

☆ XXXX ☆

基于KP/FSHR通路探讨电针改善围绝经期大鼠卵巢功能减退的机制

罗秋平¹, 李虹莹¹, 杨心彧¹, 卢春霞², 崔瑾^{1,2}(¹贵州中医药大学针灸推拿学院, 贵阳 550000; ²贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550000)

【摘要】 目的:观察电针对围绝经期卵巢功能减退大鼠卵巢功能的作用,探讨其通过KP/FSHR通路延缓卵巢衰老的潜在分子机制。**方法:**40只10~12月龄SPF级雌性SD大鼠中,选取10只动情周期正常的大鼠作为对照组,30只动情周期紊乱的大鼠作为围绝经期卵巢功能减退模型大鼠,并随机分为模型组、电针组和电针+拮抗剂组,每组10只。电针组电针“关元”“气海”、双侧“太冲”“太溪”,频率2 Hz,电流强度0.1~1 mA,每日1次,每次20 min,连续治疗14 d;电针+拮抗剂组同时接受电针与KP234腹腔注射(100 nmol/kg,隔日1次),疗程14 d。采集大鼠阴道涂片,用快速革兰氏染色法观察大鼠动情周期并对比各组大鼠治疗前及治疗期间动情周期变化情况。末次治疗24 h后,收集血清及卵巢组织,ELISA法检测大鼠血清抗缪勒管激素(AMH)、卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)和雌二醇(E2)含量,HE染色法观察大鼠卵巢组织学结构及卵泡发育情况,免疫荧光法测定大鼠卵巢组织活性氧(ROS)水平,实时荧光定量PCR法检测大鼠卵巢组织沉默信息调节因子1(Sirt1)、肿瘤抑制蛋白(p53)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子(p21)mRNA表达,免疫荧光法检测大鼠卵巢组织KP、KP受体(Kiss1R)、FSHR蛋白表达及KP/Kiss1R共定位情况,Western blot法检测大鼠卵巢组织Sirt1、p53、p21、KP、Kiss1R、FSHR蛋白表达。**结果:**治疗前,对照组大鼠动情周期均规律,与对照组比较,其余各组大鼠动情周期紊乱率升高($P<0.001$)。治疗后,与对照组比较,模型组大鼠动情周期紊乱率仍升高($P<0.001$),血清AMH、E2含量降低($P<0.001$),FSH、LH含量升高($P<0.001$),早期可观察到卵泡塌陷,颗粒细胞及膜细胞排列紊乱,晚期可见形态不规则的环状透明带,生长卵泡数目减少($P<0.001$),闭锁卵泡数目增多($P<0.001$),卵巢组织ROS水平升高($P<0.01$),Sirt1 mRNA及蛋白表达水平降低($P<0.01, P<0.001$),p53、p21 mRNA及蛋白表达水平升高($P<0.01, P<0.05, P<0.001$),KP蛋白平均荧光强度及表达水平升高($P<0.001$),Kiss1R、FSHR蛋白平均荧光强度及表达水平降低($P<0.01, P<0.001$),KP/Kiss1R共定位面积百分比降低($P<0.001$)。与模型组比较,电针组大鼠动情周期紊乱率降低($P<0.001$),血清AMH、E2含量升高($P<0.001, P<0.05$),FSH、LH含量降低($P<0.001, P<0.01$),颗粒细胞排列趋于规则,生长卵泡数目增多($P<0.01$),闭锁卵泡数目减少($P<0.01$),卵巢组织ROS水平降低($P<0.01$),Sirt1 mRNA及蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$),p53、p21 mRNA及蛋白表达水平降低($P<0.01, P<0.05, P<0.001$),KP蛋白平均荧光强度及表达水平降低($P<0.001, P<0.01$),Kiss1R和FSHR蛋白平均荧光强度及表达水平升高($P<0.01, P<0.001$),KP/Kiss1R共定位面积百分比升高($P<0.001$)。与电针组比较,除FSHR蛋白表达水平外,电针+拮抗剂组大鼠的其余指标均有不同程度逆转($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。**结论:**电针可能通过调控KP/FSHR通路减轻卵巢局部的氧化应激与细胞衰老,从而改善卵巢储备功能,延缓卵巢衰老进程。

【关键词】 电针;围绝经期卵巢功能减退;卵巢衰老;氧化应激;KP/FSHR信号通路

【DOI】 10.13702/j.1000-0607.20251424--罗秋平--基于KPFHR通路探讨电针改善围绝经期大鼠卵巢功能减退的机制--发稿提前

引用格式:罗秋平,李虹莹,杨心彧,等.基于KP/FSHR通路探讨电针改善围绝经期大鼠卵巢功能减退的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-13.

项目来源:贵州省科技计划项目[黔科合基础-ZK[2023]一般439]

通信作者:崔瑾, E-mail: cuijin@gzy.edu.cn

Mechanism of electroacupuncture in improving ovarian function decline in perimenopausal rats based on the kisspeptin/ follicle-stimulating hormone receptor pathway

Luo Qiuping¹, Li Hongying¹, Yang Xinyu¹, Lu Chunxia², Cui Jin^{1,2} (¹ School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China; ² The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on ovarian function in perimenopausal rats with ovarian function decline, and to explore its potential molecular mechanism underlying delaying ovarian aging through the Kisspeptin (KP)/follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) pathway. **Methods** Forty female SD rats were included in the present study. Ten rats with regular estrous cycles were selected as the control group. Thirty perimenopausal (disordered estrous cycle) rats with ovarian function decline were randomly divided into model, EA, and EA plus antagonist (KP234, an antagonist for KP) groups, with 10 rats in each group. For rats of the EA and EA+antagonist groups, EA (0.1—1 mA, 2 Hz) was applied to Guanyuan (CV4), Qihai (CV6), and bilateral Taichong (LR3) and Taixi (KI3) for 20 min, once daily for 14 consecutive days. After EA intervention, rats of the EA+antagonist group received intraperitoneal injection of KP antagonist KP234 (100 nmol/kg) once every other day for 14 days. During the intervention, vaginal smears were performed daily, and rapid Gram staining was conducted to determine the estrous cycles. Twenty-four hours after the last intervention, blood samples and ovarian tissues were collected for measuring the contents of serum anti-Müllerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and estradiol (E2) with ELISA. The ovarian histomorphology and follicular development were observed by H. E. staining. The reactive oxygen species (ROS) levels in the ovarian tissue were measured by immunofluorescence assay. The mRNA expression levels of Sirtuin 1 (Sirt1), tumor suppressor protein (p53) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) in the ovarian tissue were detected by real-time quantitative PCR. The immunoactivity of KP, KP receptor (Kiss1R) and FSHR, and the KP/Kiss1R colocalization in the ovarian tissue were detected by immunofluorescence staining. The protein expression levels of ovarian Sirt1, p53, p21, KP, Kiss1R and FSHR were detected by western blot. **Results** After modeling and treatment, all the rats (100%) of the model group, 20% in the EA group and 80% in the EA+inhibitor group had a disordered estrous cycle, being significantly lower in the EA group than in the model group ($P<0.001$), and significantly higher in the EA+inhibitor group than in the EA group ($P<0.05$). Compared with the control group, the model group showed a considerable decrease in the contents of serum AMH and E2, number of growing follicles, expression level of Sirt1 mRNA, and immunoactivity of Kiss1R and FSHR, and percent of colocalized area of KP/KissR, as well as the expression levels of Sirt1, Kiss1R and FSHR proteins ($P<0.001$, $P<0.01$), and a notable increase in the contents of serum FSH and LH, number of atretic follicles, ovarian ROS level, mRNA expression levels of p53 and p21, immunoactivity of KP, and protein expression of p53, p21 and KP ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). Following the intervention, modeling induced decrease and increase of all the indexes mentioned above were reversed by EA ($P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.01$) rather than by EA + inhibitor, suggesting an elimination of the therapeutic effect after administration of KP234, an antagonist for KP. Additionally, H.E. staining of the ovarian tissue displayed that in the model group, early on, the follicular collapse could be seen, with disordered arrangement of granulosa cells and theca cells, while in the later stage, irregularly shaped annular zona pellucida could be seen. The arrangement of granular cells in the EA group became more regular. **Conclusion** EA can improve the ovarian reserve function and delay ovarian aging by attenuating local oxidative stress and cellular senescence in the ovary through regulating the KP/FSHR pathway.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Perimenopausal ovarian function decline; Ovarian aging; Oxidative stress; KP/FSHR signaling pathway

