

# 针刺调节cAMP信号通路改善睡眠剥夺小鼠卵巢功能减退的机制

甘 谛<sup>1</sup>, 刘璿莹<sup>1</sup>, 郝健亨<sup>1,2</sup>, 常博雅<sup>2</sup>, 王海军<sup>2</sup>, 杨 洁<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075; <sup>2</sup>山西中医药大学第二临床学院, 山西晋中 030619)

**【摘要】 目的:**基于转录组学探讨针刺通过调节环磷酸腺苷(cAMP)信号通路改善睡眠剥夺(SD)诱导的小鼠卵巢功能减退的潜在机制。**方法:**将动情周期规律的C57BL/6雌性小鼠随机分成空白组、SD组和针刺组,每组15只。空白组小鼠保持6周的正常作息;SD组和针刺组小鼠每日16:00至次日12:00进行20 h的SD,连续6周;针刺组从第4周开始,在非SD时间取“百会”“三阴交”“关元”进行针刺治疗,每次20 min,每周治疗6 d,连续治疗3周。通过阴道脱落细胞涂片法观察小鼠动情周期变化;检测体质量、卵巢湿重,计算卵巢指数;苏木精-伊红染色法检测卵巢组织形态;ELISA法检测血清促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、抗缪勒管激素(AMH)、雌二醇(E2)含量和卵巢组织cAMP含量;转录组学技术检测各组小鼠卵巢组织差异表达基因(DEG)并进行功能分析;实时荧光定量PCR和Western blot法分别检测卵巢组织卵泡生成素受体(FSHR)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白1(CREB1)、蛋白激酶A催化亚基 $\alpha$ (PRKACA)、腺苷酸环化酶5(ADCY5)mRNA和蛋白表达变化。**结果:**治疗结束后,与空白组比较,SD组小鼠动情周期紊乱率升高( $P<0.01$ );体质量、卵巢湿重和卵巢指数降低( $P<0.01$ );卵巢组织形态结构破坏,闭锁卵泡增多;血清中FSH和LH含量升高( $P<0.01$ ),AMH和E2含量下降( $P<0.01$ )。与SD组比较,针刺组小鼠动情周期紊乱率降低( $P<0.01$ );体质量、卵巢湿重和卵巢指数提高( $P<0.01$ );卵巢组织病理结构改善,闭锁卵泡减少;血清中FSH和LH含量降低( $P<0.01$ ),AMH和E2含量提高( $P<0.01$ )。转录组学共鉴定出173个具有回调趋势的交集DEGs,基因本体分析表明,交集DEGs主要参与其他生物体的反应等生物过程;主要发生在细胞外区域等细胞组分,同时与2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性等分子功能有关。基因组百科全书富集分析表明,交集DEGs主要参与cAMP信号通路等;基因集富集分析表明,cAMP信号通路在SD组处于受抑制状态,而在针刺组中呈现激活趋势。与空白组比较,SD组小鼠卵巢cAMP含量,FSHR、CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA表达,FSHR、ADCY5、PRKACA蛋白表达水平及磷酸化(p)-CREB1/CREB1蛋白表达比值均不同程度降低( $P<0.01$ )。与SD组比较,针刺组小鼠卵巢cAMP含量,FSHR、CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA表达水平,FSHR、ADCY5、PRKACA蛋白表达水平及p-CREB1/CREB1蛋白表达比值均不同程度提高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。**结论:**针刺可以改善SD诱导的小鼠卵巢功能减退,其机制可能与调节cAMP信号通路的CREB1、FSHR、ADCY5和PRKACA等关键分子表达有关。

**【关键词】** 针刺;睡眠剥夺;卵巢功能减退;转录组学;差异表达基因;环磷酸腺苷信号通路

## Mechanism of acupuncture regulating cAMP signaling pathway to improve ovarian dysfunction in sleep-deprived mice

GAN Di<sup>1</sup>, LIU Li-ying<sup>1</sup>, HAO Jian-heng<sup>1,2</sup>, CHANG Bo-ya<sup>2</sup>, WANG Hai-jun<sup>2</sup>, YANG Jie<sup>1</sup> (<sup>1</sup>College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; <sup>2</sup>The Second Clinical College, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province)

**【ABSTRACT】 Objective** To explore the potential mechanism by which acupuncture alleviates sleep deprivation (SD)-induced ovarian dysfunction in mice via regulating the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251079

引用格式:甘谛,刘璿莹,郝健亨,等.针刺调节cAMP信号通路改善睡眠剥夺小鼠卵巢功能减退的机制[J].针刺研究,2026,51(8):1001-1012.

项目来源:国家自然科学基金项目(No. 82174517、82575219、82505759)

通信作者:杨洁, E-mail: jenny\_yang\_jie@126.com

pathway based on transcriptomics. **Methods** Female C57BL/6 mice with regular estrous cycles were randomly divided into blank group, SD group and acupuncture group, with 15 mice in each group. Mice in the blank group maintained a normal light-dark schedule for 6 weeks; mice in the SD group and acupuncture group were subjected to 20-hour SD daily from 16:00 to 12:00 the next day for 6 consecutive weeks. Starting from the 4<sup>th</sup> week, mice in the acupuncture group received acupuncture treatment for 20 min per session at non-SD time points, 6 d a week for 3 consecutive weeks. The estrous cycle changes of mice were observed via vaginal exfoliative cell smear staining. Body weight, ovarian wet weight were measured and ovarian index was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was adopted to detect ovarian tissue morphology. ELISA was used to detect serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), anti-Müllerian hormone (AMH), estradiol (E2), as well as ovarian tissue cAMP content. Transcriptomic technology was applied to screen differentially expressed genes (DEGs) in ovarian tissues of mice in each group followed by functional enrichment analysis. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), cAMP response element-binding protein 1 (CREB1), protein kinase A catalytic subunit  $\alpha$  (PRKACA) and adenylate cyclase 5 (ADCY5), respectively. **Results** After treatment, compared with the blank group, the rate of estrous cycle disorder was significantly elevated in the SD group ( $P<0.01$ ); body weight, ovarian wet weight and ovarian index were markedly decreased ( $P<0.01$ ); the morphological structure of ovarian tissue was damaged with increased atretic follicles; serum FSH and LH levels were up-regulated ( $P<0.01$ ), while AMH and E2 levels were down-regulated ( $P<0.01$ ). Compared with the SD group, the acupuncture group exhibited a reduced rate of estrous cycle disorder ( $P<0.01$ ); increased body weight, ovarian wet weight and ovarian index ( $P<0.01$ ); ameliorated pathological ovarian structure and fewer atretic follicles; decreased serum FSH and LH levels ( $P<0.01$ ), and elevated serum AMH and E2 levels ( $P<0.01$ ). A total of 173 intersecting DEGs with a callback trend were identified via transcriptomic sequencing. Gene ontology analysis revealed that these intersecting DEGs were mainly involved in biological processes such as response to other organisms, localized in cellular components including extracellular region, and associated with molecular functions like 2'-5'-oligoadenylate synthetase activity. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis demonstrated that the intersecting DEGs were primarily enriched in the cAMP signaling pathway. Gene set enrichment analysis indicated that the cAMP signaling pathway was suppressed in the SD group but activated after acupuncture intervention. Compared with the blank group, the SD group showed significantly reduced ovarian cAMP content, mRNA expressions of FSHR, CREB1, ADCY5 and PRKACA, protein levels of FSHR, ADCY5, PRKACA, as well as p-CREB1/CREB1 ratio ( $P<0.01$ ). Relative to the SD group, the acupuncture group presented increased ovarian cAMP content, up-regulated mRNA expressions of FSHR, CREB1, ADCY5 and PRKACA, elevated protein levels of FSHR, ADCY5, PRKACA, and an increased p-CREB1/CREB1 ratio ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** Acupuncture can ameliorate SD-induced ovarian dysfunction in mice, and its therapeutic mechanism may be related to regulating the expressions of key molecules including CREB1, FSHR, ADCY5 and PRKACA in the cAMP signaling pathway.

