· 临床论著 ·

电针对痰湿型多囊卵巢综合征患者体外受精结局及差异基因表达的影响

刘丹琪[1] 相 珊[1] 连 方[2]

摘要 目的 基于基因组学对痰湿型多囊卵巢综合征（PCOS）患者进行差异基因筛选，探讨电针治疗对痰湿型 PCOS 患者体外受精－胚胎移植（IVF-ET）结局及差异基因表达的影响。**方法** 随机选取拟行 IVF-ET 10 例痰湿型 PCOS 患者和 10 例单纯因男性因素不孕女性。收集两组患者卵巢颗粒细胞，并提取 RNA，采用高通量测序技术分析基因表达谱，筛选差异表达基因并进行验证。选择痰湿型 PCOS 患者 60 例，按随机数字表法分为电针治疗组和对照组，每组 30 例。两组患者分别接受电针治疗和伪针刺激，每周 2 次，至扳机日。收集卵巢颗粒细胞，运用实时荧光定量 PCR 技术验证痰湿型 PCOS 差异基因的表达。比较两组患者的胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）、受精率、优质胚胎率和临床妊娠率。**结果** （1）与单纯因男方因素不孕女性比较，痰湿型 PCOS 患者共检测到 596 个差异表达的基因（$P<0.05$），其中血栓反应蛋白 -1（THBS1）等 433 个基因表达上调（FC>2），葡萄糖转运蛋白 4 型（GLUT4）等 163 个基因表达下调（FC<0.5）。（2）两组患者受精率和临床妊娠率比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。电针治疗组治疗后 HOMA-IR 较治疗前显著降低（$P<0.05$）。与对照组比较，电针治疗组优质胚胎率提高，GLUT4 mRNA 表达上调，THBS1 mRNA 表达下调（$P<0.05$）。**结论** 痰湿型 PCOS 患者存在基因差异表达，GLUT4 表达受到抑制，THBS1 表达增加。电针治疗可能通过上调 GLUT4，下调 THBS1，从而改善胰岛素抵抗状态，进而提高 PCOS 患者卵细胞的质量，最终改善妊娠结局。

关键词 电针治疗；多囊卵巢综合征；基因组学；体外受精－胚胎移植；葡萄糖转运蛋白 4 型

Effects of Electroacupuncture on *In-Vitro* Fertilization Outcomes and Differential Gene Expression in Polycystic Ovary Syndrome Patients with Phlegm-damp Syndrome

LIU Dan-qi[1], XIANG Shan[1], and LIAN Fang[2] *1 First Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355); 2 Reproductive Center, Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011)*

ABSTRACT Objective To study the effect of electroacupuncture (EA) on *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) outcomes and differential gene expressions in polycystic ovary syndrome (PCOS) patients with phlegm-damp syndrome (PDS) by genomics-based screening of differential genes in them. **Methods** Ten PCOS patients with PDS and 10 infertile women with pure male factor for IVF-ET were selected. Their ovarian granulosa cells were collected and RNA samples prepared. High-throughput sequencing technology was used to analyze the gene expression profiles. The differentially expressed genes were verified Sixty PCOS patients with PDS were assigned to EA group and control group according to random number table, 30 patients in each group. Patients received EA therapy and placebo needling respectively till human chorionic gonadotrophin (HCG) injection day, twice a week. The granulosa cells were collected. The differential gene expressions of PDS PCOS were evaluated step by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). Homeostasis model assessment-

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81774355）；山东省重大科技创新工程（No.2018CXGC1302）；山东省自然科技基金项目（No.ZR2019QH013，No.ZR2016HP29）

