

助卵汤调控PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制KGN过度自噬改善早发性卵巢功能不全的机制

陈瑶^{1,2}, 田赛男^{2*}, 曾晶¹, 易星星¹, 刘文娥¹, 雷磊^{1,2}, 唐丽^{1*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 基于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路探讨助卵汤抑制人卵巢颗粒细胞(KGN)过度自噬改善早发性卵巢功能不全(POI)的作用机制。方法: 通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法确定环磷酰胺作用于KGN建立POI细胞模型最优浓度,并基于此检测不同含量助卵汤含药血清对KGN细胞模型活力的影响。确定最佳给药浓度后,将KGN分为空白组(20%空白血清)、模型组(20%空白血清+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺)、助卵汤含药血清组(20%助卵汤含药血清+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺)、自噬抑制剂组(20%空白血清+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氯喹)、自噬抑制剂+助卵汤含药血清组(20%助卵汤含药血清+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氯喹)、补佳乐组(20%补佳乐含药血清+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺),培养48 h后,通过流式细胞术检测各组KGN的凋亡率,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组KGN中PI3K、p-Akt和Akt、磷酸化(p)-mTOR和mTOR信号通路蛋白表达情况,以及Beclin1、ATG5和微管相关蛋白1轻链3(LC3)等自噬相关蛋白的表达情况,采用单丹磺酰尸胺(MDC)染色检测各组自噬的程度。结果: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺处理KGN细胞48 h可以构建KGN的POI细胞模型,明显抑制KGN细胞增殖,且环磷酰胺对KGN细胞增殖的抑制能力与环磷酰胺的浓度呈正相关;20%及30%含量的助卵汤含药血清能促进细胞增殖,缓解环磷酰胺对KGN细胞增殖的抑制作用,且2个浓度疗效相当;与空白组比较,模型组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$),PI3K、p-Akt及p-mTOR蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),自噬相关蛋白Beclin1、LC3及ATG5蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),而Akt与mTOR蛋白表达水平未见显著变化,MDC自噬荧光强度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,空白组、模型组、卵汤含药血清组、自噬抑制剂组、自噬抑制剂+助卵汤含药血清和补佳乐组细胞凋亡率均明显降低($P<0.05, P<0.01$),自噬抑制剂+助卵汤含药血清组疗效最佳;PI3K、p-Akt及p-mTOR蛋白表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),自噬抑制剂+助卵汤含药血清组升高最显著($P<0.01$),自噬相关蛋白Beclin1和ATG5表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$);助卵汤含药血清组和补佳乐组LC3蛋白表达明显下降($P<0.05, P<0.01$),自噬抑制剂组和自噬抑制剂+助卵汤含药血清LC3蛋白表达下降,但差异无统计学意义。结论: 助卵汤可能通过激活PI3K/Akt/mTOR通路抑制细胞过度自噬,逆转环磷酰胺对KGN细胞模型的损害作用,达到改善POI的目的。

[关键词] 助卵汤; 早发性卵巢功能不全; 环磷酰胺; 自噬

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0089-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252306

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251028.1358.004>

[网络出版日期] 2025-10-28 15:33:17 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Zhuluan Decoction Ameliorates Premature Ovarian Insufficiency by Inhibiting Excessive Autophagy of KGN Through Regulation of PI3K/Akt/mTOR Pathway

CHEN Yao^{1,2}, TIAN Sainan^{2*}, ZENG Jing¹, YI Xingxing¹, LIU Wen'e¹, LEI Lei^{1,2}, TANG Li^{1*}

(1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;*

2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*)

[收稿日期] 2025-09-14

[基金项目] 2025年湖南省研究生科研创新项目(CX20251215);湖南省自然科学基金青年项目(2025JJ60625);湖南省卫生健康委员会科研课题(W20243198),湖南中医药大学校院联合基金重点项目(2023XYLHJ005);湖南省中医药管理局课题项目(B2024049);湖南中医药大学校院联合基金项目(2024XYLH353);湖南省科技厅重点领域研发计划项目(2023SK2050)

[第一作者] 陈瑶,在读博士,从事中西医结合防治妇产科疾病研究,E-mail:1552698385@qq.com

[通信作者] *唐丽,博士,主治医师,从事中西医结合防治妇产科疾病研究,E-mail:1451962023@qq.com;

*田赛男,博士,讲师,从事中医药防治眼科疾病研究,E-mail:tsn004826@163.com

[Abstract] **Objective:** To elucidate the underlying mechanism through which Zhuluan decoction suppresses excessive autophagy in human ovarian granulosa cells (KGN) and ameliorates premature ovarian insufficiency (POI) via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Methods:** The optimal concentration of cyclophosphamide for inducing a POI model in KGN cells was identified via the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Subsequently, the impacts of varying concentrations of Zhuluan decoction-containing serum on the viability of the KGN cell model were assessed. After the optimal drug concentration was determined, KGN cells were categorized into the following groups: blank control (20% blank serum), model (20% blank serum + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cyclophosphamide), Zhuluan decoction-containing serum (20% Zhuluan decoction-containing serum + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cyclophosphamide), autophagy inhibitor (20% blank serum + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cyclophosphamide + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chloroquine phosphate), autophagy inhibitor + Zhuluan decoction-containing serum (20% Zhuluan decoction-containing serum + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cyclophosphamide + 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chloroquine phosphate), and estradiol valerate (20% estradiol valerate-containing serum + 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cyclophosphamide). Following 48 hours of incubation, flow cytometry was utilized to measure the apoptosis rate of KGN cells in each group. Western blotting was employed to quantify the protein levels of PI3K, phosphorylated (p)-Akt, Akt, p-mTOR, and mTOR, along with the expression levels of autophagy-related proteins such as Beclin1, autophagy-related 5 homolog (ATG5), and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), in each group. Additionally, monodansylcadaverine (MDC) staining was performed to evaluate the extent of autophagy in each group. **Results:** Incubation of KGN cells with 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cyclophosphamide for 48 h successfully established a POI model, marked by a significant inhibition of KGN cell proliferation. Notably, the inhibitory effect of cyclophosphamide on KGN cell proliferation exhibited a positive correlation with its concentration. Zhuluan decoction-containing serum at 20% and 30% promoted cell proliferation and mitigated the inhibitory effect of cyclophosphamide on KGN cell proliferation, with comparable therapeutic efficacy observed at both concentrations. Compared with the blank control group, the model group displayed an elevated apoptosis rate ($P<0.01$), reduced protein levels of PI3K, p-Akt, and p-mTOR ($P<0.01$), increased protein levels of Beclin1, LC3, and ATG5 ($P<0.01$), no significant alterations in the protein levels of Akt and mTOR, and an enhanced MDC autophagy fluorescence intensity ($P<0.01$). In comparison to that the model group, the apoptosis rates in the blank control group, model group, Zhuluan decoction-containing serum group, autophagy inhibitor group, autophagy inhibitor + Zhuluan decoction-containing serum group, and estradiol valerate group all reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), with the most pronounced reduction observed in the autophagy inhibitor + Zhuluan decoction-containing serum group. The protein levels of PI3K, p-Akt, and p-mTOR were higher in other groups than in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), being the highest in the autophagy inhibitor + Zhuluan decoction-containing serum group ($P<0.01$). The protein levels of Beclin1 and ATG5 were lower in other groups than in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression level of LC3 declined in the Zhuluan decoction-containing serum group and the estradiol valerate group ($P<0.05$, $P<0.01$), while it decreased without statistical significance in the autophagy inhibitor group and the autophagy inhibitor + Zhuluan decoction-containing serum group. **Conclusion:** Zhuluan decoction may activate the PI3K/Akt/mTOR pathway to inhibit excessive autophagy and counteract the detrimental effects of cyclophosphamide on the KGN cell model, thus managing POI.

