

白头翁汤正丁醇提取物通过调控自噬与凋亡缓解外阴阴道念珠菌病

邱薇, 李璨, 吴惠, 施高翔, 吴大强, 汪天明*, 汪长中*

安徽中医药大学 中西医结合学院, 安徽 合肥

邱薇, 李璨, 吴惠, 施高翔, 吴大强, 汪天明, 汪长中. 白头翁汤正丁醇提取物通过调控自噬与凋亡缓解外阴阴道念珠菌病[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2321-2338.

QIU Wei, LI Can, WU Hui, SHI Gaoxiang, WU Daqiang, WANG Tianming, WANG Changzhong. *n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction alleviates vulvovaginal candidiasis by inducing autophagy and inhibiting apoptosis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2321-2338.

摘要: 外阴阴道念珠菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是女性生殖道常见的真菌感染性疾病。尽管针对 VVC 的传统治疗手段已相对成熟,但仍存在一定局限性。白头翁汤作为中国医学的经典方剂在临床上已被证实对 VVC 具有明确疗效,但其具体作用机制尚未完全阐明。【目的】通过网络药理学及动物实验阐明中药白头翁汤正丁醇提取物(*n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction, BEPD)对 VVC 的作用机制。【方法】构建 VVC 小鼠模型,评估 BEPD 对 VVC 的疗效;通过网络药理学筛选出 BEPD 对 VVC 潜在的作用信号通路,并采用蛋白印迹法、免疫荧光、免疫组化、实时荧光定量 PCR 检测小鼠阴道黏膜组织中自噬、凋亡及其相关通路蛋白的变化水平。【结果】网络药理学分析显示,白头翁汤发挥抗真菌活性、治疗 VVC 的关键靶点包括 PIK3RA 和 AKT1 等;KEGG 分析结果表明,白头翁汤可能通过调控 PI3K-Akt 信号通路发挥治疗 VVC 的作用。动物实验证实,相对于 VVC 模型组,BEPD 治疗后,PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达下降,自噬相关蛋白 LC3B 和 ATG5 表达显著增加,凋亡相关蛋白 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 的表达则明显下调,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达明显上调。【结论】BEPD 可能通过抑制 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进阴道上皮细胞自噬并抑制凋亡,从而恢复阴道黏膜上皮屏障稳态,缓解 VVC。

关键词: 白头翁汤正丁醇提取物; 外阴阴道念珠菌病; 自噬; 凋亡; PI3K-Akt-mTOR 信号通路

资助项目: 国家自然科学基金(82374173, 81774034, 81573725)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82374173, 81774034, 81573725).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Tianming, wtm1818@163.com; WANG Changzhong, ahwcz63@sina.com

Received: 2026-01-10; Accepted: 2026-02-11; Published online: 2026-02-24

***n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction alleviates vulvovaginal candidiasis by inducing autophagy and inhibiting apoptosis**

QIU Wei, LI Can, WU Hui, SHI Gaoxiang, WU Daqiang, WANG Tianming*, WANG Changzhong*

School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China

Abstract: Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a prevalent fungal infection affecting the female reproductive tract. Although conventional therapeutic approaches for VVC are relatively well-established, they still exhibit certain limitations. *Pulsatilla* decoction, a classic traditional Chinese medicine formula, has demonstrated significant clinical efficacy in the treatment of VVC. However, its precise mechanism of action remains incompletely elucidated. **[Objective]** To clarify the therapeutic mechanism of the *n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction (BEPD) on VVC through network pharmacology and animal experiments. **[Methods]** A mouse model of VVC was established and the therapeutic effect of BEPD on VVC was evaluated. Network pharmacology was employed to screen the potential signaling pathways of BEPD on VVC. Western blotting, immunofluorescence, immunohistochemistry, and real-time fluorescence quantitative PCR were employed to measure the changes in autophagy, apoptosis, and related pathway proteins in the vaginal mucosa of mice. **[Results]** Network pharmacology analysis identified PIK3R1 and AKT1 as key targets of *Pulsatilla* decoction in exerting antifungal activity against VVC. KEGG pathway enrichment analysis indicated that *Pulsatilla* decoction exerted its therapeutic effects on VVC by regulating the PI3K-Akt signaling pathway. Animal experiments confirmed that compared with the VVC model group, the BEPD treatment down-regulated the expression of PI3K, p-Akt, and p-mTOR, significantly up-regulated the expression of autophagy-related proteins LC3B and ATG5, significantly inhibited the expression of apoptosis-related proteins Bax and Cleaved-Caspase-3, and significantly promoted the expression of anti-apoptosis-related protein Bcl-2. **[Conclusion]** BEPD may promote autophagy and inhibit apoptosis of vaginal epithelial cells by inhibiting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway, thereby restoring the homeostasis of the vaginal mucosal epithelial barrier and alleviating VVC.

Keywords: *n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction (BEPD); vulvovaginal candidiasis (VVC); autophagy; apoptosis; PI3K-Akt-mTOR signaling pathway

白念珠菌(*Candida albicans*)是人体最常见的条件致病性真菌,常定植于皮肤、口腔、肠道、阴道等部位,在机体免疫力下降或菌群失衡时会引发黏膜感染甚至系统性感染。外阴阴道念珠菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是女性生殖道黏膜常见的感染性疾病,白念珠菌是导致

该病的主要致病菌^[1]。VVC发生时,白念珠菌从酵母相转变为菌丝相,黏附并侵袭阴道黏膜上皮,通过产生多种毒力因子(侵袭素、念珠菌溶素、水解酶等)破坏黏膜屏障结构,诱发局部免疫炎症反应^[2],引起外阴瘙痒、红肿、烧灼感,以及白色凝乳状或淡黄色豆渣样阴道分泌

物等症状,严重影响患者生活质量^[3]。流行病学数据显示,约75%的女性在其一生中至少经历一次VVC感染,其中40%–45%的患者会出现2次或以上复发^[4]。若未得到及时有效的治疗,VVC可能发展为难治性外阴阴道念珠菌病(recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC)^[5]。因此,对VVC进行有效干预具有重要的临床意义。

VVC的发生不仅与白念珠菌的毒力因子相关,还取决于宿主自身的免疫状态,尤其是阴道局部的免疫防御功能^[6]。阴道上皮细胞(vaginal epithelial cells, VECs)是阴道黏膜屏障的核心组成部分^[7]。白念珠菌感染时,上皮细胞不仅为其定植及后续侵袭提供附着位点和营养支持,同时还可以通过调控免疫应答以及自噬等过程维持细胞稳态,恢复黏膜屏障的完整性^[8]。

自噬是高度保守的细胞内降解与回收过程,在包括上皮细胞在内的多种细胞类型中参与清除真菌、细菌和病毒感染,以及受损的细胞器和蛋白质,维持细胞的正常生理功能^[9]。在感染过程中,病原体可被细胞表面或胞质内的多种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)识别,随之激活下游自噬通路,从而促进对病原体或病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)的捕获与清除;除直接介导病原体清除外,自噬还在抗原呈递以及固有免疫应答中发挥重要作用^[10–12]。Shroff等^[13]研究发现,具备自噬功能的阴道上皮细胞可有效抵抗白念珠菌感染所致的细胞损伤,而自噬功能缺陷的细胞则在感染后发生死亡。这表明自噬在阴道上皮细胞抵御白念珠菌感染过程中起着关键作用。

自噬在感染等应激状态下所诱导的细胞凋亡方面也发挥调控作用^[14–15]。自噬在多个层面与多种凋亡相关信号分子形成交互调控,共同决定细胞最终命运^[16–19]。Shroff等^[13]研究报道,在白念珠菌感染下转染了野生型自噬相关基因5 (autophagy related 5, ATG5)质粒的阴道上皮细胞中,凋亡与坏死的比例比未转染的显著降低;

而转染了突变型ATG5质粒的细胞则表现出更高的细胞死亡率。可见,自噬以及与其互作的凋亡的调控在阴道上皮细胞抵御白念珠菌感染以维持细胞稳态中发挥关键的保护作用,从而可能成为治疗VVC的潜在靶点。

目前,治疗VVC的一线药物主要为氟康唑、咪康唑和酮康唑等唑类抗真菌药。然而,长期广泛使用此类药物导致耐药菌株的检出率逐年上升,菌株耐药性已成为临床上治疗VVC面临的重要挑战。另外,新型抗真菌药物的研发通常面临投入成本高、研发周期长等现实困难^[20]。这些问题的出现为中医药干预提供了潜在的应用空间。

