 目的 观察经皮穴位电刺激(TEAS)对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)中早发性卵巢功能不全(POI)患者卵母细胞质量及卵泡刺激素受体(FSHR)表达的影响。方法 选取2018年5~10月在南方医科大学附属深圳妇幼保健院生殖医学中心接受IVF治疗的POI妇女66例,采用随机数表法分为TEAS组和对照组,每组33例。TEAS组自促性腺激素(Gn)启动日至绒毛膜促性腺激素(hCG)注射日给予电子针疗法治疗,隔日1次,对照组自Gn启动日起给予安慰针治疗,治疗时间、疗程及穴位选择均与TEAS组相同。比较两组患者的获卵数、受精率、优质胚胎率及临床妊娠率的差异,采用Western blot法检测取卵日颗粒细胞FSHR蛋白的表达。结果 TEAS组患者的临床妊娠率为51.52%,明显高于对照组的27.28%,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,TEAS组和对照组的获卵数分别为 (3.33 ± 1.05) 个、 (2.73 ± 1.21) 个,优质胚胎率分别为54.29%和34.15%,颗粒细胞FSHR蛋白表达分别为 0.75 ± 0.17 、 0.55 ± 0.12 ,两组上述指标比较差异均有统计学意义($P<0.05$);TEAS组和对照组的受精率分别为75.79%和73.23%,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 TEAS疗法可能通过调控卵巢颗粒细胞FSHR的表达,促进卵母细胞发育,提高卵母细胞质量,改善IVF中POI患者的妊娠结局。

【关键词】 经皮穴位电刺激;体外受精-胚胎移植;早发性卵巢功能不全;卵母细胞质量;卵泡刺激素受体

【中图分类号】 R711.75 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)08-0960-03

Effect of transcutaneous electric acupoint stimulation on oocyte quality and follicle-stimulating hormone receptor expression in patients undergoing *in vitro* fertilization with premature ovarian insufficiency. SHUAI Zhen-hong¹, LI Xue-mei¹, ZHANG Wan-jing¹, YANG Zhuo-xin². 1. Center for Reproductive Health, Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen 518017, Guangdong, CHINA; 2. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518021, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the effects of transcutaneous electric acupoint stimulation (TEAS) on oocyte quality and follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) expression of premature ovarian insufficiency (POI) patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Methods** A total of 66 POI women receiving IVF treatment at Center for Reproductive Health of Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital Affiliated to Southern Medical University from May 2018 to October 2018 were selected and randomly divided into the TEAS group and the control group, with 33 cases in each group. The patients in the TEAS group were treated by electronic acupuncture once every other day from the day of gonadotropin (Gn) injection to the day of hCG injection. The patients in the control group were treated with placebo as from the day of Gn injection to the day of hCG injection. The time, course of treatment and acupoint selection were the same as those in the TEAS group. The number of oocytes retrieved, rate of fertilization, high-quality embryos, and the clinical pregnancy between the two groups were observed and compared, and the expression of FSHR protein in the granulosa cells was detected by Western blot. **Results** The clinical pregnancy rate of the TEAS group was 51.52%, which was significantly higher 27.28% of the control group ($P<0.05$). After the treatment, the number of oocytes retrieved, rate of high-quality embryos, FSHR protein expression in granulosa cells of the TEAS group were 3.33 ± 1.05 , 54.29%, 0.75 ± 0.17 , versus 2.73 ± 1.21 , 34.15%, 0.55 ± 0.12 of the control group (all $P<0.05$). The fertilization rates in the TEAS group and control group were 75.79% and 73.23%, respectively. There was no significant difference in the rate of fertilization between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** TEAS can regulate the expression of FSHR in granulosa cells, promote oocyte development, improve oocyte quality, and then improve the pregnancy outcome in IVF patients with POI.

