

Acupuncture expérimentale

Jean-Marc Stéphan

Acupuncture expérimentale et syndrome des ovaires polykystiques

Résumé : Le syndrome des ovaires polykystiques, encore appelé syndrome de Stein-Leventhal, associe anovulation, stérilité, obésité, hirsutisme et différents troubles hormonaux (hyperandrogénisme..) chez les femmes en âge de procréer. La médecine expérimentale va essayer de clarifier les mécanismes d'action physiopathologique de l'acupuncture. Plusieurs voies ont été explorées : Corticotropin-releasing hormone (CRH) hypothalamique et ovarienne, nerve growth factor (NGF) et système nerveux sympathique, endothéline-1, flux sanguin ovarien et enfin action des bêta-endorphines sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'électroacupuncture entraîne un effet sur chacune de ces voies. **Mots-clés :** électroacupuncture - revue - syndrome des ovaires polykystiques - CRH - NGF - endothéline-1 - physiopathologie - axe hypothalamo-hypophysaire - bêta-endorphines - système nerveux sympathique

Summary : Polycystic ovary syndrome (PCOS), still called Stein-Leventhal's syndrome, is a complex endocrinological disorder, associated with ovulatory dysfunction, infertility, obesity, hirsutism and various hormonal disorders (hyperandrogenism...) among women in age to procreate. Experimental medicine will try to clarify the mechanisms physiopathological of acupuncture. Several ways were explored: hypothalamic and ovarian Corticotropin-releasing hormone (CRH), nerve growth Factor (NGF) and nervous system sympathetic nerve, endothelin-1, ovarian blood flow and finally action of beta-endorphins on axis hypothalamic-pituitary. The electro-acupuncture involves an effect on each one of these ways. **Key words:** acupuncture - review - hypothalamic-pituitary-ovarian axis - beta-endorphins - Polycystic ovary syndrome - PCOS - CRH - NGF - endothelin-1 - physiopathology - sympathetic system.

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), encore appelé syndrome de Stein-Leventhal demeure une des causes les plus communes de l'anovulation chez les femmes en âge de procréer. L'association d'une spanio-ménorrhée ou d'une aménorrhée, d'un problème de stérilité, d'un hirsutisme, d'une obésité, avec des taux hormonaux sériques anormalement élevés d'androgènes (testostérone, déhydroépiandrostérone, androstènedione, et dihydrotestostérone) et/ou d'hormone lutéinisante (LH), et la démonstration histologique ou échographique de la présence de deux gros ovaires polykystiques, sont les principales caractéristiques du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). L'étiologie reste mal connue et multifactorielle. Des études objectivent que l'hyperinsulinisme ou une résistance à l'insuline en serait une des causes [1,2,3]. D'autres études montrent que ce syndrome est associé à une hyperactivité du système nerveux sympathique pouvant être secondaire à

l'hyperinsulinémie [4,5], mais aussi par le fait que l'innervation par des fibres nerveuses cathécolaminergiques est plus dense dans les ovaires liés aux SOPK que dans les ovaires normaux [6,7].

Corticotropin-releasing hormone (CRH) hypothalamique et ovarienne

Nous savons que la CRH au niveau hypothalamique active les surrénales par l'intermédiaire de la sécrétion de l'ACTH hypophysaire entraînant donc une production excessive d'androgènes en cas de syndrome des ovaires polykystiques.

La CRH est présente aussi au niveau des cellules de la thèque intra-ovarienne et joue ici un rôle autocrine / paracrine dans l'inhibition de la synthèse de stéroïdes ovariens. Les ovaires normaux présentent une concentration plus élevée en CRH que les ovaires polykys-

tiques, suggérant que ce neuropeptide joue un rôle de normalisation dans une ou plusieurs des diverses fonctions de cette gonade, telles que la maturation folliculaire, l'ovulation, la régression lutéale, les réactions inflammatoires via les cytokines (interleukine-1) en rapport avec la physiologie ovarienne, et/ou la biosynthèse ovarienne stéroïde. In vitro, le CRH d'origine ovarienne inhibe la production d'estrogènes FSH-dépendante des cellules de la granulosa de rat et d'humain. Cet effet semble être lié à l'inhibition de l'activité d'aromatase. D'autre part, en fonction de la concentration en CRH, la production d'estrogènes sera variable et pourra être diminuée de 25 à 50% [8]. In vivo, Muramatsu et coll. confirme que le CRH d'origine ovarienne a la capacité d'inhiber la biosynthèse ovarienne stéroïdienne [9]. Par ailleurs, sa concentration et localisation diminuées dans les ovaires polykystiques semblent liées à la biosynthèse accrue d'androgènes par la thèque [10].

