

孙晓峰,黄欣怡,曾贵荣,等. 膜细胞对化疗损伤性颗粒细胞的影响及左归丸含药血清干预作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 16-21.

Sun XF, Huang XY, Zeng GR, et al. Effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and intervention with serum containing Zuogui pill components [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 16-21.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 003

膜细胞对化疗损伤性颗粒细胞的影响及左归丸含药血清干预作用

孙晓峰¹,黄欣怡¹,曾贵荣²,龚力民^{3*},乔江⁴,阳松威³,周琳⁵

(1.湖南中医药大学医学院,长沙 410208;2.湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410331;3.湖南中医药大学药学院,长沙 410208;4.湖南中医药大学附属第一医院妇产科,长沙 410007;5.长沙医学院,长沙 410219)

【摘要】 目的 探讨膜细胞对化疗损伤性颗粒细胞的影响以及左归丸含药血清的干预作用。方法 制备左归丸含药血清,培养大鼠卵巢颗粒细胞和膜细胞,分8组,分别是(1)空白对照组;(2)共培养组;(3)ZGW血清组;(4)ZGW血清+共培养组;(5)模型组;(6)模型+共培养组;(7)模型+ZGW血清组;(8)模型+ZGW血清+共培养组。实时荧光定量PCR法(qRT-PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测Bax、Caspase-3、Beclin-1、p62、LC3B在转录水平和翻译水平上的表达。结果 模型组的Beclin-1、LC3B、Bax及Caspase-3基因在转录水平及翻译水平上均有高表达,加入10%左归丸含药血清处理或与膜细胞共培养可下调上述基因的表达;p62基因的表达较对照组降低,加入10%左归丸含药血清处理或与膜细胞共培养可上调模型组p62基因表达。当实验组与膜细胞共培养时加入10%左归丸含药血清后,5种基因表达的变化程度更明显。结论 膜细胞能缓解体外颗粒细胞的化疗性损伤,且与左归丸含药血清有协同作用,与抑制颗粒细胞自噬和减少其凋亡有关。

【关键词】 左归丸;化疗损伤;颗粒细胞;膜细胞;自噬;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0016-06

Effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and intervention with serum containing Zuogui pill components

SUN Xiaofeng¹, HUANG Xinyi¹, ZENG Guirong², GONG Limin^{3*}, QIAO Jiang⁴,
YANG Songwei³, ZHOU Lin⁵

(1. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.

2. Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs & Hunan Key

Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331.

3. College of Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208. 4. Department of

Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine,

Changsha 410007. 5. Changsha Medical College, Changsha 410219.)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and the intervention effect of serum containing Zuogui pill (ZGW). **Methods** Serum containing Zuogui pill components was

[基金项目] 国家自然科学基金(81774362,81303004);湖南省自然科学基金(2018JJ2290)。

[作者简介] 孙晓峰(1975—),女,汉族,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:生殖内分泌疾病及肿瘤基础性研究工作。

E-mail: 2642724115@qq.com

[通信作者] 龚力民(1980—),男,汉族,副教授,硕士生导师,研究方向:中药品质评价研究。E-mail: 5065451@qq.com

prepared. Granulosa and theca cells were cultured and divided into 8 groups, including blank control group, coculture group, ZGW serum group, ZGW serum+coculture group, model group, model+coculture group, model+ZGW serum group and model+ZGW serum+coculture group. The expression levels of Bax, Caspase-3, Beclin 1, p62 and LC3B were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Beclin-1, LC3B, Bax and Caspase-3 were highly expressed in the model group at the transcriptional and translational levels, which were downregulated after adding 10% serum containing Zuogui pill components or co-culturing with theca cells. The gene expression of p62 was lower in the model group than that in the control group, and was upregulated by adding 10% serum containing Zuogui pill components or co-culturing with theca cells. When the experimental group was co-cultured with theca cells, the expression of these genes changed more substantially after the addition of 10% serum containing Zuogui pill components. **Conclusions** Theca cells alleviated the chemotherapy-induced injury of granulosa cells *in vitro* and demonstrated a synergistic effect with serum containing Zuogui pill components. These effects were related to the inhibition of autophagy and reduction in apoptosis of granulosa cells.

