

·综述·

本文引用:黄姗姗,刘慧萍,张韞玉,陈镇,张楚洁,付慧兰,肖小芹.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.

卵巢颗粒细胞自噬与PI3K/AKT/FOXO3a信号通路的相关性

黄姗姗,刘慧萍*,张韞玉,陈镇,张楚洁,付慧兰,肖小芹*
(湖南中医药大学,湖南长沙410208)

[摘要] 细胞自噬是哺乳动物细胞物质代谢的一个重要机制,与细胞凋亡共同参与卵巢卵泡的发育和闭锁,并发挥重要的作用。近年研究发现,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号通路参与卵巢疾病的发生。PI3K和AKT的过度激活可使原始卵泡过早发育以及卵泡过快凋亡,卵巢颗粒细胞作为卵泡发育重要的支持细胞,其功能的减退或凋亡很可能引发一系列女性内分泌方面的疾病。FOXO3a转录因子是PI3K/AKT信号通路下游的重要靶蛋白之一,参与抗增殖和凋亡。本文就关于卵巢颗粒细胞自噬与PI3K/AKT/FOXO3a信号通路的相关进展加以综述。

[关键词] 卵巢;卵泡;颗粒细胞;自噬;PI3K/AKT/FOXO3a信号通路

[中图分类号]R711.75 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.023

Correlation Between Ovarian Granulosa Cell Autophagy and PI3K/AKT/FOXO3a Signaling Pathway

HUANG Shanshan, LIU Huijing*, ZHANG Yunyu, CHEN Zhen, ZHANG Chujie, FU Huilan, XIAO Xiaoqin*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] Autophagy is an important mechanism of material metabolism in mammalian cells. Together with apoptosis, it plays an important role in the development and atresia of ovarian follicles. In recent years, it has been found that phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway is involved in ovarian diseases. Excessive activation of PI3K and AKT can lead to premature development of primordial follicles and excessive apoptosis of follicles. As important supporting cells of follicular development, the functional decline or apoptosis of ovarian granulosa cells may lead to a series of female endocrine diseases. As one of the most important target proteins in the downstream of PI3K/AKT signaling pathway, FOXO3a transcription factor is involved in anti-proliferation and apoptosis. This paper reviewed the progress in the correlation between ovarian granulosa cells autophagy and PI3K/AKT/FOXO3a signaling pathway.

[Keywords] ovary; follicle; granulosa cells; autophagy; PI3K/AKT/FOXO3a signaling pathway

卵巢是女性重要的生殖内分泌器官,产生卵细胞和分泌性激素,因此它兼具生殖与内分泌这两种功能。颗粒细胞(granulosa cell, GC)是卵泡的主要功能细胞之一,通过缝隙连接围绕在卵母细胞周围,

[收稿日期]2018-09-17

[基金项目]国家自然科学基金项目(81303123);湖南省自然科学基金面上项目(2018JJ2299);湖南省教育厅创新平台项目(18K069);湖南省中医药科研计划项目重点项目(201801,201815,201495);湖南省教育厅科研项目(17C1219);国家级大学生研究性学习与创新性实验计划项目(201810541001);湖南省大学生研究性学习与创新性实验计划项目(2016-281,2018-400);湖南中医药大学大学生研究性学习与创新性实验计划项目(2017-2,2016-6)。

[作者简介]黄姗姗,女,在读硕士研究生,主要从事女性内分泌疾病病机研究。

[通讯作者]*刘慧萍,女,医学博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:1074983953@qq.com;肖小芹,男,医学博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:705500732@qq.com.