La concentration de CRH (corticotropin-releasing hormone) dans le cerveau, les glandes surrénales et les ovaires a été étudiée chez les rates présentant des ovaires polykystiques induits par du valérate d'estradiol (OPK), paradigme le plus proche du SOPK humain. La concentration de CRH était plus élevée de manière statistiquement significative au niveau du noyau hypothalamique paraventriculaire aussi bien chez les rates OPK que dans le groupe OPK bénéficiant de 12 séances d'électroacupuncture (EA) par rapport au groupe témoin sain, indiquant une augmentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Mais, la concentration de CRH dans les ovaires était significativement réduite dans le groupe OPK-EA comparé au groupe contrôle OPK sans électroacupuncture. Tout ceci indique que l'EA répétée peut changer l'état neuro-hormonal dans les ovaires [11]. Bref, en cas de SPOK l'action de l'électroacupuncture, stimulant la production de CRH d'origine hypothalamique activerait la production d'androgènes mais celle-ci par un effet de rétroaction de la CRH d'origine ovarienne, mettant en jeu une diminution de l'inhibition des aromatasés, serait modulée d'une manière

cybernétique avec production au final d'estrogènes (voir figure 1).

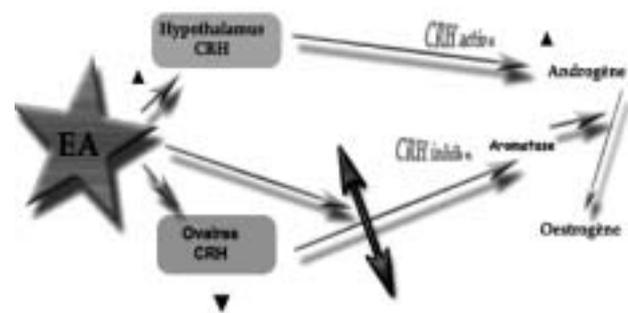


Figure 1. Action de l'électroacupuncture sur la CRH dans le syndrome des ovaires polykystiques

Nerve growth factor, Endothéline-1 et système nerveux sympathique

L'hyperactivité dans le système nerveux sympathique a été aussi étudiée par l'intermédiaire du NGF (nerve growth factor) qui appartient à la classe des facteurs de croissance neurotrophiques. C'est une cytokine, polypeptide d'environ 100 acides aminés, synthétisée dans diverses zones du cerveau, le cortex cérébral, l'hippocampe, le bulbe olfactif. Elle est captée par les neurones cholinergiques qui la transportent jusqu'aux noyaux cellulaires. Le NGF augmente l'activité de la choline acétyl-transférase responsable de la synthèse d'acétylcholine et inhiberait la dégénérescence des neurones cholinergiques notamment. Le NGF est connu comme neurotrophine du système nerveux sympathique mais aussi sensoriel et améliore l'activité des catécholamines. Des concentrations plus élevées de NGF ont été trouvées de manière statistiquement significative dans les ovaires et les glandes surrénales dans le groupe des rates présentant des ovaires polykystiques induits par du valérate d'estradiol (OPK) comparé à celui du groupe témoin injecté avec de l'huile ou du NaCl. L'électroacupuncture (EA) est connue pour réduire l'hyperactivité dans le système nerveux sympathique. Pour ces diverses raisons, les effets de l'EA (12 traitements, approximativement 25 minutes chacun pendant plus de 30 jours) ont été étudiés chez les rates OPK (figure 2).