【Key words】 Transcutaneous electric acupoint stimulation (TEAS); *In vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET); Premature ovarian insufficiency (POI); Oocyte quality; Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)

早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是女性在40岁之前出现卵巢功能衰退的临床综合征,以月经紊乱同时伴有高促性腺激素和低

雌激素为特征性表现。卵巢功能通过卵巢内储存的卵泡来体现,POI妇女由于功能性卵泡的丧失,面临不孕、围绝经期症状等一系列问题,严重影响女性身心

基金项目:广东省深圳市卫生计生系统科研项目(编号:SZFZ2018043);中国博士后基金(编号:2018M643206)

通讯作者:杨卓欣, E-mail:562599739@qq.com

健康和生活质量^[1]。卵泡刺激素受体(FSHR)属于G蛋白偶联受体超家族成员之一,存在于卵巢的颗粒细胞中,通过与卵泡刺激素(FSH)结合后激活cAMP/PKA通路下游区信号级联放大,使颗粒细胞增殖分化加快,促进卵泡的发育和成熟。大量研究显示,针刺可以良性调节女性下丘脑-垂体-卵巢轴(HPOA),使基础内分泌激素水平趋于正常^[2]。本研究旨在观察经皮穴位电刺激(transcutaneous electric acupoint stimulation, TEAS)对行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的POI患者卵母细胞质量及颗粒细胞FSHR表达的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年5~10月在南方医科大学深圳妇幼保健院生殖医学中心接受IVF治疗的POI妇女66例,按照随机数表法分为TEAS组和对照组各33例。POI的诊断标准参照欧洲人类生殖与胚胎学会指南2016版^[3]:(1)40岁之前月经稀发或闭经至少4个月以上;(2)连续两次血清基础FSH>25 IU/L(间隔>4周)。纳入标准:(1)符合POI诊断标准;(2)年龄27~39岁,体质指数(BMI)18~24 kg/m²;(3)签署知情同意书。排除标准:(1)生殖道解剖结构异常不能正常妊娠者;(2)生殖内分泌异常;(3)多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症等;(4)患有严重躯体、精神疾患不能承受妊娠者。两组患者的年龄、不孕年限、BMI、抗苗勒氏管激素(AMH)基本资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。

表1 两组患者的基本资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	平均年龄(岁)	不孕年限(年)	BMI(kg/m ²)	AMH(ng/mL)
TEAS组	33	31.48±4.03	4.18±1.91	22.13±1.72	0.70±0.18
对照组	33	32.94±4.06	4.21±1.14	21.42±1.42	0.68±0.19
<i>t</i> 值		1.459	0.078	1.826	0.321
<i>P</i> 值		0.150	0.938	0.072	0.749

1.2 治疗方法

1.2.1 TEAS组 采用常规短方案进行控制性超促排卵(COH)。自促性腺激素(Gn)启动日起给予SDZ-II电子针疗仪治疗直至绒毛膜促性腺激素(HCG)日结束,将电极片贴于天枢、关元、子宫、三阴交、命门、肾俞、腰阳关穴上,设置电流强度为20~25 mA,频率为2 Hz,每周3次,每次20 min。然后进行常规取卵和IVF-ET。

1.2.2 对照组 COH方案与TEAS组一致。自Gn启动日起给予安慰针治疗,将25 mm长的毫针减去0.5寸,打磨断面使其平滑并穿于橡胶片上,制成安慰针贴于穴位上,用胶布固定。原理:模拟毫针刺法但不刺破患者表皮,仅起安慰针效果,无实际治疗作用。治疗时间、疗程及穴位选择均与TEAS组相同。

1.3 观察指标

1.3.1 临床结局指标 比较两组患者的获卵数、受精率、优质胚胎率和临床妊娠率。显微镜下观察M

II 卵母细胞数即为获卵数。采用微滴法受精,16~19 h后显微镜观察原核形成情况,2个原核即为正常受精。受精72 h后观察胚胎发育情况,7~9个细胞及碎片<10%的为优质胚胎。ET后30 d阴道B超见胎芽及胎心者为临床妊娠。

1.3.2 颗粒细胞FSHR蛋白的表达 取卵后留取M II 卵母细胞的卵泡液,提取颗粒细胞,用蛋白印迹法(Western blot)测定。采用Image J软件分析,目的蛋白的表达量=目的蛋白灰度值/ β -actin灰度值。

1.4 统计学方法 应用SPSS20.0软件包分析数据,计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本*t*检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的临床结局指标比较 TEAS组患者的获卵数为(3.33±1.05)个,高于对照组的(2.73±1.21)个,差异有统计学意义($t=2.177, P<0.05$);TEAS组优质胚胎率及临床妊娠率均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);但两组患者的受精率比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 两组患者的临床结局指标比较[例(%)]

