

苍附导痰丸含药血清调控大鼠卵巢颗粒细胞自噬的作用[△]

谢蓬蓬*, 刘佳玥, 曾 蕾[#](广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)05-0547-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.05.07

摘要 目的:研究苍附导痰丸含药血清调控大鼠卵巢颗粒细胞(GCs)自噬的作用。方法:将3月龄SD大鼠分为生理盐水组(生理盐水,灌胃)、卵巢刺激素(FSH)注射组(10.71 IU/kg,皮下注射)和苍附导痰丸高、中、低剂量灌胃组[0.5、1、2 mg/g(以生药量计),灌胃],每组6只,每天皮下注射/灌胃给药1次,连续3天;末次给药后,于腹主动脉采血,获取各组大鼠的含药血清。将大鼠GCs分为空白对照组、模型组、FSH组(阳性对照)和苍附导痰丸高、中、低剂量组,除空白对照组直接加入生理盐水组大鼠血清100 μL外,其余各组均先给予丙酸睾酮诱导以复制自噬模型,然后模型组加入生理盐水组大鼠血清100 μL,各给药组分别加入对应药物组含药血清100 μL。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组细胞上清液中雌二醇(E₂)、孕激素(P)的含量,采用Western blot法检测各组GCs中磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)蛋白的相对表达量;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法检测各组细胞中PI3K、Akt、mTOR和自噬相关因子Beclin 1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA的相对表达量。结果:与空白对照组比较,模型组细胞上清液中E₂含量以及细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA和蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.01$),Beclin 1、LC3 I、LC3 II mRNA的相对表达量均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,FSH组和苍附导痰丸中、高剂量组细胞上清液中E₂含量显著升高,细胞中Beclin 1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA的相对表达量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各给药组细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA和蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:苍附导痰丸可能是通过激活PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白及其mRNA的表达,从而抑制GCs的自噬。

关键词 苍附导痰丸;卵巢颗粒细胞;自噬;PI3K/Akt/mTOR通路

Effect of Cangfu Daotan Pill Containing Serum on Autophagy of Ovarian Granulosa Cells of Rats

XIE Pengpeng, LIU Jiayue, ZENG Lei (The First Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of Cangfu daotan pill (CDP) containing serum on autophagy of ovarian granulosa cells (GCs) of rat. METHODS: Three-month-old SD rat were divided into normal saline group (normal saline, ig), FSH injection group (10.71 IU/kg, ih), CDP irrigation high-dose, medium-dose and low-dose groups [0.5, 1, 2 mg/g (by crude drug), ig], with 6 rats in each group. They were given relevant medicine subcutaneously/intragastrically, once a day, for consecutive 3 days. After last medication, blood sample was collected from the abdominal aorta to obtain drug-containing serum. GCs of rat were divided into blank control group, model group, FSH group (positive control) and CDP high-dose, medium-dose and low-dose groups. The autophagy model was induced by giving testosterone propionate, except that the blank control group was directly added with 100 μL serum of normal saline group. Then model group was given 100 μL serum of normal saline group, and administration groups were given 100 μL drug-containing serum of corresponding drug group. The contents of estradiol (E₂) and progesterone (P) in supernatant of cells were determined by ELISA. Western blot assay was used to detect protein expression of PI3K, Akt and mTOR in cells. The mRNA expression of PI3K, Akt, mTOR, Beclin 1, LC3 I, LC3 II and p62 were detected by RT-PCR. RESULTS: Compared with blank control group, the content of E₂ in supernatant, relative mRNA and protein expression of PI3K, Akt and mTOR were decreased significantly in model group ($P < 0.01$), while relative mRNA expression of Beclin 1, LC3 I and LC3 II were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, the content of E₂ in supernatant were significantly increased in FSH group, CDP medium-dose and high-dose groups, while relative mRNA expression of Beclin 1, LC3 I, LC3 II and p62 were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); relative mRNA and protein expression of PI3K, Akt and mTOR were increased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: CDP can inhibit autophagy of GCs by

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81804135)

* 主治中医师,硕士。研究方向:中医药防治妇科疾病。电话:020-38076311。E-mail:LXPP4239@163.com

通信作者:副主任中医师,博士。研究方向:生殖健康与生殖障碍。电话:020-38076311。E-mail:407687448@qq.com

activating related protein and mRNA expression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

