

子宫内膜异位症患者与健康女性的经血源间充质干细胞自噬功能比较研究

张悦健¹, 林陶秀¹, 何甜甜¹, 杨思晨¹, 李长香², 睢丛璐³, 郭亚楠³, 马小娜^{3*}

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 中医学学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029

摘要: 目的 比较子宫内膜异位症 (EMT) 患者与健康女性的经血源间充质干细胞 (MenSCs) 的自噬功能。方法 分别从 EMT 患者及健康女性的月经血中提取 EMT MenSCs (E-MenSCs) 和正常 MenSCs (H-MenSCs), 并借助成脂、成骨诱导分化鉴定其干细胞属性。通过 CCK-8 法比较 E-MenSCs 和 H-MenSCs 在 12、24、48、72、96、120 h 时刻于波长 450 nm 的吸光度 (A) 值, 并绘制细胞增殖曲线, 比较 2 组细胞的细胞活力; 运用透射电镜观察 E-MenSCs 与 H-MenSCs 的细胞形态, 检测比较其中自噬体和自噬溶酶体的数量; 采用 Western blotting 法检测 E-MenSCs 和 H-MenSCs 中自噬标志物微管相关蛋白轻链 3-II (LC3-II) 和 Beclin1 的蛋白表达。结果 E-MenSCs 和 H-MenSCs 均为长梭形, 呈辐射状扩散, 且经成脂、成骨诱导分化后均有脂滴、钙结节形成。与 H-MenSCs 比较, E-MenSCs 在 72、96、120 h 的细胞活力均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 自噬体和自噬溶酶体数量显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且 LC3-II、Beclin1 蛋白表达量也显著降低 ($P < 0.05$)。结论 与 H-MenSCs 比较, E-MenSCs 的自噬功能减弱, 这可能是 EMT 发病进展的潜在机制。

关键词: 子宫内膜异位症; 经血源间充质干细胞; 自噬; 自噬体; 自噬溶酶体; Beclin1; LC3-II

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2023) 07-1417-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.004

Comparative study of autophagy in menstrual blood-derived mesenchymal stem cells from patients with endometriosis and healthy women

ZHANG Yuejian¹, LIN Taoxiu¹, HE Tiantian¹, YANG Sichen¹, LI Changxiang², SUI Conglu³, GUO Ya'nan³, MA Xiaona³

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

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

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

Abstract: **Objective** To compare the autophagy of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) in patients with endometriosis (EMT) and healthy women. **Methods** EMT MenSCs (E-MenSCs) and healthy MenSCs (H-MenSCs) were isolated from the menstrual blood of patients with endometriosis and healthy volunteers, respectively. Then their stem cell properties were identified using adipogenic and osteogenic differentiation. The absorbance (A) value at 450 nm of E-MenSCs and H-MenSCs at 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h time points were obtained using CCK-8 assay, the cell proliferation curves were plotted, and the cell viability of E-MenSCs and H-MenSCs were compared. The cell morphology of E-MenSCs and H-MenSCs was observed by transmission electron microscope, and the number of autophagosome and autophagic lysosome was detected and compared. The expression of autophagy marker proteins (LC3-II and Beclin1) in E-MenSCs and H-MenSCs were detected by Western blotting. **Results** E-MenSCs and H-MenSCs, long spindle-shaped, diffused radially. After adipogenic and osteogenic differentiation, the lipid droplets and calcium nodules in E-MenSCs and H-MenSCs were observed. In contrast to H-MenSCs, E-MenSCs showed increased cell viability at 72, 96, and 120 h ($P < 0.01$ and 0.001), decreased expressions of autophagosomes and autolysosomes ($P < 0.05$ and 0.01), and reduced LC3-II and Beclin1 proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** E-MenSCs autophagy is weakened compared with H-

收稿日期: 2023-02-28

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, 主任医师、教授, 主要从事中医药干预子宫内膜异位症的机制与临床研究。E-mail: C523@bucm.edu.cn

MenSCs, which might be the underlying mechanism of EMT pathogenesis and progression.

