

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003042

白藜芦醇调节 SIRT1/AMPK 通路抑制大鼠多囊卵巢综合征颗粒细胞内自噬的机制研究

邓煜, 马智, 胡俊, 文一迪, 曲慧颖, 桂文武

(重庆医科大学附属第一医院生殖医学中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨植物提取物白藜芦醇对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)大鼠模型颗粒细胞内自噬的影响,并探讨其对 SIRT1/AMPK 通路的调控作用。**方法:**体外培养 PCOS 的 SD 大鼠卵巢颗粒细胞,用不同浓度白藜芦醇(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理不同时间(24、48、72 h),MTT 法观察卵巢颗粒细胞增殖率的变化;电镜观察细胞内自噬水平的变化;Western blot 检测细胞内沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silent information regulator T1, SIRT1)、单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化的 AMPK(pAMPK)、Beclin1 和 p62 的表达变化,并检测 SIRT1 特异性抑制剂 EX527 作用后,细胞内上述蛋白的表达情况。**结果:**MTT 结果显示,白藜芦醇能明显促进颗粒细胞增殖($P<0.05$),呈浓度-时间依赖性($P<0.05$);电镜结果表明白藜芦醇能降低细胞内的自噬体数量($P<0.05$)。Western blot 结果显示白藜芦醇可以增强卵巢颗粒细胞内 SIRT1 和 pAMPK 的蛋白表达水平($P<0.05$),抑制细胞内 Beclin1 的表达($P<0.05$),增加 p62 的表达;联合 SIRT1 特异性抑制剂 EX527 作用后,颗粒细胞内的 SIRT1 和 pAMPK 蛋白表达水平明显降低,Beclin1 表达明显增加($P<0.05$),p62 却明显降低($P<0.05$)。**结论:**白藜芦醇能抑制 PCOS 卵巢颗粒细胞内自噬水平并促进其增殖,这与白藜芦醇激活 SIRT1/AMPK 通路密切相关。

【关键词】多囊卵巢综合征;颗粒细胞;自噬;沉默信息调节因子 2 相关酶 1/单磷酸腺苷活化蛋白激酶通路

【中图分类号】R737.31

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-02-25

Inhibitory effects of resveratrol on autophagy of the granulosa cells in rats with polycystic ovary syndrome through regulating SIRT1/AMPK pathway

Deng Yu, Ma Zhi, Hu Jun, Wen Yidi, Qu Huiying, Gui Wenwu

(Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of plant extract resveratrol on autophagy of the granulosa cells in rat model with polycystic ovary syndrome and to explore its regulation on SIRT1/AMPK pathway. **Methods:** Ovarian granulosa cells of Sprague Dawley rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of resveratrol (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) for different times (24, 48, 72 h). The proliferation rate of ovarian granulosa cells was observed by MTT method, the changes of intracellular autophagy were observed by electron microscope, and the expression changes of silent information regulator T1 (SIRT1), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (pAMPK), Beclin1 and p62 were detected by Western blot. Finally, the expression of the above proteins in the cells was detected after the application of EX527, as a specific SIRT1 inhibitor. **Results:** MTT results showed that resveratrol promoted the proliferation rates of the granulosa cells of PCOS rats ($P<0.05$), and it was in a concentration-time dependent manner ($P<0.05$). Electron microscope showed that resveratrol could reduce the number of autophagosome in cells ($P<0.05$). Western blot results showed that resveratrol could enhance the protein expression levels of SIRT1 and pAMPK in ovarian granulosa cells ($P<0.05$), inhibit the expression of Beclin1 ($P<0.05$), and increase the expression of p62. After combined with SIRT1 specific inhibitor EX527, the protein expression levels of SIRT1 and pAMPK in granulosa cells decreased significantly, the expression of Beclin1 increased significantly ($P<0.05$), while p62 decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Resveratrol could inhibit the level of autophagy and promote the proliferation of ovarian granulosa cells of the

作者介绍: 邓煜, Email: 51223144@qq.com,

研究方向: 生殖内分泌疾病及 PCOS 防治。

通信作者: 桂文武, Email: guiwennwu023@163.com。

基金项目: 重庆市渝中区科委资助项目 (编号: 202101118)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220620.1837.006.html>

(2022-06-22)

rats with PCOS, which is closely related to the activation of SIRT1/AMPK pathway by resveratrol.

