

阳丽,吴湘,李昂,等. 黄芪多糖调控 Sirt1/FoxO1 通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 93-98.

Yang L, Wu X, Li A, et al. Astragalus polysaccharide regulates the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibits granulosa cell autophagy in polycystic ovary syndrome rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 93-98.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.014

黄芪多糖调控 Sirt1/FoxO1 通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究

阳 丽*, 吴 湘, 李 昂, 何薇薇

(湖南省妇幼保健院, 长沙 410008)

【摘要】 目的 探究黄芪多糖(APS)调控沉默信息调节因子 1/叉头状转录因子 O1 (Sirt1/FoxO1) 通路对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠颗粒细胞自噬的影响。**方法** 大鼠中分离卵巢颗粒细胞并经促卵泡刺激素受体(FSHR)免疫荧光鉴定,且 CCK8 检测 APS 对卵巢颗粒细胞增殖的影响。 10^{-5} mol/L 丙酸睾酮、 $10 \mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24 h 诱导 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬模型, CCK8 检测细胞增殖情况;透射电镜观察自噬体情况;免疫印迹法检测细胞中 Sirt1、FoxO1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)蛋白表达情况。**结果** 免疫荧光检测显示, FSHR 蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞中的平均阳性表达量 $93.18\% > 90\%$, 可进行接下来实验。 0 、 100 、 200 、 $400 \mu\text{g/mL}$ APS 处理正常卵巢颗粒细胞,在贴壁 0、24 h 比较,细胞 OD_{450} 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组相比,模型组细胞核附近出现大量自噬小体,双层、单层膜包裹胞质形成封闭、圆形结构,部分自噬小体内膜溶解,自噬小体周围可见单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆、类似自噬小体结构; $100 \mu\text{g/mL}$ APS 组与模型组细胞结构类似,随着 APS 剂量的升高,自噬小体数量减少,在 $400 \mu\text{g/mL}$ APS 组时细胞正常。正常组、模型组、 100 、 200 、 $400 \mu\text{g/mL}$ APS 组在细胞贴壁 0 h 时,细胞 OD_{450} 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细胞贴壁 24 h,与正常组相比,模型组细胞 OD_{450} 降低 ($P < 0.05$),细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平升高 ($P < 0.05$);与模型组相比, 100 、 200 、 $400 \mu\text{g/mL}$ APS 组细胞 OD_{450} 升高 ($P < 0.05$),细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** APS 可以抑制 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬,可能是通过抑制自噬通路 Sirt1/FoxO1 实现的。

【关键词】 黄芪多糖;沉默信息调节因子 1/叉头状转录因子 O1 通路;多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0093-06

Astragalus polysaccharide regulates the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibits granulosa cell autophagy in polycystic ovary syndrome rats

YANG Li*, WU Xiang, LI Ang, HE Weiwei

(Hunan Maternal and Child Health Hospital, Changsha 410008, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of astragalus polysaccharides (APS) on autophagy of granulosa cells in polycystic ovary syndrome (PCOS) rats by regulating the silent mating type information regulation 2 homolog 1 (Sirt1)/forkhead box transcription factor O1 (FoxO1) pathway. **Methods** Ovarian granulosa cells were isolated from rats and identified by follicle stimulating hormone receptor (FSHR) immunofluorescence. CCK8 was used to assess the effect of APS on the proliferation of ovarian granulosa cells. Ovarian granulosa cells were treated with 1×10^{-5} mol/L testosterone propionate and $10 \mu\text{mol/L}$ C2 ceramide for 24 h to induce the autophagy model of PCOS rat granulosa cells. CCK8 was used to measure cell proliferation. Autophagy was observed by transmission electron microscope. Protein expression of Sirt1,

