

双酚 AF 对人子宫内膜基质细胞衰老的影响及雷帕霉素的抑制作用

邓 玲¹, 李首庆², 钮春雪², 林秀英², 米旭光², 付建华^{1,2}

(1. 长春中医药大学临床医学院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林省人民医院生殖医学中心, 吉林 长春 130021)

[摘 要] **目的:** 探讨双酚 AF (BPAF) 对子宫内膜基质细胞 (hESCs) 衰老的影响, 并阐明雷帕霉素 (Rapa) 对 BPAF 诱导的 hESCs 衰老的抑制作用。**方法:** 体外培养 hESCs, 采用 0、7.5、15.0、30.0、60.0 和 120.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF 处理 hESCs。采用 MTT 法检测不同浓度 BPAF 作用后 hESCs 存活率。将 hESCs 分为对照组 (正常培养基)、BPAF 组 (加入含 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF 培养基) 和 Rapa 组 (加入含 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF 及 100.0 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Rapa 培养基)。采用衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色法检测各组细胞中 SA- β -gal 阳性细胞百分率, 流式细胞术检测各组细胞周期百分率, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中 *p16*、*p21* 和 *p53* mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组细胞中衰老相关蛋白 p16、p21 和 p53 及自噬相关蛋白 p62、微管相关蛋白 1 轻链 3 型蛋白 II (LC3-II) 和微管相关蛋白 1 轻链 3 型蛋白 I (LC3-I) 表达水平。**结果:** MTT 法, 当 BPAF 浓度为 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率达 75%, 后续实验选用 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF 诱导细胞衰老。与对照组比较, BPAF 组 SA- β -gal 阳性细胞百分率明显升高 ($P<0.01$), G_1 期细胞百分率明显升高 ($P<0.01$), 细胞中 *p16*、*p21* 和 *p53* mRNA 及蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.01$)。与 BPAF 组比较, Rapa 组 SA- β -gal 阳性细胞百分率明显降低 ($P<0.01$), G_1 期细胞百分率明显降低 ($P<0.01$), 细胞中 *p16*、*p21* 和 *p53* mRNA 及蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.01$), 自噬相关 p62 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), LC3-II/LC3-I 比值明显升高 ($P<0.01$)。**结论:** 高浓度 BPAF 可抑制 hESCs 增殖并诱导细胞衰老, Rapa 可抑制 BPAF 诱导的细胞衰老, 其作用机制可能与细胞自噬激活有关。

[关键词] 子宫内膜基质细胞; 双酚 AF; 细胞衰老; 雷帕霉素; 自噬; 衰老相关 β -半乳糖苷酶

[中图分类号] R994.6 **[文献标志码]** A

Effect of bisphenol AF on senescence of human endometrial stromal cells and inhibitory role of rapamycin

DENG Ling¹, LI Shouqing², NIU Chunxue², LIN Xiuying², MI Xuguang², FU Jianhua^{1,2}

(1. School of Clinical Medical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China; 2. Department of Reproductive Medicine Center, People's Hospital, Jilin Province, Changchun 130021, China)

[收稿日期] 2025-05-27 **[录用日期]** 2025-07-06

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20250601012RC)