它在卵泡的发育、成熟及闭锁过程中起着重要作用^[1]。近年来,随着对卵巢微环境调节机制研究的深入,国内许多学者意识到颗粒细胞的功能变化对卵泡的生长发育及成熟起着决定性作用。通过大量的实验研究,人们发现自噬这种程序性死亡的方式,区别于细胞凋亡的地方,在于对机体内环境的一个调节作用,并与癌症、感染、神经退行性疾病、炎症以及代谢性疾病密切相关^[2]。由于分子生物学及其相关领域的不断扩展,研究人员先是在酵母中发现一些与自噬有关的分子机制,之后又在哺乳动物之中发现了相似的分子机制^[3-4]。

1 颗粒细胞自噬在卵泡发育中的相关作用

生理性的自噬贯穿了细胞的整个自我修整与恢复的过程,通过清理掉内部无用的或者不被需要的部分,来完成细胞的自身代谢以及其中某些重要细胞器的一个更新,并防止细胞的异常死亡,维持细胞、组织和器官之间的稳态与平衡,以此来确保机体的健康状态^[5]。而且,自噬作为细胞内物质再循环的重要途径之一,不仅有利于细胞的存活^[6],还在卵巢的胚胎发育、卵巢的疾病中起着重要作用^[4,7-8]。

卵泡是维持卵巢功能的物质基础,卵泡发育的任何一个环节受阻,都会影响到女性生殖和内分泌功能。颗粒细胞是卵泡发育最早的细胞之一,可分泌某些激素受体来刺激卵母细胞使其开始发育^[9-10]。它与卵母细胞,与卵泡膜细胞之间互相作用,影响卵泡的生长,其中,与后者之间的互相作用对卵泡的正常发育以及功能的正常运转也非常重要。而且原始卵泡的发育也有赖于颗粒细胞的生长与分化,再者生长期的卵泡发育和闭锁也是颗粒细胞经过受体介导的信号转导途径去调节^[11-12],使颗粒细胞在卵泡的生长过程中发挥重要的调节作用。颗粒细胞与卵泡膜细胞之间也可以合成,并且释放出相关激素,如性激素、抑制素等,卵母细胞则会释放出与生长和分化有关的一些因子,如生长分化因子-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)、骨形态发生蛋白-15(bone morphogenetic protein-15, BMP-15)等,其中, GDF-9 可以通过抑制颗粒细胞的凋亡和卵泡闭锁,来促进卵泡的生长和增殖;如果 GDF-9 的表达下调,则可以促进半胱天冬酶-3(Caspase-3)的活化和颗粒细胞的凋亡^[13]。而且激活素 A(Activin A),作为一种由颗粒细胞分泌的肽类物质,不但可以推进颗粒细胞的发育和增长^[14],对卵泡的一个生长、排卵和黄体的形成也很关键。一旦这些因子发生了突变,

就可能表现出卵泡的发育障碍,或者是说出现卵泡的一个提前闭锁的情况^[15]。

卵泡闭锁可分为早期的卵泡闭锁和晚期的卵泡闭锁,在部分卵泡细胞内会观察到自噬体,它包含细胞膜的结构、羊毛状物质以及降解的线粒体,这些细胞内形态有利于晚期卵泡闭锁的鉴别^[16]。有研究表明,卵泡闭锁与细胞凋亡有一定的关联,颗粒细胞作为细胞凋亡的主要靶细胞,可诱导颗粒细胞自噬^[17-18]。而且卵巢功能受损具有隐匿性,被发现时往往已经处于衰竭状态^[19-20]。在相关分子机制中,Silva 等^[21-22]报道表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和其家族成员之一的 EGFR 在羊卵巢上皮表面和卵巢黄体及卵巢卵泡均有表达。Zhao F 等^[23]研究发现,沉默信息调节因子 1(silent information regulator1, SIRT1) 蛋白也许能够通过推动颗粒细胞的凋亡来参与到猪卵泡闭锁的调节控制之中。胡卫红等^[24]研究了患有多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)的患者,就卵巢颗粒细胞的表达调控,来证明雄激素和胰岛素可以调节卵巢颗粒细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 的表达,并得出结论,PPAR γ 的异常表达可能与 PCOS 患者的内分泌失调和排卵障碍有关。并且在 PCOS 患者中,由于卵泡发育障碍,颗粒细胞分泌较少,缺乏芳香化酶的活性,促卵泡生成刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)的活性阻遏,没有足够多的雌二醇(E₂),容易导致 PCOS 患者的高雄激素血症^[25]。宋翠森等^[26]发现排卵前孕酮(progesterone, P)的分泌受到抑制,可能会阻止促黄体生成素(luteotropic hormone, LH)峰前的 P 水平过早升高和卵泡过早黄素化、卵泡闭锁以及未破裂卵泡黄素化综合征的发生有重要生理意义。

