

睡眠剥夺致雌性大鼠生育力下降及其机制*

许雅琦^{1,3}, 金治平³, 张倩³, 李炜^{1,2}, 张癸荣^{1,3}

1. 河北北方学院药学系, 河北 张家口 075000
2. 河北省神经药理学重点实验室, 河北 张家口 075000
3. 北京中科遗传与生殖医学研究院, 北京 102629

摘要: 睡眠是人体维持时辰节律稳态的关键生理过程, 主客观原因导致的睡眠剥夺 (SD, sleep deprivation) 十分常见。SD 与生育相关研究正日益引起重视。本研究采用改良多平台睡眠剥夺法 (MMPM) 建立雌性 Wistar 大鼠的睡眠剥夺模型, 考察大鼠一般情况、卵巢病理、动情周期、交配率和妊娠率, 判断 SD 对雌性大鼠生育力的影响情况; 应用新一代测序 (NGS) 技术, 通过 RNA 测序 (RNA-Seq, RNA sequencing) 和 DNA 甲基化测序, 研究 SD 雌性大鼠卵巢转录组及表观遗传的差异。研究结果表明 SD 导致雌性大鼠动情周期异常、妊娠率下降、卵巢病理结构改变; SD 大鼠卵巢组织发现了 101 个显著差异表达基因 (52 个上调基因和 49 个下调基因), SD50 组与对照组之间发现 26 个甲基化显著差异区域, 但上述 101 个差异基因的所有位点, 均未检测到甲基化水平变化。SD 雌性大鼠的生育指标差异表明 SD 导致雌性 Wistar 大鼠生育力下降; SD 大鼠卵巢的差异表达基因及甲基化差异显示 SD 可能通过基因转录、表观遗传调控来影响雌性动物性腺功能。

关键词: 睡眠剥夺; 生育力; 卵巢; RNA 测序; DNA 甲基化测序

中图分类号: Q7 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2023) 02-0051-09

Sleep deprivation induced fertility decline in female rats and its mechanism

XU Yaqi^{1,3}, JIN Zhiping³, ZHANG Qian³, LI Wei^{1,2}, ZHANG Guirong^{1,3}

1. College of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China
2. Hebei Key Laboratory of Neuropharmacology, Zhangjiakou 075000, China
3. Peking Medriv Academy of Genetics and Reproduction, Beijing 102629, China

Abstract: Sleep is a key physiological process to maintain the homeostasis of the human circadian rhythm, and sleep deprivation (SD) caused by subjective and objective reasons is very common. The research on the relationship between SD and fertility is attracting more and more attention. In this study, the modified multiple platform method (MMPM) was used to establish the sleep deprivation model of female Wistar rats. The general conditions, ovarian pathology, oestrus cycle, mating rate and pregnancy rate of the rats were investigated to determine the effect of SD on the fertility of female rats; The new generation sequencing (NGS) technology was used to study the differences of ovarian transcriptome and epigenetic in SD female rats by RNA sequencing (RNA-Seq) and DNA methylation sequencing. The results showed that SD led to abnormal estrous cycle, decreased pregnancy rate and pathological changes of ovary in female rats; 101 significantly differentially expressed genes

* 收稿日期: 2022-05-27 录用日期: 2022-06-12 网络首发日期: 2022-11-07

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2020405298)

作者简介: 许雅琦 (1994 年生), 女; 研究方向: 生殖遗传诊断新技术; E-mail: yaqi_xu2021@163.com

通信作者: 李炜 (1977 年生), 女; 研究方向: 药理学; E-mail: leewei318@163.com

张癸荣 (1974 年生), 男; 研究方向: 生殖遗传诊断新技术; E-mail: guirong_zhang@126.com

(李炜、张癸荣为共同通信作者)

(52 up-regulated genes and 49 down-regulated genes) were found in the ovarian tissue of SD rats, and 26 methylation significantly different regions were found between the SD50 group and the control group, but no changes in methylation levels were detected at all sites of the above 101 differentially expressed genes. The difference of fertility index of SD female rats showed that SD led to the decrease of fertility of female Wistar rats; The differentially expressed genes and methylation differences in the ovaries of SD rats indicate that SD may affect the gonadal function of female animals through gene transcription and epigenetic regulation.

Key words: sleep deprivation; fertility; ovary; RNA sequencing; DNA methylation sequencing