[作者简介] 邓 玲 (1998—), 女, 四川省会理市人, 医学硕士, 主要从事生殖医学基础和子宫内膜细胞衰老方面的研究。

[通信作者] 付建华, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: rufeng11@sina.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of bisphenol AF (BPAF) on the senescence in the human endometrial stromal cells (hESCs), and to elucidate the inhibitory effect of rapamycin (Rapa) on the BPAF-induced senescent hESCs. **Methods:** The hESCs were cultured *in vitro* and treated with 0, 7.5, 15.0, 30.0, 60.0, and 120.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF. MTT assay was used to detect the cell survival rates of the hESCs after treated with different concentrations of BPAF. The cells were divided into control group (normal medium), BPAF group (medium containing 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF), and Rapa group (medium containing both 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPAF and 100.0 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Rapa). Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining was used to assess the percentages of SA- β -gal positive cells in various groups; flow cytometry was used to analyze the percentages of cells at different cell cycles in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to assess the expression levels of *p16*, *p21* and *p53* mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of senescence-related proteins (p16, p21 and p53), autophagy-related proteins p62, microtubule-associated protein 1-light chain 3 (LC3)-II and LC3-I in the cells in various groups. **Results:** The MTT assay results showed that the cell survival rate was 75% when the BPAF concentration was 30.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; therefore, this concentration was selected for subsequent senescence induction experiments. Compared with control group, the percentage of SA- β -gal positive cells in BPAF group was significantly increased ($P<0.01$), the percentage of the cells at G_1 phase was significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of *p16*, *p21*, and *p53* mRNA and proteins were significantly increased ($P<0.01$). Compared with BPAF group, the percentage of SA- β -gal positive cells in Rapa group was significantly decreased ($P<0.01$), the percentage of the cells at G_1 phase was significantly decreased ($P<0.01$), the expression levels of *p16*, *p21*, and *p53* mRNA and proteins in the cells were significantly decreased ($P<0.01$), and the expression level of the autophagy-related protein p62 in the cells was significantly decreased ($P<0.01$) while the LC3-II/LC3-I ratio was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** High concentrations of BPAF can inhibit the proliferation of the hESCs and induce cellular senescence. Rapa can suppress BPAF-induced cellular senescence, and its mechanism may be related with the activation of autophagy.

KEYWORDS Endometrial stromal cell; Bisphenol AF; Cellular senescence; Rapamycin; Autophagy; Senescence-associated β -galactosidase

子宫内膜主要由子宫内膜上皮细胞和人子宫内膜基质细胞 (human endometrial stromal cells, hESCs) 组成^[1]。hESCs在子宫内膜功能层的周期性转化中起关键作用,并可在激素诱导下转化为蜕膜化状态^[2]。然而,hESCs衰老会导致子宫内膜容受性降低,继而影响胚胎着床过程,降低女性生育能力^[3]。双酚 AF (bisphenol AF, BPAF) 是一种内分泌干扰化学物质 (endocrine disrupting chemicals, EDCs),长期暴露可影响子宫的正常形态和功能,导致女性生殖功能障碍^[4]。研究^[5-6]表明:长期暴露于BPAF可引起子宫内膜中雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β) 过表达,导致子宫内膜异位症;还可抑制hESCs蜕膜化,导致胚胎着床失败。研究^[7]显示:BPAF可引起hESCs线粒体膜电位降低,增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累,导致细胞衰老和凋亡。衰老细胞可通过旁分泌方式向附近正常细胞传递衰老相

关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP),加速细胞衰老进程^[8]。雷帕霉素 (rapamycin, Rapa) 是目前公认的有效抗衰老药物之一,具有一定的抗氧化应激作用,并可减少衰老细胞 SASP 分泌,延缓细胞衰老^[9]。研究^[10]发现:Rapa可通过调节细胞代谢和能量平衡来促进子宫内膜蜕膜化,改善子宫内膜着床环境。但目前Rapa对EDCs诱导细胞衰老的作用及其机制尚不明确。本研究采用BPAF处理hESCs,并观察Rapa对BPAF诱导的细胞衰老的影响,探讨其作用机制,为子宫内膜相关疾病的治疗提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、主要试剂和仪器 hESCs来自吉林省人民医院中心实验室,经冻存复苏后稳定培养用于后续实验。BPAF购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,溶解于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide,

DMSO), 配制为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。MEM α 培养基、青霉素-链霉素溶液和胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 溶液均购自南京生航生物技术有限公司, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 cDNA 第一链合成试剂盒 EasyScript 和 TransStart Top Green qPCR SuperMix (+Dye II) 均购自北京全式金生物技术有限公司, MTT (98%, 试剂级)、细胞衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 染色试剂盒和细胞周期与凋亡检测试剂盒 Annexin V - 异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, FITC/PI) 均购自上海碧云天生物技术有限公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法蛋白质定量试剂盒购自美国 ABP Biosciences 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、p21 抗体、自噬适配体蛋白 p62 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 型蛋白 I (microtubule-associated protein 1-light chain 3-I, LC3-I) 抗体和微管相关蛋白 1 轻链 3 型蛋白 II (microtubule-associated protein 1-light chain 3-II, LC3-II) 抗体均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, p16 抗体和 p53 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 所用的引物序列由金唯智生物科技公司合成, RT-qPCR 试剂购自日本宝生物工程 (上海) 有限公司。NanoDrop 2000 分光光度计、CO₂ 培养箱和 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 电泳系统购自美国 Wealtec 有限公司, 荧光倒置显微镜购自日本 Olympus Corporation 公司, RT-qPCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 细胞培养 hESCs 采用完全培养基 MEM α (含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素) 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。当细胞融合度达到 80% 时, 经胰酶消化传代。选取第 6~12 代处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3 MTT 法检测不同浓度 BPAF 作用后 hESCs 存活率 收集处于对数生长期的 hESCs, 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板。每孔加入 100 μL 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养至细胞融合度约达 70%。弃去原培养基, 更

