

基于CXCL12/CXCR4轴探讨琥珀散含药血清促进子宫内膜异位症患者经血源间充质干细胞自噬活性的作用机制

张悦健¹, 林陶秀¹, 何甜甜¹, 李长香², 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 基于CXCL12/CXCR4轴探讨琥珀散对子宫内膜异位症(EMT)经血源间充质干细胞(MenSCs)自噬活性的调控作用。方法 从EMT患者和健康女性志愿者的月经血中分离提取EMT MenSCs (E-MenSCs)和正常MenSCs (H-MenSCs)。采用12只7周龄雄性SD大鼠制备空白血清和含药血清(ig给予大鼠琥珀散9.9 g·kg⁻¹,临床等效剂量)。将细胞分为3组:对照组(H-MenSCs)、模型组(E-MenSCs)和琥珀散组(E-MenSCs),对照组和模型组使用20%空白血清干预,琥珀散组使用20%含药血清干预,均干预48 h。分别采用CCK-8法、透射电镜、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting法检测3组细胞的细胞活力、自噬体和自噬溶酶体表达、CXCL12和CXCR4的mRNA水平和CXCL12/CXCR4及自噬标志分子(Beclin1和LC3II)的蛋白表达量。结果 与对照组比较,模型组的细胞活力、CXCL12和CXCR4的mRNA和蛋白表达水平均显著提高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),自噬体和自噬溶酶体数量、Beclin1和LC3II的蛋白表达均显著降低($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,琥珀散组的细胞活力、CXCL12和CXCR4的mRNA及蛋白表达水平均显著下调($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),自噬体和自噬溶酶体数量、Beclin1和LC3II的蛋白表达均显著上调($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 琥珀散含药血清能够上调E-MenSCs自噬活性,其作用机制可能与其抑制CXCL12/CXCR4轴有关。

关键词: 琥珀散; 子宫内膜异位症; 经血源间充质干细胞; CXCL12/CXCR4轴; 自噬; 含药血清

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)07-1424-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.005

Mechanistic study of Hupo Powder containing serum promoting autophagy of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells with endometriosis based on CXCL12/CXCR4 axis

ZHANG Yuejian¹, LIN Taoxiu¹, HE Tiantian¹, LI Changxiang², 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** Based on CXCL12/CXCR4 axis, the regulation of Hupo Powder on the autophagy of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) with endometriosis (EMT) was studied. **Methods** EMT MenSCs (E-MenSCs) and healthy MenSCs (H-MenSCs) from the menstrual blood of patients with EMT and healthy volunteers were isolated, respectively. Twelve seven-weeks old male SD rats were used to prepare blank serum and drug containing serum (9.9 g·kg⁻¹ of amber powder was given to rats by ig, clinical equivalent dose). These cells were divided into three groups: control (H-MenSCs), model (E-MenSCs), and Hupo Powder (E-MenSCs) groups. The control and model groups were intervened in 20% concentration of blank serum for 48 hours, while the Hupo Powder group was intervened in 20% concentration of Hupo Powder containing serum for 48 hours. CCK-8 assay, transmission electron microscope, qRT-PCR, and Western blotting were used to detect the cell viability, autophagosomes and

收稿日期: 2023-05-09

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

autolysosomes, the mRNA levels of *CXCL12* and *CXCR4*, and the protein level of *CXCL12*, *CXCR4*, and autophagy marker proteins (Beclin1 and LC3II), respectively. **Results** Compared to the control group, cell viability, mRNA and protein expression of *CXCL12* and *CXCR4* in the model group were increased ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001), and autophagosomes and autolysosomes, Beclin1 and LC3II protein expression were decreased ($P < 0.05$ and 0.01). Compared to the model group, cell viability, mRNA and protein expression of *CXCL12* and *CXCR4* in the Hupo Powder group were down-regulated ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001), and autophagosomes and autolysosomes, Beclin1 and LC3 II protein expression were upregulated ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001). **Conclusion** Hupo Powder containing serum can up-regulate E-MenSCs autophagy, which might relate to the inhibition of *CXCL12*/*CXCR4* from Hupo Powder.