白头翁汤出自中国传统医学典籍《伤寒论》,由白头翁、黄连、黄柏和秦皮四味中药材组成。临床上,该方药常用于治疗细菌性痢疾和溃疡性结肠炎,近年来也被应用于治疗VVC^[21]。本课题组Hu等^[22]分别采用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇等不同极性溶剂对白头翁汤进行萃取,获得相应的提取物,经比较证实,白头翁汤正丁醇提取物(*n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction, BEPD)的抗真菌活性最好,其主要活性成分包括白头翁皂苷B4、小檗碱、秦皮甲素、秦皮乙素、药根碱以及黄柏碱等;还发现BEPD可以显著改善VVC的阴道炎症^[22]。然而,关于BEPD能否通过调控自噬/凋亡以维持阴道上皮细胞的稳态尚不明确。因此,本研究基于网络药理学和实验验证,从自噬/凋亡对阴道黏膜上皮稳态的影响以及相应的调控信号通路的角度阐明BEPD抗VVC的机制。

1 材料与方法

1.1 菌株、动物与药物

白念珠菌SC5314由海军军医大学姜远英教授惠赠。该菌株首先接种于YPD固体培养基进行培养,随后转接至YPD液体培养基中活化,在37℃、200 r/min培养14–16 h。采用3 000×g

离心 5 min 收集真菌, 弃去上清液, 用 PBS 稀释调整至 2×10^8 个/mL。

6–7 周龄雌性 C57BL/6 小鼠共 60 只, 体重为 18–22 g, 购自杭州子源实验动物科技有限公司(合格证书 SCXK2019-004)。将小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 饲养于无病环境中, 湿度为 50%–55%, 温度为 (22 ± 2) °C, 采用 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 并给予自由取食和饮水。本研究所有动物实验均获得安徽中医药大学医学研究所动物伦理委员会批准(编号为 AHUCM-mouse-2025038), 并遵循中国关于实验动物伦理使用和护理的立法指导方针。

白头翁汤由白头翁、黄连、黄柏、秦皮组成, 购自安徽中医药大学第一附属医院中药房, 并经刘守金教授鉴定, 四味中药分别按照 5:2:4:4 的比例混合^[1]。首先将药材用 80% 乙醇浸泡过夜, 然后进行水浴加热, 在 70 °C 回流 3 h, 重复此步骤 3 次, 并收集合并滤液。接着按不同极性梯度溶液(石油醚、乙酸乙酯、正丁醇)萃取 5–6 次, 最后在 80 °C 下旋转蒸发至干燥得到 BEPD。

1.2 主要试剂和仪器

氟康唑(fluconazole, Flu), 上海源叶生物科技有限公司; 苯甲酸雌二醇, 上海笛柏生物科技有限公司; 乙醇, 江苏强盛功能化学股份有限公司; 石油醚、乙酸乙酯、正丁醇, 国药集团化学试剂有限公司; 多聚甲醛、免疫组化试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒, 山东白鲨生物科技有限公司; 革兰氏染色试剂盒, 珠海贝索生物科技有限公司; 酵母浸出粉葡萄糖琼脂培养基、YPD 液体培养基, 青岛高科技工业园海博生物科技有限公司; 小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、小鼠白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)酶联免疫吸附试剂盒, 上海爱萌优宁生物科技有限公司; TRIzol、ECL 发光试剂盒, 山东思科捷生物科技有限公司; GAPDH、LC3B、ATG5、Bax、

Cleaved-Caspase-3、mTOR、p-mTOR、Occludin 和 PI3K, 成都正能生物技术有限责任公司; Akt、p-Akt, 沈阳万类生物科技有限公司; ZO-1, 武汉三鹰生物技术有限公司; Bax、Bcl-2 和 Claudin-1, Immunoway 公司; Hieff qPCR SYBR Green Master Mix, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

正置显微镜, 广州市明美光电技术有限公司; 高速离心机, 北京雷勃尔医疗器械有限公司; 医用洁净工作台, 上海博讯实业有限公司; 激光共聚焦显微镜, Leica 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Roche 公司; 发光成像分析仪, 上海天能科技有限公司。

1.3 VVC 模型的建立与治疗

小鼠随机分为 6 组: 空白对照组(Control)、模型组(Model)、BEPD 低剂量组(BEPD-L, 20 mg/kg)、BEPD 中剂量组(BEPD-M, 40 mg/kg)、BEPD 高剂量组(BEPD-H, 80 mg/kg)、阳性药物氟康唑组(Flu, 20 mg/kg)。按照本课题组 Hu 等^[22]报道的方法进行操作。除对照组小鼠外, 其余各组小鼠每隔一天在颈部皮下注射以无菌食用油溶解的苯甲酸雌二醇 0.1 mg, 共注射 3 次。随后, 连续一周将含有 2×10^8 个/mL 真菌悬液接种至小鼠阴道(不包括空白对照组)。接种后, 将小鼠倒挂 5 min 以确保真菌悬液与阴道黏膜充分接触。模型建立后, 模型组和空白对照组接受生理盐水灌胃, Flu 组每天给予 20 mg/kg Flu 灌胃, BEPD 组每天分别给予 20、40、80 mg/kg 的 BEPD 灌胃, 持续 7 d。在感染后第 1、3、7、14 天采集阴道灌洗液用于后续实验。图 1 为造模和给药具体流程图, 图片制作由 biogdp.com 提供服务^[23]。

1.4 革兰氏染色

在感染后第 1、3、7、14 天分别收集各组小鼠阴道灌洗液。取 20 μ L 阴道灌洗液均匀涂抹至黏附载玻片上, 自然晾干。按照革兰氏染色试剂盒说明书操作, 检测小鼠阴道冲洗液中白

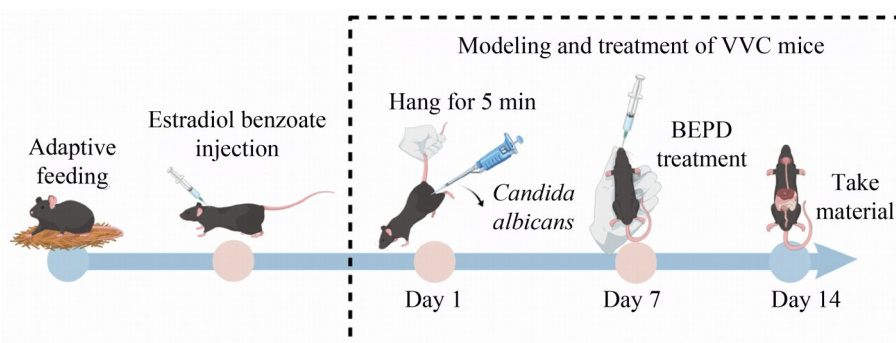


图1 VVC小鼠的造模和给药

Figure 1 Modeling and treatment for VVC mice.

念珠菌的形态。

1.5 真菌载荷

在感染后第 1、3、7、14 天分别收集各组小鼠阴道灌洗液。取 50 μL 灌洗液分别稀释至 10^{-3} 和 10^{-4} ，涂布于 YPD 培养基上，将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h，之后对真菌菌落进行计数。

1.6 酶联免疫吸附测定

收集阴道灌洗液，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 离心 10 min。使用 ELISA 试剂分别对 IL-1 β 、TNF- α 和 LDH 的水平进行定量检测。

1.7 苏木素-伊红染色

处死小鼠后，取其阴道组织，用 10% 多聚甲醛固定，经脱水、包埋处理后，制备厚度为 5 μm 的组织切片。切片采用二甲苯脱蜡，随后进行苏木素-伊红染色(hematoxylin and eosin, HE)染色以评估小鼠阴道组织的损伤程度。在光学显微镜下，以 200 倍放大倍数对每只感染小鼠的阴道组织进行观察与分析。

1.8 网络药理学预测 BEPD 抗 VVC 的作用机制

本研究采用网络药理学方法，利用 TCMSP 在线平台 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 和 Swiss Target Prediction database 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 对口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和药物相似度

(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的白头翁汤中潜在的活性化合物和靶点进行筛选。随后通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行基因名标准化。与真菌感染和 VVC 相关的疾病靶点检索自 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 和 Therapeutic Target Database 数据库 (TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>)，进行整合、去重和整理。通过维恩图绘制药物-疾病交集靶点，蛋白质-蛋白质相互作用网络通过向 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 提交交集靶点生成，并通过 Cytoscape 3.9.1 选出度值前 15 个的作为核心靶点。最后利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 对交集靶点的基因本体 (gene ontology, GO) 功能 [分子功能 (molecular function, MF); 生物过程 (biological process, BP); 细胞组分 (acellular component, CC)] 和京都基因与基因组数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路进行富集分析。