睡眠对维持身体健康、认知能力和心理健康至关重要。睡眠不足的常见原因包括失眠症、睡眠呼吸暂停、不宁腿综合征、情绪障碍以及其他病理因素,近年来睡眠不足也受到社会发展和生活习惯的影响,如延长工作时间、轮班工作和网络(Liew et al., 2021)。睡眠剥夺(SD, sleep deprivation)增加肥胖、II型糖尿病、心血管疾病、肿瘤、自身免疫性疾病和退行性疾病发生的风险(Antza et al., 2021; Garbarino et al., 2021; Zhao et al., 2021), SD与生育力相关研究正日益引起关注,睡眠剥夺、睡眠中断和睡眠障碍与女性生殖功能受损和临床结果较差有关。在一项基于4 078名不孕女性为期14年的回顾性研究发现阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)在不孕妇女中更常见,并增加了女性不孕的概率(Lim et al., 2021)。女性的睡眠时间影响体外受精(IVF)过程,较短的睡眠时间和较晚的入睡时间增加了胚胎移植前不能完成IVF周期的概率(Pimolsri et al., 2021)。睡眠障碍会破坏人体昼夜节律稳态,可能会导致下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的破坏,进而导致生殖激素同步释放受损,引起生殖过程的改变(Beroukhim et al., 2022)。下丘脑的视交叉上核(SCN)由时钟基因调控,节律性地激活促性腺激素释放激素(GnRH)神经元,并刺激垂体促性腺激素细胞释放黄体生成素(LH)(Shao et al., 2021)。时钟基因包括*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1* 和 *Dec2*, 它们的分子产物对调节女性生殖过程具有重要意义(Shao et al., 2021; Beroukhim et al., 2022)。

SD致雌性大鼠血清雌二醇浓度显著降低,而5-羟色胺浓度显著增加,经研究认为雌二醇浓度降低可能是5-羟色胺的抑制作用和大卵泡中类固醇激素急性调节蛋白(StAR)表达降低导致的(Yang et al., 2015)。SD影响雌鼠的性行为,使得雌鼠在动情前期性接受行为增加,但在动情期和动情间期性排斥行为表现明显(Andersen et al., 2009)。

由于可能的伦理和研究可及性问题,睡眠剥夺与女性生育力直接研究甚少。前期,本课题组研究了SD对雄性大鼠生育力影响的相关研究(Chen et al., 2020)。本研究中,我们采用改良多平台睡眠剥夺法(MMPM, modified multiple platform method)建立雌鼠睡眠剥夺模型,考察SD对雌性大鼠生育力的影响情况并应用新一代测序(NGS)技术,研究SD雌性大鼠转录组差异及表观遗传差异,试图发现SD影响雌性大鼠主要性腺的差异表达基因并初步探讨其表达调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

32只10周龄SPF级雌性Wistar大鼠,体质量为220~230 g。10只成年雄性Wistar大鼠,体质量为300~320 g。以上动物均购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物合格许可证号:SCXK(京)2019-0010。

雌鼠在每日16:00进行阴道细胞学检查,确定其动情周期,将连续2个动情周期正常的雌鼠纳入实验。随机分为睡眠剥夺15 d(SD15)组、睡眠剥夺50 d(SD50)组、模型对照(MC)组和空白对照(BC)组,每组8只雌鼠。

1.2 建立睡眠剥夺模型

参照文献所述模型构建方法(Alvarenga et al., 2015; 王若冲等, 2022),使用MMPM法建立大鼠快动眼(REM, rapid eye movement)睡眠剥夺模型。准备一个120 cm×60 cm×35 cm的树脂玻璃箱,箱内固定8个直径6.5 cm的圆柱体平台,平台间距15 cm。向箱中注入水,水面距离平台顶部1 cm,让大鼠站立在平台上,当大鼠进入REM时因颈部肌张力降低引起节律性低头、触水,从而剥夺REM睡眠。每天持续睡眠剥夺18 h(16:00~次日10:00),10:00~16:00放入普通鼠笼中休息。为了排除水环境对雌鼠生育力的影响设置MC组,准备

一个60 cm×60 cm×35 cm的玻璃箱,箱内放置一张铁丝网,水位位于铁丝网下1 cm,将MC组8只雌鼠放在铁丝网上,使其处于水环境中但不会落水。BC组的雌鼠饲养于普通鼠笼中,4只一笼。所有实验大鼠均可以自由摄食、饮水。

1.3 评估雌鼠的一般情况和生育能力

观察雌鼠的精神状态、进食量、毛色变化,每日称量1次体质量。

造模期间每日16:00对雌鼠进行阴道细胞学检查,记录睡眠剥夺是否使动情周期改变;雌鼠造模结束后当日18:00与雄鼠以1:1合笼,第2天08:00对雌鼠行阴道细胞学检查,若显微镜下观察到精子,记为孕1 d。

孕8 d时,麻醉后用眼科手术剪剪开大鼠腹腔,取出子宫,若子宫体有“串珠样”隆起确认为妊娠子宫。辨别雌鼠是否妊娠并计数胚胎着床数。剔除卵巢表面脂肪和结缔组织,用 $w=4\%$ 多聚甲醛固定。固定后的卵巢组织经过脱水、透明、浸蜡、包埋后制作成组织蜡块,组织块5 μm 切片,

每个蜡块取4张切片用于HE染色。

1.4 基因表达水平测定及qRT-PCR

再次购买24只雌性Wistar大鼠,随机分成SD50组、MC组和BC组,睡眠剥夺模型建立方法同1.2。造模结束后立即取卵巢组织。

按照爱博泰克总RNA提取试剂说明书提取大鼠卵巢RNA,使用诺唯赞mRNA Seq V3 Library Prep Kit建立cDNA文库。使用NextSeq 550测序仪和NextSeq 500/550 High Output Kit V2测序试剂盒对cDNA文库进行RNA测序,参数设置为单端100 bp,测序量为40~50 M reads。