[Keywords] Zuogui pill; chemotherapy injury; granulosa cells; theca cells; autophagy; apoptosis

女性因使用化疗药物所导致卵巢储备功能在 40 岁之前衰竭称为化疗性卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF), 可导致继发性闭经并伴随血促性腺激素升高和雌激素下降所引起的一系列症状, 此类患者罹患骨质疏松、心血管疾病等疾病风险性也明显增加。随着肿瘤疾病的明显年轻化以及病人对生育和生活质量的要求, 如何改善化疗性卵巢早衰愈受关注^[1-2]。发育中的卵泡由卵母细胞 (oocyte, OC)、颗粒细胞 (granulosa cells, GC) 及膜细胞 (theca cell, TC) 组成, 三者相互作用维持卵泡的生长发育以及卵巢的功能^[3-4]。GC 为 OC 提供支持 and 营养, TC 与 GC 密不可分, 为优势卵泡提供稳定的雌激素微环境, 同时也是女性雌激素的主要来源。化疗药物的效果取决于它对快速分裂细胞的破坏能力, 常用的化疗药物环磷酰胺对卵巢损伤作用不仅表现为其对生长期卵泡中 GC 增殖和 OC 发育的破坏, 也可以通过损伤 DNA 的方式破坏静止期的原始卵泡, 从而减小原始卵泡池的大小, 降低卵巢储备。本团队及其他研究均提示化疗性 POF 动物模型中 GC 凋亡率上升, 而左归丸可减少 GC 凋亡率, 在一定程度上恢复卵巢功能^[5-6]。环磷酰胺的体外活性成分磷酰胺氮芥 (phosphoramidate mustard, PM) 在体外可通过促进凋亡和自噬过程损伤 GC; 此种损伤能被 10% 左归丸 (ZGW) 含药血清通过影响 GC 自噬和凋亡过程所缓解^[7], 目前关于 TC 的研究较少, 其作用往往被小觑。本研究进一步探讨 TC 对化疗损伤性 GC 的影响以及左归丸含药血清对 TC 和 GC 共培养的干预机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 20 只, 体重 250~270 g, 8

周龄, 用于制备含药血清, 由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供 [SCXK(湘)2019-0015], 动物饲养于湖南省药物安全评价研究中心 SPF 环境 [SYXK(湘)2020-0015]。动物实验经湖南省药物安全评价研究中心伦理委员会批准 (2020014), 过程中遵循实验动物学的 3R 原则。

1.1.2 细胞

原代大鼠卵巢 GC (赛百慷上海生物技术股份有限公司, 批号: iCell20191027)。原代大鼠卵巢 TC (赛百慷上海生物技术股份有限公司, 批号: iCell201912025)。

1.2 主要试剂与仪器

左归丸由熟地、菟丝子、枸杞、川牛膝、山茱萸、山药、鹿角胶、龟板胶组成, 购自北京同仁堂。按原配方比制成含 1 g/mL 生药的浸膏。磷酰胺氮芥 (江苏倍达, 20180908); GC 专用培养基 (iCell, PriMed-iCell-028); TC 专用培养基 (iCell, PriMed-iCell-042); RIPA 蛋白裂解液 (碧云天, P0013B); BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天, P0012S); 二抗 (Anti Rabbit IgG/HRP, Abclonal, AS014,); β -actin 内参 (Abclonal, AC026); 兔抗 Beclin-1 (Abclonal, A7353); 兔抗 Caspase-3 (Abclonal, A19654); 兔抗 Bax (Abclonal, A19684); 兔抗 p62 (Abclonal, A19700); 兔抗 LC3B (Abclonal, A19665); High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, EP0742); PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, A25742)。引物 (上海生工)。Fast Pure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit (Vazyme, RC101-01); 化学发光仪 (博路腾); 倒置显微镜 (OLYMPUS IX71); 电泳仪 (北京六一); 实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 7500); 分光光度计 (Thermo Fisher, NanoDrop Lite)。

1.3 实验方法

1.3.1 左归丸含药血清制备与给药

SD 大鼠随机分 2 组:左归丸含药血清组和正常血清组各 10 只。1 g/mL 的左归丸浸膏,按照 245.7 g/(kg·d)剂量(根据成人与大鼠体表面积的计算公式计算出的大鼠用药量,相当于临床等效剂量的 9 倍),每天分 2 次给左归丸含药血清组动物连续灌服 3 d,正常血清组每天分 2 次给予等量纯净水连续灌服 3 d,两组于第 3 天末次灌胃后的 2~2.5 h,麻醉后腹主动脉进行采血,静置 30 min 后,离心并分离血清置于-20℃保存,实验前于 56℃、30 min 环境灭活,使用 0.22 μm 滤器过滤后使用。