Key words: Hupo Powder; endometriosis; menstrual blood-derived mesenchymal stem cells; *CXCL12*/*CXCR4* axis; autophagy; medicated serum

子宫内膜异位症(EMT)影响着越来越多育龄期妇女的身心健康^[1],细胞自噬已被证实参与EMT的发病进展^[2-4]。自噬标志分子(Beclin1、LC3等)在EMT异位和在位内膜组织中表达下调,其下调程度与血清糖类抗原125(CA125)水平及EMT病程负相关^[5-6]。趋化因子12(*CXCL12*)与其受体-G蛋白偶联受体(*CXCR4*)构成*CXCL12*/*CXCR4*轴。已有研究指出,异常高水平表达的*CXCL12*/*CXCR4*轴通过限制分泌期异位内膜基质细胞自噬,进而促进EMT的形成与发展^[7]。也有研究从抑制该轴上调自噬探讨了孕酮干预EMT的作用机制^[8]。

琥珀散是《医宗金鉴》中治疗“寒凝血瘀成癥”的重要方剂,由三棱、莪术、赤芍、当归、牡丹皮等10味药组成,共奏温经止痛、活血消癥之效,临床治疗EMT疗效较好,不仅能改善经行腹痛、盆腔慢性疼痛、性交痛等主要症状^[9],与促性腺激素释放激素类似物(GnRHa)联用还能明显降低术后复发率^[10]。但目前对琥珀散的作用机制研究有限。经血源间充质干细胞(MenSCs)是从女性月经血中分离提取的间充质干细胞,具有较强的自我复制增生能力与多向分化潜能^[11]。有研究表明,EMT患者的MenSCs(E-MenSCs)与非EMT患者相比存在形态学差异,具有更强的增殖和侵袭能力^[12],自噬功能减弱^[13]。MenSCs是潜在的能够反映EMT在位内膜生物学特性的体外研究模型^[14]。因而,本研究分别提取E-MenSCs与正常MenSCs(H-MenSCs),使用琥珀散含药血清干预,采用CCK-8、透射电镜、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western blotting等方法探讨琥珀散含药血清从*CXCL12*/*CXCR4*轴对E-MenSCs自噬的调控作用及其可能机制。

1 材料

1.1 细胞

E-MenSCs和H-MenSCs分别取自EMT患者和健康女性志愿者的月经血。EMT患者(纳入标准见

本课题组文献报道^[15])均于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门诊,健康女性志愿者为暂无妊娠计划的育龄期健康女性,两组一般资料比较差异无统计学意义,详见表1。1月内未接受任何治疗EMT的药物,近6个月未使用激素类制剂。所有纳入研究者均签署知情同意书。本研究通过北京中医药大学第三附属医院伦理委员会审查(伦理审核编号BZYSY-2021KYKTPJ-12)。具体的细胞提取、传代、冻存、复苏和鉴定步骤参考文献报道^[15]。

表1 纳入研究者一般资料($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 General conditions of enrolled people ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	年龄/岁	身体质量指数/(kg·m ⁻²)
EMT患者	28.00±2.00	21.62±0.93
健康女性志愿者	26.60±1.14	22.13±1.18

1.2 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(批号22022661,含4-香豆酸0.15~0.60 mg·g⁻¹)、醋莪术(批号22020251,含莪术烯醇1.5~7.0 mg·g⁻¹)、赤芍(批号22005791,含芍药苷29.0~80.0 mg·g⁻¹)、当归(批号22040171,含阿魏酸0.50~1.70 mg·g⁻¹)、牡丹皮(批号22037191,含芍药苷和丹皮酚的总量10.0~60.0 mg·g⁻¹)、熟地黄(批号22031051,含地黄苷D 0.70~2.70 mg·g⁻¹)、肉桂(批号22034121,含桂皮醛16.0~40.0 mg·g⁻¹)、乌药(批号22022991,含去甲异波定15.0~37.0 mg·g⁻¹)、醋延胡索(批号21036611,含延胡索乙素0.8~5.0 mg·g⁻¹)、北刘寄奴(批号22013321,含木犀草素0.9~3.2 mg·g⁻¹)、毛蕊花糖苷4.0~25.0 mg·g⁻¹)。