**【KEYWORDS】** Acupuncture; Sleep deprivation; Ovarian dysfunction; Transcriptomics; Differentially expressed genes; Cyclic adenosine monophosphate signaling pathway

睡眠剥夺(SD)是指个体因环境、心理或生理等多种因素,未能获得足够的睡眠时间或优质的睡眠质量,从而导致一系列生理功能紊乱与心理障碍的状态<sup>[1]</sup>。随着现代社会节奏加快,工作压力加重,电子设备广泛使用导致作息紊乱,SD逐渐成为全球范围内亟待解决的重大公共卫生问题<sup>[2]</sup>。大量研究<sup>[3-5]</sup>表明,SD不仅会引起情绪波动、认知功能下降、免疫力下降及多种心血管疾病,还会通过神经、内分泌及免疫等多重途径,对女性生殖系统造成深远影响。临床调查显示,长期睡眠不足的女性更容易出现月经周期紊乱、卵泡发育障碍、性激素分泌

异常及生物节律紊乱,甚至会增加不孕不育的风险<sup>[6-7]</sup>。基础研究进一步表明,SD可干扰下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴的正常调控,造成性激素分泌失衡;还能诱发卵巢氧化应激反应,抑制卵泡发育和排卵过程,并打乱卵巢生物钟基因的节律表达,加速卵巢功能衰退<sup>[8-9]</sup>。针灸既能改善睡眠节律,又能调节内分泌平衡,在改善睡眠障碍和多种卵巢相关疾病方面均表现出良好疗效<sup>[10-12]</sup>。临床研究<sup>[13-14]</sup>表明,针刺在改善卵巢功能的同时,还可以提高卵巢功能减退患者的睡眠质量,提示其对生殖功能与睡眠状态均有调节作用。然而,目前针刺干预睡眠障

碍相关卵巢功能减退的研究报道较少,其改善卵巢损伤的分子机制尚不明确。基于此,本研究运用转录组学技术,深入探究针刺对SD小鼠卵巢功能减退的调控机制,以期对针灸防治睡眠障碍相关卵巢损伤提供科学依据和理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

50 只雌性 SPF 级 4~5 周龄 C57BL/6 小鼠,体重(12±1)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2024-0001。饲养环境:小鼠饲养于山西中医药大学动物实验管理中心,饮水摄食自由,每日明暗周期各 12 h,温度控制在(25±2)℃,湿度控制在(55±5)%。适应性喂养 7 d 结束后,随机挑选 45 只动情周期正常的小鼠采用随机数字表法分成空白组、SD 组和针刺组,每组 15 只。本实验通过山西中医药大学伦理委员会审查,批准号为 AWE202412449。

### 1.2 主要试剂和仪器

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京雷根),低水平抗缪勒管激素(AMH)、促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)检测试剂盒(北京成志科为),环磷酸腺苷(cAMP)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特),双链 DNA 检测试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific),RNA 提取液、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂、微管蛋白(Tubulin)抗体、羊抗兔二抗、化学发光显影液(武汉赛维尔),环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 1(CREB1)一抗、磷酸化(p)-CREB1 一抗、卵泡生成素受体(FSHR)一抗、蛋白激酶 A 催化亚基 α(PRKACA)一抗(武汉爱博泰克),腺苷酸环化酶 5(ADCY5)一抗(北京博奥森),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天),异氟烷(深圳瑞沃德)。

小鼠睡眠剥夺仪(南京卡尔文),一次性无菌针灸针(0.25 mm×13 mm,苏州华佗),酶标仪(深圳 Rayto),石蜡切片机(德国 LEICA),天平(上海佑科)光学显微镜(日本 Nikon),低温高速离心机、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific),电泳仪、转膜仪、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad),小动物专用吸入麻醉机(北京众实迪创),Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台(美国 Illumina)。

### 1.3 造模方法

本研究采用睡眠剥夺仪通过机械干扰方式构

建 SD 小鼠模型<sup>[15]</sup>。空白组小鼠保持 6 周的正常作息;SD 组和针刺组小鼠每日 16:00 至次日 12:00 置于睡眠剥夺仪内(仪器底部有匀速转动的干扰棒,可以有效阻止小鼠正常睡眠),每次 20 h,连续 6 周。阴道脱落细胞涂片法观察动情周期,如出现动情周期延长,或长时间停滞于某一期,或周期中细胞变化无规律等情况,都可视为动情周期紊乱,表明卵巢功能减退模型造模成功<sup>[16]</sup>。

### 1.4 干预方法

针刺组从第 4 周开始,在非 SD 时间点(每日 12:30)进行针刺治疗:仰卧位固定小鼠,用 75% 乙醇消毒穴位周围皮肤,取“百会”(顶骨正中)、“三阴交”(后肢内踝尖上 5 mm 处)、“关元”(脐下约 10 mm 处)进行针刺干预,选穴定位参考文献<sup>[17]</sup>,深度约 2~3 mm,每次 20 min,每周治疗 6 d,休息 1 d,连续治疗 3 周。空白组和 SD 组同时间进行相同的抓取固定。

### 1.5 标本采集

干预结束后次日,先称取小鼠体质量,然后将其接入小动物专用吸入麻醉机,麻醉机内加入 2.5% 异氟烷并以 1 L/min 流速的气体对小鼠进行麻醉,采用眼球摘除法采血;处死小鼠后,剪取两侧卵巢组织,分别储存于多聚甲醛固定液或-80℃条件下以备后续实验。

### 1.6 观察指标及检测方法

阴道脱落细胞涂片法观察动情周期变化:每天下午,用蘸 0.9% 氯化钠溶液的棉签轻插小鼠阴道蘸取分泌物,涂在载玻片上,自然干燥后用苏木精溶液和伊红溶液先后各染 3 min,清水冲洗后自然干燥,最后在光学显微镜下观察阴道脱落细胞变化。观察记录小鼠动情周期变化。

体质量、卵巢湿重与卵巢指数检测:日常记录小鼠体质量;取材当日处死小鼠后,迅速解剖暴露卵巢,用镊子小心分离卵巢周围的脂肪及结缔组织,吸取多余水分,使用电子天平称量卵巢质量即为卵巢湿重,并计算卵巢指数。卵巢指数(mg/g)=卵巢湿重(mg)÷小鼠处死时体质量(g)。

HE 染色法观察卵巢组织病理形态变化:将小鼠卵巢组织放入多聚甲醛中固定约 24 h,取出后经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋制成蜡块;用切片机将蜡块切成 5 μm 厚的切片,二甲苯脱蜡,乙醇水化,苏木精染细胞核 3 min,盐酸乙醇分化,流水返蓝,伊红染细胞质 5 min,最后脱水透明,并用中性树胶封片,在光学显微镜下观察卵巢组织病理形态

变化。

ELISA 法检测血清 AMH、FSH、LH 和 E2 和卵巢组织 cAMP 含量:将通过眼球摘除法采集的小鼠全血静置 30 min,离心 15 min,收集血清备用;取小鼠卵巢组织,加入裂解液匀浆处理,离心 10 min,收集上清备用。根据不同 ELISA 试剂盒说明书进行检测,终止反应后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值,最后通过标准曲线来计算不同指标在小鼠血清或卵巢组织中的含量。

转录组学技术检测卵巢组织差异表达基因(DEGs):每组随机选取 5 只小鼠卵巢组织,提取样本总 RNA 并进行质量检测;去除 rRNA 后进行文库构建,对 RNA 进行片段化处理,使片段长度约为 300 bp;以 RNA 为模板,在随机六碱基引物和反转录酶作用下合成 cDNA 第一链,并以其为模板合成第二链 cDNA;完成文库构建后,运用 PCR 扩增技术富集文库片段,随后依据片段大小筛选文库,使文库大小约为 450 bp;随后,采用 Quant-iT PicoGreen 双链 DNA 检测试剂盒对构建完成的 cDNA 文库进行浓度测定及质量控制,确定最佳上样量,并依托 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台进行测序。测序完成后,对下机后的 Raw Reads 进行质量评估,过滤低质量的数据生成 Clean Reads,使用 HISAT2 将配对末端 Clean Reads 与参考基因组(Mus\_musculus.GRCm39.dna.primary\_assembly.fa)进行比对;使用 HTSeq 统计比对到每一个基因上的 Read Count 值,作为基因的原始表达量,采用 FPKM 对表达量进行标准化。使用 DESeq2 软件进行组间 DEGs 的筛选及分析,然后对交集 DEGs 进行基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并利用基因集富集分析(GSEA)评估基因集在不同组间的整体富集情况。