【Key words】 polycystic ovary syndrome; granulosa cell; autophagy; silent information regulator T1/adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期妇女最常见的代谢性疾病,也是育龄妇女不育的重要原因之一。PCOS 的病因和发病机制不清,涉及多方面的因素,如遗传、内分泌、环境及社会心理等。自噬是通过溶酶体介导,吞噬并降解细胞内衰老的、受损的细胞器或蛋白质的过程,对细胞起重要保护作用。但是,过度自噬会导致细胞结构破坏,引起细胞死亡^[1]。研究发现,自噬参与卵泡储备的建立和维持,以及卵母细胞的老化等生理过程^[2],但过度自噬却参与卵巢早衰、原发性卵巢功能不全、PCOS 等病理过程^[3-4]。因此,抑制自噬可能是 PCOS 等排卵异常性疾病潜在的治疗靶点^[5]。前期研究发现在 PCOS 大鼠模型的卵巢颗粒细胞中自噬水平增强,白藜芦醇可抑制颗粒细胞自噬,进而促进颗粒细胞增殖,但深入的机制并未阐明^[6]。

研究发现,白藜芦醇是沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 激动剂,可激活单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK),引起细胞内 NAD^+ 升高,进而发挥保护作用^[7]。但是,在 PCOS 的调节机制中,白藜芦醇是否通过调节 SIRT1 与 AMPK 的表达来抑制自噬尚未见相关文献报道。因此,本研究通过构建 PCOS 大鼠模型,分离提取颗粒细胞,并给予白藜芦醇处理,观察其对卵巢颗粒细胞内自噬的影响,并探讨其机制是否与激活 SIRT1/AMPK 有关,以期治疗 PCOS 提供更加丰富的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

白藜芦醇和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma 公司; SIRT1 特异性抑制剂 EX527 购自 Tocris 公司; 注射用注射脱氢表雄酮、注射诺和 N 由扬州奥赛康药业有限公司生产; 高糖细胞培养液 (dulbecco's modified eagle medium/F-12, DMEM/F12)、青霉素/链霉素和胎牛血清购自 Gibco 公司; MTT 试剂盒、蛋白浓度检测试剂盒和电泳凝胶试剂盒均购自碧云天生物技术研究; 一抗 anti-SIRT1、anti-AMPK、anti-pAMPK、Beclin1 和 p62, 内参 β -actin 抗体以及辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔的二抗购自北京博赛森生物技术有限公司; 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜和电化学发光 (electro-

chemi-luminescence, ECL) 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 动物模型的建立

选用 23 日龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量 30~45 g, 随机分成 PCOS 模型组和对照组。PCOS 模型鼠的建立方法如下: 大鼠麻醉后, 于颈背部皮下注射脱氢表雄酮 6 mg/(100 g·d)+0.2 mL 芝麻油剂, 然后在腹部皮下注射诺和 N 2 IU/d。模型对照组直接采取背部皮下注射注射用油剂 0.2 mL 芝麻油, 均连续注射 35 d 后停药^[8]。

1.3 颗粒细胞的收集

连续注药 35 d 后, 用水合氯醛麻醉 SD 大鼠, 摘取其卵巢, 并剥离周围脂肪组织, 用 1 mL 注射针头刺破卵泡, 用 PBS 液反复冲洗卵泡, 用细胞筛滤出卵泡膜, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再将颗粒细胞重悬, 并再次 1 500 r/min 离心 5 min, 取上层细胞即为颗粒细胞, 颗粒细胞的鉴定见文献^[9]。