CCK-8试剂盒(货号AQ308)、磷酸盐缓冲溶液(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)均购自北京翊圣生物科技有

限公司(中国);2.5%戊二醛、1%四氧化锇和3%醋酸柚-枸橼酸铅均购自国药集团药业股份有限公司(中国);TRIzol reagent试剂盒(货号15596026CN)购自Thermo Fisher Scientific(美国);HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)(货号R312-01)和AceQ Universal SYBR qPCR Mater Mix(货号Q511-02)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RIPA裂解液(货号WB0003)和BCA蛋白定量试剂盒(货号WB0028)购自天德悦(北京)生物科技有限责任公司;一级抗体: CXCL12一抗(货号17402-1-AP)、CXCR4一抗(货号60042-1-Ig)、LC3-II一抗(货号18725-1-AP)和Beclin1一抗(货号11306-1-AP)均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: HRP标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)(货号S001)和山羊抗兔IgG(H+L)(货号S004)均购自天德悦(北京)生物科技有限责任公司。

1.3 主要仪器

Fresco低温冷冻离心机、A5119500C酶标仪和NanoDrop® ND-2000分光光度计均购自Thermo Fisher Scientific; Tecnai Spirit透射电镜购自FEI公司; ABI 7500 qRT-PCR仪购自Applied Biosystems公司; T100 PCR仪器和电泳仪均购自BIO-RAD公司; QL-902涡旋震荡仪购自海门其林贝尔仪器制造有限公司; 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。

2 方法

2.1 琥珀散含药血清的制备及细胞分组、给药

琥珀散含药血清的制备及干预E-MenSCs条件的筛选按照本课题组前期建立方法^[16], 具体过程如下: 采用12只7周龄雄性SD大鼠体质量[(223.00±8.11)g]制备空白血清(ig给予大鼠0.9%氯化钠溶液)和含药血清(ig给予大鼠琥珀散9.9 g·kg⁻¹, 临床等效剂量), 设置5%、10%、20%血清浓度和12、24、48 h干预时间, 干预E-MenSCs和H-MenSCs, 经CCK-8法筛选后获得最佳条件: 血清浓度20%、干预48 h。

选取2~4代细胞进行实验, 设置对照组、模型组、琥珀散组, H-MenSCs细胞为对照组、E-MenSCs细胞为模型组, 琥珀散组为E-MenSCs细胞给予20%含药血清干预48 h, 对照组和模型组使用20%空白血清干预48 h。

2.2 CCK-8法检测各组细胞的细胞活力

采用CCK-8法检测干预后3组细胞在波长450 nm

处的吸光度(A)值, 比较3组细胞的相对存活率。

2.3 透射电镜观察各组细胞自噬体和自噬溶酶体的表达

取干预后的3组细胞, 制备成1×10⁶·mL⁻¹的单细胞悬液。4℃、400×g离心5 min, PBS洗涤后连续离心2次, 弃上清, 加入2.5%戊二醛固定2 h, 置于4℃冰箱, 再用PBS充分浸洗3次。于1%四氧化锇的环境中固定2 h, PBS洗涤3次, 再对细胞进行梯度脱水, 环氧树脂浸透、包埋, 超薄切片机切片(50~70 nm), 3%醋酸柚-枸橼酸铅双重染色, 置于透射电镜下观察并采集照片。