KEYWORDS Cangfu daotan pill; Ovarian granulosa cells; Autophagy; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

卵泡发育障碍是多囊卵巢综合征、卵巢早衰、不孕症等诸多妇科疾病的主要原因^[1]。目前,上述疾病的西医治疗手段以激素等药物为主,存在不良反应多、患者易复发等不足^[2],故针对卵泡发育障碍相关疾病探讨更加有效、安全的治疗措施,具有重要的临床意义。近年来,中药在卵泡发育障碍相关疾病方面的应用受到越来越多的关注^[3]。苍附导痰丸作为妇科常用方剂,可安全、有效地治疗多囊卵巢综合征、卵巢早衰等疾病,其机制可能与改善性激素[如雌二醇(E₂)、孕激素(P)]水平、促进卵泡发育有关^[4],但具体机制尚未明确。

研究表明,卵泡的发育与卵巢颗粒细胞(GCs)自噬的稳态平衡有关,而GCs的自噬受诸多细胞因子(如Beclin 1、LC3 I、LC3 II和p62)的调控^[5]。存在于卵母细胞中的磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)是重要的细胞信号转导因子,其激活后的产物可促使蛋白激酶B(Akt)磷酸化,使其下游的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)活化,从而影响GCs的增殖、凋亡^[6]。PI3K/Akt/mTOR通路是自噬研究最广泛的信号通路之一,已有研究表明,激活该通路可抑制GCs自噬,从而维持卵泡的正常发育及功能^[7-8]。可见,通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调节GCs自噬,有望成为治疗卵巢发育障碍疾病的新靶点。有鉴于此,本研究基于PI3K/Akt/mTOR通路和自噬相关因子,探讨苍附导痰丸调控大鼠GCs自噬的作用,以期对卵泡发育障碍相关疾病的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:JEM-1000型透射电子显微镜(日本SanYo公司)、BT25S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司)、Rotofix 32A型离心机(德国Hettich公司)、MK3型酶标仪(美国Bio-Rad公司)、ECO 48型聚合酶链式反应(PCR)仪(英国PCRmax公司)、BioDoc-IT型凝胶成像系统(美国UVP公司)、UV-6100S型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司)、HH-501S水浴锅(上海赫田科学仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有:苍附导痰丸(由苍术12g、香附12g、枳壳12g、陈皮12g、茯苓15g、甘草6g组成,由广州中医药大学第一附属医院熬制而成,每袋200mL,按生药量计质量浓度为1g/mL),卵巢刺激素(FSH,美国Invitrogen公司),丙酸睾酮(TP)、DMEM/F12培养基、化学发光试剂盒、cDNA合成试剂盒、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体以及E₂、P酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国Life Technology公司,批号分别为WP20147、WP20489、WP21138、WP22467、WP20028、WP10267、WP71890),10%胎牛血清、0.25%

胰蛋白酶、蛋白裂解液、2.5%戊二醛、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)、山羊抗大鼠PI3K多克隆抗体、山羊抗大鼠Akt多克隆抗体、山羊抗大鼠mTOR多克隆抗体、山羊抗大鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗、TRIzol试剂、BCA试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)缓冲液、逆转录试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为00251450、00242682、00143679、01271398、03462477、05472588、04462976、05862874、15562672、14422598、06460571、02432319、01442466),PCR引物[赛默飞世尔科技(中国)有限公司设计合成],醋酸铀-枸橼酸铅双染色剂、PBST溶液(武汉博士德生物工程有 限公司,批号分别为BSD-GS88900、BSD-GS45907);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物包括3月龄雌性SD大鼠30只,体质量为(300±50)g,用于含药血清的制备;1月龄雌性SD大鼠15只,体质量为(200±40)g,用于大鼠GCs的原代培养。实验动物均由广州中医药大学实验中心提供,动物生产许可证号为SCXK(粤)2018-0034。所有动物均饲养于温度(22±2)℃、相对湿度50%的动物房。

2 方法

2.1 大鼠GCs的制备

参考文献[9]方法,取1月龄的SD大鼠15只,处死后取出卵巢,刺破卵巢上的成熟卵泡以收集卵泡液;将卵泡液加入含青霉素(100U/mL)、链霉素(100μg/mL)的DMEM/F12培养基中洗涤,以1000r/min离心5min后,弃上清,向沉淀中加适量DMEM/F12培养基,吹打混匀,制成细胞密度为1×10⁶个/mL的GCs悬液,备用。

