

# 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

刘姣, 杨阳, 何悦双, 尤凤鸣, 石丹宁, 赵丕文\*  
(北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488)

**[摘要]** 目的:通过观察小檗碱(BBR)对卵巢颗粒细胞衰老的影响,探究其保护作用及调节机制。方法:应用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导建立人卵巢颗粒样肿瘤(KGN)细胞衰老模型;设置空白组、模型组、BBR高剂量(1 μmol·L<sup>-1</sup>)组和BBR低剂量(0.5 μmol·L<sup>-1</sup>)组,模型组与BBR组加入浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,孵育40 min。通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)分析检测BBR对KGN细胞增殖的影响;通过β-半乳糖苷酶染色检测BBR对KGN细胞衰老状态的影响;应用流式细胞术检测BBR对KGN细胞凋亡和ROS含量的影响;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测BBR对KGN细胞抗凋亡蛋白Bcl-2/Bax/促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)比值、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、叉头框转录因子O1(FoxO1)及过氧化氢酶(CAT)mRNA表达的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测BBR对KGN细胞沉默信息调节因子1(SIRT1)、超氧化物歧化酶2(SOD2)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、FoxO1、自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链3 II(LC3B II)、自噬关键分子酵母Atg6(Beclin-1)及泛素结合蛋白p62蛋白表达的影响。结果:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导40 min后,与空白组比较,模型组细胞增殖率显著下降(P<0.01);与模型组比较,BBR干预组细胞增殖率明显上升(P<0.05);β-半乳糖苷酶染色结果显示,与空白组比较,模型组细胞呈现明显的衰老状态(P<0.01),BBR干预组细胞衰老情况较模型组显著降低(P<0.01);流式细胞术检测显示,与空白组比较,模型组细胞凋亡率显著上升(P<0.01),BBR干预组细胞凋亡率较模型组明显降低(P<0.05);同时,与空白组比较,模型组ROS含量显著增加(P<0.01);与模型组比较,BBR干预组细胞ROS含量显著降低(P<0.01);Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组KGN细胞CAT、Bcl-2/Bax mRNA表达明显降低,Caspase-3与FoxO1 mRNA表达明显增加(P<0.05);与模型组比较,BBR干预后KGN细胞CAT与Bcl-2/Bax mRNA表达明显增加(P<0.05),Caspase-3与FoxO1 mRNA表达较模型组明显降低(P<0.05)。Western blot结果显示,与空白组比较,模型组SIRT1、SOD2及p62蛋白水平显著降低(P<0.01),JNK、FoxO1、LC3B II与Beclin-1蛋白水平明显升高(P<0.05);BBR干预后,SIRT1、SOD2及p62蛋白水平较模型组显著增加(P<0.01),JNK、FoxO1、LC3B II与Beclin-1蛋白水平较模型组明显降低(P<0.05)。结论:BBR具有抑制卵巢颗粒细胞衰老效应,其机制与通过SIRT1/FoxO1通路介导抑制细胞凋亡与自噬有关。

**[关键词]** 小檗碱; 卵巢颗粒细胞; 氧化损伤; 凋亡; 自噬; 细胞沉默信息调节因子1(SIRT1)/叉头框转录因子O1(FoxO1)信号通路

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0079-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230104

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221129.1327.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-11-29 17:22:45

## Regulatory Mechanism of Berberine in Inhibiting Apoptosis and Autophagy in Ovarian Granulosa Cells Based on SIRT1/FoxO1 Pathway

LIU Jiao, YANG Yang, HE Yueshuang, YOU Fengming, SHI Danning, ZHAO Piwen\*  
(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect and regulatory mechanism of berberine