[Keywords] Zhuluan decoction; premature ovarian insufficiency; cyclophosphamide; autophagy

早发性卵巢功能不全(POI)是指40岁前出现月经紊乱、卵泡数量锐减、促性腺激素水平升高及雌激素水平降低,其核心病理特征为卵巢功能过早减退^[1-2]。流行病学数据显示,全球POI患病率逐年上升,且呈年轻化趋势,我国育龄期女性中POI患病率已高达3%^[3-4],严重影响女性生殖健康,并显著增加了骨质疏松、心血管疾病及认知功能障碍等远期并发症风险^[5]。然而,现有治疗手段,如激素替代疗法,存在疗效局限性和潜在不良反应^[6-7],探索安全有效的干预策略成为临床亟待解决的关键问题。

现有研究证实,卵巢颗粒细胞过度自噬是POI的关键病理环节之一^[8-9]。自噬作为细胞应对营养匮乏或氧化应激的适应性保护机制,在卵巢颗粒细胞中过度激活可导致卵泡闭锁加速、原始卵泡池耗竭及雌激素合成障碍,最终引发卵巢功能不可逆损

伤^[10]。因此,抑制卵巢颗粒细胞过度自噬成为改善POI的重要治疗靶点。助卵汤是尤昭玲教授依据其“冰山论”理论所创立的经验方,由菟丝子、黄芪、党参等12味中药组成,是中医“健脾补肾,暖巢养泡”理论的代表性方剂。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)信号通路是细胞生长、代谢及自噬调控的核心枢纽^[11]。课题组前期研究发现,POI模型动物卵巢组织中PI3K/Akt/mTOR信号通路关键蛋白PI3K、Akt、mTOR表达显著降低,且与自噬水平升高呈负相关,助卵汤可上调POI模型大鼠卵巢组织中PI3K、Akt及mTOR蛋白表达,同时降低微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)蛋白水平,抑制卵巢颗粒细胞过度自噬发生,从而逆转造模对大鼠卵巢储备功能的影响^[12]。

基于此,本研究以人卵巢颗粒细胞(KGN)为模型,结合化学诱导自噬抑制体系,系统探讨助卵汤含药血清对PI3K/Akt/mTOR信号通路活性、自噬相关蛋白表达及细胞存活率的影响,弥补当前研究局限于整体动物水平,缺乏细胞模型及分子互作验证的不足,进一步揭示助卵汤多靶点、多层次调控卵巢颗粒细胞自噬的分子网络,为中医药治疗POI提供现代科学依据。

1 材料

1.1 细胞与动物 KGN,编号PC-H2023021346(ProcellCL-0603)由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。短串联重复序列(STR)鉴定显示,①未检测到人源细胞交叉污染;②该细胞系DNA分型与细胞库中细胞类型匹配度为100.00%。SPF级雌性SD大鼠30只,体质量220~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2021-0002。大鼠饲养于湖南中医药大学动物实验室,许可证号SYXK(湘)2024-0014,普通饲料喂养,自由摄食饮水,温度(22±2)℃,湿度(60±5)%,保持安静,灯照周期为12 h。

1.2 伦理 本研究动物均经湖南中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查通过(批准号LL2021101301),符合相关伦理学要求。

1.3 药物与试剂 助卵汤:党参15 g、黄芪15 g、白术15 g、葛根10 g、枸杞子10 g、山药10 g、盐菟丝子10 g、石斛10 g、百合10 g(湖南中医药大学第一附属医院,批号分别为CK24092701、ZR24102501、SX24101801、ZR24091901、SX24092704、ZQ24101403、NG24101604、SX24092705、SX24092702),三七花5 g、覆盆子10 g、玉竹10 g(亳州市沪淮药业有限公司,批号分别为2410100142、2406300062、2406200072),橘叶10 g(长沙新林制药有限公司,批号240701),莲子10 g(安徽亳药千草中药饮片有限公司,批号2407284),甘草5 g(安徽仁普中药饮片有限公司,批号2409121),经湖南中医药大学第一附属医院药学教研室主任戴冰教授鉴定为正品。环磷酸胺、磷酸氯喹(美国MCE公司,批号分别为C3250000、PHR1404);补佳乐(德国拜耳集团,批号J20171038)。

DMEM培养基(美国Hyclone公司,批号12100046);胎牛血清(德国PAN公司,批号P30-3306);青霉素/链霉素(美国Gibco公司,批号15140);PI3K、Akt、磷酸化(p)-Akt、mTOR、p-mTOR抗体(美国Proteintech公司,批号分别为20584-1-

AP、60203-2-Ig、66444-1-Ig、66888-1-Ig、67778-1-Ig);p-PI3K抗体[艾比玛特生物医药(上海)有限公司,批号T40116];肌球蛋白样B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)结合蛋白(Beclin1)、自噬相关基因5(ATG5)及LC3抗体(英国Abcam公司,批号分别为Ab302669、Ab108329、Ab63817);山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗小鼠重组多克隆抗体(H+L)(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号分别为AWS0002a、RGAM001);细胞增殖与活性检测(CCK-8)、细胞自噬染色检测试剂盒(MDC法)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为CA1210、G0170);AnnexinV/PI细胞凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号A211)。