用Applied Biosystems公司High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit试剂盒将RNA反转录为cDNA后使用PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix试剂盒配制qRT-PCR反应体系进行检测。选择3个目标基因进行荧光定量PCR,每个样本重复3次。以Actb为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法分析待测基因的转录水平。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR使用引物序列
Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名称	正向引物序列	反向引物序列
<i>Actb</i>	5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3'	5'-ATCGTCATCCATGGCGAACTGG-3'
<i>Espn</i>	5'-CTGAGCTTGGAACACCGAGT-3'	5'-AGTCTGAGGATCTGGCACCT-3'
<i>A2m</i>	5'-TGCTTTGTCCAATGGGTGCT-3'	5'-AGCCATAGGGCATCTTGAGG-3'
<i>Cdc42</i>	5'-GCGGAGAAGCTGAGGTCAA-3'	5'-CCAACAGCACCATCACCAAC-3'

1.5 卵巢差异基因蛋白互作网络(PPIN)的构建以及核心基因的筛选

使用STRING对差异表达基因(DEGs)进行分析,预测基因所编码蛋白质之间的互作关系,选择置信度0.4作为显著标准。将STRING分析结果导入Cytoscape 3.9.1软件,通过Cytohubba插件计算出每个节点的度(Degree),Degree得分前10的基因构成的网络可视作核心子网络。

1.6 DNA简化甲基化测序(RRBS)

用天根TIANamp Genomic DNA Kit试剂盒提取卵巢DNA,每个体系加入100 ng DNA建立RRBS文库:①MSP1酶切;②末端修复和添加脱氧腺苷酸;③连接接头和接头开环;④筛选DNA长度为200~450 bp的连接产物;⑤重亚硫酸盐转化;⑥扩增;⑦纯化。

使用NovaSeq测序系统进行DNA甲基化测序。参数设置:双端,150 bp。

1.7 数据统计

数据使用SPSS统计软件进行分析,采用单因素方差分析比较不同组的平均值,以均数±标准差表示,检验水准 α 设置为0.05。

2 结果

2.1 雌鼠一般状况

各组受试动物均通过实验全程,中途无逃逸、死亡等情况。SD15组和SD50组雌鼠在睡眠剥夺过程中进食量增加,但体质量减轻,毛色暗淡杂乱、鼠尾咬痕严重。SD15组雌鼠对抚摸等刺激表现出后退、逃避的“激惹”行为,随着睡眠剥夺时间延长,SD50组雌鼠的疲劳困倦程度逐渐增加,行为由兴奋转变为抑制,轻触不动,对抓取的反抗差。

2.2 体质量情况

如表2所示,4组大鼠造模前体质量差异无统计学意义($F=0.021, P=0.996$);SD15、SD50组造

模后体质量减轻,差异具有统计学意义,而MC组与BC组相比,差异无统计学意义($F=29.974, P<0.001$)。

2.3 动情周期

如表3所示,SD15组造模后有2只雌鼠动情周期消失,1只雌鼠动情周期紊乱;SD50组造模后有5只雌鼠动情周期消失,1只雌鼠动情周期紊乱;BC组有1只雌鼠出现动情周期紊乱的情况,其余7只雌鼠动情周期正常;MC组雌鼠在实验过程中动

情周期均正常。4组间动情周期差异有统计学意义($P=0.006$)。

2.4 交配率、妊娠率

为研究睡眠剥夺对雌性大鼠生育的影响,造模后各组雌鼠与雄鼠合笼。结果如表4所示,4组雌鼠的交配率均为100%;SD15、MC、BC组雌鼠妊娠率为100%,SD50组雌鼠妊娠率为87.5%,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表2 SD对雌鼠体质量的影响¹⁾

Table 2 Effect of SD on body weight of female rats

组别	数量/只	造模前体质量/g	造模后体质量/g
SD15	8	233.63±9.78	225.25±16.10 ^{**##}
SD50	8	234±9.40	228.25±11.56 ^{**##}
MC	8	233.63±7.61	294.75±20.42
BC	8	232.75±13.59	294.75±28.93

1) **表示与BC组相比差异有统计学意义($P<0.01$); #表示与MC组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。

表3 SD对雌鼠动情周期的影响¹⁾

Table 3 Effect of SD on estrous cycle in female rats

组别	睡眠剥夺时间/d																			
	1~10				11~20 ²⁾				21~30				31~40				41~50			
	延长	紊乱	消失	正常	延长	紊乱	消失	正常	延长	紊乱	消失	正常	延长	紊乱	消失	正常	延长	紊乱	消失	正常
SD15	1	2	0	5	0	1	2	5												
SD50 ^{**##}	1	1	2	4	0	2	3	3	1	1	4	2	1	1	4	2	0	1	5	2
MC	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8
BC	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	1	0	7	0	1	0	7