2.2 大鼠含药血清的制备

参考文献[10]方法,取3月龄的SD大鼠30只,随机分为生理盐水组(生理盐水,灌胃给药)、FSH注射组(10.71IU/kg,皮下注射给药;剂量根据临床等效剂量换算而得)和苍附导痰丸高、中、低剂量灌胃组[0.5、1、2mg/g(按生药量计),灌胃给药;剂量分别为临床等效剂量的5、10、20倍],每组6只。各组大鼠每天皮下注射/灌胃给药1次,连续3天。各组大鼠均在末次给药后,于腹主动脉采血,置于含有枸橼酸钠的离心管中,混匀后,以3000r/min离心5min,取上清液,于56℃水浴条件下灭活补体并用0.22μm微孔滤膜过滤除菌后,于-20℃下保存,备用。

2.3 分组、造模和给药

取“2.1”项下GCs悬液适量,随机分为空白对照组、模型组、FSH组(阳性对照)和苍附导痰丸高、中、低剂量组,除空白对照组细胞加入“2.2”项下生理盐水组的大鼠血清100μL外,其余各组细胞均先加入TP(100nmol/L)

并于37℃、5%CO₂条件下培养12h以复制GCs自噬模型,再向模型组细胞中加入“2.2”项下生理盐水组大鼠血清100μL,向FSH组和苍附导痰丸各剂量组细胞中分别加入“2.2”项下FSH注射组和苍附导痰丸各剂量灌胃组的大鼠含药血清100μL,每组设3个复孔。

2.4 细胞上清液中E₂、P含量的检测

采用ELISA法进行检测。取“2.1”项下GCs悬液适量,按“2.3”项下方法分组、造模和给药,置于37℃、5%CO₂条件下培养48h。取各组细胞上清液适量,按照相应ELISA试剂盒说明书方法操作后,采用酶标仪于450nm波长下检测各组细胞上清液中E₂、P的含量。以上试验重复3次。

2.5 细胞中PI3K、Akt、mTOR蛋白相对表达量的检测

采用Western blot法检测。取“2.1”项下GCs悬液适量,按“2.3”项下方法分组、造模和给药,置于37℃、5%CO₂条件下培养48h。在细胞中加入蛋白裂解液于碎冰上裂解30min,以12000r/min离心10min后,收集上清液,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度后,于沸水浴中变性5min。取变性后的蛋白样品,进行SDS-PAGE电泳、转膜后,以5%脱脂奶粉于室温下封闭2h;加入PI3K抗体、Akt抗体、mTOR抗体(稀释度均为1:1000)孵育2h后;以PBST清洗3次,加入二抗(稀释度为1:200),室温孵育2h;以PBST清洗13次,使用化学发光试剂盒显色后,置于凝胶成像系统上成像。采用Image proplus 6.0软件进行分析,以目的蛋白与内参GAPDH的灰度值比值来表示目的蛋白的相对表达量。以上试验重复3次。

2.6 细胞中PI3K、Akt、mTOR、Beclin 1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA相对表达量的检测

采用实时荧光定量PCR法。取“2.1”项下GCs悬液适量,按“2.3”项下方法分组、造模和给药,置于37℃、5%CO₂条件下培养48h。采用TRIzol法^[11]分别提取各组细胞中的总RNA,采用紫外分光光度计于260、280nm波长下检测RNA的纯度和浓度后,使用cDNA合成试剂盒将RNA逆转录为cDNA,然后进行PCR扩增(引物序列及扩增产物长度信息见表1)。PCR扩增体系(20μL)包括:cDNA模板4μL、上/下游引物各2μL、无核酸酶水2μL、荧光染料10μL。PCR扩增条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸30s,共40个循环。使用Image J v1.5.1软件分析结果,以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算PI3K、Akt、mTOR、Beclin 1、LC3 I、LC3 II和p62 mRNA的相对表达量。以上试验重复3次。