FoxO1, and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) was detected by Western blot. **Results** Immunofluorescence showed that average positive expression of FSHR protein in rat ovarian granulosa cells was 93.18% > 90%. In 0, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ APS-treated normal ovarian granulosa cells, there was no significant difference in OD_{450} after adherence at 0 or 24 h ($P > 0.05$). Compared with the normal group, a large number of autophagy bodies appeared near the nucleus of the model group, and double and single layer membranes wrapped the cytoplasm to form a closed and round structure. Some of the autophagy body inner membrane had dissolved and there was a single membrane structure around the autophagosome, which contained some degraded cytoplasm similar to the autophagosome structure. The cell structure of the 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group was similar to that of the model group. With the increase of APS dosage, the number of autophagy bodies decreased and the cells were normal in the 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group. There was no significant difference in OD_{450} between normal, model, and 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ APS groups at 0 h of cell adhesion ($P > 0.05$). After 24 h of cell adhesion, compared with the normal group, OD_{450} was lower in the model group ($P < 0.05$) and the protein levels of Sirt1, FoxO1, and LC3II/LC3I were higher ($P < 0.05$). Compared with the model group, OD_{450} was higher in 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ APS groups ($P < 0.05$) and the protein levels of Sirt1, FoxO1, and LC3II/LC3I were lower ($P < 0.05$). **Conclusions** APS inhibits autophagy of granulosa cells in PCOS rats, which may be mediated by inhibiting the autophagy pathway Sirt1/FoxO1.

【Keywords】 astragalus polysaccharides; silent mating type information regulation 2 homolog 1/forkhead box transcription factor O1 pathway; granulosa cell autophagy in polycystic ovary syndrome rats

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是临床常见妇科内分泌疾病,会导致内分泌系统紊乱,而 PCOS 中出现卵巢颗粒细胞明显凋亡情况,而凋亡与自噬之间存在较多交叉位点,且自噬参与许多生理病理过程^[1-2]。卵巢颗粒细胞自噬可影响卵泡发育和卵泡闭锁,从而影响生育功能^[3]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 在黄嘌呤氧化酶诱导的肺癌中可以抑制自噬从而发挥抗肿瘤作用^[4],但在 PCOS 中尚未发现相关研究。沉默信息调节因子 1/叉头状转录因子 O1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1/forkhead box transcription factor O1, Sirt1/FoxO1) 作为自噬相关通路在 PCOS 卵巢组织中处于激活状态,可以通过对颗粒细胞、卵泡细胞的调控从而抑制卵泡正常发育过程^[5],且本研究预实验结果显示 PCOS 中颗粒细胞自噬现象明显。APS 是否影响 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬尚不清楚。因此,建立 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬模型,探究 APS 对其影响,为临床提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,6 周龄、体重 190 ~ 210 g,购自北京维通利华实验动物有限公司 [SCXK (京) 2016-0011],饲养在中南大学湘雅二医院 [SYXK (湘) 2017-0002]。在温度 24℃ ~ 25℃、湿度 50% ~ 60%、自然光照、自由摄食饮水,定时通风环

境中饲养。本实验动物使用 3R 原则给予人道关怀,经湖南省妇幼保健院伦理委员会审核批准 (2020-S061)。

1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) (上海生物化学制药厂,批号: 820120); CCK8 试剂盒、一抗促卵泡刺激素受体 (follicle stimulating hormone receptor, FSHR)、Sirt1、FoxO1、哺乳动物同族物微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、 β -actin (美国 abcam 公司,货号分别为: ab228554、ab150557、ab189494、ab58518、ab229327、ab179467); 丙酸睾酮 (中国 aladdin 科技公司, CAS 号: 57-85-2); 自噬诱导剂 C2-神经酰胺 (美国 Sigma 公司,批号: A7191); APS (纯度 90%) (中国上海源叶生物科技有限公司,批号: 20170316)。酶标仪 (中国 BioBase 公司,型号: inark); 透射电镜 (日立高新科技有限公司,型号: ChromAssist Data Station); 蛋白凝胶系统 (上海 Bio-Rad 公司,型号: 7500)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠卵巢颗粒细胞的分离与培养

无菌环境中大鼠皮下注射 50 IU PMSG, 48 h 后大鼠处死,无菌条件下摘取卵巢,去除周围脂肪组织,低倍镜下用 25 号针头刺破卵泡,轻轻挤压,逸出卵母细胞和颗粒细胞,吹打使细胞分离,200 目网筛过滤,800 r/min 离心 10 min,弃上清,收集细胞。取部分细胞台盼蓝染色计数,未见蓝染的为死细胞。

将颗粒细胞稀释密度为每毫升 1×10^5 个,添加 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

1.3.2 免疫荧光鉴定离体的大鼠卵巢颗粒细胞

细胞贴壁生长 48 h 后经胰蛋白酶消化,直至消化成单个圆形细胞,添加 DMEM/F12 终止消化,收集细胞置于含载玻片的 24 孔培养板中,细胞爬片,待密度约 70% 时,多聚甲醛固定,细胞免疫荧光染色。滴加一抗 FSHR (1:200) 4°C 封闭过夜,滴加二抗,室温孵育 1 h,荧光显微镜卤素 2 灯光源激发绿色荧光,进行观察拍照。

