

【实验研究】

琥珀散对人MenSCs植入式子宫内膜异位症裸鼠异位病灶及Beclin1、ZEB1表达的影响

张悦健¹, 何甜甜¹, 林陶秀¹, 霍超越¹, 杨思晨¹, 高路益¹, 杨梦萍¹, 罗伯茨宋泽¹, 李长香³, 马小娜^{2*}

1. 北京中医药大学第三临床医学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029

3. 北京中医药大学 中医学学院, 北京 100029

摘要: 目的 探究琥珀散对人经血源间充质干细胞(MenSCs)植入式子宫内膜异位症(EMT)裸鼠的异位病灶及Bcl-2同源结构域蛋白抗体(Beclin1)、锌指E盒同源结合蛋白1(ZEB1)表达的影响。方法 将裸鼠随机分为对照组、模型组、地诺孕素(0.001 g·kg⁻¹)组和琥珀散(29 g·kg⁻¹)组, 每组10只。从EMT患者及健康女性的月经血中提取MenSCs, 并借助成脂、成骨诱导分化鉴定其干细胞属性。将EMT MenSCs注射至裸鼠腹部皮下, 制备EMT裸鼠模型, 对照组植入正常人MenSCs。至第7天每组随机抽取1只裸鼠, 开腹观察异位病灶生长情况, 并借助HE染色和人类白细胞抗原A(HLAA)免疫荧光法评价模型。自造模成功连续给药21 d, 末次给药后第2日取材, 观测EMT异位病灶体积及血管分布; 切取异位病灶组织, 应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western blotting、免疫组织化学及免疫荧光技术分别测定组织中Beclin1与ZEB1在mRNA及蛋白水平的表达。结果 EMT源及正常MenSCs为长梭形, 呈辐射状向周边集落扩散, 且经成脂、成骨诱导分化后均有脂滴、钙结节形成。造模7 d后, 对照组未见异位病灶形成, 其余各组均有囊泡样病灶形成, 且周围血管形成丰富, 病理切片均可见子宫内膜腺体和间质, HLAA均阳性表达。与模型组比较, 琥珀散能显著缩小EMT裸鼠异位病灶体积($P<0.001$), 改善周围血管分布。在mRNA水平, 与模型组比较, 地诺孕素组和琥珀散组ZEB1表达显著降低($P<0.001$), Beclin1表达显著升高($P<0.001$)。在蛋白水平, 与模型组比较, Western blotting结果显示, 地诺孕素组和琥珀散组ZEB1表达显著降低($P<0.05$), Beclin1表达显著升高($P<0.01$ 、 0.001); 免疫组化结果显示, 琥珀散组Beclin1大量分布在异位内膜、腺腔以及腺上皮细胞与间质细胞的胞核及胞浆中, Beclin1表达显著增加($P<0.01$); 免疫荧光结果显示, 琥珀散组ZEB1蛋白在异位内膜、腺腔、腺上皮细胞及周围间质细胞的胞核与胞浆中的分布均明显减少, 地诺孕素组、琥珀散组ZEB1蛋白表达阳性率显著降低($P<0.001$)。结论 琥珀散可能通过上调Beclin1、下调ZEB1表达, 缩小EMT裸鼠异位病灶, 改善周围血管分布。

关键词: 子宫内膜异位症; 经血源间充质干细胞; 琥珀散; 异位病灶; Beclin1; ZEB1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)02-0294-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.009

Effects of Hupo Powder on ectopic lesions, Beclin1 and ZEB1 expression in endometriotic nude mice implanted with human MenSCs

ZHANG Yuejian¹, HE Tiantian¹, LIN Taoxiu¹, HUO Chaoyue¹, YANG Sichen¹, GAO Luyi¹, YANG Mengping¹, SONG ZE ROBERTS¹, LI Changxiang³, MA Xiaona²

1. The Third School of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the influence of Hupo Powder on the ectopic lesions and the expression of Beclin1 and ZEB1 in EMT nude mice implanted with human menstrual blood stromal cells (MenSCs). **Methods** Nude mice were randomly divided into control group, model group, dienogest (0.001 g·kg⁻¹) group and Hupo Powder (29 g·kg⁻¹) group, 10 mice in each group. MenSCs

收稿日期: 2022-11-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973895); 北京中医药大学重点攻关项目(2020-JYB-ZDGG-143-3)

第一作者: 张悦健, 中医妇科学博士研究生, 主要研究方向为中医药干预子宫内膜异位症的作用机制研究。E-mail: Zyj095214@163.com

*通信作者: 马小娜, 妇科主任, 主任医师/教授, 主要从事中医药对子宫内膜异位症诊疗的机制与临床研究。E-mail: fightandfight@yeah.net

were extracted from menstrual blood of EMT patients and healthy women, respectively, and identified by adipogenic and osteogenic differentiation. EMT MenSCs were sc into the abdomen of nude mice to prepare EMT nude mice model, and the control group was implanted with healthy MenSCs. On the 7th day, one nude mouse was randomly selected from each group, and the growth of ectopic lesions was observed. We then evaluated model by HE staining and human leukocyte antigen A (HLAA) immunofluorescence. Each group was administered continuously for 21 days since model had been prepared, and the ectopic lesions were collected on the 2nd day after the last administration. We observed the volume and blood vessel distribution of EMT ectopic lesions in each group. Beclin1 and ZEB1 mRNA and protein levels were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), Western blotting, immunohistochemistry and immunofluorescence. **Results** EMT-derived and normal MenSCs were long-fusiform, radially spreading to the surrounding colonies, and lipid droplets and calcium nodules were formed. After seven days of modeling, no ectopic lesion was found in the control group, while the other groups had vesicle-like lesions and abundant peripheral blood vessels. Endometrial glands and stroma were found in pathological sections, and HLAA was positively expressed. Compared with the model group, Hupo Powder could significantly reduce the volume of ectopic lesions in EMT nude mice ($P < 0.001$) and improve the distribution of peripheral blood vessels. At the mRNA level, the expression of ZEB1 was decreased in the dienogest group and the Hupo Powder group ($P < 0.001$), while the expression of Beclin1 was increased ($P < 0.001$). At the protein level, compared with model group, Western blotting results showed that the expression of ZEB1 in dinogestrel group and Hupo Powder group was significantly decreased ($P < 0.05$), while Beclin1 expression was significantly increased ($P < 0.01, 0.001$). Immunohistochemical results showed that Beclin1 in Hupo Powder group was distributed in ectopic intima, glandular cavity, nucleus and cytoplasm of glandular epithelial cells and stromal cells, and Beclin1 expression was significantly increased ($P < 0.01$). Immunofluorescence results showed that ZEB1 protein distribution in ectopic endometrium, glandular cavity, glandular epithelial cells and the cytoplasm of surrounding stromal cells was significantly decreased in the Hupo Powder group, and the positive rate of ZEB1 protein expression was significantly decreased in the dinogestrel and Hupo Powder groups ($P < 0.001$). **Conclusion** Hupo Powder may reduce the ectopic lesions of EMT nude mice and improve the distribution of peripheral blood vessels by up-regulating Beclin1 and down-regulating the expression of ZEB1.