Key words: endometriosis; menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs); autophagy; autophagosome; autolysosome; Beclin1; LC3-II

子宫内膜异位症(EMT)是指具有生长功能的子宫内膜组织在子宫腔被覆黏膜以外的其他部位种植生长的一种常见妇科疾病,严重影响女性身心健康,尤以疼痛、不孕为甚^[1]。超80% EMT患者伴有各种疼痛(痛经、性交痛、慢性盆腔痛、排便痛等)^[2],近100% EMT患者自然妊娠率降低,伴明显的反复性或早期流产倾向,且50% EMT患者合并不孕^[3]。然而,EMT的发病机制仍不清晰。自噬是新近报道的影响EMT发病进展的可能机制^[4-5],异位内膜细胞的低自噬水平增强其抗凋亡能力,使得其能够在异地存活、增殖和血管生成,最终形成异位病灶^[6-7]。

随着研究的深入,越来越多的研究强调了在位内膜的固有属性在EMT发病进展中的重要作用^[8-10]。郎景和院士^[11]提出“在位内膜决定论”,即在位内膜的生物学特性是EMT发病的决定性因素,而其他的激素、免疫、微环境等仅仅是附加条件。然而,鲜有研究从在位内膜自噬入手探讨EMT的发病机制。经血源间充质干细胞(MenSCs)源自周期性脱落的子宫内膜(月经血),能够在一定程度上反映在位内膜的固有属性^[12]。因而,本研究将MenSCs作为体外模型,分别从健康女性志愿者与EMT患者的月经血中提取正常MenSCs(H-MenSCs)与EMT MenSCs(E-MenSCs),采用CCK-8法、透射电镜、Western blotting等技术,观察比较2组细胞的自噬功能,以期从在位内膜自噬的角度揭示EMT发病进展的可能机制。

1 材料

1.1 细胞

2~4代H-MenSCs、E-MenSCs分别从健康女性志愿者($n=5$)与EMT患者($n=5$)的月经血中分离提取。5名健康女性志愿者为暂无妊娠计划的育龄期健康女性,5名患者均为2020年11月—2022年6月就诊于北京中医药大学第三附属医院妇科且被明确诊断为EMT的女性。纳入研究者均符合以下标准:年龄26~36岁,身体质量指数(BMI)18~28 kg·m⁻²;月经周期规律;近6个月内未使用激素类药物治疗;近1个月内未使用抗EMT的治疗药物;在纳入研究前无EMT外科手术史;无恶性肿瘤或自身免疫性疾病。纳入研究者均签署知情同意

书,该研究方案通过北京中医药大学第三附属医院伦理委员会审查(BZYSY-2021KYKTPJ-12)。

1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液购自美国 Thermo Fisher Scientific;磷酸盐缓冲液(PBS)、DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)、青/链霉素和CCK-8试剂盒均购自北京翱擎生物科技有限公司;成脂诱导培养基(iCell-MSCYD-004)和成骨诱导培养基(iCell-MSCYD-002)均购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;茜素红和油红O染液均购自中国 Beyotime Biotechnology 公司;CELLSAVING 无血清细胞冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司;RIPA 裂解液和BCA蛋白定量试剂盒购自天德悦(北京)生物科技有限责任公司。一级抗体:微管相关蛋白轻链3II(LC3-II)一抗和Beclin1一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;GAPDH一抗购自美国 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。

1.3 主要仪器

CKX53 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司;Fresco 低温冷冻离心机和A5119500C酶标仪均购自美国 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;电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;FEI Tecnai Spirit透射电镜购自美国 FEI 公司。