组别	例数	受精率	优质胚胎率	临床妊娠率
TEAS组	33	25 (75.76)	18 (54.55)	17 (51.52)
对照组	33	24 (73.73)	11 (33.33)	9 (27.27)
χ^2 值		0.116	4.212	4.062
<i>P</i> 值		0.733	0.040	0.044

2.2 两组患者的颗粒细胞FSHR蛋白表达比较 与对照组的0.55±0.12比较,TEAS组FSHR蛋白表达(0.75±0.17)明显升高,差异有统计学意义($t=3.326, P<0.05$),见图1。

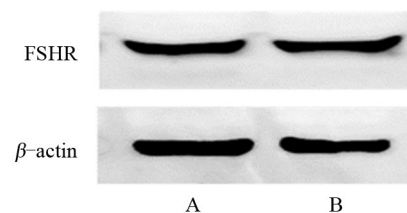


图1 两组颗粒细胞FSHR蛋白表达电泳图

注:A, TEAS组;B, 对照组。

3 讨论

POI曾被称为卵巢早衰(premature ovarian failure, POF),是困扰育龄期女性的疑难病症。据有关数据显示,40岁之前女性POI的发生率为1%左右。POI患者除月经紊乱、不孕等症状外,还会因低雌激素状态而出现骨质疏松和围绝经期综合征的相关症状,如失眠、抑郁、焦虑等精神神经症状,潮热、出汗等血管舒缩症状,以及阴道干涩、性交痛、尿频尿急等泌尿生殖系统症状,严重影响女性身心健康。目前,POI的病因病机尚不明了,主要认为与遗传、免疫、放疗化疗、手术损伤、感染、精神、生活方式等因素有关。现代医学

针对POI的治疗手段主要为激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT),能明显改善患者性激素水平及月经症状,但并不能特异性地改善POI患者卵巢功能^[4]。对于育龄期的POI患者而言,尽管有50%的患者可能存在卵巢功能间断性恢复的可能,但也无法预料^[5],大部分POI女性仍需寻求辅助生殖技术(assisted reproduction technology, ART)的帮助。IVF临床医生尝试各种促排卵方案诱发POI排卵,但目前尚未有确切证据表明其效果^[6]。POI患者中有5%左右可能自然妊娠,但大多数仍需要通过赠卵结合ART治疗。然而,卵子捐献来源非常有限,同时还要面临医学伦理学的有关规定。POI患者由于卵巢功能衰退或丧失,导致卵泡生长发育异常或提前耗竭,又大大增加了ART难度。因此,寻找新的POI治疗方法显得尤为重要。

本研究采用的TEAS疗法是对中医传统手捻针刺治疗的改良,其是以电刺激信号代替机械刺激,通过皮肤表面的电极片向腧穴输入脉冲电流发挥疗效,因其具有疼痛小且无创的优点,而且可以产生强度、频率固定的针刺刺激并可以进行定量描述,大大节省了针灸治疗的时间,而且与传统针刺相比明显减少了对局部皮肤及组织的损伤,易于被患者接受,越来越受到临床医生和患者的喜爱,亦被广泛应用于IVF领域。现代研究表明,TEAS可以调节女性下丘脑-垂体-卵巢轴,改善卵巢局部微环境。有研究证实,TEAS可通过提高血清中的干细胞因子水平,抑制颗粒细胞凋亡,提高卵母细胞和胚胎质量,进而改善IVF结局^[7]。

中医古籍并无POI病名的记载,但在《内经》中便可见“早衰”一词,书中不仅提出了“早衰”的病名,也明确了早衰的年龄界定为四十岁,与现代医学对POI的定义不谋而合。根据其临床特点,认为可归属于“月经稀发、闭经、不孕”等妇科病范畴。中医理论指出,“经水出诸肾”,肾气的盛衰与摄精成孕直接相关,故肾虚是POI发生的根本。“妇人以血为本,以血为用”,冲为血海、任主胞胎,脏腑之血皆归冲脉,故冲任失调是POI发生的关键。因此,本研究选取子宫、三阴交、命门、肾俞为主穴,配用天枢、关元、腰阳关滋肾益精、通调气血。动物实验表明,中药补肾调冲方可提高卵巢早衰大鼠血清AMH水平,恢复早衰的卵巢组织,促卵泡生长发育^[8]。