1.9 免疫组化和免疫荧光

小鼠阴道组织切片经脱蜡和水化处理，进行抗原修复，随后采用内源性过氧化物酶阻断法进行封闭。接着滴加正常山羊血清以进一步封闭非特异性结合位点。在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，加入 LC3B (1:100) 一抗，置于湿盒中孵育过夜。次日，依照免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 检测试剂盒说明书的标准操作程序进行后续染色步骤。

染色完成后, 使用中性树胶封片, 并在光学显微镜下进行观察与图像采集。

对于免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色实验, 制备小鼠阴道组织切片用于检测。分别向切片中加入 ATG5 (1:100)和 Cleaved-Caspase-3 (1:100)的一抗及其相应二抗(1:200), 于 37 °C 孵育 1 h。最后加入 DAPI 溶液, 于 37 °C避光孵育 10 min, 随后进行封片处理, 并在共聚焦显微镜下进行观察与图像采集。

1.10 蛋白印迹分析(Western blotting, WB)

用 RIPA 裂解液提取阴道组织蛋白。采用 BCA 试剂盒对提取的蛋白质进行定量, 随后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。将分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上, 于 4 °C与一抗(ZO-1:1:10 000, 其余 1:1 000)孵育过夜, 然后在 37 °C使用二抗(1:15 000)孵育 2 h。利用 ECL 发光试剂盒及发光成像分析仪对蛋白

条带进行化学发光显影与图像采集。以 GAPDH 作为内参蛋白, 采用 ImageJ 软件对所得图像进行半定量分析。

1.11 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

使用 TRIzol 从阴道组织中提取总 RNA, 然后反转录为 cDNA。使用 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 在实时荧光定量 PCR 仪上进行检测, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参。PCR 反应体系(20 μ L): Hieff qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L)各 0.4 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。反应条件: 95 °C预变性 60 s; 58 °C退火 20 s, 72 °C延伸 20 s, 共 40 个循环。引物序列见表 1。目标基因的相对表达量按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.12 数据分析

数据分析使用 SPSS 26.0 软件, 数据可视化

表1 RT-qPCR所需的引物

Table 1 Primers sequences used for RT-qPCR

Gene	Primer direction	Primer sequences (5'→3')
<i>GAPDH</i> -mouse	Forward	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Reverse	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG
<i>PI3K</i> -mouse	Forward	CAAACCACCCAAGCCCACTACT
	Reverse	CCATCAGCAGTGTCTCGGAGTT
<i>AKT</i> -mouse	Forward	GGACTACTTGCACTCCGAGAAG
	Reverse	CATAGTGGCACCGTCCTTGATC
<i>mTOR</i> -mouse	Forward	AGAAGGGTCTCCAAGGACGACT
	Reverse	GCAGGACACAAAGGCAGCATTG
<i>LC3B</i> -mouse	Forward	GTCCTGGACAAGACCAAGTTCC
	Reverse	CCATTCCACAGGAGGAAGAAGG
<i>ATG5</i> -mouse	Forward	CTTGCAATCAAGTTCAGCTCTTCC
	Reverse	AAGTGAGCCTCAACCGCATCCT
<i>CASP3</i> -mouse	Forward	GGAGTCTGACTGGAAAGCCGAA
	Reverse	CTTCTGGCAAGCCATCTCCTCA
<i>BAX</i> -mouse	Forward	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT
	Reverse	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
<i>Bcl-2</i> -mouse	Forward	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG
	Reverse	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG

使用 GraphPad Prism 9.5 软件。数据以平均值±标准差表示, 至少有 3 个生物重复。组间差异采用单因素方差分析比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 BEPD 对 VVC 小鼠阴道的治疗作用

结果显示, 模型组小鼠阴道口可见白色分泌物, 并伴有明显的红肿现象。经 BEPD 治疗后, 局部阴道体征有所改善, BEPD-L 组和 BEPD-M 组分泌物减少, 但阴道口仍存在轻微红肿; BEPD-H 组和 Flu 组小鼠的阴道症状显著改善, 基本恢复至正常水平(图 2A)。进一步对各组小鼠阴道灌洗液进行稀释涂布并培养。与模型组相比, BEPD-M 组和 BEPD-H 组显著降低小鼠阴道内白念珠菌的载荷量(图 2B)。

革兰氏染色结果表明, 除空白对照组外, 其余各组小鼠灌洗液中均可见广泛伸长且相互交织的菌丝; 经 BEPD 干预后, 各治疗组中白念珠菌的数量均有所减少, 且菌丝长度显著缩短, 其中以 BEPD-H 组和 Flu 组尤为明显(图 2C)。

HE 染色结果显示, 空白对照组小鼠阴道黏膜表面覆盖较厚的角质层, 结构完整、层次清晰; 而 VVC 模型组阴道黏膜几乎完全脱落, 角质层消失, 并伴有大量炎症细胞浸润。随着 BEPD 浓度的增加, 角质层逐渐增厚, 炎症细胞浸润明显减少。BEPD-H 组及 Flu 组中, 角质层基本恢复至正常水平, 黏膜组织结构保持完整(图 2D)。ELISA 实验结果显示, 与空白对照组相比, 模型组阴道分泌物中 TNF- α 、IL-1 β 和 LDH 的水平显著升高; 经药物干预后, 上述炎症因子和 LDH 水平均有所降低, 且在 BEPD-M、BEPD-H 及 Flu 组中差异具有统计学意义(图 2E-2G)。

WB 结果显示, 在 VVC 模型小鼠中, 阴道黏膜组织中 ZO-1、Claudin-1 和 Occludin 蛋

白的表达水平显著低于空白对照组; 经 BEPD 治疗后, 上述紧密连接蛋白的表达均有所回升, 其中以 BEPD-H 组的恢复效果最为明显(图 2H-2K)。

综上所述, BEPD 可通过抑制炎症因子的释放和上调紧密连接蛋白的表达, 有效减轻阴道组织的炎症反应, 改善阴道黏膜屏障的损伤。

2.2 基于网络药理学分析 BEPD 治疗 VVC 的潜在机制

通过 TCMSP 数据库检索共获得生物活性物质 65 个, 其中包括白头翁 11 个、黄柏 37 个、黄连 14 个、秦皮 3 个(表 2)。随后, 整合 GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库信息, 获取与真菌感染及 VVC 相关的疾病靶点 2 050 个。利用 VENNY 2.1 在线平台构建维恩图, 识别出 142 个“药物-疾病”交集基因靶点, 这些靶点与白头翁汤对 VVC 的治疗作用相关(图 3A)。基于上述交集靶点, 构建初步的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 并将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行分析与可视化。根据度值(degree)排名筛选前 15 位的靶点作为核心靶点, 构建核心靶点的 PPI 互作网络图(图 3B), 最终获得包含 15 个节点和 94 条边的网络。筛选出的核心靶点包括 TP53、AKT1、SRC、JUN、ESR1、TNF、IL6、PRKACA、CCND1、MAPK1、HSP90AB1、PIK3R1、CXCL8、RELA 和 CDK1。

GO 功能富集结果显示, 共筛选出 2 198 个具有统计学意义的 GO 条目, 其中包括 1 855 个生物学过程、106 个细胞组分和 237 个分子功能条目。条形图展示了基因数最多的前 10 项 BP、CC 和 MF 富集结果(图 3C)。同时, KEGG 通路富集分析共识别出 201 条显著富集的信号通路, 主要包括 PI3K-Akt 通路、Kaposi 肉瘤相关通路、HPV 感染相关通路、IL-17 通路、C 型凝集素通路等。