卵巢衰老是女性生殖系统功能逐渐减退的自然生理过程,伴随卵泡数量减少、激素失衡及生育力下降,过早的增龄性卵巢功能降低不仅直接影响生殖内分泌系统,还可间接导致心血管疾病、骨质疏松和阿尔茨海默病等多器官功能障碍,因此卵巢

衰老被视为女性整体衰老进程的“启动器”^[1-2]。据报道,中国女性较欧洲女性表现出更早且更快的卵巢功能下降^[3]。随着社会生育年龄增加及老龄化趋势加剧,如何有效改善卵巢储备功能、延缓卵巢衰老成为生殖医学与老年医学的研究重点^[4-5]。

氧化应激被视为卵巢衰老的关键驱动因素^[6]。吻素(KP)是下丘脑神经元分泌的关键信号分子,其受体 Kiss1R 在卵巢颗粒细胞与卵母细胞广泛表达^[7],卵巢局部的 KP 信号系统通过自分泌/旁分泌途径调节氧化应激,参与细胞衰老及关键信号转导,从而影响激素合成与卵泡发育^[8-9]。研究显示 KP/卵泡刺激素受体(FSHR)信号轴是调控卵巢功能的重要枢纽,在卵巢衰老过程中,局部异常升高的 KP 分子下调 FSHR 表达,进而导致卵泡发育异常与激素水平紊乱^[10-11]。课题组前期临床研究表明,电针对卵巢储备功能减退具有改善作用^[12]。电针作为一种能够同时调节生殖内分泌与卵巢局部稳态的干预手段^[13],是否能通过调控 KP/FSHR 通路延缓卵巢功能衰退,尚不明确。因此,本实验以 KP/FSHR 通路为切入点,观察电针对围绝经期卵巢功能减退大鼠卵巢局部氧化应激及细胞衰老相关指标的影响,探讨电针延缓卵巢衰老的潜在机制,为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物实验

10~12月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只,体质量(310±20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(京)2024-0001。动物饲养于(22±2)℃条件下,湿度维持在 50%~60%,采用 12 h/12 h 光/暗循环交替,自由进食饮水。选取 10 只动情周期正常的大鼠作为对照组;动情周期紊乱的围绝经期卵巢功能减退大鼠随机分为模型组、电针组和电针+拮抗剂组,每组 10 只。本研究的所有动物实验操作遵循《关于善待实验动物的指导性意见》的规定,研究方案经贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(批号:2024036)。

1.2 主要试剂和仪器

快速革兰氏染色液(珠海贝索),Kisspeptin 234(KP234,美国 MCE),抗缪勒管激素(AMH)试剂盒、卵泡刺激素(FSH)试剂盒、促黄体生成激素(LH)试剂盒、雌二醇(E2)试剂盒,组织活性氧(ROS)荧光法测定试剂盒(上海江莱生物),SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(含基因组 DNA 清除柱)、SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR(With gDNA Eraser)试剂盒、2×SYBR Green qPCR Mix(With ROX)试剂盒(山东思科捷),Sirt1 抗体、p53 抗体(美国 Abmart),KP

抗体、Kiss1R 抗体、FSHR 抗体(美国 Affinity),p21 抗体、GAPDH 抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗(武汉三鹰),iF488-Tyramide、CY3-Tyramide(武汉赛维尔)。

华佗牌一次性无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司),电针治疗仪(上海医用电子仪器厂),光学显微镜、荧光显微镜、成像系统(日本尼康),离心机(上海安亭),全波长酶标仪、多功能酶标仪(美国 Thermo),Auto-Pure32A 全自动核酸提取仪(杭州奥盛),实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Rot kreuz),冰冻切片机(美国赛默飞世尔),垂直电泳仪、转印电泳仪、化学发光成像系统(武汉赛维尔),CaseViewer 数字切片浏览软件(匈牙利 3DHISTECH)。

1.3 围绝经期卵巢功能减退模型大鼠的筛选及分组

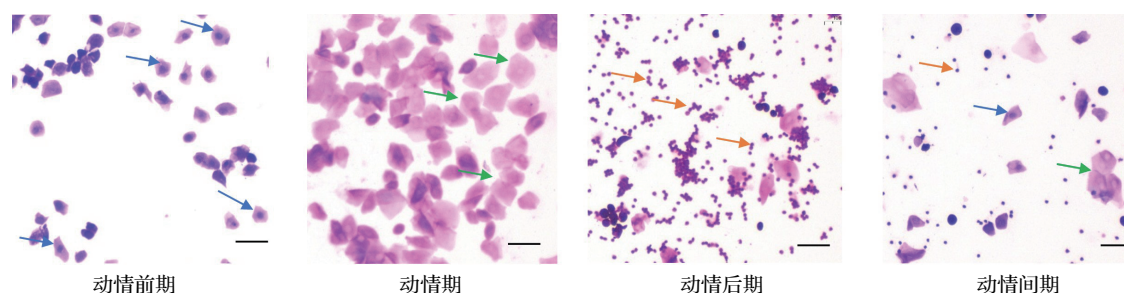
本研究选用的围绝经期卵巢功能减退大鼠是与临床吻合度较高的卵巢储备功能减退模型^[14]。在 8 月龄左右开始出现卵巢功能衰退,并持续至 12 月龄^[15],且 KP 参与卵泡发育调控^[11],故本研究选用卵巢储备功能下降的 10~12 月龄 SD 大鼠构建围绝经期卵巢功能减退大鼠模型。实验治疗前连续 10 d 每天上午 9 点采集大鼠阴道涂片,采用快速革兰氏染色法鉴定动情周期^[16]。大鼠的正常动情周期为 4~5 d,按顺序分为 4 个阶段:动情前期(以有核上皮细胞为主)、动情期(以角化上皮细胞为主)、动情后期(以白细胞为主)和动期间期(核上皮细胞、角化上皮细胞和白细胞都有)。见图 1。若观察到周期显著延长(>5 d)、顺序紊乱或某阶段停滞超过 3 d,则可判定为动情周期紊乱,提示卵巢储备功能下降,可作为围绝经期卵巢功能减退大鼠模型^[17-18]。

1.4 治疗方法

对照组及模型组:大鼠清醒状态下被固定在特制固定器上,每日固定 1 次,每次 20 min,连续 14 d。

电针组:固定大鼠后,参照《实验动物常用穴位名称与定位 第 2 部分:大鼠》^[19]及《实验针灸学》^[20]结合拟人比照法进行穴位定位,常规消毒穴位,“关元”“气海”直刺约 5 mm、双侧“太冲”“太溪”直刺约 2 mm;“关元”“气海”及双侧“太冲”“太溪”分别连接电针仪一对电极。电针参数为连续波,频率 2 Hz,电流强度 0.1~1 mA,每日电针 1 次,治疗 20 min,连续 14 d。

电针+拮抗剂组:选穴及操作同电针组,电针治疗结束 30 min 后给予每只大鼠腹腔注射 100 nmol/kg 的 KP234^[21],隔日 1 次,连续 14 d。