2 方法

2.1 MenSCs的提取、传代、冻存与复苏

使用月经杯获取纳入研究者月经期第2天的经血(约5 mL),在2 h内运输至细胞间,细胞间与超净台均提前用紫外消毒1 h,在超净台中将经血转移至50 mL 无菌离心管中,以无菌PBS等体积稀释,重悬后以1:1缓慢贴壁加入淋巴细胞分离液,400×g离心10 min,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DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清、1%青/链霉素)制成细胞悬液,以 1×10^5 mL⁻¹接种于培养瓶中,放入细胞培养箱(37℃、5% CO₂)中培养,72 h后换液,弃去未贴壁的细胞,之后每3天全量换液1次。待原代细胞汇合至80%~90%时,按合适比例进行传代,依次标记为第2代、第3

代等。本实验选取2~4代MenSCs。取生长状态良好且汇合度>80%的细胞,采用无血清细胞冻存液冻存细胞,置于-80℃冰箱/液氮罐中保存。复苏时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,以400×g离心3 min,弃上清,加入适量培养基重悬细胞,移入培养瓶中培养。

2.2 成脂与成骨诱导分化^[13]鉴定 MenSCs

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,E-MenSCs与H-MenSCs均分为成脂诱导组、成骨诱导组与未诱导组,每组3个复孔。成脂诱导分化结束后用油红O染色,成骨诱导于2~3周钙结节形成后,进行茜素红染色。采用倒置相差显微镜下观察并采集照片,观察诱导后是否有红色脂滴与钙结节形成,以鉴定MenSCs的间充质干细胞属性。

2.3 CCK-8法比较 E-MenSCs 与 H-MenSCs 的细胞活力

分别将重悬后的E-MenSCs和H-MenSCs细胞悬液($3 \times 10^4 \cdot \text{cm}^{-2}$)同时接种于6块96孔板中,每孔100 μL,并设置3个复孔。种板后在37℃、4% CO₂条件下的细胞培养箱内培养,分别于12、24、48、72、96和120 h,每孔加入10 μL的CCK-8溶液(避光条件下),继续孵育2 h后放入酶标仪中,振荡1 min,并测量其在波长450 nm处的吸光度(A)值。计算平均A值后,采用OriginPro 2021绘制细胞增殖曲线。

2.4 透射电镜观测 E-MenSCs 与 H-MenSCs 中自噬体与自噬溶酶体的表达

将E-MenSCs组($n=3$)与H-MenSCs组($n=3$)分别制备成 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液。4℃、400×g

离心5 min;洗涤,结束后再次离心;通过2.5%戊二醛固定、乙醇脱水、离心操作等一系列过程,最后充分洗涤;1%四氧化锇固定2 h;脱水操作,树脂包埋处理,超薄切片机切片,并于透射电镜下观察各组细胞自噬体的表达。

2.5 Western blotting法测定E-MenSCs与H-MenSCs中自噬标志蛋白的表达量

按照试剂盒说明提取各组细胞的总蛋白,然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-PAGE电泳,蛋白质转移到硝酸纤维素膜,30 mA恒流,4℃转移,过夜;膜在5% BSA溶液中室温孵育1 h,加入一级抗体LC3-II(1:1 000)、Beclin1(1:2 000)、GAPDH(1:10 000)室温孵育1.5 h;加入HRP标记的二抗[山羊抗兔IgG(H+L)和山羊抗小鼠IgG(H+L),1:10 000],室温孵育1 h;最后用ECL化学发光法检测,X胶片曝光显影。以GAPDH作为内参蛋白。

2.6 统计分析

使用IBM SPSS Statistics 21进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Student *t*检验。

3 结果

3.1 E-MenSCs、H-MenSCs 鉴定

如图1所示,E-MenSCs与H-MenSCs在诱导前均呈长梭形,轮辐状扩散,符合间充质干细胞的形态特征;未加诱导剂的E-MenSCs与H-MenSCs在21 d后无明显变化,只是细胞形态更显细长;成脂诱导分化后的E-MenSCs和H-MenSCs均有红色脂滴形成;成骨诱导分化后的E-MenSCs和H-MenSCs均可观测到钙结节。