2 PI3K/AKT/FOXO3a 信号通路

PI3K/AKT 信号通路被认为是与多种人类疾病相关的一条通路^[27]。它是细胞增殖调控的重要通路之一,主要是通过促进细胞增殖来抗凋亡。PI3K 由催化亚基(p110)和调节亚基(p85)组成。一旦 PI3K 激活,它的产物 PI-3,4-P₂ 和 PI-3,4,5-P₃ 将会与 AKT 的 PH 区进行连合,让 AKT 从细胞质到了细胞膜,并且改变它的结构。在丝氨酸 473(Serine 473, Ser473)以及苏氨酸 308(Threonine 308, Thr308)这两个关键点磷酸化激活,更重要的是,这两个位点的磷酸化还是 AKT 被激活过程中不可或缺的环节^[28]。信号传导

通路的级联反应也被 AKT 的活化所促进引导,也让一些下游的靶蛋白开始出现磷酸化反应,例如,叉头框蛋白(Forkhead box, FOX)家族成员之一的 FOXO3a 蛋白参与了抗增殖和凋亡;雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)控制蛋白之间的生物合成,调节细胞生长;p27 蛋白则维持原始卵泡储量等^[29-30]。研究表明,自噬能被 PI3Ks 家族中的 PI3K-I 与它下游的 AKT 用激活 mTOR 来约束压制,这主要是用激活 AKT 来加强 PI3K/AKT 信号通路,让 mTOR 抑制结节性硬化症基因 2(TSC2),致使 mTOR 被活化,来控制自噬的发生^[31]。在研究肿瘤的发生和发展机制时,观察到细胞的活性被 PI3K/AKT 信号通路经由磷酸化多种底物而变化,并通过这种方式,进一步推动了肿瘤细胞的生长与增殖,还抑制了细胞的凋亡^[32-33]。该通路的抗细胞凋亡机制,主要是 AKT 被激活之后通过凋亡相关程序的直接磷酸化,又或者是编码的凋亡相关程序基因表达水平的一个间接改变,来控制凋亡过程^[34]。人们通过使用多种基因修饰的小鼠,或者通过对大鼠进行造模,来对卵巢相关的生理和病理过程中 PI3K 信号通路实行了一系列的研究,发现它不仅参与了卵泡的发育、排卵,还参与到了卵巢肿瘤的发展过程之中^[29]。

叉头框蛋白是广泛分布于酵母和人类的一类转录因子,包括 17 个亚族,研究最多的是 O 亚家族,FOXO 家族的四个成员分别是 FOXO1、FOXO3a、FOXO4 和 FOXO6^[35]。作为重要成员之一,FOXO3a 蛋白参与了重要生命过程的调控,如细胞的增殖、生长、分化、凋亡以及衰老^[36-37]。FOXO3a 是 PI3K/AKT 通路下游重要转录因子之一,磷酸化的 PI3K 激活 AKT,被激活的 AKT 进而磷酸化 FOXO3a,磷酸化后的 FOXO3a 特异性结合细胞核内的结构蛋白 14-3-3,并从细胞核转移到细胞浆中,通过泛素化降解,丧失正常的转录活性,细胞凋亡将会降低;而当 AKT 途径受到抑制时,大部分去磷酸化的 FOXO3a 进入了细胞核并加速细胞凋亡^[38]。有研究者建立了大鼠脑缺血模型,通过检测 FOXO3a 的表达情况以及海马区神经细胞凋亡的情况,证实了 FOXO3a 的磷酸化受 PI3K/AKT 通路的调节^[39]。同样,有研究人员在体外培养人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞时,通过对 FOXO3a 表达的观察,来研究它对这两种细胞是否有增殖和凋亡的影响。通过进一步的研究发现,PI3K/AKT 信号通路的活性一旦被抑制,人鼻咽癌 CNE-1 和 CNE-2 的表达将会出现上调的现象,并