实时荧光定量 PCR 法检测 FSHR、CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA 表达水平:取小鼠卵巢组织,提取其总 RNA,并测定浓度与纯度;然后以此为模板,利用反转录试剂盒合成 cDNA,随后根据基因序列设计特异性引物,以 cDNA 为模板配制 PCR 反应体系,用实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序如下:首先 95 ℃预变性 30 s;接着进入扩增循环,每个循环包括 95 ℃变性 15 s、60 ℃退火并延伸 30 s,共进行 40 个循环;最后,以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目标基因的 mRNA 相对表达量。引物序列由武汉赛维尔设计,见表 1。

Western blot 法检测 FSHR、p-CREB1/

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

| 基因     | 序列(5'→3')                  | 产物长度/bp |
|--------|----------------------------|---------|
| CREB1  | 上游 ATTCACAGGAGTCAGTGGATAGT | 144     |
|        | 下游 CACCGTTACAGTGGTGATGG    |         |
| FSHR   | 上游 TGCTCTAACAGGGTCTTCCTC   | 84      |
|        | 下游 TCTCAGTTCAATGGCGTTCCG   |         |
| ADCY5  | 上游 AGTTCCCGTCGGACAAACTG    | 202     |
|        | 下游 AGCACGGCCATGATAAGGAT    |         |
| PRKACA | 上游 CACCTACGGCGGATTGGAA     | 166     |
|        | 下游 CGAAGTCTGTCACTGAATATAGC |         |
| GAPDH  | 上游 AAGGTGAAGGTCTGGAGTCAAC  | 102     |
|        | 下游 GGGGTCATTGATGGCAACAA    |         |

注:CREB1 为环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 1,FSHR 为卵泡生成素受体,ADCY5 为腺苷酸环化酶 5,PRKACA 为蛋白激酶 A 催化亚基  $\alpha$ 。

CREB1、ADCY5、PRKACA 蛋白相对表达量:提取小鼠卵巢组织中的总蛋白,并使用 BCA 法测定浓度。将蛋白样品与上样缓冲液混合,煮沸 5 min 变性,分别加到 SDS-PAGE 凝胶孔中进行电泳分离蛋白;电泳结束后将蛋白质转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,取出条带置于湿盒中加入一抗 CREB1(1:1 000)、p-CREB1(1:1 000)、FSHR(1:1 000)、ADCY5(1:1 000)、PRKACA(1:5 000)和 Tubulin(1:1 000),于 4 ℃条件下孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次后再与羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,经 TBST 洗膜后加入化学发光显色液上机显影,用 Image J 软件分析条带灰度值,将目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为量化指标。

1.7 统计学处理

实验采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析:计数资料以百分率(%)表示,组间差异比较运用  $\chi^2$  检验;计量资料均符合正态分布,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较时,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐选用 Tamhane's  $t_2$  检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义的标准。转录组数据的差异表达分析使用 DESeq2 软件进行,基因 Read Count 经过标准化并估计离散度后,基于负二项分布模型进行显著性检验,筛选标准为  $|\log_2 \text{fold change}| > 1$  且  $P \leq 0.05$ ;功能富集分析包括 GO 与 KEGG 通路分析,采用 clusterProfiler 和 topGO 软件包进行,使用超几何检

验并以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义的标准; GSEA 分析通过 clusterProfiler 软件包进行, 基于置换检验计算富集得分 (ES) 及标准化富集得分 (NES), 以校正后  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠动情周期比较

正常小鼠动情周期规律<sup>[16]</sup>, 表现为以 4~5 d 为 1 个周期的稳定波动。阴道涂片以有核上皮细胞为主, 此阶段为动情前期; 阴道涂片以无细胞核的角化上皮细胞为主, 此阶段为动情期; 阴道涂片中角化细胞明显减少, 有核上皮细胞与白细胞数量增

多, 此阶段为动情后期; 阴道涂片表现为白细胞、有核上皮细胞和无核角化细胞共现, 此阶段为动情间期。干预前, 与空白组比较, SD 组和针刺组小鼠多表现为持续的动情间期, 动情周期紊乱率提高 ( $P < 0.01$ ); SD 组和针刺组之间动情周期紊乱率差异无统计学意义。干预后, 与空白组比较, SD 组小鼠动情周期紊乱率提高 ( $P < 0.01$ ); 与 SD 组相比, 针刺组小鼠动情周期紊乱率降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

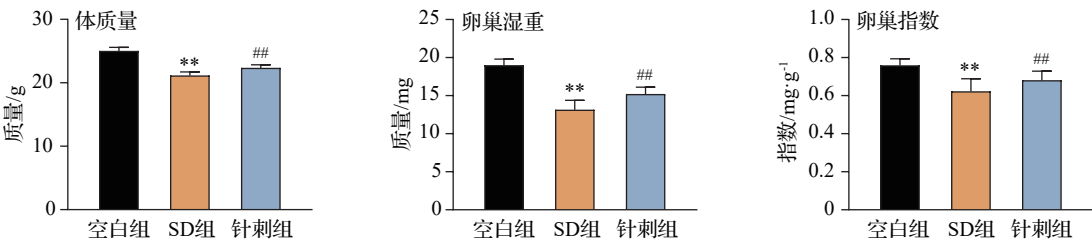
2.2 各组小鼠体质量、卵巢湿重及卵巢指数比较

与空白组比较, SD 组小鼠处死前测得的体质量、卵巢湿重及卵巢指数降低 ( $P < 0.01$ ); 与 SD 组比较, 针刺组小鼠处死前测得的体质量、卵巢湿重及卵巢指数提高 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

表 2 各组小鼠动情周期紊乱率的比较 (15 只鼠/组)  
Table 2 Comparison of estrous cycle disorder rate of mice in the 3 groups (15 mice/group)

| 组别   | 干预前    |        |          | 干预后    |        |                     |
|------|--------|--------|----------|--------|--------|---------------------|
|      | 周期正常/只 | 周期紊乱/只 | 紊乱率/%    | 周期正常/只 | 周期紊乱/只 | 紊乱率/%               |
| 空白组  | 15     | 0      | 0.00     | 15     | 0      | 0.00                |
| SD 组 | 0      | 15     | 100.00** | 0      | 15     | 100.00**            |
| 针刺组  | 0      | 15     | 100.00** | 11     | 4      | 26.67 <sup>##</sup> |

注: SD 为睡眠剥夺。与同时点空白组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与同时点 SD 组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。



注: SD 为睡眠剥夺。与空白组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 SD 组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

图 1 各组小鼠体质量、卵巢湿重及卵巢指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 15 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of body weight, ovarian wet weight, and ovarian index of mice in the 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ , 15 mice/group)

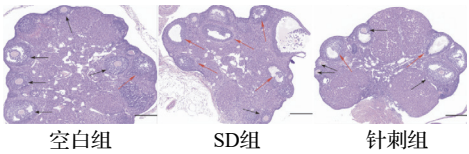
2.3 各组小鼠卵巢组织形态学比较

空白组小鼠卵巢形态规则, 各级卵泡多且分布均匀, 卵泡膜和颗粒细胞层界限清晰, 颗粒细胞排列紧密; SD 组小鼠卵巢形态被破坏, 卵泡数量减少、闭锁卵泡增多, 颗粒细胞排列松散, 卵巢间质部分出现纤维化或萎缩; 针刺组闭锁卵泡减少、正常卵泡增多, 卵巢整体形态改善。见图 2。

2.4 各组小鼠血清 AMH、FSH、LH 和 E2 含量比较

与空白组比较, SD 组小鼠血清 AMH 和 E2 含量下降 ( $P < 0.01$ ), FSH 和 LH 含量升高 ( $P < 0.01$ ); 与 SD 组比较, 针刺组小鼠血清 AMH 和 E2 含量升