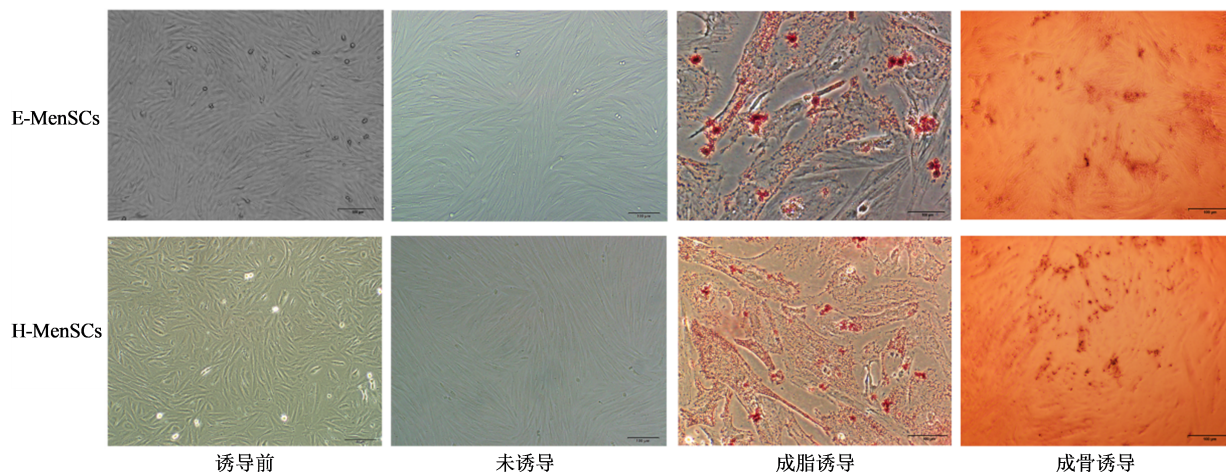
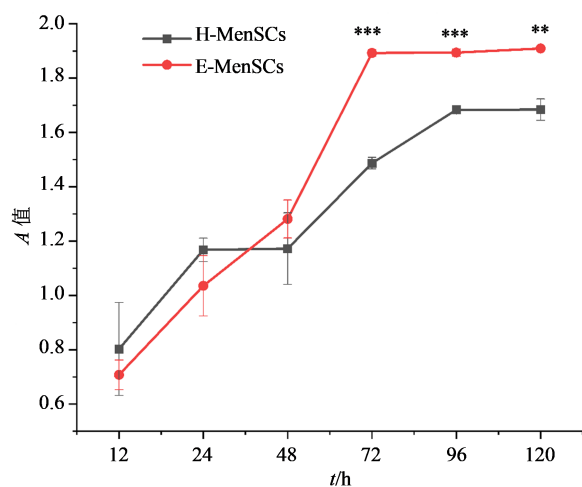


图1 E-MenSCs与H-MenSCs成脂与成骨诱导分化染色

Fig. 1 Adipogenic and osteogenic differentiation of E-MenSCs and H-MenSCs

3.2 H-MenSCs与E-MenSCs的细胞活力

如图2所示,随着时间的推移(12~120 h),H-MenSCs与E-MenSCs在450 nm下的 A 值均有所增加。H-MenSCs在12~24 h期间增速与E-MenSCs基本一致,但在24~48 h A 值趋于固定,其后至96 h又有所升高,且增速渐减,后至120 h处于平台期;E-MenSCs在24~48 h增速略缓,自48 h后陡增,并在72 h达到峰值,其后至120 h均处于平台期。而且,在72、96、120 h,E-MenSCs的细胞活力均显著高于同时刻的H-MenSCs($P<0.01$ 、 0.001)。



与H-MenSCs组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$
** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs H-MenSCs group

图2 H-MenSCs与E-MenSCs的增殖曲线($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 Cell growth curve of H-MenSCs and E-MenSCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.3 H-MenSCs与E-MenSCs中自噬体和自噬溶酶体的表达

