

·综述·

本文引用:杨 硕.细胞自噬与多囊卵巢综合征研究进展[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):425-428,封三.

细胞自噬与多囊卵巢综合征研究进展

杨 硕

(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] 多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是导致女性月经不调、排卵障碍性不孕的主要原因,确切发病机制尚未阐明。自噬可以发生在卵泡发育的各个阶段,卵泡颗粒细胞自噬相对活跃,具有促性腺激素依赖性和细胞特异性。卵泡颗粒细胞自噬稳态平衡以维持卵巢功能,调控卵泡发育,影响胚胎质量和妊娠结局。PCOS 卵泡颗粒细胞自噬活性过高,自噬相关基因表达过强,与 PCOS 卵泡发育异常、内分泌代谢紊乱、临床自然流产率高和辅助生殖中发生卵巢过度刺激综合征风险增高密切相关,可能是 PCOS 发病的重要机制。补肾中药通过下调 PCOS 卵泡颗粒细胞过度自噬,改善卵巢功能,维持机体阴阳平衡,但具体作用机制亟待进一步阐明,为 PCOS、不孕症等妇科疑难病症临床诊疗提供新思路。

[关键词] 多囊卵巢综合征;卵泡颗粒细胞自噬;卵泡发育;补肾中药

[中图分类号]R271;R711

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.03.031

Research Advances in Cell Autophagy and Polycystic Ovary Syndrome

YANG Shuo

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the main cause of irregular menstruation and ovulatory dysfunctional infertility in women, and its pathogenesis remains unclear. Autophagy can occur at all stages of follicular development, and autophagy of follicular granulosa cells is relatively active, which has gonadotropin dependence and cell specificity. Homeostasis of follicular granulosa cell autophagy plays an important role in maintaining ovarian function and regulating follicular development and can affect embryo quality and pregnancy outcome. High activity of follicular granulosa cells and high expression of autophagy-related genes are observed in patients with PCOS and are closely associated with follicular dysplasia, endocrine and metabolic disorders, a high rate of spontaneous abortion in clinical practice, and an increased risk of ovarian hyperstimulation syndrome during assisted reproduction, which may be an important pathogenesis of PCOS. Kidney-tonifying traditional Chinese herbs can improve ovarian function and maintain Yin-Yang balance by downregulating excessive autophagy of follicular granulosa cells, but the specific mechanism needs to be further clarified, in order to provide new ideas for clinical diagnosis and treatment of difficult gynecological diseases such as PCOS and infertility.

[Keywords] polycystic ovary syndrome; follicular granulosa cell autophagy; follicular development; kidney-tonifying traditional Chinese medicine

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种生殖功能障碍与糖代谢异常并存的内分泌紊乱综合症^[1-2],卵泡发育异常是PCOS的最棘手问题,是导致女性月经不调、排卵障碍性不孕的主要原因,严重影响育龄期女性生殖健康。卵泡发育成熟并排卵是非常精密、有序而复杂的过程,有赖卵巢和卵泡微环境自身稳态的维持。自噬是以自噬体出

现为特征的一种细胞分解代谢机制。卵泡内颗粒细胞维持自噬稳态平衡,参与并调节卵泡的发育和闭锁,维持卵巢的正常功能^[3-7]。国内外学者对颗粒细胞自噬与PCOS发病机制的研究甚少,但随着近年来人们对于颗粒细胞自噬与卵巢功能、卵泡发育及其调控机制等相关性的认识和研究,有证据表明颗粒细胞自噬可能是PCOS卵泡发育异常及性激素合

[收稿日期]2018-08-28

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81503611),湖南省自然科学基金资助项目(2015JJ6078),湖南省教育厅科学研究基金资助项目(15B180)。

[作者简介]杨 硕,女,医学博士,副教授,研究方向:妇科疑难病症防治,E-mail:shuoyang017@gmail.com。

成失调的重要影响因素,对于促进 PCOS 卵泡发育成熟及排卵具有重要意义,并与 PCOS 患者临床自然流产发生率增高和辅助生殖中发生卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)风险增高密切相关。