作者单位：1. 山东中医药大学第一临床医学院（济南 250355）；2. 山东中医药大学附属医院生殖中心（济南 250011）

通讯作者：连 方，Tel：0531-68617980，E-mail：lianfangbangong@163.com

DOI：10.7661/j.cjim.20220720.303

中国中西医结合杂志

insulin resistance（HOMA-IR），fertilization rate，high-quality embryo rate，and clinical pregnancy rate were also compared. **Results** （1）Compared with women with pure male factor infertility，596 differentially expressed genes were detected in PCOS patients with PDS（$P<0.05$），including 433 up-regulated genes such as THBS1（FC>2），and 163 down-regulated genes such as glucose transporter 4（GLUT4，FC<0.5）.（2）There was no significant difference in fertilization rate or clinical pregnancy rate between the two groups（$P>0.05$）. HOMA-IR was significantly lowered after treatment in the EA group（$P<0.05$）. Compared with the control group，the high-quality embryo rate significantly increased（$P<0.05$），the expression of GLUT4 mRNA was up-regulated and the expression of thrombospondin 1（THSB1）mRNA was down-regulated in EA group（$P<0.05$）. **Conclusions** Differential expression of genes existed in PCOS patients with PDS. The expression of GLUT4 was inhibited and that of THBS1 was enhanced. EA improved insulin resistance possible by up-regulating GLUT4 expression and down-regulating THBS1 expression，therefore，the quality of oocytes in PCOS patients could be improved，and the pregnancy outcome eventually improved.

KEYWORDS electroacupuncture；polycystic ovary syndrome；genomics；*in vitro* fertilization embryo transfer；glucose transporter 4

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）是育龄期女性不孕的常见原因之一。其患病率约为 5%~10%[1]，其中 30%~75% 的患者存在超重现象[2]。外周组织中有限的脂肪储存能力被认为是胰岛素抵抗（insulin resistance，IR）的关键因素之一[3]，研究表明大多数 PCOS 患者存在 IR[4]。笔者在临床发现，肥胖患者易出现痰湿证候，而肥胖型 PCOS 患者往往为痰湿体质，脂代谢异常是形成“痰湿”的重要原因。有研究发现，PCOS 会加重肥胖对 IR 的不良影响[5]。比较不同类型 PCOS 患者促排卵结局发现，痰湿型患者促排卵结局和临床妊娠率均明显低于其他证型[6]，这提示痰湿型 PCOS 患者可能存在更明显的生殖内分泌异常或代谢功能障碍。近年来，生殖医学也进入了后基因组时代。Hou Y 等[7]完成了人类单个卵母细胞的高精度全基因组测序，对植入前的基因筛查具有重要意义，其应用可有效减少先天性遗传缺陷婴儿的出生。同济大学和南京医科大学的研究小组利用单细胞 RNA 测序技术分析哺乳动物早期胚胎发育不同阶段基因转录组的动态变化[8]。第一次全基因组关联分析研究和对汉族人群[9, 10]的跟踪调查，将胰岛素受体底物（insulin receptor，INSR）、促黄体生成激素（luteinizing hormone，LH）/ 绒毛膜促性腺激素受体 chorionic gonadotropin receptor，CGR）、促卵泡激素受体（follicle stimulating hormone receptor，FSHR）等基因作为 PCOS 候选基因，使 PCOS 的基因组学研究能够开拓新的方向。PCOS 发病机制复杂，表现出强大的基因调控和中医证型的多样性。临床上最常见的痰湿证型具有较高的识别度，利用基因组学研究方法，可以筛选出 PCOS 痰湿证候具有的特异性标志物。在治疗干预方面，本团队运用现代科技手段，在规范、客观科学的基础上，诠释治疗 PCOS 的中医证候内涵。

资料与方法

1　诊断标准

1.1　PCOS 诊断标准　参照鹿特丹诊断标准[11]及《多囊卵巢综合征中国诊疗指南》[12]制定，满足以下 3 个特征中的 2 个即可诊断：（1）少排卵或无排卵；（2）高雄激素血症的临床和（或）生化体征；（3）B 超表现为多囊卵巢。

1.2　痰湿证诊断标准　参照《中西医结合妇产科学》[13]及《中医病症诊断疗效标准》[14]拟定如下：（1）月经周期延迟，或逐渐闭经；经血颜色淡；婚后长期不孕；（2）超重；（3）腹部肿胀不健康，经常腹泻或月经腹泻；（4）阴道分泌物过多；（5）舌色苍白肥硕，苔薛白腻；（6）脉滑尺弱。满足条件（1）和（2）~（6）中的任意 3 项即可诊断。