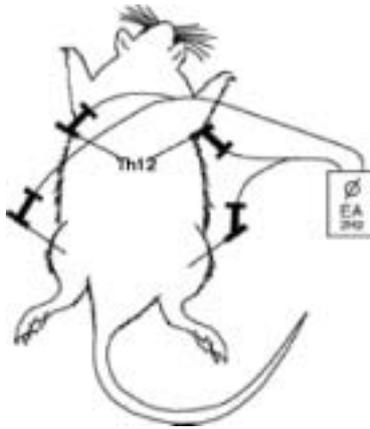


Figure 2. Face dorsale du rat : 2 aiguilles placées bilatéralement sur le muscle spinal en regard de la 12^{ème} vertèbre thoracique, et 2 bilatéralement sur le muscle quadriceps.

(D'après le schéma de Stener-Victorin et coll.)

L'étude a permis de montrer que l'EA à basse fréquence (2 Hz) n'entraîne aucune amélioration morphologique du groupe OPK-EA par rapport aux autres groupes. Par contre, l'EA inhibe l'hyperactivité du système nerveux sympathique en diminuant de manière statistiquement significative les concentrations de NGF dans les ovaires du groupe de rates OPK par rapport au groupe de celles non traitées par électroacupuncture ou du groupe témoin [12].

L'équipe suédoise de Stener-Victorin en 2003 a de nouveau observé l'effet des traitements répétés de l'électroacupuncture (EA) chez les rates présentant des ovaires polykystiques induits par du valérate d'estradiol (OPK). L'électroacupuncture module la concentration du NGF (Nerve Growth Factor) dans les ovaires ainsi que la corticolibérine (CRH corticotropin-releasing hormone) au niveau du noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN). Dans cette étude, a été évaluée l'hypothèse que des traitements répétés d'électroacupuncture à des fréquences alternées de 2 Hz et 80Hz au niveau de la zone métamérique correspondant à l'innervation ovarienne module l'activité du système nerveux sympathique chez les rats avec OPK. Ceci a été réalisé en analysant l'endothéline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur impliqué dans les fonctions ovariennes, ainsi que la NGF et l'expression par l'ARNm de la NGF également impliqués dans le processus physiopathologique des ovaires polykystiques stéroïdes-induits.

Le principal résultat de cette étude est que les concentrations d'ET-1 dans les ovaires sont de manière statis-

tiquement significative ($p < 0,05$) inférieures dans le groupe OPK recevant l'EA par rapport au groupe contrôle en bonne santé. Cependant, dans l'hypothalamus les concentrations ET-1 se sont avérées sensiblement plus élevées dans le groupe OPK recevant l'EA que dans le groupe contrôle (voir tableau I).

Tableau I. Concentrations d'Endothéline-1 (ET-1) (moyenne \pm erreur type sur la moyenne) dans les ovaires, les glandes surrénales et l'hypothalamus dans les trois groupes expérimentaux : groupe sain, groupe contrôle des ovaires polykystiques (OPK), et groupe OPK recevant l'électroacupuncture (EA).

	Concentrations d'ET-1 (pmol/g)		
	Groupe sain	Contrôle OPK	OPK + EA
Ovaires	0.44 \pm 0.11	0.38 \pm 0.14	0.15 \pm 0.05 *
Glandes surrénales	0.01 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04
Hypothalamus	0.14 \pm 0.05	0.33 \pm 0.10	0.71 \pm 0.23 *

* $p < 0.05$ quand le groupe OPK-EA est comparé avec le groupe sain
Tableau extrait de "Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1 (1): 33" ; <http://www.rbej.com/content/1/1/33>

Les concentrations ovariennes de NGF étaient significativement plus hautes ($p < 0,001$) dans le groupe OPK comparé au groupe contrôle en bonne santé, et ces concentrations diminuent de manière statistiquement significative ($p < 0,05$) après des traitements répétés d'EA par rapport à ceux du groupe OPK jusqu'à atteindre les concentrations du groupe contrôle en bonne santé (tableau II).