1.4 仪器 20160974型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),75002455型离心机(美国赛默飞公司),TSB-108型摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),VORTEX-6型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),041BR358545型电泳仪、552BR297327型垂直电泳槽、153BR134653型转印槽、721BR12725型化学发光凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司),HLD-10002型天平(杭州友恒称重设备有限公司),CytoFLEX型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司)。

2 方法

2.1 制备助卵汤水提液 根据既往动物实验结果^[12],助卵汤中药饮片均匀混合先后加入10、8倍量水,熬煮1.5 h,合并2次过滤药液,经旋转蒸发仪浓缩至生药质量浓度为5.6 g·mL⁻¹(按成人体质量70 kg,临床用药4倍),冷却、4℃密封保存。

2.2 制备含药血清和空白血清 SPF级雌性SD大鼠分为助卵汤含药血清组15只、补佳乐含药血清组5只,空白血清组10只。每日上午9时和下午6时,助卵汤含药血清组大鼠按照56 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃助卵汤水提液,补佳乐含药血清组大鼠,按照0.09 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃补佳乐混悬液,空白组大鼠按照10 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃蒸馏水,连续灌胃1周。末次给药后1 h,戊巴比妥钠腹腔麻醉后腹主动脉取血,室温静置2 h后,离心机4℃,3 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm,下同)。取上清液置于56℃水浴锅中灭活30 min,0.22 μm滤膜过滤后分装置于-80℃冰箱保存备用。

2.3 制备环磷酸胺溶液 根据药品说明书,将环磷酸胺溶于二甲基亚砜(DMSO)溶液中,制备成

20 mmol·L⁻¹的环磷酰胺母液,以每管20 μL分装,置于-80℃冰箱中保存。

2.4 制备磷酸氯喹溶液 根据药品说明书,将磷酸氯喹溶于无酶水中,配置成1 mmol·L⁻¹的磷酸氯喹母液,用0.22 μm的滤膜过滤除菌后,以每管100 μL分装,置于-80℃冰箱中保存。

2.5 CCK-8 确定磷酸酰胺诱导 KGN 细胞模型条件 细胞达到对数生长期,用0.25% EDTA胰酶消化至细胞变圆,加含有10% FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基1 mL轻轻吹散,收集至离心管,于1 500 r·min⁻¹离心5 min,去除上清,加DMEM培养基2 mL轻轻吹散,按1 000个/孔的密度铺板细胞至96孔板,置于37℃培养12 h。取母液20 mmol·L⁻¹环磷酰胺按1:1 000稀释成20 μmol·L⁻¹,再按倍比稀释成10、5、2.5 μmol·L⁻¹,去掉细胞上清,分别取200 μL药物(0、2.5、5、10、20 μmol·L⁻¹)加入孔中,置于37℃、5% CO₂,培养48 h后,每孔加入CCK-8 20 μL,混合均匀,置于37℃、5% CO₂,培养4 h,在450 nm测定吸光度A。

2.6 CCK-8 确定助卵汤含药血清缓解环磷酰胺诱导 KGN 细胞模型最佳含量 同2.5项将细胞铺板至96孔板,分别添加不同浓度的助卵汤含药血清细胞培养液,即1%青霉素-链霉素混合液分别添加50%、40%、30%、20%、10%的含药血清,剩余体积用相应体积的空白血清和基础培养基补齐。再取母液20 mmol·L⁻¹环磷酰胺按1:4 000加入(即终浓度5 μmol·L⁻¹);去掉细胞上清,分别取200 μL加入孔中,置于37℃、5% CO₂,培养48 h后,每孔加入CCK-8 20 μL,混合均匀,置于37℃、5% CO₂,培养4 h,在450 nm测定A。

2.7 Annexin V-FITC/PI 标记流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞达到对数生长期,按50%密度接种细胞至6孔板,置于37℃培养12 h,去掉上清,基于2.5、2.6项实验结果,空白组加入含有20%空白血清的培养基2 mL,模型组加入含有20%空白血清及5 μmol·L⁻¹环磷酰胺的培养基2 mL,助卵汤含药血清组加入含有20%助卵汤含药血清及5 μmol·L⁻¹环磷酰胺的培养基2 mL,自噬抑制剂组加入含有20%空白血清、5 μmol·L⁻¹环磷酰胺及20 μmol·L⁻¹磷酸氯喹的培养基2 mL,自噬抑制剂+含药血清组加入含有20%助卵汤含药血清、5 μmol·L⁻¹环磷酰胺及20 μmol·L⁻¹磷酸氯喹的培养基2 mL,补佳乐组加入含有20%补佳乐含药血清及5 μmol·L⁻¹环磷酰胺的培养基(以上培养基均含有1%的青霉素-链霉素混

合液)2 mL,置于37℃、5% CO₂,培养48 h,收集细胞上清,用不含EDTA胰酶消化2 min,加DMEM培养基2 mL进行终止,轻轻吹下,收集至离心管,置于离心机1 500 r·min⁻¹,4℃离心5 min,PBS洗涤2次,去掉细胞上清,用Binding Buffer 1 mL重悬,加入AnnexinV/FITC 5 μL和PI染色液5 μL,室温染色10 min,置于流式细胞仪,检测细胞凋亡情况。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路与自噬相关蛋白表达

同2.5项采用相应干预条件处理各组细胞,置于37℃、5% CO₂,培养48 h,去掉细胞上清,用PBS清洗2次,每孔加入RIPA裂解液(含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)150 μL,混合均匀后,将细胞刮下,收集至1.5 mL离心管,置于冰上裂解30 min,间隔10 min震荡1次,置于离心机12 000 r·min⁻¹,4℃离心10 min,吸取上清,用BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品30 μg,加入4×Loading Buffer,沸水浴10 min,10 000 r·min⁻¹离心10 min,根据蛋白分子量制备10%或15%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶进行电泳分离蛋白样品。将SDS-PAGE胶上的蛋白通过电转移到PVDF膜上,电转结束后,将PVDF浸泡在含5%脱脂奶粉的封闭液中,室温孵育1 h,加入相应的一抗PI3K(1:500)、p-Akt(1:2 000)、Akt(1:5 000)、p-mTOR(1:2 000)、mTOR(1:5 000)、Beclin1(1:1 000)、ATG5(1:1 000)和LC3(1:500),4℃过夜后,TBST洗膜3次,每次10 min,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液(兔二抗1:10 000,鼠二抗1:10 000),室温孵育1 h,TBST洗膜3次,每次10 min,将PVDF膜与新鲜配制的增强型化学发光剂(ECL)溶液反应2 min,快速于暗室中曝光显影,采用Image J软件进行灰度分析。