1.4 白藜芦醇溶液的配制和 EX527 工作液的配制

称取 100 mg 白藜芦醇, 以 DMSO 溶解, 并加入三蒸水使其浓度为 1.0 mmol/L, 过滤后-20℃保存。另取 1 mg EX527, 以 DMSO 溶解, 将浓度调整为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.5 颗粒细胞的培养

颗粒细胞重悬后移至 25 cm^2 培养瓶中, 加入培养液 (1% 青霉素/链霉素+10% FBS+DMEM/F12), 置入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养; 待细胞完全贴壁后, 洗去未贴壁细胞, 每 2 d 更换 1 次培养基。

1.6 MTT 法检测细胞活性

收集对数期的颗粒细胞, 重悬细胞并按照调整浓度 5 000 个细胞/孔接种于 96 孔中, 并加入培养液至 200 μL 。将 96 孔板置入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞完全处于贴壁生长 24 h 后, 按照实验需要往每孔中加入不同浓度 (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 白藜芦醇以及白藜芦醇和 EX527 联合处理组, 并设空白对照组和溶剂对照组即 DMSO 组 (浓度为 0.1%), 每组设 5 个复孔。药物反应不同时间 (24、48、72 h) 后, 每孔加入 20 μL 的 MTT 工作液 (5 mg/mL), 作用 4 h 后, 小心吸走孔内培养液, 再加入 150 mL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 待结晶充分溶解后, 用酶标仪检测各孔 490 nm 的光密度 (optical density, OD) 值。

1.7 透射电镜观察自噬

收集各组颗粒细胞 (空白对照组、DMSO 组、40 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组、40 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇和 5 $\mu\text{mol/L}$ EX527 联合处理组), 3% 戊二醛预固定后用 1% 四氧化锇再固定, 将样品团块放到适当模具中包埋, 并用超薄切片机制备约 50 nm 的超薄切片, 捞至铜网。先用醋酸铀染色 10~15 min, 再用枸橼酸铅染色 1~2 min, 室温下染色, JEM-1400PLUS 透射电镜观察。

1.8 Western blot

收集各组颗粒细胞 (分组同 1.7), 加入 1 mL 蛋白裂解液 (含 1 μL 苯甲基磺酰氟, PMSF), 充分裂解后于 4℃、12 000 r/min

15 min 离心后,测定其蛋白样品浓度,并分装保存。上样各组蛋白 50 μg 经 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上,用抗体 SIRT1、p-AMPK、AMPK、P62 和 Beclin1 孵育过夜;充分洗涤后加入 1:5 000 的 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,最后用 ECL 发光试剂盒行曝光显影,经 Bio-Rad Chemical Dox XRS 凝胶成像系统进行条带分析。

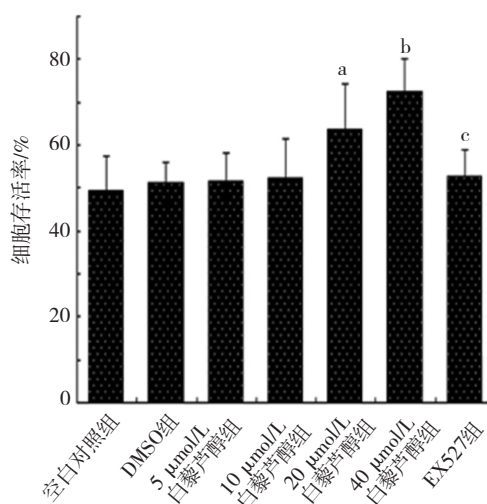
1.9 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。所有计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间计量资料比较采用单因素方差分析,涉及 2 个因素的计量资料采用重复测量方差分析;组间两两比较采用 SNK- q 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 白藜芦醇促进 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞增殖

与空白对照组比较,DMSO 组及 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇作用 24 h 后,卵巢颗粒细胞的增殖率无明显变化($P_1=0.578$, $P_2=0.385$, $P_3=0.082$),当白藜芦醇的作用浓度增至 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,颗粒细胞增殖率明显提高,差异有统计学