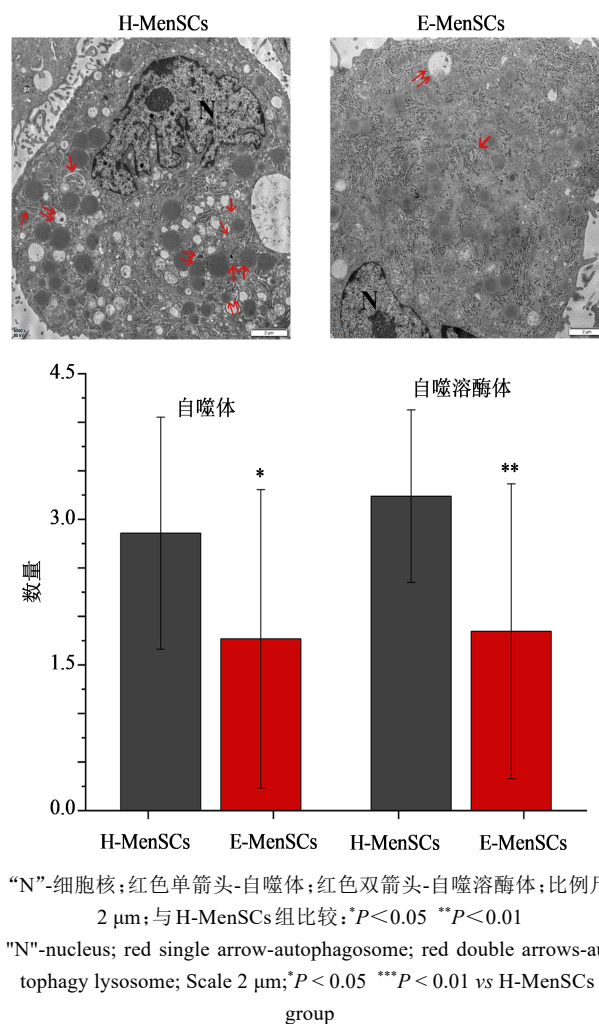
如图3所示,与H-MenSCs比较,E-MenSCs中自噬体和自噬溶酶体的数量均显著减少($P<0.05$ 、 0.01)。

3.4 H-MenSCs与E-MenSCs中的自噬标志物表达

如图4所示,与H-MenSCs比较,自噬标志分子(LC3-II和 Beclin1)蛋白表达量在E-MenSCs中显著降低($P<0.05$)。

4 讨论

本研究从3个层面比较了E-MenSCs与H-MenSCs的自噬功能:(1)细胞活力层面:E-MenSCs迅速生长增殖,尤其是24~72 h,并在72、96、120 h时刻达到峰值,其细胞活力明显优于H-MenSCs;(2)细胞中自噬体和自噬溶酶体的表达情况:E-MenSCs中自噬体和自噬溶酶体的数量均



"N"-细胞核;红色单箭头-自噬体;红色双箭头-自噬溶酶体;比例尺 2 μm ;与H-MenSCs组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
"N"-nucleus; red single arrow-autophagosome; red double arrows-autophagy lysosome; Scale 2 μm ; * $P<0.05$ *** $P<0.01$ vs H-MenSCs group

图3 H-MenSCs与E-MenSCs细胞中自噬体与自噬溶酶体的表达情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 3 Autophagosome and autolysosome expression in H-MenSCs and E-MenSCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

明显低于H-MenSCs;(3)细胞中自噬标志蛋白的表达量:E-MenSCs中 Beclin1 和 LC3-II的表达量均明显低于H-MenSCs。

自噬可以调控凋亡来影响细胞活力,EMT子宫颈内膜异位细胞处于低自噬水平,增加了细胞的抗凋亡能力,即提升其细胞活力,使得脱落的子宫内膜细胞在宫腔外得以存活、种植并生长,导致异位病灶的形成^[14]。在EMT异位囊肿中,mTOR被激活,自噬与凋亡都被抑制^[15];使用mTOR抑制剂(雷帕霉素)干预后,EMT细胞/异位病灶中的自噬与凋亡分子都上调表达,CCK-8检测结果显示细胞活力下降^[16];再加入自噬抑制剂(3-MA)后,EMT细胞的凋亡状态被逆转,细胞活力趋升^[15]。说明EMT细胞的低自噬状态可以抑制凋亡来上调细胞活力,细胞活力是表征EMT细胞自噬的重要指标之一^[17]。本研