**[收稿日期]** 2022-08-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673764);北京中医药大学科研创新团队项目(2019-JYB-TD-006)

**[第一作者]** 刘姣,在读硕士,从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究,E-mail:20200931185@bucm.edu.cn

**[通信作者]** \*赵丕文,教授,博士生导师,从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究,E-mail:pwzhao@263.net

(BBR) against the senescence of ovarian granulosa cells. **Method:** A cell senescence model in the human ovarian granulosa-like tumor (KGN) cell line was induced by  $H_2O_2$ . A control group, a model group, and high-dose ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and low-dose ( $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) BBR groups were set up. The cells in the model group and the BBR groups were incubated with  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$  for 40 min. The effect of BBR on KGN cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The effect of BBR on the senescence of KGN cells was detected by  $\beta$ -galactosidase staining. The effects of BBR on the apoptosis and ROS content of KGN cells were detected by flow cytometry. The effects of BBR on the mRNA expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)/Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), forkhead transcription factor O1 (FoxO1), and catalase (CAT) was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Western blot was used to detect the effects of BBR on protein expression of silent information regulator1 (SIRT1), superoxide dismutase 2 (SOD2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), FoxO1, autophagy-associated protein microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3B II), mammalian ortholog of yeast Atg6 (Beclin-1), and ubiquitin-binding protein p62. **Result:** After  $H_2O_2$  induction for 40 min, the cell proliferation rate of the model group decreased compared with that of the control group ( $P<0.01$ ), and the cell proliferation rates of the BBR groups increased compared with that of the model group ( $P<0.05$ ). The results of  $\beta$ -galactosidase staining showed that the cells of the model group showed significant senescence compared with those of the control group ( $P<0.01$ ), and the cellular senescence in the BBR groups was reduced compared with that of the model group ( $P<0.01$ ). As revealed by flow cytometry, compared with the control group, the model group showed increased apoptosis rate ( $P<0.01$ ), and compared with the model group, BBR groups showed decreased apoptosis rates ( $P<0.05$ ). Meanwhile, the ROS content in the model group increased compared with that in the control group ( $P<0.01$ ), and compared with the model group, the BBR groups showed reduced cellular ROS content ( $P<0.01$ ). The Real-time PCR results showed that compared with the control group, the model group showed decreased mRNA expression of CAT and Bcl-2/Bax in KGN cells and increased mRNA expression of Caspase-3 and FoxO1 ( $P<0.05$ ), and compared with the model group, the BBR groups showed increased mRNA expression of CAT and Bcl-2/Bax ( $P<0.05$ ) and reduced mRNA expression of Caspase-3 and FoxO1 in KGN cells ( $P<0.05$ ). As revealed by Western blot results, SIRT1, SOD2, and p62 protein levels decreased in the model group compared with those in the control group ( $P<0.01$ ), and JNK FoxO1, LC3B II, and Beclin-1 protein levels increased ( $P<0.05$ ). After BBR intervention, SIRT1, SOD2, and p62 protein levels increased ( $P<0.01$ ), and JNK, FoxO1, LC3B II, and Beclin-1 protein levels decreased compared with those in the model group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** BBR has an inhibitory effect on ovarian granulosa cell senescence, and the mechanism is related to the inhibition of apoptosis and autophagy mediated by the SIRT1/FoxO1 pathway.

**[Keywords]** berberine; ovarian granulosa cells; oxidative damage; apoptosis; autophagy; silent information regulator1 (SIRT1)/forkhead transcription factor O1 (FoxO1) signaling pathway

卵巢早衰(POF)是一种伴有月经稀发,停经,潮热,盗汗,闭经,骨质疏松甚至不孕不育等一系列围绝经期症状的疾病,发病率呈年轻化趋势,严重威胁着女性的身心健康<sup>[1]</sup>。POF主要发病原因为卵巢颗粒细胞(GCs)的凋亡。GCs在促卵泡激素刺激下,合成并分泌雌激素,GCs的增殖分化是卵母细胞成熟及排卵的关键,直接影响卵巢功能<sup>[2]</sup>。GCs凋亡会诱导卵泡闭锁和卵巢功能障碍,进而诱导POF<sup>[3-4]</sup>。GCs及卵母细胞衰老与凋亡的重要原因之一是机体发生氧化损伤引起活性氧(ROS)含量

增加<sup>[5]</sup>。BRAS等<sup>[6]</sup>发现氧化损伤可以调控多种程序性细胞死亡,如自噬性细胞死亡与细胞凋亡。巨自噬(下文统称自噬)是细胞内自我更新的代谢过程,吞噬受损与衰老细胞器以维持细胞功能,但过度自噬会诱导自噬性细胞死亡<sup>[7]</sup>。ROS是自噬发生的重要介质<sup>[8]</sup>。XU等<sup>[9]</sup>证明在衰老过程中自噬下调KGN细胞沉默信息调节因子1(SIRT1)表达。SIRT1是NAD<sup>+</sup>依赖性Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶家族成员之一,参与调节细胞衰老,氧化损伤与自噬等<sup>[10]</sup>。SIRT1使转录因子叉头框转录因子O1

(FoxO1)去乙酰化,介导氧化损伤、细胞凋亡和炎症反应等途径<sup>[11]</sup>。研究表明,SIRT1/FoxO1通路可以抑制氧化损伤引起的细胞凋亡与自噬<sup>[12]</sup>,改善卵巢功能<sup>[13-14]</sup>。

小檗碱(BBR)是从中药黄芩、黄连和黄柏中分离出的一种活性成分<sup>[15]</sup>;已有实验研究表明BBR具有抗氧化,抗炎,抗凋亡,提高生育能力等作用<sup>[16]</sup>。ZHANG等<sup>[17]</sup>发现,BBR可通过丝裂原蛋白活化激酶(MAPK)信号通路介导增加GCs层数治疗多囊卵巢综合征。GCs与卵巢功能状态密切相关<sup>[18]</sup>,改善GCs功能可以缓解POF,但目前关于BBR作用于GCs的靶点和相关分子机制研究较少。本研究通过探究BBR抑制卵巢颗粒细胞效应中的凋亡与自噬调节机制及其SIRT1/FoxO1通路介导途径,为小檗碱进一步研究开发提供新思路。