注:标尺=100 μm,蓝色箭头表示有核上皮细胞,绿色箭头表示角化上皮细胞,黄色箭头表示白细胞。

图1 大鼠正常动情周期的阴道脱落细胞涂片(快速革兰氏染色)

Fig. 1 Vaginal exfoliative cell smear of the normal estrous cycle of rats (rapid Gram staining)

1.5 检测指标及方法

快速革兰氏染色法观察动情周期:从治疗第1天起至治疗结束,所有大鼠每天上午9点取阴道分泌物涂片,固定大鼠,暴露阴道口,将蘸有0.9%氯化钠溶液的医用消毒小棉签伸入阴道,轻轻转动2~3圈获取分泌物,涂抹于干净的载玻片,待玻片干燥后采用快速革兰氏染色法按要求依次滴入龙胆紫液、碘液、脱色液和沙黄溶液,待玻片干燥后移到显微镜下观察并连接软件进行彩色图像拍摄。观察细胞分布比例,确定大鼠治疗前及治疗后动情周期变化。动情周期紊乱率(%)=组内动情周期紊乱大鼠数目/组内大鼠总数×100%。

取材:末次治疗24 h后,大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,取完血清后处死并取双侧卵巢。①血清收集:沿腹中线剖腹暴露腹主动脉,用0.45 mm采血针及普通采血管取血后,室温静置约30 min,在4℃、3 000 r/min条件下离心15 min,吸取上层血清分装后保存于-80℃冰箱,用于ELISA检测;②卵巢收集:颈椎脱臼法处死大鼠后将其固定于冰板上,沿着阴道口寻找大鼠的“Y”字型子宫,沿着子宫的两个角向上寻找到左右卵巢,取其双侧卵巢并剥离周围脂肪组织,每组大鼠一侧卵巢取皮质附近0.01 g的新鲜组织立即用于活性氧(ROS)荧光法检测,剩余卵巢组织切成两半后于-80℃冰箱保存,分别用于实时荧光定量PCR和Western blot检测,另一侧卵巢用4%多聚甲醛固定,用于苏木精-伊红(HE)染色法和免疫荧光染色法检测。

ELISA法检测血清抗缪勒管激素(AMH)、卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)和雌二醇(E2)含量:严格按照各指标(AMH、FSH、LH、E2)ELISA试剂盒说明书进行操作。将血清样本、标准品及质控品室温平衡,按序加入预先包被抗体的微

孔板中,孵育、洗涤后加入生物素标记的检测抗体,再次孵育、洗涤;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素,经孵育和彻底洗涤后,加入显色底物TMB溶液避光显色;待标准品梯度显色明显后,加入终止液终止反应。立即使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度值(OD值),根据标准品浓度与对应OD值绘制标准曲线并计算各样本中目标激素的浓度。

HE染色法观察卵巢组织学结构及卵泡发育动态:每组随机取6只大鼠多聚甲醛固定的卵巢组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,再浸蜡包埋成蜡块,使用切片机将蜡块连续切片(厚度为5 μm),贴附于载玻片上并烘干。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,进行HE染色:苏木精染液染色细胞核(呈蓝色),盐酸乙醇分化去除非特异性着色,流水返蓝;伊红染液复染细胞质及胶原等胞外基质(呈粉红色)。染色后的切片再次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,最后用中性树胶封固。在显微镜下观察卵巢皮质、髓质结构,识别生长卵泡(初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡及成熟卵泡)和闭锁卵泡的典型结构特征,从而全面评估卵巢的组织学形态和卵泡的发育阶段、质量及动态变化。采用CaseViewer软件采集图像。

荧光法测定卵巢组织活性氧(ROS)水平:每组随机取6只大鼠的新鲜卵巢组织0.01 g,根据试剂盒要求加入预冷提取液,冰浴条件下充分匀浆,4℃离心10 min后收集上清液;于黑色96孔板中设置测定管和空白管,避光混匀后于37℃条件下孵育30 min,立即用荧光酶标仪在488 nm激发波长/525 nm发射波长下读取荧光值(F),计算各样本相对荧光强度(ΔF)= $F_{测定管}-F_{空白管}$;按组织质量计算ROS强度。 $ROS强度=\Delta F/(T \times W)$ 。其中T为孵育时间=0.5 h;W为组织质量=0.01 g/样本。

实时荧光定量 PCR 法检测卵巢组织沉默信息调节因子 1(Sirt1)、酰化肿瘤抑制蛋白(p53)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子(p21)mRNA 表达水平:每组随机取 4 只大鼠卵巢冷冻组织约 20 mg,用组织 RNA 快速提取试剂盒(含基因组 DNA 清除柱)提取总 RNA,使用核酸分析仪检测 RNA 浓度和纯度后,采用 All-in-one RT SuperMix for qPCR (With gDNA Eraser)试剂盒对提取的 RNA 进行反转录,获得 cDNA 并保存于-20℃。反转录产物 cDNA 为后续 PCR 模板,依据 2×SYBR Green qPCR Mix(With ROX)试剂盒说明书进行,扩增条件设定为:94℃预变性 3 min;随后进行 40 个循环(94℃变性 10s,60℃退火延伸 30 s)。反应完成后,通过实时荧光定量 PCR 仪采集各反应孔 Ct 值。目的基因 mRNA 相对表达量以 GAPDH 为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算,并以对照组为基准进行归一化处理。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并提供。见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/ bp
Sirt1	上游 CAG TTC CAG CCA TCT CTG TGT CAC	138
	下游 GAT TCC TGC AAC CTG CTC CAA GG	
p53	上游 CCG TAT GAG CCA CCT GA	291
	下游 GTC CCG TCC CAG AAG ATT	
p21	上游 TGC TGC TCT CCC TTC CTC	98
	下游 CCT GTG TAC CCG TTC CCT	
GAPDH	上游 AAG ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC	138
	下游 AGC CTT GAC TGT GCC GTT GAA C	

注:Sirt1 为沉默信息调节因子 1,p53 为酰化肿瘤抑制蛋白,p21 为细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子。

免疫荧光染色检测卵巢组织 KP、Kiss1R、FSHR 蛋白表达及 KP/Kiss1R 共定位情况:每组随机取 3 只大鼠多聚甲醛固定后的卵巢组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,再浸蜡包埋成蜡块,使用切片机将蜡块连续切片(厚度为 5 μm),贴附于载玻片上并烘干。经环保脱蜡液梯度脱蜡、梯度乙醇水化后,按目标蛋白特性进行抗原修复,然后采用 3% H_2O_2 灭活内源过氧化物酶 25 min。双重免疫荧光染色检测 KP 与 Kiss1R,10% 兔血清封闭 30 min;加一抗 KP(1:200)4℃过夜→HRP 标记二抗室温孵

育 50 min→TSA 荧光染料 iF488-Tyramide(1:500)标记 KP 并避光孵育 10 min;微波洗脱抗体(关键步骤:同源修复液加热中火 8 min,停火 8 min,转中低火 7 min);加一抗 Kiss1R(1:150)4℃过夜→荧光二抗 CY3(1:400)标记孵育 50 min。单色免疫荧光染色 FSHR:封闭后直接添加一抗 FSHR(1:200)4℃过夜→荧光二抗 CY5(1:400)避光孵育 50 min。统一后续步骤:DAPI 染核 10 min,自发荧光淬灭剂处理 5 min,抗淬灭封片剂封片。应用 Image J 软件对免疫荧光图像进行分析。KP、Kiss1R、FSHR 蛋白表达水平采用平均荧光强度表示,KP 与 Kiss1R 共定位情况采用面积百分比表示。