2.9 单丹磺酰尸胺染色法(MDC)检测细胞自噬程度 同2.5项采用相应干预条件处理各组细胞,参照细胞自噬染色检测试剂盒说明书进行MDC染色,荧光显微镜下观察计数并拍照。

2.10 统计学分析 所有数据通过Graphad Prism 5软件进行作图分析,统计方法为多组单因素方差分析法(One-way ANOVA),P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CCK-8 法确定环磷酰胺诱导 KGN 细胞模型的最佳剂量 与空白组比较,2.5 μmol·L⁻¹环磷酰胺组细胞增殖下降,但差异无统计意义,5 μmol·L⁻¹环磷

酰胺组细胞增殖明显下降($P<0.05$), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺组细胞增殖显著下降($P<0.01$), $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 环磷酰胺组细胞增殖显著下降($P<0.01$)。见表1。故选择 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 KGN 细胞 48 h 作为 KGN 的 POI 细胞模型。

表1 不同剂量环磷酰胺对 KGN 细胞增殖率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Effect of different doses of cyclophosphamide on proliferation rate of KGN cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖率/%
环磷酰胺组	0	100.00±8.89
	2.5	94.50±12.71
	5	75.71±7.66 ¹⁾
	10	66.58±7.78 ²⁾
	20	49.71±7.19 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

3.2 CCK-8 确定助卵汤含药血清逆转环磷酰胺损伤 KGN 细胞模型的最优浓度 与空白组比较,模型组细胞增殖率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,10%助卵汤含药血清组细胞增殖增加,但差异无统计学意义,20%和30%助卵汤含药血清细胞增殖率均增加,差异有统计学意义($P<0.05$),40%和50%助卵汤含药血清细胞增殖增加,但差异无统计意义。见表2。综合考虑,选择20%含药血清作为治疗药物条件。

表2 不同浓度助卵汤含药血清对 KGN 细胞模型增殖率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of drug-containing serum on KGN cell model ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	增殖率/%
空白组		100.00±6.64
模型组		48.92±16.63 ²⁾
助卵汤含药血清组	10	56.84±11.70
	20	82.18±10.69 ³⁾
	30	81.52±6.30 ³⁾
	40	72.24±14.86
	50	64.60±10.80

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表6同)

3.3 助卵汤对 KGN 细胞凋亡情况的影响 与空白组比较,模型组凋亡率显著性增加($P<0.01$);与模型组比较,助卵汤含药血清组细胞凋亡率明显减少($P<0.05$),自噬抑制剂组细胞凋亡率明显减少($P<0.05$),自噬抑制剂+助卵汤含药血清组细胞凋亡率

显著减少($P<0.01$),补佳乐组细胞凋亡率明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$),自噬抑制剂+助卵汤含药血清组抑制细胞凋亡率最佳,但各治疗组间差异无统计学意义。见表3及增强出版附加材料。

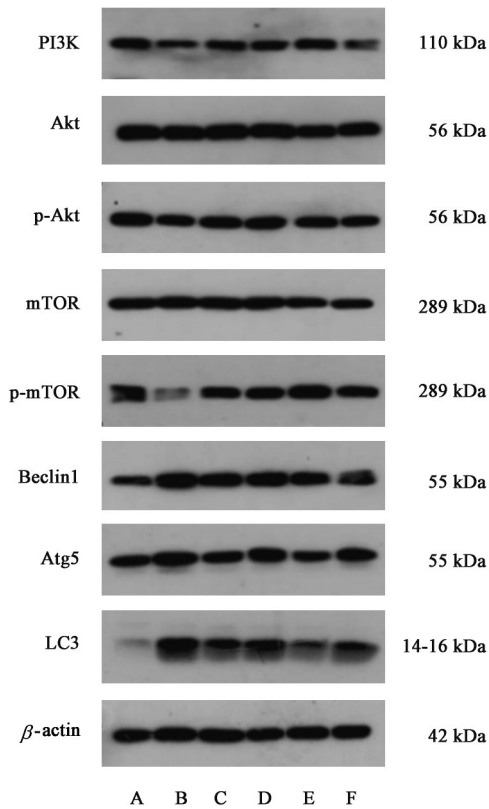
表3 助卵汤对 KGN 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of Zhuluan decoction on apoptosis rate of KGN cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
空白组		2.94±2.60
模型组		26.11±2.52 ²⁾
助卵汤含药血清组	20	17.36±4.04 ³⁾
自噬抑制剂组	20 ⁵⁾	17.44±3.84 ³⁾
自噬抑制剂+助卵汤含药血清组	20 ⁵⁾ +20	11.55±3.08 ⁴⁾
补佳乐组	20	15.38±4.99 ³⁾

注:⁵⁾浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表4-表6同)

3.4 助卵汤对 KGN 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白及自噬蛋白表达情况的影响 与空白组比较,模型组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达显著下降($P<0.01$),Beclin1 和 LC3 蛋白表达显著升高($P<0.01$),ATG5 蛋白表达显著升高($P<0.01$),Akt 和 mTOR 蛋白表达无明显变化。与模型组比较,含药血清组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达明显升高($P<0.05$),Beclin1、ATG5 和 LC3 蛋白表达明显下降($P<0.05$),Akt 和 mTOR 蛋白表达变化差异无统计学意义。自噬抑制剂组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达明显升高($P<0.05$),Beclin1 和 ATG5 蛋白表达下降($P<0.05$),Akt、mTOR 和 LC3 蛋白表达变化差异无统计学意义。自噬抑制剂+助卵汤含药血清组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达显著升高($P<0.01$),Beclin1 和 ATG5 蛋白表达显著下降($P<0.01$),LC3 蛋白量下降,但差异无统计学意义,Akt 和 mTOR 蛋白表达变化差异无统计学意义,补佳乐组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达明显升高($P<0.05$),Beclin1 和 LC3 蛋白表达显著下降($P<0.01$),ATG5 蛋白表达显著下降($P<0.01$),Akt 和 mTOR 蛋白表达变化差异无统计学意义。见图1、表4、表5。

3.5 助卵汤对 KGN 细胞自噬程度的影响 与空白组比较,模型组 MDC 荧光强度显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,助卵汤含药血清组 MDC 荧光强度明显下降($P<0.05$),自噬抑制剂组 MDC 荧光强度明显下降($P<0.05$),自噬抑制剂+助卵汤含药血清组 MDC 荧光强度显著下降($P<0.01$),补佳乐组 MDC 荧光强度明显下降($P<0.05$),自噬抑制剂+助



