

CaMKK β /AMPK/HIF-1 α 信号通路通过调控线粒体自噬诱导子宫内位症血管生成

陈元欢¹, 岳斌¹, 武权生¹, 毛海燕², 吉秀家³, 褚翠君¹, 陈琳¹, 张雨知¹, 李冰霞¹, 张小花¹, 冯鹏⁴

甘肃中医药大学¹中医临床学院,³护理学院, 甘肃兰州 730030;²甘肃省人民医院中医二科, 甘肃兰州 730030;⁴河西学院医学院, 甘肃张掖 734000

摘要:目的 探讨CaMKK β /AMPK/HIF-1 α 信号通路是否通过调控线粒体自噬参与子宫内位症(EMs)血管生成的分子机制。方法 分别培养EMs患者的在位内膜间质细胞(hEM15A)与非EMs女性的正常内膜间质细胞(HESCs)。通过CCK-8法、划痕实验及体外血管生成实验分别检测细胞的增殖、侵袭/迁移及成管能力。采用Western blotting和qPCR技术检测CaMKK β 、AMPK、HIF-1 α 、BNIP3、LC3、VEGF及CD31的蛋白与mRNA表达水平。使用MitoTracker Green、MitoSOX Red荧光探针及免疫荧光染色观察线粒体形态、mtROS水平及BNIP3/LC3共定位情况。通过使用CaMKK β 激动剂和抑制剂进行干预,以验证该通路的功能。结果 与HESCs相比,hEM15A细胞表现出更强的增殖、侵袭、迁移及血管生成能力($P<0.01$),且CaMKK β 、AMPK、HIF-1 α 、BNIP3、LC3及VEGF、CD31表达上调($P<0.01$)。线粒体形态观察显示EMs细胞线粒体数量增多、结构完整,但BNIP3与LC3的定位信号增强,同时mtROS水平升高($P<0.01$)。机制上,抑制CaMKK β 可降低AMPK、BNIP3、LC3、HIF-1 α 、VEGF、CD31的表达($P<0.01$);反之,激动CaMKK β 则能逆转上述效应,促进线粒体自噬并诱导血管生成($P<0.01$)。结论 在EMs的发生过程中,CaMKK β /AMPK的活化被异常激活,导致HIF-1 α 过度积累,进而升高其下游靶基因BNIP3的表达,继而促进线粒体自噬的发生,从而诱导异常血管生成,抑制CaMKK β 的表达则可抑制EMs的疾病进程。

关键词:子宫内位症;血管生成;线粒体自噬;CaMKK β /AMPK/HIF-1 α 信号通路

Activation of the CaMKK β /AMPK/HIF-1 α signaling pathway promotes angiogenesis in endometriosis by regulating mitophagy

CHEN Yuanhuan¹, YUE Bin¹, WU Quansheng¹, MAO Haiyan², JI Xiujia³, CHU Cuijun¹, CHEN Lin¹, ZHANG Yuzhi¹, LI Bingxia¹, ZHANG Xiaohua¹, FENG Peng⁴

¹Clinical School of Chinese Medicine, ³College of Nursing, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China;

²Second Department of Traditional Chinese Medicine, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730030, China; ⁴Medical College, Hexi University, Zhangye 734000, China

Abstract: Objective To investigate whether the CaMKK β /AMPK/HIF-1 α signaling pathway participates in angiogenesis in endometriosis by regulating mitophagy. **Methods** Human endometrial stromal cells (hEM15A) isolated from endometriosis patients and normal endometrial stromal cells (HESCs) from non-endometriosis women were tested for proliferation, invasion, migration and tube formation abilities using CCK-8 assay, scratch assay and in vitro angiogenesis test. The protein and mRNA expression levels of CaMKK β , AMPK, HIF-1 α , BNIP3, LC3, VEGF and CD31 in the cells were detected by Western blotting and qPCR. MitoTracker Green, MitoSOX Red fluorescent probes and immunofluorescence staining were used to observe mitochondrial morphology, mtROS level and BNIP3/LC3 co-localization. CaMKK β agonists and inhibitors were used to verify the function of the CaMKK β /AMPK/HIF-1 α pathway. **Results** Compared with HESCs, hEM15A cells showed stronger proliferation, invasion, migration and angiogenesis abilities with significantly up-regulated expressions of CaMKK β , AMPK, HIF-1 α , BNIP3, LC3, VEGF and CD31. hEM15A cells showed increased number of mitochondria with intact structure, but the localization signals of BNIP3 and LC3 and mtROS level increased significantly. Mechanistically, inhibition of CaMKK β significantly reduced expressions of AMPK, BNIP3, LC3, HIF-1 α , VEGF and CD31, while activation of CaMKK β increased expressions these proteins, down-regulated mitochondrial autophagy and inhibited angiogenesis. **Conclusion** CaMKK β /AMPK is abnormally activated in endometriosis to result in excessive accumulation of HIF-1 α , which in turn increases the expression of its downstream target gene BNIP3, thus promoting mitophagy to trigger abnormal angiogenesis, which can be inhibited by inhibiting abnormal activation of CaMKK β .