Tableau II. Concentrations des protéines Nerve Growth Factor (NGF) (moyenne \pm erreur type sur la moyenne) dans les ovaires, les glandes surrénales et la partie dorsale de la moëlle épinière dans les quatre groupes expérimentaux : groupe sain, groupe sain + EA, groupe contrôle des ovaires polykystiques (OPK), et groupe OPK recevant l'électroacupuncture (EA).

	Concentrations de NGF (pg/g)			
	groupe sain	groupe sain + EA	Contrôle OPK	OPK + EA
Ovaires	294.85 \pm 17.00	265.79 \pm 20.99	479.77 \pm 26.86 *	385.34 \pm 12.26 **
Surrénales	102.42 \pm 26.14	119.97 \pm 51.81	98.82 \pm 12.46	94.42 \pm 14.32
Moëlle épinière	867.36 \pm 65.52	1600.59 \pm 360.03	1351.26 \pm 220.82	1081.94 \pm 193.72

* $p < 0.001$ quand le groupe OPK est comparé avec le groupe sain et le groupe sain+EA. ** $p < 0.05$ quand le groupe OPK+EA est comparé au groupe OPK de contrôle.

Tableau extrait de "Reprod Biol Endocrinol. 2003;1(1):33" ; <http://www.rbej.com/content/1/1/33>

En conclusion, ces résultats indiquent que l'EA module l'état neuro-endocrinologique des ovaires, très probablement en modulant l'activité du système sympathique dans les ovaires, qui peut être un facteur dans l'entretien des ovaires polykystiques stéroïdes-induits [13].

On sait donc que le NGF (Nerve Growth Factor) est impliqué dans la pathogénie du SOPK [14,15]. En 2004, dans une autre étude, ce syndrome a été expérimentalement induit par une injection intra-musculaire de 4 mg de valérate d'estradiol chez la rate, afin de déterminer si l'électroacupuncture pouvait affecter l'ovaire polykystique. Le point d'acupuncture RA6 (*sanyinjiao*) a été stimulé pour déterminer l'efficacité de l'électroacupuncture dans l'expression de la protéine du NGF. Pendant la période expérimentale de 8 semaines, un groupe de rats a été traité par électroacupuncture deux fois par semaine ; ce groupe a été comparé à un groupe sain contrôle et à un groupe estradiol-injecté non soumis à l'électroacupuncture. Au soixantième jour, l'expression de la protéine NGF a été examinée par des méthodes immuno-histo-chimiques au niveau des ovaires, des glandes surrénales et au niveau du cerveau. Le traitement à l'estradiol induit un aspect net d'ovaires polykystiques, et a été associé à une augmentation importante de l'expression de la NGF dans les ovaires, les glandes surrénales et le cerveau. Or, le traitement électroacupunctural a en partie inversé l'augmentation de NGF, en particulier dans les ovaires, mais pas dans le cerveau. Ces données prouvent donc que l'électroacupuncture affecte l'implication du NGF dans le dysfonctionnement ovarien [16] et confirment les travaux de l'équipe suédoise de Stener-Victorin [13].

Flux sanguin ovarien

Comme nous l'avons vu précédemment le système nerveux sympathique est impliqué dans la physiopathologie du syndrome des ovaires polykystiques. De plus l'ovaire est une glande très richement vascularisée et le maintien d'un flux sanguin ovarien est important dans le processus de l'ovulation. Les nerfs du système sympathique apparaissent être impliqués distinctement dans le contrôle et la régulation de l'activité ovarienne

[17]. Et même plus, les nerfs sympathiques ovariens sont des régulateurs importants du flux sanguin ovarien.