改变细胞中 FOXO3a 的表达,结果证明,它不仅控制了细胞的增殖,还诱导了细胞的凋亡^[40]。

3 卵巢颗粒细胞自噬与 PI3K/AKT/FOXO3a 信号通路

PI3K/AKT 作为调节自噬的经典信号传导通路,有研究表明,颗粒细胞经由 PI3K/AKT/mTOR 的途径来介导自噬,进一步的调整控制卵泡发育和卵泡闭锁,并给性未成熟时期的大鼠注射促性腺激素,以此控制大鼠在卵泡发育时期卵泡中颗粒细胞的自噬,来抑制细胞的凋亡^[41]。研究还表明,微管相关蛋白 3 (Light Chain 3, LC3) 是自噬相关基因 8 (Autophagy-related 8 genes, Atg8) 同源基因之一,主要表达于卵泡颗粒细胞中,由于细胞的特异性,自噬主要出现在颗粒细胞中^[42]。这些表明 PI3K/AKT/mTOR 途径参与了颗粒细胞自噬。而且自噬基因 Beclin-1 对维持人体黄体细胞和卵巢雄激素分泌细胞的寿命起着重要的调控作用,并通过维持自噬水平来促进细胞存活^[43]。Beclin-1 还能和 PI3K/AKT 信号通路中 PI3K-III 受体结合,在自噬早期阶段发挥着重要作用,并参与早期自噬体的形成^[44]。而 Bcl-2 蛋白的作用则与 Beclin-1 的相反,通过和 Beclin-1 的结合来抑制它对自噬活性的一个推进作用^[45-46]。并且当细胞的营养供给缺乏时会活化 PI3K/AKT 这条途径。王伟等^[47]研究发现,自噬水平能通过 PI3K/AKT 途径的活化来提升,还能推动细胞对自身代谢部分的吸收,给细胞的生存与运动供应能量。

同样的,PI3K/AKT 信号传导通路下游的 FOXO3a 转录因子的磷酸化/去磷酸化,也可以影响细胞自噬和细胞凋亡的水平。通过研究发现^[48],经过多种方式唤醒哺乳动物中胰岛素信号通路之后,因为 AKT 的磷酸化,FOXO3a 的功能受到抑制,细胞中的 FOXO3a 被灭活,调控细胞的发育和代谢的作用也会失效^[49]。换过来说,AKT 和它的下游分子也能被 FOXO3a 进行负调节,而且内源性的 AKT 和 FOXO3a 也能组成复合体,它们的表达状态能促使细胞凋亡^[50-51]。同样,细胞凋亡因子能被活化后的 FOXO3a 上调,通过调节前凋亡蛋白 Bim 来调控细胞周期,以此来推动细胞的凋亡以及周期阻滞^[52]。FOXO3a 还可以改变细胞核中 p27kip 和细胞周期蛋白 D 的表达,使细胞不再活跃,卵泡不再发育。研究还发现,敲除了 FOXO3a 基因的小鼠在出生后 3 周左右显示出原始卵泡的大量启动,进而出现促性腺激素水平降低、