2　纳入标准　（1）符合 PCOS 及中医痰湿证诊断标准；（2）过去 2 个月经周期未使用含激素药物者；（3）年龄 22~40 岁；（4）签署知情同意书。

3　排除标准　（1）严重疾病不能接受辅助生殖技术治疗的患者；（2）见针即晕厥患者；（3）不能配合治疗的患者。

4　一般资料　80 例均为 2018 年 1—11 月于山东中医药大学附属医院生殖与遗传综合医学中心拟行体外受精 – 胚胎移植（*in vitro* fertilization-embryo transfer，IVF-ET）患者，其中 10 例为单纯因男方因素导致不孕，作为正常对照组（简称正常组）。首先随机选取痰湿型 PCOS 患者 10 例（痰湿组）用于

与正常组进行差异基因筛查。然后采用随机数字表法将 60 例痰湿型 PCOS 患者分为电针治疗组及对照组，每组各 30 例，两组患者年龄、不孕年限、体重指数（body mass index，BMI）、原发不孕人数、基础促卵泡激素（basic follicle-stimulating hormone，bFSH）、基础促黄体生成素（basic luteinizing hormone，bLH)、睾酮（testosterone，T）、基础窦卵泡数、胰岛素抵抗指数（homeostasis model assessment-insulin resistance，HOMA-IR）比较（表 1），差异无统计学意义（P>0.05）。本研究经山东中医药大学附属医院生殖医学伦理委员会批准（No.20180201M），并在中国临床试验注册中心注册（No.ChiCTR1800015453）。

5 方法

5.1 差异基因筛选 采用黄体期短效长方案，应用高通量测序技术筛选痰湿型PCOS患者的标志基因。两组患者在 IVF-ET 前 1 个月经周期第 3~5 天口服炔雌醇环丙孕酮片（达英 -35，成分：每片含 2 mg 醋酸环丙孕酮和 0.035 mg 炔雌醇，德国先灵公司，批号：H20170209），每天 1 粒，共 21 天；根据患者情况，自黄体期皮下注射醋酸曲普瑞林（达必佳，每支 0.1 mg，法国博福益普生制药有限公司，批号：H20160237）14~18 天进行降调节。达到降调标准后，给予患者重组人促卵泡激素注射液（果纳芬，每支 600 U，瑞士雪兰诺公司，批号：AU023076）和（或）皮下注射注射用尿促性腺激素（human menopausal gonadotrophin，HMG，每支 75 U，珠海丽珠集团丽宝生物化学制药公司，批号：H1094009）。在此期间，进行B超和血清性激素检测，动态观察卵泡发育情况。当有 3 个及以上卵泡直径达到 1.8 cm 时，予 8 000~10 000 IU 人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，HCG，每支 2 000 U，珠海丽珠集团丽宝生物化学制药公司，批号：H44020674）扳机。36 h 后在 B 超引导下行经阴道穿刺取卵术。

5.2 电针治疗 按国际相关随机对照研究标准[15]进行电针治疗。两组患者均采用达英 -35 加黄体期短效长方案，电针治疗组每周接受 2 次电针治疗，每次 25 min，直至扳机日。电针穴位选择中脘、天枢、大横、带脉、气海、关元、血海、丰隆、足三里和阴陵泉。具体操作：常规消毒后用华佗牌 30×40 mm 毫针（中国苏州医疗用品厂有限公司）针刺治疗，得气后，连接汉斯 -100A 电针治疗仪（中国南京根森医疗科技有限公司）的正负极。频率为 2Hz，电流 20~25 mA，持续 25 min。对照组选穴与电针治疗组相同，常规消毒后用安慰剂针刺法（将与电针治疗组规格相同的毫针截为 20 mm 长，打磨针尖后贴在橡胶板上）进行“针刺”（采用模拟毫针刺法，使患者只感觉针头，不刺穿皮肤），用胶带将橡胶片固定在针体上，接电极线，电针治疗仪设置关闭状态，留置 25 min。

6 卵巢颗粒细胞收集 取卵时收集第一管成熟卵泡的浅黄色、近乎透明的卵泡液。离心（2 000 r/min，5 min），保留沉淀。将 3 mL PBS（0.01%）加入沉淀液中，取 15 mL 离心管，加入 5 mL 人淋巴细胞分离液，然后将沉淀混悬液缓慢加入人淋巴细胞分离液并保持液面分层，离心（1 500 r/min，20 min）后在两层之间提取颗粒细胞。转移后加入 PBS，-80 ℃冻存。