Western blot 法检测卵巢组织 Sirt1、p53、p21、KP、Kiss1R、FSHR 蛋白表达水平:每组随机取 4 只大鼠卵巢冷冻组织约 20 mg,按组织重量(g):裂解液体积(mL)=1:5 的比例加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,使用高速组织研磨仪进行组织匀浆,匀浆后冰上裂解 30 min,裂解结束后于 4℃条件下离心 20 min。抽取上清液转至新的预冷离心管进行蛋白浓度检测。采用 BCA 法测定蛋白浓度并调整蛋白浓度至一致。取等量蛋白(30 μg)与上样缓冲液混合,沸水浴变性 5~10 min。样品经 PAGE 蛋白预制胶(浓度为 4~20%)电泳分离后,通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。转膜后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1~2 h。随后,膜在 4℃条件下分别与 Sirt1(1:1 000)、p53(1:1 000)、p21(1:800)、KP(1:800)、Kiss1R(1:800)、FSHR(1:1 000)及内参蛋白 GAPDH(1:2 000)的特异性一抗孵育过夜。次日,TBST 洗膜后,室温孵育相应种属的 HRP 标记二抗(1:5 000)1~2 h。经充分洗涤后,使用 ECL 化学发光显影液在化学发光成像系统上曝光显影,获取蛋白条带图像。使用 Image J 软件分析目标蛋白与内参蛋白 GAPDH 条带的灰度值。以目标蛋白与内参蛋白灰度值比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

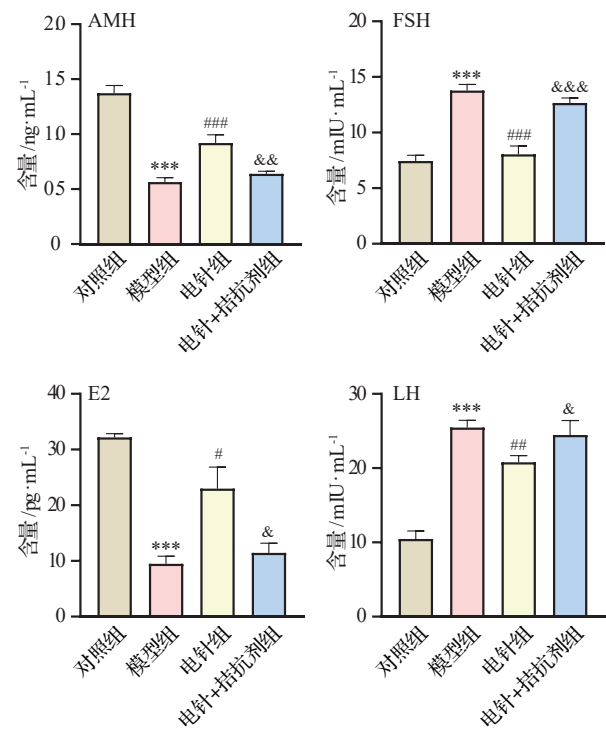
所有数据采用 SPSS26.0 软件进行分析,并使用 GraphPad Prism10.0 软件完成统计图的绘制。计数资料以例数和构成比(%)进行描述,多组率的比较采用 Fisher 精确概率法。计量资料符合正态分布,以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐的数据使用 LSD 检验进行事后两两比较;方差不齐的数据则采用塔姆黑尼(Tamhane's t_2)检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有

表2 各组大鼠动情周期紊乱率比较
Table 2 Comparison of estrous cycle disorder rate of rats in the 4 groups

组别	只数	治疗前/只			治疗期间/只		
		正常	紊乱	紊乱率/%	正常	紊乱	紊乱率/%
对照组	10	10	0	0	9	1	10
模型组	10	0	10	100***	0	10	100***
电针组	10	0	10	100***	8	2	20###
电针+拮抗剂组	10	0	10	100***	2	8	80&

注：与同时点对照组比较，*** $P<0.001$ ；与治疗期间模型组比较，### $P<0.001$ ；与治疗期间电针组比较，& $P<0.05$ 。

含量升高($P<0.001$, $P<0.05$)，FSH、LH 含量降低($P<0.001$, $P<0.01$)；与电针组比较，电针+拮抗剂组大鼠血清 AMH、E2 含量降低($P<0.01$, $P<0.05$)，FSH、LH 含量升高($P<0.001$, $P<0.05$)。见图3。



注：AMH为抗缪勒管激素，FSH为卵泡刺激素，E2为雌二醇，LH为促黄体生成激素。与对照组比较，*** $P<0.001$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ ；与电针组比较，& $P<0.05$ ，&& $P<0.01$ ，&&& $P<0.001$ 。

图3 各组大鼠血清AMH、FSH、LH、E2含量比较
($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

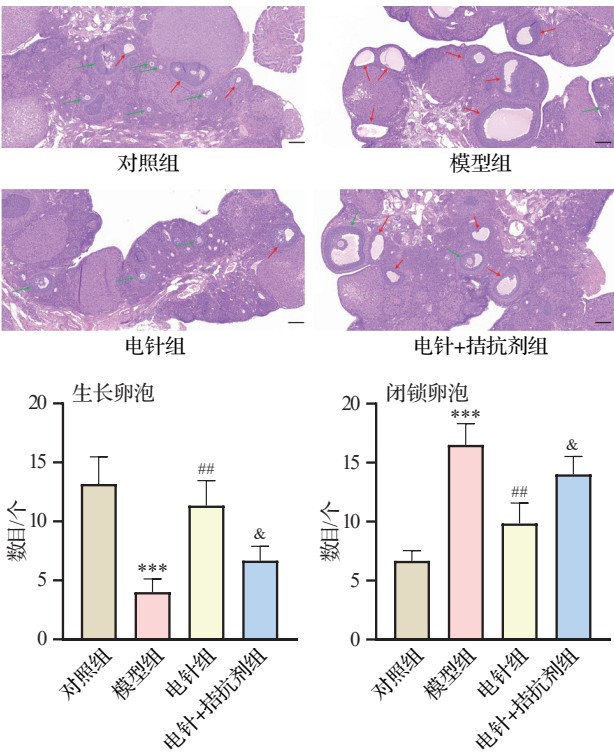
Fig. 3 Comparison of serum AMH, FSH, LH, and E2 levels of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.3 各组大鼠卵巢组织形态和各级卵泡数比较

对照组大鼠卵巢组织结构正常，镜下可观察到处于各发育阶段的卵泡，卵母细胞与颗粒细胞形态完整，细胞排列有序，卵泡内透明带与放射冠结构明显，可见卵丘结构及黄体内的颗粒物，闭锁卵泡数量少；与对照组比较，模型组大鼠早期可观察到卵泡塌陷，颗粒细胞及膜细胞排列紊乱，晚期可见形态不规则的环状透明带，生长卵泡数目减少($P<0.001$)，闭锁卵泡数目增多($P<0.001$)；与模型组比较，电针组大鼠颗粒细胞排列趋于规则，生长卵泡数目增多($P<0.01$)，闭锁卵泡数目减少($P<0.01$)；与电针组比较，电针+拮抗剂组大鼠颗粒细胞排列欠规则，生长卵泡数目减少($P<0.05$)，闭锁卵泡数目增多($P<0.05$)。见图4。

2.4 各组大鼠卵巢组织ROS水平比较

与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织ROS水平升高($P<0.01$)；与模型组比较，电针组大鼠卵巢组织ROS水平降低($P<0.01$)；与电针组比较，电针+



注：标尺=200 μm ，绿色箭头示生长卵泡，红色箭头示闭锁卵泡。与对照组比较，*** $P<0.001$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与电针组比较，& $P<0.05$ 。