Les travaux de Stener-Victorin et coll. [18] ont, de ce fait, mis en évidence le rôle crucial du système nerveux sympathique dans le flux sanguin ovarien chez les rates. Ainsi, le flux sanguin ovarien (FSO) a été étudié par débitmètre laser doppler et mesure de la pression artérielle en réponse à la stimulation électroacupuncturale à différentes fréquences et intensités chez des rats anesthésiés. Deux fréquences de 2 Hz (basse fréquence) et 80 Hz (haute fréquence) avec 3 intensités différentes de 1,5mA, 3 et 6 mA ont été appliquées pendant 35 secondes sur des aiguilles d'acupuncture implantées sur des muscles abdominaux et de hanche. Le flux sanguin ovarien a été mesuré sur la surface de l'ovaire gauche. L'électroacupuncture (EA) à haute fréquence à 1,5 mA et l'EA à haute fréquence à 3 mA n'ont eu aucun effet sur le flux ou la pression artérielle moyenne (PAM). L'EA de basse fréquence à 3 et 6 mA a permis d'obtenir une augmentation statistiquement significative du flux sanguin ovarien. En revanche, l'EA à haute fréquence avec une intensité de 6 mA a entraîné une diminution significative du flux sanguin ovarien, suivi d'une diminution de la pression artérielle moyenne sanguine. Après section des nerfs sympathiques ovariens, les augmentations du FSO en réponse à l'EA de basse fréquence à 3 et 6 mA ont été totalement supprimées, et la réponse à 6 mA ont montré une tendance à diminuer, probablement en raison des diminutions concomitantes de la pression artérielle moyenne. Les réponses diminuées du FSO et de la pression artérielle moyenne sanguine à l'EA à haute fréquence à 6 mA demeurent après la sympathectomie ovarienne. En conclusion, il est prouvé que la stimulation EA à basse fréquence augmente le flux sanguin ovarien, comme réponse réflexe par l'intermédiaire des nerfs sympathiques ovariens, tandis que la stimulation EA à haute fréquence diminue le FSO.

La même procédure de travail a été ensuite reprise chez des rates avec des ovaires polykystiques stéroïdes-induits expérimentalement par une injection de valé-

te d'estradiol (OPK). Le but était d'étudier si l'électroacupuncture (EA) à différentes fréquences et intensités pouvait améliorer le flux sanguin ovarien (FSO) chez la rate à OPK. Le groupe des rats de contrôle a été bénéficié d'une injection d'huile. L'implication des deux nerfs sympathiques ovariens : le nerf ovarien supérieur (NOS) et le plexus nerveux ovarien (PNO) dans les réponses au maintien du flux sanguin ovarien a été élucidé par section des deux nerfs NOS et PNO dans le groupe OPK et de contrôle. Le flux sanguin ovarien (FSO) a été mesuré par débitmétrie doppler à laser avec mesure de la pression artérielle comme dans le précédent travail réalisée par la même équipe suédoise en 2003. L'EA de basse fréquence (2 Hz) aux intensités de 3 et 6 mA a permis d'obtenir des augmentations statistiquement significatives du flux sanguin ovarien dans le groupe contrôle par rapport au flux ovarien basal. Dans le groupe OPK, les augmentations du FSO étaient significatives seulement en stimulant avec l'EA de basse fréquence à 6 mA. Après section des nerfs sympathiques ovariens, l'augmentation du FSO qui avait été induit par EA de basse fréquence dans les deux groupes a été abolie, indiquant l'implication des nerfs sympathiques ovariens dans la réponse du FSO.

L'EA à haute fréquence (80 Hz) à 6 mA diminue de manière statistiquement significative à la fois le FSO et la pression artérielle moyenne dans le groupe de contrôle comparé aux mesures basales. Dans le groupe OPK, la même stimulation produit les diminutions semblables de la pression artérielle moyenne (PMA), mais pas du FSO. En conclusion, la stimulation EA de basse fréquence avec une intensité forte (6 mA) augmente le flux sanguin ovarien chez les rats avec ovaires polykystiques stéroïdes-induits tandis qu'une intensité moins forte (3 mA) induit des changements similaires dans le groupe contrôle. La section des nerfs sympathiques ovariens supprime cette augmentation du FSO dans les deux groupes d'étude, ce qui suggère l'implication des nerfs sympathiques ovariens (voir figure 3).