7 RNA 提取及 RNA-seq 高通量测序数据分析 RNA 提取采用 Trizol 法对样本进行提取纯化。高通量测序部分由杭州联川生物技术股份有限公司实施。使用 Hiseq 4000（第二代 RNA-seq 高通量测序

表 1 两组一般资料比较

项目	电针治疗组（30 例）	对照组（30 例）	P 值
年龄（岁，$\bar{x}\pm s$）	32.82 ± 5.43	31.67 ± 5.39	0.41
BMI（kg/m^2，$\bar{x}\pm s$）	29.14 ± 7.81	28.93 ± 8.27	0.91
不孕年限（年，$\bar{x}\pm s$）	3.11 ± 2.46	3.08 ± 2.27	0.96
原发不孕人数 [例（%）]	13（43.33）	14（46.67）	0.79
bFSH（mIU/mL）	6.61 ± 2.72	5.87 ± 1.24	0.66
bLH（mIU/mL）	7.37 ± 3.52	6.91 ± 2.23	0.54
T（ng/mL）	0.66 ± 0.14	0.64 ± 0.35	0.61
基础窦卵泡数（个，$\bar{x}\pm s$）	19.33 ± 10.21	21.25 ± 9.64	0.46
HOMA-IR（$\bar{x}\pm s$）	3.44 ± 1.11	3.51 ± 1.31	0.82
吸烟 [例（%）]	6（20.0）	5（16.7）	0.73
甘油三酯（mmol/L，$\bar{x}\pm s$）	0.83 ± 0.27	0.75 ± 0.24	0.23
总胆固醇（mmol/L，$\bar{x}\pm s$）	3.63 ± 1.70	4.01 ± 1.41	0.34

中国中西医结合杂志

技术）对合格 RNA 样本进行高通量测序。利用公共生物学数据库提供的检索程序对差异表达基因进行分析，并利用基因本体论（gene ontology，GO）对差异表达基因进行注释，利用公共数据库京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）进行路径分析。

8　差异 mRNA 水平检测　采用实时荧光定量 PCR 技术，将所筛选出的差异表达 RNA 进行进一步验证。RNA 反转录反应条件：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，然后在 4 ℃下合成 cDNA。使用罗氏 LightCycler 480 Ⅱ进行荧光定量 PCR 扩增。反应条件为：95℃修饰 5 s，95℃变性 10 s，60℃退火 10 s，72℃延伸 1 次，45 个周期；95 ℃修饰 5 s，65 ℃延伸 60 s，97 ℃灭活酶，40 ℃冷却 10 s。使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算相对表达量，每个靶基因做 3 次重复。根据所选的标记基因合成引物。

9　测量血糖及胰岛素水平并计算 HOMA-IR　治疗前和取卵日采集空腹患者肘静脉血，使用氧化酶法检测空腹血糖（fasting plasma glucose，FBG）水平，使用化学发光法检测空腹胰岛素（fasting insulin，FINS）水平，利用公式 HOMA-IR=FPG × FINS/22.5 计算 HOMA-IR。检测由山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心检验室完成。