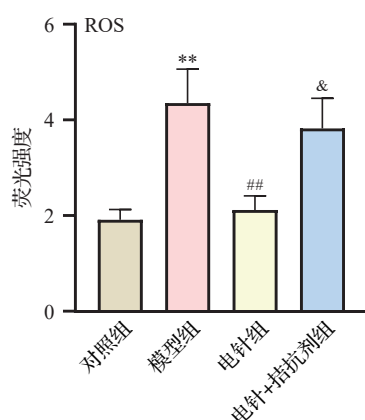
图4 各组大鼠卵巢组织形态及卵泡数目比较
(HE染色, $\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of ovarian tissue morphology and follicle counts of rats in the 4 groups (Hematoxylin-eosin staining, $\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

拮抗剂组大鼠卵巢组织 ROS 水平升高 ($P<0.05$)。见图 5。

2.5 各组大鼠卵巢组织 Sirt1、p53、p21 mRNA 表达水平比较

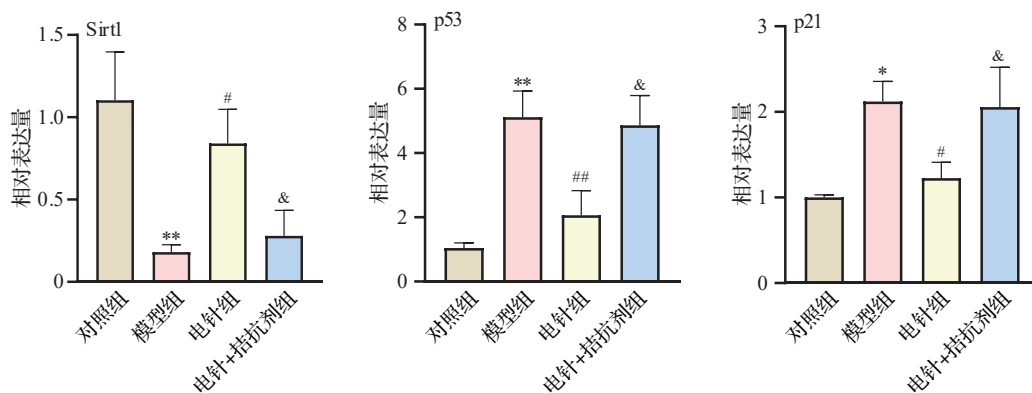
与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织 Sirt1 mRNA 表达水平降低 ($P<0.01$), p53、p21 mRNA



注:ROS为活性氧。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与电针组比较,& $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠卵巢组织 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of ROS levels in ovarian tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注:Sirt1为沉默信息调节因子1,p53为肿瘤抑制蛋白,p21为细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与电针组比较,& $P<0.05$ 。

图6 各组大鼠卵巢组织 Sirt1、p53、p21 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 4只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of Sirt1, p53, and p21 mRNA expression levels in ovarian tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

2.7 各组大鼠卵巢组织 Sirt1、p53、p21、KP、Kiss1R、FSHR 蛋白相对表达量比较

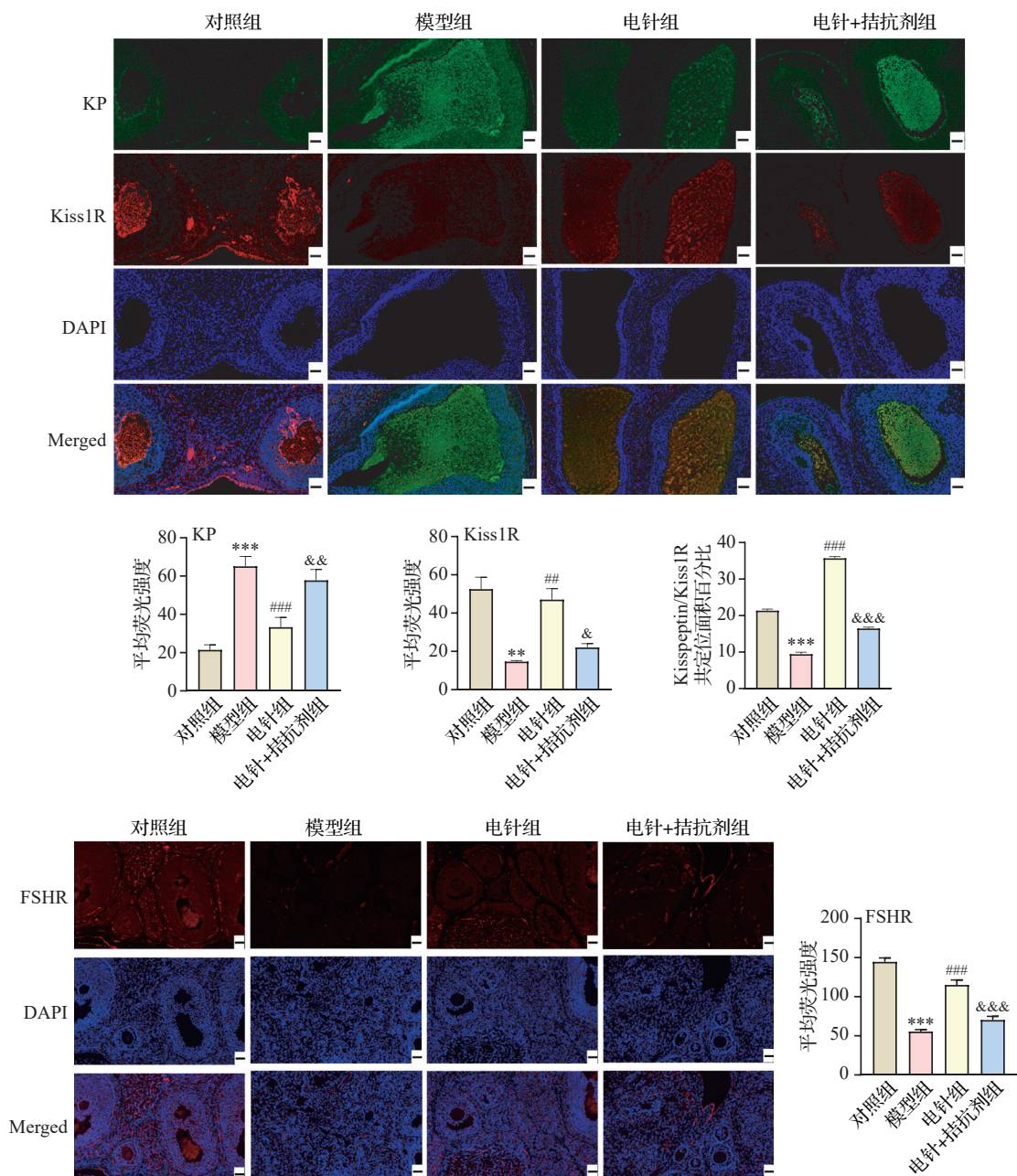
与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织 Sirt1、Kiss1R、FSHR 蛋白相对表达量降低 ($P<0.001$, $P<0.01$), p53、p21、KP 蛋白相对表达量升高 ($P<0.01$, $P<0.001$)。与模型组比较,电针组大鼠卵巢组织 Sirt1、Kiss1R、FSHR 蛋白相对表达量升高 ($P<$

表达水平升高 ($P<0.01$, $P<0.05$);与模型组比较,电针组大鼠卵巢组织 Sirt1 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), p53、p21 mRNA 表达水平降低 ($P<0.01$, $P<0.05$);与电针组比较,电针+拮抗剂组大鼠卵巢组织 Sirt1 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$), p53、p21 mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$)。见图 6。