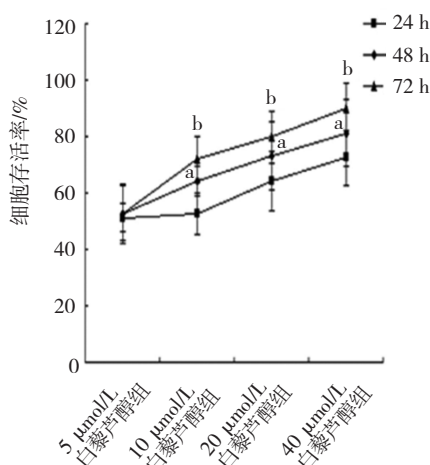
注:a,与空白对照组或 DMSO 组比较, $P<0.05$;b:与 5 或 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组比较, $P<0.01$;c:与 40 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组比较, $P<0.05$

A. 白藜芦醇对颗粒细胞的增殖的影响呈浓度依赖性

意义($P_1=0.000$, $P_2=0.000$),呈明显的剂量依赖性。再联合 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 EX527 共同作用后,颗粒细胞增殖率又明显回落($P=0.000$)(图 1A)。进一步探索颗粒细胞增殖率变化与白藜芦醇作用时间的效果关系时发现,与作用 24 h 比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇作用颗粒细胞 48 h 和 72 h 时的细胞增殖率无变化($P_1=0.604$, $P_2=0.220$),而 10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇作用颗粒细胞 48 h 和 72 h 时的细胞增殖率都明显提高,呈时间依赖性($F_{\text{浓度}}=309.655$, $P_{\text{浓度}}=0.000$; $F_{\text{时间}}=121.706$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{浓度} \times \text{时间}}=12.345$, $P_{\text{浓度} \times \text{时间}}=0.000$; $P_1=0.012$, $P_2=0.002$, $P_3=0.008$, $P_4=0.001$, $P_5=0.021$, $P_6=0.001$;图 1B)。

2.2 白藜芦醇抑制卵巢颗粒细胞的自噬

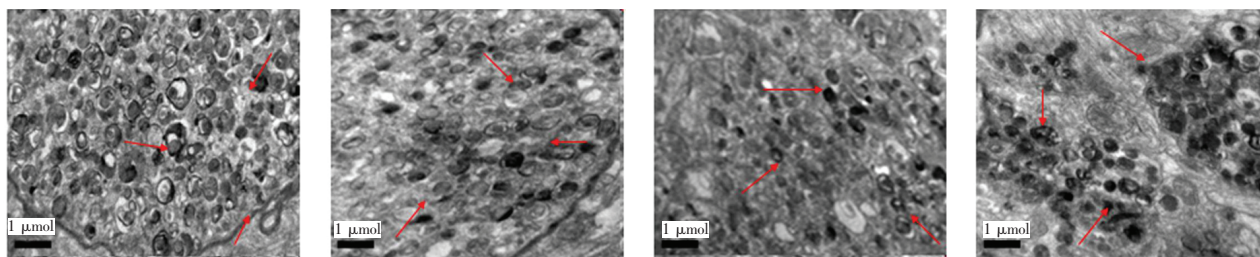
空白对照组及 DMSO 组卵巢颗粒细胞内存在大量的双层膜自噬体,数量分别为 37.5 ± 3.8 和 40.5 ± 4.1 ,2 组之间差异无统计学意义;当白藜芦醇浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,颗粒细胞内的双层膜自噬体数量为 14.7 ± 2.5 ,与空白对照组和 DMSO 组比较明显降低($P_1=0.000$; $P_2=0.000$);当 40 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EX527 共同作用后,卵巢颗粒细胞内的自噬体数量为 29.2 ± 3.1 ,较单独用白藜芦醇处理有一定反弹($P_1=0.000$, $P_2=0.000$)(图 2;总 $F=44.157$, $P=0.000$)。