## 1 材料

**1.1 细胞** KGN细胞来自于广东省中医院的友情馈赠。

**1.2 药物及试剂** BBR(北京银河天虹化工有限公司,批号2086-83-1);Fetal Bovine Serum(ExCell Bio公司,批号FSP500);青链霉素混合液与DMEM/F-12(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为KGY0023、KGM12500N-500);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(大连美仑生物技术有限公司,批号MA0218);ROS检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号S0033M);SIRT1多克隆抗体、SOD2单克隆抗体、JNK单克隆抗体、FoxO1多克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、LC3B II多克隆抗体(美国Proteintech公司,批号分别为13161-1-AP、66474-1-Ig、66210-1-Ig、18592-1-AP、60004-1-Ig、18725-1-AP);p62多克隆抗体、Beclin-1多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab109012、ab207612);碘化丙啶(PI)、Hoechst33342荧光染料、BCA蛋白定量试剂盒、超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1021-10ML、B8040、PC0020、PE0010)。

**1.3 仪器** MCO-20AIC型二氧化碳培养箱(日本Sanyo公司),正倒置一体显微镜(美国Echo公司),ELx808型酶标仪(美国BioTek公司),CytoFLEX型流式细胞仪(美国贝克曼公司),超微量分光光度计(Pultton公司),QuantStudio™6 Flex型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) System(美国Thermo Fisher Scientific公司),JY300C型电泳/电转仪(北京骏易科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 CCK-8细胞活性分析检测细胞活力水平** 将KGN细胞培养于含10%胎牛血清,1%青链霉素的DMEM/F-12完全培养基中,37℃含5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。取对数生长期KGN细胞,以5×10<sup>3</sup>个/孔接种于96孔板中,分为空白组、模型组、BBR不同剂量组(5、1、0.5、0.1、0.05 μmol·L<sup>-1</sup>),每组6个复孔,培养24 h后,BBR组加入BBR分别至上述终浓度,空白组和模型组加入等体积完全培养基。24 h后,模型组和不同剂量BBR组均加入终浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,空白组加入等体积完全培养基。培养40 min后吸弃培养液,每孔加入CCK-8工作液(CCK-8 10 μL+DMEM/F-12 90 μL) 100 μL,37℃孵育2 h,测定450 nm吸光度A<sub>450</sub>,按照(处理组A<sub>450</sub>-溶剂组A<sub>450</sub>)/(空白组A<sub>450</sub>-溶剂组A<sub>450</sub>)×100%计算细胞活力。

**2.2 β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况** 以4×10<sup>4</sup>/孔的密度将KGN细胞接种于24孔板,37℃培养箱中孵育24 h。分为空白组(C)、模型组(M)、BBR高剂量组(1 μmol·L<sup>-1</sup>)和BBR低剂量组(0.5 μmol·L<sup>-1</sup>),空白组与模型组加入完全培养基,BBR组加入BBR至上述终浓度,干预24 h后吸弃上清液,模型组与BBR组加入浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,孵育40 min。按照试剂盒说明书的方法进行β-半乳糖苷酶染色:磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后加入固定液,室温固定15 min后,每孔加入染色工作液500 μL,37℃孵育过夜。镜下观察,取细胞密度大致相同的随机视野,每孔3个视野取均值,按照(视野内阳性细胞数/视野内总细胞数)×100%计算阳性细胞比例,阳性比例即为细胞衰老比例。

**2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 将KGN细胞以1×10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔板中,每组3个复孔,分组、药物干预及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用流程同1.6项。离心弃上清,加入终质量浓度为5 mg·L<sup>-1</sup>的Hoechst33342和终质量浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>的PI染液,37℃培养箱孵育20 min,离心,弃上清,PBS重悬,流式细胞仪上机检测凋亡水平。

**2.4 流式细胞术检测细胞内ROS的含量** KGN细胞接种于6孔板中,每组3个复孔,分组、药物干预及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用流程同1.6项。离心弃上清,加入终质量浓度为5 mg·L<sup>-1</sup>的Hoechst33342和终质量浓度为1 mg·L<sup>-1</sup>的活性氧荧光探针(DCFH-DA)染液,37℃培养箱孵育20 min,离心,弃上清,PBS

重悬,流式细胞仪上机检测 ROS 含量。

**2.5 Real-time PCR测定细胞凋亡及其传导通路关键因子 mRNA 表达** KGN 细胞接种于 6 孔板中,每组 3 个复孔,分组、药物干预及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用流程同 1.6 项。离心弃上清,按照试剂盒说明提取总 RNA,定量,逆转录采用 oligo (dT) 引物,条件为 42 °C 60 min,70 °C 5 min,SYBR Green 染料法检测 Bcl-2、