Key words: endometriosis; menstrual blood stromal cells (MenSCs); Hupo Powder; ectopic lesions; Beclin1; ZEB1

子宫内膜异位症(EMT)严重危害女性身心健康,20%~50%的不孕症合并EMT,71%~87%的慢性盆腔疼痛和EMT有关^[1],25%~75%有痛经症状的青少年是EMT患者^[2]。中医治疗EMT独具特色,在病灶成因上,“寒凝血瘀成癥”是EMT异位病灶形成的关键病机;在处方治疗上,具有“温经通络、活血消癥”功效的琥珀散治疗EMT疗效确切。琥珀散由醋三棱、醋莪术、赤芍、当归、牡丹皮、熟地黄、肉桂、乌药、醋延胡索、北刘寄奴组成,可显著改善EMT患者痛经、减少月经量、缩小异位病灶、降低糖类抗原125(CA125)水平^[3],还可通过平衡Th1/Th2,降低基质金属蛋白酶2(MMP2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平等改善局部微环境,明显缩小EMT大鼠的异位病灶体积^[4-7]。

上皮间质转化是促进EMT发生发展的重要机制之一^[8]。锌指E盒同源结合蛋白1(ZEB1)是激活上皮间质转化的核心转录因子^[9],其在EMT异位病灶组织中高表达^[10],可作为表征EMT侵袭性的潜在指标^[11]。越来越多的研究发现激活自噬可以抑制上皮间质转化^[12-13]。Bcl-2同源结构域蛋白抗体(Beclin1)是自噬的标志分子,“Beclin1/ZEB1”通路是介导自噬调控上皮间质转化的关键通路^[14-15]。

然而,尚未见到有关“Beclin1/ZEB1”通路参与EMT发生发展的研究。本研究将探究EMT异位病灶中Beclin1、ZEB1表达与分布情况以及琥珀散是否能影响EMT异位病灶中Beclin1、ZEB1表达以缩小异位病灶。

在位内膜的分子生物学特点在EMT异位病灶形成的“3A”模式中起重要作用,即“在位内膜决定论”^[16]。子宫内膜干细胞无限增殖、自我更新和分化能力是EMT异位病灶形成的关键^[17]。其病理机制可简单概括为:子宫内膜干细胞黏附至邻近位置,侵袭邻近组织,并在病灶中形成血管,使异位的内膜组织形成、存活并增生^[18]。然而,传统的造模方式(将供体鼠的子宫内膜移植到受体鼠腹腔形成异位病灶)采用的正常鼠子宫内膜不具备EMT的特性,也无法排除动物与人的生物学差异^[19-21]。因而,亟需一种能客观模拟人EMT子宫内膜干细胞种植、侵袭与血管生成进而形成异位病灶的动物模型。近年来,借助免疫缺陷的BALB/cAnN裸鼠,将EMT患者的子宫内膜组织^[22]/细胞^[23]植入裸鼠体内是EMT动物模型制备的新方法。但其采用的组织/细胞多源自EMT患者术中切取的异位病灶,无法反映EMT在位内膜的固有属性。从月经血中提取的脱落子宫内膜间充质干细胞(MenSCs)既能较好反映

EMT在位内膜的生物学特性,又具备干细胞属性。本研究借鉴上述方式,首次采用EMT患者的MenSCs制备EMT裸鼠模型,以模拟人子宫内膜干细胞异位种植、侵袭、血管形成进而生成异位病灶组织的过程;并研究琥珀散对EMT裸鼠模型的作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

雌性免疫缺陷(SCID)7周龄小鼠(BALB/cAnN)40只,体质量(19.91 ± 1.06)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0006。饲养于北京中医药大学研究院动物实验室,实验操作经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委会审核批准(UCM-4-2021-42003-2131)。

1.2 药物及主要试剂

琥珀散配方颗粒(北京康仁堂药业有限公司制备):醋三棱(货号22022661,含4-香豆酸 $0.15 \sim 0.60 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、醋莪术(货号22020251,含莪术烯醇 $1.5 \sim 7.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、赤芍(货号22005791,含芍药苷 $29.0 \sim 80.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、当归(货号22040171,含阿魏酸 $0.50 \sim 1.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、牡丹皮(货号22037191,含芍药苷和丹皮酚的总量 $10.0 \sim 60.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、熟地黄(货号22031051,含地黄苷D $0.70 \sim 2.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、肉桂(货号22034121,含桂皮醛 $16.0 \sim 40.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、乌药(货号22022991,含去甲异波尔定 $15.0 \sim 37.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、醋延胡索(货号21036611,含延胡索乙素 $0.8 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、北刘寄奴(货号22013321,含木犀草素 $0.9 \sim 3.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)、毛蕊花糖苷 $4.0 \sim 25.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。地诺孕素片(Bayer Weimar GmbH und Co. KG,货号H20180090,每片2mg)。

淋巴细胞分离液(货号LTS1077)购自Thermo Fisher Scientific公司;磷酸盐平衡生理盐水(PBS,货号AQ10010)、DMEM/F12培养基(货号AQ11330)、胎牛血清FBS(货号AQmv09900)和青/链霉素(货号AQ512)均购自北京翱擎生物科技有限公司;成脂诱导培养基(货号iCell-MSCYD-004)和成骨诱导培养基(货号iCell-MSCYD-002)均购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;茜素红(货号C0140)和油红O染液(货号C0158S)均购自Beyotime Biotechnology公司;CELLSAVING无血清细胞冻存液(货号C40100)购自苏州新赛美生物科技有限公司;一级抗体:Beclin1一抗(货号11306-1-AP)和ZEB1一抗(货号21544-1-AP)购自武汉三鹰生物技

术有限公司,GAPDH一抗(货号YM3029)购自ImmunoWay Biotechnology公司;二级抗体:山羊抗兔IgG(H+L)HRP和山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP购自天德悦(北京)生物科技有限责任公司;TRIzol reagent试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司;cDNA逆转录系统购自Promega公司;SYBR Green Master Mix购自Life Technologies公司。

1.3 主要仪器

倒置相差显微镜购自Olympus公司;Fresco低温冷冻离心机MultiSkan3酶标仪均购自Thermo Fisher Scientific公司;Mini P-4电泳槽和湿转电泳槽均购自北京凯元信瑞仪器有限公司;电泳仪购自Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 MenSCs的提取、培养、传代、冻存、复苏与鉴定

2.1.1 MenSCs的提取 从EMT患者与健康女性志愿者的月经血中分别提取EMT MenSCs与正常MenSCs。月经血取自2020年12月—2022年4月就诊于北京中医药大学第三附属医院妇科的寒凝血瘀型EMT患者与健康女性志愿者。健康女性志愿者为暂无妊娠计划的育龄期健康女性,寒凝血瘀型EMT患者须符合如下纳排标准,纳入标准:①符合西医诊断标准^[24],明确诊断为EMT的患者;②符合中医证型诊断标准,属于中医“寒凝血瘀证”范畴^[25-26];③18~48岁的非哺乳期及妊娠妇女,且治疗期间无妊娠计划者;④1月内未接受任何治疗子宫内膜异位症的药物,6个月内未使用激素类制剂;⑤知情同意,所有纳入研究者均签署知情同意书,通过伦理委员会讨论,志愿接受治疗、观察和各项检查者(伦理审核编号BZYSY-2021KYKTPJ-12)。排除标准:①合并生殖道畸形等妇科疾病、免疫系统、肝肾功能异常等疾病者;②精神病患者,不能配合治疗者。