1) **表示与BC组相比差异有统计学意义($P<0.01$); #表示与MC组相比差异有统计学意义($P<0.01$);

2) SD15组的睡眠剥夺时间为11~15 d。

表4 雌鼠交配与妊娠情况¹⁾

Table 4 Mating and pregnancy of female rats

组别	数量/只	交配数/只	交配率/%	妊娠数/只	妊娠率/%
SD15	8	8	100	8	100
SD50	8	8	100	7	87.5 ^{**##SS}
MC	8	8	100	8	100
BC	8	8	100	8	100

1) **表示与BC组相比差异有统计学意义($P<0.01$); #表示与MC组相比差异有统计学意义($P<0.01$); SS表示与SD15组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.5 胚胎着床数

结果如表5所示,各组间胚胎着床数差异无统计学意义($F=1.645, P=0.202$)。

2.6 卵巢病理改变

如图1所示,大鼠卵巢HE染色后图片可见MC组(图1a)和BC组(图1b)卵巢皮质分布大量各级生长卵泡和黄体,闭锁卵泡数量较少,卵泡内

表5 妊娠第8天胚胎着床数
Table 5 Number of embryo implantation
on the 8th day of pregnancy

组别	数量/只	胚胎着床数
SD15	8	14.13±1.81
SD50	7	13.29±1.60
MC	8	15.25±2.12
BC	8	15.00±2.00

卵母细胞形状轮廓规则, 颗粒细胞结构清晰; SD15组(图1c)卵巢皮质层变薄, 髓质致密, 血管较少。皮质可见各级生长卵泡和黄体, 卵泡形态基本正常, 空泡状卵泡数量增多; SD50组(图1d)

卵巢皮质层变薄, 可见各级生长卵泡和黄体, 卵泡内卵母细胞固缩变形, 颗粒细胞层数明显减少, 空泡状卵泡数量明显增多。各级卵泡构成比例如表6所示。SD15组和SD50组次级卵泡构成比低于MC组和BC组, 而黄体构成比高于MC组和BC组, 差异具有统计学意义($\chi^2=30.105, P=0.003$)。

2.7 卵巢差异基因(DEGs)和qRT-PCR验证结果

在SD50组大鼠卵巢中, 发现101个显著差异表达的基因, 包括52个上调基因和49个下调基因。如图2所示, 荧光定量PCR结果和RNA-Seq的结果表达趋势一致, 表明转录组测序结果真实可靠。图3为差异基因的火山图谱。

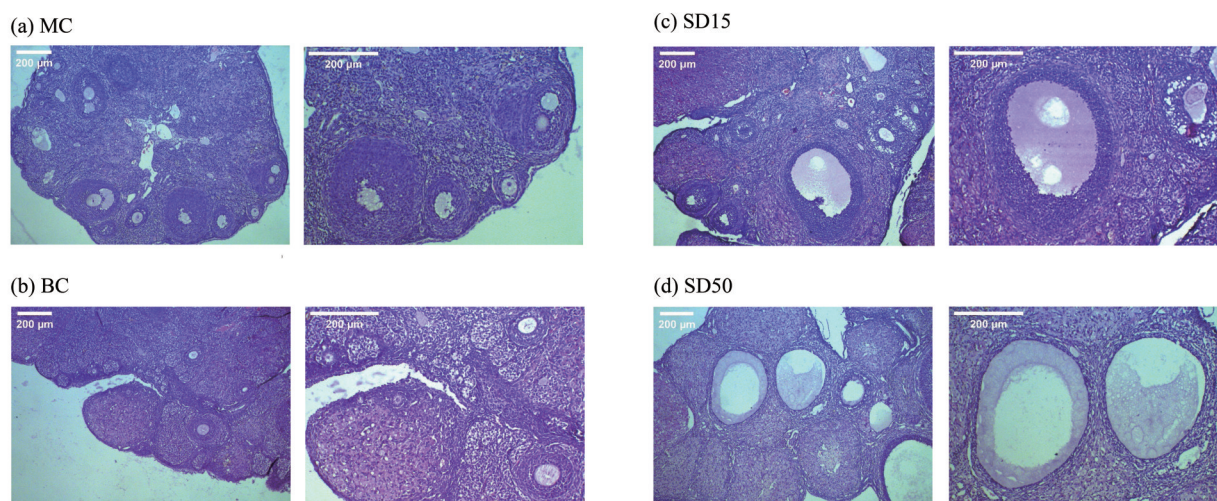


图1 卵巢病理图片

Fig. 1 Pathological picture of ovary

表6 大鼠卵巢各级卵泡比例

Table 6 Proportion of follicles at all levels of rat ovary

组别	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡	闭锁卵泡	黄体	%
SD15	17.6	9.3	22.6	13.7	36.9	
SD50	23.0	10.1	18.1	15.9	33.0	
MC	21.9	12.7	26.2	13.8	25.4	
BC	20.4	12.6	26.8	13.4	26.8	