注:A.空白组;B.模型组;C.助卵汤含药血清组;D.自噬抑制剂;
E.自噬抑制剂+助卵汤含药血清组;F.补佳乐组(图2同)

图1 各组PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白及自噬蛋白表达电泳
Fig. 1 Expression electrophoresis of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway proteins and autophagy proteins in each group

卵汤含药血清组荧光强度最弱,但各治疗组间差异

表4 助卵汤对KGN细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Zhuluan decoction on protein expression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in KGN cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	PI3K/ β -actin	p-Akt/ β -actin	Akt/ β -actin	p-mTOR/ β -actin	mTOR/ β -actin
空白组		1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.16
模型组		0.43 \pm 0.06 ²⁾	0.45 \pm 0.12 ²⁾	0.98 \pm 0.10	0.47 \pm 0.07 ²⁾	0.91 \pm 0.13
助卵汤含药血清组	20	0.76 \pm 0.11 ³⁾	0.81 \pm 0.06 ³⁾	0.96 \pm 0.19	0.77 \pm 0.10 ³⁾	0.90 \pm 0.15
自噬抑制剂	20 ⁵⁾	0.73 \pm 0.07 ³⁾	0.81 \pm 0.06 ³⁾	1.05 \pm 0.13	0.73 \pm 0.08 ³⁾	0.87 \pm 0.16
自噬抑制剂+助卵汤含药血清组	20 ⁵⁾ +20	0.87 \pm 0.14 ⁴⁾	0.91 \pm 0.06 ⁴⁾	0.96 \pm 0.24	0.88 \pm 0.15 ⁴⁾	0.84 \pm 0.18
补佳乐组	20	0.73 \pm 0.15 ³⁾	0.99 \pm 0.18 ³⁾	1.12 \pm 0.20	0.73 \pm 0.05 ³⁾	0.94 \pm 0.30

表5 助卵汤对KGN细胞自噬相关蛋白水平表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Zhuluan decoction on expression of autophagy-related proteins in KGN cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Beclin1/ β -actin	ATG5/ β -actin	LC3/ β -actin
空白组		1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.25
模型组		2.49 \pm 0.36 ²⁾	1.85 \pm 0.19 ²⁾	3.44 \pm 0.31 ²⁾
助卵汤含药血清组	20	1.83 \pm 0.24 ³⁾	1.34 \pm 0.16 ³⁾	2.04 \pm 0.18 ³⁾
自噬抑制剂	20 ⁵⁾	1.87 \pm 0.16 ³⁾	1.30 \pm 0.20 ³⁾	2.50 \pm 0.56
自噬抑制剂+助卵汤含药血清组	20 ⁵⁾ +20	1.46 \pm 0.31 ⁴⁾	1.09 \pm 0.18 ⁴⁾	2.44 \pm 0.83
补佳乐组	20	1.69 \pm 0.17 ⁴⁾	0.62 \pm 0.26 ⁴⁾	1.58 \pm 0.86 ⁴⁾

无统计学意义。见图2、表6。

4 讨论

自噬作为细胞维持稳态的核心机制,在成熟哺乳动物卵巢中具有双重调控作用^[13]。一方面,正常的线粒体自噬可以清除老化线粒体,维持颗粒细胞和卵母细胞的能量供应,确保卵泡正常发育^[14];其次,正常的线粒体自噬通过清除异常蛋白质和细胞器,减少DNA损伤积累,维持卵母细胞质量和促进卵母细胞成熟^[15]。另一方面,线粒体自噬过度激活,细胞自噬凋亡影响卵母细胞的质量和数量,最终影响女性生殖健康^[15]。动物实验研究发现,POI模型大鼠卵巢颗粒细胞中LC3 II/LC3 I转化率升高,自噬底物p62表达下降,提示自噬过度激活,而抑制卵巢颗粒细胞过度自噬,可以降低血清中促卵泡生成素(FSH)和促黄体生成素(LH)水平,增加雌二醇(E₂)和抗苗勒氏管激素(AMH)水平,减少卵泡闭锁,改善卵巢储备功能^[16]。

中医无POI病名,根据临床表现可将其归属为“月经过少”“闭经”“不孕”“经水早断”等范畴,肾虚是POI的根本病因,并涉及心肝脾肺等多个脏腑失调,卵巢及卵泡由肾所主宰,故以补肾大法。尤昭玲教授经过长期临证认为论治POI可从脾、肾着手,通过滋养后天脾胃充养先天,温煦胞络,激活冰山之下沉寂的始基卵泡,达到恢复卵巢功能的目的^[17]。助卵汤是尤昭玲教授依据其“冰山论”理论