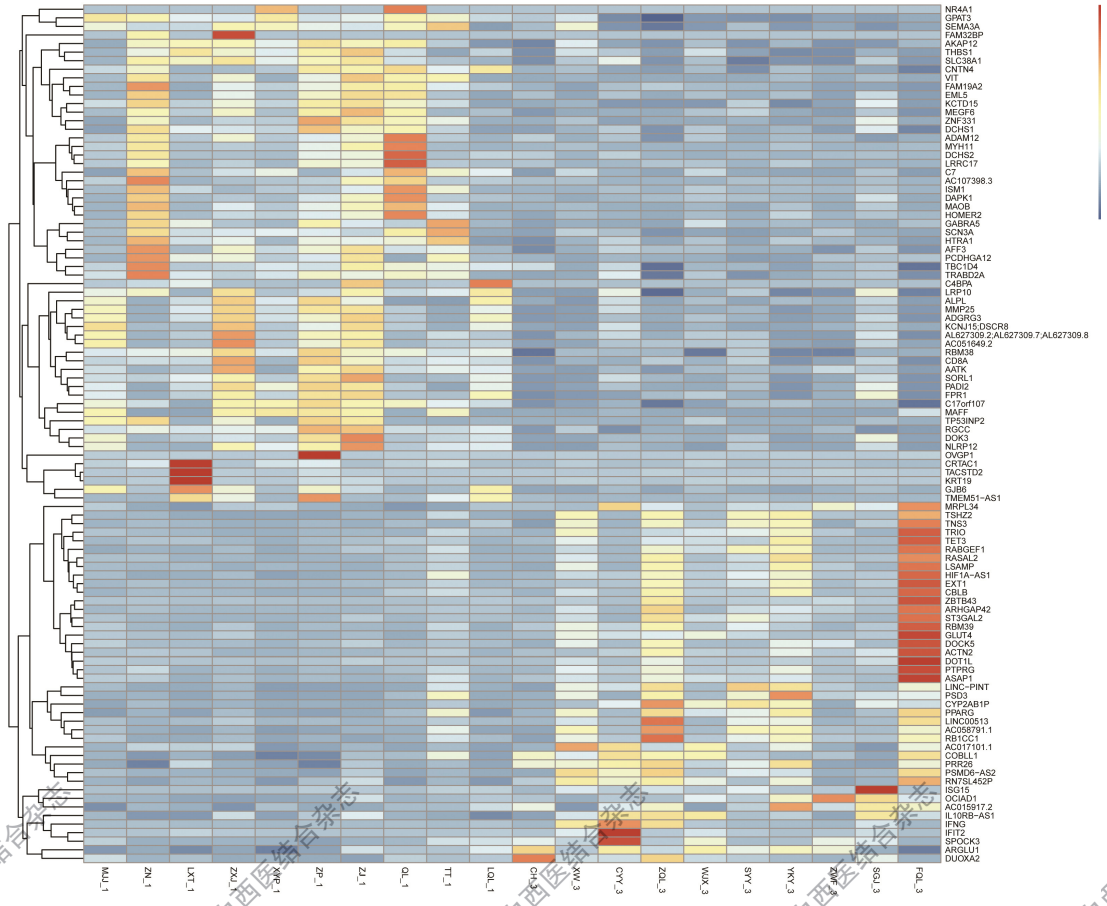
10　受精率、优质胚胎率、临床妊娠率计算　受精率（%）= 双原核（2PN）受精卵数 / 卵母细胞总数 × 100%；优质胚胎率（%）=（Ⅰ级 + Ⅱ级）胚胎数 / 胚胎总数 ×100%；临床妊娠率（%）= 临床妊娠例数 / 移植总例数 ×100%。

11　统计学方法　采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，若数据满足正态性，独立组间比较采用独立样本 t 检验；两组间率的比较采用四格表 *Pearson* χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1　RNA-seq 高通量测序数据分析

1.1　痰湿型 PCOS 患者和正常组女性的差异表达基因（图 1）　通过高通量测序，筛选出 596 个的差异表达基因（$P<0.05$），其中血栓反应蛋白 -1（thrombospondin 1，THBS1）等 433 个基因表达上



注：X 轴表示不同样本，Y 轴表示差异表达的基因。颜色越浅，表达量越低；颜色越深，表达量越高

图 1　差异表达基因的表达量比较

中国中西医结合杂志

调［差异倍数（fold change，FC）>2］，葡萄糖转运蛋白 4 型（glucose transporter 4，GLUT4）等 163 个基因表达下调（FC<0.5）。

1.2　痰湿型 PCOS 患者和正常组女性差异表达基因的 GO 功能注释（图 2）　痰湿型 PCOS 患者与正常组筛选出 596 个差异有统计学意义的基因。GO 功能注释分析发现差异表达基因涉及 33 个生物学过程（P<0.05，基因数 >5），其中包括细胞因子 – 细胞因子受体相互作用、生殖免疫、细胞增殖、转录调控、炎症反应和免疫反应等。