使用月经杯采集经期第2天的月经血(约5mL),取血后将月经杯中的经血移至50mL无菌离心管中,冰袋运输、4℃保存,并在2h内完成MenSCs分离。经血以无菌PBS等体积稀释,混匀;缓慢加入淋巴细胞分离液上层, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min,吸取中间白膜层,再加入培养基反复漂洗离心细胞2次,最后加入含10%胎牛血清、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 青/链霉素的DMEM/F12培养基制成细胞悬液,以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于培养瓶中,放入37℃、5% CO₂培养箱中培养,72h后换液,弃去未贴壁的细胞,之后每3天全

量换液1次。

2.1.2 MenSCs的传代 原代细胞汇合度达到80%~90%时,弃原培养基,用PBS冲洗3次,加入0.25%胰蛋白酶2 mL,放入37℃温箱消化1 min,显微镜下观察细胞,弃消化液,加入含10%胎牛血清的培养基终止消化,Pasteur吸管反复吹打直至细胞从瓶底脱落,形成细胞悬液,以 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清,加入含10%胎牛血清、 $100\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 青/链霉素的DMEM/F12培养基,轻轻吹打、重悬细胞,按合适比例传代,依次标记为第1代、第2代等。取2~4代细胞观察。

2.1.3 MenSCs的冻存与复苏 取生长状态良好且汇合度达80%的细胞,胰蛋白酶消化制成细胞悬液,离心弃上清,加入1.2 mL无血清细胞冻存液,吹打混匀移入冻存管中,置于-80℃冰箱/液氮罐中保存。取出冻存管后,立即放入37℃水浴锅中,轻轻摇动使其在1 min内融化,将细胞移入含大体积培养基的离心管中混匀, $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃去上清液,加入适量培养基重悬细胞,移入培养瓶中培养。

2.1.4 MenSCs的鉴定 采用成脂、成骨诱导分化鉴定MenSCs的间充质干细胞属性。取第2~4代对数生长期细胞,将细胞以 $3\times 10^4\cdot\text{cm}^{-2}$ 的密度铺于预先用0.1%明胶铺被的6孔板中,放于37℃、5% CO_2 孵箱内培养,每3天换液1次,直至细胞汇合度达到100%,再继续培养细胞3 d。将正常MenSCs和EMT MenSCs分别进行成脂、成骨诱导实验($n=3$),成脂诱导组弃原培养基,用成脂诱导培养基孵育,成骨诱导组弃原培养基,用成骨诱导培养基孵育,2个实验分别设置未诱导组,继续用原培养基孵育,每3天换液1次,总诱导过程持续约22 d。成脂诱导分化结束后用油红O对细胞进行染色,成骨诱导分化结束后进行茜素红染色,4组细胞均置于倒置相差显微镜下观察并采集照片。

2.2 人MenSCs植入式EMT裸鼠模型制备与验证

制备MenSCs植入式EMT动物模型^[27]。将50 μL EMT MenSCs细胞悬液($1\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$)注射至BALB/cAnN雌性免疫缺陷小鼠的腹部皮下,可见绿豆大小的皮丘鼓起。对照组注射等量的正常MenSCs细胞悬液。于注射后1周每组随机抽取1只裸鼠,开腹观察植入病灶及血管生成情况,分离病灶组织,进行造模评价。评价方式包括:通过HE染色病理切片观察异位病灶组织、细胞、血管形态;免疫荧光法检测病灶人类白细胞抗原A(HLAA)以

明确组织来源为人MenSCs,而非裸鼠。以病灶组织中有人子宫内膜组织的腺体和间质存在为造模成功标准。

2.3 分组及给药

琥珀散配方颗粒含醋三棱10 g、醋莪术10 g、赤芍10 g、当归12 g、牡丹皮9 g、熟地黄9 g、肉桂10 g、乌药15 g、醋延胡索10 g、北刘寄奴15 g,使用去离子水配制琥珀散配方颗粒混悬液。

根据随机数字表将实验动物分为4组:对照组、模型组、地诺孕素($0.001\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,临床等效剂量)组及琥珀散($29\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,临床等效剂量)组,每组10只,适应性饲养1周后,行MenSCs腹部sc造模,7 d后开始给药,连续ig 21 d。ig体积为 $10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,对照组和模型组ig给予0.9% NaCl溶液。

2.4 标本采集与处理

末次给药后第2日,禁食4~6 h,脱颈法处死,立即冰上开腹,观察、测量异位病灶的大小及周围血管分布,并采集照片,切取异位病灶组织。组织标本分3部分,一部分置于5~10倍体积的4%甲醛固定液中,供后续免疫组化及免疫荧光检测,其余2部分立刻置于液氮中速冻,干冰运输,-80℃冰箱/液氮罐中储存,供后续Western blotting及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测。

2.5 指标检测

2.5.1 观察并测量各组异位病灶组织的生长情况 脱颈法处死后剖开各组小鼠的腹部皮下,观察异位病灶的生长情况,包括异位病灶体积、数目、周围血管分布等,并采集照片。使用游标卡尺测量异位病灶的体积(长 $\times$ 宽 $\times$ 高, mm^3)。

2.5.2 小鼠EMT异位病灶中Beclin1、ZEB1蛋白的定位与表达检测 免疫组化检测各组Beclin1蛋白定位与表达:制作石蜡包埋组织切片,烤片、脱蜡、复水,胎牛血清封闭非特异性抗原,以1:100滴加Beclin1的一抗工作液,4℃湿盒过夜,复温30 min,除去一抗工作液,PBS冲洗,滴加二抗37℃孵育30 min,PBS冲洗后滴加DAB显色液,苏木精复染细胞核,中性树胶封片。每组切片于光镜下拍摄3个视野($200\times$ 、 $400\times$),运用Image J分析获得Beclin1吸光度值,采用Origin 2021绘制图表。

免疫荧光测定各组ZEB1蛋白定位与表达:制作石蜡切片,烤片、脱蜡、复水、抗原修复、封闭,滴加按1:100稀释的ZEB1一抗工作液,放入4℃湿盒中过夜,次日复温30 min,除去一抗工作液,PBS冲洗3次,按1:200比例配制滴加有荧光标记的Goat

anti-Rabbit 二抗工作液(注意避光), 37 °C 孵育 2 h, PBS 冲洗后用 DAPI 对细胞核染色, 用抗荧光淬灭封片剂封片。使用荧光显微镜对每组切片至少 3 个视野采集图像(200×、400×), 通过 Image J 分析获得 ZEB1 阳性表达的平均荧光强度。运用 Origin 2021 绘制图表。