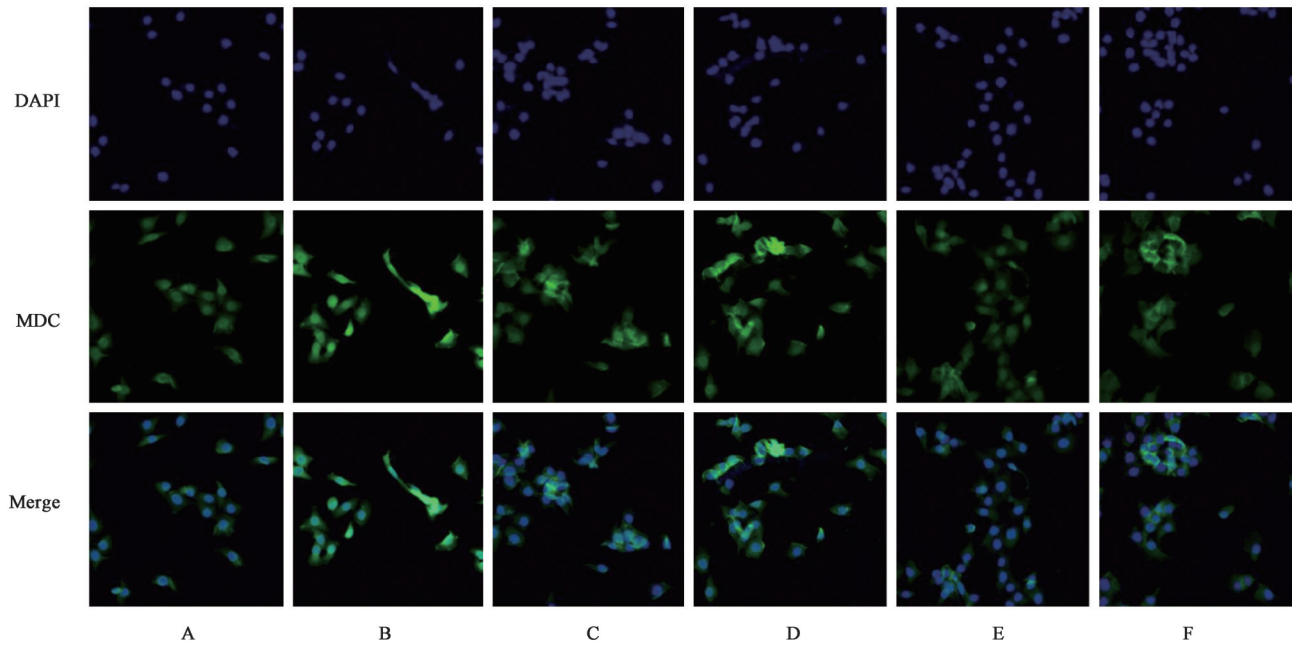


图2 助卵汤对KGN细胞MDC染色荧光强度的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 2 Effect of Zhuluan decoction on fluorescence intensity of MDC staining in KGN cells (IF, ×200)

表6 助卵汤对KGN细胞自噬荧光强度的量化分析的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of Zhuluan decoction on quantitative analysis of autophagy fluorescence intensity detected by MDC method in KGN cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	体积分数/%	自噬平均荧光密度
空白组		1.00±0.14
模型组		1.70±0.09 ²⁾
助卵汤含药血清组	20	1.13±0.14 ³⁾
自噬抑制剂	20 ⁵⁾	1.08±0.19 ³⁾
自噬抑制剂+助卵汤含药血清组	20 ⁵⁾ +20	0.78±0.07 ⁴⁾
补佳乐组	20	0.97±0.03 ³⁾

所创立的“健脾补肾,暖巢养泡”经验方,方中菟丝子补益肝肾、固精安胎,黄芪补气升阳健脾、生津养血,二药合用,共建脾肾二脏,共为君药;枸杞子滋养肝肾阴血,党参、白术、山药健脾益肺补肾、补气养血,石斛、玉竹益气养阴,共为臣药;君臣合用,共行补脾滋肾之效,葛根升举阳气,与莲子共同交通心肾阴阳,固涩肾精,覆盆子收敛固涩肾中阳气,三七花清肝肾之虚实诸热,橘叶行胸膈之气,使补而不滞,共为佐药;甘草调和诸药之性。全方共奏健脾补肾,暖巢养泡之效^[18-19]。临床研究表明,助卵汤可显著降低POI患者血清FSH水平,升高AMH水平,并增加卵巢窦卵泡数^[20]。课题组前期研究发现,助卵汤可上调POI模型大鼠卵巢组织中PI3K、Akt及mTOR蛋白表达,同时降低LC3B蛋白水平,

抑制卵巢颗粒细胞过度自噬发生,从而逆转环磷酸胺造模对大鼠卵巢储备功能的影响。然而,目前助卵汤抑制卵巢颗粒细胞过度自噬的研究只开展于整体动物层面,缺乏细胞模型及分子互作验证,且助卵汤多组分协同调控的机制尚不清楚。本研究采用KGN细胞进行体外验证,旨在揭示助卵汤多靶点、多层次调控卵巢颗粒细胞自噬的分子网络,为中医药治疗POI提供现代科学依据。

KGN细胞系是KGN肿瘤来源的永生化细胞,作为卵巢的重要组成部分,保留正常卵巢颗粒细胞的生物学特性(如FSH受体表达、雌激素合成能力及自噬调控机制),能直接影响卵巢的生殖与内分泌功能,其增殖与凋亡与卵泡的发育息息相关^[21-22],是研究POI病理机制及药物干预的理想工具^[23-25]。已有研究发现环磷酸胺对KGN细胞有促凋亡作用,从而可利用环磷酸胺构建KGN细胞的POI模型^[26],但其作用浓度有待进一步探索。本研究结果显示,5 μmol·L⁻¹环磷酸胺能明显抑制KGN细胞增殖,损害卵巢颗粒细胞功能,且环磷酸胺对KGN细胞增殖的抑制能力与环磷酸胺浓度正相关,5 μmol·L⁻¹处理KGN细胞48 h可以建立人卵巢颗粒KGN细胞POI模型。磷酸氯喹作为溶酶体抑制剂,通过抑制溶酶体对自噬小体的降解,来抑制自噬的发生^[27]。有研究表明,氯喹类药物的靶点是一种名为PPT1的酶,PPT1能调控mTOR从而影响自噬^[28-29]。mTORC1是自噬的关键调控因子,当营养充足时,

mTORC1被激活,抑制自噬;当营养缺乏或能量不足时,mTORC1被抑制,自噬被激活^[30-31]。PI3K/Akt/mTOR信号通路是细胞内重要的信号传导通路,参与细胞生长、增殖、存活和代谢等过程^[32]。研究表明PI3K/Akt/mTOR信号通路参与颗粒细胞和卵母细胞自噬的发生,PI3K通过激活Akt进而激活mTOR,抑制颗粒细胞自噬的发生^[33]。在本研究发现,环磷酸胺诱导的KGN细胞POI模型中PI3K、p-Akt、p-mTOR的表达被抑制,而助卵汤含药血清和自噬抑制剂磷酸氯喹能逆转这一改变,且二者具有协同作用,并且减少了环磷酸胺对KGN细胞的损伤,降低KGN细胞的凋亡率。Beclin1通过与Ⅲ类PI3K(Vps34)形成复合体,调控自噬前体膜的成核,是自噬起始的标志性正性调节因子^[34-35],ATG5是自噬体形成与膜扩展的关键执行者,其脂化修饰是自噬体成熟的关键步骤^[36],LC3通过从LC3 I转化为LC3 II定位于自噬体膜,其分布及水平变化是监测自噬活性的关键指标^[37],本研究中模型组中Beclin1、ATG5及LC3呈现出高表达现象,说明在KGN细胞POI模型中自噬被过度激活,助卵汤含药血清和自噬抑制剂磷酸氯喹可以降低Beclin1、ATG5及LC3的表达,抑制KGN细胞的过度自噬,发挥卵巢颗粒细胞功能的保护作用。其次,MDC染色检测也直观地反映了助卵汤含药血清可以改善环磷酸胺诱导的KGN细胞POI模型过度自噬发生。