原始卵泡耗竭以及早期不孕等情况^[53]。

FOXO3a 在卵巢卵母细胞及卵泡发育中起着重要的调节作用^[50],使细胞发生自噬活动,并出现细胞的免疫性异常死亡^[54]。有研究显示,FOXO3a 可能通过 SCF-PI3K-FOXO3a-p27kip1/Bim 通路介入新生大鼠卵巢中裸露卵母细胞及原始卵泡卵母细胞凋亡的调节^[55]。而且 FOXO3a 在卵泡的激活中也起着很重要作用,研究证明,尽管 FOXO3a(DAF-16 同源基因)雌性小鼠处在性成熟正常的阶段,但是原始卵泡已经在性成熟之前就被激活了,相关机制尚未明确,作为 PI3K 的下游分子,其与自噬的改变极有可能息息相关^[56]。另有研究发现, E_2 的参与,可能使颗粒细胞 FOXO3a 的表达下调,并激活下游调控因子 AKT,并且由于 AKT 对 FOXO3a 的磷酸化,使得 FOXO3a 的表达显著降低,最终抑制细胞凋亡^[57]。

然而,还有一些研究发现,自噬可诱导细胞死亡^[58],B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 下调可诱导自噬,转染 Bcl-2 反义 mRNA 的白血病原髓细胞几乎不再生。通过电子显微镜观察发现,一些细胞死亡是由自噬引起的,与凋亡没有关系^[59]。佟庆等^[60]在 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬率的相关研究中,证明了卵巢颗粒细胞的减少会直接影响卵泡的发育,而且在窦状卵泡阶段的时候就有大多数卵泡不再发育,并大胆假设 PCOS 大鼠的颗粒细胞可能出现有过度自噬的情况。也就是说,在某种情况下,自噬过度可能会出现一些病理状态,如颗粒细胞死亡。研究发现,在促性腺激素依赖性大鼠的卵巢卵泡闭锁中,自噬体的蓄积能经由降低凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达和下游 Caspase-3 的活化使得卵巢颗粒细胞凋亡^[44],但是其机制还有待进一步的研究。隋旭霞在前期的研究中发现^[61],FOXO3a 转录因子在新生大鼠卵巢卵母细胞巢中的一些卵母细胞和一些原始卵泡的卵母细胞中出现高表达。此外,FOXO3a 高表达的阳性细胞率和卵母细胞凋亡率基本相同。后期的研究猜测,FOXO3a 可能同步诱导促凋亡蛋白 Bim 和 FasL,出现高表达,激活下游细胞凋亡途径,并引起卵母细胞凋亡^[62]。杨竹^[63]发现,在没有 FOXO3a 的雌性小鼠中,特征性卵巢表型,即球型卵泡,一旦被激活,就会导致卵母细胞死亡。Fu Y 等^[64]研究发现,褪黑素(10-7M)能够向下调节 P53 的表达,向上调节 Bcl-2 和 LHR 基因的表达,以此来减少应激条件下给绵羊卵巢颗粒细胞造成的负面影响。

综上所述,一旦转录因子出现异常,颗粒细胞的自噬水平就有可能被升高或降低,而且颗粒细胞内

的 PI3K/AKT/FOXO3a 信号通路对卵泡的生长和成熟也有至关重要的作用^[65-66]。

4 其他

FOXO 可通过调节 SIRT1 的去乙酰化,在调节自噬中发挥重要作用,并且 SIRT1-FOXO 介导的细胞自噬在氧化应激中也起着一定的作用^[67]。SIRT1 不仅能够增强 FOXO3a 引导细胞周期停滞和应对氧化应激损害的“本领”;还能够控制 FOXO3a 引导细胞死亡的“本领”。并且原始卵泡的发育也能通过 FOXO3a 的激活来调控,并让它们维持原始形态,减少转变为成熟卵泡的数目,并通过减少卵泡中颗粒细胞的凋亡,来维持卵巢中卵泡的储备以及延缓卵巢的退化^[51]。