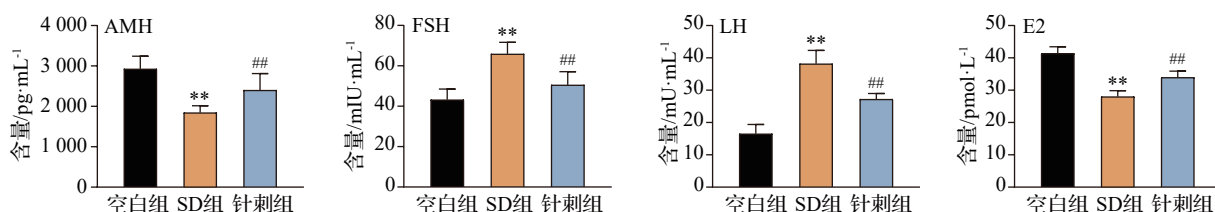
高 ( $P < 0.01$ ), FSH 和 LH 含量降低 ( $P < 0.01$ )。见图 3。



注: SD 为睡眠剥夺。标尺 = 100  $\mu\text{m}$ 。黑色箭头示发育正常的各级卵泡, 红色箭头示闭锁卵泡。

图 2 各组小鼠卵巢组织形态学比较 (HE 染色)

Fig. 2 Comparison of ovarian morphology of mice in the 3 groups (HE staining)



注:AMH为抗缪勒管激素,FSH为促卵泡生成素,LH为促黄体生成素,E2为雌二醇,SD为睡眠剥夺。与空白组比较,  
\*\* $P<0.01$ ;与SD组比较,## $P<0.01$ 。

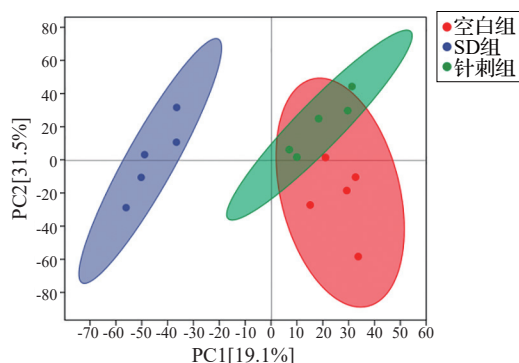
图3 各组小鼠血清AMH、FSH、LH和E2含量比较( $\bar{x}\pm s$ ,7只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of serum AMH, FSH, LH, and E2 levels of mice in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ , 7 mice/group)

## 2.5 转录组学分析

### 2.5.1 主成分分析(PCA)

PCA结果显示各组之间存在较为明显的差异,满足进一步分析的条件。见图4。



注:PCA为主成分分析,SD为睡眠剥夺。红色圆点为空白组样本,蓝色圆点为SD组样本,绿色圆点为针刺组样本。  
各点距离越近表明样本间相似性越高。

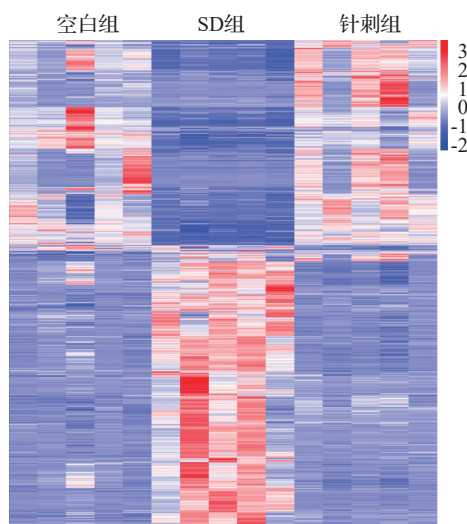
图4 各组小鼠卵巢转录组学PCA分析(5只鼠/组)

Fig. 4 PCA analysis of ovarian transcriptome of mice in the 3 groups (5 mice/group)

### 2.5.2 DEGs筛选

空白组和SD组之间共鉴定得出1 623个DEGs(SD组935个上调和688个下调);SD组和针刺组之间共鉴定得出438个DEGs(针刺组130个上调和308个下调)。聚类分析结果表明,这些DEGs的表达水平在不同组间表现出较为明显的差异,而组内的DEGs表达模式相似性较高,满足进一步分析条件。见图5。

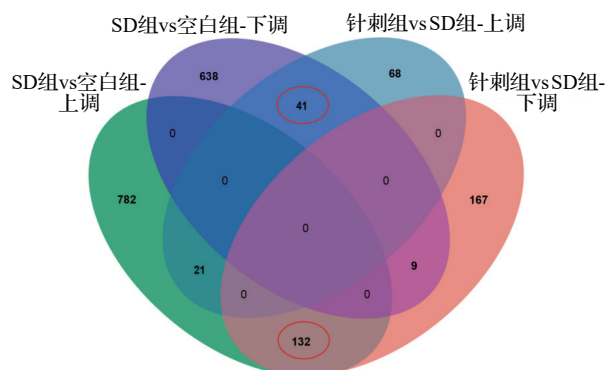
空白组、SD组和针刺组之间共筛选到203个交集DEGs。其中,132个DEGs在SD组中表达升高,而在针刺组中表达降低;41个DEGs在SD组中表达降低,而在针刺组中表达升高。因此,这173个显示出回调趋势的交集DEGs可能是针刺起效的重要靶标,将作为后续功能分析。见图6。



注:SD为睡眠剥夺,DEG为差异表达基因。图中每一行为一个DEG,每一列为一个样本,红色表示DEGs呈上调趋势,蓝色表示DEGs呈下调趋势。

图5 各组小鼠卵巢转录组学DEGs聚类热图(5只鼠/组)

Fig. 5 DEGs clustering heatmap of ovarian transcriptome of mice in the 3 groups (5 mice/group)



注:SD为睡眠剥夺,DEG为差异表达基因。○示共表达回调差异DEGs。

图6 各组小鼠卵巢转录组学交集DEGs筛选韦恩图(5只鼠/组)

Fig. 6 Venn diagram of intersecting DEGs of ovarian transcriptome of mice in the 3 groups (5 mice/group)

### 2.5.3 GO 分析和KEGG 富集分析

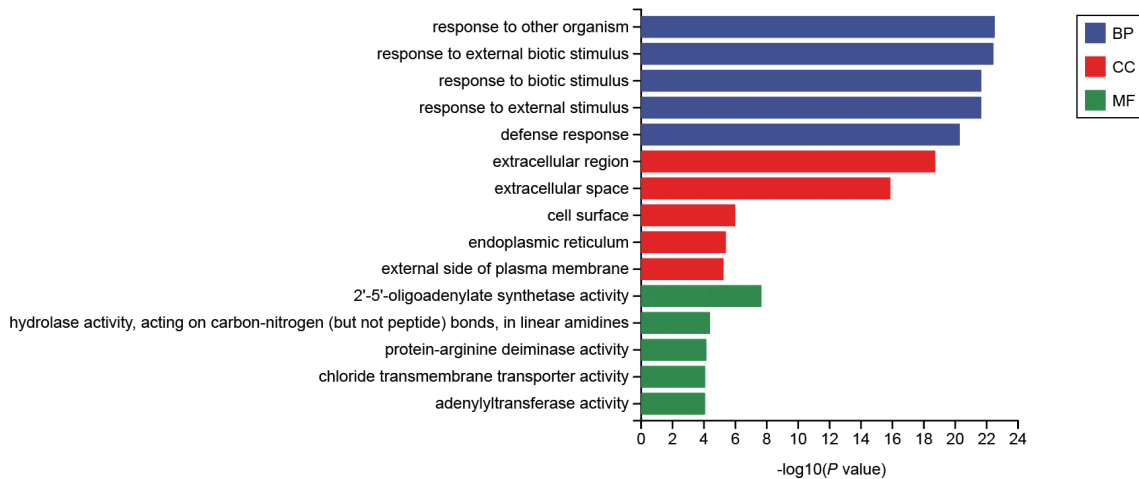
GO 分析表明,交集 DEGs 主要参与的生物过程(BP)是对其他生物体的反应(response to other organism)和对外界生物刺激的反应(response to external biotic stimulus)等;主要发生在细胞外区域(extracellular region)、细胞外空间(extracellular space)和细胞表面(cell surface)等细胞组分(CC),同时与 2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性(2'-5'-oligoadenylate synthetase activity)等分子功能(MF)