2.5.3 Western blotting 法检测小鼠 EMT 异位病灶中 Beclin1、ZEB1 蛋白水平 在液氮罐/−80 °C 冰箱中取出各组冰冻的异位病灶标本, 冰上剪碎, 利用 RIPA 组织裂解液裂解, 按照 Western blotting 试剂盒说明提取总蛋白。而后加入抽提试剂去除非蛋白成分, 离心、干燥, 得到总蛋白, BCA 方法检测蛋白浓度。取等量蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳, 蛋白质转移到硝酸纤维素膜, 30 mA 恒流, 4 °C 转移, 过夜; 在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h 后, 加入 Beclin1、ZEB1、GAPDH 一抗, 4 °C 过夜。加入二抗, 室温孵育 1 h。最后用 ECL 化学发光法检测, X 胶片曝光显影。使用 Image J 分析各组相应蛋白的灰度值, 并计算相对表达量。运用 Origin 2021 绘制柱状图。

2.5.4 qRT-PCR 测定小鼠 EMT 异位病灶中 Beclin1、ZEB1 mRNA 表达 将各组异位病灶组织标本置于盛有液氮的研钵中研磨, 使用 TRIzol reagent 试剂盒提取总 RNA。运用 cDNA 逆转录系统和 SYBR Green Master Mix 进行 Beclin1、ZEB1 的 qRT-PCR。反应结束后绘制扩增曲线和熔解曲线,

GADPH 作为内参基因对 mRNA 标准化, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 mRNA 表达水平, 通过 Origin 2021 绘制柱状图。引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Details of primers sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
Beclin1	上游: CAGATGCGTTATGCCAGAGA	64
	下游: AGGTTGCATTAAAGACGTTGGT	
ZEB1	上游: ACACGACCACAGATACGGC	244
	下游: TGGGAGACACCAAACCAAC	
GAPDH	上游: CACCCACTCCTCCACCTTTGA	188
	下游: TCTCTCTTCCTCTTGCTCTTGC	

2.6 统计分析

通过 IBM SPSS Statistics 21 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 MenSCs 鉴定

如图 1-A 所示, EMT MenSCs 与正常 MenSCs 均为长梭形, 呈漩涡状或辐射状向周边集落扩散, 符合间充质干细胞的体外生长形态。EMT MenSCs 生长增殖更快, 于 240 h 时即可铺满皿底, 正常 MenSCs 在 288 h 时细胞融合度可达 95%。成脂诱导油红 O 染色后, EMT 与正常 MenSCs 均可见红色

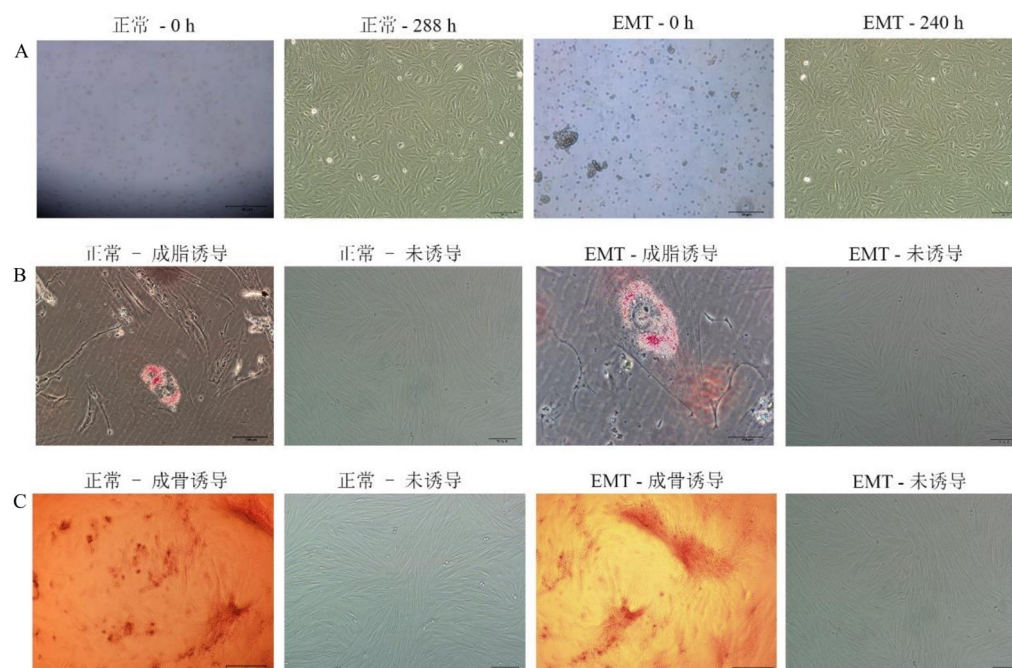


图 1 正常 MenSCs 与 EMT MenSCs 的细胞形态(A)以及成脂(B)、成骨(C)细胞染色

Fig. 1 Cell morphology (A) and staining of lipogenic (B) and osteoblastic (C) cells of normal MenSCs and EMT MenSCs

脂滴(图1-B);成骨诱导茜素红染色后,二者MenSCs有钙结节(图1-C)。未诱导组无脂滴和钙结节形成(图1-B、C)。

3.2 EMT裸鼠模型评价

注射正常MenSCs的对照组腹部皮下光滑平整,无异位病灶与血管形成。模型组、地诺孕素组与琥珀散组均可见异位病灶形成,透明质硬,表面有结缔组织覆盖,且周围血管形成丰富,至少有3条大血管与病灶相连,其大小均值为 $(4.40 \times 3.03 \times 3.10) \text{ mm}^3$ 。结果见图2。

3组的异位病灶组织切片HE染色(图3)均可见子宫内膜腺体和间质,腺体由高立方状腺上皮细胞扩张形成,周围由梭形间质细胞紧密围绕。HLAA免疫荧光结果显示(图4),3组异位病灶组织中均有HLAA(红色)阳性表达,说明裸鼠中形成的异位病灶为人源,而非来自于裸鼠。

3.3 琥珀散对EMT裸鼠异位病灶的影响

基于上述结果,对照组未形成EMT异位病灶,因而,本部分取材异位病灶的指标检测结果均只有

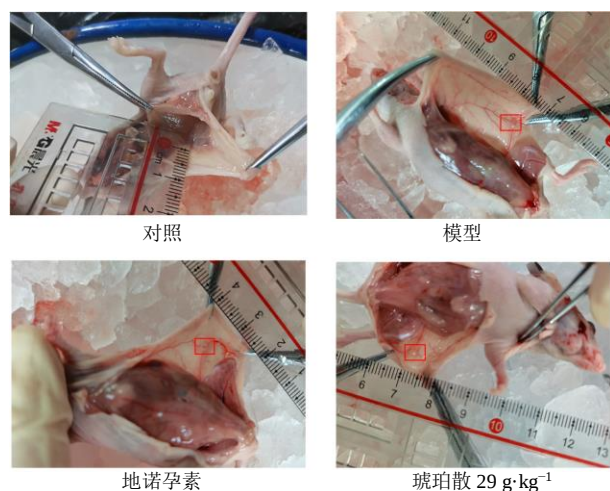


图2 造模7 d后各组形成的异位病灶组织及血管形成分布
Fig. 2 Ectopic lesions and vascular distributions in each group seven d after model construction