1.3.3 CCK8 检测 APS 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

每毫升 1×10^5 个正常卵巢颗粒细胞接种至 96 孔板中,待细胞贴壁后加含 0、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 的 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养贴壁,分别在贴壁 0 h、24 h 加 CCK8 试剂继续培养 1~4 h,酶标仪检测 450 nm 下各孔细胞光密度(optic density, OD)。6 个重复,3 个平行。验证 APS 对正常卵巢颗粒细胞的影响。

1.3.4 PCOS 卵巢颗粒细胞的自噬模型建立

参考文献^[6]结合本实验确定诱导自噬的剂量。在前期研究发现, 10^{-5} mol/L 丙酸睾酮作用卵巢颗粒细胞 24 h 可以建立 PCOS 细胞模型,1、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24、48 h,细胞自噬染色检测试剂盒(MDC 荧光染色)检测细胞自噬情况。

1.3.5 细胞分组及给药处理

正常大鼠分离的颗粒细胞为正常组,模型组、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组。正常组为鉴定过的卵巢颗粒细胞,其余各组添加丙酸睾酮+C2-神经酰胺作用 24 h。24 h 后更换培养液,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组分别用含 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液培养,模型组、正常组用正常 10% 胎牛血清 DMEM 培养液培养 24 h 进行实验。

1.3.6 CCK8 检测细胞增殖情况

将 1.3.5 各组细胞处理 24 h 后,参考 1.3.3 中 CCK8 试剂处理方法,检测细胞增殖情况。

1.3.7 透射电镜观察自噬体情况

将 1.3.5 各组细胞处理 24 h 后细胞消化后爬片,乙醇及丙酮脱水,环氧树脂浸透、包埋,超薄切片机切片(厚度:60 nm),醋酸双氧铀-柠檬酸铅双

重染色,透射电镜观察并拍照。

1.3.8 免疫印迹法检测细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 蛋白表达情况

将 1.3.5 各组细胞处理 24 h 后添加蛋白裂解液,冰上裂解 10 min, 4°C 13000 r/min 离心 10 min 收集总蛋白,上样 20 μg , PVDF 膜转膜后封闭;加入一抗 Sirt1、FoxO1、LC3、 β -actin, 4°C 孵育过夜;加入对应二抗,蛋白凝胶系统定量分析,待测蛋白相对表达水平=待测蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

1.4 统计学方法

本研究数据采用 GraphPad 8.0 软件进行分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$,差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠卵巢颗粒细胞的鉴定结果

FSHR 蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞的平均阳性表达量 93.18% > 90%, 见图 1。可进行接下来实验。

2.2 APS 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

0、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 处理正常卵巢颗粒细胞,分别在贴壁 0、24 h 比较,细胞 OD₄₅₀ 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 PCOS 卵巢颗粒细胞的自噬模型建立情况

1、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24、48 h,结果发现 C2-神经酰胺在 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 24 h、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 48 h 均可诱导自噬抑制细胞增殖,结合文献及自噬效果,确定 10^{-5} mol/L 丙酸睾酮、10 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24 h 构建 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬模型。

2.4 APS 对 PCOS 卵巢颗粒自噬细胞增殖的影响

正常组、模型组、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组在细胞贴壁 0 h 时, OD₄₅₀ 差异无统计学意义($P >$

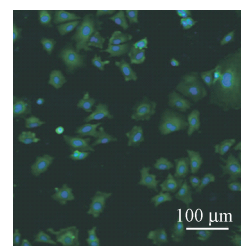


图 1 大鼠颗粒细胞的鉴定

Figure 1 Identification of rat granulosa cells

0.05)。细胞贴壁 24 h,与正常组相比,模型组细胞 OD₄₅₀降低 ($P<0.05$);与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细胞 OD₄₅₀升高 ($P<0.05$)。见表 2。

2.5 APS 对 PCOS 卵巢颗粒自噬细胞自噬的影响

与正常组相比,模型组细胞核附近出现大量自噬小体,双层、单层膜包裹胞质形成封闭、圆形结构,部分自噬小体内膜溶解,自噬小体周围可见单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆、类似自噬小体结构;100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组与模型组结构类似,随着 APS 剂量的升高,自噬小体数量减少,在 400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组时正常。见图 2。