2.6 各组大鼠卵巢组织 KP、Kiss1R 及 FSHR 蛋白阳性表达比较

与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织 KP 蛋白平均荧光强度升高 ($P<0.001$), Kiss1R、FSHR 蛋白平均荧光强度降低 ($P<0.01$, $P<0.001$), KP/Kiss1R 共定位面积百分比降低 ($P<0.001$)。与模型组比较,电针组大鼠卵巢组织 KP 蛋白平均荧光强度降低 ($P<0.001$), Kiss1R、FSHR 蛋白平均荧光强度升高 ($P<0.01$, $P<0.001$), KP/Kiss1R 共定位面积百分比升高 ($P<0.001$)。与电针组比较,电针+拮抗剂组大鼠卵巢组织 KP 蛋白平均荧光强度升高 ($P<0.01$), Kiss1R、FSHR 蛋白平均荧光强度降低 ($P<0.05$, $P<0.001$), KP/Kiss1R 共定位面积百分比降低 ($P<0.001$)。见图 7。

0.01), p53、p21、KP 蛋白相对表达量降低 ($P<0.01$, $P<0.001$)。与电针组比较,电针+拮抗剂组大鼠卵巢组织 Sirt1、Kiss1R 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), p53、p21、KP 蛋白相对表达量升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSHR 蛋白相对表达量差异无统计学意义。见图 8。



注:标尺=50 μm 。KP为吻素,Kiss1R为吻素受体,FSHR为卵泡刺激素受体。与对照组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,### $P<0.01$,#### $P<0.001$;与电针组比较,& $P<0.05$,&& $P<0.01$,&&& $P<0.001$ 。

图7 各组大鼠卵巢组织 KP、Kiss1R 及 FSHR 蛋白阳性表达比较 ($\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

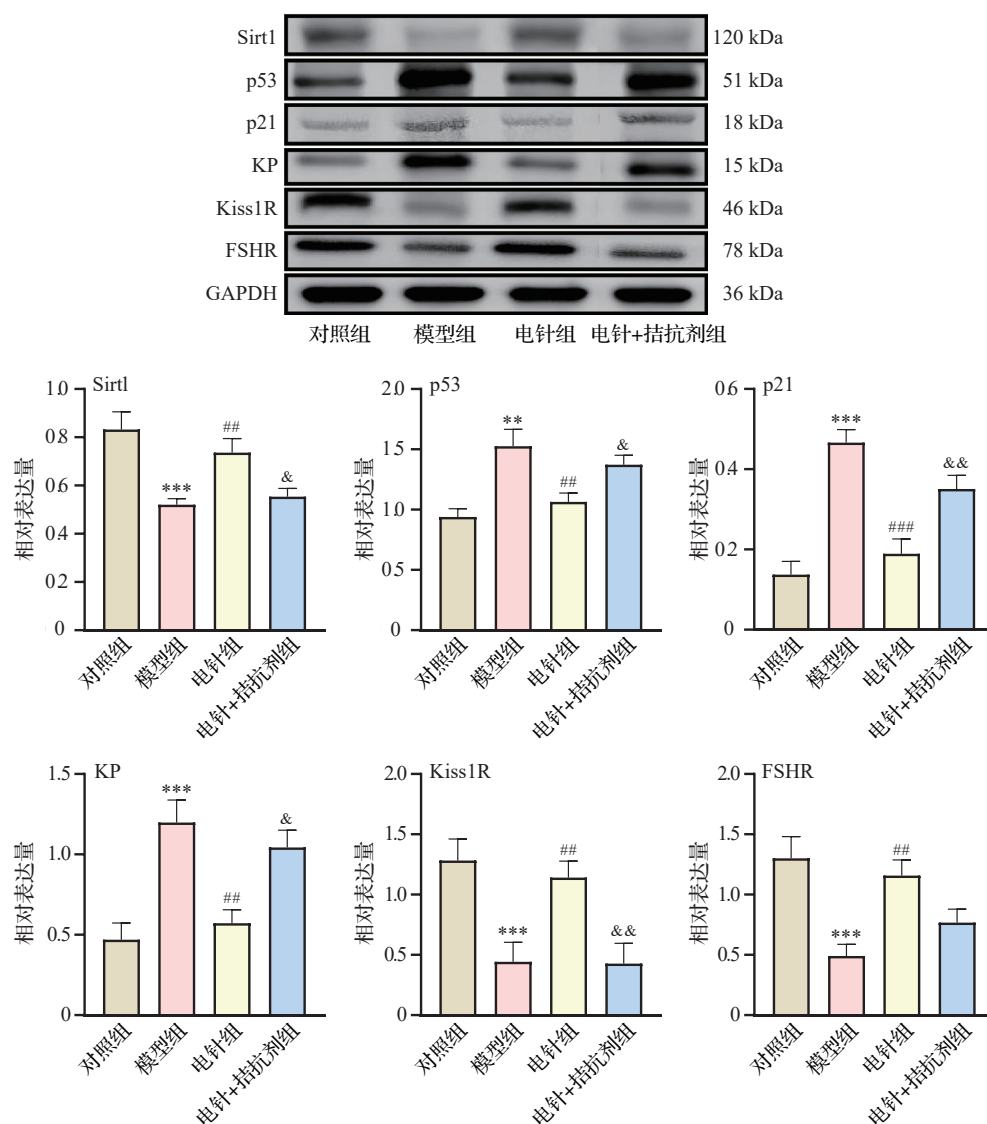
Fig. 7 Comparison of KP, Kiss1R and FSHR positive expression in ovarian tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

3 讨论

由《内经》“七七”理论可知,女性生殖衰老是随年龄增长的自然规律,而过早衰老的根本原因在于肾气渐亏、阴精耗损,以及天癸的衰竭^[22]。《素问·病机气宜保命集》载“天癸既行,皆从厥阴论之”;叶天士则提出“女子以肝为先天”,强调肝对于育龄期妇女经带胎产乳的重要性。因此,临床上针对卵巢功能减退主要治则为补肾调肝^[23]。本实验参考针灸改

善卵巢功能的数据挖掘结果^[24-25],并根据局部取穴及辨证取穴原则,选取改善卵巢功能和补肾调肝的关键穴位,分别为关元、气海和双侧太冲、太溪,通过补肾气滋肾精,益天癸调肝血达到改善卵巢功能的目的。

本研究结果显示,与对照组相比,模型组大鼠的动情周期紊乱率显著升高,血清 AMH、E2 含量和生长卵泡数目降低,而 FSH、LH 水平和闭锁卵泡数



注:Sirt1为沉默信息调节因子1,p53为肿瘤抑制蛋白,p21为细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子,KP为吻素,Kiss1R为吻素受体,FSHR为卵泡刺激素受体。与对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与电针组比较,& $P < 0.05$,&& $P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠卵巢组织 Sirt1、p53、p21、KP、Kiss1R、FSHR 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, 4只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of the relative expression levels of Sirt1, p53, p21, Kisspeptin, Kiss1R, and FSHR proteins in ovarian tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)

量增加,并伴有卵泡结构塌陷、颗粒细胞排列紊乱,符合卵巢功能衰退的典型表现^[5]。经过电针干预后,围绝经期卵巢功能减退模型大鼠的动情周期紊乱率降低,激素指标及卵泡数目均有改善,表明电针可有效改善的围绝经期卵巢功能减退模型大鼠卵巢功能。

ROS触发的氧化应激状态通过诱发线粒体功能障碍、局部炎症反应及生物大分子损伤,导致卵母细胞的数量减少和质量下降,从而削弱卵巢功能并加速卵巢衰老^[26]。Sirt1是调控细胞氧化应激与延缓复制性衰老的关键因子,广泛存在于哺乳动物