1.3.2 造模与分组

分为 8 组:(1)空白对照组:10%正常血清专用培养基培养 48 h;(2)共培养组:10%正常血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,培养 48 h;(3)ZGW 血清组:10% ZGW 血清专用培养基培养 48 h;(4)ZGW 血清+共培养组:10% ZGW 血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,培养 48 h;(5)模型组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10%正常血清专用培养基继续培养 24 h;(6)模型+共培养组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10%正常血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,继续培养 24 h。(7)模型+ZGW 血清组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10% ZGW 血清专用培养基继续培养 24 h;(8)模型+ZGW 血清+共培养组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10% ZGW 血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,继续培养 24 h。各组均在 37℃,5% CO₂细胞培养箱培养。利用 0.4 μm 孔径的聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)-based 小室进行细胞共培养试验,具体方法如下:先分别制备 TC 细胞

和 GC 细胞的细胞悬液,进行细胞计数,每组取 3×10⁵个细胞,放至 1.5 mL 无菌 EP 管中,并用其各自专用培养基补齐至 600 μL。向 6 孔板中加入 2.4 mL 含有 10%正常血清的 GC 细胞专用培养基,同时加入 200 μL 事先准备的 GC 细胞悬液;上面放细胞小室,先向小室中加入 1.3 mL 含有 10%正常血清的 TC 细胞专用培养基,将 200 μL 的细胞悬液轻轻加入小室的上室中,尽量使细胞均匀分布到小室孔内(注意:保证上下室液体相互接触)。

1.3.3 qRT-PCR 法检测各组目的基因 mRNA 表达

根据试剂盒要求提取细胞总 RNA,检测 RNA 纯度及浓度后,使用琼脂糖电泳法检测 RNA 完整性。参照试剂盒操作说明,将 1 μg 总 RNA 反转录合成 cDNA 后进行扩增,反应条件为 95℃、10 min,95℃、10 s,60℃、30 s,72℃、15 s,循环次数为 40 次。参照文献^[8]方法分析实验数据,以 2^{-ΔΔct}法(ct 表示基本循环值)测定各目的 mRNA 基因相对表达量。试验重复 3 次。各组目的基因引物序列见表 1。

1.3.4 Western blot 检测各组目标蛋白的表达

弃培养基,用 1 mL PBS 缓冲液漂洗细胞 2 次,吸掉 PBS,用胰酶将细胞消化,使用移液枪反复吹打制成细胞悬液,取细胞悬液置于 EP 管内,1000 r/min 的速度离心 5 min 后,去上清,转移至无菌的 1.5 mL EP 管中。每管加入 200 μL 细胞裂解液 RIPA,用移液枪吸打,将细胞沉淀充分打散至溶液澄清,放入-80℃冰箱反复冻融 2 次后用超声破碎仪破碎细胞,放入提前预冷到 4℃的离心机,12000 r/min,离心 10 min;将上清转移到新的 1.5 mL EP 管中,做好标记待用。取 80 μg 蛋白样品量,加入 6×SDS 混合,置于 105℃高温变性 10 min,剩余的蛋白样品置于-80℃保存。变性后的各组蛋白经 SDS 凝胶电泳(2~3 h)、转膜(90 min)、封闭(60 min)、孵一抗(孵育 4~6 h 或 4℃过夜)、洗膜(10 min×3 次)、孵二抗(60 min)、再次洗膜(10 min×3 次)后。使用 ECL 显影液进行显影后,在 Tanon-5200 系统中,加入化学发光底物检测荧光信号,进行成像分析。定性和定

表 1 各组引物序列

Table 1 Primer sequence of each group

引物名称 Primer name	正向引物(5' to 3') Forward primer	反向引物(5' to 3') Reverse primer
Beclin-1	CGACATCTGGCAGTGGACAGTTG	AGCATGGAGCAGCAACACAGTC
LC3B	GTCAGCGTCTCCACACCAATCTC	TCCTGGGAGGCATAGACCATGTAC
p62	TGATTGAGTCCCTCTCCAGATGC	CCGCTCCGATGTCATAGTTCTTGG
Bax	GATGCGTCCACCAAGAAGCTGAG	CACGGCGCAATCATCTCTCTG
Caspase-3	GTGGAGGCCGACTTCTTGTATGC	TGGCACAAAAGCGACTGGATGAAC

量分析各组条带 Beclin-1、LC3B、Bax、Caspase-3 及 p62 的表达。实验重复 3 次,结果取 3 次平均值。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件处理数据,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据符合正态性和方差齐性,各组间均数比较采用单因素方差分析法;若数据不符合正态性或方差齐性,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验方法比较各组间均值。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