换为含不同浓度 (0、7.5、15.0、30.0、60.0 和 120.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) BPAF 的 100 μL 完全培养基, 继续培养 7 d。每组设置 5 个复孔。培养结束后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 37 °C 孵育 4 h。吸弃孔内液体, 加入 100 μL DMSO, 室温振荡 5 min 充分溶解结晶。采用酶标仪于 492 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照组 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.4 细胞分组和处理 取处于对数生长期的 hESCs, 分为对照组、BPAF 组和 Rapa 组。对照组细胞采用完全培养基置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 7 d; BPAF 组细胞使用含 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPAF 的培养基在相同条件下培养 7 d; Rapa 组细胞先使用含 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPAF 的培养基在相同条件下培养 5 d, 5 d 后在培养基中加入 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapa 继续培养 2 d。

1.5 流式细胞术检测各组不同细胞周期细胞百分率

收集各组 hESCs, 以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板。每孔加入 2 mL 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞完全贴壁, 更换为对应分组的含药物培养基, 相同条件下继续培养 7 d。配制 PI 染色液 (配比组成: 染色缓冲液 0.5 mL + 20 $\times$ PI 染色液 25 μL + 50 $\times$ RNA 酶 10 μL)。收集各组细胞培养液, 胰酶消化, 加入提前收集的细胞培养液中和, 离心收集各组细胞, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 1 次, 再次离心, 每管加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇, 轻轻吹打混匀, 4 °C 固定 12 h 后离心收集细胞。加入 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 各孔加入 0.5 mL 提前配好的 PI 染色液, 充分混匀, 37 °C 避光孵育 30 min。采用流式细胞术检测各组细胞的细胞周期分布, 使用 Modfit LT 5 软件分析处于不同细胞周期的细胞百分率。实验重复 3 次。

1.6 SA- β -gal 染色法检测各组 SA- β -gal 阳性细胞百分率

将收集的 hESCs 接种于 6 孔细胞培养板, 按上述细胞分组处理 7 d 后, 进行 SA- β -gal 染色。弃去培养基, PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 每孔加入 1 mL 染色固定液, 室温固定 15 min。移除固定液, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 3 min。每孔加入 1 mL SA- β -gal 染色工作液 (配比组成: β -gal 染色液 A 10 μL + β -gal 染色液 B 10 μL + β -gal 染色液 C 930 μL + X-gal 溶液 50 μL)。密封后置于 37 °C 湿盒 (或水浴

锅) 中避光孵育 18 h。于倒置显微镜下观察各组细胞染色情况, 蓝染细胞计为 SA-β-gal 阳性细胞。随机选取视野 (每个视野细胞总数>200 个) 计数阳性细胞数。采用 Image J 软件统计各组阳性细胞数, 计算 SA-β-gal 阳性细胞百分率。SA-β-gal 阳性细胞百分率= (SA-β-gal 阳性细胞数/细胞总数) × 100%。实验独立重复 3 次。

1.7 RT-qPCR 法检测各组 hESCs 中 p16、p21 和 p53 mRNA 表达水平 各组细胞在 6 孔细胞培养板中培养 7 d 后, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 采用 Thermo Scientific NanoDrop 2000 型分光光度计对 RNA 样品的纯度和含量进行检测。采用逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 作为模板进行 RT-qPCR 扩增。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组细胞中衰老标志物 p16、p21 和 p53 mRNA 表达水平。实验重复 3 次, 每次至少 4 个复孔。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Sequence (5'-3')
GAPDH	F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R: TGGTGAAGACGCCAGTGGA
p16	F: TCAACGCACCGAATAGTTACG R: CAGCTCCTCAGCCAGGTC
p21	F: TGTCTTGTACCCTTGTGCCT R: CAGCTCCTCAGCCAGGTC
p53	F: CTGCTCAGATAGCGATGGTCTG R: ATCTGAGGTGCCCATGCTAG