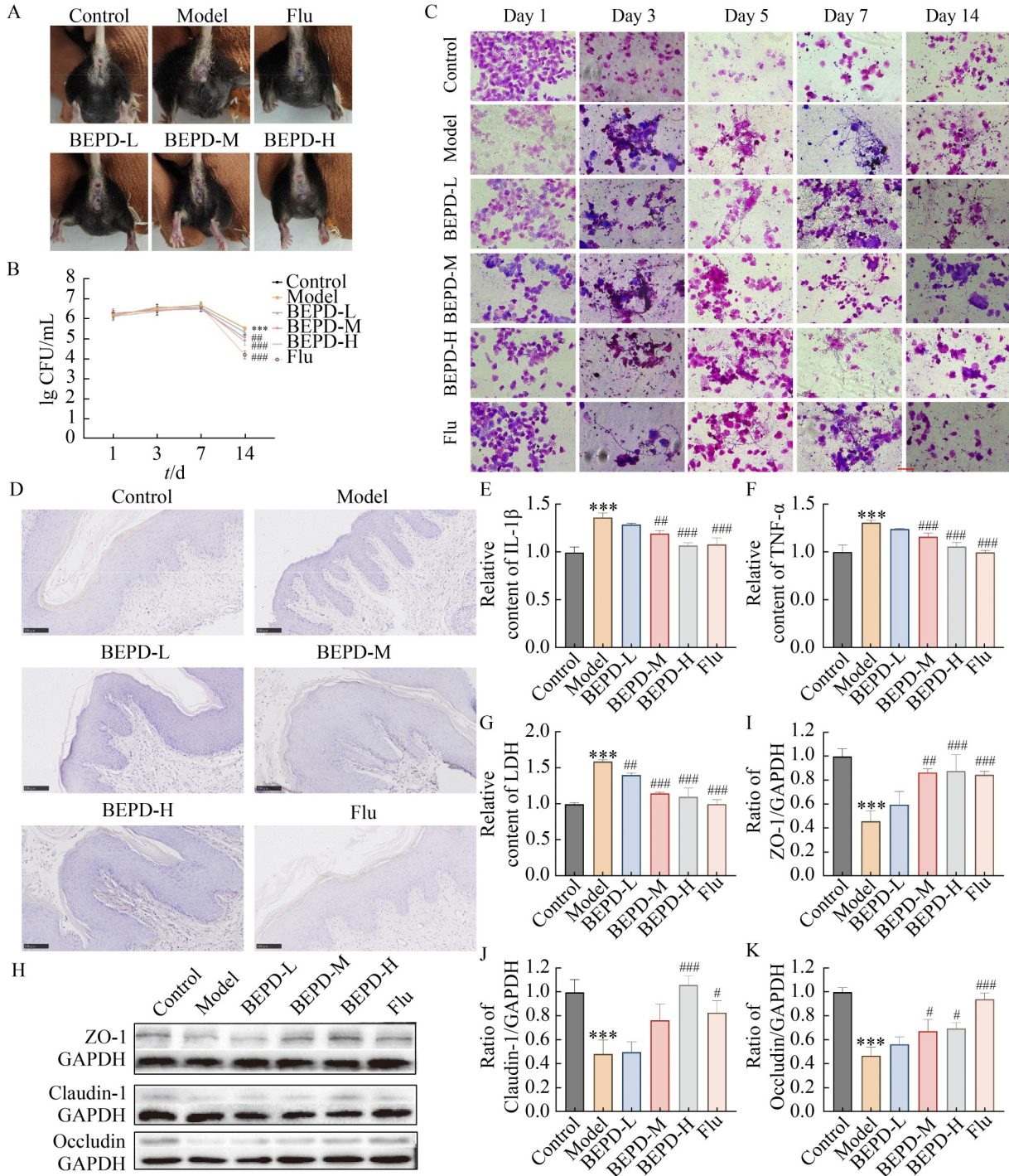


图2 BEPD缓解VVC小鼠阴道炎症和黏膜屏障损伤

Figure 2 BEPD alleviates vaginal inflammation and promotes mucosal barrier reconstruction in VVC mice. A: Local vaginal signs of VVC mice; B: Fungal load in vaginal secretions; C: Morphology of *C. albicans* in vaginal secretions (200 \times , scale bar=100 μ m); D: HE staining of vaginal tissues (200 \times , scale bar=100 μ m); E: IL-1 β level; F: TNF- α level; G: LDH level; H: WB bands; I-K: Quantification of ZO-1, Claudin-1 and Occludin in the vagina of mice. Compared to the control group, *** $P < 0.001$; Compared to the VVC model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

表2 复方白头翁汤的活性成分

Table 2 Information on the effective components of compound *Pulsatilla* decoction

Mol ID	Molecular name	Herb
MOL001984	3beta, 23-dihydroxy-lup-20(29)-ene-28-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-4)-beta-D-glucopyranosyl(1-6)-beta-D-glucopyranoside_qt	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001978	Aureusidin	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL000358	Beta-sitosterol	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL000354	Isorhamnetin	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001979	LAN	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL000211	Mairin	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001971	Pulchinoside C_qt	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001973	Sitosteryl acetate	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL000449	Stigmasterol	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001985	ZINC01615307	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001987	β -sitosterol	<i>Pulsatilla Chinensis</i> (Bunge) Regel
MOL001454	Berberine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL013352	Obacunone	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL002894	Berberrubine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL002897	Epiberberine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL002903	(R)-canadine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL002904	Berlambine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL002907	Corchoroside A_qt	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL000622	Magnograndiolide	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL000762	Palmidin A	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL000785	Palmatine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL000098	Quercetin	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL001458	Coptisine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL002668	Worenine	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL008647	Moupinamide	<i>Coptis chinensis</i> Franch
MOL000098	Quercetin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000358	Beta-sitosterol	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000449	Stigmasterol	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000622	Magnograndiolide	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000762	Palmidin A	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000785	Palmatine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000787	Fumarine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000790	Isocorypalmine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL001131	Phellamurin_qt	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL001454	Berberine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL001455	S-canadine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL001458	Coptisine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL001771	Poriferast-5-en-3beta-ol	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid

(待续)

(续表2)

Mol ID	Molecular name	Herb
MOL002636	Kihadalactone A	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002641	Phellavin _{qt}	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002643	Delta 7-stigmastenol	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002644	Phellopterin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002651	Dehydrotanshinone II A	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002652	Delta7-dehydrosophoramine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002656	Dihydroniloticin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002659	Kihadanin A	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002660	Niloticin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002662	Rutaecarpine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002663	Skimmianin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002666	Chelerythrine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002668	Worenine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002670	Cavidine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002671	Candletoxin A	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002672	Hericenone H	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002673	Hispidone	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL002894	Berberrubine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL005438	Campesterol	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL006392	Dihydroniloticin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL006401	Melianone	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL006413	Phellochin	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL006422	Thalifendine	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL013352	Obacunone	<i>Phellodendron chinense</i> Schneid
MOL000358	Beta-sitosterol	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance
MOL006709	AIDS214634	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance
MOL006710	8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-7-hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance

在开展网络药理学分析的同时,本研究梳理了近年来 VVC 发病机制的相关文献,发现阴道上皮细胞稳态中自噬与凋亡的调控尤为关键。KEGG 富集结果中的 PI3K-Akt 通路明确报道参与调控自噬与凋亡。因此,后续将围绕 PI3K-Akt 通路及其介导的自噬与凋亡,探讨 BEPD 通过调节阴道上皮细胞稳态缓解 VVC 的作用机制(图 3D)。

2.3 BEPD 对 VVC 小鼠阴道黏膜上皮细胞自噬的影响

IHC 结果显示,随着 BEPD 浓度的增加,LC3B 的表达水平呈剂量依赖性升高,与模型组相比差异具有统计学意义(图 4A、4B)。IF 结果表明,经 BEPD-M 和 BEPD-H 处理后,ATG5

的荧光信号显著增强(图 4C、4D)。此外,WB 与 RT-qPCR 检测结果一致显示,在 VVC 小鼠模型中,LC3B II/LC3B I 及 ATG5 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著下调;而 BEPD 干预可有效恢复上述分子的表达(图 4E-4I)。

2.4 BEPD 对 VVC 小鼠阴道黏膜上皮细胞凋亡的影响

IF 结果表明,与空白对照组相比,模型组中 Cleaved-Caspase-3 的表达水平显著升高,随着 BEPD 治疗浓度的增高,Cleaved-Caspase-3 的荧光强度逐渐下降(图 5A、5B)。WB 结果显示,模型组中促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved-Caspase-3 表达量显著上调,抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著下调,而 BEPD 则显著拮抗了这