注:a,与 24 h 相比, $P<0.05$;b:与 24 h 相比, $P<0.01$

B. 白藜芦醇对颗粒细胞的增殖的影响呈时间依赖性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 1 白藜芦醇促进 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞的增殖呈浓度-时间依赖性



空白对照组

DMSO组

白藜芦醇组

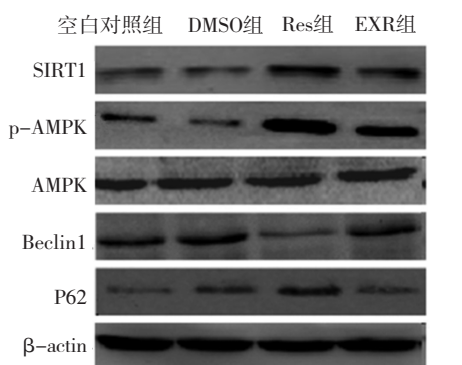
白藜芦醇联合 EX527 组

注:红色箭头均表示为自噬体

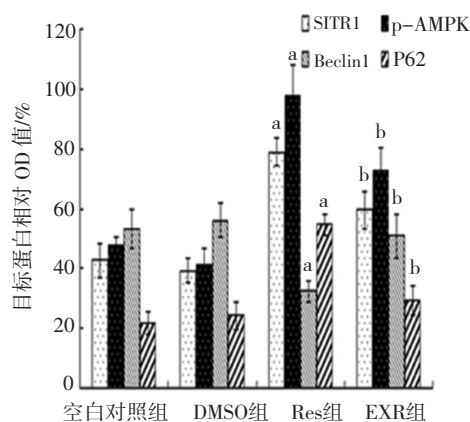
图 2 白藜芦醇抑制 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞的自噬

2.3 白藜芦醇通过调节 SIRT1/AMPK 通路抑制卵巢颗粒细胞自噬

与空白对照组和 DMSO 组相比,40 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇单独处理 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞后,细胞内的 SIRT1、p-AMPK 蛋白水平明显提高 ($P_{\text{SIRT1}}=0.000$, $P_{\text{p-AMPK}}=0.000$),而自噬密切相关的 2 个标志性蛋白 Beclin1 明显降低 ($P=0.000$),P62 明显增强 ($P=0.002$)。当 EX527 和白藜芦醇联合作用后,颗粒细胞内的 SIRT1 和 p-AMPK 蛋白水平的表达受到明显抑制 ($P=0.000$),Beclin-1 的表达却明显升高 ($P=0.000$),而 P62 的表达又明显降低 ($P=0.000$) (图 3; 总 $F_{\text{SIRT1}}=88.347$, $P_{\text{SIRT1}}=0.000$; $F_{\text{AMPK}}=2819.649$, $P_{\text{AMPK}}=0.000$; $F_{\text{Beclin-1}}=118.154$, $P_{\text{Beclin-1}}=0.000$; $F_{\text{P62}}=8.193$, $P_{\text{P62}}=0.000$)。



A. 白藜芦醇对颗粒细胞中各目的蛋白水平的影响



注: a, 与空白对照组或 DMSO 组相比, $P<0.05$; b, 与白藜芦醇组相比, $P<0.05$

B. 各目的蛋白的相对 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 3 白藜芦醇通过调节 SIRT1/AMPK 信号通路抑制卵巢颗粒细胞的自噬

3 讨论

PCOS 是育龄期妇女最为常见的内分泌紊乱性疾病之一,因其发病机制不清,临床上治疗效果也

不满意,严重威胁妇女身心健康。因此,PCOS 的防治一直以来是研究的焦点问题。颗粒细胞是组成卵泡的重要细胞,也是其功能细胞,能分泌高水平的甾体激素,颗粒细胞的增殖、分化对卵泡的成熟、排卵等过程起重要作用,而且还对卵泡有营养支撑作用。颗粒细胞形态、功能的好坏直接决定卵泡的成熟、排卵等过程。自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖的降解受损细胞器、变性蛋白等物质的途径,在体内多个过程中发挥重要作用。自噬是一把“双刃剑”,适度的自噬可以使受损细胞存活,过度的自噬则会加速细胞的死亡,进而导致机体的功能异常。研究表明,在 PCOS 中卵巢颗粒细胞自噬明显增强,抑制过度自噬对 PCOS 有保护作用^[9]。