2.7 细胞中自噬小体的观察

采用透射电镜进行观察。取“2.1”项下GCs悬液适量按“2.3”项下方法分组、造模和给药,置于37℃、5%

表1 引物序列及扩增产物长度

Tab 1 Primer sequence and amplification product length

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度, bp
PI3K	上游:CAAAGCCGAGAACCTATTGC	226
	下游:TGAGGGAGTCAITGTGCTG	
Akt	上游:TGGACTACTTGCACTCCGAG	155
	下游:CGCAGAACGTCTTCATGGTG	
mTOR	上游:TGGCTTCTAAGTCTACCACGACAG	356
	下游:GAGGTCTGACATTCCTGATT	
Beclin 1	上游:ATCCTGGACCGTGTCACCATCCAGG	352
	下游:GTTGAGCTGAGTGCCAGCTGG	
LC3	上游:CGGAGCTTTGAACAAAGAGTGG	158
	下游:CTCTCTCACTCTCGTACAC	
p62	上游:TCCCTGTCAAGCAGTATCC	147
	下游:TCCTCTTGGCTTTGTCTC	

CO₂条件下培养48h。将细胞培养液以1000r/min离心5min后,弃上清液,取沉淀以2.5%戊二醛溶液于室温下固定1h以上;以PBS漂洗后,加入1%四氧化锇溶液于室温下固定1h;再以50%、70%丙酮溶液各脱水1次后,进行包埋、切片(厚度约1μm)及染色(3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色),然后于透射电子显微镜下观察细胞中自噬小体,并计数。

2.8 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 苍附导痰丸含药血清对细胞上清液中E₂、P含量的影响

与空白对照组比较,模型组细胞上清液中E₂含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,FSH组和苍附导痰丸中、高剂量组细胞上清液中E₂含量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各组细胞上清液中P含量差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表2。

表2 各组细胞上清液中E₂、P含量的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 The contents of E₂ and P in supernatant of cells in each group($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	E ₂ , pg/mL	P, ng/mL
空白对照组	55.01 ± 1.71	12.23 ± 0.54
模型组	31.55 ± 1.16**	11.68 ± 0.37
FSH组	50.73 ± 1.27 ^{##}	12.53 ± 1.15
苍附导痰丸低剂量组	33.94 ± 1.38	12.24 ± 0.14
苍附导痰丸中剂量组	37.33 ± 1.73 [#]	12.45 ± 0.47
苍附导痰丸高剂量组	48.62 ± 1.36 ^{##}	12.46 ± 0.26

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2 苍附导痰丸含药血清对细胞中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组细胞中PI3K、Akt、mTOR蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,FSH组和苍附导痰丸中、高剂量组细胞中上述蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图1、表3。

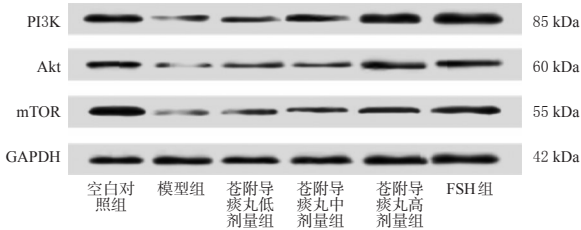


图1 各组细胞中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的电泳图
Fig 1 Electrophoretogram of protein expression of PI3K, Akt and mTOR in cells of each group

表3 各组细胞中PI3K、Akt、mTOR蛋白相对表达量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Relative protein expression of PI3K, Akt and mTOR in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH
空白对照组	2.21±0.34	1.71±0.22	2.81±0.25
模型组	0.89±0.16**	0.64±0.16**	0.93±0.05**
FSH组	2.37±0.25 ^{##}	1.64±0.12 ^{##}	2.13±0.16 ^{##}
苍附导痰丸低剂量组	0.94±0.12*	0.86±0.20*	1.24±0.11*
苍附导痰丸中剂量组	1.42±0.15*	0.92±0.21*	1.61±0.27*
苍附导痰丸高剂量组	2.35±0.23 ^{##}	1.51±0.15 ^{##}	2.04±0.14 ^{##}

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

3.3 苍附导痰丸含药血清对细胞中PI3K、Akt、mTOR、Beclin 1、LC3 I、LC3 II和p62 mRNA表达的影响

与空白对照组比较,模型组细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA的相对表达量均显著降低,Beclin 1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA的相对表达量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,FSH组和苍附导痰丸各剂量