1 细胞自噬概述

自噬是以自噬体出现为特征的一种细胞分解代谢机制。细胞自噬依赖自身溶酶体,形成自噬体,程序性自我消化降解的过程,并为细胞提供能量和合成底物,维持细胞正常功能,是一种重要的生物学现象。当细胞处于饥饿、缺氧等不良环境刺激下,细胞自噬调控启动,既可以保护受损细胞,进行亚细胞水平上的重构,又可以作为一种 II 型细胞死亡程序诱导细胞主动性死亡,维持体内环境稳定和能量代谢^[8]。自噬不足可能引起机体衰老、疾病;自噬持续活化可能导致细胞凋亡、坏死;过度自噬可能破坏细胞结构,引起细胞死亡。细胞内环境自噬平衡打破与疾病发生密切相关^[9]。

参与自噬调控的基因称为自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg),是自噬特异性基因,主要来自对酵母细胞的研究,目前已发现 30 多个参与细胞自噬调控的基因^[10-12],如微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, MAP1-LC3, LC3)和 Beclin-1 是哺乳动物体与 Atg6 同源的自噬基因。LC3 在大鼠体内有 LC3A 和 LC3B 两种不同剪切,其中 LC3B 在各组织中分布较为广泛,以胞质型 LC3B I 与自噬体膜型 LC3B II 2 种形式存在。胞质型 LC3B I 与磷脂酰乙醇胺结合,形成 LC3B II 定位在自噬体膜上,参与自噬体的形成过程,与自噬体的数量有关,通常以 LC3B II/LC3B I 比值大小评价细胞自噬水平。Beclin-1 基因则通过与 B 细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Vps34 等自噬相关蛋白结合形成多蛋白复合体调控细胞自噬。

2 颗粒细胞自噬调节卵泡发育与闭锁

人类卵泡自胚胎形成后即进入自主发育和卵泡闭锁的轨道,进入青春期后,每个月经周期有一批(3~11 个)卵泡发育,经过周期募集、选择,一般最终只有一个优势卵泡发育成熟并排出卵子,其余卵泡自行退化而闭锁^[1]。人类卵泡的发育、成熟及其排出是非常精密、有序而复杂的过程,受到下丘脑-垂体-卵巢轴和卵巢旁/自分泌活动的调控,有赖卵巢和卵泡微环境自身稳态的维持。

卵泡由卵母细胞、颗粒细胞及卵泡膜细胞组成^[13]。卵泡内颗粒细胞位于卵母细胞透明带的外侧,可分为壁颗粒细胞、窦颗粒细胞和卵丘颗粒细胞,其旁分

泌甾体激素功能和细胞有丝分裂活性的表型异质。卵丘颗粒细胞与卵母细胞形成卵丘-卵母细胞复合物,随着窦腔发育、体积增大和颗粒细胞增殖,卵泡快速膨胀并移至卵巢表面,复合物完成生长、成熟,并在排卵时随着卵泡破裂与卵子一起释放。残存的颗粒细胞及卵泡膜细胞则分化为黄体。壁颗粒细胞分泌的 C 型利钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)和脑型利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)与卵丘颗粒细胞上的利钠肽受体 2(natriuretic peptide receptor 2, Npr2)结合,卵丘颗粒细胞环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)增高经细胞缝隙连接下调卵母细胞环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)降解,高浓度 cAMP 维持卵母细胞减数分裂停滞状态。排卵前,卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)与黄体生成素(luteinizing hormone, LH)协调作用于卵泡内颗粒细胞,降低 cAMP,卵母细胞恢复减数分裂,完成核成熟、胞质成熟,卵泡破裂并排卵,直到受精,第二极体分离排出,完成第二次减数分裂,提高了卵泡的发育潜能^[14]。当次级卵泡形成时,颗粒细胞产生雌激素(estrogen, E)、雄激素(androgen, A)和 FSH 的 3 种受体,并通过缝隙连接与邻近细胞相连,彼此间通过营养物质的交换和分子信号的传递调节卵子发生和卵泡发育成熟,影响卵母细胞的质量。