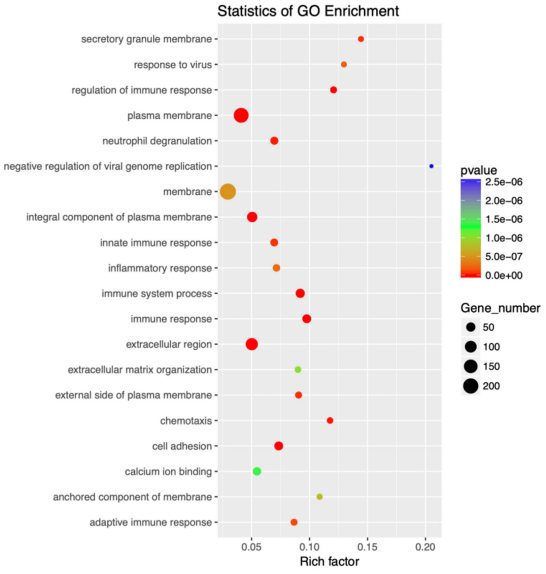


图 2　两组差异基因 GO 富集分析图

1.3　痰湿型 PCOS 患者与正常组女性差异表达基因 KEGG 通路分析（图 3）　基于测序结果，应用 KEGG 公共数据库进行信号通路的富集性分析，发现共涉及 31 个生物学过程（P<0.05，基因数 >5），其中包括 Ras 相关蛋白 -1（Ras-associated protein 1，Rap1）信号通路、胰岛素代谢途径和转化生长因子（transforming growth factor，TGF）信号通路等。

2　两组组受精率、优质胚胎率、临床妊娠率比较（表 2）　与对照组比较，电针治疗组优质胚胎率有显著提高（χ^2 = 4.73，P<0.05），受精率和临床妊娠率略高于对照组，但差异无统计学意义（χ^2 分别为 0.27、0.60，P>0.05）。

3　两组治疗前后 HOMA-IR 比较（表 3）　电针

表 2　两组受精率、优质胚胎率和临床妊娠率比较　（%）

组别	例数	受精率	优质胚胎率	临床妊娠率
电针治疗	30	71.25（399/560）	40.89（119/291）*	53.33（16/30）
对照	30	69.84（396/567）	32.17（92/286）	43.33（13/30）

注：与对照组比较，*P<0.05

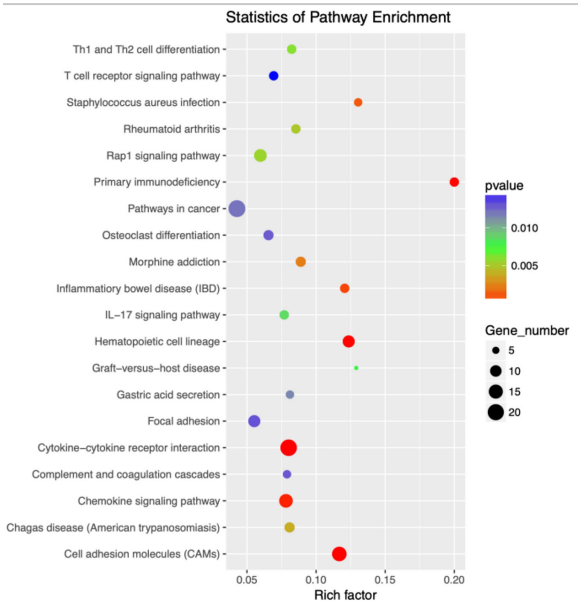


图 3　两组差异基因 KEGG 通路富集分析图

治疗组治疗后 HOMA-IR 显著降低，差异有统计学意义（t=2.23，P<0.05），对照组治疗前后 HOMA-IR 差异无统计学意义（t=0.67，P>0.05）。

表 3　两组治疗前后 HOMA-IR 比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	HOMA-IR	
		治疗前	治疗后
电针治疗	30	3.23 ± 0.97	2.71 ± 0.83*
对照	30	3.14 ± 1.01	2.97 ± 1.05

注：与本组治疗前比较，*P<0.05

4　两组患者颗粒细胞中 THBS1、GLUT4 mRNA 表达水平比较（表 4）　电针治疗组 THBS1 mRNA 表达较对照组降低，GLUT4 mRNA 表达较对照组提高，差异均有统计学意义（t 分别为 2.73、3.87，P<0.05）

表 4　两组 THBS1、GLUT4 mRNA 表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	THBS1 mRNA	GLUT4 mRNA
电针治疗	30	0.80 ± 0.40*	1.26 ± 0.36*
对照	30	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

注：与对照组比较，*P<0.05，

讨　论

PCOS 是一种育龄期女性常见的以生殖功能障碍和糖、脂代谢异常为特征的疾病，是不孕的主要原因之一。临床上半数 PCOS 患者伴有肥胖症状，许多临床研究已证实肥胖 PCOS 患者比非肥胖 PCOS 患者有更严重的代谢紊乱。传统观念认为“肥胖者易生痰湿”，肥胖 PCOS 患者多为痰湿型体质，脂代谢异常为“痰湿”的发生提供了重要依据。中医学认为脾