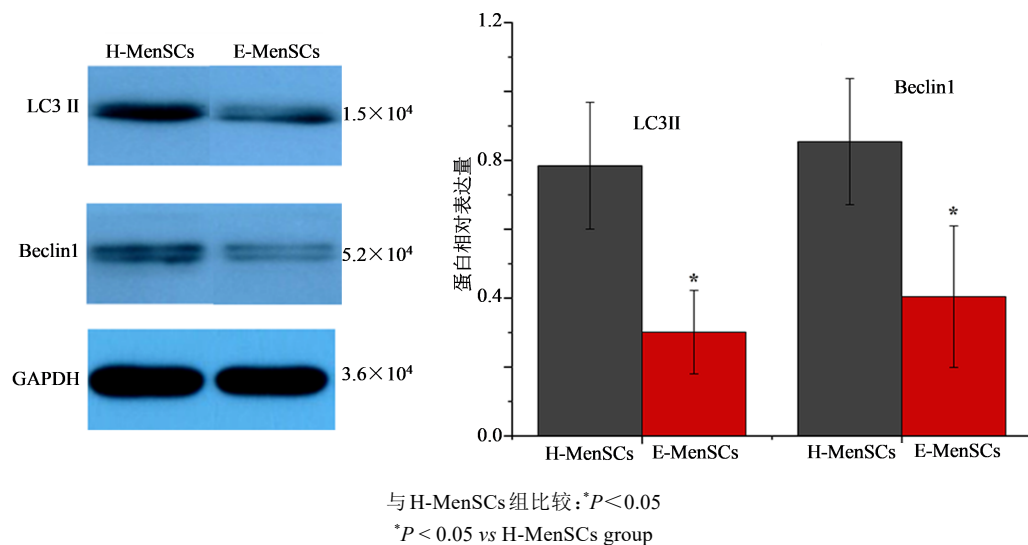


图4 自噬标志蛋白在H-MenSCs和E-MenSCs中的表达情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Protein expression of autophagy markers in H-MenSCs and E-MenSCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

究也通过CCK-8法比较发现:EMT患者的MenSCs细胞活力显著高于正常MenSCs,这提示E-MenSCs可能处于低自噬水平。E-MenSCs的自噬功能是否真的受到了抑制?本研究采用透射电镜直观观测细胞中自噬体和自噬溶酶体的表达情况。

自噬体和自噬溶酶体是细胞自噬过程的标志产物,通过透射电镜可以直接观测到细胞中自噬体和自噬溶酶体的表达^[18]。细胞自噬研究^[19-22]多会采用该方法直观观察,并统计分析1个视野中自噬体与自噬溶酶体的数量,以此来评估细胞的自噬活性。多项EMT研究^[4,23-24]使用该方法探讨自噬在EMT发病进展中的作用。EMT患者和EMT小鼠异位病灶中的自噬体数量均明显减少^[23]。本研究也采用透射电镜直观观察了E-MenSCs与H-MenSCs中自噬体、自噬溶酶体的表达。研究发现,与H-MenSCs比较,E-MenSCs自噬体和自噬溶酶体表达均明显受抑制。在分子层面,E-MenSCs与H-MenSCs中的自噬标志蛋白是否也会有差异?本研究通过Western blotting进一步研究。

LC3-II是LC3的脂化形式,已被证明是细胞自噬体形成的标志物,被广泛地应用于定量细胞的自噬活性^[25]。在EMT患者的血清和腹腔液中LC3和Beclin1的蛋白和RNA水平均明显低于非EMT患者^[26],而且EMT异位内膜的LC3和Beclin1的蛋白表达水平较在位内膜更低^[27],这也佐证了EMT异位内膜细胞的低自噬水平,从而增加其抗凋亡能力,使得其更易存活生长。本研究也发现了LC3-II蛋白表达在E-MenSCs中明显低于H-MenSCs。