正常情况下,颗粒细胞决定着卵泡的结局,可能通过连接蛋白、激素和卵巢局部细胞因子等共同作用及多条信号通路,卵泡内颗粒细胞维持自噬和凋亡间的平衡,参与并调节卵泡的发育和闭锁,维持卵巢的正常功能^[3-7]。研究发现 LC3 蛋白主要在卵泡颗粒细胞中表达,表明自噬作用主要发生在颗粒细胞,并具有细胞特异性和区域特异性,且颗粒细胞自噬与凋亡具有很好的相关性和促性腺激素(gonadotropin, Gn)依赖性的特点^[11]。闭锁可以发生在卵泡发育的各个阶段。由于颗粒细胞在卵泡闭锁过程中最先发生自噬,形成自噬体积累并引起凋亡,所以推测颗粒细胞可能通过自噬进一步影响卵泡的发育和闭锁过程。TGF- β 超家族/Smad 信号通路在卵泡发育过程中发挥着重要的调控作用^[15]。Smad3 主要定位于体内窦前卵泡和早窦卵泡的未/低分化颗粒细胞中,在体外培养的颗粒细胞亦表达明显。研究发现 Smad3 能增加 LC3B II/LC3B I 比值,即 Smad3 过表达使 Bcl-2 蛋白表达水平明显增加,从而促进体外培养 SD 大鼠卵巢颗粒细胞自噬^[12]。Gao 等^[16]研究表明猪颗粒细胞的自噬活性增加能促进颗粒细胞孕激素的分泌,在哺乳动物卵泡发育过程中发挥着重要的调控作用。Gannon 等^[17]研究发现有毒物质如香烟烟雾,可能通过增加自噬体数量和增强卵泡颗粒细胞中 LC3 等自噬关键基因表达,导致小鼠卵泡数量减少,引起卵泡自噬和凋亡。

颗粒细胞自噬相对活跃,可以发生在卵泡发育的各个阶段,参与调节并贯穿卵泡发育、成熟及闭锁的全过程^[18-19]。亦有研究发现:行卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)治疗患者的卵丘颗粒细胞自噬水平越低,卵子成熟度越低,受精能力越差,受孕几率越低,胚胎质量越差^[20]。颗粒细胞自噬活性及凋亡状态,参与调控卵母细胞成熟及受精过程,影响卵子质量、卵子成熟度和受精能力,进而影响胚胎质量和妊娠结局。

3 颗粒细胞自噬与 PCOS 发病

根据流行病学统计,PCOS 约占无排卵性不孕的 70%,占育龄期妇女的 5.6%,是导致女性月经不调、排卵障碍性不孕的主要原因^[21]。其个体临床表现、生化指标、发病机制具有异质性,确切发病机制尚未阐明。卵泡发育异常是 PCOS 的最棘手问题,以窦状卵泡发育阻滞、早期生长卵泡数量增多和优势卵泡选择障碍导致的周期性无排卵为主要特征^[22]。卵巢多囊样改变:卵巢增大,包膜增厚呈白色,表面光滑;卵泡发育在窦中期闭锁,呈车轮状排列;颗粒细胞层逐渐退化、变薄,功能不良^[23]。研究发现:PCOS 大鼠颗粒细胞自噬率明显高于正常大鼠,颗粒细胞减少与自噬率增高具有相关性^[24-26]。

自噬的经典调节方式有 2 种,一种是 Beclin-1 与 Bcl-2、Vps34、Vps15 等形成蛋白复合体,调控细胞自噬;另一种是雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径, mTOR 是细胞自噬的负调控因子,其抑制剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA)通过下调 mTOR 表达,从而激活细胞自噬。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)/mTOR 通路与卵泡发育及细胞自噬都密切相关^[27-28]。饥饿、缺氧等应激条件下下调 PI3K/AKT/mTOR 通路, mTOR 下调诱导并激活细胞自噬。而体外培养大鼠颗粒细胞给予 FSH 或直接体内注射 FSH, AKT 磷酸化增加, FSH 介导的 S6K 磷酸化增加, LC3 II 表达下降。Sirt1-Foxo 自噬通路提高卵巢颗粒细胞抗氧化应激能力,因其异常可能引起卵泡闭锁。p53/AMPK 信号通路亦是调控细胞自噬的重要通路。p53 是一种人体肿瘤抑制因子,在细胞质和细胞核中对细胞自噬具有双向调节作用。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是生物能量代谢调节的关键分子。p53/AMPK 信号通路在调控卵泡颗粒细胞自噬中发挥着重要作用,对于恢复卵巢颗粒细胞数量,维持卵巢功能,平衡卵泡微环境自身稳态,促进 PCOS 卵泡发育成熟及排卵具有重要意义。