表 1 不同浓度 APS 处理下卵巢颗粒细胞 OD₄₅₀ 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of OD₄₅₀ levels in ovarian granulosa cells treated with different concentrations of APS

组别 Groups	OD ₄₅₀	
	0 h	24 h
0 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.16 $\pm$ 0.34	3.41 $\pm$ 0.35
100 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.41 $\pm$ 0.27	3.68 $\pm$ 0.42
200 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.37 $\pm$ 0.25	3.78 $\pm$ 0.35
400 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.29 $\pm$ 0.19	3.95 $\pm$ 0.69
<i>F</i>	1.016	1.366
<i>P</i>	0.406	0.282

2.6 APS 对 PCOS 卵巢颗粒自噬细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 蛋白的影响

与正常组相比,模型组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平升高 ($P<0.05$);与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。见图 3、表 3。

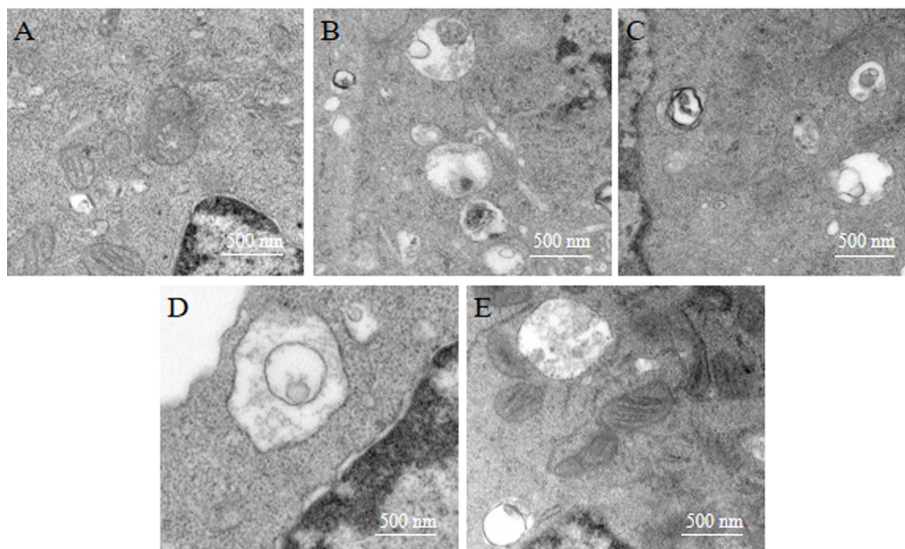
表 2 5 组细胞中 OD₄₅₀ 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of OD₄₅₀ levels in 5 groups

组别 Groups	OD ₄₅₀	
	0 h	24 h
正常组 Normal group	2.33 $\pm$ 0.34	4.06 $\pm$ 0.36
模型组 Model group	2.43 $\pm$ 0.26	2.96 $\pm$ 0.30 [#]
100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group	2.39 $\pm$ 0.37	3.51 $\pm$ 0.35 [*]
200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group	2.43 $\pm$ 0.25	3.58 $\pm$ 0.29 [*]
400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group	2.44 $\pm$ 0.36	4.67 $\pm$ 0.35 [*]
<i>F</i>	0.122	22.593
<i>P</i>	0.973	0.000

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.

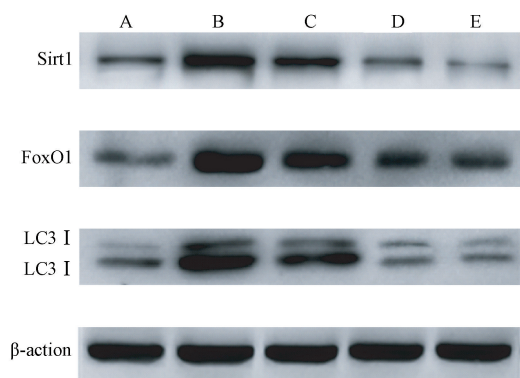


注:A:正常组;B:模型组;C:100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组;D:200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组;E:400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组。

图 2 5 组细胞中细胞自噬情况

Note. A, Normal group. B, Model group. C, 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group. D, 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group. E, 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group.

Figure 2 Autophagy in group 5 cells



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组; D: 200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组; E: 400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组。

图 3 5 组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 蛋白表达情况

Note. A, Normal group. B, Model group. C, 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group. D, 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group. E, 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group.