有关。见图 7。

KEGG 富集分析结果表明,交集 DEGs 主要与 cAMP 信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路、Apelin 信号通路等相关。见图 8。

### 2.5.4 cAMP 信号通路 GSEA 分析及关键 DEGs 筛选

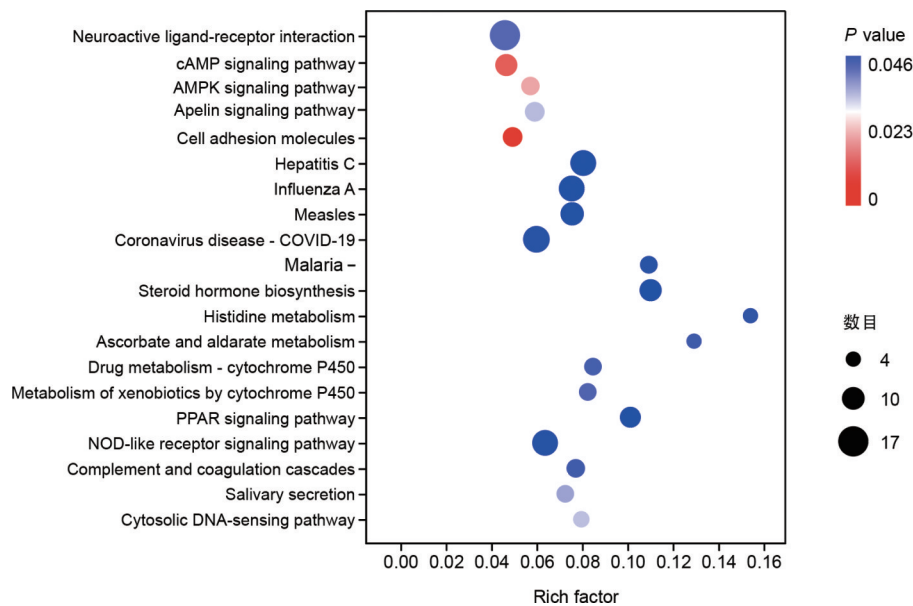
KEGG 分析结果显示,DEGs 中 cAMP 信号通路显著富集。进一步 GSEA 分析表明,该通路在 SD 组中呈负向富集( $NES < 0$ ),提示该通路相关基



注:DEG 为差异表达基因,GO 为基因本体,BP 为生物过程,CC 为细胞组分,MF 为分子功能。纵坐标为 GO 条目,横坐标 $-\log_{10}(P \text{ value})$ 代表对应 GO 条目的富集显著性。

图 7 各组小鼠卵巢 173 个交集 DEGs 的 GO 分析

Fig. 7 GO analysis of ovarian 173 intersecting DEGs of mice in the 3 groups



注:DEG 为差异表达基因,KEGG 为京都基因与基因组百科全书,cAMP 为环磷酸腺苷,AMPK 为腺苷酸活化蛋白激酶,PPAR 为过氧化物酶体增殖物活化受体。横坐标为富集因子(富集到该通路的差异基因个数与注释到该通路的总基因数之比),纵坐标为 KEGG 通路,图中点的大小表示相应通路中富集到的基因数目,颜色的深浅表示显著性水平高低。

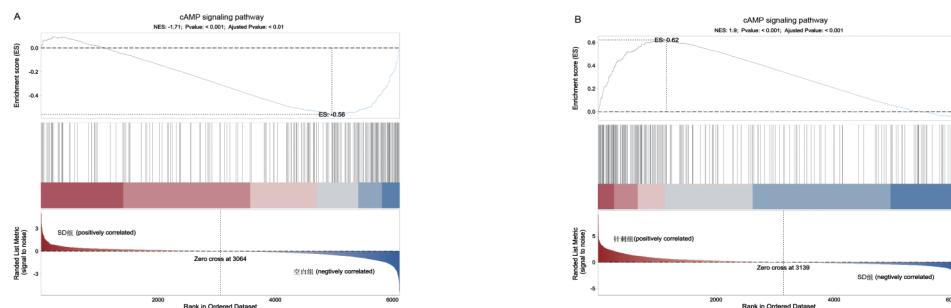
图 8 各组小鼠卵巢 173 个交集 DEGs 的 KEGG 富集分析

Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis of ovarian 173 intersecting DEGs of mice in the 3 groups

因整体富集于排序基因列表的下调端,表现为通路活性降低;而在针刺组中呈正向富集( $NES > 0$ ),提示相关基因富集于排序基因列表的上调端,表明该通路活性增强,提示针刺可能通过调节cAMP信号通路发挥调控作用。见图9。

结合SD组与针刺组该通路的DEGs结果,根据 $P$ 值大小筛选,通路中主要涉及的4个关键基因为FSHR、ADCY5、PRKACA和CREB1。其中,

FSHR位于通路上游,感受外界信号并启动下游反应;ADCY5负责催化ATP生成第二信使cAMP;PRKACA在下游执行磷酸化调控;CREB1作为转录因子介导基因表达调节。上述4个分子基本覆盖了cAMP通路的主要作用环节,可较完整地解释针刺通过激活该通路改善SD相关卵巢功能减退的分子机制,因此将其作为后续验证的关键靶基因。



注:cAMP为环磷酸腺苷,GSEA为基因集富集分析,ES为富集得分,NES为标准化富集得分,SD为睡眠剥夺。图A和图B分别为空白组和SD组之间及针刺组和SD组之间cAMP信号通路GSEA分析结果。图中上面部分每个位置对应的ES值的分布曲线,最高峰处的得分是基因集的ES值;中间部分用线条标记了对应基因集中出现在排序列表中的位置,每条竖线代表一个基因;下面部分是所有基因排序后分布情况,图A中红色部分对应的基因在SD组中高表达,蓝色部分对应的基因在空白组中高表达;图B中红色部分对应的基因在针刺组中高表达,蓝色部分对应的基因在SD组中高表达。NES表示通路整体变化方向,正值代表该通路富集上调,负值代表富集下调。

图9 各组小鼠卵巢转录组学cAMP信号通路GSEA分析

Fig. 9 GSEA analysis of the cAMP signaling pathway of ovarian transcriptome of mice in the 3 groups

## 2.6 各组小鼠卵巢组织cAMP含量比较

与空白组相比,SD组小鼠卵巢组织cAMP含量降低( $P < 0.01$ );与SD组相比,针刺组小鼠卵巢组织cAMP含量提高( $P < 0.01$ )。见图10。

## 2.7 各组小鼠卵巢组织FSHR、CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA表达比较

与空白组相比,SD组小鼠卵巢组织FSHR、

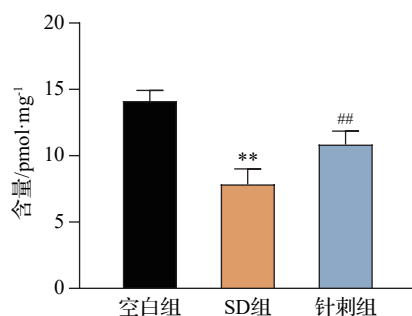
CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA表达水平不同程度降低( $P < 0.01$ );与SD组相比,针刺组小鼠卵巢组织FSHR、CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA表达水平不同程度提高( $P < 0.01, P < 0.05$ ),与转录组学结果表达趋势一致。见图11。

## 2.8 各组小鼠卵巢组织FSHR、p-CREB1/CREB1、ADCY5、PRKACA蛋白表达比较

与空白组相比,SD组小鼠卵巢组织FSHR、ADCY5、PRKACA蛋白表达水平及p-CREB1/CREB1比值不同程度降低( $P < 0.01$ );与SD组相比,针刺组小鼠卵巢组织FSHR、ADCY5、PRKACA蛋白表达水平及p-CREB1/CREB1比值不同程度提高( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见图12。