Beclin-1 和 Bcl-2 在细胞自噬和凋亡中具有重要的调节作用,二者受蛋白水平及磷酸化程度的影

响,双向调控细胞自噬活性水平,导致卵泡闭锁或者过度消耗^[29]。Beclin-1 蛋白参与早期自噬体的形成,通过与 Bcl-2 蛋白结合,下调细胞自噬活性水平;反之, Bcl-2 磷酸化降低了与 Beclin-1 蛋白的亲合力,通过增加游离 Beclin-1 蛋白水平,上调细胞自噬活性水平。研究发现 Beclin-1 mRNA 在 PCOS 患者颗粒细胞中呈高表达,并与获卵数、体质量指数(body mass index, BMI)呈弱正相关,即获卵数越多, BMI 越大,颗粒细胞自噬活性越高^[30]。且非妊娠 PCOS 患者自噬活性较妊娠 PCOS 患者更高,而游离雄激素、胰岛素或 BMI 与子宫内膜表达 Atg3、Atg4 呈负相关。最新研究表明行 ICSI 治疗的 PCOS 患者卵泡颗粒细胞自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg7 表达较非 PCOS 患者显著增高, Beclin-1 基因表达与血清、卵泡液睾酮(testosterone, T)和血清抗苗勒氏管激素(anti-mullerian hormone, AMH)水平呈显著正相关^[31]。颗粒细胞自噬异常活跃,且与 PCOS 患者高激素内分泌失调及血清 AMH 异常高表达密切相关,可能是 PCOS 发病的重要机制,但其参与 PCOS 卵泡发育及内分泌调控的作用机制和影响因素仍有待进一步阐明。另有研究表明 PCOS 患者颗粒细胞凋亡的发生率亦高于正常人群^[32]。颗粒细胞的凋亡与自噬密切相关,颗粒细胞可能通过自噬形成自噬体积累并引起凋亡,进一步影响 PCOS 患者卵泡发育。

据统计, PCOS 患者中 40% 存在自然流产史,且复发性流产的发病率明显增高, PCOS 患者行体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)治疗者卵子与胚胎质量显著下降,术后合并 OHSS 风险增高^[33-34]。颗粒细胞自噬率在 PCOS 患者中呈高表达,研究提示颗粒细胞自噬率过高, Atg 表达过强,可能是 PCOS 卵泡发育异常及性激素合成失调的重要影响因子,并与 PCOS 患者临床自然流产发生率增高和辅助生殖中发生 OHSS 风险增高密切相关^[24,33-34]。

维持颗粒细胞内环境自噬平衡,可作为治疗 PCOS 卵泡发育障碍和提高辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的新靶点。但诸多问题,如 BMI 是否通过颗粒细胞自噬影响卵母细胞质量, Beclin-1 mRNA 等自噬基因表达与 PCOS 患者受精率相关性及是否与采用 ICSI 方案有关等,仍有待进一步研究。此外,还可以通过营养缺乏、药物干预、自噬基因敲除、沉默或过表达等方法激活或抑制体外培养细胞自噬,进一步探索已知的 PCOS 发病、内分泌调控、卵泡发育、卵泡闭锁和卵子排出的影响因子和信号通路,与 PCOS 卵泡颗粒细胞过度自噬之间的关系。

4 中医药调控作用机制与理论研究

中医学无“PCOS”的病名,但根据临床表现将其

归属“不孕症”“闭经”“月经后期”“癥瘕”“崩漏”等范畴。中医现代医家认为其发病与肾、肝、脾关系密切,其中肾虚是根本病机,肝郁脾虚、七情内伤以致生殖轴功能失调是内在因素,痰湿、气滞、血瘀为标,属本虚标实之证。治疗总以补肾为要,辅以健脾疏肝,兼顾调理气血。中医“肾主生殖”理论认为肾精是产生卵子和孕育胎儿之根本,肾精化为肾气,肾阴为卵子成熟提供物质基础,肾阳为卵子排出提供内在动力。肾精肾气亏虚是卵子难以发育成熟及排卵功能障碍的根本原因^[35]。尤昭玲教授^[22]提出女性生殖以“卵巢”为本,PCOS性不孕卵泡发育异常病本在卵巢,以卵巢功能障碍以致卵泡发育时空方面异常为显著标志,形成了“助卵养泡”的重要学术思想和病、症、期、时相结合的PCOS整体诊治新思路,强调中医调泡的重点在卵泡期,治尤重肾,针对卵泡发育的时空规律和特性,捕捉生长卵泡,把握调泡时限。