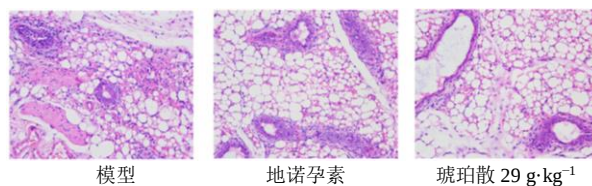


图3 造模7 d后3组形成的异位病灶组织HE染色($\times 200$)
Fig. 3 HE staining of ectopic lesions in three groups 7 d after model construction ($\times 200$)

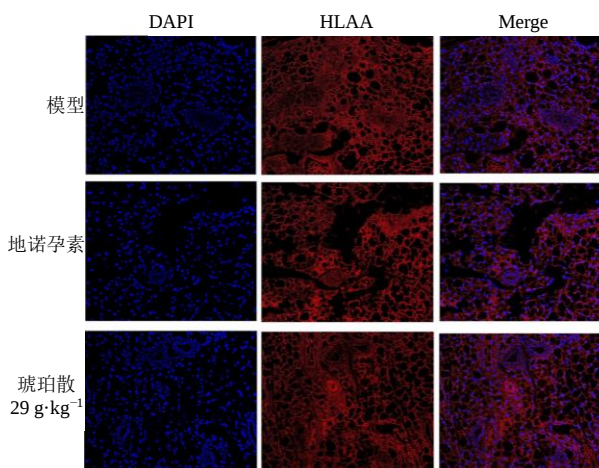


图4 造模7 d后3组形成的异位病灶组织HLAA免疫荧光结果($\times 200$)
Fig. 4 HLAA immunofluorescence of ectopic lesions in three groups 7 d after model construction ($\times 200$)

模型组、地诺孕素组与琥珀散组。如表2所示,ig干预21 d后,模型组异位病灶体积的均值为 45.40 mm^3 ,较模型成功时(40.50 mm^3)增大了 4.9 mm^3 。与模型组比较,琥珀散与地诺孕素均显著缩小了异位病灶体积($P < 0.001$)。与地诺孕素组比较,琥珀散组异位病灶体积更小($P < 0.05$)。此外,地诺孕素组与琥珀散组异位病灶的周围血管分布也明显减少(图5)。

3.4 琥珀散对EMT裸鼠异位病灶中Beclin1、ZEB1蛋白水平的影响

如图6所示,与模型组比较,地诺孕素组和琥珀散组异位病灶中ZEB1蛋白显著降低($P < 0.05$),地诺孕素组和琥珀散组异位病灶中Beclin1蛋白明显升高($P < 0.01, 0.001$)。

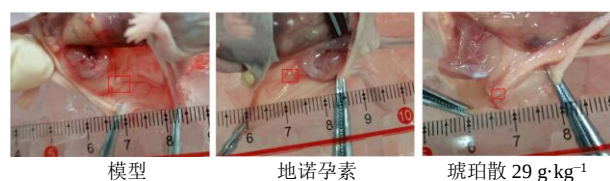
表2 干预后3组异位病灶的体积比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of volumes of ectopic lesions in three groups after intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	长/mm	宽/mm	高/mm	异位病灶体积/ mm^3
模型($n=8$)	—	4.64 ± 0.56	3.06 ± 0.63	3.25 ± 0.39	45.40 ± 8.59
地诺孕素($n=8$)	0.001	4.38 ± 0.74	1.96 ± 0.57	1.56 ± 0.25	$13.74 \pm 6.31^{***}$
琥珀散($n=9$)	29	2.74 ± 0.67	2.06 ± 0.37	1.32 ± 0.20	$7.69 \pm 3.02^{***\#}$

与模型组比较:*** $P < 0.001$;与地诺孕素组比较: # $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.001$ vs dinorgestrel group



模型 地诺孕素 琥珀散 29 g·kg⁻¹
红色矩形框中为 EMT 异位病灶
Red rectangular box shows EMT ectopic lesion

图5 药物干预后3组异位病灶组织及血管分布
Fig. 5 Ectopic lesions and vascular distributions in three groups after intervention

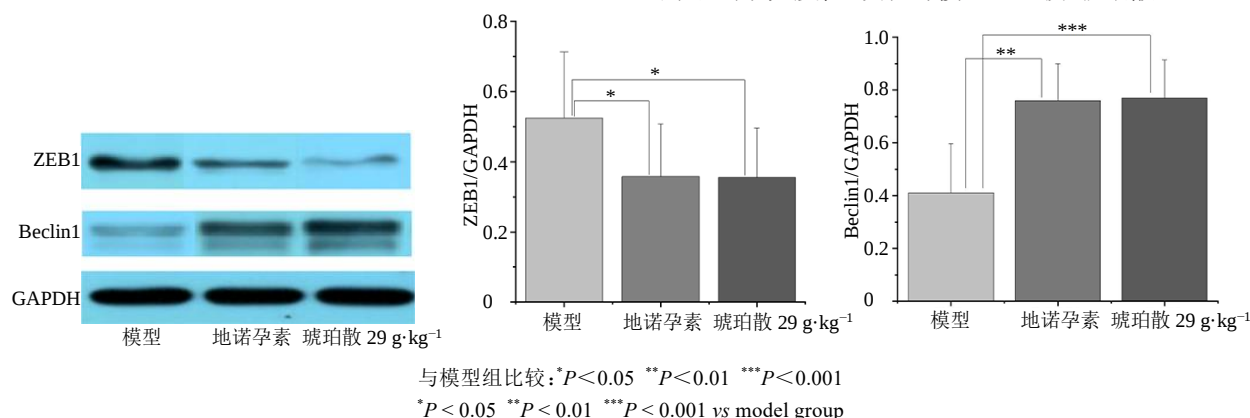
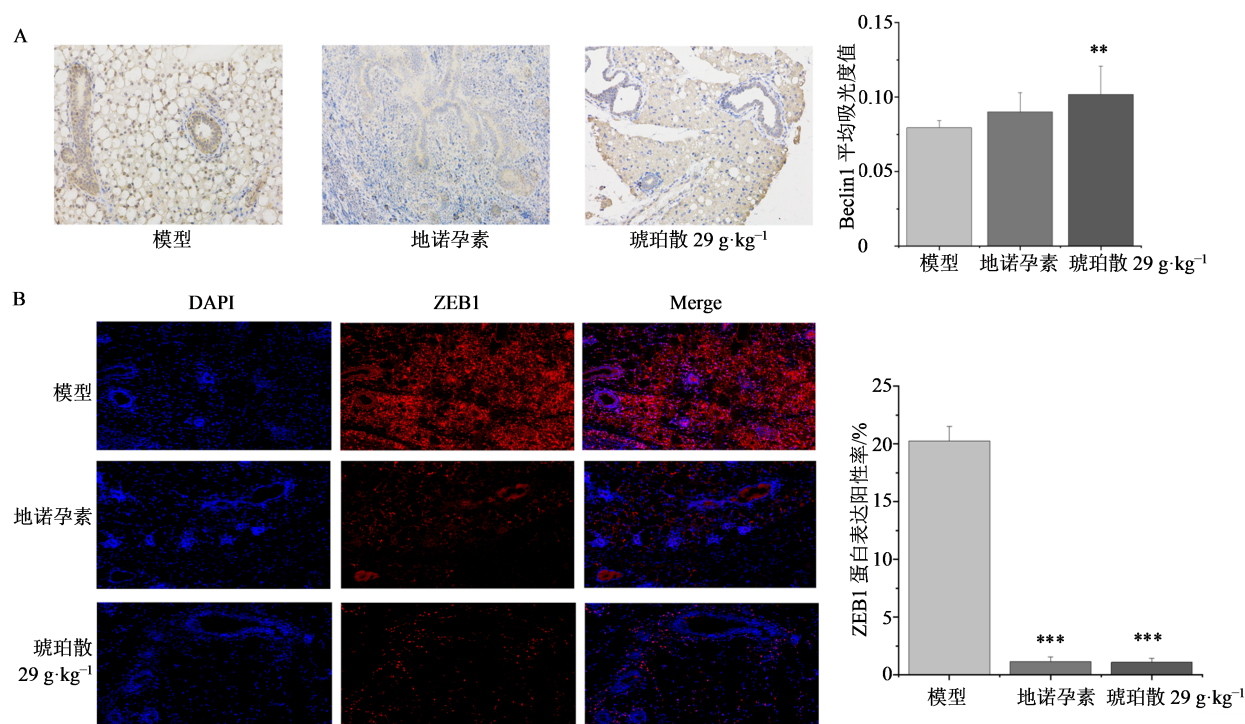