2.8 PPIN及核心子网络图

通过STRING预测101个DEGs所编码蛋白质之间的相互作用关系。将预测结果导入Cytoscape软件构建出蛋白质互作网络(图4a)。此外, 用Cytoscape的插件CytoHubba筛选出PPIN中的核心子网络: 度(Degree)排名前10的基因构成的子网络(图4b)。这10个核心基因分别是: 载脂蛋白E

(ApoE, apolipoprotein E)、脂肪酸结合蛋白4 (Fabp4, fatty acid binding protein 4)、 α -2-巨球蛋白(alpha-2-macroglobulin)、基质金属蛋白酶2 (Mmp2, matrix metalloproteinase 2)、细胞分裂周期蛋白42(Cdc42, cell division cycle 42)、肌营养不良蛋白(Dmd, dystrophin)、人衰老关键蛋白1 (Fbln1, fibulin 1)、抗肌萎缩蛋白相关蛋白

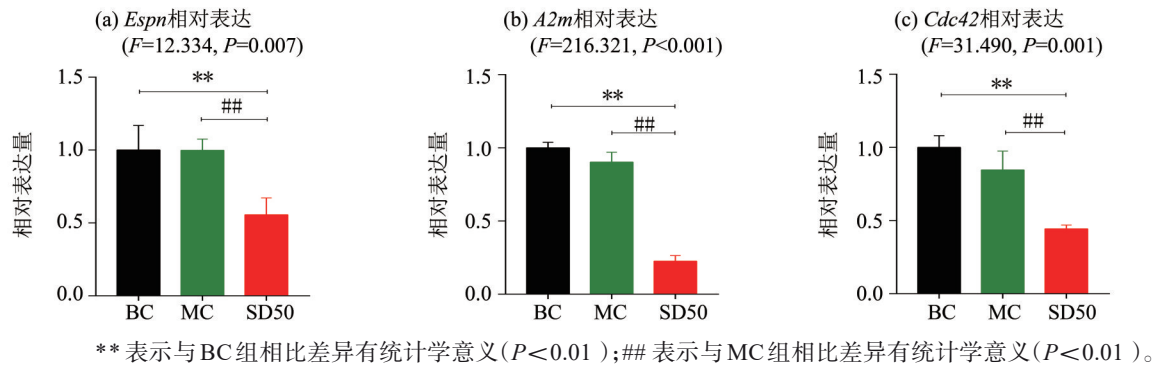
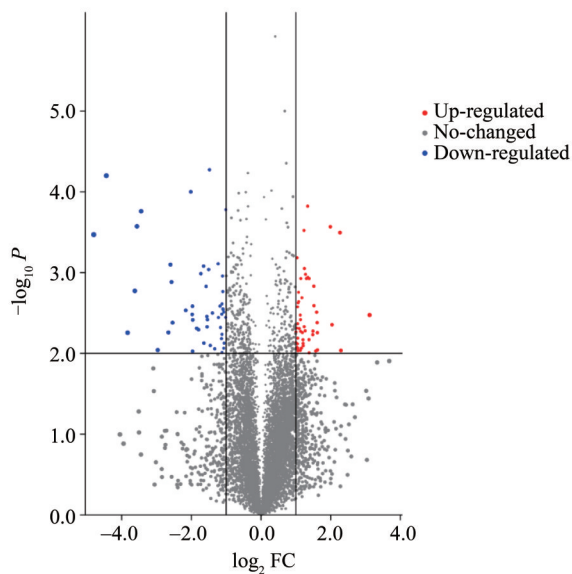


图 2 3 个基因的 qRT-PCR 验证结果

Fig. 2 Three genes expression level by qRT-PCR validation

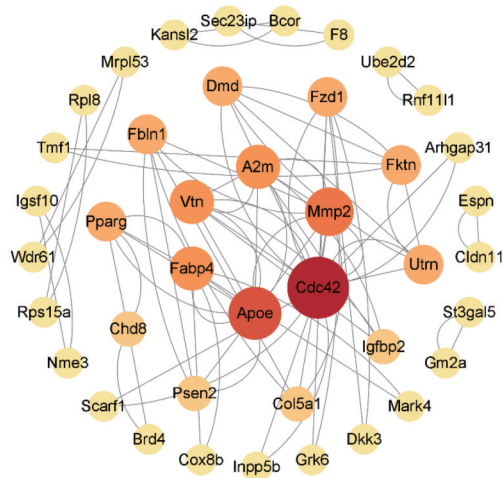


红点表示上调基因, 蓝点表示下调基因; FC: Fold change.