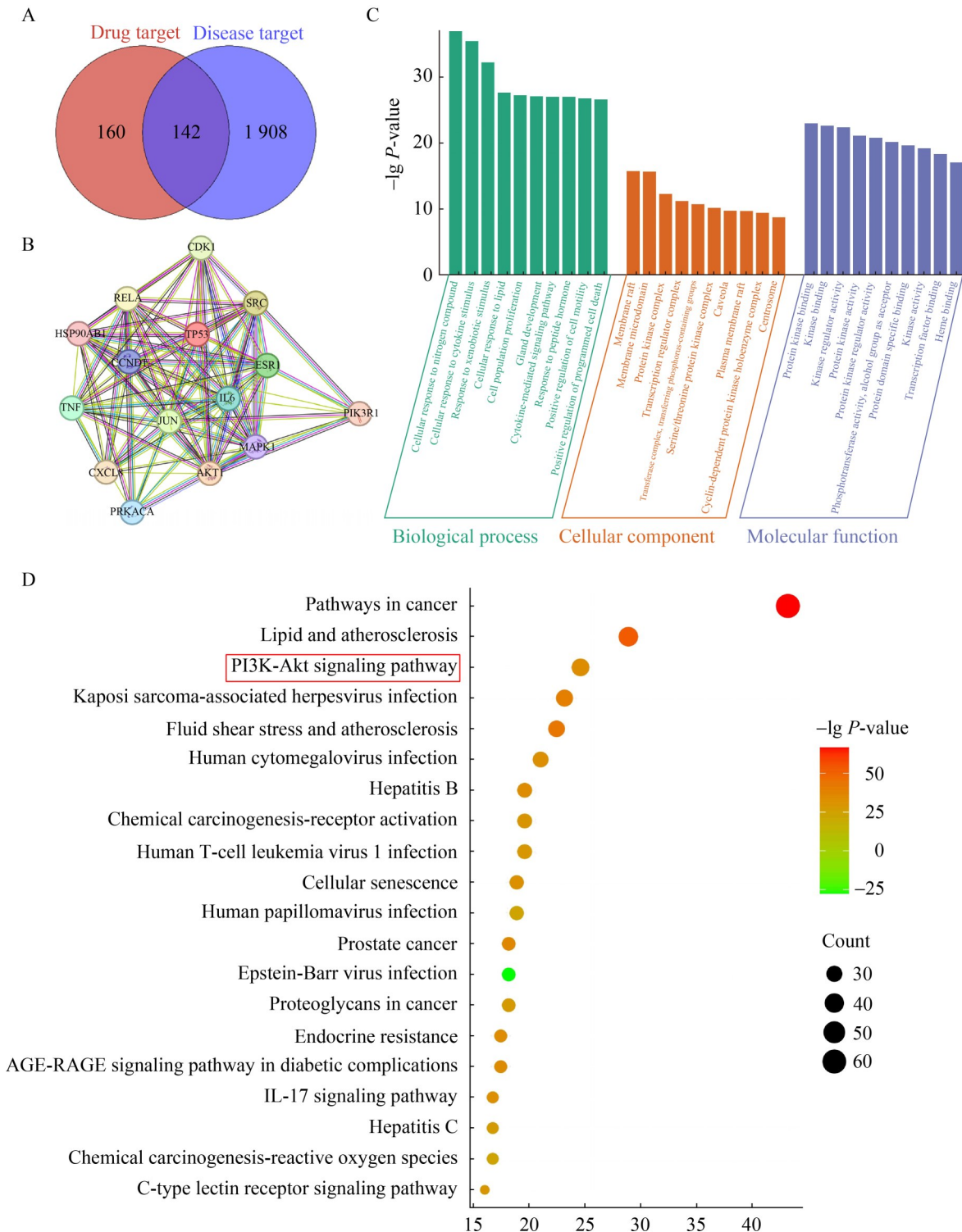


图3 基于网络药理学分析BEPD治疗VVC的潜在机制

Figure 3 Potential mechanism of BEPD in treating VVC based on network pharmacology analysis. A: Venn diagram of “drug-disease” intersection gene targets; B: PPI network; C: GO enrichment analysis; D: KEGG enrichment analysis.

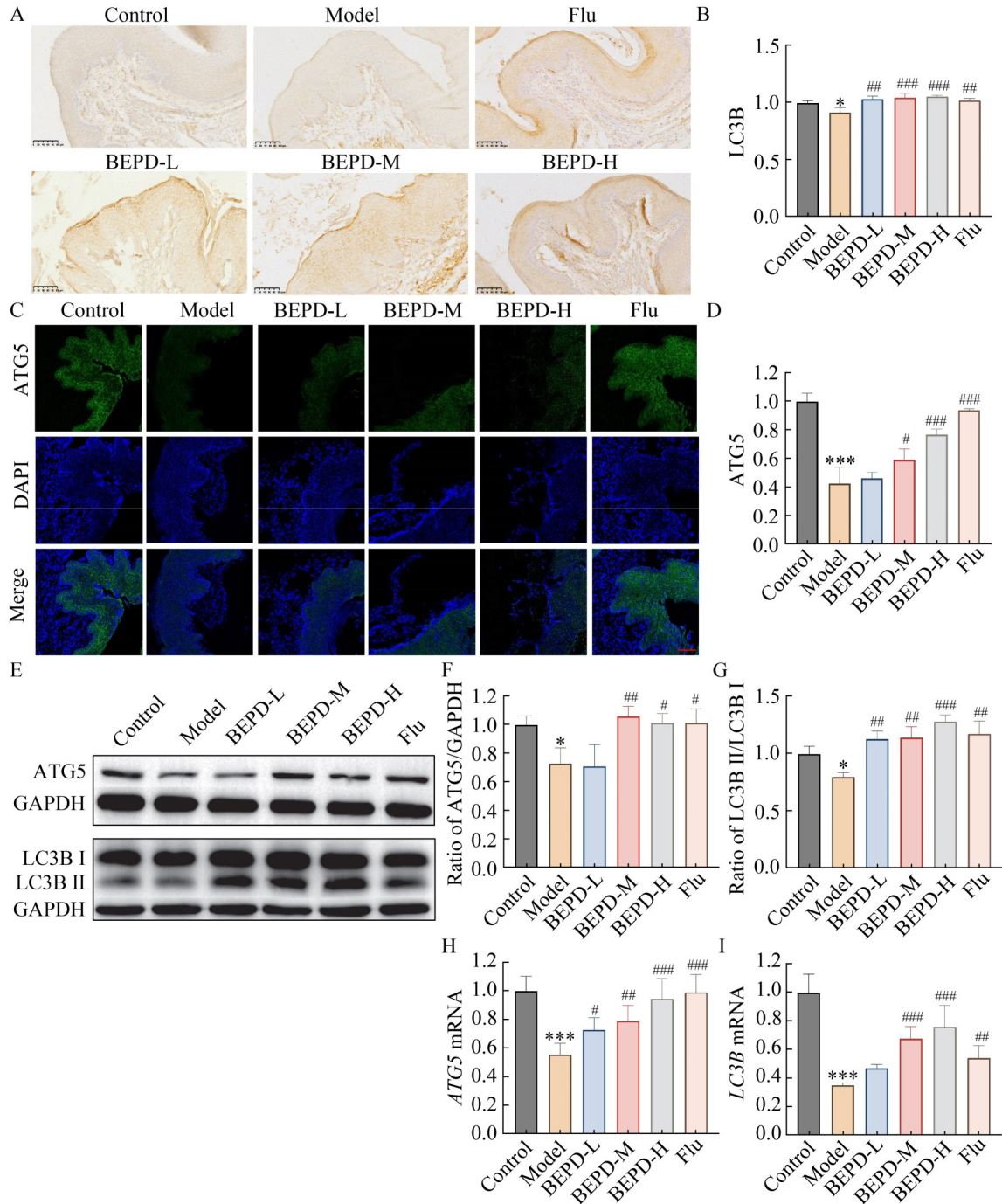


图4 BEPD诱导VVC小鼠阴道上皮细胞自噬的激活

Figure 4 BEPD-induced activation of autophagy in vaginal epithelial cells of VVC mice. A, B: Immunohistochemistry and quantification of LC3B in the vagina of mice (200 \times , scale bar=100 μ m); C, D: Immunofluorescence and quantification of ATG5 in the vagina of mice (200 \times , scale bar=100 μ m); E–G: WB bands and quantification of LC3B I, LC3B II, and ATG5 in the vagina of mice; H and I: mRNA expression of *ATG5* and *LC3B* in the vagina of mice. Compared to the control group, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$; Compared to the VVC model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

种趋势(图 5C–5F)。RT-qPCR 检测显示相同趋势, 即 BEPD 可以降低促凋亡基因 *Bax* 和 *Caspase-3* 的表达, 促进抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达(图 5G–5I)。