1.8 Western blotting 法检测各组 hESCs 中 p16、p21、p53、p62、LC3-II 和 LC3-I 蛋白表达水平 将 hESCs 接种于 6 孔细胞培养板, 按照 1.4 中细胞分组处理 7 d 后, 收集各组细胞进行裂解获取蛋白。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离后, 转印至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 用快速封闭液封闭 15 min。随后分别加入以下一抗 (1:1 000 稀释): GAPDH、p16、p21、p53、p62、LC3-II 和 LC3-I, 于 4℃ 孵育过夜。加入含 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲盐水 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 洗膜 3 次, 按抗体来源加入鼠二抗或兔二抗 (1:2 000 稀释), 室温孵育 1~2 h。

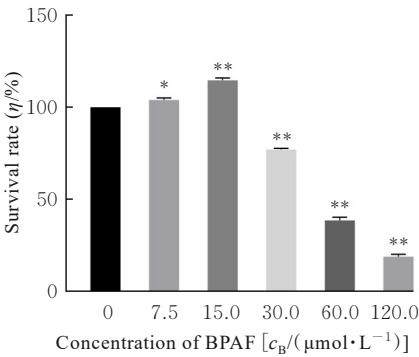
TBST 洗膜 3 次后使用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 法检测。使用 Image J 软件分析各目的蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。实验重复 3 次。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, GraphPad Prism 9.0 软件用于图表绘制。各组 hESCs 存活率、SA-β-gal 阳性细胞百分率和不同细胞周期 hESCs 百分率, 各组细胞中 p16、p21 和 p53 mRNA 和蛋白表达水平以及各组细胞中 p62 蛋白表达水平和 LC3-II /LC3-I 比值均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 BPAF 作用后各组 hESCs 存活率

与 0 μmol·L⁻¹ BPAF 比较, 7.5 和 15.0 μmol·L⁻¹ BPAF 组 hESCs 存活率明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 30.0、60.0 和 120.0 μmol·L⁻¹ BPAF 组 hESCs 存活率明显降低 ($P < 0.01$)。BPAF 以浓度依赖性的方式影响 hESCs 的存活率, 当 BPAF 浓度 ≤ 30 μmol·L⁻¹ 时, 细胞存活率可达 75%; 随着浓度升高, hESCs 存活率逐渐降低。见图 1。本研究选用浓度为 30 μmol·L⁻¹ BPAF 进行后续诱导细胞衰老实验。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 μmol·L⁻¹ BPAF.

图 1 不同浓度 BPAF 作用后 hESCs 存活率

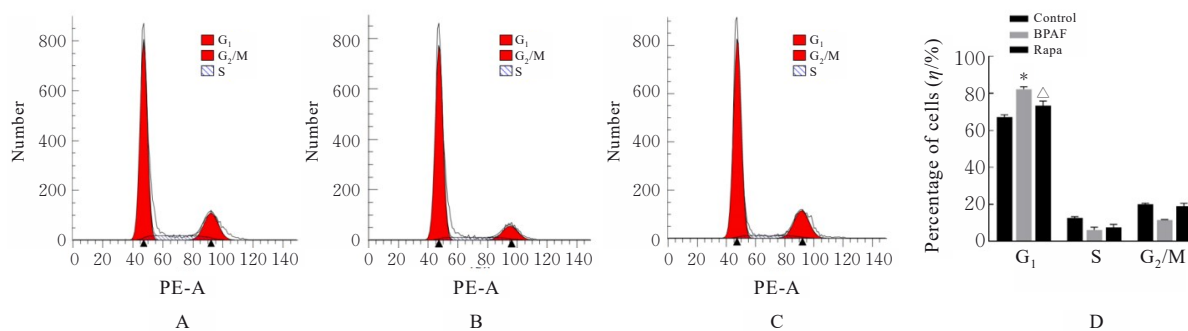
Fig. 1 Survival rates of hESCs after treated with different concentrations of BPAF