现代研究主要从生殖内分泌调控、卵巢旁/内分泌调控、卵泡代谢组学、细胞凋亡等多方面探索了中医药促卵泡发育、改善卵巢功能的作用机制。研究证实补肾中药可通过促进卵泡发育,抑制颗粒细胞凋亡,减少卵泡闭锁,改善卵巢功能,延缓卵巢衰老等,进而改善各种临床症状。近年来,越来越多学者将细胞自噬与中医学相联系,基于“肾主生殖”“肝主疏泄”“阴阳平衡”等中医理论,开展细胞自噬与中医理论、中药临床疗效的相关性研究。黄贵华等^[36]认为正常人体内细胞自噬维持在较低水平的自稳状态。在营养缺乏、情志刺激等不良因素影响下,机体激活细胞自噬,降解衰老受损的亚细胞器和错误折叠的蛋白质,供给细胞能量和合成底物,从而促进细胞存活。相当于中医痰瘀情况下,通过“精化气”,以发挥气的推动和防御功能,恢复体内阴阳平衡;祛瘀化痰以消除内生实邪,维持机体生命活动和自我保护。若“精气转化”功能失调,细胞过度自噬或自噬不足,将导致“阴阳离决”。白俊等^[37]从“肾主生殖”理论与细胞自噬对卵泡发育和闭锁调控的相关性出发,认为肾精肾气充足,颗粒细胞和卵母细胞自噬与凋亡比例平衡,卵泡发育成熟并能顺利排卵。段恒等^[38]研究比较并证实了毓麟珠、温胞饮、养精种玉汤等经典补肾名方改善IVF-ET中小鼠卵细胞质量,促进卵细胞成熟,其中补益肾气的毓麟珠作用最为明显。谈勇教授^[39]基于中医“肾主生殖”和夏桂成教授“补肾调整月经周期节律”理论,经后期用滋阴方以补精血,经前期用补阳方以补肾阳,序贯治疗PCOS,临床疗效显著,且研究证实其含药血清通过提高颗粒细胞培养上清液中雌二醇(estradiol,E2)水平,可以改善PCOS大鼠颗粒细胞分泌功能,通过下调卵泡期干细胞因子(stem cell factor,SCF)基因高表达,调控PCOS卵泡发育及内分泌功能并具有一定的量效

关系,为治疗PCOS排卵障碍提供了实验依据。邢玉等^[40]最新研究以自噬诱导剂C2-神经酰胺和丙酸睾酮(testosterone propionate,TP)作用于颗粒细胞,模拟PCOS的高雄激素水平并建立了PCOS颗粒自噬模型。研究发现:补肾健脾、活血通利中药通过p53调控细胞自噬相关基因,发挥其抑制颗粒细胞自噬作用优势,从而降低PCOS大鼠颗粒细胞过度自噬。研究表明补肾中药能抑制卵巢颗粒细胞的凋亡和过度自噬,减少卵泡闭锁,改善卵巢储备功能或PCO状态,调节血清内分泌性激素水平,恢复卵巢颗粒细胞数量,从而维持卵巢功能,促进卵泡发育^[30,41]。

PCOS发病机制复杂,临床表现多态,阐明PCOS患者高雄激素、高胰岛素、高AMH水平、BMI水平与颗粒细胞过度自噬的相关性,揭示补肾中药维持颗粒细胞自噬平衡与调控卵泡发育的环节、靶点和量效关系,从而纠正PCOS患者内分泌代谢紊乱、促进卵泡发育和排卵的作用机制,有望成为中医药诊治PCOS的新突破,并在中医药ART中发挥重要作用。