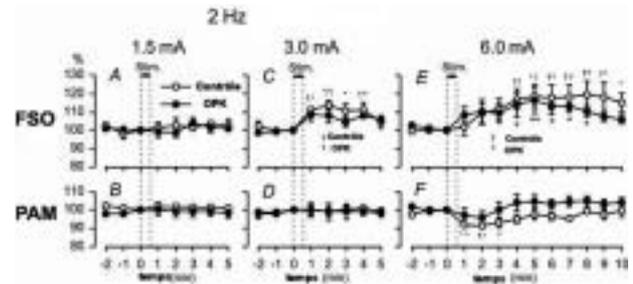


Figure 3. Effet de l'EA à basse fréquence (2 Hz) sur le flux sanguin ovarien (FSO) et la pression artérielle moyenne (PAM). Récapitulatif des réponses des FSO (A, C, E) et PAM (B, D, F) à la fois sur le groupe des rats contrôle et celui des rats OPK avec une stimulation à 2 Hz. Les variations dans les FSO et PAM sont calculées chaque minute (1 s d'enregistrement), et la magnitude de réponse est exprimée en pourcentage de la ligne basale avant stimulation, valeur au point 0mn de la ligne de temps. Les lignes verticales et la barre horizontale épaisse indiquent la période de la stimulation. Les données sont exprimées comme moyenne \pm erreur type sur la moyenne. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ (rate contrôle) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (rates OPK), comparée avec la valeur contrôle de pré-stimulation.

Figure extraite de "Reprod Biol Endocrinol. 2004;2:16" ; <http://www.rbej.com/content/2/1/16>

Bêta-endorphines et système immunitaire

La même équipe en 2004, après avoir démontré que l'hyperactivité du système nerveux sympathique était impliquée dans la pathogénie des ovaires polykystiques stéroïdes-induits (OPK) chez la rate a étudié d'une part, les concentrations de bêta-endorphines hypothalamique et plasmatique et d'autre part les altérations et l'activité des populations des cellules immunes circulantes. Les traitements d'électroacupuncture (EA) répétés à basse fréquence (2 Hz) sont connus pour moduler la libération de bêta-endorphines et les réponses immunitaires, ainsi que l'activité du système nerveux autonome. L'EA à basse fréquence a été appliquée en séances de 25 minutes pendant plus de 30 jours. Les concentrations de bêta-endorphines hypothalamiques et plasmatiques ainsi que la fréquence des cellules lymphocytaires CD4+ T et des cellules CD8+ T étaient significativement plus basses dans le groupe contrôle des rats OPK par rapport au groupe témoin de rates huile-injectée. Suite aux traitements répétés d'EA chez les rates OPK, les concentrations de bêta-endorphines dans l'hypothalamus ont augmenté alors

de manière statistiquement significative. En conclusion, ces résultats prouvent que les systèmes bêta-endorphinique et immunitaire sont sensiblement altérés chez les rates avec ovaires polykystiques stéroïdes-induits et que les traitements répétés d'EA peuvent reconstituer certaines de ces perturbations [19]. Et on le sait déjà, la libération centrale des bêta-endorphines, en inhibant la sécrétion anormale de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) et par conséquent de LH (Hormone Lutéinique) favorisera ainsi l'ovulation [20]. En conclusion, la médecine expérimentale nous offre plusieurs voies d'approche pour expliquer les mécanismes physiopathologiques du syndrome des ovaires polykystiques et de son traitement par électroacupuncture (figure 4). Bien sûr, cela n'est pas suffisant pour affirmer avec certitude qu'un traitement acupunctural puisse être une meilleure alternative à un traitement

classique pharmacologique. Néanmoins, les chinois n'hésitent pas à promouvoir ces méthodes dans les hôpitaux d'obstétrique et de gynécologie, comme ils le font par exemple, à Shanghai depuis de nombreuses années [21].

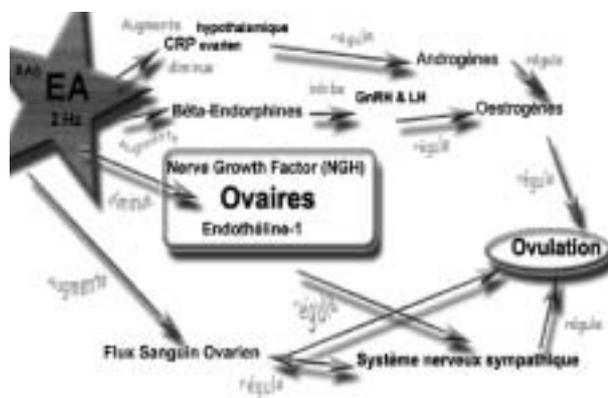


Figure 4. Mécanismes physiopathologiques de l'effet de l'électroacupuncture dans le syndrome des ovaires polykystiques.