表4 各组细胞中PI3K、Akt、mTOR、Beclin 1、LC3 I、LC3 II和p62 mRNA相对表达量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 4 mRNA expression of PI3K, Akt, mTOR, Beclin 1, LC3 I, LC3 II and p62 in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PI3K mRNA	Akt mRNA	mTOR mRNA	Beclin 1 mRNA	LC3 I mRNA	LC3 II mRNA	p62 mRNA
空白对照组	1.32±0.22	1.43±0.21	1.28±0.21	1.00±0.11	1.00±0.12	1.00±0.15	1.00±0.21
模型组	0.53±0.18**	0.46±0.14**	0.53±0.17**	3.92±0.34**	2.23±0.13**	3.12±0.13**	3.60±0.42**
FSH组	1.26±0.21 ^{##}	1.17±0.13 ^{##}	1.12±0.07 ^{##}	2.21±0.05 ^{##}	2.04±0.31 ^{##}	2.45±0.12 ^{##}	2.34±0.23 ^{##}
苍附导痰丸低剂量组	0.72±0.24*	0.63±0.21*	0.74±0.02*	3.85±0.32	2.07±0.14	3.03±0.30	3.54±0.30
苍附导痰丸中剂量组	1.12±0.13*	0.78±0.23*	0.86±0.20*	3.74±0.26*	1.94±0.17*	2.96±0.21*	3.47±0.24*
苍附导痰丸高剂量组	1.23±0.17 ^{##}	1.02±0.14 ^{##}	1.06±0.14 ^{##}	2.14±0.13 ^{##}	1.90±0.20 ^{##}	2.38±0.14 ^{##}	2.26±0.25 ^{##}

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

组细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA的相对表达量均显著升高,FSH组和苍附导痰丸中、高剂量组细胞中Beclin 1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA的相对表达量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表4。

4 讨论

近年来,在卵泡发育障碍相关疾病中应用疗效佳、副作用少的中药进行治疗日益受到重视^[11]。卵巢发育障碍相关的疾病,多属于中医“闭经”“不孕”等范畴^[12]。妇科常用方剂苍附导痰丸是由苍术、香附、枳壳、陈皮、茯苓、甘草等组成,具有健脾化痰、活血调经、理气散结的功效,相关研究表明其可有效改善闭经、月经不调、不孕等卵巢发育障碍所致的疾病^[13]。已有研究表明,卵泡发育障碍与GCs异常激活的自噬密切相关,GCs自噬会导致卵泡的提前闭锁,引起卵泡发育障碍,造成卵泡分泌性激素的功能失调,从而引发一系列临床症状,而该过程受到自噬相关基因、多种细胞因子以及信号通路的调控^[14-16]。PI3K/Akt/mTOR通路是目前研究较为广泛的信号通路之一,PI3K在细胞因子、缺氧等因素的影响下可激活Akt,活化后的Akt又可激活下游的mTOR,从而抑制GCs的自噬^[17-18]。Beclin-1、LC3、p62是常见的自噬标志物:Beclin-1蛋白是自噬体形成的必备物质,其表达下调会抑制自噬的发生,因此Beclin-1的表达可反映自噬的活性;LC3蛋白包括LC3 I、LC3 II两种形式,可与Beclin-1蛋白共同参与自噬体的形成,已被作为自噬体的特异性标记物;p62蛋白在自噬过程中,会不断地被降解,若自噬活性降低,则p62会在细胞中积累,因而p62是反映自噬活性的重要标志物^[19-20]。基于此,本研究通过检测GCs中PI3K、Akt、mTOR mRNA和蛋白的相对表达量以及Beclin-1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA的相对表达量,以反映GCs的自噬情况。

本研究将TP作用于GCs后,发现细胞上清液中E₂的含量以及细胞中PI3K、Akt、mTOR、p62 mRNA的相对表达量均显著降低,Beclin 1、LC3 I、LC3 II mRNA的相对表达量均显著升高,推测TP可能是通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路的激活来促使GCs发生自噬,因而可模

拟卵泡发育障碍相关疾病的激素紊乱状态。经药物处理后发现,与模型组比较,FSH组和苍附导痰丸各剂量组细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA和蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);FSH组和高剂量组细胞上清液中 E_2 含量均显著升高,细胞中Beclin 1、LC3 I、LC3 II、p62 mRNA的相对表达量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

综上所述,苍附导痰丸可能通过激活PI3K/Akt/mTOR通路,从而抑制GCs的自噬。这提示苍附导痰丸可能通过上述机制改善性激素水平,从而发挥治疗卵泡发育障碍相关疾病的作用。

参考文献

[1] 韩辉,吕丹丽,宋成玮,等.补肾化痰祛瘀方对铜负荷肝豆状核变性模型小鼠卵泡发育障碍的影响[J].北京中医药大学学报,2020,43(3):225-233.