综上所述,本实验验证了助卵汤通过降低KGN细胞的凋亡率,激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,降低自噬相关蛋白Beclin1、ATG5及LC3的表达,抑制环磷酸胺诱导的KGN细胞POI模型的过度自噬,逆转化疗性药物对卵巢颗粒细胞的损伤,达到改善卵巢储备功能的作用,并从分子角度进一步证明在临床有效方剂助卵汤治疗POI的可能机制与潜在靶点。

正常情况下自噬和凋亡是相互抑制的关系,细胞自噬通过吞噬“老弱病残”的细胞或细胞器,为正常细胞提供更好的生存环境,从而起到保护细胞的作用;凋亡是细胞程序性死亡的方式之一,是存在于细胞中的自我毁灭机制,凋亡的发生会导致所有的细胞组成成分都会被其他活细胞降解和消化;两者互相作用,共同调控细胞死亡,维持生命活动的有序进行^[38]。然而有诸多研究证实,自噬对细胞死亡的调节具有双重性,温和的自噬在一定程度上发挥上述细胞保护作用,而过度自噬发生将诱导细胞程序性死亡,促进细胞凋亡的发生^[39-40]。环磷酸胺

通过抑制PI3K/Akt信号通路的激活,刺激小鼠过度自噬的发生,从而促进卵巢细胞的凋亡,导致卵巢功能受损^[41]。符山花等^[42]研究发现ABT-737能够通过诱导卵巢癌细胞持续自噬的发生,促进卵巢癌细胞的自噬性凋亡,从而发挥抗癌作用。张玲等^[43]研究发现氯化镉可能激活过度自噬的发生,使自噬体异常聚集,从而诱导小鼠初级精母细胞发生凋亡,影响小鼠的生殖功能。本研究中流式细胞术检测结果提示环磷酸胺造模后细胞凋亡率明显增加,Western blot提示模型组自噬相关蛋白表达明显升高,MDC染色也提示模型组自噬荧光表达明显,考虑环磷酸胺可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路促使卵巢颗粒细胞过度自噬的发生,进而诱导KGN细胞自噬性凋亡,助卵汤可逆转这一损伤,且联用自噬抑制剂发挥了更大的协同作用。故推测,自噬抑制剂与助卵汤的联用可能并非简单的“抑制-促进”关系,可能是通过多层次调控自噬-凋亡网络实现的动态平衡。未来研究应聚焦于自噬-凋亡交叉节点的精准调控,为个体化治疗提供理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] NASH Z, DAVIES M. Premature ovarian insufficiency [J]. *BMJ*, 2024, 384: e077469.
- [2] PANAY N, ANDERSON R A, BENNIE A, et al. Evidence-based guideline: Premature ovarian insufficiency [J]. *Fertil Steril*, 2025, 123(2): 221-236.
- [3] LI M, ZHU Y, WEI J, et al. The global prevalence of premature ovarian insufficiency: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Climacteric*, 2023, 26(2): 95-102.
- [4] GUO T, LIU H, XU B, et al. Epidemiology, genetic etiology and intervention of premature ovarian insufficiency [J]. *Endocr Rev*, 2025, 46(5): 621-651.
- [5] DHANUSHI FERNANDO W, VINCENT A, MAGRAITH K. Premature ovarian insufficiency and infertility [J]. *Aust J Gen Pract*, 2023, 52(1/2): 32-38.
- [6] LAMBRINOUDAKI I, PASCHOU S A. Hormone therapy for menopause and premature ovarian insufficiency [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, 35(6): 101597.
- [7] ARMENI E, PASCHOU S A, GOULIS D G, et al. Hormone therapy regimens for managing the menopause and premature ovarian insufficiency [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, 35(6): 101561.
- [8] 周绵莉, 喻小兰, 施后渊, 等. 二仙汤治疗早发性卵巢功能不全小鼠的机制研究 [J]. *世界中医药*, 2025, 20(15): 2671-2676, 2685.
ZHOU M L, YU Xi L, SHI H Y, et al. Mechanism of Erxian decoction in the treatment of primary ovarian insufficiency in