2.4 qRT-PCR法测定各组细胞中CXCL12、CXCR4的mRNA水平

干预48 h后, 弃掉液体培养基, 加入1 mL Trizol, 用移液器反复吹打贴壁细胞, 直至细胞全部裂解。采用HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)和AceQ Universal SYBR qPCR Mater Mix进行CXCL12、CXCR4和GAPDH的qRT-PCR检测。GAPDH作为内参基因对mRNA标准化, 采用2^{-ΔΔCt}法分析二者表达水平。引物序列见表2。

表2 引物序列信息
Table 2 Details of primers sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
CXCL12	上游: ATTCTCAACACTCCAACTGTGC	88
	下游: ACTTTAGCTTCGGGTCAATGC	
CXCR4	上游: ACGCCACCAACAGTCAGAG	96
	下游: AGTCGGGAATAGTCAGCAGGA	
GAPDH	上游: CTGGGCTACACTGAGCACC	101
	下游: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	

2.5 Western blotting法测定各组细胞中CXCL12、CXCR4及自噬标志蛋白的表达

预冷RIPA蛋白裂解液, 并加入蛋白酶抑制剂。干预结束后在各组细胞中加入RIPA裂解液, 冰上孵育20 min, 4℃、13 000 r·min⁻¹离心20 min, 取上清。采用BCA法检测蛋白浓度。取等量蛋白样品进行SDS聚丙烯酰胺凝胶(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; 在5% BSA溶液中室温孵育1 h, 加入CXCR12(1:2 000)、CXCR4(1:2 000)、Beclin1(1:2 000)、LC3-II(1:1 000)和GAPDH(1:10 000)的一级抗体室温孵育1.5 h; 加入HRP标记的二抗, 包括山羊抗兔IgG(H+L)(1:

10 000)和山羊抗小鼠IgG(H+L)(1:10 000),室温轻摇1 h,TBST洗膜5次,每次3 min;最后用ECL化学发光法检测,X胶片曝光显影。将GAPDH作为内参蛋白。

2.6 统计分析

采用IBM SPSS Statistics 21.0 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。

3 结果

3.1 各组细胞的细胞活力

如图1所示,与对照组比较,模型组的细胞活力显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,琥珀散组细胞活力显著降低($P < 0.01$),且与对照组无显著差异。

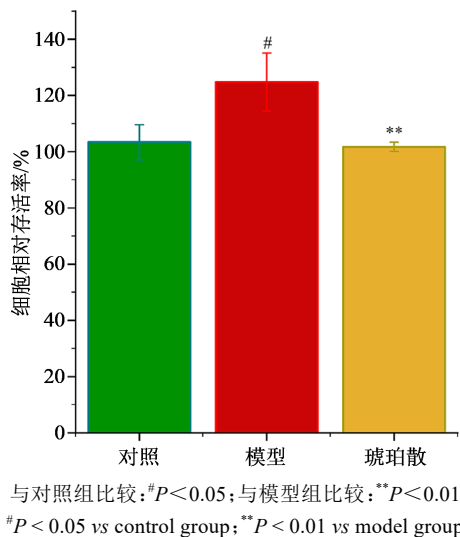


图1 干预后各组细胞活力($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Cell viability in each group after intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 各组细胞中自噬体和自噬溶酶体的表达

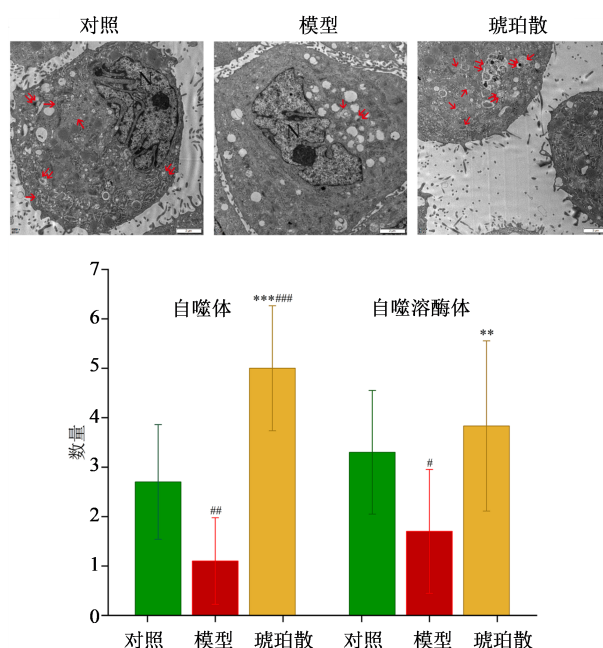
如图2所示,与对照组比较,模型组的自噬体和自噬溶酶体均表达显著降低($P < 0.05, 0.01$),琥珀散组的自噬体表达升高($P < 0.001$);与模型组比较,琥珀散组自噬体和自噬溶酶体的表达均显著增加($P < 0.01, 0.001$)。