2.2 各组不同细胞周期 hESCs 百分率

流式细胞术结果显示: 与对照组比较, BPAF 组 G₁期 hESCs 百分率明显升高 ($P < 0.01$); 与 BPAF 组比较, Rapa 组 G₁期 hESCs 百分率明显降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 各组 SA- β -gal 阳性细胞百分率 SA- β -gal 染色结果显示:与对照组比较,BPAF 组 SA- β -gal 阳性细胞百分率明显升高 ($P<0.01$);与 BPAF 组

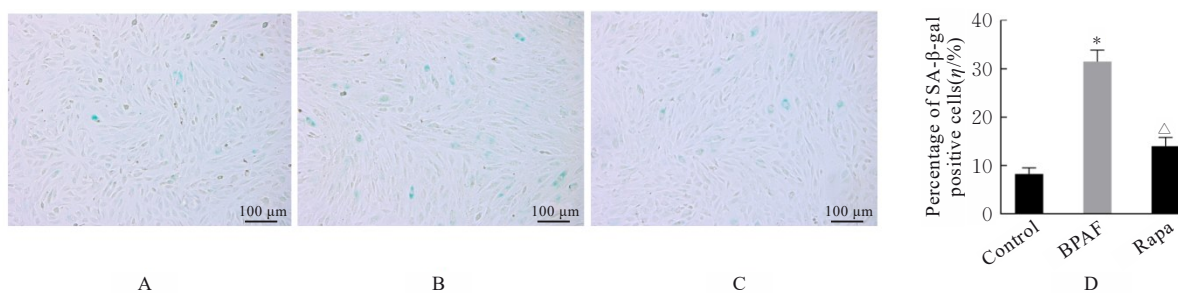
比较,Rapa 组 hESCs 中 SA- β -gal 阳性细胞百分率明显降低 ($P<0.01$)。见图3。



A: Control group; B: BPAF group; C: Rapa group. * $P<0.01$ compared with control group; $\Delta P<0.01$ compared with BPAF group.

图2 流式细胞术检测各组细胞周期分布(A~C)和不同细胞周期 hESCs 百分率(D)

Fig. 2 Cell cycle distribution(A-C) and percentages(D) of hESCs at different cell cycles in various groups detected by flow cytometry



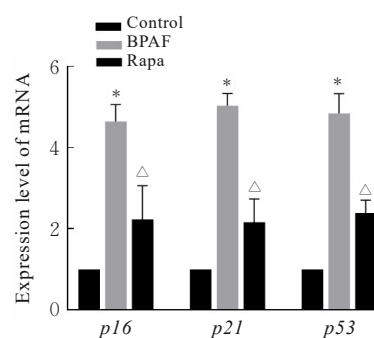
A: Control group; B: BPAF group; C: Rapa group. * $P<0.01$ compared with control group; $\Delta P<0.01$ compared with BPAF group.

图3 各组 SA- β -gal 染色阳性细胞分布(A~C)和阳性细胞百分率(D)

Fig. 3 Distribution (A-C) and percentages (D) of SA- β -gal positive cells in various groups

2.4 各组细胞中 $p16$ 、 $p21$ 和 $p53$ mRNA 和蛋白表达水平 RT-qPCR 法检测结果显示:与对照组比较,BPAF 组细胞中 $p16$ 、 $p21$ 和 $p53$ mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.01$);与 BPAF 组比较,Rapa 组细胞中 $p16$ 、 $p21$ 和 $p53$ mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。Western blotting 法检测结果显示:与对照组比较,BPAF 组细胞中 $p16$ 、 $p21$ 和 $p53$ 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$);与 BPAF 组比较,Rapa 组细胞中 $p16$ 、 $p21$ 和 $p53$ 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见图4和5。

2.5 各组细胞中 $p62$ 蛋白表达水平和 LC3- II / LC3- I 比值 Western blotting 法检测结果显示:与对照组比较,BPAF 组细胞中 $p62$ 蛋白表达水平和 LC3- II / LC3- I 比值无明显改变,差异无统计学意义 ($P>0.05$);与 BPAF 组比较,Rapa 组细胞