Bax、Caspase-3、FoxO1、CAT 的转录水平,GAPDH 作为内参,条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 15 s,60 °C 延伸 30 s,40 个循环,运行机器自带熔解曲线。使用 Real-time PCR 仪进行扩增,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,记录基因的循环阈值(C<sub>t</sub>),使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法,计算相对 mRNA 表达。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	长度/bp
Bcl-2	CCGCGACTCCTGATTCATTG	ACTTCCTCTGTGATGTTGTATTTTT	160
Bax	ACCATCTTTGTGGCGGGAG	AAAAACACAGTCCAAGGCAGC	89
Caspase-3	GATTATCCTGAGATGGGTTTATGTA	AATGTTTCCTGAGGTTTGC	116
FoxO1	AAACACCAGTTTGAATCACCC	TCGACTTATTGTCCTGAAGTGT	113
CAT	GAGCACAGCATCCAATATTCTG	CTCATTCAGCACGTTCAATAG	102
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞抗氧化及其传导通路关键蛋白水平** KGN 细胞接种于 6 孔板,分组、药物干预及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用流程同 1.6 项。加入蛋白裂解液冰上裂解细胞,提取总蛋白并进行 BCA 蛋白定量,10% 分离胶 SDS-PAGE 电泳,使用 PVDF 膜进行转移,奶粉封闭 1.5 h,分别加入稀释后的 SIRT1 (1: 1 000),SOD2 (1: 10 000),JNK (1: 3 000),FoxO1 (1: 1 000),LC3B II (1: 300),p62 (1: 10 000),Beclin-1 (1: 2 000) 和 GAPDH (1: 20 000) 抗体孵育过夜,洗膜后加入对应二抗孵育 1 h,曝光显影。采用 Image J 软件测定目的条带与内参 β-actin 灰度值并求比值。

**2.7 统计学方法** 实验结果使用统计学软件 SPSS 26.0 进行处理,使用 *t* 检验,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析(ANOVA)进行分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对衰老 KGN 细胞增殖的影响** 培养 24 h 后,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,随 BBR 浓度增高细胞增殖率均明显升高(*P* < 0.05),在 BBR 浓度为 1 μmol·L<sup>-1</sup> 时达到最高,因此选用 BBR 高剂量、低剂量终浓度分别为 1 μmol·L<sup>-1</sup> 与 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> BBR 进行下一步实验。见表 2。

**3.2 对衰老 KGN 细胞衰老状态的影响** 与空白组比较,模型组蓝染的衰老细胞显著增加(*P* < 0.01);比较于模型组,BBR 干预组蓝染的衰老细胞

表 2 BBR 对衰老 KGN 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of BBR on proliferation of senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	增值率/%
空白组		100.00±3.36
模型组		59.18±4.47 <sup>1)</sup>
BBR 组	5	67.07±4.52 <sup>1,2)</sup>
	1	72.79±2.59 <sup>1,2)</sup>
	0.5	67.76±5.29 <sup>1,2)</sup>
	0.1	60.58±8.13
	0.05	69.38±7.72

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>*P* < 0.05(表 2-表 8 同)

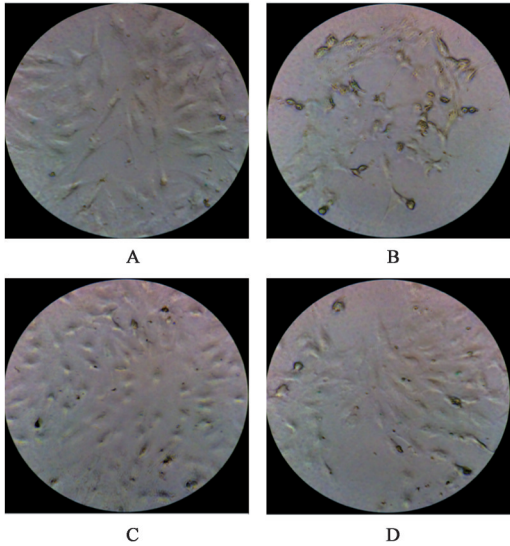
显著降低(*P* < 0.01),且具有剂量依赖性。结果表明 BBR 可以缓解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的 KGN 细胞衰老。见表 3 和图 1。

表 3 BBR 对衰老 KGN 细胞衰老状态的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of BBR on senescence state of senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	衰老细胞比例/%
空白组		6.42±2.20
模型组		33.95±3.54 <sup>2)</sup>
BBR 组	1	12.77±2.00 <sup>1,2)</sup>
	0.5	19.87±8.04 <sup>1,2)</sup>

**3.3 对衰老 KGN 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,模型组细胞凋亡率显著增加(*P* < 0.01)。与模型



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 小檗碱  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; D. 小檗碱  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组(图2和图3同)