5 小结与展望

细胞自噬可能发生在卵泡发育的各个阶段,具有Gn依赖性和细胞特异性。颗粒细胞自噬稳态平衡以维持正常人体卵巢功能,参与调控卵泡发育,影响胚胎质量和妊娠结局。PCOS颗粒细胞自噬活性过高,Atg表达过强,与PCOS卵泡发育异常、内分泌代谢紊乱、临床自然流产率高和ART中发生OHSS风险率高密切相关,可能是PCOS发病的重要机制,但其影响因子和路径有待进一步研究。补肾中药通过抑制PCOS颗粒细胞过度自噬,改善卵巢多囊状态,调节卵泡发育和生殖内分泌功能,从而维持机体的阴阳平衡,但具体作用机制亟待进一步阐明。完善PCOS细胞自噬模型,探索卵泡颗粒细胞自噬通路,开展细胞自噬调控机制与中医理论、临床疗效、作用靶点、物质基础、影响因子和信号通路等相关性研究,揭示中医药治疗PCOS、促卵泡发育的分子机制对卵泡内细胞自噬活性、自噬基因及信号通路的影响,从新的视角进一步阐明PCOS发生、发展中潜在的分子机制和中医药防治PCOS、干预卵泡发育的作用机制。其结果可能为我们探索PCOS、不孕症、卵巢早衰及卵泡发育异常等妇科疑难病症诊疗方法提供新的思路,并丰富中医“肾主生殖”“阴阳平衡”理论的科学内涵。

参考文献:

- [1] 乐杰,谢幸,林仲秋,等.妇产科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] YABA AYLIN, DEMIR NECDET. The mechanism of mTOR