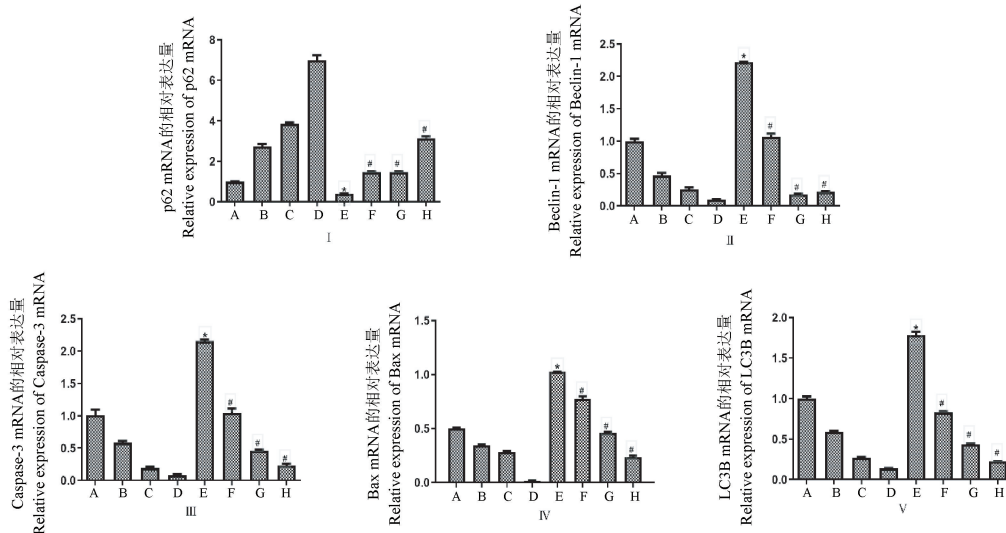
2.1 各组目标蛋白 mRNA 基因表达

由图 1 中结果所示,用 PM 处理大鼠卵泡 GC 后,GC 中的 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 表达增加,p62 的表达水平下降;而左归丸给药能显著降低 PM 处理后 GC 升高的 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 水平,同时升高 PM 处理后 GC 降低 p62 的 mRNA 表达水平;加入 TC 细胞与 GC 细胞共培养,同样可以使化疗损伤性的 GC 细胞中 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的

mRNA 表达水平降低,p62 的表达水平升高,且在模型组中同时加入共培养及左归丸含药血清处理后,Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平较单纯使用共培养或左归丸含药血清处理的更低,而 p62 的表达水平更高。以上差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组目标蛋白表达

由图 2 中结果所示,用 PM 处理大鼠卵泡 GC 后,GC 中 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的蛋白表达增加,p62 的表达水平下降;而左归丸给药能降低 PM 处理后 GC 升高的 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的水平,同时升高 PM 处理后 GC 降低的 p62 表达水平;加入 TC 细胞与 GC 细胞共培养,同样可以使 GC 细胞中 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的表达水平降低,p62 的表达水平升高。且在模型组中同时加入共培养及左归丸含药血清处理后,Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的蛋白表达水平较单纯使用共培养或左归丸含药血清处理的更低,而 p62 的表达水平更高。以上差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