2.5 BEPD 对 PI3K-Akt-mTOR 信号通路的影响

RT-qPCR 和 WB 结果表明, 在模型组小鼠

中, PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 的表达水平显著升高; 经 BEPD 中高剂量处理后, PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 的表达则逐渐下调(图 6A–6H)。上述结果提示, 随着 BEPD 剂量的增加, Akt 与 mTOR 的活化程度呈梯度性抑制, 推测 PI3K-Akt-mTOR 信号通路的抑制可能介导了 BEPD 诱导阴道水平细胞自噬并抑制细胞凋亡的生物学效应。

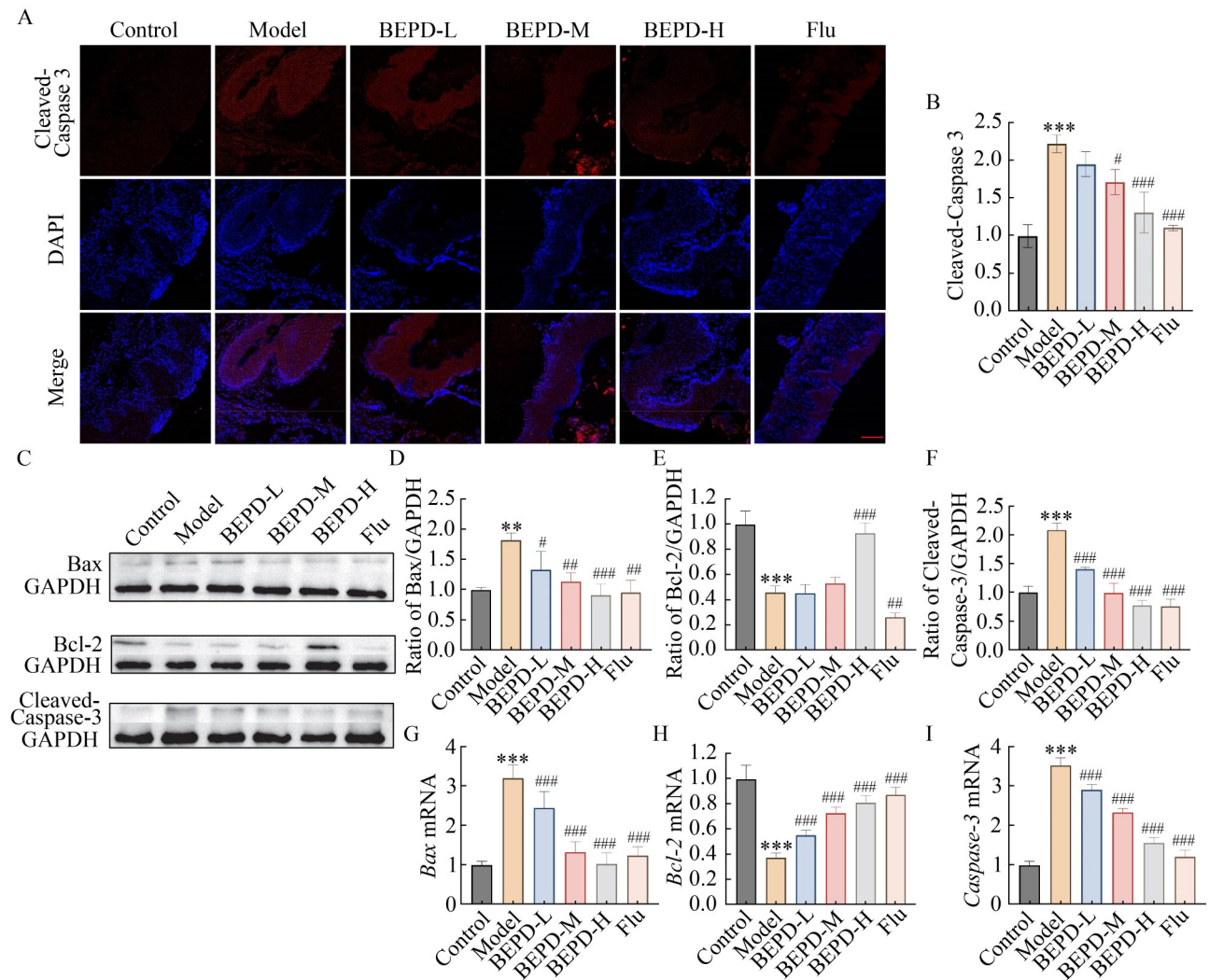


图5 BEPD抑制VVC小鼠阴道上皮细胞凋亡

Figure 5 BEPD inhibits apoptosis of vaginal epithelial cells in VVC mice. A, B: Fluorescence and quantification of Cleaved-Caspase-3 in the vagina of mice (200 \times , scale bar=100 μ m); C–F: WB bands and quantification of Bax, Bcl-2, and Cleaved-Caspase-3 in the vagina of mice; G–I: mRNA expression of *Bax*, *Bcl-2*, and *Caspase-3* in the vagina of mice. Compared to the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared to the VVC model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

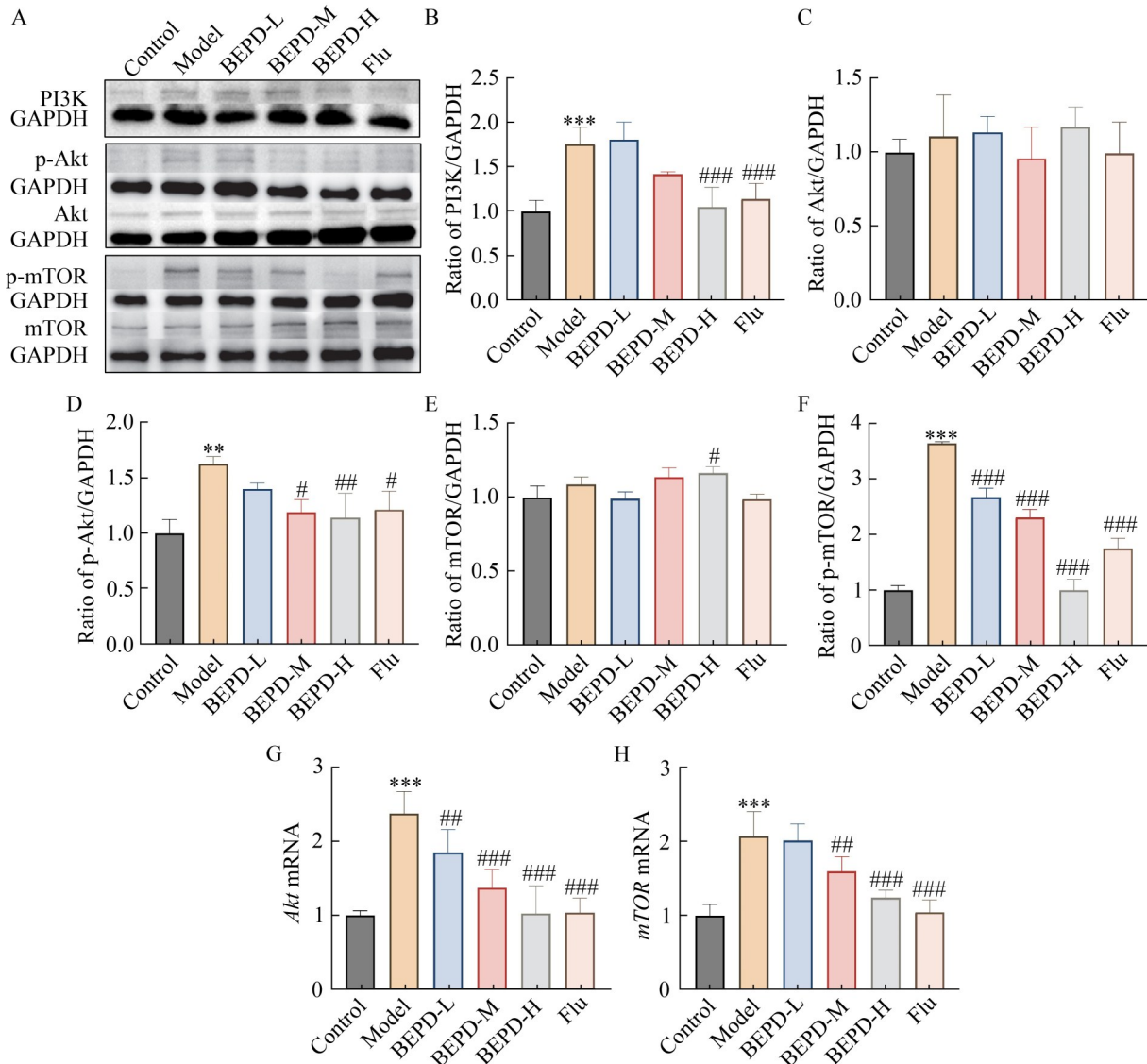


图6 BEPD抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活

Figure 6 BEPD inhibits the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. A – F: WB bands and quantification of PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, and mTOR in the vagina of mice; G, H: mRNA expression of *Akt* and *mTOR* in the vagina of mice. Compared to the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared to the VVC model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