图6 琥珀散对 EMT 小鼠异位病灶组织 ZEB1、Beclin1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 6 Effects of Hupo Powder on protein level of ZEB1 and Beclin1 in ectopic lesions of EMT nude mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)



A-干预后3组 EMT 小鼠异位病灶组织中 Beclin1 蛋白的免疫组化结果 ($\times 200$); B-干预后3组 EMT 小鼠异位病灶组织中 ZEB1 蛋白的免疫荧光结果 ($\times 200$); 与模型组比较: **P < 0.01 ***P < 0.001

A-Immunohistochemical results of Beclin1 protein in ectopic lesion tissue of EMT mice in three groups after intervention ($\times 200$); B-Immunofluorescence results of ZEB1 protein in ectopic lesion tissue of EMT mice in three groups after intervention ($\times 200$); **P < 0.01 ***P < 0.001 vs model group

图7 琥珀散对 EMT 小鼠异位病灶组织 ZEB1、Beclin1 蛋白表达及定位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 7 Effects of Hupo Powder on protein expression and positions of ZEB1 and Beclin1 in ectopic lesions of EMT nude mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

鼠异位病灶组织中Beclin1表达显著增加($P<0.01$)。

如图7-B所示,ZEB1呈红色荧光,细胞核显蓝色荧光。模型组EMT异位病灶组织中ZEB1高表达,大量分布在异位内膜、腺体细胞及周围间质细胞的胞核与胞浆中;与模型组比较,地诺孕素干预后,ZEB1蛋白在腺上皮细胞与间质细胞的胞核及胞浆中表达明显减少,在腺腔中可见阳性表达;琥珀散干预后,ZEB1蛋白在异位内膜、腺腔、腺上皮细胞及周围间质细胞的胞核与胞浆中的分布均明显减少。通过Image J分析获得ZEB1阳性表达的平均荧光强度,与模型组比较,地诺孕素组、琥珀散组ZEB1蛋白表达阳性率显著降低($P<0.001$)。

3.6 琥珀散对EMT裸鼠异位病灶中Beclin1、ZEB1 mRNA水平的影响

如图8所示,与模型组比较,地诺孕素和琥珀散组EMT裸鼠异位病灶组织中ZEB1 mRNA水平均显著下调($P<0.001$),Beclin1 mRNA水平明显上调($P<0.001$)。

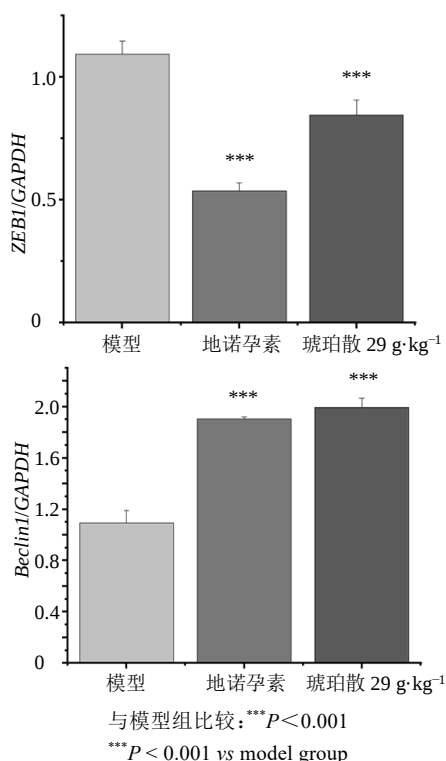


图8 琥珀散对EMT小鼠异位病灶组织ZEB1、Beclin1 mRNA的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 8 Effects of Hupo Powder on mRNA level of ZEB1 and Beclin1 in ectopic lesions of EMT nude mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

4 讨论

EMT是指有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆黏膜以外的身体其他部位而引起的病症,其发病率高,呈年轻化趋势^[28]。现行治疗主要

包括手术和药物治疗:外科手术通常只能缩小病灶,抗子宫内膜异位症药物副作用明显,术后及停药后极易复发,严重影响女性的身心健康^[29-32]。中医药在整体观与辨证论治原则指导下,对EMT的认识与治疗具有一定优势。EMT属于中医“癥瘕”“痛经”“不孕”等病症的范畴,“瘀阻胞宫冲任”是主要病机,瘀血是主要病因,寒凝血瘀证多见^[33-36]。琥珀散是《医宗金鉴》中治疗“寒凝血瘀成癥”的重要方剂,本课题组前期临床研究已证实^[3],琥珀散可明显缓解痛经症状,降低糖类抗原125(CA125)水平,缩小异位囊肿体积。本研究尝试从动物实验角度进一步验证琥珀散治疗EMT的疗效,探索其作用机制。

从肿瘤研究领域挖掘EMT的发病机制与药物研发越来越成为EMT研究的潜在突破口。已有研究报道“Beclin1/ZEB1”通路在癌细胞侵袭与转移中的作用^[15],Beclin1下调能够通过激活富含A+U的RNA结合因子1(AUF1),促进其与ZEB1 mRNA的3'-UTR结合,进而上调并稳定ZEB1的表达,导致甲状腺癌细胞发生上皮间质转化,促进癌细胞的侵袭与转移。在EMT研究中未见相关报道,但多项研究指出Beclin1低表达、ZEB1高表达是EMT发病进展的潜在标志指标^[10-11,37-38]。在EMT中,是否存在Beclin1/ZEB1通路导致上皮间质转化,进而促进EMT的发病进展,而中药琥珀散是否能通过该路径调控上皮间质转化,以起到干预EMT的作用均未见相关文献报道。

本研究采用EMT MenSCs植入造模,以模拟人子宫内膜干细胞异位种植、侵袭、血管形成进而生成异位病灶组织的过程,而且从月经血中提取的MenSCs可较好反映在位内膜的生物学特性。该造模方式成模时间短(约1周),对实验动物创伤小,且最后开腹取材时均可见异位病灶组织形成。