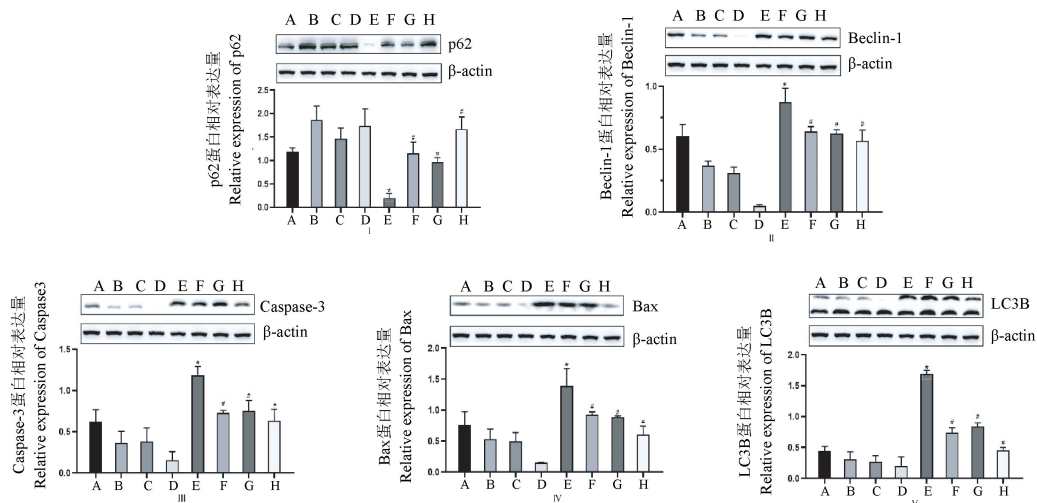


注:I:p62 mRNA 的表达;II: Beclin-1 mRNA 的表达。III: Caspase-3 mRNA 的表达;IV: Bax mRNA 的表达;V: LC3B mRNA 的表达。与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。A:空白对照组;B:共培养组;C:ZGW 血清组;D:ZGW 血清+共培养组;E:模型组;F:模型+共培养组;G:模型+ZGW 血清组;H:模型+ZGW 血清+共培养组。

图 1 各组目的基因 mRNA 表达量

Note. I, Expression of p62 mRNA. II, Expression of Beclin-1 mRNA. III, Expression of Caspase-3 mRNA. IV, Expression of Bax mRNA. V, Expression of LC3B mRNA. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. A, Blank control group. B, Coculture group. C, ZGW serum group. D, ZGW serum+coculture group. E, Model group. F, Model+coculture group. G, Model+ZGW serum group. H, Model+ZGW serum+coculture group.

Figure 1 mRNA expression of target gene in each group



注:I;p62 蛋白的表达;II:Beclin-1 蛋白的表达;III:Caspase-3 蛋白的表达;IV:Bax 蛋白的表达;V:LC3B 蛋白的表达。与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。A:空白对照组;B:共培养组;C:ZGW 血清组;D:ZGW 血清+共培养组;E:模型组;F:模型+共培养组;G:模型+ZGW 血清组;H:模型+ZGW 血清+共培养组。

图 2 各组目的蛋白表达

Note. I, Expression of p62 protein. II, Expression of Beclin-1 protein. III, Expression of Caspase-3 protein. IV, Expression of Bax protein. V, Expression of LC3B protein. Compared with the blank control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. A, Blank control group; B, Coculture group. C, ZGW serum group. D, ZGW serum+coculture group. E, Model group. F, Model+coculture group. G, Model+ZGW serum group. H, Model+ZGW serum+coculture group.

Figure 2 Expression of target proteins in each group

3 讨论

作为广谱抗肿瘤药物的环磷酰胺,不仅对各种实体瘤、白血病有效,而且是目前应用的各种免疫抑制剂中作用最强、应用最多的药物之一,由于其良好的临床疗效,应用范围日益广泛^[9],但其副作用也不容忽视,包括脱发、骨髓抑制、损伤卵巢功能等。本实验以 PM(环磷酰胺的体外活性成分)处理 GC 建立化疗损伤性 GC 模型,并尝试将 TC 与 GC 共培养发现:自噬启动因子 Beclin-1、微管结合蛋白轻链 3(LC3B)、凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 在 PM 作用的 GC 中,较对照组在转录水平及翻译水平上有高表达,10%左归丸含药血清处理及与 TC 共培养处理可下调上述蛋白在模型组中的表达;然而自噬受体蛋白 p62 的表达较对照组降低,与 TC 共培养或在培养基中加入 10%左归丸含药血清可上调模型组 GC 中 p62 蛋白及其对应 mRNA 的表达。且当 GC 与 TC 共培养处理的同时加入 10%左归丸含药血清后上述蛋白及其对应的 mRNA 的表达变化程度更明显。

自噬是一种溶酶体依赖的细胞内降解系统,在多种生理过程中起着重要的作用,在心血管疾病、

肿瘤等各类疾病的发生发展中存在失衡状态^[10-11]。Beclin-1 是自噬启动关键因子;LC3B 则是自噬过程的标志物,主要参与了自噬小体的形成;p62 可在自噬时降解,能反映自噬的强弱。当 LC3B 升高,p62 同时降低,则表明自噬流畅^[12-13]。凋亡是一种自主调节的细胞死亡过程,其特征是细胞收缩、膜泡出现、DNA 断裂和凋亡小体的形成,主要有 2 种途径:外源性或死亡受体途径、内源性或线粒体途径。这 2 条通路最终都通过由 Caspase-3 的裂解启动的执行通路。同时 Bax 蛋白不仅能作为 Caspase-3 的上游调控机制,调节其活性,也能作为 Caspase-3 的底物,在其下游机制发挥促凋亡作用,两者相互联系又相互制约,都是重要的促凋亡基因^[14]。自噬和凋亡都是典型的程序性细胞死亡类型,通常发生在同一个细胞内。自噬的顺序先于凋亡,自噬是否诱导或抑制凋亡取决于细胞类型、刺激性质和持续时间^[15]。本实验结果中模型组 Beclin-1、LC3B 基因表达上升的同时,p62 基因表达下降,说明 PM 损伤 GC 过程中自噬流畅,此过程中 Bax 和 Caspase-3 基因表达的上升也提示 GC 凋亡。