Jean-Marc Stéphan,
✉ jean-marc.stephan@acudoc2.org

Références

- Hopkinson ZE, Sattar N, Fleming R, Greer IA. Polycystic ovary syndrome: the metabolic syndrome comes to gynaecology. *Br Med* 1998;J 317:329–332
- Ek I, Arner P, Bergqvist A, Carlström K, Wahrenberg H. Impaired adipocyte lipolysis in nonobese women with the polycystic ovary syndrome: a possible link to insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1147–1153
- Ek I, Arner P, Ryden M, Holm C, Thorne A, Hoffstedt J, Wahrenberg H. A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. *Diabetes* 2002 Feb;51(2):484–92.
- Faulds G, Ryden M, Ek I, Wahrenberg H, Arner P. Mechanisms behind lipolytic catecholamine resistance of subcutaneous fat cells in the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2269–73.
- Garcia-Rudaz C, Armando I, Levin G, Escobar ME, Barontini M. Peripheral catecholamine alterations in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49(2):221–8.
- Semenova, II: Adrenergic innervation of the ovaries in Stein-Leventhal syndrome *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 1969;24:5862.
- Heider, U, Pedal, I, & Spanel-Borowski, K: Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries *Fertil Steril* 2001;75:1141–1147.
- Calogero AE, Burrello N, Negri-Cesi P, et al. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production in vitro. *Endocrinology* 1996;137:4161–4166.
- Muramatsu Y, Sugino N, Suzuki T, Totsune K, Takahashi K, Tashiro A, Hongo M, Oki Y, Sasano H. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):1362–9.
- Mastorakos G, Scopa CD, Vryonidou A, Friedman TC, Kattis D, Phenekos C, Merino MJ, Chrousos GP. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(4):1191–7.
- Stener-Victorin, E, Lundeberg, T, Waldenstrom, U, Bileviciute-Ljungar, I, & Janson, PO: Effects of electroacupuncture on corticotropin-releasing factor in rats with experimentally-induced polycystic ovaries *Neuropeptides* 2001;35:227–231.
- Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenstrom U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Janson PO. Effects of electroacupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. *Biol Reprod* 2000;63(5):1497–503.
- Stener-Victorin E, Lundeberg T, Cajander S, Aloe L, Manni L, Waldenstrom U, Janson PO. Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electroacupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1(1):33.

14. Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A, Ojeda SR. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 2000;141(3):1073-82.
15. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 2000;141(3):1059-72.
16. Bai YH, Lim SC, Song CH, Bae CS, Jin CS, Choi BC, Jang CH, Lee SH, Pak SC. Electro-acupuncture reverses nerve growth factor abundance in experimental polycystic ovaries in the rat. *Gynecol Obstet Invest* 2004;57(2):80-5.
17. Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 1986;118(4):1682-9.
18. Stener-Victorin E, Kobayashi R, Kurosawa M. Ovarian blood flow responses to electro-acupuncture stimulation at different frequencies and intensities in anaesthetized rats. *Auton Neurosci* 2003;108(1-2):50-6.
19. Stener-Victorin, E & Lindholm, C: Immunity and beta-endorphin concentrations in hypothalamus and plasma in rats with steroid-induced polycystic ovaries; effect of low frequency electro-acupuncture *Biol Reprod* 2004;70:329333
20. Chen BY, Yu J. Relationship between blood radioimmunoreactive beta-endorphin and hand skin temperature during the electro-acupuncture induction of ovulation. *Acupunct Electrother Res* 1991;16(1-2):1-5.
21. Yu J. [Integrated traditional Chinese and western medicine should make new contribution to the reproductive health of women]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2004;2(2):83-5.