3 讨论与结论

白念珠菌作为一种常见的引起女性生殖道黏膜感染的致病菌，可通过释放念珠菌溶素等毒力因子造成阴道黏膜损伤，严重影响女性生活质量。白念珠菌虽是引发 VVC 的直接诱因，

但宿主的免疫应答也会影响疾病的发生与发展。VVC 患者的临床表现严重程度并非单纯由阴道内白念珠菌的载荷量决定，而与阴道黏膜上皮的过度免疫应答密切相关^[24]。常规抗真菌药物主要通过靶向菌体不同结构或组分发挥作用，尚未发现通过对宿主的机能调控而达到抗真菌

感染作用^[25]。鉴于中药具有多成分、多靶点、综合调节及免疫调控等独特优势,其在VVC治疗中或许可通过调控黏膜屏障发挥作用。在本研究中,经BEPD低剂量治疗后症状缓解不明显;但中高剂量治疗后,VVC小鼠阴道分泌物减少,分泌物中所含有的促炎因子水平显著降低,阴道红肿症状显著改善。

阴道上皮细胞是黏膜防御的第一道防线。正常上皮细胞之间的相互作用由细胞间多种紧密连接蛋白(如Claudin-1、Occludin和ZO-1等)连接组成,这些连接蛋白控制细胞旁通透性,维持黏膜屏障功能和黏膜稳态^[26-27]。Doan等^[28]研究表明,热带念珠菌和白念珠菌的感染会下调紧密连接蛋白的表达,降低肠道屏障的通透性。在本研究中,受白念珠菌感染的小鼠阴道组织中紧密连接蛋白表达下调,经BEPD中高剂量治疗后,紧密连接蛋白表达逐渐恢复至正常水平,表明BEPD可通过恢复损伤的阴道上皮屏障结构缓解VVC。

网络药理学近年来广泛应用于分析中药治疗相关疾病涉及的关键基因或信号通路。本研究采用网络药理学方法分析了BEPD在治疗VVC中的潜在作用机制,筛选出AKT1等多个靶点以及PI3K-Akt等多个信号通路。同时,本研究查阅分析了近年来关于VVC发病机制的主要文献发现,其涉及阴道黏膜上皮稳态的自噬与凋亡的调控,而上述KEGG富集通路中的PI3K-Akt通路即参与了对自噬和凋亡的调控。因此,下文将从PI3K-Akt通路介导的自噬和凋亡角度探讨BEPD通过调控阴道上皮细胞稳态缓解VVC的作用机制。

自噬作为细胞内部高度保守的分解代谢过程,在调控免疫应答和炎症反应中起着关键作用。它不仅能够维持细胞内稳态,清除受损或衰老的细胞器及蛋白质聚集体,还能够选择性地识别并清除入侵的病原微生物(如细菌、病毒和真菌)^[29-30]。自噬体通过双层膜结构包裹细胞质中的大分子物质、受损细胞器或病原体,并

将其运送至溶酶体进行降解与再循环,从而提供能量和代谢前体,并参与抗原呈递等免疫调节功能。Lapaquette等^[31]研究发现,在白念珠菌感染上皮细胞过程中会招募多种自噬相关蛋白到白念珠菌入侵部位,促进溶酶体胞吐作用,参与质膜的修复,并保护上皮细胞免受白念珠菌诱导的细胞死亡。自噬在细胞感染期间与凋亡相互作用,共同维持细胞命运平衡。自噬通常在应激早期被诱导,通过清除受损的线粒体、内质网等细胞器以及错误折叠的蛋白质,从而抑制过度凋亡,维持细胞存活^[32]。在细胞凋亡的调控过程中,促凋亡蛋白Bax与抗凋亡蛋白Bcl-2发挥核心调控作用。当细胞受到外界应激刺激时,Bax/Bcl-2比值升高,导致线粒体膜通透性增加,并激活半胱天冬酶-3(caspase-3),表明细胞凋亡开始^[33]。自噬与凋亡之间的关系为理解感染性疾病、炎症相关病理过程及潜在治疗策略提供了重要视角。本研究结果显示,对VVC小鼠进行BEPD治疗后,中高剂量组中的Bax和Cleaved-Caspase-3的表达均显著下调,而LC3B II/LC3B I、ATG5和抗凋亡蛋白Bcl-2的表达则显著上调,表明BEPD对阴道上皮细胞具有明显的激活保护性自噬和抗凋亡作用,也提示上皮屏障的恢复可能与此相关。

PI3K-Akt信号通路主要介导细胞增殖、分化、迁移及代谢过程,并在调控自噬与凋亡过程中发挥关键作用^[34-35]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)被认为是调节自噬的核心因子,是多条信号通路交汇的关键节点,其中包括磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/mTOR以及单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/mTOR等通路^[36-37]。Akt的激活在调控细胞生理过程中具有重要意义,已被证实可通过多个层面抑制哺乳动物细胞的自噬活性^[38]。此外,多种Akt下游效应分子,如mTORC1、mTORC2、GSK3 β 和TSC1/2,均定位于溶酶

体——即自噬发生的主要场所^[39]。Akt 可通过磷酸化并抑制 TSC1/2 复合物，维持 RHEB GTP 酶的活性状态，从而激活 mTORC1，最终抑制自噬的启动^[40]。Wang 等^[41]研究表明，Akt 还可直接磷酸化自噬关键蛋白 ULK1 (ATG1) 和 Beclin1 (ATG6)，该作用独立于 mTOR 通路，进一步增强对自噬的负向调控。此外，Akt 在体外和体内均可磷酸化抗凋亡蛋白 Bcl-2，促进其从细胞质向线粒体外膜转位，释放活化的 Bcl-2 蛋白，进而阻止线粒体释放细胞色素 C，抑制下游半胱天冬酶 (caspase) 的激活，最终阻断细胞凋亡过程^[42]。因此，mTOR 与 Akt 通常被视为连接自噬与细胞凋亡的关键分子枢纽。在本研究中，BEPD 影响这一通路的能力为自噬激活和凋亡抑制的发生提供了一个合理的解释。本研究表明，VVC 模型组小鼠 PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 的表达水平显著上调；BEPD 治疗后，PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 的表达明显下调。上述结果提示，BEPD 有可能通过调控 PI3K-Akt-mTOR 信号通路，促进阴道上皮细胞自噬，抑制细胞凋亡，从而发挥治疗 VVC 中的作用。

综上所述，对于 VVC 的治疗，中药提取物 BEPD 具有独特的优势，其缓解 VVC 与促进阴道上皮细胞自噬、抑制细胞凋亡、改善黏膜屏障、减轻炎症反应密切相关，这些作用可能涉及调控 PI3K-Akt-mTOR 信号通路，这一发现为上皮屏障在 VVC 等黏膜感染性疾病中发挥保护作用提供了新的理论依据。当然，本研究的工作仍存在一定的局限性。首先，本研究主要基于小鼠的 VVC 模型验证网络药理学中 PI3K-Akt 通路在 BEPD 治疗 VVC 的潜在作用，缺乏核心靶点与通路的关联机制。其次，虽然小鼠 VVC 模型在致病过程、炎症反应等方面具有可重复性高、操作性强等优点，但其与人类阴道的复杂微环境(如菌群构成、免疫系统差异、激素周期波动及上皮结构等)仍存在一定的区别。因此，未来也需要更多基于人类细胞模型或临床样本的研究加以验证。