本研究首先从细胞形态、成脂及成骨诱导分化,借助油红O和茜素红染色,鉴定从EMT患者及健康女性月经血中分离提取的细胞是MenSCs,具有间充质干细胞的特性。而后将高密度的MenSCs细胞悬液注射至裸鼠腹部皮下制备EMT模型,对照组注射健康女性的MenSCs,模型组、地诺孕素组和琥珀散组则注射EMT患者的MenSCs。结果显示,至注射后第7天,对照组并未观测到异位病灶,而其他3组均有囊泡样病灶组织形成,且经HE染色同时可见子宫内膜的腺体和间质,并借助HLAA免疫荧光明确组织来源为人,而非裸鼠。至此可说明EMT

裸鼠模型造模成功。而对照组在第7天及连续给药21 d后取材均未观测到异位病灶形成,其腹部皮下光滑平整,且无血管生成。这可能与EMT及正常MenSCs的增殖、侵袭及迁移能力相关,有待深入研究。因而,本实验其后对异位病灶的观测及Beclin1、ZEB1指标检测均无对照组结果。

本实验从异位病灶层面明确了琥珀散对EMT裸鼠模型的治疗作用。用药干预后,可以发现,与模型组比较,地诺孕素组与琥珀散组的异位病灶体积均明显缩小。与地诺孕素组比较,琥珀散组的异位病灶体积最小,为 7.69 mm^3 ,较给药前(40.50 mm^3)缩小了 32.81 mm^3 。而未作干预的模型组异位病灶体积则增长了 4.9 mm^3 ($40.50\text{ mm}^3 \rightarrow 45.40\text{ mm}^3$)。此外,模型组异位病灶周围血运丰富,与造模评价时所示相似,至少有3根较大血管形成。但是,用药后周围血管分布明显改善,甚至肉眼观测不到病灶周围的血管。该结果提示,琥珀散可明显缩小EMT裸鼠异位病灶体积,改善病灶周围的血管形成与分布,从组织层面反映了琥珀散治疗EMT的效果。

本实验进而由Beclin1/ZEB1通路切入,探究“活血消癥”方琥珀散治疗EMT的微观作用机制。观测指标为Beclin1与ZEB1,检测样本为3组裸鼠EMT异位病灶组织,检测方式包括Western blotting、免疫组化、免疫荧光与qRT-PCR。Western blotting从蛋白质水平定量分析琥珀散对Beclin1、ZEB1的影响;免疫组化与免疫荧光进一步阐明琥珀散对Beclin1、ZEB1蛋白在异位病灶组织中定位分布的影响,分别通过Beclin1平均吸光度值及ZEB1蛋白表达阳性率进行蛋白半定量分析,与Western blotting结果互相参考;qRT-PCR法测定琥珀散对各组EMT异位病灶组织中Beclin1、ZEB1 mRNA水平的影响。研究表明,4种方式的检测结果趋势一致,与模型组比较,用药后Beclin1的蛋白及mRNA水平均显著上调,ZEB1则均显著下调。在mRNA水平,下调ZEB1的效应情况是:地诺孕素>琥珀散;上调Beclin1的效应情况是:琥珀散>地诺孕素。

Beclin1与ZEB1蛋白在异位病灶组织中的定位也有相应的变化。在EMT模型组中,Beclin1蛋白主要存在于异位内膜、腺腔、腺上皮细胞胞浆中,地诺孕素、琥珀散干预后,其分布范围扩大到异位内膜、腺腔、腺上皮细胞及周围间质细胞的胞核与胞浆中,且染色更深;在模型组中,ZEB1蛋白广泛、大量分布在异位内膜、腺体细胞及周围间质细胞的胞核与胞浆中,地诺孕素干预后,其在腺上皮细胞与

间质细胞的胞核与胞浆中明显减少,但在腺腔中可见阳性表达,而琥珀散干预后,其在异位内膜、腺腔、腺上皮细胞及间质细胞的胞核与胞浆中均明显减少。

本研究发现,在组织层面,琥珀散能够缩小EMT裸鼠异位病灶体积,改善周围血管分布;在微观机制层面,琥珀散能够明显上调EMT裸鼠异位病灶组织中Beclin1的表达,并扩大其分布范围,同时下调ZEB1的表达,并明显缩小组织定位范围。而Beclin1上调、ZEB1下调是否会进一步影响EMT自噬与上皮间质转化,有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国医师协会妇产科医师分会, 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症诊治指南(第三版)[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(12): 812-824.
Chinese Medical Doctor Association Branch of Obstetricians and Gynecologists, Chinese Medical Association Branch of Obstetrics and Gynecology endometriosis collaboration group. Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis (third edition)[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2021, 56(12): 812-824.
- [2] Hirsch M, Dhillon-Smith R, Cutner A S, et al. The prevalence of endometriosis in adolescents with pelvic pain: A systematic review [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2020, 33(6): 623-630.
- [3] 马小娜, 任国辉, 张洪丽, 等. 加味琥珀散治疗肾虚血瘀型子宫内膜异位症患者疗效观察[J]. 河北医药, 2018, 40(23): 3616-3618.
Ma X N, Ren G H, Zhang H L, et al. The therapeutic effects of modified Huposan on endometriosis due to kidney deficiency and blood stasis [J]. Hebei Med J, 2018, 40(23): 3616-3618.
- [4] Ma X N, Wu Y H, Li B B, et al. Effect of amber powder on endometrial ultrastructure and MAPK pathway in endometriosis model rats [J]. Trop J Pharm Res, 2021, 18(9): 1845-1851.
- [5] 马小娜, 刘丹彤, 闫军堂, 等. 琥珀散对气滞血瘀型子宫内膜异位症大鼠Th1/Th2免疫失衡的影响研究[J]. 中医药学报, 2012, 40(4): 15-17.
Ma X N, Liu D T, Yan J T, et al. Effect of HuPoSan in the treatment of Th1/Th2 immune disorder of endometriosis rats with qi stagnancy and blood stasis [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2012, 40(4): 15-17.
- [6] 马小娜, 刘丹彤, 闫军堂, 等. 琥珀散对气滞血瘀子宫内