本研究将分离的 PCOS 大鼠模型卵巢颗粒细胞体外培养并给予不同浓度的白藜芦醇处理,发现颗粒细胞的增殖率明显升高,且存在浓度-时间依赖性。这一结果表明,白藜芦醇促进颗粒细胞的生长、增殖。透射电镜观察自噬体形成是自噬发生与否以及发生程度的金标准^[9]。本研究结果也证实在 PCOS 的卵巢颗粒细胞内存在大量双层膜样自噬体,白藜芦醇处理后双层膜样自噬体数量明显减少。Beclin 1 是一种重要的、与自噬密切相关的特异性基因,参与自噬的形成,也能调节其他自噬相关蛋白。p62 蛋白是细胞自噬的降解底物,可通过与泛素化蛋白结合后再与另一种自噬标记蛋白 LC3 结合形成复合物,随后转入自噬溶酶体中被降解。Beclin1 与 p62 呈负相关,随自噬作用增强,Beclin-1 表达增强,而 p62 水平下降。本研究中,白藜芦醇作用后颗粒细胞内的 Beclin-1 表达水平受抑制,而 p62 表达水平明显增强。这些结果提示白藜芦醇可通过抑制颗粒细胞自噬发生而促进细胞增殖。

SIRT1 是 sirtuins 家族成员之一,是一种广泛存在于哺乳动物中的 NAD⁺依赖的去乙酰化酶,在调节细胞周期^[10]、氧化应激^[11]、炎症反应^[12]、延长细胞寿命和调节物质代谢^[13]中发挥重要作用。研究发现 SIRT1 的表达也与自噬的激活密切相关^[14]。作为 SIRT1 下游重要的靶点,AMPK 是参与多种物质代谢过程的重要激酶,被称为“细胞能量的开关”,其活性受 AMP/ATP 比值调节。当 AMP/ATP 比值增加,AMPK 去磷酸化被抑制,AMPK 活性降低;反之,当 AMP/ATP 比值降低,AMPK 去磷酸化增强,其活性增强。研究发现,AMPK 对女性生殖系统功能具

有调节作用:参与 PCOS 相关的病理生理过程,作用于下丘脑-垂体-性腺轴,纠正 PCOS 患者激素紊乱,促进卵巢功能恢复和子宫内膜细胞成熟,从而调节月经周期^[15-16]。同时还可以调节糖类和脂类代谢,预防并发症发生^[17-18]。因此,AMPK 激动剂在 PCOS 的治疗中具有良好的应用前景,如二甲双胍^[19]、人参皂苷^[20]、维生素 D₃^[21]等。本研究结果发现,在 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞中,SIRT1 和 p-AMPK 的蛋白表达水平都较低,白藜芦醇可以明显提高二者的表达;而白藜芦醇联合 SIRT1 抑制剂 EX527 后,不仅使 SIRT1 和 p-AMPK 的表达降低,颗粒细胞的增殖也受到抑制,而细胞内的自噬体数量增加,自噬相关的蛋白 Beclin-1 增强,p-62 降低。