3.3 各组细胞中CXCL12、CXCR4的mRNA水平

与对照组比较,模型组CXCL12和CXCR4的mRNA水平均显著上升($P < 0.01, 0.001$);与模型组比较,琥珀散组的CXCL12和CXCR4的mRNA表达量均显著降低($P < 0.01, 0.001$)。结果见图3。

3.4 各组细胞中CXCL12、CXCR4及自噬标志蛋白的表达

如图4所示,与对照组比较,模型组CXCL12和



“N”-细胞核;红色单箭头-自噬体(双层细胞膜囊泡,内含线粒体、内质网、核糖体等细胞器);红色双箭头-自噬溶酶体(单层细胞膜囊泡,和溶酶体融合);比例尺2 μm ;与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$;与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

“N”-nucleus; Red single arrow-autophagosome (double layer cell membrane vesicle, containing mitochondria, endoplasmic reticulum, ribosome and other organelle); Red double arrows-autophagy lysosome (single layer cell membrane vesicle, fused with lysosome); Scale 2 μm ; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图2 干预后各组的自噬体和自噬溶酶体表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Autophagosome and autolysosome in each group after intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

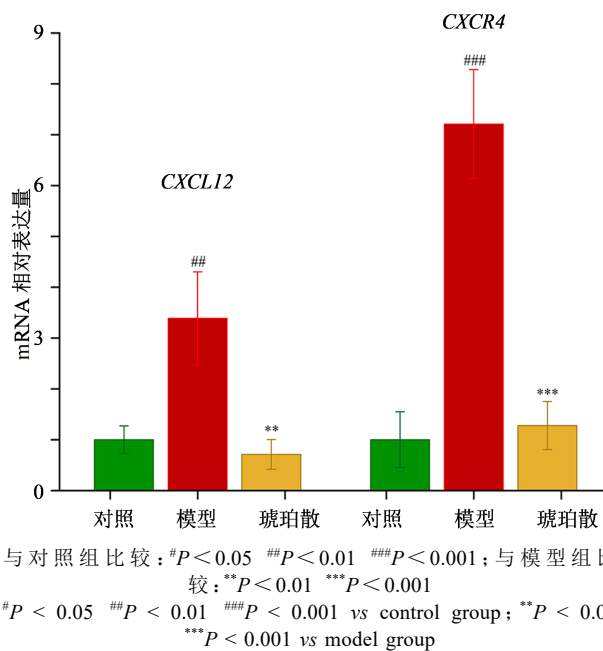


图3 CXCL12、CXCR4的mRNA表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Relative mRNA expression of CXCL12 and CXCR4 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