中国中西医结合杂志

虚痰湿互结是肥胖 PCOS 的根本病机，患者多同时伴有乏力、痰多、身体困重、肥胖等症状。

基于高通量测序技术发现，与单纯男方因素不孕女性相比，痰湿型 PCOS 患者中 596 个基因表达有差异。其差异表达基因主要涉及细胞因子 – 细胞因子 – 受体相互作用、生殖免疫、细胞增殖、转录调控、炎症反应和免疫应答等生物学过程。基于 KEGG 公共数据库进行分析发现，差异表达基因涉及 Rap1 信号通路、胰岛素代谢通路、TGF 信号通路等多个信号通路。在差异表达及基因中，与胰岛素抵抗相关的 THBS1 mRNA 在痰湿型 PCOS 患者中表达上调，GLUT4 mRNA 则表达下调。THBS1 参与调节血管内皮细胞的黏附、迁移和增殖，以及血管生成 [16，17]，同时也是 TGF 信号通路的重要调节因子 [18-20]，有研究人员发现 THBS1 在 IR 的发病机制中起着重要作用 [21]。THBS1 在肥胖和 IR 患者中的表达显著增加，而在饮食诱导肥胖小鼠模型中，靶向和阻断 THBS1 的表达则会显著改善胰岛素抵抗状态 [22，23]。GLUT4 是磷脂酰肌醇 3 激酶 / 丝氨酸苏氨酸激酶（phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）信号通路的一个重要下游分子，可以加速葡萄糖从细胞外到细胞内的跨膜转运，GLUT4 的基因转录及转位等任何一个环节出现障碍都可引起外周组织胰岛素抵抗 [24]，细胞膜上缺乏 GLUT4 代表胰岛素抵抗的早期阶段 [25]。

在本研究中，笔者参考文献 [26] 选取了中脘、天枢、大横、带脉、气海、关元、血海、丰隆、足三里和阴陵泉作为干预点。气海、关元具有固本、养元气的作用；中脘、天枢、大横具有运谷运水、固脉、化瘀的作用；丰隆、阴陵泉具有清湿化痰的作用；足三里具有健脾益气的功效 [27]。诸穴配合使用，达到“通脉调脾胃”的效果。与对照组比较，电针治疗组受精率和临床妊娠率呈上升趋势，电针治疗组优质胚胎率显著高于对照组（$P<0.05$），电针治疗组 GLUT4 mRNA 表达上调，THBS1 mRNA 表达下调（$P<0.05$）。其原因可能是穴位电针治疗刺激中枢神经，抑制卵巢颗粒细胞 THBS1 的过度表达，同时促进 GLUT4 的表达，改善 PCOS 患者的胰岛素抵抗状态，从而改善卵母细胞的质量。

综上所述，痰湿型 PCOS 的表型与特异基因的表达相关，这些基因主要涉及细胞因子 – 细胞因子受体相互作用、生殖免疫、细胞增殖、转录调节、炎症反应等生物学过程。在痰湿型 PCOS 患者中，THBS1 表达上调，GLUT4 表达下调。在“健脾化痰”的基础上应用电针治疗可降低 PCOS 患者卵巢颗粒细胞 THBS1 的表达，促进 GLUT4 的表达，改善 IR 状况，提高 PCOS 患者卵子和胚胎质量。期望今后联合多中心开展大规模、多地区、大样本研究，为电针治疗特定类型 PCOS 提供更高水平的临床依据。

利益冲突：无。

参 考 文 献

[1] Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome[J]. N Engl J Med，2005，352（12）：1223–1236.

[2] Hoeger KM. Obesity and lifestyle management in polycystic ovary syndrome[J]. Clin Obstet Gynecol，2007，50（1）：277–294.

[3] Jin J，Ruan XY，Hua L，et al. Prevalence of diminished ovarian reserve in Chinese women with polycystic ovary syndrome and sensitive diagnostic parameters[J]. Gynecol Endocrinol，2017，33（9）：694–697.