Keywords: endometriosis; angiogenesis; mitochondrial autophagy; CaMKK β /AMPK/HIF-1 α signaling pathway

收稿日期:2025-12-16

基金项目:国家自然科学基金(82260949,82560954);“岐黄英才”导师专项基金(ZYXKBD-202405);甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2023KCZD-10);甘肃省研究生“创新之星”项目(2025CXZX-912);甘肃省中医药科研课题(GZKG-2020-49);兰州市科技发展指导计划项目(2023-ZD-237)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82260949, 82560954).

作者简介:陈元欢,在读博士研究生,E-mail: 2334347343@qq.com

通信作者:武权生,教授,博士生导师,E-mail: wqslanzhou@126.com

子宫内位症(EMs)是一类雌激素依赖的慢性炎症性疾病,该病在育龄期女性中发病率为6%~10%^[1,2],其中20%~50%合并不孕,严重影响患者的生理和心理健康及生活质量^[3-5]。目前,EMs的确切病因与发病机制尚未完全阐明,导致其临床诊断常明显滞后,且缺乏根治性治疗手段。现有疗法主要包括药物干预与手术切除,前者以激素抑制为主,虽可暂时缓解症状,但易引起类绝经期不良反应且停药后复发率高;后者虽

可清除可见病灶,但易导致组织粘连与卵巢功能损伤,且术后复发率较高^[6]。由于该病因复杂、病因不明,导致其诊断滞后且现有治疗策略难以从根本上阻断疾病进展。因此,系统深入地探索EMs的发病机制,寻找可有效抑制异位病灶形成与发展、改善临床症状的新型治疗靶点,已成为当前基础与临床研究中亟待解决的关键问题。

近年来,随着对EMs发病机制的不断探索,研究重点逐渐向细胞代谢、炎症微环境及细胞器功能调控等分子层面展开。线粒体是调控细胞能量代谢与存亡的核心细胞器,其功能异常与多种女性生殖系统疾病密切相关^[7]。研究表明,当线粒体自噬功能受损时,会间接导致线粒体介导的细胞凋亡途径被抑制,这种凋亡机制的减弱,将显著削弱机体对异位子宫内膜组织的清除能力,从而促进其在子宫腔外的黏附与种植^[8]。在EMs的发生过程中存在线粒体自噬的表达异常^[9],但关于其上游调控信号网络,尤其是在EMs微环境中的具体激活机制,目前尚未系统阐明。值得注意的是,钙/钙调素依赖性激酶 β (CaMKK β)是钙信号通路的关键上游激酶,可通过激活AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)应对细胞的能量危机^[10];而在低氧等应激条件下,AMPK还可进一步磷酸化低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),增强其转录活性,从而通过调控线粒体自噬,保障细胞在应激环境中的生存能力^[11,12]。然而,该信号轴在EMs的缺氧微环境中是否被激活,以及它是否及如何通过调控线粒体自噬来影响异位内膜细胞的存活、侵袭及血管生成,目前尚属未知。

因此,本研究以EMs患者与非EMs女性的在位内膜间质细胞作为研究对象,旨在揭示EMs血管生成的发生机制及CaMKK β /AMPK/HIF-1 α 信号通路调控线粒体自噬的分子机制,为EMs的发生机制与治疗靶点研究提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验试剂与设备