综上所述,白藜芦醇可通过抑制 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞的自噬而促进其增殖,这可能与白藜芦醇激活 SIRT1/AMPK 通路有关。这提示白藜芦醇可以作为治疗 PCOS 的潜在药物及以 SIRT1 和 AMPK 作为潜在的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Yadav AK, Yadav PK, Chaudhary GR, et al. Autophagy in hypoxic ovary[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(17):3311-3322.
- [2] Zhang JQ, Lykke-Hartmann K, Shen M. Editorial: involvement of autophagy in determining the developmental fate of ovarian follicles[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:814135.
- [3] Liu LL, Wang HS, Xu GL, et al. Tet1 deficiency leads to premature ovarian failure[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:644135.
- [4] Saha P, Kumar S, Datta K, et al. Upsurge in autophagy, associated with mifepristone-treated polycystic ovarian condition, is reversed upon thymoquinone treatment[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 208: 105823.
- [5] Kumariya S, Ubba V, Jha RK, et al. Autophagy in ovary and polycystic ovary syndrome: role, dispute and future perspective[J]. Autophagy, 2021, 17(10): 2706-2733.
- [6] 马智, 胡俊, 邓煜, 等. 白藜芦醇调节 Akt/mTOR 通路对大鼠多囊卵巢综合征颗粒细胞自噬的影响机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(4): 388-393.
- [7] Ma Z, Hu J, Deng Y, et al. Effects of resveratrol on granulosa cell autophagy by regulating Akt/mTOR pathway in rats with polycystic ovarian syndrome[J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(4): 388-393.
- [8] Furat Rencber S, Kurnaz Ozbek S, Eraldemir C, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study[J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1):55.
- [9] 马泰, 孙国平, 李家斌. 细胞自噬的研究方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(3): 204-209.
- [10] Ma T, Sun GP, Li JB. Methods for autophagy detection[J]. Prog Biochem Biophys, 2012, 39(3): 204-209.
- [11] Chen ACH, Peng Q, Fong SW, et al. DNA damage response and cell cycle regulation in pluripotent stem cells[J]. Genes (Basel), 2021, 12(10): 1548.
- [12] Chen TS, Chuang SY, Shen CY, et al. Antioxidant SIRT1/Akt axis expression in resveratrol pretreated adipose-derived stem cells increases regenerative capability in a rat model with cardiomyopathy induced by diabetes mellitus[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(6): 4290-4302.
- [13] Zhang SH, Zhao J, Ma WQ. Circ-SIRT1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Autoimmunity, 2021, 54(8): 514-525.
- [14] Qiu PX, Hou WL, Wang HT, et al. Sirt1 deficiency upregulates glutathione metabolism to prevent hepatocellular carcinoma initiation in mice[J]. Oncogene, 2021, 40(41): 6023-6033.
- [15] Wang L, Xu CY, Johansen T, et al. SIRT1—a new mammalian substrate of nuclear autophagy[J]. Autophagy, 2021, 17(2): 593-595.
- [16] Yin LJ, Luo M, Wang R, et al. Mitochondria in sex hormone-induced disorder of energy metabolism in males and females[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 749451.
- [17] Zuo M, Liao GT, Zhang WQ, et al. Effects of exogenous adiponectin supplementation in early pregnant PCOS mice on the metabolic syndrome of adult female offspring[J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 15.
- [18] Wu LY, Li HY, Xu WJ, et al. Dissimilar regulation of glucose and lipid metabolism by leptin in two strains of gibel carp (*Carassius gibelio*) [J]. Br J Nutr, 2021, 125(11): 1215-1229.
- [19] Xu DX, Guo XX, Zeng Z, et al. Puerarin improves hepatic glucose and lipid homeostasis *in vitro* and *in vivo* by regulating the AMPK pathway[J]. Food Funct, 2021, 12(6): 2726-2740.
- [20] Ala M, Ala MH. Metformin for cardiovascular protection, inflammatory bowel disease, osteoporosis, periodontitis, polycystic ovarian syndrome, neurodegeneration, cancer, inflammation and senescence: what is next? [J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2021, 4(6): 1747-1770.
- [21] Kim J, Yang G, Kim Y, et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities[J]. Exp Mol Med, 2016, 48(4): e224.
- [22] Bakhshalizadeh S, Amidi F, Shirazi R, et al. Vitamin D₃ regulates steroidogenesis in granulosa cells through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. Cell Biochem Funct, 2018, 36(4): 183-193.

(责任编辑:冉明会)