Beclin1是介导自噬的关键调节因子之一,被视

为自噬标志分子^[28-29]。有研究表明^[30]:Beclin1的mRNA和蛋白水平在EMT患者在位子宫内膜和其基质细胞中的表达均显著低于健康女性,而且Beclin1的蛋白水平与EMT患者血清CA125及盆腔疼痛呈负相关。也有研究将Beclin1作为EMT诊断及其病程的新型标志物,其在EMT异位和在位内膜组织中表达下调,其下调程度与血清CA125水平及EMT病程负相关^[31-32]。本研究也发现了E-MenSCs中Beclin1的蛋白表达显著低于H-MenSCs。

本研究从细胞活力、自噬体与自噬溶酶体和自噬标志蛋白3个层面比较了E-MenSCs与H-MenSCs的自噬功能,发现相较于H-MenSCs,E-MenSCs的自噬功能被明显抑制,提示在EMT中在位内膜间充质干细胞处于低自噬水平,这可能是EMT发病进展的机制之一。但本研究存在一定局限性。如只从蛋白层面对2个自噬分子进行了比较观察,后续可以增加实时荧光定量PCR、免疫荧光、免疫组化等研究手段,丰富上下游的自噬分子,从RNA、蛋白定量与定位、分子间相互作用等多角度完善E-MenSCs低自噬水平的证据链条。本研究为揭示EMT机制提供了一条新的思路与实验依据,也为治疗EMT提供了新的研究方向与药物靶点,有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, et al. Endometriosis: Pathogenesis and treatment [J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(5): 261-275.