人子宫内膜基质细胞(HESCs)、子宫内膜异位症内膜间质细胞系(hEM15A)[青旗(上海)生物科技发展有限公司];HUVECs(STM-CL-5186,思泰默(上海)生物科技有限公司),STO-609(CaMKK β 抑制剂)、MCB-22-174(CaMKK β 激活剂),CCK8(K101811133EF5E, APEXBIO),鼠单抗 β -actin(zenbio),兔单抗AMPK(immunoway),兔多抗CaMKK β 、兔多抗HIF-1 α (武汉三鹰),兔单抗血管内皮生长因子(VEGF)、鼠单抗CD31、兔单抗Bcl-2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(BNIP3)、兔单抗自噬受体与微管相关蛋白轻链3B(LC3B)(huabio),Goat Anti Mouse IgG(H+L)(HRP)(Immunoway),HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(Proteintech),Alexa Fluor 488(Servicebio),RNA提取剂(思科捷生物),Mito Tracker Green绿色荧

光探针、Mito-Tracker Red CMXRos(碧云天),SP试剂盒(2119B0708,迈新生物)。

酶标仪(Thermo),CO₂培养箱(美国精麒),Western blotting转膜仪、Western blotting电泳仪、Western blotting电源(北京六一生物科技公司),化学发光成像仪(北京赛智科技有限公司),超微量分光光度计(上海嘉鹏科技有限公司),实时定量PCR仪(西安天隆)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与分组

1.2.1.1 细胞培养 细胞复苏后实验PBS清洗,胰酶消化1~3 min,镜下见细胞变圆脱落时,加完全培养基终止,吹打制成单细胞悬液,离心弃上清,新鲜培养基重悬后按1:2比例分瓶,继续培养。

1.2.1.2 实验分组 使用人子宫内膜基质细胞HESCs及人子宫异位子宫内膜间质细胞永生细胞系hEM15A,分为在位内膜间质细胞组(HESCs组)、EMs在位内膜间质细胞组(hEM15A组)、EMs在位内膜间质细胞组+CaMKK β 激动剂组(hEM15A+激动剂组)以及EMs在位内膜间质细胞组+CaMKK β 抑制剂组(hEM15A+抑制剂组)。

1.2.2 体外小管形成实验 收集各组细胞的上清液添加到HUVECs中。将预冷的基质胶铺于24孔板,37℃孵育30~60 min使其聚合凝固,随后,消化并重悬HUVECs细胞,调整浓度至 1.5×10^5 /mL。在凝固的基质胶上轻柔加入500 μ L/孔细胞悬液(约 1×10^5 个细胞),轻轻晃动使其均匀分布后,置于37℃培养箱培养。细胞接种4 h后,于倒置显微镜下观察并拍照记录。

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖能力 收集对数期细胞并调整浓度,按1000~10 000/孔密度接种于96孔板(边缘孔用PBS填充)。37℃培养至细胞贴壁后,加入含特定浓度药物的培养基,设6复孔,继续培养相应时间。加入20 μ L/孔CCK-8溶液,孵育2 h后,用酶标仪检测各孔吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。

1.2.4 细胞划痕实验观察细胞迁移能力 于6孔板背面画横线,接种细胞约 5×10^5 /孔,过夜培养至铺满。次日用枪头垂直板背划线制造划痕,PBS清洗3次后更换为含1%血清的培养基。置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,分别于0、24 h取样拍照,使用Image J分析划痕宽度。

1.2.5 Mito Tracker Green染色观察线粒体形态 取处于对数生长期、生长状态良好的细胞,使用PBS洗涤3次后,向细胞加入1 mL/孔经37℃预热的Mito-Tracker Green染色工作液,将培养板置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中,进行避光孵育15~45 min,孵育结束后,小心吸弃染色工作液,并加入37℃预温的新鲜完全培养基进行换液,于荧光显微镜下进行观察并拍照。

1.2.6 使用特异性新型荧光探针MitoSOX Red检测细胞线粒体活性氧(mtROS)水平 取生长良好的细胞,经

预温PBS轻柔洗涤3次后,加入1 mL染色工作液,37 ℃避光孵育10~60 min。孵育结束后,吸弃染液,再用PBS洗涤2次以去除未结合染料。最后加入2 mL PBS覆盖细胞,于荧光显微镜下观察并采集图像以检测细胞mtROS表达水平。