- (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2012, 5(1):38.
- [3] ZHOU J L, YAO W, LIU K Q, et al. MicroRNA let-7g regulates mouse granulosa cell autophagy by targeting insulin-like growth factor 1 receptor[J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016, 78: 130-140.
- [4] CHOI J, JO M, LEE E, et al. Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells[J]. *Fertility & Sterility*, 2011, 95(4): 1482-1486.
- [5] HULAS-STASIAK M, GAWRON A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(10): 967-975.
- [6] GAWRILUK T R, KO C, HONG X M, et al. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(40): E4194-E4203.
- [7] ZHOU J L, YAO W, LIU K Q, et al. MicroRNA let-7g regulates mouse granulosa cell autophagy by targeting insulin-like growth factor 1 receptor [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 78(9):130-140.
- [8] QIN H D, TAN W G, ZHANG Z, et al. 15d-prostaglandin J(2) protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury: involvement of inhibiting autophagy through upregulation of Bcl-2[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2015, 35(3):303-312.
- [9] 李蓉蓉, 殷先利, 李俊军, 等. MAP1LC3B 表达促进结肠癌侵袭转移的体外研究[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(2):152-156.
- [10] 吴春丽, 郭燕君, 徐海琦, 等. 自噬与哺乳动物卵泡闭锁[J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(9):1397-1404.
- [11] 郭燕君, 徐 营, 刘胜兵, 等. LC3 蛋白在小鼠卵泡颗粒细胞中的表达及定位研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(9):1690-1695.
- [12] 申春艳, 董静霞, 徐 健. Smad3 促进大鼠卵巢颗粒细胞自噬[J]. *解剖学报*, 2014, 45(1):109-113.
- [13] 吴玉萍, 赵苗苗, 周玉霞, 等. 颗粒细胞在卵母细胞发育成熟中的作用[J]. *国际生殖健康*, 2017, 36(6):503-506.
- [14] ZHANG J, WEI Q, CAI J, et al. Effect of C-Type Natriuretic peptide on maturation and developmental competence of goat oocytes matured in vitro[J]. *Plos One*, 2015, 10(7): e0132318.
- [15] 黄金珠, 黄 昕, 傅春华. 通脉大生片对肾虚排卵障碍型不孕大鼠卵巢 P-Smad3 表达水平影响研究[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(4): 990-992.
- [16] GAO H, LIN L, HAQ I U, et al. Inhibition of NF- κ B promotes autophagy via JNK signaling pathway in porcine granulosa cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473(1):311-316.
- [17] GANNON A M, STAMPFLI M R, FOSTER W G. Cigarette smoke exposure leads to follicle loss via an alternative ovarian cell death pathway in a mouse model[J]. *Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2012, 125(1): 274-284.
- [18] 胡 蓉. 抗苗勒氏管激素对干细胞因子负调控分子机制的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [19] 谢 敏, 姜法贵, 郭燕君. 卵泡发育和闭锁过程中颗粒细胞自噬和凋亡关系的研究[J]. *四川生理科学杂志*, 2015, 37(2):85-88.
- [20] 罗 嘉, 宋英伟, 徐艳霞, 等. ICSI 治疗患者卵丘颗粒细胞自噬活性对卵母细胞质量的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(14):2198-2210.
- [21] MARCH W A, MOORE V M, WILLSON K J. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria[J]. *Human Reproduction*, 2010, 25(2): 544-551.
- [22] 杨 硕, 尤昭玲. 尤昭玲教授诊疗 PCOS 性不孕卵泡发育异常经验总结[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5):1312-1315.
- [23] 杜慧兰. 中西医结合妇产科学[M]. 3 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016:137.
- [24] 佟 庆, 金 哲, 沈喜萍. 多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬率的相关研究[J]. *疑难病杂志*, 2011, 10(5):364-365.
- [25] 张信贤. Beclin1 mRNA 和 Atg5 mRNA 在多囊卵巢综合征患者冠丘颗粒细胞中的表达及其意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [26] SUMARAC-DUMANOVIC M, APOSTOLOVIC M, JANJETOVIC K, et al. Downregulation of autophagy gene expression in endometria from women with polycystic ovary syndrome[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2017, 440:116-124.
- [27] HUNZICKER-DUNN M E, MAIZELS E T. PKA and GAB2 play central roles in the FSH signaling pathway to PI3K and AKT in ovarian granulosa cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(44):2979-2988.
- [28] 刘慧萍, 曾柳庭, 张国民, 等. 颗粒细胞与卵母细胞自噬对卵泡发育和闭锁的调控[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2017, 37(1):67-74.
- [29] 王 灿, 廖海燕, 刘慧萍, 等. 自噬机制与卵巢早衰的关系[J]. *生殖与避孕*, 2016, 36(8):637-641.
- [30] 白 俊, 郝然然, 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.
- [31] 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.
- [32] 王 伟, 徐忠东, 陶瑞松. 肿瘤发生过程中自噬与凋亡关系的研究[J]. *合肥师范学院学报*, 2011, 29(6):83-85.
- [33] RASHAD N M, EL-SHAL A S, ABDELAZIZ A M. Association between inflammatory biomarker serum procalcitonin and obesity in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2013, 97(2): 232-239.
- [34] MENDOZA N, ABAD P, BARO F, et al. Spanish Menopause Society position statement: use of tibolone in postmenopausal women[J]. *Menopause—the Journal of the North American Menopause Society*, 2013, 20(7): 754-760.
- [35] 孙维峰, 梁 静, 张娴娴, 等. 补肾活血化痰法治疗多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的临床研究[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(9):2018-2020.
- [36] 黄贵华, 纪云西, 吴大力, 等. 细胞自噬与中医气虚痰瘀关系探讨[J]. *中医杂志*, 2011, 52(20):1717-1719.
- [37] 白 俊, 吴克明, 郝然然. 基于“肾主生殖”探赜细胞自噬机制与卵泡发育的微观联系[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(5):921-925.
- [38] 段 恒, 周 滢. 不同补肾复方对小鼠卵细胞质量的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(1):76-77.
- [39] 赵 娟, 童星丽, 王 勇, 等. 滋阴补阳序贯法对多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞分泌功能及干细胞因子基因表达的调控[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(4):963-967.
- [40] YU XING, YAN-XIA LIU, XIN LIU, et al. Effects of Gui Zhu Yi Kun formula on the P53/AMPK pathway of autophagy in granulosa cells of rats with polycystic ovary syndrome [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 13(6): 3567-3573.
- [41] 阳松威, 郭建生, 王晓倩, 等. 补肾疗更浸膏延缓老年小鼠卵巢功能衰退的实验研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(5):613-618.