5 展望

自噬发生在卵泡的各个发育阶段,并参与卵巢疾病的发生和发展,PI3K/AKT 信号通路作为与卵泡发育相关联的一个重要信号通路,对其相关因子的研究已经成为治疗女性内分泌疾病的一个有力的研究方向。通过近些年的研究,人们在卵母细胞和颗粒细胞中,发现存在有完整的 PI3K/AKT 信号系统,它们不仅可以调节卵母细胞的生长,促进原始卵泡的生存和发育,还可以推动颗粒细胞的增殖与分化,并且能抑制细胞的凋亡,这些对于卵巢发育和生理性的维稳都有着非常重要的作用^[9]。有研究表明,FOXO3a 对于雌性动物卵泡的发育调控、颗粒细胞自噬以及卵巢功能调控的研究还在继续,对调节 FOXO3a 之后是增殖还是延缓卵泡的发育,研究的结论也不尽相同^[68-69]。但是,充分了解颗粒细胞自噬的相关机制对卵巢疾病的发生、发展、治疗以及预后有重大意义,也有很大的发展空间,值得我们进一步去探索。

参考文献

- [1] 王健宏,周慧芳.中药干预对卵巢颗粒细胞分泌相关因子表达影响的研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(4):593-596.
- [2] LEVINE B, PACKER M, CODOGNO P. Development of autophagy inducers in clinical medicine[J]. The Journal of clinical investigation,2015,125(1):14-24.
- [3] KLIONSKY D J, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. Autophagy,2016,12(1):1554-8627.
- [4] 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.
- [5] 张 慧,张 宏.自噬:细胞自身物质更新代谢的重要机制[J].科学