图1  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况

Fig. 1  $\beta$ -galactosidase staining to detect cellular senescence

组比较少, BBR 干预后, 凋亡细胞明显减少 ( $P < 0.05$ )。见表4。

表4 BBR对衰老KGN细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of BBR on apoptosis of senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白组		19.10±0.79
模型组		30.00±1.14 <sup>2)</sup>
BBR组	1	24.30±0.53 <sup>1,2)</sup>
	0.5	26.77±2.91 <sup>1,2)</sup>

**3.4 对衰老KGN细胞ROS含量的影响** 结果显示, 与空白组比较, 模型组ROS含量显著增加 ( $P < 0.01$ ); BBR干预后, 与模型组比较, 小檗碱各剂量组ROS含量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且有剂量依赖性。见表5。

**3.5 对衰老KGN细胞中Bcl-2/Bax、Caspase-3、FoxO1、CAT mRNA表达的影响** 与空白组比较, 模型组CAT与Bcl-2/Bax mRNA表达显著减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, BBR干预后CAT与Bcl-2/

表5 BBR对衰老KGN细胞ROS含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of BBR on ROS content of senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS百分比/%
空白组		0.53±0.22
模型组		42.13±7.79 <sup>2)</sup>
BBR组	1	3.45±0.97 <sup>1,2)</sup>
	0.5	6.88±1.82 <sup>1,2)</sup>

Bax mRNA表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较, 模型组Caspase-3与FoxO1 mRNA表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, BBR干预后Caspase-3与FoxO1 mRNA表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表6。

表6 BBR对衰老KGN细胞中Bcl-2/Bax、Caspase-3、FoxO1、CAT mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of BBR on Bcl-2/Bax, Caspase-3, FoxO1, CAT mRNA expression in senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2/Bax	Caspase-3	FoxO1
空白组		1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.06
模型组		0.47±0.05 <sup>2)</sup>	1.53±0.03 <sup>2)</sup>	1.29±0.29 <sup>2)</sup>
BBR组	1	0.68±0.01 <sup>1,2)</sup>	0.54±0.08 <sup>1,2)</sup>	0.96±0.01 <sup>1,2)</sup>
	0.5	0.61±0.02 <sup>1,2)</sup>	0.60±0.09 <sup>1,2)</sup>	1.00±0.08 <sup>1,2)</sup>

**3.6 对衰老KGN细胞SIRT1、SOD2、JNK、FoxO1、LC3B II、p62、Beclin-1蛋白水平的影响** 结果表明, 与空白组比较, 模型组SIRT1与SOD2蛋白水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); BBR干预后SIRT1与SOD2蛋白水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。同时, 与空白组比较, 模型组JNK与FoxO1蛋白水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, BBR干预后JNK与FoxO1蛋白水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖性。与空白组比较, 模型组LC3B II与Beclin-1表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), p62蛋白水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, BBR组LC3B II与Beclin-1表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), p62蛋白水平显著增加 ( $P < 0.01$ )。见图2和表7、图3和表8。

表7 BBR对衰老KGN细胞SIRT1、SOD2、JNK、FoxO1蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of BBR on expression of SIRT1, SOD2, JNK and FoxO1 proteins in senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SIRT1/GAPDH	SOD2/GAPDH	JNK/GAPDH	FoxO1/GAPDH
空白组		1.00±0.11	1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.06
模型组		0.35±0.06 <sup>2)</sup>	0.58±0.08 <sup>2)</sup>	1.24±0.04 <sup>2)</sup>	1.63±0.07 <sup>2)</sup>
BBR组	1	1.06±0.09 <sup>1,2)</sup>	1.22±0.02 <sup>1,2)</sup>	0.59±0.10 <sup>1,2)</sup>	0.53±0.07 <sup>1,2)</sup>
	0.5	0.74±0.31 <sup>1,2)</sup>	1.05±0.17 <sup>1,2)</sup>	0.79±0.26 <sup>1,2)</sup>	0.85±0.14 <sup>1,2)</sup>

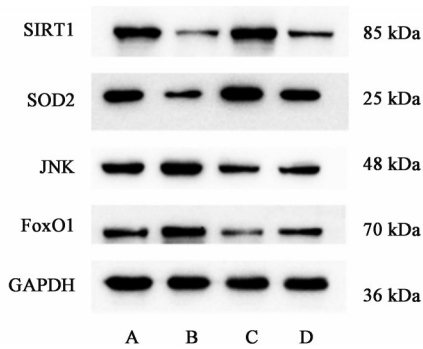


图2 KGN细胞SIRT1、SOD2、JNK、FoxO1蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of SIRT1, SOD2, JNK, FoxO1 protein expression in KGN cells

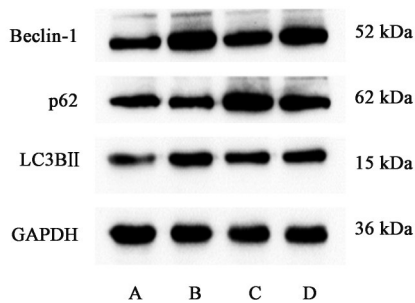


图3 KGN细胞Beclin-1、p62、LC3 II蛋白表达电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of Beclin-1, p62, LC3 II protein expression in KGN cells