[4] Freeman R，Pollack R，Rosenbloom E. Assessing impaired glucose tolerance and insulin resistance in polycystic ovarian syndrome with a muffin test：an alternative to the glucose tolerance test[J]. Endocr Pract，2010，16（5）：810–817.

[5] Behboudi-Gandevani S，Ramezani TF，Rostami DM，et al. Insulin resistance in obesity and polycystic ovary syndrome：systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. Gynecol Endocrinol，2016，32（5）：343–353.

[6] 赵虹，王幸儿，张婷，等 . 多囊卵巢综合征中医证型与药物促排卵效果的相关性研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2011，31（7）：896–898.

[7] Hou Y，Fan W，Yan L，et al. Genome analyses of single human oocytes[J]. Cell，2013，155（7）：1492–1506.

[8] Xue ZG，Huang K，Cai CC，et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing[J]. Nature，2013，500（7464）：593–597.

[9] Chen ZJ，Zhao H，He L，et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3，2p21 and 9q33.3[J]. Nat Genet，2011，43（1）：55–59.

[10] Shi YY，Zhao H，Shi YH，et al. Genome-wide

中国中西医结合杂志

association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome[J]. Nat Genet，2012，44（9）：1020–1025.

[11] Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril，2004，81：19–25.

[12] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组 . 多囊卵巢综合征中国诊疗指南 [J]. 中华妇产科杂志，2018，53（1）：2–6.

[13] 连方，齐聪主编 . 中西医结合妇产科学 [M]. 北京：人民卫生出版社，2012：274.

[14] 国家中医药管理局 . 中医病证诊断疗效标准 [M]. 南京：南京大学出版社，1994：59–62.

[15] MacPherson H，White A，Cummings M，et al. Standards for reporting interventions in controlled trials of acupuncture：the STRICTA recommendations[J]. Complement Ther Med，2001，9（4）：246–249.

[16] Huang TT，Wang L，Liu D，et al. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1[J]. Int J Oncol，2017，50（5）：1501–1512.

[17] Hulsurkar M，Li Z，Zhang Y，et al. Beta-adrenergic signaling promotes tumor angiogenesis and prostate cancer progression through HDAC2-mediated suppression of thrombospondin-1[J]. Oncogene，2017，36（11）：1525–1536.

[18] Atanasova VS，Russell RJ，Webster TG，et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-β signaling in recessive dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts[J]. J Invest Dermatol，2019，139（7）：1497–1505.e5.

[19] Murphy-Ullrich JE，Suto MJ. Thrombospondin-1 regulation of latent TGF-β activation：a therapeutic target for fibrotic disease[J]. Matrix Biol，2018，68-69：28–43.

[20] Singh V，Singh AP，Sharma I，et al. Epigenetic deregulations of Wnt/β-catenin and transforming growth factor beta-Smad pathways in esophageal cancer：outcome of DNA methylation[J]. J Cancer Res Ther，2019，15（1）：192–203.

[21] Inoue M，Jiang Y，Barnes RH，et al. Thrombospondin 1 mediates high-fat diet-induced muscle fibrosis and insulin resistance in male mice[J]. Endocrinology，2013，154（12）：4548–4559.

[22] Matsuo Y，Tanaka M，Yamakage H，et al. Thrombospondin 1 as a novel biological marker of obesity and metabolic syndrome[J]. Metabolism，2015，64（11）：1490–1499.

[23] Memetimin H，Li D，Tan K，et al. Myeloid-specific deletion of thrombospondin 1 protects against inflammation and insulin resistance in long-term diet-induced obese male mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2018，315（6）：E1194–E1203.

[24] 关秋华，刘德惠 . 葡萄糖转运蛋白与 2 型糖尿病 [J]. 中国实验动物学杂志，2000，10（3）：47–54.

[25] Saltiel AR，Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. Nature，2001，414（6865）：799–806.

[26] 金春兰，庞然，徐立鹏，等 . 针灸治疗多囊卵巢综合征临床选穴组方规律 [J]. 中国针灸，2015，35（6）：625–630.

[27] 冉国平，刘嘉颖，杨大业，等 . 电针足三里对肠易激综合征腹泻型大鼠炎性损伤的机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2019，39（3）：342–346.

（收稿：2021–01–12　在线：2022–08–19）

责任编辑：段碧芳

英文责编：张晶晶

中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志