图 3 差异表达基因火山图

Fig. 3 Volcano map of DEGs

(a) 差异表达基因的蛋白质互作网络图



(b) Degree 排名前 10 的基因构成的子网络

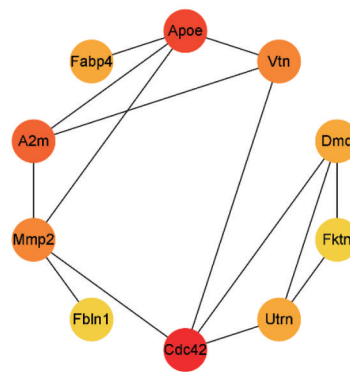


图 4 差异表达基因的蛋白质互作网络

Fig. 4 PPIN of DEGs

(Utrn, utrophin)、玻璃黏连蛋白(Vtn, vitronectin)和(Fktn, Fukutin)。

2.9 GO 富集分析和 KEGG Pathway 分析

DEGs 富集在生物学过程 (BP, biological process) 功能分类中。显著上调基因涉及 27 个生物学过程, 显著下调基因涉及 54 个生物学过程。差异基因在分子功能 (MF, molecular functions) 和细胞组成 (CC, cellular components) 功能分类中没有富集。

显著下调基因在 2 种 KEGG Pathway 中富集, 即 Proteoglycans in cancer 和 Leukocyte transendothelial migration 通路, Proteoglycans in cancer 中包含 *Cdc42*、*Mmp2* 和 *Cldn11* 基因。Leukocyte transendothelial migration 中包含 *Cdc42*、*Mmp2* 和 *Fzd1* 基因; 显著上调基因在 KEGG Pathway 中没有富集。

2.10 甲基化测序结果

在 SD50 组与对照组间发现 26 个差异性甲基化区域 (DMRs) (如表 7), 在 52 个上调基因和 49 个下调基因的所有位点上, 其甲基化水平没有变化。

表7 SD50组与对照组间差异性甲基化区域
Table 7 DMRs between SD50 group and control groups

染色体	起始	终止	长度/bp	CpGs 数量/只	DMCs 数量/只	q 值
Chr1	36 750 301	36 750 447	147	16	5	4.50×10^{-62}
Chr1	65 520 775	65 520 943	169	13	3	5.35×10^{-13}
Chr1	72 340 595	72 340 744	150	19	5	1.54×10^{-26}
Chr1	78 573 007	78 573 146	140	23	4	7.85×10^{-20}
Chr10	82 829 574	82 829 918	345	28	17	2.14×10^{-63}
Chr10	86 145 220	86 145 345	126	22	8	6.80×10^{-44}
Chr13	70 019 627	70 019 774	148	14	6	1.05×10^{-22}
Chr15	2 375 945	2 376 078	134	11	4	2.57×10^{-26}
Chr18	29 989 110	29 989 329	220	19	11	5.00×10^{-27}
Chr2	61 948 676	61 948 806	131	11	8	3.84×10^{-19}
Chr2	197 682 222	197 682 245	24	9	4	8.83×10^{-21}
Chr3	120 760 053	120 760 119	67	11	5	6.54×10^{-18}
Chr3	162 075 239	162 075 509	271	30	6	4.70×10^{-40}
Chr3	168 110 982	168 111 166	185	14	3	3.04×10^{-30}
Chr3	176 666 247	176 666 317	71	15	15	4.76×10^{-49}
Chr4	32 372 708	32 372 843	136	21	17	4.20×10^{-47}
Chr4	78 264 682	78 265 063	382	76	48	2.01×10^{-167}
Chr7	11 907 577	11 907 664	88	9	6	5.42×10^{-14}
Chr7	135 571 765	135 571 891	127	34	9	3.58×10^{-112}
Chr7	140 438 039	140 438 183	145	14	10	4.31×10^{-43}
Chr7	140 467 690	140 467 837	148	48	38	1.56×10^{-97}
Chr8	85 951 568	85 951 610	43	14	4	2.44×10^{-13}
Chr8	118 992 671	118 992 977	307	34	8	4.14×10^{-31}
Chr9	99 299 504	99 299 595	92	43	22	4.56×10^{-56}
ChrX	33 786 413	33 786 572	160	17	4	5.10×10^{-23}
ChrX	70 606 015	70 606 182	168	17	3	6.46×10^{-16}

3 讨论

本研究从动情周期、交配率和妊娠率、胚胎着床数、卵巢各级卵泡比例等维度考量睡眠剥夺对雌鼠生育力的影响,而后首次应用RNA测序(RNA-Seq, RNA sequencing)和DNA甲基化测序技术,研究睡眠剥夺雌性大鼠卵巢转录组差异及表观遗传差异。结果确认睡眠剥夺导致雌性大鼠生育力下降,主要表现在动情周期异常和妊娠率降低。从SD15组和SD50组次级卵泡构成比降低、黄体构成比增加情况推测,SD影响雌性动物的生殖器官。

研究表明REM睡眠剥夺导致大(小)鼠摄食量增加、体质量减轻、基础代谢率增加(张继辉等,

2007;曾荣等,2010;周东升等,2014),本研究SD雌鼠摄食量增加、但体质量减轻,结合SD大鼠精神状态日渐倦怠分析,长期睡眠剥夺可能增加大鼠机体能量消耗并破坏能量代谢平衡。由原始卵泡生长发育为成熟卵泡并排卵的过程高度复杂,在生殖过程中受到多种细胞、激素和生长因子的共同调节,信号通路如TGF- β 、PI3K/AKT/mTOR、cAMP和Wnt/ β -catenin等均与卵泡发育密切相关(孙晖,2021)。研究表明Cdc42蛋白促进小鼠卵巢原始卵泡激活,其机制可能是Cdc42通过结合卵母细胞中的磷脂酰肌醇3-激酶亚单位(p110 β)来调节卵巢中的PI3K信号通路(Yan et al.,2017),实验证实Cdc42基因缺失导致雌性小鼠不孕,用特异性抑