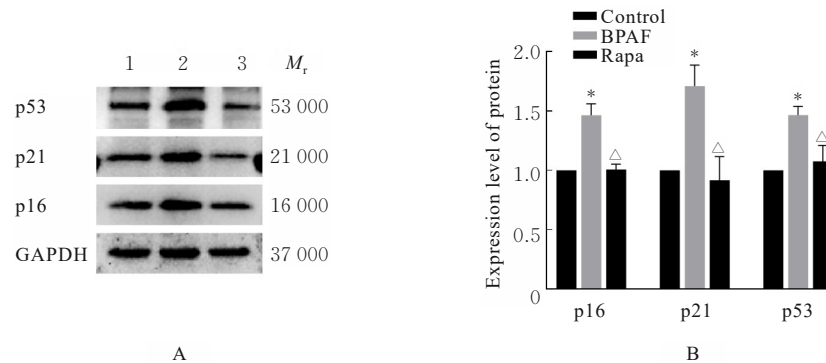


* $P<0.01$ compared with control group; $\Delta P<0.01$ compared with BPAF group.

图4 各组细胞中 $p16$ 、 $p21$ 和 $p53$ mRNA 表达水平

Fig. 4 Expression levels of $p16$, $p21$ and $p53$ mRNA in cells in various groups

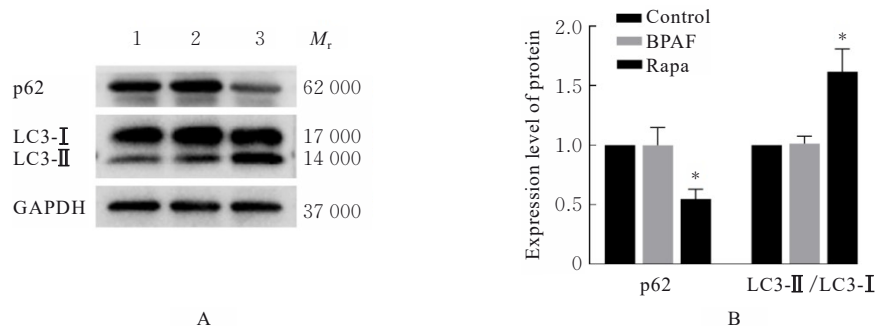
中 $p62$ 表达水平明显降低 ($P<0.01$), LC3- II / LC3- I 比值明显升高 ($P<0.01$)。见图6。



Lane 1: Control group; Lane 2: BPAF group; Lane 3: Rapa group. * $P < 0.01$ compared with control group; $\Delta P < 0.01$ compared with BPAF group.

图5 各组细胞中p16、p21和p53蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of p16, p21, and p53 proteins in cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: BPAF group; Lane 3: Rapa group. * $P < 0.01$ compared with BPAF group.

图6 各组细胞中p62、LC3-II和LC3-I蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of p62, LC3-II, and LC3-I proteins in cells in various groups

3 讨论

子宫内膜衰老与多种生殖功能障碍密切相关,包括不孕症、自然流产及辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)治疗失败等。衰老基质细胞可分泌和释放SASP,破坏局部微环境稳态,增加子宫内膜疾病的发病风险^[11]。近年来,与hESCs衰老相关的子宫内膜疾病发病率显著上升,子宫内膜异位症20年间发病率增长35%,不孕风险增高2~4倍^[12];薄型子宫内膜在40岁以上女性中患病率高达25%^[13]。这些疾病不仅危害女性生殖健康,也带来沉重的社会经济负担,亟待针对hESCs衰老机制开发干预策略。

细胞衰老是一种不可逆的细胞周期停滞状态,通常在G₁期或G₂期停滞,伴随增殖能力明显下降^[14]。SA-β-gal作为检测细胞衰老的经典标志物,是溶酶体中的一种水解酶,其活性在衰老细胞中升高。

p16/视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)和p53/p21/pRb是经典的衰老信号通路^[14]。衰老细胞中,p16和p53表达水平均明显升高,p53表达水平升高可激活p21,而p16和p21作为周期蛋白依赖性激酶抑制剂,通过维持pRb的低磷酸化状态^[15],促使pRb持续抑制转录因子E2F的活性,最终阻断细胞周期进程,抑制细胞增殖^[16]。