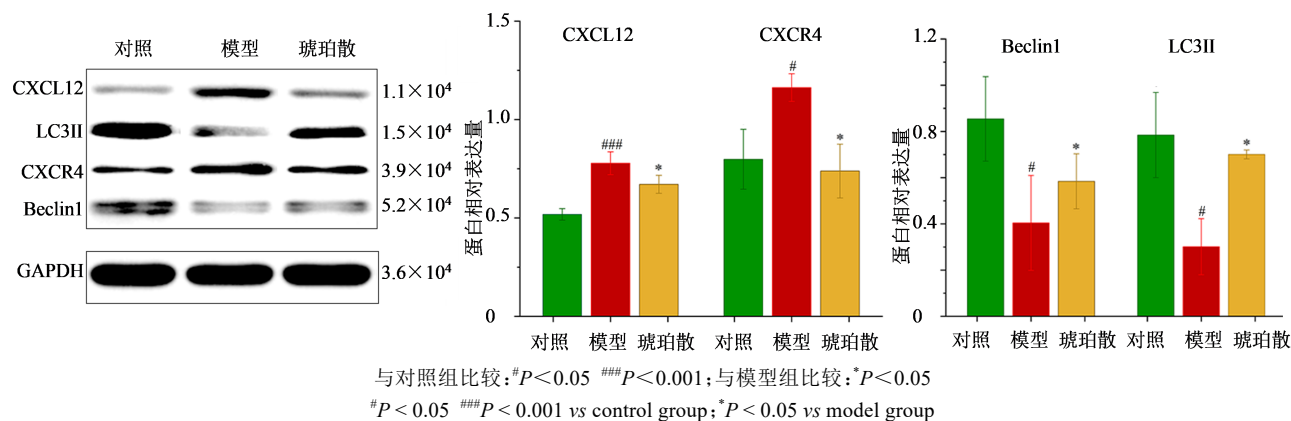


图4 干预后各组CXCL12、CXCR4、Beclin1和LC3II的蛋白表达情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Relative protein expression of CXCL12, CXCR4, Beclin1, and LC3II in each group after intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

CXCR4的蛋白表达量显著上调($P < 0.05, 0.001$),而自噬标志蛋白Beclin1和LC3II均显著下调($P < 0.05$);与模型组比较,琥珀散组CXCL12和CXCR4的蛋白表达量显著下降($P < 0.05$),Beclin1和LC3II则显著上升($P < 0.05$)。

4 讨论

近年来越来越多的研究从调控EMT自噬切入探讨治疗EMT的新方法^[17-18],研究指出促进EMT自噬能够减轻炎症^[19]、促进异位内膜细胞凋亡^[20]、抑制黏附增殖^[21]等,进而缩小EMT异位病变,延缓EMT发病进展。也有研究从诱导自噬探讨了抗EMT药物的作用机制:地诺孕素能通过抑制Akt、ERK1/2,进而下调mTOR,诱导EMT细胞发生自噬并促进其凋亡^[22]。另有研究证实使用孕酮干预EMT子宫内膜基质细胞(ESCs)后,可以下调CXCL12/CXCR4表达,进而上调自噬标志蛋白LC3B的表达并促进ESCs自噬^[8]。本研究发现了琥珀散含药血清能够明显上调E-MenSCs自噬,其作用机制可能与其对CXCL12/CXCR4轴的调控作用相关,主要体现在以下3个方面:(1)琥珀散含药血清能够抑制E-MenSCs细胞活力;(2)琥珀散含药血清能够上调E-MenSCs细胞中自噬体和自噬溶酶体的表达,其中自噬体的数量明显多于H-MenSCs;(3)就分子层面,琥珀散含药血清能够明显抑制E-MenSCs中CXCL12/CXCR4 mRNA和蛋白水平的表达量,并明显上调自噬特征蛋白的表达。

ESCs分泌产生CXCL12,骨髓干细胞表达其受体CXCR4^[23],CXCL12/CXCR4轴影响多种女性生殖疾病,包括EMT、子宫内膜癌等^[7,24]。在肿瘤疾病中,CXCL12/CXCR4轴介导自噬进而促进肿瘤细胞的增殖和侵袭、干细胞的存活等^[25]。在EMT异位病