- [2] 范俊, 栾少红, 李晓林, 等. 口服避孕药在子宫内膜异位症治疗中的作用 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2013, 5(2): 73-75.
Fan J, Luan S H, Li X L, et al. The effect of oral contraceptives in treatment of endometriosis [J]. Chin J Fam Plan Gynecotokol, 2013, 5(2): 73-75.
- [3] Evans M B, Decherney A H. Fertility and endometriosis [J]. Clin Obstet Gynecol, 2017, 60(3): 497-502.
- [4] Pei T J, Luo B, Huang W, et al. Increased expression of YAP inhibited the autophagy level by upregulating mTOR signal in the eutopic ESCs of endometriosis [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 813165.
- [5] Turathum B, Gao E M, Grataitong K, et al. Dysregulated sphingolipid metabolism and autophagy in granulosa cells of women with endometriosis [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 906570.
- [6] Jiang L L, Wan Y H, Feng Z Y, et al. Long noncoding RNA UCA1 is related to autophagy and apoptosis in endometrial stromal cells [J]. Front Oncol, 2020, 10: 618472.
- [7] Mei J, Zhu X Y, Jin L P, et al. Estrogen promotes the survival of human secretory phase endometrial stromal cells via CXCL12/CXCR4 up-regulation-mediated autophagy inhibition [J]. Hum Reprod, 2015, 30(7): 1677-1689.
- [8] Adamczyk M, Wender-Ozegowska E, Kedzia M. Epigenetic factors in eutopic endometrium in women with endometriosis and infertility [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3804.
- [9] Liu H, Lang J H. Is abnormal eutopic endometrium the cause of endometriosis? The role of eutopic endometrium in pathogenesis of endometriosis [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(4): RA92-RA99.
- [10] Matson B C, Quinn K E, Lessey B A, et al. Elevated levels of adrenomedullin in eutopic endometrium and plasma from women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2018, 109(6): 1072-1078.
- [11] 郎景和. 对子宫内膜异位症认识的历史、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. The history, present situation and development of understanding endometriosis [J]. China Ind Econ, 2020, 36(3): 193-196.
- [12] 刘海青, 陈艳洁, 杜玲, 等. 子宫内膜异位症患者经血和内膜间充质干细胞的表达和相关性 [J]. 中国妇幼保健, 2022, 37(16): 3065-3068.
Liu H Q, Chen Y J, Du L, et al. Expression and correlation of menstrual blood and endometrial mesenchymal stem cells in patients with endometriosis [J]. Matern Child Health Care China, 2022, 37(16): 3065-3068.
- [13] 张悦健, 何甜甜, 林陶秀, 等. 琥珀酸对人 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 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 294-304.
Zhang Y J, He T T, Lin T X, et al. Effects of Hupo Powder on ectopic lesions, Beclin1 and ZEB1 expression in endometriotic nude mice implanted with human MenSCs [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(2): 294-304.
- [14] Lin Y K, Li Y Y, Li Y, et al. SCM-198 prevents endometriosis by reversing low autophagy of endometrial stromal cell via balancing ER α and PR signals [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 858176.
- [15] Choi J, Jo M, Lee E, et al. Differential induction of autophagy by mTOR is associated with abnormal apoptosis in ovarian endometriotic cysts [J]. Mol Hum Reprod, 2014, 20(4): 309-317.
- [16] Siracusa R, D'Amico R, Impellizzeri D, et al. Autophagy and mitophagy promotion in a rat model of endometriosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5074.
- [17] Zhou Y Y, Peng Y Y, Xia Q Q, et al. Decreased Indian hedgehog signaling activates autophagy in endometriosis and adenomyosis [J]. Reproduction, 2021, 161(2): 99-109.
- [18] Eskelinen E L, Reggiori F, Baba M, et al. Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research [J]. Autophagy, 2011, 7(9): 935-956.
- [19] Xiao X, Wang W, Li Y Q, et al. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 201.
- [20] Zhang S T, Hu L, Jiang J L, et al. HMGB1/RAGE axis mediates stress-induced RVLM neuroinflammation in mice via impairing mitophagy flux in microglia [J]. J Neuroinflamm, 2020, 17(1): 15.
- [21] Yan W J, Fan J H, Zhang X, et al. Decreased neuronal synaptosome associated protein 29 contributes to poststroke cognitive impairment by disrupting presynaptic maintenance [J]. Theranostics, 2021, 11(10): 4616-4636.
- [22] Dai F, Yu P F, Yu Z H, et al. Yiqi Huoxue recipe delayed intervertebral disc degeneration by activating autophagy [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 705747.
- [23] Huang Z X, He X R, Ding X Y, et al. Lipoxin A4 depresses inflammation and promotes autophagy via AhR/mTOR/AKT pathway to suppress endometriosis [J]. American J Rep Immunol, 2023, 89(3): e13659.
- [24] Jyoti B, Kaushal. Targeted inhibition of TAK1 abrogates TGF β 1 non-canonical signaling axis, NF κ B/Smad7

- inhibiting human endometriotic cells proliferation and inducing cell death involving autophagy [J]. *Cytokine*, 2021, 148: 155700.
- [25] Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi F H, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10147.
- [26] 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: 1958-1962.
- [27] Zhan L, Yao S, Sun S, et al. NLRC5 and autophagy combined as possible predictors in patients with endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(5): 949-956.
- [28] Hill S M, Wrobel L, Ashkenazi A, et al. VCP/p97 regulates beclin-1-dependent autophagy initiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(4): 448-455.
- [29] Gassen N C, Niemeyer D, Muth D, et al. SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibition reduces MERS-Coronavirus infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5770.
- [30] Ren Y F, Mu L, Ding X Y, et al. Decreased expression of Beclin 1 in eutopic endometrium of women with adenomyosis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2010, 282(4): 401-406.
- [31] Kong Z W, Yao T T. Role for autophagy-related markers beclin-1 and LC3 in endometriosis [J]. *BMC Womens Health*, 2022, 22(1): 264.
- [32] Zhang L, Liu Y, Xu Y, et al. The expression of the autophagy gene beclin-1 mRNA and protein in ectopic and eutopic endometrium of patients with endometriosis [J]. *Int J Fert Steril*, 2015, 8(4): 429-436.

[责任编辑 兰新新]