BPAF是双酚A(bisphenol A, BPA)的含氟衍生物,作为工业与塑料中BPA的替代物使用^[17]。近年来,BPAF在土壤、食品、灰尘和河流等多种环境介质及人类生物样本(母乳、尿液、血液和汗液中)广泛检出^[18-19]。研究^[20-22]显示:BPAF可通过干扰下丘脑-垂体-性腺轴的功能,影响生殖发育、激素平衡和生育能力,而这可能与影响卵泡生成和发育、子宫内膜容受性的建立及干扰胚胎着床过程有关。为探讨BPAF的生殖毒性和Rapa的干预作用,本研究采用BPAF处理hESCs,成功诱导基质

细胞衰老模型。本研究结果显示: BPAF处理后, hESCs的细胞周期停滞于G₁期, SA- β -gal阳性细胞百分率明显升高, 衰老相关的p16、p21和p53蛋白表达水平及mRNA表达水平均明显升高, 证明BPAF可明显抑制hESCs增殖, 并诱导其早衰。上述结果证实, BPAF通过激活p53/p21/pRb和p16/pRb信号通路损害hESCs细胞功能, 为EDCs诱导的子宫内膜疾病(如不孕症和内膜异位症)提供了新的治疗方向^[23]。

Rapa是一种应用广泛的抗衰老药物, 通过激活自噬途径发挥生物学效应。研究^[24]表明: Rapa不仅可增强老年骨髓间充质干细胞的成骨分化和增殖能力, 还可抑制其成脂分化, 从而恢复细胞生物学特性。研究^[25-26]显示: 卫星细胞的衰老进程与自噬有密切关联, 氧化应激增加和线粒体功能障碍均会加速细胞衰老, 抑制细胞增殖和代谢, 而重建自噬通路可有效逆转衰老并恢复老年卫星细胞的再生功能。本研究结果显示: Rapa可在一定程度上缓解BPAF引起的细胞周期阻滞, 促进细胞周期进程, 降低SA- β -gal阳性细胞百分率, 下调p16、p21和p53蛋白及mRNA表达, 表明Rapa可减轻BPAF诱导的hESCs衰老, 为其临床应用于改善子宫内膜细胞衰老提供了实验依据。

自噬是细胞通过溶酶体降解并回收受损组分的关键机制, 其功能随细胞衰老逐渐衰退, 而自噬缺陷又进一步加速细胞衰老进程, 形成复杂的反馈循环^[27]。自噬过程中, p62与LC3在自噬体的形成和降解中起关键作用, 自噬水平越高, p62降解程度越高^[28]。LC3存在LC3-I和LC3-II这2种形式, 其中LC3-I存在于细胞质中, 而LC3-II存在于自噬体膜中^[29]。当自噬激活时, LC3-I向LC3-II转化, 因此LC3-II通常被视为哺乳动物自噬体标志物^[29]。本研究结果显示: Rapa组细胞中LC3-II/LC3-I比值明显升高, p62蛋白表达水平明显降低, 说明Rapa处理后细胞自噬通路受到激活。上述结果提示: Rapa可能通过增强自噬活性和促进衰老相关有害物质的清除, 从而发挥其抗衰老作用, 改善子宫内膜环境。

综上所述, BPAF可抑制hESCs增殖, 诱导其衰老, 而Rapa可通过激活自噬发挥抗衰老作用, 有效改善子宫内膜环境, 上述结果为未来开发抗子宫内膜衰老药物提供了理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

邓玲参与实验操作、数据采集、数据分析和论文撰写, 李首庆参与实验指导, 钮春雪参与论文审阅和修改, 林秀英参与实验指导, 米旭光和付建华参与研究设计。

[参考文献]