表8 BBR对衰老KGN细胞LC3 II、p62、Beclin-1蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of BBR on LC3 II, p62, Beclin-1 protein expression in senescent KGN cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Beclin-1 /GAPDH	p62 /GAPDH	LC3 II /GAPDH
空白组		1.00±0.11	1.00±0.06	1.00±0.28
模型组		1.43±0.06 <sup>2)</sup>	0.82±0.04 <sup>2)</sup>	1.42±0.16 <sup>1)</sup>
BBR组	1	1.05±0.14 <sup>1,2)</sup>	1.14±0.05 <sup>1,2)</sup>	1.00±0.18 <sup>1,2)</sup>
	0.5	1.10±0.15 <sup>1,2)</sup>	1.08±0.05 <sup>1,2)</sup>	1.03±0.16 <sup>1,2)</sup>

#### 4 讨论

GCs对卵泡发育至关重要,GCs凋亡可诱导POF的发生<sup>[19]</sup>。POF主要特征为卵巢失去正常功能,提前闭经,闭锁卵泡增加等<sup>[20]</sup>。卵泡闭锁可能出现在卵泡发生的任何阶段,卵泡由卵母细胞、颗粒细胞与卵泡膜细胞共同组成,颗粒细胞通过缝隙连接和丝状伪足与卵母细胞相连,在促卵泡激素与促黄体生成素共同作用下,此连接处于开放状态,大量小分子物质可以进入卵母细胞内,使卵母细胞发挥正常功能<sup>[21-22]</sup>。GCs直接影响卵母细胞发育,进而影响卵巢功能<sup>[23-25]</sup>。因此,可以通过抑制GCs死亡改善卵巢功能,从而发挥抗POF效应。

氧化损伤诱导的细胞死亡可能是POF发病的主要机制之一<sup>[20]</sup>。ROS是氧化损伤过程中生成的主要产物之一,细胞内过多的ROS累积会导致氧化损伤进而诱导细胞凋亡<sup>[26-27]</sup>。ROS的内源性来源还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶,是自由基超氧阴离子的主要构成部分。大多数超氧阴离子被超氧化物歧化酶2(SOD2)歧化成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。 $\text{H}_2\text{O}_2$ 是氧化过程中具有很高活性的分子,可以引起GCs细胞膜破坏及细胞的凋亡与坏死,而GCs功能异常可引起卵泡闭锁,诱导POF发生<sup>[28]</sup>。因此实验选用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导建立KGN细胞衰老模型。本研究中,模型组衰老细胞显著增加,细胞增殖率显著下降,细胞凋亡,ROS含量均显著增加,提示衰老模型构建成功。

凋亡与自噬是程序性死亡的两种形式,I型程序性死亡指细胞凋亡,自噬性细胞死亡为II型程序性死亡<sup>[29]</sup>。凋亡与自噬具有复杂的相互作用关系,既可相互拮抗,也可相互协同<sup>[30]</sup>。CHOI等<sup>[31]</sup>验证表明,在GCs中,自噬与凋亡诱导卵泡闭锁具有相关性<sup>[32]</sup>。ROS是细胞信号转导中重要的信号分子,在诱导凋亡与自噬中发挥重要作用<sup>[29]</sup>。ROS的主要来源是线粒体和NADPH氧化酶<sup>[33]</sup>。细胞凋亡包括线粒体的内在途径与死亡受体的外在途径,Bcl-2是内在线粒体途径的抑制细胞凋亡因子,Bax是重要的促凋亡因子,Bcl-2主要通过限制Bax的激活来发挥作用,二者结合形成Bcl-2/Bax二聚体共同发挥抗凋亡作用<sup>[34-35]</sup>。Caspase-3是经典的细胞凋亡标志物<sup>[36]</sup>。本研究发现,经BBR干预后Bcl-2/Bax mRNA表达升高,Caspase-3 mRNA表达降低,证明BBR抗线粒体内在途径诱导的细胞凋亡。

自噬降解衰老蛋白质和细胞器,回收营养物质并产生能量,维持机体稳态平衡<sup>[37]</sup>。但氧化损伤条件下自噬被过度激活,会发生自噬性细胞死亡<sup>[38]</sup>。SHEN等<sup>[32]</sup>研究发现,氧化损伤诱导的自噬增强会损害GCs,引起卵泡闭锁<sup>[39]</sup>。自噬始于吞噬细胞形成,吞噬细胞与LC3 II紧密结合,吞噬泛素化底物形成自噬体,与溶酶体融合,形成有助于降解内容物的内部酸性水解环境<sup>[40]</sup>。KABEYA等<sup>[41]</sup>研究验证,诱导自噬条件下LC3 II表达显著增加。Beclin-1是自噬起始因子,介导自噬产生,控制自噬体成熟,促进自噬<sup>[42]</sup>。HILL等<sup>[43]</sup>研究表明,VCP可通过增加Beclin-1水平诱导自噬发生。p62是一种自噬底物,为自噬活性的报告分子,识别泛素化蛋白质或细胞器,被自噬-溶酶体途径降解,自噬缺陷导致p62蛋