制剂破坏 *Cdc42* 活性或敲低 *Cdc42* 表达可显著抑制原始卵泡激活(Wang et al., 2013; Yan et al., 2017)。本研究 SD 雌鼠卵巢次级卵泡构成比下降, 可能是卵巢 *Cdc42* 基因表达下调抑制了 PI3K 信号通路活性, 影响卵泡生长发育的过程。

睡眠剥夺增加女性月经周期紊乱的风险(Caetano et al., 2021), 本研究中 SD15 组有 3 只雌鼠动情周期紊乱或消失, SD50 组有 6 只雌鼠动情周期紊乱或消失, 动情周期异常的雌鼠数量随着睡眠剥夺时间延长而增加。BC 组中有一只雌鼠动情周期紊乱, 原因可能是长期以阴道涂片法检测动情周期引起大鼠性激素异常分泌, 导致动情周期紊乱(荆宝琴等, 2015)。HPG 轴水平上精确的激素调节对正常的生殖功能和生育是必不可少的。下丘脑 GnRH 的脉冲式分泌刺激垂体促性腺激素对促卵泡生成素(FSH)和黄体生成素(LH)的合成和释放, GnRH 通过与垂体前叶促性腺激素细胞表面的高亲和力的 7-跨膜受体(GnRHR)结合而发挥作用(Stamatiades et al., 2018)。本研究 SD50 组卵巢 *Gnrhr* 基因表达上调, 可能是机体调控激素水平的一种代偿作用。

本课题研究 SD 导致卵巢转录组发生显著变化, GO 分析显示差异上调基因涉及蛋白质分解代谢及水解调节、对机械刺激反应、糖基化(大分子及蛋白质)、阳离子跨膜转运的调控、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞对生长因子刺激的反应、鞘脂生物合成过程、有丝分裂核分裂等生物学过程; 显著下调基因则主要涉及细胞-基质粘附调节、激素代谢过程、对活性氧的反应、女性妊娠、胶原代谢过程、神经元投射发育的调控等

生物学过程。女性妊娠生物学过程包括 3 个基因: *Fbln1*、*Mmp2* 和 *Maged2* 基因。在已知的 25 种人类基质金属蛋白酶中, MMP2 和 MMP9 在排卵和妊娠期间发挥重要作用, 研究发现不孕女性颗粒细胞中 *Mmp2* 基因表达显著高于正常女性(Ramu et al., 2017; Luddi et al., 2018), 但我们的研究结果与文献报道的不孕女性颗粒细胞中 *Mmp2* 基因显著升高结果相反。

本研究中卵巢差异基因与课题组前期研究的雄性大鼠睾丸差异基因有一个相同基因: *Fktn*。*Fktn* 富集在碳水化合物衍生物生物合成过程、蛋白质糖基化、大分子糖基化和糖基化生物学过程中。在糖基转移酶作用下将糖转移至蛋白质, 和蛋白质的氨基酸残基形成糖苷键的过程称为糖基化, 糖基化对蛋白有重要的修饰作用, 如改变多肽的构象和增加蛋白质的稳定性。*Fktn* 编码一种基于高尔基体的磷酸核糖醇转移酶, *Fktn* 基因突变导致福山先天性肌营养不良症(FCMD)的发生(Ujihara et al., 2019; 廖瑛, 2021), 研究发现在 *Fktn* 基因敲除 18 天内, 小鼠体内糖基化肌营养不良蛋白聚糖几乎完全消失(Beedle et al., 2012)。现有研究未发现 *Fktn* 基因调控生殖能力的机制, 此基因能否作为睡眠调控生殖能力的靶点基因值得深入研究。

在 SD50、MC、BC 组之间发现 26 个甲基化显著差异区域(如表 7), 尽管在 52 个上调基因和 49 个下调基因的所有位点上, 其甲基化水平没有变化。但上述 26 个甲基化区域与生育的关系尚有待挖掘。

参考文献:

- 荆宝琴, 张金晓, 王磊, 等, 2015. 成年 SD 大鼠不同阴道涂片方法探索[C]//中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集. 武汉: 99.
- 廖瑛, 2021. FKTN 基因突变相关成年发病福山型先天性肌营养不良伴癫痫及扩张性心肌病一例表型及遗传分析[D]. 南昌: 南昌大学.
- 孙晖, 2021. FHL2 基因对小鼠卵泡发育及繁殖力的调控作用及机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学.
- 王若冲, 戴宁, 李儒婷, 等, 2022. 平台水环境法构建人类疾病动物模型的应用与思考[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, (2022-01-11) [2022-05-25]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220521.1730.002.html>.
- 张继辉, 潘集阳, 2007. 慢性 REM 睡眠剥夺对大鼠体重、进食量、血清瘦素及下丘脑瘦素水平的影响[C]//第 2 届中国睡眠医学论坛论文集汇编. 南京: 140-141.
- 曾荣, 邵淑丽, 徐兴军, 等, 2010. 长期异相睡眠剥夺对大鼠能量代谢及血清甲状腺素水平的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 26(1): 105-108.
- 周东升, 周锦, 郑池乐, 等, 2014. 睡眠剥夺对雄性小鼠体重及性行为的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, (23): 189-191.
- ALVARENGA T A, HIROTSU C, MAZARO-COSTA R, et al. 2015. Impairment of male reproductive function after sleep deprivation[J]. Fertil Steril, 103(5): 1355-1362.
- ANDERSEN M L, ALVARENGA T A F, GUINDALINI C, et

- al, 2009. Paradoxical sleep deprivation influences sexual behavior in female rats[J]. *J Sex Med*, 6(8):2162–2172.
- ANTZA C, KOSTOPOULOS G, MOSTAFA S, et al, 2021. The links between sleep duration, obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. *J Endocrinol*, 252(2):125–141.
- BEEDLE A M, TURNER A J, SAITO Y, et al, 2012. Mouse fukutin deletion impairs dystroglycan processing and recapitulates muscular dystrophy[J]. *J Clin Invest*, 122(9):3330–3342.
- BEROUKHIM G, ESENCAN E, SEIFER D B, 2022. Impact of sleep patterns upon female neuroendocrinology and reproductive outcomes: A comprehensive review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 20(1):16.
- CAETANO G, BOZINOVIC I, DUPONT C, et al, 2021. Impact of sleep on female and male reproductive functions: A systematic review [J]. *Fertil Steril*, 115(3):715–731.
- CHEN W Y, GUO X D, JIN Z P, et al, 2020. Transcriptional alterations of genes related to fertility decline in male rats induced by chronic sleep restriction[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 66(2):99–111.
- GARBARINO S, LANTERI P, BRAGAZZI N L, et al, 2021. Role of sleep deprivation in immune-related disease risk and outcomes[J]. *Commun Biol*, 4(1):1304.
- LUDDI A, GORI M, MARROCCO C, et al, 2018. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human cumulus and granulosa cells as biomarkers for oocyte quality estimation[J]. *Fertil Steril*, 109(5):930–939.e3.
- LIEW S C, AUNG T, 2021. Sleep deprivation and its association with diseases—A review [J]. *Sleep Med*, 77:192–204.
- LIM Z W, WANG I D, WANG P, et al, 2021. Obstructive sleep apnea increases risk of female infertility: A 14-year nationwide population-based study [J]. *PLoS One*, 16(12):e0260842.
- PIMOLSRI C, LYU X, GOLDSTEIN C, et al, 2021. Objective sleep duration and timing predicts completion of in vitro fertilization cycle [J]. *J Assist Reprod Genet*, 38(10):2687–2696.
- RAMU D, VENKATESAN V, PAUL S F D, et al, 2017. Genetic variation in matrix metalloproteinase MMP2 and MMP9 as a risk factor for idiopathic recurrent spontaneous abortions in an Indian population[J]. *J Assist Reprod Genet*, 34(7):945–949.
- STAMATIADIS G A, KAISER U B, 2018. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 463:131–141.
- SHAO S Y, ZHAO H Q, LU Z Y, et al, 2021. Circadian rhythms within the female HPG axis: From physiology to etiology[J]. *Endocrinology*, 162(8):bqab117.
- UJIHARA Y, KANAGAWA M, MOHRI S, et al, 2019. Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure[J]. *Nat Commun*, 10(1):5754.
- WANG Z B, JIANG Z Z, ZHANG Q H, et al, 2013. Specific deletion of CDC42 does not affect meiotic spindle organization/migration and homologous chromosome segregation but disrupts polarity establishment and cytokinesis in mouse oocytes[J]. *Mol Biol Cell*, 24(24):3832–3841.
- YANG C K, WU S C, WU C H, et al, 2015. Sleep deprivation enhances peripheral serotonin secretion to regulate the large follicle steroidogenesis of rats [J]. *Taiwanese J Obstet Gynecol*, 54(3):260–265.
- YAN H, ZHANG J W, WANG C, et al, 2017. CDC42 in oocytes controls the activation of primordial follicles by regulating PTEN-PI3K signaling in mice[C]//中国生理学会生殖科学专业委员会-中国动物学会生殖生物学分会第二次联合学术年会暨“生殖科学专业委员会第二次学术交流大会”和“生殖生物学分会第十六次学术年会”论文集:168.
- ZHAO B B, SUN S L, HE X Y, et al, 2021. Sleep fragmentation and the risk of obesity: The sleep heart health study [J]. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 29(8):1387–1393.

(责任编辑 张冰)