的卵巢组织中,如颗粒细胞、卵母细胞等^[27]。卵巢局部Sirt1可通过调节细胞应激相关蛋白活性、上调抗氧化酶表达并抑制ROS过度生成,发挥抗氧化和细胞保护作用^[28]。研究表明,Sirt1表达升高可降低p53乙酰化水平,抑制p53依赖性转录活性,进而下调细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子p21的表达,参与调控大鼠的动情周期和激素分泌水平^[29]。本研究结果显示模型组大鼠卵巢组织ROS含量升高,Sirt1表达降低,p53、p21表达升高,而电针组的以上指标均显著改善,表明电针能改善卵巢局部的氧化应激状态及卵泡细胞分裂周期,改善卵巢功能,延

缓卵巢衰老。

KP是生殖内分泌轴中维持正常卵巢功能的重要调控因子^[7],卵巢功能减退常伴随血清及卵巢局部KP水平的代偿性升高^[30-31],而Kiss1R的功能缺失则可导致卵泡发育异常与卵巢早衰^[32]。KP与Kiss1R作为配体-受体结合对,二者在卵巢局部的共定位状态在一定程度上反映配体-受体空间耦联状态及局部KP信号传递条件,适宜的空间匹配有助于维持局部信号通路的正常传导,从而参与卵泡发育及类固醇激素合成的调控^[7]。FSHR是存在于卵巢颗粒细胞上介导卵泡发育和类固醇合成的特异性G蛋白偶联受体^[33]。研究显示,KP对FSHR表达具有剂量依赖性调节作用,低剂量KP可促进FSHR表达以增强卵泡对FSH的敏感性,有利于卵泡募集;而高剂量KP或卵巢局部KP异常升高则会抑制FSHR的表达^[10-11]。因此,围绝经期卵巢功能减退状态下KP信号通路传导障碍可能影响FSHR表达,进而引发卵泡发育异常与激素紊乱。在KP/FSHR信号通路中,氧化应激是关键的调控环节;研究显示,Sirt1表达水平的变化与KP分子的表现遗传调控相关^[34],并与FSHR的表达状态存在共变关系^[35],同时,ROS增加可导致卵巢颗粒细胞中FSHR表达下调^[36]。本研究结果显示,模型组大鼠卵巢组织KP表达增加,Kiss1R和FSHR的表达降低,同时KP/Kiss1R共定位面积百分比下降,提示KP与Kiss1R空间耦联减弱,可导致局部KP信号传递受损,进而下调FSHR表达;而电针干预有效降低了卵巢组织中异常升高的KP水平,同时上调Kiss1R、FSHR的表达及KP/Kiss1R共定位面积百分比,恢复KP信号通路的正常传导,这表明电针可能通过调控KP/FSHR信号通路的关键因子来改善卵巢局部的氧化应激状态及衰老,从而改善卵巢功能。值得注意的是,本研究中电针组KP/Kiss1R共定位面积百分比高于对照组。Dunn等^[37]指出,共定位可包括信号共现和信号相关两个层面,但基于荧光图像分布的共定位分析并不能直接等同于二者发生分子结合,也不能单独将此结果作为判断相关信号通路活性强弱的依据。既往共定位研究结果提示,在某些功能过程被干预激活时,相关细胞结构或分子的共定位程度可高于基础对照状态,此类变化主要由于治疗促进相关分子空间耦联或修复性调节过程增强,而非简单代表治疗组功能优于正常组^[38]。因此,本研究中电针组KP/Kiss1R共定位面积百分比高于对照组,可理解为电针在卵巢功能减退状态

下增强的修复调节效应。

为进一步观察KP/FSHR通路在电针效应中的参与作用,本实验采用KP受体拮抗剂KP234阻断KP信号传递。结果显示与电针组相比,电针+拮抗剂组大鼠的动情周期紊乱率升高,血清AMH、E2含量降低,FSH和LH含量升高,生长卵泡数目减少,闭锁卵泡数目增多,卵巢组织ROS水平增加,p53、p21及KP表达上调,Sirt1、Kiss1R、FSHR表达及KP/Kiss1R共定位面积百分比降低,提示KP234可部分削弱电针对初老模型大鼠卵巢功能、氧化应激及衰老相关指标的改善作用,证明KP/FSHR通路的激活是电针发挥抗衰老作用的重要环节。而KP234拮抗该通路后,电针对卵巢功能的改善作用被显著逆转,这提示KP/FSHR通路可能是电针延缓卵巢衰老的关键通路之一。但相较于模型组,KP234拮抗并未完全消除电针对卵巢功能的改善效应,其原因可能与电针还可能通过铁死亡、细胞自噬等多靶点、多层次途径发挥卵巢保护作用相关^[13,39]。因此,电针多通路协同调控卵巢衰老的具体机制仍有待进一步研究。

综上所述,电针可能通过调控KP/FSHR通路减轻卵巢局部的氧化应激与细胞衰老,从而改善卵巢储备功能,延缓卵巢衰老进程。未来研究可利用条件性基因敲除动物模型,进一步阐明电针改善衰老时KP/FSHR信号通路在卵巢颗粒细胞中精确调控的分子机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Ingole S, Khare K, Dwivedi V, et al. Decoding ovarian aging in women: Cellular damage, signaling networks, and treatment frontiers[J]. *Reprod Biol*, 2025, 25(4): 101075.
- [2] Cavalcante M B, Sampaio O G M, Câmara F E A, et al. Ovarian aging in humans: potential strategies for extending reproductive lifespan[J]. *Geroscience*, 2023, 45(4): 2121-2133.
- [3] Nelson S M, Sun A J, Ling Q, et al. Ethnic discordance in serum anti-Müllerian hormone in healthy women: a population study from China and Europe [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40(3): 461-467.
- [4] 何雨辰, 於嘉. 生命周期视角下中国生育年龄模式的变动与国际比较[J]. *中国人口科学*, 2025, 39(3): 35-50.
He Y C, Yu J. Fertility age patterns in China and global comparisons from a life cycle perspective (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Population Science*, 2025, 39(3): 35-50.
- [5] Balough J L, Dipali S S, Velez K, et al. Hallmarks of female reproductive aging in physiologic aging mice [J]. *Nat Aging*, 2024, 4(12): 1711-1730.