- mice[J]. *World Chin Med*, 2025, 20(15):2671-2676, 2685.
- [9] WANG Y, KONG S, QIAN Y, et al. Zigui-Changqi decoction against premature ovarian insufficiency by moderating autophagy via EGFR/ERBB2/IL6/Akt1 signals [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2025, 90(6):611-622.
- [10] ZHOU M, NIU H, CHEN R, et al. Gui ShenWan prevent premature ovarian insufficiency by modulating autophagy and angiogenesis via facilitating VDR [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326:117955.
- [11] OMOLEKAN T O, CHAMCHEU J C, BUERGER C, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling network in human health and diseases[J]. *Cells*, 2024, 13(17):1500.
- [12] 唐丽, 牟珍妮, 申思楠, 等. 基于PI3K/Akt/mTOR通路探讨助卵汤对大鼠早发性卵巢功能不全的保护作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(4):52-59.
- TANG L, MU Z N, SHEN S N, et al. Protective mechanism of Zhuluan decoction in rats with premature ovarian insufficiency based on PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(4):52-59.
- [13] LEOPARDO N P, VELAZQUEZ M E, CORTASA S, et al. A dual death/survival role of autophagy in the adult ovary of *Lagostomus maximus* (Mammalia- Rodentia)[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5):e0232819.
- [14] ESMAEILIAN Y, HELA F, BILDIK G, et al. Discovery of autophagy as a universal mechanism for sex steroid synthesis in human ovary and testis[J]. *Autophagy Rep*, 2023, 2(1):2251804.
- [15] BHARDWAJ J K, PALIWAL A, SARAF P, et al. Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(2):1157-1170.
- [16] LI T, WEI Y, JIAO B, et al. Bushen Huoxue formula attenuates lipid accumulation evoking excessive autophagy in premature ovarian insufficiency rats and palmitic acid-challenged KGN cells by modulating lipid metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1425844.
- [17] 伍琴, 张韞玉, 刘慧萍, 等. 尤昭玲教授治疗早发性卵巢功能不全经验[J]. *陕西中医*, 2021, 42(7):941-943.
- WU Q, ZANG Y Y, LIU H P, et al. Professor YOU Zhaoling's experience of treating premature ovarian insufficiency [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2021, 42(7):941-943.
- [18] 邢敏, 刘慧萍, 李荣慧, 等. 运用“三部八法”治疗卵泡发育异常经验[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(7):3133-3136.
- XING M, LIU H P, LI R H, et al. Experience in treating follicular dysplasia with 'three parts and eight methods'[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(7):3133-3136.
- [19] 邱乐乐, 谈珍珠. 尤昭玲治疗卵泡排出障碍所致不孕症经验[J]. *河南中医*, 2020, 40(11):1670-1673.
- QIU L L, TAN Z Y. YOU Zhaoling's experience of treating infertility caused by follicular discharge disorders[J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2020, 40(11):1670-1673.
- [20] 黄旗书画. 助卵汤治疗早发性卵巢功能不全闭经脾肾两虚证临床观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- HUANG Q S H. Clinical observation of egg decoction in the treatment of early-onset ovarian insufficiency amenorrhea and spleen and kidney deficiency [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2023.
- [21] CHOI J, JO M, LEE E, et al. Akt is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia [J]. *Reproduction*, 2014, 147(1):73-80.
- [22] LIU F, LI M. BNIP3-mediated autophagy via the mTOR/ULK1 pathway induces primordial follicle loss after ovarian tissue transplantation[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2023, 40(3):491-508.
- [23] 杜悠雯, 石海涛, 韩帅龙, 等. MSI2对DHT诱导的KGN细胞增殖凋亡失衡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(3):464-470.
- DU Y W, SHI H T, HAN L S, et al. Effect of MSI2 on proliferation and apoptosis imbalance of KGN cells induced by DHT[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(3):464-470.
- [24] 刘姣, 杨阳, 何悦双, 等. 基于SIRT1/FoxO1通路探究小檗碱抑制卵巢颗粒细胞凋亡与自噬的调节机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(6):79-87.
- LIU J, YANG Y, HE Y S, et al. Regulatory mechanism of berberine in inhibiting apoptosis and autophagy in ovarian granulosa cells based on SIRT1/FoxO1 pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(6):79-87.
- [25] ZHOU Q, JIN X, WANG J, et al. 4-vinylcyclohexene diepoxide induces premature ovarian insufficiency in rats by triggering the autophagy of granule cells through regulating miR-144[J]. *J Reprod Immunol*, 2023, 157:103928.
- [26] 陈春林. 麒麟丸对卵巢功能减退模型小鼠的药效作用及其主要成分淫羊藿苷的作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- CHEN C L. Study on the effect of Qilin pill on ovarian dysfunction mice and the mechanism of its main component icariin in ovarian dysfunction [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2020.
- [27] 王路遥, 李宁, 宋瑞瑞, 等. PI3KC3/Beclin1复合物对染矽尘NR8383细胞自噬的调控作用[J]. *环境与职业医学*, 2018, 35(9):801-808.
- WANG L Y, LI N, SONG R R, et al. Regulation of PI3KC3/Beclin1 complex on autophagy of NR8383 macrophages exposed to silica dust [J]. *J Environ Occup Med*, 2018, 35(9):801-808.
- [28] 李云龙. 基于剪接与自噬抑制协同增强光动力疗法的抗肿瘤免疫治疗策略研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2025.
- LI Y L. Research on splicing and autophagyinhibition synergistically enhance photodynamic therapy for antitumor immunotherapy [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2025.
- [29] 刘学娟, 潘闻燕, 黄琦, 等. 二磷酸氯喹和雷帕霉素对HEP-2细胞增殖和凋亡的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2015, 37

- (11):1289-1292.
- LIU X J, PAN W Y, HUANG Q, et al. Effects of chloroquine disphosphate and rapamycin on proliferation and apoptosis of HEP-2 cells [J]. *J Ningxia Med Univ*, 2015, 37(11): 1289-1292.
- [30] PAN Z, ZHANG H, DOKUDOVSKAYA S. The role of mTORC1 pathway and autophagy in resistance to platinum-based chemotherapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10651.
- [31] RABANAL-RUIZ Y, OTTEN E G, KOROLCHUK V I. mTORC1 as the main gateway to autophagy [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6):565-584.
- [32] XIA N, CHEN Q, MENG Z, et al. Isobavachin induces autophagy-mediated cytotoxicity in AML12 cells via AMPK and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2024, 100:105919.
- [33] DOU X, JIN X, CHEN X, et al. Bu-Shen-Ning-Xin decoction alleviates premature ovarian insufficiency (POI) by regulating autophagy of granule cells through activating PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2022, 38(9): 754-764.
- [34] LI X, ZHU Y, LIN X, et al. Beclin1- and Atg13-dependent autophagy activation and morroniside have synergistic effect on osteoblastogenesis [J]. *Exp Biol Med*, 2022, 247(19): 1764-1775.
- [35] PRERNA K, DUBEY V K. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 204:258-273.
- [36] CAMPISI D, HAWKINS N, BONJOUR K, et al. The role of WIPI2, ATG16L1 and ATG12-ATG5 in selective and Nonselective autophagy [J]. *J Mol Biol*, 2025, 437(18): 169138.
- [37] SUN L, LV S, SONG T. Monitoring autophagy with GFP-LC3 reporter [J]. *Methods Mol Biol*, 2025, 2879:51-61.
- [38] SORICE M. Crosstalk of autophagy and apoptosis [J]. *Cells*, 2022, 11(9):1479.
- [39] HOUSTON J P. Apoptosis and autophagy [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(6):655-656.
- [40] THORBURN A. Crosstalk between autophagy and apoptosis: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2020, 172:55-65.
- [41] 陶叶杏. 乌贼墨多糖 SIP-1 干预环磷酰胺介导小鼠卵巢细胞凋亡与自噬的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.
- TAO Y X. The interventional effects of SIP-1 on cyclophosphamide-associated ovarian cell apoptosis and autophagy in mice abstract [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015.
- [42] 符山花, 包利利, 赵达, 等. ABT-737 对 M2 型 TAM 来源外泌体处理的卵巢癌细胞 SKOV3 自噬性凋亡与干性特征的影响 [J]. *西部医学*, 2023, 35(5):654-661.
- FU S H, BAO L L, ZHAO D, et al. Effects of ABT-737 on autophagic apoptosis and stemness characteristics of SKOV3 ovarian cancer cells treated with M2 tumor-associated macrophage-derived exosomes [J]. *Med J West China*, 2023, 35(5):654-661.
- [43] 张玲, 王一翔, 易玲娜, 等. 自噬在氯化镉诱导小鼠初级精母细胞凋亡中的作用 [J]. *卫生研究*, 2023, 52(3):489-496.
- ZHANG L, WANG Y X, YI L N, et al. Effect of autophagy in cadmium chloride induced apoptosis of mouse spermatogenic cells [J]. *J Hyg Res*, 2023, 52(3):489-496.

[责任编辑 周冰冰]