Figure 3 Expression of Sirt1, FoxO1 and LC3 protein in 5 groups

表 3 5 组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Comparison of Sirt1, FoxO1 and LC3 II/LC3 I protein levels in cells of groups 5

组别 Groups	Sirt1	FoxO1	LC3 II/LC3 I
正常组 Normal group	0.15 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	1.86 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	0.87 $\pm$ 0.08 [#]	0.96 $\pm$ 0.08 [#]	3.86 $\pm$ 0.25 [#]
100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group	0.39 $\pm$ 0.04 [*]	0.54 $\pm$ 0.04 [*]	2.76 $\pm$ 0.05 [*]
200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group	0.13 $\pm$ 0.02 [*]	0.13 $\pm$ 0.02 [*]	1.26 $\pm$ 0.15 [*]
400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group	0.07 $\pm$ 0.04 [*]	0.11 $\pm$ 0.02 [*]	1.38 $\pm$ 0.05 [*]
F	229.229	489.202	390.917
P	0.000	0.000	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与模型组相比, ^{*} $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.

3 讨论

颗粒细胞是卵泡主要功能细胞,与卵细胞成熟和排卵关系密切,而 PCOS 中颗粒细胞减少,导致患者无卵^[7];在本研究中以大鼠中分离卵巢颗粒细胞作为研究对象,FSHR 在卵巢颗粒细胞上表达,细胞膜上免疫荧光阳性定位,可用 FSHR 阳性率反映分离的细胞纯度,当纯度 $>90\%$ 时说明所分离颗粒细胞可进行实验。本研究 FSHR 蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞中的平均阳性表达量 93.18% $>90\%$,可用于研究。颗粒细胞减少这一现象与细胞凋亡有关,而

凋亡与自噬存在多重交叉,二者具有多种共同调控因子,且自噬是凋亡的必要条件,相互促进共同影响疾病^[8]。在本研究中发现,10⁻⁵ mol/L 丙酸睾酮、10 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24 h 构建 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬模型,模型组细胞增殖下降,细胞核附近出现大量自噬小体,部分自噬小体内膜溶解,自噬小体周围可见单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆、类似自噬小体结构,提示卵巢颗粒细胞自噬现象明显,模型建立成功。APS 是黄芪干燥根主要的活性成分之一,具有介导宿主免疫反应,降低机体伤害等功能^[9];在 T 淋巴细胞经顺铂处理后自噬过多中具有抑制自噬功能,从而缓解顺铂对机体的伤害^[10]。为改善机体功能,APS 在 PCOS 卵巢颗粒细胞过度自噬中是否发挥作用尚不情况。不同剂量 APS 处理正常卵巢颗粒细胞,各组细胞 OD₄₅₀ 差异无统计学意义,提示 APS 对正常卵巢颗粒细胞增殖影响不明显。但经诱导 PCOS 颗粒细胞自噬后不同剂量 APS 处理,各组细胞 OD₄₅₀ 升高、自噬现象也得到缓解,提示 APS 可以抑制 PCOS 卵巢颗粒细胞自噬现象,从而缓解自噬过度对机体的影响。

FoxO 转录因子是一类关键调控自噬因子,激活 FoxO 可加强自噬,从而影响细胞增殖、凋亡、存活、周期等过程^[11]。FoxO 中以 FoxO1、FoxO3 广泛存在,2007 年采用 Northern 杂交和实时荧光 PCR 技术检测 FoxO1 存在于心脏、肝、头脑、骨骼、卵巢、睾丸、脾、胰腺等处,存在广泛^[12]。FoxO1 能够激活细胞参与自噬活动,同时在分子水平上参与细胞增殖、分化等过程^[13]。FoxO1 转录活性受 Sirt1 等上游转录调控因子的调节,而 Sirt1 作为沉默信息调节因子 Sir2 家族主要成员,可以通过直接作用影响自噬,或通过调节 FoxO1 影响自噬^[14-16]。在自噬过程中特征蛋白 LC3 分 I 型和 II 型,其中 LC3 I 存在细胞质中,LC3 II 存在于自噬体膜上^[17],自噬发生时 LC3 I 被 ATG7 活化后转运至 ATG3,并在 ATG3 作用修饰为 LC3 II,LC3 II/LC3 I 反映自噬情况^[18];在 PCOS 卵巢颗粒细胞自噬中 LC3 II/LC3 I 比例升高反映自噬状况^[19]。FoxO1 可以通过调节 LC3 II/LC3 I 影响自噬^[20]。本研究发现,与正常组相比,模型组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平升高,提示在 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬中激活 Sirt1 调控 FoxO1,从而 LC3 I 向 LC3 II 转化,促进自噬。与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细

胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低,提示 APS 可能是通过抑制 Sirt1/FoxO1 通路发挥对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬的缓解,从而降低细胞损伤。

综上所述,APS 可能通过抑制 Sirt1/FoxO1 通路发挥抑制 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬作用,本文首次证明 APS 可减轻 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬。但影响自噬通路较多,亦可能通过别的通路发挥作用,探究更多信号通路是接下来研究的内容。

参考文献:

- [1] 张娟,王立群,周月希,等.多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞中 DR5, DcR2 的表达变化[J].中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 33-39.
- [2] Zeng X, Chai W. Role of SENP3 in the autophagy of granulosa cells in polycystic ovary syndrome [J]. Fertil Steril, 2018, 110(4): e119-e125.
- [3] Wang J, Ruan W, Huang B, et al. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of mouse ovarian granulosa cells [J]. Reproduction, 2019, 158(1): 61-69.
- [4] 王雪林,李杨,刘丹,等.黄芪多糖对黄嘌呤氧化酶诱导的肺癌 A549 细胞自噬及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J].中国药理学通报, 2019, 35(12): 1676-1680.
- [5] 何轶然,张治芬,王芳,等. SIRT1、FoxO3a 在 DHEA 诱导多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢组织中的表达及意义[J].浙江医学, 2018, 40(5): 429-432, 438, 550.
- [6] 邢玉,刘欣,刘杰,等.通过 p53/AMPK 信号通路研究归术益坤方对多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的影响[J].中华中医药杂志, 2017, 32(11): 5074-5077.
- [7] Wang Y, Xu S, Wang Y, et al. Identification and potential value of candidate microRNAs in granulosa cells of polycystic ovary syndrome [J]. Technol Health Care, 2019, 27(6): 579-587.
- [8] 裴晓川,张媛媛,张志华.细胞凋亡与自噬关系的探讨[J].国际输血及血液学杂志, 2016, 39(6): 549-552.
- [9] Dong N, Li X, Xue C, et al. Astragalus polysaccharides alleviates LPS - induced inflammation via the NF - κ B/MAPK signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(7-8): 5525-5540.
- [10] 王楠,陆金华,林胜友.黄芪多糖对大鼠 T 淋巴细胞顺铂处理后自噬的影响[J].浙江临床医学, 2018, 20(4): 603-605.
- [11] Wang P, Nolan TM, Yin Y, et al. Identification of transcription factors that regulate ATG8 expression and autophagy in arabidopsis [J]. Autophagy, 2020, 16(1): 123-139.
- [12] van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(6): 440-450.
- [13] Jin JZ, Li HY, Jin J, et al. Exogenous pancreatic kininogenase protects against renal fibrosis in rat model of unilateral ureteral obstruction [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2020, 41(12): 1597-1608.
- [14] Xu J, Liu LQ, Xu LL, et al. Metformin alleviates renal injury in diabetic rats by inducing Sirt1/FoxO1 autophagic signal axis [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2019, 47(4): 599-608.
- [15] Wu Q, Hu Y, Jiang M, et al. Effect of autophagy regulated by Sirt1/FoxO1 pathway on the release of factors promoting thrombosis from vascular endothelial cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17): 4132-4139.
- [16] Lo MC, Chen JY, Kuo YT, et al. Camptothecin activates SIRT1 to promote lipid catabolism through AMPK/FoxO1/ATGL pathway in C2C12 myogenic cells [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(8): 672-683.
- [17] You ZY, Xu YF, Wan W, et al. TP53INP2 contributes to autophagosome formation by promoting LC3-ATG7 interaction [J]. Autophagy, 2019, 15(8): 1309-1321.
- [18] 李亚,李金凤,李小承,等.糖尿病小鼠海马神经元中自噬增强与热休克蛋白 B8 上调相关[J].中华糖尿病杂志, 2020, 12(8): 631-636.
- [19] 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): 3249-3434.
- [20] Wang J, Shen L, Hong H, et al. Atrasentan alleviates high glucose-induced podocyte injury by the microRNA-21/forkhead boxO1 axis [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 852(13): 142-150.

[收稿日期]2020-11-18