白的积累<sup>[44-45]</sup>。ZHANG等<sup>[46]</sup>发现,DDX5介导自噬减少p62表达量。本研究同样发现,BBR干预后LC3 II、Beclin-1蛋白水平显著降低,p62蛋白水平显著升高,表明BBR对氧化损伤诱导的自噬过程具有抑制作用。

SIRT1是NAD<sup>+</sup>依赖性脱乙酰酶,在多种生物事件中发挥重要作用。衰老过程中,SIRT1被识别为自噬底物,通过自噬蛋白LC3降解,促进自噬发生<sup>[9]</sup>。SIRT1去乙酰化FoxO1诱导自噬,REN等<sup>[47]</sup>发现,SIRT1/FoxO1信号通路作为氧化损伤刺激自噬的主要信号通路发挥作用。同时,研究发现SIRT1在凋亡途径中发挥关键作用,ZHANG等<sup>[48]</sup>发现SIRT1抑制GCs中FoxO1去乙酰化酶,逆转氧化损伤对GCs凋亡的促进作用。SUI等<sup>[49]</sup>研究表明,抑制JNK可以平衡凋亡与自噬。JNK被ROS激活诱导SIRT1磷酸化,促进FoxO1去乙酰化。SUI等<sup>[49]</sup>验证,JNK激活响应多种应激信号,包括细胞凋亡与自噬等。SUZUKI等<sup>[50]</sup>表明,ROS可以介导JNK/Caspase-3信号通路激活,诱导细胞凋亡。ZHOU等<sup>[51]</sup>发现JNK是自噬的潜在调节途径。本研究同样发现,BBR干预后,JNK、FoxO1蛋白水平显著降低,SIRT1蛋白水平显著增加;FoxO1、Caspase-3 mRNA表达显著降低,表明BBR可通过抑制SIRT1/FoxO1信号通路介导的卵巢颗粒细胞凋亡与自噬发挥作用。

综上所述,本研究发现,BBR可通过SIRT1/FoxO1信号通路抑制卵巢颗粒细胞的凋亡与自噬,但凋亡与自噬之间具体相互作用并未得到进一步阐述,这将是本课题组接下来研究重点。研究结果进一步为BBR治疗卵巢颗粒细胞衰老的分子机制提供了新的实验依据,也为BBR的临床药物开发提供了理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] KOVANCI E, SCHUTT A K. Premature ovarian failure: Clinical presentation and treatment[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2015, 42(1):153-161.
- [2] KAWAI T, RICHARDS J S, SHIMADA M. Large-scale DNA demethylation occurs in proliferating ovarian granulosa cells during mouse follicular development[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1):1334.
- [3] SREERANGARAJA URS D B, WU W H, KOMRSKOVA K, et al. Mitochondrial function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and

female fertility[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10):3592.

- [4] TANG X, DONG H, FANG Z, et al. Ubiquitin-like modifier 1 ligating enzyme 1 relieves cisplatin-induced premature ovarian failure by reducing endoplasmic reticulum stress in granulosa cells [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1):84.
- [5] YADAV A K, YADAV P K, CHAUDHARY G R, et al. Autophagy in hypoxic ovary [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(17):3311-3322.
- [6] BRAS M, QUEENAN B, SUSIN S A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(2):231-239.
- [7] DADAKHUJAEV S, JUNG E J, NOH H S, et al. Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death [J]. *Autophagy*, 2009, 5(1):103-105.
- [8] FILOMENI G, DE ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3):377-388.
- [9] XU C, WANG L, FOZOUNI P, et al. SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(10):1170-1179.
- [10] LUO G, JIAN Z, ZHU Y, et al. Sirt1 promotes autophagy and inhibits apoptosis to protect cardiomyocytes from hypoxic stress [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(5):2033-2043.
- [11] MICHAN S, SINCLAIR D. Sirtuins in mammals: Insights into their biological function [J]. *Biochem J*, 2007, 404(1):1-13.
- [12] MEI Z G, HUANG Y G, FENG Z T, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FoxO1 signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(13):13187-13205.
- [13] DING C, ZOU Q, WANG F, et al. HGF and BFGF secretion by human adipose-derived stem cells improves ovarian function during natural aging via activation of the SIRT1/FoxO1 signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4):1316-1332.
- [14] LIM C J, LEE Y M, KANG S G, et al. Aquatide activation of SIRT1 reduces cellular senescence through a SIRT1-FoxO1-autophagy axis [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(5):511-518.
- [15] IMENSHAHIDI M, HOSSEINZADEH H. Berberis vulgaris and berberine: An update review [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(11):1745-1764.
- [16] WANG K, FENG X, CHAI L, et al. The metabolism of