- [6] Ammar O F, Massarotti C, Mincheva M, et al. Oxidative stress and ovarian aging: from cellular mechanisms to diagnostics and treatment[J]. *Hum Reprod*, 2024, 39(7): 1582-1586.
- [7] 覃颖, 宋亚丽. Kisspeptin/GPR54 系统对卵巢的调控及相关机制的研究进展[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2025, 17(8): 18-22.
- Qin Y, Song Y L. Research progress on the regulation of kisspeptin/GPR54 system on ovary and related mechanisms (in Chinese) [J]. *Chinese Journal Of Family Planning & Gynecotokology*, 2025, 17(8): 18-22.
- [8] Sun P P, Zhang Y M, Sun L L, et al. Kisspeptin regulates the proliferation and apoptosis of ovary granulosa cells in polycystic ovary syndrome by modulating the PI3K/AKT/ERK signalling pathway[J]. *BMC Womens Health*, 2023, 23(1): 15.
- [9] Ruohonen S T, Gaytan F, Usseglio Gaudi A, et al. Selective loss of kisspeptin signaling in oocytes causes progressive premature ovulatory failure[J]. *Hum Reprod*, 2022, 37(4): 806-821.
- [10] Fabová Z, Loncová B, Mlynček M, et al. Kisspeptin as autocrine/paracrine regulator of human ovarian cell functions: Possible interrelationships with FSH and its receptor [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(1): 100580.
- [11] Fernandois D, Na E, Cuevas F, et al. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats [J]. *J Endocrinol*, 2016, 228(3): 161-170.
- [12] 罗秋平, 杨志虹, 金灵敏, 等. 电针肝经膻穴治疗肝郁型卵巢储备功能减退: 随机对照试验[J]. *中国针灸*, 2024, 44(11): 1261-1266.
- Luo Q P, Yang Z H, Jin L M, et al. Electroacupuncture at acupoints of liver meridian for diminished ovarian reserve of liver depression: a randomized controlled trial (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2024, 44(11): 1261-1266.
- [13] 李政宇, 赵茜, 常娟, 等. 电针调控铁死亡 ACSL4/LPCAT3/AOX15 信号通路对早发性卵巢功能不全大鼠的影响[J]. *针刺研究*, 2026, 51(2): 152-160.
- Li Z Y, Zhao Q/X, Chang J, et al. Effect of electroacupuncture on ACSL4/LPCAT3/AOX15 signaling pathway of ferroptosis in rats with premature ovarian insufficiency (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2026, 51(2): 152-160.
- [14] 陆樱瑜, 沈明洁, 李佳慧, 等. 卵巢储备功能下降动物模型研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(12): 996-999.
- Lu Y Y, Shen M J, Li J H, et al. Progress in animal models of diminished ovarian reserve (in Chinese) [J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2014, 23(12): 996-999.
- [15] Acuña E, Fornes R, Fernandois D, et al. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 64.
- [16] 张蕾, 张若乾, 秦秀云, 等. 快速革兰氏染色法对大、小鼠动情周期的鉴别[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(3): 45-50, 74.
- Zhang L, Zhang R Q, Qin X Y, et al. Identification of estrous cycles in rats and mice by rapid Gram staining (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2023, 33(3): 45-50, 74.
- [17] 于明玥, 汤玲, 孙晓卉, 等. 基于中西医临床病证特点的卵巢储备功能减退动物模型分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(9): 240-248.
- Yu M Y, Tang L, Sun X H, et al. Evaluation of animal models with diminished ovarian reserve based on clinical disease and syndrome characteristics of traditional Chinese medicine and western medicine (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2025, 31(9): 240-248.
- [18] 李丽美, 黄雪萍, 陈建清, 等. 卵巢功能减退肾虚肝郁证病证结合大鼠模型的建立与评价[J]. *中国实验动物学报*, 2026, 34(6): 819-828.
- Li L M, HUANG X P, CHEN J Q, et al. Establishment and evaluation of a disease-syndrome combined rat model of diminished ovarian function with kidney deficiency and liver depression syndrome [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2026, 34(6): 819-828.
- [19] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分: 大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.
- China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [20] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255-257.
- Li Z R. Experimental acupuncturology (in Chinese) [M]. 2nd ed. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 255-257.
- [21] 杨艳红, 张建亮, 李冬晓, 等. kisspeptin 调控 Notch1/Akt/Foxo1 通路参与复发性流产患者子宫内膜蜕膜化[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2024, 55(3): 542-551.
- Yang Y H, Zhang J L, Li D X, et al. Notch1/Akt/Foxo1 pathway regulated by kisspeptin is involved in endometrial decidualization in patients with recurrent spontaneous abortion (in Chinese) [J]. *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*, 2024, 55(3): 542-551.
- [22] 张弛, 张伟, 传鹏, 等. 马烈光教授论《黄帝内经》生殖健康观[J]. *成都中医药大学学报*, 2022, 45(4): 67-70.
- Zhang C, Zhang W, Chuan P, et al. Reproductive health based on huangdi neijing by professor ma lieguang (in Chinese) [J]. *Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 45(4): 67-70.
- [23] 周旋乐, 楼毅云, 兰慧珍, 等. 从肝肾论治卵巢储备功能减退合并不孕症[J]. *新中医*, 2024, 56(7): 201-205.
- Zhou X L/Y, Lou Y Y, Lan H Z, et al. Discussion on treating decreased ovarian reserve complicated with infertility from kidney and liver based on syndrome differentiation (in Chinese) [J]. *Journal of New Chinese Medicine*, 2024, 56

- (7): 201-205.
- [24] 何婷, 杨硕, 莫倩, 等. 基于数据挖掘技术探讨针灸治疗卵巢储备功能下降的选穴规律[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(9): 2200-2205.
- He T, Yang S, Mo Q, et al. Exploration of acupoint selection rules of acupuncture and moxibustion in the treatment of diminished ovarian reserve based on the data mining technology (in Chinese)[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 39(9): 2200-2205.
- [25] 郝鸣昭. 针灸治疗早发性卵巢功能不全的古代文献研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- Hao M Z. Ancient literature research on acupuncture and moxibustion treatment of premature ovarian insufficiency (POI) (in Chinese) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.
- [26] Yan F, Zhao Q, Li Y, et al. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review[J]. J Ovarian Res, 2022, 15(1): 100.
- [27] Teppa-Garrán A, Pérez-Peña E, Sobrevia L, et al. Pharmacologic interventions targeting ovarian aging, cancer, and mitochondrial dysfunction: an updated evidence [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2025, 1871 (8) : 167987.
- [28] 向恬, 马瑞红, 王宝娟, 等. SIRT1调控卵泡发育、延缓卵巢衰老的研究进展[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(4): 389-391.
- Xiang T, Ma R H, Wang B J, et al. Research progress of SIRT1 regulating follicular development and delaying ovarian aging (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Reproductive Health, 2020, 31(4): 389-391.
- [29] Liu J, Yang Y, He Y S, et al. Erxian decoction alleviates cisplatin-induced premature ovarian failure in rats by reducing oxidation levels in ovarian granulosa cells [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 304: 116046.
- [30] 王金玉, 陈圆辉, 王倩, 等. 血清神经肽类激素水平在卵巢储备功能减退不孕症患者中的变化及其诊断价值[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(4): 476-481.
- Wang J Y, Chen Y H, Wang Q, et al. Diagnostic value and changes of serum Kisspeptin level in women with diminished ovarian reserve (in Chinese) [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2022, 31(4): 476-481.
- [31] Merhi Z, Thornton K, Bonney E, et al. Ovarian kisspeptin expression is related to age and to monocyte chemoattractant protein-1[J]. J Assist Reprod Genet, 2016, 33(4): 535-543.
- [32] Gaytan F, Garcia-Galiano D, Dorfman M D, et al. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion[J]. Endocrinology, 2014, 155(8): 3088-3097.
- [33] Mehalko K, Kim M, Paye S, et al. Lack of accelerated ovarian aging in a follicle-stimulating hormone receptor haploinsufficiency model[J]. Transl Med Aging, 2023, 7: 1-8.
- [34] Vazquez M J, Toro C A, Castellano J M, et al. SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4194.
- [35] Guo L, Liu X C, Chen H, et al. Decrease in ovarian reserve through the inhibition of SIRT1-mediated oxidative phosphorylation[J]. Aging, 2022, 14(5): 2335-2347.
- [36] Secomandi L, Borghesan M, Velarde M, et al. The role of cellular senescence in female reproductive aging and the potential for senotherapeutic interventions [J]. Hum Reprod Update, 2022, 28(2): 172-189.
- [37] Dunn K W, Kamocka M M, McDonald J H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(4): C723-C742.
- [38] Chen Q X, Shao X T, Tian Z Q, et al. Nanoscale monitoring of mitochondria and lysosome interactions for drug screening and discovery[J]. Nano Res, 2019, 12(5): 1009-1015.
- [39] 张怡, 黄思丹, 师旭亮, 等. 电针对早发性卵巢功能不全大鼠卵巢颗粒细胞自噬的影响[J]. 中国针灸, 2024, 44(6): 676-684.
- Zhang Y, Huang S D, Shi X L, et al. Effect of electroacupuncture on autophagy of ovarian granulosa cells in rats with premature ovarian insufficiency (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2024, 44(6): 676-684.

收稿日期:2025-12-26 修回日期:2026-04-10