- 通报,2016,61(36):3903-3906.
- [6] DERETIC V, KLIONSKY D J. How cells clean house[J]. Scientific American Magazine, 2008,298(5):74-81.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] ORISAKA M, MIZUTANI T, TAJIMA K, et al. Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle[J]. Molecular Reproduction & Development, 2006,73(6):737-744.
- [10] 梅 巧.滋勒调经汤对大鼠卵巢颗粒细胞增殖和分泌的影响[D].南宁:广西中医药大学,2016.
- [11] TIWARI M, PRASAD S, TRIPATHI A, et al. Apoptosis in mammalian oocytes:a review[J]. Apoptosis,2015,20(8):1019-1025.
- [12] CHAUBE S K, SHRIVASTAV T G, PRASAD S, et al. Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes [J]. Open Journal of Apoptosis, 2014,3(3):52-58.
- [13] 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.
- [14] 王小玉,葛资宇,陈明辉,等.补肾中药调节卵泡发育应用研究[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(9):120-122.
- [15] 张 群.miR-181a 通过激活素受体 2a 抑制小鼠卵巢颗粒细胞增殖[A].中华医学会、中华医学会生殖医学分会.中华医学会第六次全国生殖医学学术会议专刊[C].北京:中华医学会、中华医学会生殖医学分会,2012:1.
- [16] 张文静,杜 晶,张慧琴.卵巢早衰相关基因突变的最新研究进展[J].生殖与避孕,2009,29(2):96-99.
- [17] TRIPATHI A, SHRIVASTAV T G, CHAUBE S K. An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (Azadirachta indica) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat[J]. International Journal of Applied Basic Medical Research,2013,3(1):27-36.
- [18] CHAUBE S K, SHRIVASTAV T G, PRASAD S, et al. Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes [J]. Open Journal of Apoptosis,2015,3(3):52-58.
- [19] 赵 倩,叶 宸,李 文.卵巢早衰的研究现状与进展[J].生殖与避孕,2014,34(1):59-64.
- [20] 刘慧萍,尤昭玲,张国民,等.补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵泡凋亡相关蛋白的影响[J].湖南中医药大学学报,2012,32(5):28-31,42.
- [21] SILVA C M, CASTRO S V, FAUSTINO L R, et al. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the in vitro development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles[J]. Research in Veterinary Science,2013, 94(3):453-461.
- [22] SILVA J R, VAN D H R, FIGUEIREDO J R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries[J]. Zygote, 2006,14(2):107-117.
- [23] ZHAO F, ZHAO W, REN S, et al. Roles of SIRT1 in granulosa cell apoptosis during the process of follicular atresia in porcine ovary[J]. Animal Reproduction Science, 2014,151(1-2):34-41.
- [24] 胡卫红,陈 琳,同 军,等. PPAR γ mRNA 在卵巢颗粒细胞的表达调节及与多囊卵巢综合征的相关性[J].北京大学学报(医学版), 2013,45(6):859-863.
- [25] 杨正望,文炯,张增玲.补肾化痰方对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 CYP450 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(1):30-32,39.
- [26] 宋翠森,杨宏敏,陆 君,等.补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSH/cAMP-PKA 通路的影响[J].中国中西医结合杂志,2014,34(3):317-323.
- [27] 王 维,张王列.PI3K/AKT 信号转导通路的研究进展[J].现代医药卫生,2010,26(7):1051-1052.
- [28] 裴艳宏,刘坤祥.FOXO3a 转录因子的研究进展[J].泰山医学院学报,2013,34(4):318-320.
- [29] 杨 静,梁嘉丽,秦佳佳.PI3K/Akt 信号通路在卵巢早衰相关性的研究进展[J].现代妇产科进展,2016,25(2):156-158.
- [30] 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,2013,147(1):73-80.
- [31] CHEN N, KARANTZA V. Autophagy as a therapeutic target in cancer[J]. Cancer Biology & Therapy, 2011,11(2):157-168.
- [32] 武博荣,金 萌,王卫真,等.PI3K/AKT 信号通路在肿瘤调控中的免疫作用及分子机制[J].临床合理用药杂志,2013,6(16):135-137.
- [33] 严冬梅,邓 莉,张春燕,等.PI3K/AKT 抑制剂对内质网应激下游癌细胞 MEK/ERK 途径的影响[J].泸州医学院学报,2012,35(2):127-129.
- [34] 张毅敏,于 斌,陈 佳,等.针刺治疗对卵巢早衰大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J].中国针灸,2015,35(1):53-58.
- [35] FANG L, WANG H, ZHOU L, et al. Akt-FOXO3a signaling axis dysregulation in human oral squamous cell carcinoma and potent efficacy of FOXO3a-targeted gene therapy[J]. Oral Oncology,2011,47(1):16-21.
- [36] 赵 笛.基于 FOXO3a 转录因子探讨二仙汤对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护机制[D].北京:北京中医药大学,2017:28-32.
- [37] NHO R S, HERGERT P. FoxO3a and disease progression.[J]. World Journal of Biological Chemistry,2014,5(3):346-354.
- [38] PENG K, LI Y, LONG L, et al. Knockdown of FoxO3a induces increased neuronal apoptosis during embryonic development in zebrafish[J]. Neuroscience Letters, 2010,484(2):98-103.
- [39] JOVER-MENGUAL T, MIYAWAKI T, LATUSZEK A, et al. Acute estradiol protects CA1 neurons from ischemia-induced apoptotic cell death via the PI3K/Akt pathway[J]. Brain Research,2010,1321(12):1-12.
- [40] 邱 权,叶 琳,皮静婷,等.PI3K/Akt/FoxO3a 信号通路对人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞增殖及凋亡的影响[J].第三军医大学学报,2014,36(12):1264-1267.