## 3 讨论

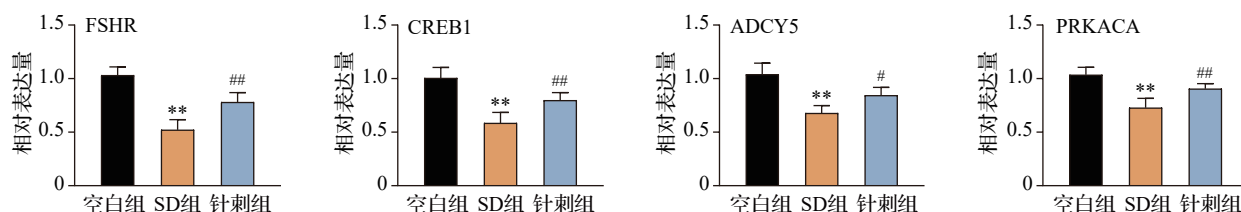
睡眠是维持机体正常生理功能的重要过程,对神经、免疫、内分泌等系统均具有重要调节作用<sup>[18]</sup>。近年来,随着生活节奏加快、夜班工作频繁及电子产品的广泛使用,不同程度的SD现象在育龄女性中日益普遍,成为影响女性生殖健康的重要潜在危



注:cAMP为环磷酸腺苷,SD为睡眠剥夺。与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与SD组比较,## $P < 0.01$ 。

图10 各组小鼠卵巢组织cAMP含量比较( $\bar{x} \pm s$ , 7只鼠/组)

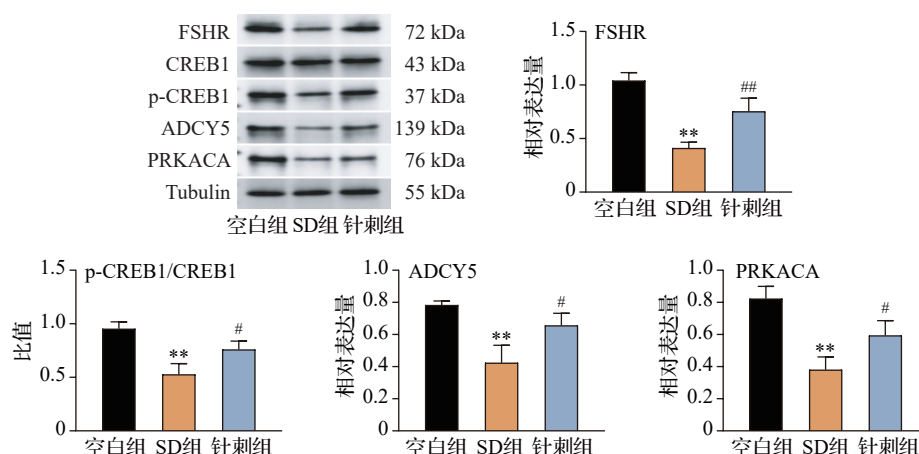
Fig. 10 Comparison of ovarian cAMP levels of mice in the 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ , 7 mice/group)



注:FSHR为促卵泡生成素受体,CREB1为环磷酸腺苷效应元件结合蛋白1,ADCY5为腺苷酸环化酶5,PRKACA为蛋白激酶A催化亚基 $\alpha$ ,SD为睡眠剥夺。与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与SD组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

图11 各组小鼠卵巢组织FSHR、CREB1、ADCY5、PRKACA mRNA表达比较( $\bar{x}\pm s$ ,5只鼠/组)

Fig. 11 Comparison of ovarian FSHR, CREB1, ADCY5, and PRKACA mRNA expression of mice in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ , 5 mice/group)



注:FSHR为促卵泡生成素受体,CREB1为环磷酸腺苷效应元件结合蛋白1,p-CREB1为磷酸化环磷酸腺苷效应元件结合蛋白1,ADCY5为腺苷酸环化酶5,PRKACA为蛋白激酶A催化亚基 $\alpha$ ,SD为睡眠剥夺。与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与SD组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

图12 各组小鼠卵巢组织FSHR、p-CREB1/CREB1、ADCY5、PRKACA蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s$ ,3只鼠/组)

Fig. 12 Comparison of ovarian FSHR, p-CREB1/CREB1, ADCY5, and PRKACA protein expression levels of mice in the 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ , 3 mice/group)

险因素之一。研究<sup>[8-9,19]</sup>表明,长期或反复SD会干扰HPO轴功能,导致性激素水平异常、卵巢组织结构损伤,进而诱发卵巢功能减退甚至影响生育能力。本研究结果显示,SD后小鼠动情周期紊乱率增加,体质量下降,卵巢湿重与指数降低,卵巢结构出现不同程度病理损伤,血清性激素水平紊乱,这些结果共同提示SD诱导的卵巢功能减退模型成功建立。

SD导致的卵巢功能减退在中医学中大致可归属于“劳伤”的范畴。中医认为<sup>[20-21]</sup>,肾为生殖之根,脾为气血生化之源,二者功能失调,易致冲任失养,胞宫失调,进而影响月经与生育。而睡眠为养生之要,长期失眠或睡眠不足易耗伤心神,进而影响内分泌功能。基于此病机特点,本研究选取“百会”“三阴交”“关元”3穴进行针刺干预。百会为诸阳之会,具有醒脑安神、调和气血之功。现代研究<sup>[22]</sup>表明,该穴可调节中枢神经系统功能,改善睡眠障碍及应激状态,对于缓解SD诱发的神经内分泌紊乱

具有积极意义。三阴交为脾、肝、肾3经交会穴,有调控冲任,养血安神之功。研究<sup>[23]</sup>证实,针刺此穴可调节睡眠时相,影响性激素分泌,促进卵巢组织修复。关元属任脉,为补肾固本、温阳益精要穴,与女子胞宫功能密切相关。研究<sup>[24]</sup>表明,针刺这一穴位可调控HPO轴的功能状态,增加卵巢血供,改善卵巢内分泌环境。总之,百会、三阴交、关元3穴配伍,可“上调神志、中调脾肝、下补肾元”,有利于整体调节SD诱导的卵巢功能障碍。本研究结果显示,针刺后小鼠动情周期紊乱率、体质量、卵巢指数、卵巢病理损伤和血清激素水平均得到不同程度改善,提示针刺对于缓解SD相关的卵巢功能减退有积极意义。

为了进一步探究针刺改善SD相关卵巢功能减退的分子机制,本研究对各组小鼠卵巢组织进行了转录组测序。通过差异表达分析,我们鉴定出在SD组与空白组之间显著改变的DEGs,并进一步筛选出针刺干预后呈回调趋势的173个DEGs,即这些

基因在SD组中表达异常,而在针刺后其表达水平向正常状态恢复。这些回调基因的表达模式不仅反映了SD诱导的分子损伤特征,也为揭示针刺干预的潜在机制提供了重要线索。基于此,我们进一步对这些DEGs进行了功能富集与通路分析,以探讨其潜在的生物学意义和关键调控通路。