- 膜异位症大鼠 IL-2、IL-10 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 628-629.
- Ma X N, Liu D T, Yan J T, et al. Study of the effect of Hupo Powder on IL-2 and IL-10 of rats with qi stagnation and blood stasis syndrome of endometriosis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2013, 31(3): 628-629.
- [7] 马小娜, 刘丹彤, 闫军堂, 等. 琥珀散对子宫内异位症大鼠 MMP-2、TIMP-2 的影响 [J]. 中医药学报, 2013, 41(2): 46-49.
- Ma X N, Liu D T, Yan J T, et al. The influence of HuPoSan on MMP-2 and TIMP-2 endometriosis rats [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2013, 41(2): 46-49.
- [8] Yang Y M, Yang W X. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis [J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 41679-41689.
- [9] Krebs A M, Mitschke J, Lasierra Losada M, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer [J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(5): 518-529.
- [10] Wu R F, Chen Z X, Zhou W D, et al. High expression of ZEB1 in endometriosis and its role in 17 β -estradiol-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(10): 4744-4758.
- [11] Furuya M, Masuda H, Hara K, et al. ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2017, 96(9): 1128-1135.
- [12] Chen H T, Liu H, Mao M J, et al. Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in cancer therapy [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 101.
- [13] Xu W, Yu M H, Qin J, et al. LACTB regulates PIK3R3 to promote autophagy and inhibit EMT and proliferation through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in colorectal cancer [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 5181-5200.
- [14] Li S, Zhang H Y, Du Z X, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by Beclin 1 knockdown via posttranscriptional upregulation of ZEB1 in thyroid cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(43): 70364-70377.
- [15] 李思. Beclin 1 表达下调在转录后水平上调 ZEB1 表达诱导甲状腺癌细胞上皮-间质转化 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- Li S. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by beclin 1 knockdown via posttranscriptional upregulation of ZEB1 in thyroid cancer cells [D]. Shenyang: China Medical University, 2018.
- [16] 郎景和. 对子宫内异位症认识的历史、现状与发展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(3): 193-196.
- Lang J H. Past history, current situation and progress in the knowledge of endometriosis [J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2020, 36(3): 193-196.
- [17] Kong Y, Shao Y, Ren C X, et al. Endometrial stem/progenitor cells and their roles in immunity, clinical application, and endometriosis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 474.
- [18] 魏玉珍, 张艺宏, 杨信志, 等. 小鼠子宫内修复模型中 β -catenin、CD146 的表达 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41(2): 143-146, 124.
- Wei Y Z, Zhang Y H, Yang X Z, et al. Expression of β -catenin and CD146 in mouse endometrial regeneration model [J]. Chin J Anat, 2018, 41(2): 143-146, 124.
- [19] Nenicu A, Yordanova K, Gu Y, et al. Differences in growth and vascularization of ectopic menstrual and non-menstrual endometrial tissue in mouse models of endometriosis [J]. Hum Reprod, 2021, 36(8): 2202-2214.
- [20] 李冰冰, 刘雁峰, 和翔宇, 等. BALB/c 小鼠子宫内异位症模型建立和异位病灶纤维化评价 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(29): 3197-3201.
- Li B B, Liu Y F, He X Y, et al. Establishment of BALB/c mouse endometriosis model and evaluation of endometriotic lesions fibrosis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 28(29): 3197-3201.
- [21] 马小娜, 谢苗, 李冰冰, 等. 滋水清肝理冲饮对子宫内异位症小鼠应用 GnRH α 后所致神经递质紊乱的干预作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(9): 742-752.
- Ma X N, Xie M, Li B B, et al. Effects of Zishui Qinggan Lichong Granule on neurotransmitter disorder in EMs mice induced by GnRH α [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2019, 42(9): 742-752.
- [22] Perelló M, González-Foruria I, Castillo P, et al. Oral administration of pentoxifylline reduces endometriosis-like lesions in a nude mouse model [J]. Reprod Sci, 2017, 24(6): 911-918.
- [23] Banu S K, Starzinski-Powitz A, Speights V O, et al. Induction of peritoneal endometriosis in nude mice with use of human immortalized endometriosis epithelial and stromal cells: A potential experimental tool to study molecular pathogenesis of endometriosis in humans [J]. Fertil Steril, 2009, 91(5 Suppl): 2199-2209.
- [24] 曹泽毅. 中华妇产科学-上册 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- Cao Z Y. Chinese Obstetrics and Gynecology - Volume 1 [M]. 3rd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014.
- [25] 张玉珍. 全国中医药行业高等教育经典老课本·普通高等教育"十二五"国家级规划教材·中医妇科学(第二版) [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
- Zhang Y Z. National Traditional Chinese Medicine

- Industry higher education Classic old textbook · General Higher Education "Twelfth Five-Year" National planning Textbook · Traditional Chinese Gynecology (New second edition)* [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2017.
- [26] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- Zheng X Y. *Guiding Principles of Clinical Research on New Chinese Medicine: Trial* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2002.
- [27] 苏晓华, 宋殿荣, 张英. 利用人异位的子宫内膜细胞建立可视化子宫内膜异位症模型 [J]. 国际妇产科学杂志, 2018, 45(4): 439-445.
- Su X H, Song D R, Zhang Y. Establishing a visible endometriosis model with human ectopic endometrial cells [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2018, 45(4): 439-445.
- [28] Zondervan K T, Becker C M, Koga K, et al. Endometriosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 9.
- [29] Chapron C, Marcellin L, Borghese B, et al. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(11): 666-682.
- [30] Vercellini P, Barbara G, Abbiati A, et al. Repetitive surgery for recurrent symptomatic endometriosis: What to do? [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, 146(1): 15-21.
- [31] Zakhari A, Delpero E, McKeown S, et al. Endometriosis recurrence following post-operative hormonal suppression: A systematic review and meta-analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(1): 96-107.
- [32] 孔东丽, 郭红燕. 子宫内膜异位症保守性手术后长期用药预防复发的研究进展 [J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(1): 19-22.
- Kong D L, Guo H Y. Research progress of long-term medication to prevent recurrence of endometriosis after conservative surgery [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2015, 31(1): 19-22.
- [33] 陈元欢, 毛海燕, 武权生, 等. 基于 MSK1/2 探讨少腹逐瘀汤治疗子宫内膜异位症痛经寒凝血瘀证的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4674-4681.
- Chen Y H, Mao H Y, Wu Q S, et al. Mechanism of Shaofu Zhuyu Decoction in treatment of endometriosis-associated dysmenorrhea with syndrome of cold coagulation and blood stasis based on MSK1/2 [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(17): 4674-4681.
- [34] 莫政, 陈艳丹. 温肾消癥汤治疗对寒凝血瘀型子宫内膜异位症卵巢功能、血清性激素水平的影响 [J]. 四川中医, 2019, 37(3): 167-169.
- Mo Z, Chen Y D. Effect of Shenxiao Zheng Decoction on ovarian function and serum sex hormone level of endometriosis with cold blood coagulation and blood stasis [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2019, 37(3): 167-169.
- [35] 倪喆鑫, 毕艳丽, 孙帅, 等. 寒凝血瘀状态对子宫内膜异位症小鼠肠道菌群结构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(10): 1214-1218.
- Ni Z X, Bi Y L, Sun S, et al. Effect of blood stasis caused by cold on the gut microbiota of endometriosis mice [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, 39(10): 1214-1218.
- [36] 孙可丰, 何美蓉, 欧诒菲, 等. 针灸治疗寒凝血瘀型子宫内膜异位症痛经临床观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 100-104.
- Sun K F, He M R, Ou Y F, et al. Effects of acupuncture and moxibustion on endometriosis dysmenorrhea [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2021, 23(10): 100-104.
- [37] Kong Z W, Yao T T. Role for autophagy-related markers beclin-1 and LC3 in endometriosis [J]. *BMC Women's Health*, 2022, 22(1): 264.
- [38] Sui X Y, Li Y D, Sun Y R, et al. Expression and significance of autophagy genes LC3, Beclin1 and MMP-2 in endometriosis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 1958-1962.

[责任编辑 兰新新]