- [41] 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]. *Fertility & Sterility*, 2010,93(8):2532–2537.
- [42] 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.
- [43] GAYTAN M, MORALER C, SANCHEZ-CRIADO J E, et al. Immunolocalization of beclin 1, a bcl-2-binding, autophagy-related protein, in the human ovary: possible relation to life span of corpus luteum[J]. *Cell & Tissue Research*,2008,331(2):509–17.
- [44] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. *Oncogene*, 2004,23(16):2891–2906.
- [45] PATTINGRE S, TASSA A, QU X, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy[J]. *Cell*,2005,122(6):927–939.
- [46] ERLICH S, MIZRACHY L, SEGEV O, et al. Differential Interactions Between Beclin 1 and Bcl-2 Family Members[J]. *Autophagy*,2007,3(6):561–568.
- [47] 王 伟,徐忠东,陶瑞松,等.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.
- [48] DATTA S R, BRUNET A, GREENBERG M E. Cellular survival: a play in three Acts [J]. *Genes & Development*,1999,13(22):2905–2927.
- [49] PLAS D R, THOMPSON C B. Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2003, 278(14):12361–12366.
- [50] TAKAISHI H, KONISHI H, MATSUZAKI H, et al. Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999,96(21):11836–11841.
- [51] 龙官运,杨洁莹,倪妍虹,等.FOXO3a 的基因表达调控及其在卵巢卵泡发育中的作用研究进展[J].*广东医学*,2017,38(18):2871–2873.
- [52] CASTRILLON D H, MIAO L, KOLLIPARA R, et al. Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a[J]. *Science*, 2003,301(5630):215–218.
- [53] HOSAKA T, BIGGS W H, TIEU D, et al. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004,101(9):2975–2980.
- [54] MARINO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,2014,15(2):81–94.
- [55] 罗丽莉,刘 红,钱元恕,等.新生大鼠卵母细胞凋亡信号通路 SCF-FOXO3a 的体外实验研究[J].*生殖与避孕*,2009,29(7):417–421.
- [56] KIMMELMAN A C, WHITE E. Autophagy and Tumor Metabolism [J]. *Cell Metabolism*,2017,25(5):1037–1043.
- [57] 马会明,张永芳,王蒙蒙,等.雌激素对卵巢颗粒细胞雌激素受体- β 和转录因子叉头蛋白 3 表达的影响[J].*山东大学学报(医学版)*, 2016,54(5):50–55.
- [58] ESCOBAR M L, ECHEVERRIA O M, GARCIA G, et al. Immunohistochemical and Ultrastructural Study of the Lamellae of Oocytes in Atretic Follicles in Relation to Different Processes of Cell Death[J]. *European Journal of Histochemistry*,2015,59(3):7–15.
- [59] YUE Z, JIN S, YANG C, et al. Beclin 1,an autophagy gene essential for early embryonic development is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15077–15082 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004,100(25):15077–15082.
- [60] 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.
- [61] 隋旭霞,罗丽莉,傅玉才,等.新生鼠卵巢 FOXO3a 表达水平与卵母细胞凋亡的相关性初步研究[J].*生殖与避孕*,2006,26(9):515–519.
- [62] 隋旭霞,傅玉才,罗丽莉,等.Foxo3a 转录因子参与卵母细胞的凋亡[J].*中国现代医学杂志*,2007,17(12):1438–1441.
- [63] 杨 竹.Fox 基因家族与卵巢疾病的研究进展[J].*重庆医科大学学报*,2007,32(4):440–441.
- [64] FU Y, HE C J, JI P Y, et al. Effects of melatonin on the proliferation and apoptosis of sheep granulosa cells under thermal stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014,15(11):21090–21104.
- [65] 杨 蕾,陶仕英,王继峰,等.P13k/Akt 通路参与二仙汤抑制顺铂所致卵巢颗粒细胞凋亡的作用[J].*世界科学技术-中医药现代化*, 2016,18(8):1362–1367.
- [66] 冯逊逊,董晓英.基于细胞自噬探讨免疫性卵巢早衰形成机制[J].*医学研究杂志*,2017,46(8):15–18.
- [67] 徐 俊,黄秀兰.SIRT1-FoxO-自噬通路研究进展[J].*中国药理学通报*,2014,30(7):901–904.
- [68] PELOSI E, OMARI S, MICHEL M, et al. Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice[J]. *Nature Communications*, 2013,4(5):1843–1856.
- [69] LIU L, RAJAREDDY S, REDDY P, et al. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a[J]. *Development*,2007,134(1):199–209.