[2] 马金平,田晓娜,王曼,等.新加归肾丸对多囊卵巢综合征模型大鼠卵泡发育障碍的影响[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(1):86-90.

[3] 李鑫,谭丽,孟瑶,等.卵泡发育不良的中医药治疗综述[J].中华中医药杂志,2019,34(6):2612-2616.

[4] 骆世存.苍附导痰丸加减治疗多囊卵巢综合征的临床疗效及预后观察[J].中国医药科学,2020,10(14):61-63、202.

[5] 李小雪,王桂泉,朱琴玲,等.多囊卵巢综合征患者颗粒细胞自噬的发生及影响因素[J].中华生殖与避孕杂志,2018,38(7):531-535.

[6] 姜凤丽,王晓滨,宗婧,等.PI3K-Akt/mTOR信号通路对卵巢早衰相关性研究进展[J].黑龙江科学,2019,10(2):50-51.

[7] DUERRSCHMIDT N, ZABIMYK O, NOWICKI M, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1-mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death[J]. Endocrinology, 2006, 147(8):3851-3860.

[8] KAYAMPILLY PP, MENON KM. Follicle-stimulating hormone increases tuberlin phosphorylation and mammalian target of rapamycin signaling through an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in rat granulosa cells [J].Endocrinology,2007,148(8):3950-3957.

[9] 白俊,吴也可,吴克明,等.雷公藤甲素通过PI3K/Akt/

mTOR通路诱导卵巢颗粒细胞自噬的实验研究[J].中国中药杂志,2019,44(16):3429-3434.

[10] 范思奇,曾平,农焦,等.通络生骨胶囊含药血清对破骨细胞及Toll样受体4/核因子 κ B信号通路的影响[J].中国组织工程研究,2021,25(14):2155-2160.

[11] 白俊,郜然然,吴克明.自噬与中医药延缓卵巢衰老的相关性研究进展与评述[J].中华中医药学刊,2017,35(12):3117-3120.

[12] 胡攀伟,李嘉,刘丹,等.基于网络药理学探讨苍附导痰丸治疗多囊卵巢综合征的作用机制[EB/OL]. [2020-09-25]. <http://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20200622.001>.

[13] 荆福河.苍附导痰丸加减治疗痰湿内阻型多囊卵巢综合征不孕的临床效果观察[J].中医临床研究,2020,12(4):16-18.

[14] 杨欣,曹金龙,陈莉,等.自噬在多囊卵巢综合征中的研究进展[J].现代妇产科进展,2020,29(1):74-76.

[15] LENKA B, TOMAS S, VISEK B, et al. Proliferative potential and phenotypic analysis of long term cultivated human granulosa cells initiated by addition of follicular fluid[J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(10):939-950.

[16] ZHOU JL, YAO W, LIU KQ, et al. MicroRNA let-7g regulates mouse granulosa cell autophagy by targeting insulin-like growth factor 1 receptor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 78(9):130-140.

[17] ZHANG DM, LIU JS, DENG LJ, et al. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6):1331-1342.

[18] 黄姗姗,刘慧萍,张钰玉,等.卵巢颗粒细胞自噬与PI3K/Akt/FOXO3a信号通路的相关性[J].湖南中医药大学学报,2019,39(6):775-780.

[19] 孔志伟,姚婷婷.自噬相关基因Beclin1和LC3与子宫内膜异位症的研究进展[J].医学综述,2019,25(21):4166-4173.

[20] 王幼辉,王锡恩,彭敏,等.自噬相关蛋白Beclin 1、p62、Atg5在浆液性卵巢癌组织中的表达及临床意义[J].中华内分泌外科杂志,2016,10(4):329-332.

(收稿日期:2020-09-27 修回日期:2020-11-25)

(编辑:唐晓莲)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