GO富集分析结果表明,这些DEGs在BP方面主要富集于“对其他生物的反应”“对外部生物刺激的反应”和“对生物刺激的反应”等,提示SD可能扰乱卵巢微环境稳态,异常激活局部免疫应答,或干扰细胞间正常信号传递,从而影响卵泡发育、激素合成及分泌等关键生理过程,而针刺干预可能通过调控这些关键基因表达,缓解免疫过度激活,重塑卵巢内的信号交流与稳态,为卵泡发育和激素分泌提供更有利的微环境。在CC层面,这些DEGs显著富集于“细胞外区域”“细胞外空间”和“细胞表面”,提示其产物多定位于细胞外基质或膜表面受体,参与细胞间的信息传递及对外部刺激的感应与响应。细胞外信号与膜受体之间的相互作用,在调节激素分泌、细胞因子传导及卵泡微环境维持中具有重要意义,这进一步显示SD可能干扰了卵巢细胞的外部信号感应与应答过程,而针刺可能通过调节细胞外部信号通路的组成或活性,恢复卵巢细胞正常的信号接收与转导能力。在MF层面,这些DEGs主要涉及“2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性”和“蛋白精氨酸脱氨酶活性”等功能。其中,2'-5'-寡腺苷酸合成酶是干扰素通路的关键酶,其活性上调提示SD可能激活了卵巢局部的抗病毒或炎症反应,导致细胞应激损伤<sup>[25]</sup>;而蛋白精氨酸脱氨酶可能参与蛋白质翻译后修饰或代谢调控,其活性异常或可干扰细胞内稳态维持<sup>[26]</sup>。针刺干预可能通过调节这些关键酶活性,抑制过度的免疫炎症反应,恢复细胞代谢平衡,从而改善卵巢功能。综上,SD引起的卵巢损伤不仅涉及局部免疫和应激反应,还可能通过干扰细胞外信号及关键酶功能影响卵巢稳态,而针刺可以多层次调控改善卵巢功能状态。

KEGG富集分析结果表明,这些DEGs与cAMP信号通路、AMPK信号通路和Apelin信号通路等密切相关,体现了针刺多靶点协同调节的作用特点。其中,cAMP信号通路是卵巢功能调控的核心轴之一,贯穿卵泡发育、排卵及类固醇合成全过程<sup>[27-29]</sup>。当cAMP水平稳定时,卵泡细胞能够保持正常增殖和分化,促进激素合成,并维持卵巢内稳态。相反,cAMP水平下降可能导致卵泡成熟受阻、

激素生成不足及卵巢微环境紊乱,从而影响卵泡发育和排卵。Jiang等研究<sup>[30]</sup>显示,慢性应激可能通过cAMP信号通路损伤卵母细胞造成卵巢储备下降,提示cAMP的失衡可能是SD等应激状态导致卵巢功能受损的重要机制之一。AMPK信号通路是细胞能量稳态的关键调控枢纽,其活性下降与卵巢老化、卵泡发育障碍及类固醇生成受抑密切相关,适度激活AMPK可促进脂质氧化和葡萄糖利用,抑制过度氧化应激,改善卵巢能量代谢状态并延缓功能退化<sup>[31-32]</sup>。已有研究<sup>[33]</sup>显示,温和灸可能通过AMPK通路抑制小鼠体内氧化应激反应,调节激素水平,进而保护卵巢功能。Apelin信号通路在卵巢中同样具有重要功能,可通过改善局部血流、抑制细胞凋亡和氧化应激,促进卵泡发育<sup>[34]</sup>。研究<sup>[35]</sup>表明,Apelin可通过调节多个下游通路提高卵巢细胞的能量代谢和抗凋亡能力。综上,针刺可能通过调节cAMP、AMPK和Apelin等多条信号通路,从多层次协调卵巢局部血流、代谢和激素合成功能,进而改善SD诱导的卵巢损伤。

富集分析显著性排序结果显示cAMP信号通路的P值最小,提示其与卵巢功能异常的关联最为密切;同时,已有研究<sup>[28,36]</sup>表明,cAMP信号通路是调控卵泡发育、颗粒细胞增殖及激素合成的重要信号轴,因此被选为本研究重点探讨的通路。进一步GSEA分析结果显示,该通路在SD组中呈抑制状态,而针刺干预可激活cAMP信号通路。结合SD组与针刺组的DEGs分析结果,根据显著性排序,FSHR、ADCY5、PRKACA和CREB1变化最为显著。这些分子覆盖了通路的主要传导环节,能够系统反映cAMP信号通路的整体活性。其中,FSHR作为上游受体,可在FSH结合后通过偶联G蛋白激活ADCY5,催化ATP转化为第二信使cAMP;升高的cAMP进一步激活PRKACA,促进其释放活性催化亚基;该亚基进一步磷酸化CREB1,使其转化为p-CREB1,后者转位入核并调控与卵巢功能相关的下游靶基因表达,从而参与卵泡发育、类固醇合成及细胞存活等关键过程。本研究表明,SD后卵巢组织中cAMP含量、FSHR、ADCY5和PRKACA蛋白和mRNA水平均不同程度下降,同时CREB1 mRNA、p-CREB1/CREB1蛋白表达比值下降,提示cAMP信号通路活性受损可能是SD诱发卵巢功能障碍的重要机制,因此靶向该通路关键蛋白可能改善SD相关的卵巢功能减退。Zhao等<sup>[37]</sup>研究显示,艾灸可以通过激活cAMP信号通路中FSHR、

CREB1等关键蛋白促进卵巢颗粒细胞中的类固醇生成,进而改善卵巢功能早衰大鼠的卵巢功能。本研究显示,针刺干预可回升卵巢cAMP水平,上调FSHR、ADCY5和PRKACA的mRNA及蛋白表达,同时提高CREB1 mRNA及p-CREB1/CREB1比值。CREB1的活性由其mRNA水平、总蛋白量和磷酸化状态共同决定:mRNA反映转录活性,为蛋白合成提供基础;总蛋白代表翻译储备;p-CREB1为活化形式,可进入细胞核启动下游促生殖基因表达。因此针刺既可以提高上游关键受体和酶的表达,又可以提升CREB1转录和翻译水平,增强p-CREB1活性,并最终通过激活下游促生殖相关基因转录,提高cAMP信号通路的活性,从而改善SD相关的卵巢功能减退。

综上,本研究通过转录组学分析,初步探讨了针刺对SD相关卵巢功能减退的改善作用,结果显示针刺可能通过激活cAMP信号通路,调节相关靶基因表达,从而改善卵巢功能。该研究为针刺干预睡眠障碍相关卵巢功能减退的机制提供了实验依据,也为相关疾病的防治提供了新的思路。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突。