作者贡献声明

邱薇：实验操作、数据收集和处理；李臻：提供技术支持；吴惠：协助实验操作；施高翔：参与论文讨论；吴大强：数据分析；汪天明：研究构思和设计；汪长中：论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Hu KF, Zhang H, Shi GX, Wang BF, Wu DQ, Shao J, Wang TM, Wang CZ. Effects of *n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction on the NLRP3 inflammasome in macrophages infected with *Candida albicans*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 304: 116041.
- [2] Willems HME, Ahmed SS, Liu JY, Xu ZB, Peters BM. Vulvovaginal candidiasis: a current understanding and burning questions[J]. *Journal of Fungi*, 2020, 6(1): 27.
- [3] Nyirjesy P, Brookhart C, Lazenby G, Schwebke J, Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis: a review of the evidence for the 2021 centers for disease control and prevention of sexually transmitted infections treatment guidelines[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2022, 74(Supplement_2): S162-S168.
- [4] Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2016, 62(4): e1-e50.
- [5] Takač I. The frequency of bacterial and yeast infection in women with different grades of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [J]. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 1998, 80(2): 231-234.
- [6] Zhao T, Zhang K, Shi GX, Ma KL, Wang BF, Shao J, Wang TM, Wang CZ. Berberine inhibits the adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 814883.
- [7] Cheu RK, Mohammadi A, Schifanella L, Broedlow C, Driscoll CB, Miller CJ, Reeves RK, Yudin MH, Hensley-McBain T, Kaul R, Klatt NR. Altered innate immunity and damaged epithelial integrity in vaginal microbial dysbiosis[J]. *Frontiers in Reproductive Health*, 2022, 4: 876729.
- [8] 汪天明, 施高翔, 吴大强, 邵菁, 汪长中. 念珠菌-上皮细胞互作研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(3): 918-931. Wang TM, Shi GX, Wu DQ, Shao J, Wang CZ. *Candida*-epithelial interactions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 918-931 (in Chinese).

- [9] Zuo H, Chen C, Sa YL. Therapeutic potential of autophagy in immunity and inflammation: current and future perspectives[J]. *Pharmacological Reports*, 2023, 75(3): 499-510.
- [10] Zheng QQ, Duan LW, Zhang Y, Li JY, Zhang SY, Wang H. A dynamically evolving war between autophagy and pathogenic microorganisms[J]. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2022, 23(1): 19-41.
- [11] Tam J, Mansour M, Acharya M, Sokolovska A, Timmons A, Lacy-Hulbert A, Vyas J. The role of autophagy-related proteins in *Candida albicans* infections[J]. *Pathogens*, 2016, 5(2): 34.
- [12] Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity[J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(5): 461-470.
- [13] Shroff A, Reddy KVR. Autophagy gene *ATG5* knockdown upregulates apoptotic cell death during *Candida albicans* infection in human vaginal epithelial cells[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2018, 80(6): e13056.
- [14] Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses[J]. *Life Sciences*, 2017, 188: 53-67.
- [15] Doherty J, Baehrecke EH. Life, death and autophagy[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(10): 1110-1117.
- [16] Matsuzawa-Ishimoto Y, Shono Y, Gomez LE, Hubbard-Lucey VM, Cammer M, Neil J, Dewan MZ, Lieberman SR, Lazrak A, Marinis JM, Beal A, Harris PA, Bertin J, Liu C, Ding Y, van den Brink MRM, Cadwell K. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2017, 214(12): 3687-3705.
- [17] Burger E, Araujo A, López-Yglesias A, Rajala MW, Geng LD, Levine B, Hooper LV, Burstein E, Yarovinsky F. Loss of paneth cell autophagy causes acute susceptibility to *Toxoplasma gondii*-mediated inflammation[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(2): 177-190.e4.
- [18] Pott J, Kabat AM, Maloy KJ. Intestinal epithelial cell autophagy is required to protect against TNF-induced apoptosis during chronic colitis in mice[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(2): 191-202.e4.
- [19] Zhu XR, Messer JS, Wang YW, Lin FF, Cham CM, Chang J, Billiar TR, Lotze MT, Boone DL, Chang EB. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(3): 1098-1110.
- [20] De J Treviño-Rangel R, González GM, Montoya AM, Rojas OC, Elizondo-Zertuche M, Álvarez-Villalobos NA. Recent antifungal pipeline developments against *Candida auris*: a systematic review[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(11): 1144.
- [21] 刘娜. 白头翁汤联合护理干预在念珠性阴道炎中的效果[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2019, 17(24): 115-117. Liu N. The effect of Baitouweng decoction combined with nursing intervention in candidal vaginitis[J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2019, 17(24): 115-117 (in Chinese).
- [22] Hu KF, Jiang XJ, Zhang JP, Xia D, Wu DQ, Shao J, Wang TM, Wang CZ. Effect of *Pulsatilla* decoction on vulvovaginal candidiasis in mice. evidences for its mechanisms of action[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155515.
- [23] Jiang S, Li HQ, Zhang L, Mu WP, Zhang Y, Chen TJ, Wu JX, Tang HY, Zheng SX, Liu YF, Wu YX, Luo XT, Xie YB, Ren J. Generic diagramming platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2025, 53(D1): D1670-D1676.
- [24] Wu H, Li C, Wang YM, Zhang MX, Wu DQ, Shao J, Wang TM, Wang CZ. Transcriptomics reveals effect of *Pulsatilla* decoction butanol extract in alleviating vulvovaginal candidiasis by inhibiting neutrophil chemotaxis and activation via TLR4 signaling[J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(5): 594.
- [25] Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(5): 4.5.19.
- [26] Kuo WT, Odenwald MA, Turner JR, Zuo L. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2022, 1514(1): 21-33.
- [27] Li YY, Zeng JJ, Zhong X, Huang QT, Wang XF, Sun SY, Wang HM, Huang XQ, Ling JJ, Lin RF. Diosgenin ameliorates CLP-induced sepsis in mice via suppressing inflammatory responses and preserving intestinal mucosal barrier integrity[J]. *Molecular Immunology*, 2025, 187: 210-220.
- [28] Doan HT, Chiu YL, Cheng LC, Coad RA, Chiang HS. *Candida tropicalis* alters barrier permeability and claudin-1 organization in intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Physiological Investigation*, 2025, 68(1): 67-76.
- [29] Wang LM, Klionsky DJ, Shen HM. The emerging mechanisms and functions of microautophagy[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(3): 186-203.
- [30] Kumar R, Chhikara BS, Gulia K, Chhillar M. Cleaning the molecular machinery of cells via proteostasis, proteolysis and endocytosis selectively, effectively, and precisely: intracellular self-defense and cellular perturbations[J]. *Molecular Omics*, 2020, 17(1): 11-28.
- [31] Lapaquette P, Ducreux A, Basmaciyan L, Paradis T, Bon F, Bataille A, Winckler P, Hube B, Esclatine A, Bringer MA, Morel E, Dalle F. Membrane protective role of autophagic machinery during infection of epithelial cells by *Candida albicans*[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14: 2004798.
- [32] Messer JS. The cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(7): 1281-1296.
- [33] Ren SC, Wei Y, Wang RL, Wei SZ, Wen JX, Yang T, Chen X, Wu SH, Jing MY, Li HT, Wang M, Zhao YL. Rutaecarpine ameliorates ethanol-induced gastric mucosal injury in mice by modulating genes related to inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. *Frontiers*

- in *Pharmacology*, 2020, 11: 600295.
- [34] Qin GW, Lu P, Peng L, Jiang W. Ginsenoside Rb1 inhibits cardiomyocyte autophagy *via* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2021, 49(8): 1913-1927.
- [35] Liu PY, Xu Y, Ye JX, Tan JR, Hou J, Wang YZ, Li JW, Cui WZ, Wang SY, Zhao QY. Qingre Huazhuo Jiagsuan decoction promotes autophagy by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to relieve acute gouty arthritis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 302: 115875.
- [36] Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway[J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(7): 1946-1954.
- [37] Yan LS, Zhang SF, Luo G, Cheng BC, Zhang C, Wang YW, Qiu XY, Zhou XH, Wang QG, Song XL, Pan SY, Zhang Y. Schisandrin B mitigates hepatic steatosis and promotes fatty acid oxidation by inducing autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Metabolism*, 2022, 131: 155200.
- [38] Kma L, Baruah TJ. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(1): 248-264.
- [39] Li Y, Xu M, Ding X, Yan C, Song ZQ, Chen LW, Huang XH, Wang X, Jian YL, Tang GH, Tang CY, Di YT, Mu SZ, Liu XZ, Liu K, Li T, Wang YC, Miao L, Guo WX, Hao XJ, et al. Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1[J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(10): 1065-1077.
- [40] Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network[J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.
- [41] Wang RC, Wei YJ, An ZY, Zou ZJ, Xiao GH, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through beclin 1 phosphorylation[J]. *Science*, 2012, 338(6109): 956-959.
- [42] Glab JA, Cao ZP, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins, beyond the veil[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2020, 351: 1-22.