颗粒细胞是卵泡的主要功能单位,对卵母细胞的生长发育及排卵环节都起着重要的调控作用,颗粒细胞的异常过度凋亡可引起卵泡闭锁^[9]。在COH过程中,卵巢内存在局部调节机制参与卵泡发育的调节,其中Gn对卵泡成熟是必需的,它可以调节颗粒细胞的增殖分化,其中FSH是最为重要因素之一^[10]。FSH是垂体前叶分泌的糖蛋白激素,通过与定位于颗粒细胞的特异性FSHR结合,激活下游的cAMP/PKA信号通路,刺激P450芳香化酶转录活化,加速颗粒细胞的增殖和分化,诱导雌激素生成和卵泡发育^[11]。有研究显示,优势卵泡与未成熟卵泡相比存在更多的FSHR

表达,使颗粒细胞对FSH的敏感性提高至少4倍以上。若FSHR发生突变,其调控的信号传导途径也会随之改变,影响性腺的正常生理功能,临床上通常表现为性腺功能不全或性腺功能亢进。动物研究证实:FSHR基因敲除的小鼠双侧卵巢体积变小,卵泡发育停滞,生育力明显降低^[12]。

本研究结果表明,TEAS组患者的获卵数、优质胎率和临床妊娠率均明显高于对照组,说明TEAS疗法在提高POI妇女卵母细胞及胚胎质量方面效果显著。与对照组相比,TEAS组患者FSHR蛋白含量明显升高,说明TEAS疗法可能通过调控颗粒细胞增殖相关蛋白FSHR的表达,使颗粒细胞增殖分化加快,从而促进雌激素合成和卵泡生长和发育,提高卵母细胞质量,改善IVF中POI患者的卵巢功能及妊娠结局,TEAS联合西药治疗有望成为改善高龄IVF患者临床结局的新方法。

参考文献

- [1] CRAWFORD NM, STEINER AZ. Age-related infertility [J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2015, 42(1): 15-25.
- [2] LI J, NG EH, STENER-VICTORIN E, et al. Comparison of acupuncture pretreatment followed by letrozole versus letrozole alone on live birth in anovulatory infertile women with polycystic ovary syndrome: a study protocol for a randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2017, 7(6): e010955.
- [3] THE ESHRE GUIDELINE GROUP ON POI, WEBBER L, DAVIES M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(5): 926-937.
- [4] 张炜. 激素替代疗法的利与弊[J]. *上海医药*, 2009, 30(5): 202-203.
- [5] KOKCU A. Premature ovarian failure from current perspective [J]. *Gynecological Endocrinology*, 2010, 26(8): 555-562.
- [6] BAKER V. Life plans and family-building options for women with primary ovarian insufficiency [J]. *Semin Repro Med*, 2011, 29(4): 362-372.
- [7] LI J, CUI W, SUN W, et al. Effect of electroacupuncture on egg quality and tumecrosis factor of patients with polycystic ovarian syndrome [J]. *World Journal of Acupuncture-Moxibustion*, 2014, 24(3): 9-15.
- [8] 徐文君, 高慧, 李杨. 中药补肾调冲方治疗模型大鼠卵巢早衰相关性研究[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2016, 19(11): 1601-1606.
- [9] ZHANG GL, SUN XF, FENG YZ, et al. Zearalenone exposure impairs ovarian primordial follicle formation via down-regulation of Lhx8 expression *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 317(6): 33-40.
- [10] ZHANG R, ZHANG S, ZHU X, et al. Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in Chinese alligator, *alligator sinensis*: molecular characterization, tissue distribution and mRNA expression changes during the female reproductive cycle [J]. *Animal Reproduction Science*, 2015, 35(156): 40-50.
- [11] XIONG Y, LIU T, WANG S, et al. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway [J]. *Gene*, 2017, 596(5): 1-8.
- [12] HUNZICKER-DUNN M, MAIZELS ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(9): 1351-1359.

(收稿日期:2019-01-30)