TC 位于 GC 的周围,源于卵巢的基质细胞,内含大量脂类物质和滑面内质网并存在丰富的 LH 受

体。既往研究提示其不仅为卵泡提供结构支持,所分泌的雄激素也是 GC 合成雌激素的原料^[16];在 TC 产生大量雄激素及其诱导的芳香化酶活化的前提下,卵泡刺激素和黄体生成素相互协调,才可产生雌激素的爆发,同时 OC 即将完成第一次减数分裂,完成优势卵泡最后阶段的发育。此外 TC 还可分泌各种生长因子调控卵巢闭锁过程^[17],对抗 GC 凋亡,但关于 TC 对化疗损伤性 GC 的影响及其具体机制的相关研究甚少。本实验证明 TC 能缓解 PM 作用于 GC 引起的化疗性损伤,且与左归丸含药血清有协同作用。PM 对 GC 的损伤以及左归丸含药血清和 TC 对 GC 的保护作用中都存在自噬与凋亡现象,且可能存在“自噬-凋亡”交叉对话,补充了 TC 对 GC 又一作用以及左归丸治疗化疗性 POF 的作用机制。但关于左归丸含药血清与 TC 共培养协同作用的具体机制、左归丸含药血清和 TC 通过哪些作用位点影响 GC 的自噬与凋亡过程,GC 与 TC 之间是否还有其他相互作用等问题仍待下一步实验阐明。

参考文献:

- [1] Stachs A, Hartmann S, Gerber B. Preservation of fertility or ovarian function in patients with breast cancer or gynecologic and internal malignancies [J]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2017, 77(8): 861-869.
- [2] Mauri D, Gazouli I, Zarkavelis G, et al. Chemotherapy associated ovarian failure [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11(11): 572388.
- [3] Casarini L, Lazzaretti C, Paradiso E, et al. Membrane Estrogen Receptor (GPER) and follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) heteromeric complexes promote human ovarian follicle survival [J]. *iScience*, 2020, 23(12): 101812.
- [4] Asiabi P, Dolmans MM, Ambroise J, et al. *In vitro* differentiation of theca cells from ovarian cells isolated from postmenopausal women [J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(12): 2793-2807.
- [5] Tuan RS, O'Brien T. Expression of concern: human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 240.
- [6] 阳松威, 孙晓峰, 贺又舜, 等. 左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响 [J]. *中成药*, 2016, 38(4): 717-722.
- [7] 孙晓峰, 刘涛, 曾贵荣, 等. 左归丸对磷酸胺氮芥体外诱导损伤颗粒细胞自噬与凋亡的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 1-6.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] Kim J, You S. Extended adverse effects of cyclophosphamide on mouse ovarian function [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2021, 22(1): 3.
- [10] Gao J, Chen X, Shan C, et al. Autophagy in cardiovascular diseases: role of noncoding RNAs [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 101-118.
- [11] Yamazaki T, Bravo-San Pedro JM, Galluzzi LM, et al. Autophagy in the cancer-immunity dialogue [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 169: 40-50.
- [12] Bresciani A, Spiezia MC, Boggio R, et al. Quantifying autophagy using novel LC3B and p62 TR-FRET assays [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194423.
- [13] Wang BJ, Tang YD, Yu BY, et al. Expression of autophagy-related factor p62 for lung cancer diagnosis and prognosis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Math Biosci Eng*, 2019, 16(6): 6805-6821.
- [14] 许国平, 杨鹏, 祁宏. Bcl-2 蛋白家族调节凋亡和自噬信号通路的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(6): 1127-1134.
- [15] Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, et al. Autophagy and autophagy-related diseases: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8974.
- [16] Imamichi Y, Sekiguchi T, Kitano T, et al. Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8374.
- [17] 文冬梅. E_2 与 FSH 对水牛卵泡颗粒细胞/内膜细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.

[收稿日期]2021-03-06