- [1] GRIUKOVA A, DERYABIN P, SHATROVA A, et al. Molecular basis of senescence transmitting in the population of human endometrial stromal cells [J]. Aging, 2019, 11(21): 9912-9931.
- [2] MARUYAMA T, YOSHIMURA Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium[J]. Endocr J, 2008, 55(5): 795-810.
- [3] DERYABIN P I, BORODKINA A V. Stromal cell senescence contributes to impaired endometrial decidualization and defective interaction with trophoblast cells[J]. Hum Reprod, 2022, 37(7): 1505-1524.
- [4] GORE A C, CHAPPELL V A, FENTON S E, et al. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals[J]. Endocr Rev, 2015, 36(6): E1-E150.
- [5] WEN X, XIONG Y, GENG T, et al. BPA modulates the WDR5/TET2 complex to regulate ER β expression in eutopic endometrium and drives the development of endometriosis[J]. Environ Pollut, 2021, 268(Pt B): 115748.
- [6] OLSON M R, SU R W, FLAWS J A, et al. Bisphenol A impairs decidualization of human uterine stromal fibroblasts[J]. Reprod Toxicol, 2017, 73: 339-344.
- [7] HUANG M Q, LIU S, FU L, et al. Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells[J]. Chemosphere, 2020, 253: 126707.
- [8] WANG B S, HAN J, ELISSEEFF J H, et al. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024, 25(12): 958-978.
- [9] SELVARANI R, MOHAMMED S, RICHARDSON A. Effect of rapamycin on aging and age-related diseases-past and future[J]. Geroscience, 2021, 43(3): 1135-1158.
- [10] LI M Y, SHEN H H, CAO X Y, et al. Targeting a mTOR/autophagy axis: a double-edged sword of rapamycin in spontaneous miscarriage [J]. Biomed

- Pharmacother, 2024, 177: 116976.
- [11] SHATROVA A, BUROVA E, PUGOVKINA N, et al. Monovalent ions and stress-induced senescence in human mesenchymal endometrial stem/stromal cells[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 11194.
- [12] LEONE ROBERTI MAGGIORE U, CHIAPPA V, CECCARONI M, et al. Epidemiology of infertility in women with endometriosis [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2024, 92: 102454.
- [13] WANG Y D, TANG Z H, TENG X X. New advances in the treatment of thin endometrium [J]. Front Endocrinol, 2024, 15: 1269382.
- [14] WENG Z J, WANG Y G, OUCHI T, et al. Mesenchymal stem/stromal cell senescence: hallmarks, mechanisms, and combating strategies [J]. Stem Cells Transl Med, 2022, 11(4): 356-371.
- [15] STEIN G H, DRULLINGER L F, SOULARD A, et al. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(3): 2109-2117.
- [16] BUROVA E, BORODKINA A, SHATROVA A, et al. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 474931.
- [17] WU X R, LI S Q, NI Y Y, et al. Maternal BPAF exposure impaired synaptic development and caused behavior abnormality in offspring[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 256: 114859.
- [18] CHEN D, KANNAN K, TAN H L, et al. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity-a review [J]. Environ Sci Technol, 2016, 50(11): 5438-5453.
- [19] ZHANG Y Y, LI T J, PAN C Y, et al. Intergenerational toxic effects of parental exposure to bisphenol AF on offspring and epigenetic modulations in zebrafish[J]. Sci Total Environ, 2022, 823: 153714.
- [20] LIU X X, WANG Z X, LIU F J. Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice [J]. Chemosphere, 2021, 262: 127880.
- [21] FAN H J, JIANG L H, LEE Y L, et al. Bisphenol compounds regulate decidualized stromal cells in modulating trophoblastic spheroid outgrowth and invasion *in vitro* [J]. Biol Reprod, 2020, 102(3): 693-704.
- [22] SIRACUSA J S, YIN L, MEASEL E, et al. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: a mini review [J]. Reprod Toxicol, 2018, 79: 96-123.
- [23] FERREIRA R, AMARAL C, CORREIA-DA-SILVA G, et al. Bisphenols A, F, S and AF trigger apoptosis and/or endoplasmic reticulum stress in human endometrial stromal cells [J]. Toxicology, 2022, 478: 153282.
- [24] MA Y, QI M, AN Y, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging [J]. Aging Cell, 2018, 17(1): e12709.
- [25] GARCÍA-PRAT L, MARTÍNEZ-VICENTE M, PERDIGUERO E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence [J]. Nature, 2016, 529(7584): 37-42.
- [26] KANG C, ELLEDGE S J. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence [J]. Autophagy, 2016, 12(5): 898-899.
- [27] QI Z Y, YANG W Q, XUE B B, et al. ROS-mediated lysosomal membrane permeabilization and autophagy inhibition regulate bleomycin-induced cellular senescence [J]. Autophagy, 2024, 20(9): 2000-2016.
- [28] LYU W P, LI Q H, WANG Y M, et al. Computational design of binder as the LC3-p62 protein-protein interaction [J]. Bioorg Chem, 2021, 115: 105241.
- [29] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720-5728.