## 参考文献

- [1] ABRAMS R M. Sleep deprivation[J]. *Obstet Gynecol Clin N Am*, 2015, 42(3): 493-506.
- [2] ORZEL -GRYGLEWSKA J. Consequences of sleep deprivation[J]. *Int J Occup Med Environ Health*, 2010, 23(1): 95-114.
- [3] TOBALDINI E, COSTANTINO G, SOLBIATI M, et al. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 74: 321-329.
- [4] KILLGORE W D S. Effects of sleep deprivation on cognition [C]// *Prog in Brain Res*. Amsterdam: Elsevier, 2010: 105-129.
- [5] LIEW S C, AUNG T. Sleep deprivation and its association with diseases: a review[J]. *Sleep Med*, 2021, 77: 192-204.
- [6] HONMA A, REVELL V L, GUNN P J, et al. Effect of acute total sleep deprivation on plasma melatonin, cortisol and metabolite rhythms in females[J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 51(1): 366-378.
- [7] BEROUKHIM G, ESENCAN E, SEIFER D B. Impact of sleep patterns upon female neuroendocrinology and reproductive outcomes: a comprehensive review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 16.
- [8] ANDERSEN M L, ALVARENGA T A F, GUINDALINI C, et al. Paradoxical sleep deprivation influences sexual behavior in female rats[J]. *J Sex Med*, 2009, 6(8): 2162-2172.
- [9] ANTUNES I B, ANDERSEN M L, BARACAT E C, et al. The effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats[J]. *Horm Behav*, 2006, 49(4): 433-440.
- [10] 沈洁, 高友玲, 卢鸽, 等. 电针对卵巢储备功能下降患者子宫内膜容受性和IVF-ET妊娠结局的影响[J]. *中国针灸*, 2022, 42(8): 879-883.
- [11] SHEN J, GAO Y L, LU G, et al. Effect of electroacupuncture on endometrial receptivity and IVF-ET pregnancy outcomes in patients with diminished ovarian reserve (in Chinese)[J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2022, 42(8): 879-883.
- [12] 邢利威, 刘凡, 董芹作, 等. 基于“冲为血海”的分期针灸治疗多囊卵巢综合征冷冻胚胎移植的疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(5): 2755-2758.
- [13] XING L W, LIU F, DONG Q Z, et al. Efficacy observation of staged acupuncture and moxibustion therapy based on the theory of “thorough fare vessel being sea of blood” on frozen-thawed embryo transfer in patients with polycystic ovary syndrome (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2022, 37(5): 2755-2758.
- [14] 于心同, 杨文佳, 赵娜, 等. 针刺治疗睡眠觉醒时相延迟障碍: 随机对照试验[J]. *中国针灸*, 2023, 43(3): 245-251.
- [15] YU X T, YANG W J, ZHAO N, et al. Acupuncture for delayed sleep-wake phase disorder: a randomized controlled trial (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2023, 43(3): 245-251.
- [16] 蒙燕萍. 柴胡龙骨牡蛎汤加减结合温针灸治疗对卵巢功能早衰患者卵巢血流状态及睡眠质量的影响[J]. *世界睡眠医学杂志*, 2023, 10(9): 2058-2060.
- [17] MENG Y P. Effect of Chaihu Longgu Muli decoction plus warming acupuncture and moxibustion on ovarian blood flow and sleep quality in patients with premature ovarian failure (in Chinese)[J]. *World Journal of Sleep Medicine*, 2023, 10(9): 2058-2060.
- [18] 李黄原. “培元解郁法”针刺治疗围绝经期失眠的临床疗效观察[D]. 福州: 福建中医药大学, 2025.
- [19] LI H Y. Clinical observation on the therapeutic effect of acupuncture on perimenopausal insomnia by “Pei Yuan Jie Yu method” (in Chinese) [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2025.
- [20] YAN J M, ZHANG X Y, ZHU K X, et al. Sleep deprivation causes gut dysbiosis impacting on systemic metabolomics leading to premature ovarian insufficiency in adolescent mice [J]. *Theranostics*, 2024, 14(9): 3760-3776.
- [21] 许雅琦, 金治平, 张倩, 等. 睡眠剥夺致雌性大鼠生育力下降及其机制[J]. *中山大学学报(自然科学版)(中英文)*, 2023, 62(2): 51-59.
- [22] XU Y Q, JIN Z P, ZHANG Q, et al. Sleep deprivation induced fertility decline in female rats and its mechanism (in Chinese) [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2023, 62(2): 51-59.
- [23] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分: 小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 445-446.
- [24] China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature

- and location of acupoints commonly used in experimental animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [18] RAMOS A R, WHEATON A G, JOHNSON D A. Sleep deprivation, sleep disorders, and chronic disease [J]. *Prev Chronic Dis*, 2023, 20: E77.
- [19] YI Z Y, LIANG Q X, ZHOU Q, et al. Maternal total sleep deprivation causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in oocytes associated with fertility decline in mice [J]. *PLoS One*, 2024, 19(10): e0306152.
- [20] 辛喜艳, 魏佳俐, 高宇, 等. 卵巢储备功能减退患者中医证候特征与卵巢功能及体外受精与胚胎移植结局关系[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(11): 6113-6118.
- XIN X Y, WEI J L, GAO Y, et al. Relationship between traditional Chinese medicine syndrome and ovarian function, *in vitro* fertilization and embryo transfer outcomes in patients with diminished ovarian reserve (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2024, 39(11): 6113-6118.
- [21] 刘敏, 唐敏洁, 钱俏红, 等. 睡眠障碍与卵巢储备功能下降的中西医研究进展[J]. *复旦学报(医学版)*, 2024, 51(5): 831-836.
- LIU M, TANG M J, QIAN Q H, et al. Research progress in traditional Chinese and western medicine on sleep disorders and decreased ovarian reserve (in Chinese) [J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 2024, 51(5): 831-836.
- [22] 周紫琳, 李嘉玉, 李京谕, 等. 百会、四神聪穴治疗卒中后失眠的作用机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(7): 216-220.
- ZHOU Z L, LI J Y, LI J Y, et al. Research progress on the mechanism of acupuncture at Baihui (DU20) and Sishencong (EX-HNI) acupoints in the treatment of post-stroke insomnia (in Chinese) [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 27(7): 216-220.
- [23] 曹华, 冯美果, 侯帅, 等. 电针三阴交对围绝经期失眠大鼠睡眠时相的影响及作用机制研究[J]. *针灸临床杂志*, 2019, 35(8): 80-83.
- CAO H, FENG M G, HOU S, et al. Effects and mechanism study of electro-needling SP6 on sleep phase in rats with perimenopausal insomnia (in Chinese) [J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2019, 35(8): 80-83.
- [24] 李娜, 程凯, 周静. 逆时针关元对去卵巢大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(8): 45-47.
- LI N, CHENG K, ZHOU J. Effects of preventive-electroacupuncture and preventive-moxibustion at Guanyuan (RN4) on hypothalamus-pituitary-ovary axis in ovariectomized rats (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2013, 20(8): 45-47.
- [25] KRISTIANSEN H, SCHERER C A, MCVEAN M, et al. Extracellular 2'-5' oligoadenylate synthetase stimulates RNase L-independent antiviral activity: a novel mechanism of virus-induced innate immunity [J]. *J Virol*, 2010, 84(22): 11898-11904.
- [26] BICKER K L, THOMPSON P R. The protein arginine deiminases: structure, function, inhibition, and disease [J]. *Biopolymers*, 2013, 99(2): 155-163.
- [27] KILANOWSKA A, ZIÓŁKOWSKA A, STASIAK P, et al. cAMP-dependent signaling and ovarian cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3835.
- [28] ZHENG W Y, ZHANG T, ZHAO T, et al. cAMP controls the balance between dormancy and activation of primordial follicles in mouse ovaries [J]. *PNAS Nexus*, 2023, 2(3): pgad055.
- [29] LUO M, YANG Z Q, HUANG J C, et al. Genistein protects ovarian granulosa cells from oxidative stress via cAMP-PKA signaling [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(2): 433-445.
- [30] JIANG Y W, XU J, TAO C Q, et al. Chronic stress induces meiotic arrest failure and ovarian reserve decline via the cAMP signaling pathway [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1177061.
- [31] ZHU Q Y, DU J H, LI Y, et al. Downregulation of glucose-energy metabolism via AMPK signaling pathway in granulosa cells of diminished ovarian reserve patients [J]. *Gene*, 2025, 933: 148979.
- [32] YANG W N, WANG L J, WANG F L, et al. Roles of AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian reproduction [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 593005.
- [33] 房延苏, 尹尧丽, 沈梅红, 等. 探讨温和灸通过调控 AMPK/PGC-1 $\alpha$  信号抑制氧化应激反应保护早发性卵巢功能不全模型小鼠卵巢功能的作用 [J]. *北京中医药大学学报*, 2025, 48(4): 583-592.
- FANG Y S, YIN Y L, SHEN M H, et al. Exploration of the protection of mild moxibustion on ovarian function in mice with premature ovarian insufficiency by regulating AMPK/PGC-1 $\alpha$  signal, thus inhibiting the response to oxidative stress (in Chinese) [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 48(4): 583-592.
- [34] ROCHE J, RAMÉ C, REVERCHON M, et al. Apelin (APLN) and apelin receptor (APLNR) in human ovary: expression, signaling, and regulation of steroidogenesis in primary human luteinized granulosa cells [J]. *Biol Reprod*, 2016, 95(5): 104.
- [35] SHUANG L, JIDONG W, HONGJUAN P, et al. Effects of apelin on proliferation and apoptosis in rat ovarian granulosa cells [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2016, 43(3): 409-413.
- [36] KASEDER M, SCHMID N, EUBLER K, et al. Evidence of a role for cAMP in mitochondrial regulation in ovarian granulosa cells [J]. *Mol Hum Reprod*, 2022, 28(10): gaac030.
- [37] ZHAO R, RAN L X, YAO H Y, et al. Moxibustion ameliorates ovarian function in premature ovarian insufficiency rats by activating cAMP/PKA/CREB to promote steroidogenesis in ovarian granulosa cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2024, 242: 106547.

收稿日期:2025-10-08 修回日期:2025-11-03

网络首发:2026-07-01

编辑:秦田雨