灶组织中,CXCL12高表达,进而吸引越来越多的骨髓干细胞至子宫内膜组织,并分泌产生CXCR4,两者特异性结合后影响EMT发病进展^[26]。研究表明,异常高水平表达的CXCL12/CXCR4可能通过限制分泌期异位ESCs自噬,有助于异位内膜细胞在子宫内膜异位环境中的生长,进而促进EMT的形成^[7]。另有研究证实,ESCs中CXCL12的浓度与自噬水平呈显著负相关($R^2 = -0.9694$),而CXCR4作为自噬过程中自噬囊泡形成的调节器,在分泌期在位和异位ESCs中异常升高^[8]。本研究也表明相较于对照组(H-MenSCs),模型组(E-MenSCs)中的CXCL12/CXCR4的mRNA和蛋白水平均显著升高,并伴随自噬特征蛋白的表达降低。

细胞活力与自噬水平呈负相关,EMT低自噬水平伴随其抗凋亡能力强,细胞活力升高。有学者研究^[27]发现袁氏内异方的含药血清能够抑制血管内皮细胞的细胞活力和血管形成,并促进其发生凋亡;而体内研究也表明该方可以减少病变体积和微血管密度,并促进异位内膜中自噬体的表达。本研究也表明E-MenSCs的细胞活力较H-MenSCs明显升高,而琥珀散含药血清能够抑制E-MenSCs的细胞活力,并显著上调细胞中自噬体和自噬溶酶体的表达。

Beclin1和LC3II是自噬的标志分子,其在EMT中低表达,而且两者的基因表达水平与EMT的病程负相关,暗示低表达的Beclin1和LC3可能在EMT的发病进展中发挥作用^[5]。另有研究表明^[4],相较于子宫肌瘤患者($n=35$),EMT患者($n=30$)的在位和异位内膜组织中LC3和Beclin1的表达均显著下调,而且异位内膜组织中两者的下调水平强于在位内膜组织。本研究也发现了相较于对照组(H-MenSCs),模

型组(E-MenSCs)Beclin1和LC3II表达减少,而用琥珀散含药血清干预后两者表达均明显上升。与琥珀散组方类似的温经止痛方体内研究表明给药后EMT大鼠在位、异位内膜上的LC3和Beclin1的mRNA和蛋白水平均高于模型组^[28]。

本研究首先从抑制细胞活力,上调自噬体、自噬溶酶体及自噬标志分子的角度说明琥珀散含药血清能够促进E-MenSCs自噬活性;并依据CXCL12/CXCR4的mRNA和蛋白水平的下调推测琥珀散含药血清可能通过抑制该轴进而促进细胞自噬。本研究尚存在局限性,如:每组细胞的重复样本只有3个;在分子层面仅通过qRT-PCR和Western blotting检测了CXCL12/CXCR4的表达,并未使用siRNA干扰技术影响CXCL12对琥珀散含药血清产生的效应进行反证;对自噬的观察方法较为单一,后续可增加自噬流的观测等。本研究为揭示琥珀散治疗EMT提供了新的实验依据,也为琥珀散作用EMT的机制研究提供了新的方向与作用靶点,仍待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zondervan K T, Becker C M, Koga K, et al. Endometriosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 9.
- [2] Matsuzaki S, Gremeau A S, Pouly J L. Impaired pathogen-induced autophagy and increased IL-1 β and TNF α release in response to pathogenic triggers in secretory phase endometrial stromal cells of endometriosis patients [J]. Reprod Bio Med Onl, 2020, 41 (5): 767-781.
- [3] 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.
- [4] Zhan L, Yao S, Sun S Y, et al. NLRC5 and autophagy combined as possible predictors in patients with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2018, 110(5): 949-956.
- [5] Kong Z, Yao T. Role for autophagy-related markers Beclin-1 and LC3 in endometriosis [J]. BMC Women's Health, 2022, 22(1): 264.
- [6] Zhang L Y, Liu Y, Xu Y P, 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 Fertil Steril, 2015, 8(4): 429-436.
- [7] Li F, Alderman M H, Tal A, et al. Hematogenous dissemination of mesenchymal stem cells from endometriosis [J]. Stem Cells, 2018, 36(6): 881-890.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Guo Y N, Shan J, Liu Y, et al. Hupo Powder combined with GnRHa in inhibiting the recurrence of endometriosis after operation [J]. Act Chin Med, 2020, 35(07): 1534-1537.
- [11] Chen L J, Qu J J, Mei Q H, et al. Small extracellular vesicles from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) as a novel therapeutic impetus in regenerative medicine [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12 (1): 433.
- [12] Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M, et al. Menstrual blood-derived stromal stem cells from women with and without endometriosis reveal different phenotypic and functional characteristics [J]. Mol Hum Reprod, 2014, 20 (9): 905-918.
- [13] 张悦健, 林陶秀, 何甜甜, 等. 子宫内膜异位症患者与健康女性的经血源间充质干细胞的自噬功能比较研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(7): 1417-1423.
Zhang Y J, Lin T X, He T T, et al. Comparative study of autophagy in menstrual blood-derived stem cells from patients with endometriosis and healthy women [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(7): 1417-1423.
- [14] Zhang Y J, He T T, Lin T X, et al. Novel *in vivo* endometriotic models associated eutopic endometrium by implanting menstrual blood-derived stromal cells from patients with endometriosis [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 8347.
- [15] 张悦健, 何甜甜, 林陶秀, 等. 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 [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.
- [16] Zhang Y J, Li C X, Sui C L, et al. Hupo Powder promotes autophagy of menstrual blood-derived stem cells from patients with endometriosis [J]. J Tradit Chin Med Sci,