- berberine and its contribution to the pharmacological effects[J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 139-157.
- [17] ZHANG N, LIU X, ZHUANG L, et al. Berberine decreases insulin resistance in a PCOS rats by improving GLUT4: Dual regulation of the PI3K/Akt and MAPK pathways[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2020, 110:104544.
- [18] REDDY P, LIU L, ADHIKARI D, et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool [J]. *Science*, 2008, 319 (5863):611-613.
- [19] KRANC W, BRAZERT M, CELICHOWSKI P, et al. 'Heart development and morphogenesis' is a novel pathway for human ovarian granulosa cell differentiation during long-term *in vitro* cultivation-a microarray approach[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1705-1715.
- [20] GHAREMANI-NASAB M, GHANBARI E, JAHANBANI Y, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4217-4226.
- [21] THOMAS F H, VANDERHYDEN B C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: Regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4:19.
- [22] RODGERS R J, LAVRANOS T C, RODGERS H F, et al. The physiology of the ovary: Maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, 53(1-6):241-246.
- [23] BRAND J S, ONLAND-MORET N C, EIJKEMANS M J, et al. Diabetes and onset of natural menopause: Results from the European prospective investigation into cancer and nutrition [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30 (6):1491-1498.
- [24] AKOGULLARI D, ULUER E T, VATANSEVER H S. Investigation of the relation between follicular atresia and granulosa cells in terms of cell death mechanisms in premature ovarian failure model [Z]. The 2nd International Cell Death Research Congress, 2018, doi: 10.3390/proceedings2251529.
- [25] ALMEIDA C P, FERREIRA M, SILVEIRA C O, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells-A review[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(10): 1276-1281.
- [26] LIU T, HAN Y, ZHOU T, et al. Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(18):7880-7898.
- [27] JACOB K D, NOREN HOOTEN N, TRZECIAK A R, et al. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease [J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134(3/4):139-157.
- [28] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13:757-772.
- [29] WANG G, ZHANG T, SUN W, et al. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106:24-37.
- [30] EISENBERG-LERNER A, BIALIK S, SIMON H U, et al. Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7):966-975.
- [31] CHOI J Y, JO M W, LEE E Y, et al. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2532-2537.
- [32] SHEN M, JIANG Y, GUAN Z, et al. Protective mechanism of FSH against oxidative damage in mouse ovarian granulosa cells by repressing autophagy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(8):1364-1385.
- [33] DAN DUNN J, ALVAREZ L A, ZHANG X, et al. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis[J]. *Redox Biol*, 2015, 6:472-485.
- [34] HASSAN M, WATARI H, ABUALMAATY A, et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:150845.
- [35] ADAMS J M, CORY S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(5):488-496.
- [36] BERNARD A, CHEVRIER S, BELTJENS F, et al. Cleaved Caspase-3 transcriptionally regulates angiogenesis-promoting chemotherapy resistance [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23):5958-5970.
- [37] YANG Z, KLIONSKY D J. Eaten alive: A history of macroautophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 814-822.
- [38] TAN Y Q, ZHANG J, ZHOU G. Autophagy and its implication in human oral diseases [J]. *Autophagy*, 2017, 13(2):225-236.
- [39] 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.
- [40] WILKINSON D S, JARIWALA J S, ANDERSON E, et al. Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy [J]. *Mol Cell*, 2015, 57(1): 55-68.
- [41] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [42] KAUR S, CHANGOTRA H. The beclin 1 interactome: Modification and roles in the pathology of autophagy-related disorders [J]. *Biochimie*, 2020, 175: 34-49.
- [43] HILL S M, WROBEL L, ASHKENAZI A, et al. VCP/p97 regulates Beclin-1-dependent autophagy initiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(4): 448-455.
- [44] HE C, KLIONSKY D J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 67-93.
- [45] KOMATSU M, WAGURI S, KOIKE M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1149-1163.
- [46] ZHANG H, ZHANG Y, ZHU X, et al. DEAD Box protein 5 inhibits liver tumorigenesis by stimulating autophagy via interaction with p62/SQSTM1 [J]. *Hepatology*, 2019, 69(3): 1046-1063.
- [47] REN H, SHAO Y, WU C, et al. Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease via AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 500: 110628.
- [48] ZHANG M, ZHANG Q, HU Y, et al. miR-181a increases FoxO1 acetylation and promotes granulosa cell apoptosis via SIRT1 downregulation [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3088.
- [49] SUI X, KONG N, YE L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 174-179.
- [50] SUZUKI M, BANDOSKI C, BARTLETT J D. Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 369-378.
- [51] ZHOU Y Y, LI Y, JIANG W Q, et al. MAPK/JNK signalling: A potential autophagy regulation pathway [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(3): e00199.

[责任编辑 周冰冰]