- 2023, 10(2): 179-185.
- [17] Hung S W, Zhang R Z, Tan Z, et al. Pharmaceuticals targeting signaling pathways of endometriosis as potential new medical treatment: A review [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 2489-2564.
- [18] Kapoor R, Stratopoulou C A, Dolmans M M. Pathogenesis of endometriosis: New insights into prospective therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11700.
- [19] He R H, Liu X J, Zhang J, et al. NLRC5 inhibits inflammation of secretory phase ectopic endometrial stromal cells by up-regulating autophagy in ovarian endometriosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1281.
- [20] 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.
- [21] Ma L, Li Z Y, Li W H, et al. microRNA-142-3p suppresses endometriosis by regulating KLF9-mediated autophagy *in vitro* and *in vivo* [J]. *RNA Biol*, 2019, 16 (12): 1733-1748.
- [22] Choi J, Jo M, Lee E, et al. Dienogest enhances autophagy induction in endometriotic cells by impairing activation of AKT, ERK1/2, and mTOR [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104 (3): 655-664.e1.
- [23] Wang X L, Mamillapalli R, Mutlu L, et al. Chemoattraction of bone marrow-derived stem cells towards human endometrial stromal cells is mediated by estradiol regulated CXCL12 and CXCR4 expression [J]. *Stem Cell Res*, 2015, 15(1): 14-22.
- [24] Dobroch J, Bojczuk K, Kołakowski A, et al. The exploration of chemokines importance in the pathogenesis and development of endometrial cancer [J]. *Molecules*, 2022, 27(7): 2041.
- [25] Chen Z, Teo A, McCarty N. ROS-induced CXCR4 signaling regulates mantle cell lymphoma (MCL) cell survival and drug resistance in the bone marrow microenvironment via autophagy [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 22: 187-199.
- [26] Taylor H S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients [J]. *JAMA*, 2004, 292(1): 81.
- [27] Yang H D, Zhu Q F, Li H, et al. Effect of Neiyi Prescription of QIU on autophagy and angiogenic ability of endometriosis via the PPAR γ /NF- κ B signaling pathway [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2022, 306(2): 533-545.
- [28] 黄艳辉, 丑丹, 冯丹, 等. 温经止痛方对子宫内膜异位症模型大鼠自噬基因 Beclin-1、LC3 表达的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(5): 848-854.
- Huang Y H, Chou D, Feng D, et al. Effects of Wenjing Zhitong recipe on expression of autophagy genes beclin-1 and LC3 in endometriosis rats [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2018, 35(5): 848-854.

[责任编辑 兰新新]