1.2.7 Western blotting法检测信号通路及血管生成关键蛋白的表达 收集细胞,预冷PBS清洗后加入RIPA裂解液冰上裂解30 min。4 ℃ 12 000 r/min离心15 min取上清,BCA法定量。蛋白样品与上样缓冲液混合,98 ℃煮沸5 min变性。进行SDS-PAGE电泳,恒流0.2 A转膜2 h。5%脱脂牛奶封闭1.5 h后,一抗β-actin(1:10 000)、AMPK(1:2000)、CaMKKβ(1:2000)、HIF-1α(1:10 000)、VEGF(1:2000)、CD31(1:5000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜,二抗Goat Anti Mouse IgG(H+L)(HRP)(1:20 000)、HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(1:10 000)室温孵育1 h,ECL显影。

1.2.8 免疫荧光检测线粒体自噬相关蛋白BNIP3、LC3定位情况 固定细胞经PBS洗涤后,用3% H₂O₂室温处理10 min以灭活内源酶。PBS清洗后,37 ℃山羊

血清封闭35 min。滴加一抗BNIP3(1:50 000)、LC3(1:1000),4 ℃湿盒过夜。次日37 ℃复温,PBS清洗后滴加二抗HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(1:10 000)37 ℃孵育1 h。DAPI染核10 min,PBS冲洗后抗荧光淬灭剂封片,避光保存并于荧光显微镜下观察。

1.2.9 qPCR检测信号通路及线粒体自噬关键分子mRNA表达 首先采用SparkZol试剂提取总RNA,经氯仿-异丙醇纯化后,使用超微量分光光度计检测RNA纯度($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值需在1.8~2.1)。随后使用gDNA Erase去除基因组DNA,并以PrimeScript RT试剂盒进行cDNA合成。实时荧光定量PCR反应体系包含SYBR Premix Ex Taq II、特异性引物和cDNA模板,在实时荧光定量PCR仪上按以下程序运行:95 ℃预变性2 min;95 ℃30 s、60 ℃60 s,共40个循环。引物由上海生工生物工程技术有限公司设计合成(表1)。实验采用2^{-ΔΔC_t}法计算基因相对表达量,所有样本均设置3个复孔,并以内参基因进行标准化。

表1 qPCR引物序列

Tab.1 qPCR primer sequences

Gene name	Forward	Reverse	bp
<i>β-actin</i>	TTTCATTCATGCGGCCAAA	TTCGCACCACTTTCTTTCCG	97
<i>CaMKKβ</i>	GTGGCTCCGCTGCCG	CTCACAGGGCTTCTGGCTTT	164
<i>AMPK</i>	TCCTGGAGAAAGATGGCGAC	CAGCGTGTACCCAGAATGT	84
<i>HIF-1α</i>	AGAGGTTGAGGGACGGAGAT	CTCCGACATTGGGAGCTCAT	71
<i>BNIP3</i>	CATGAGGAACACGAGCGTCA	GAGGTTGTCAGACGCCTTCC	138
<i>LC3B</i>	GCCGCCTTTTGGGTAGAAG	GCGTTTGTGCCAACTGTGAT	123

1.3 统计学分析

采用统计软件SPSS 21.0进行数据统计分析,计量资料以均数±标准差表示,组间两两比较采用单因素方差分析,不同组别对比采用重复测量数据的方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖、迁移能力比较

CCK-8法检测细胞增殖能力结果发现,EMs患者的在位内膜间质细胞与HESCs细胞相比,细胞增殖及侵袭、迁移能力增强;而hEM15A细胞分别予以CaMKKβ抑制剂组及其激动剂处理后发现,与hEM15A组细胞相比,予以抑制剂干预的hEM15A细胞增殖及侵袭、迁移能力呈下降趋势,反之,予以激动剂干预的hEM15A细胞增殖及侵袭、迁移能力则呈升高趋势($P<0.01$,图1、2)。

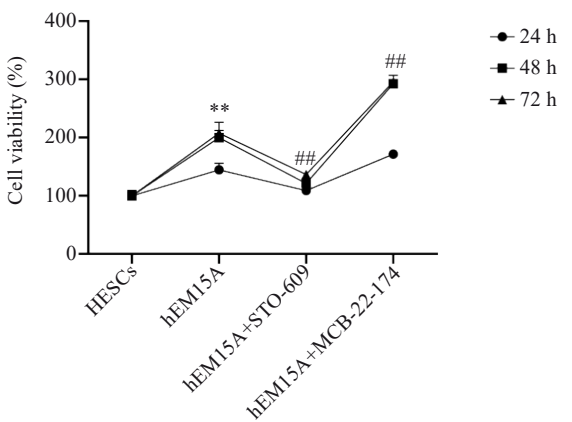


图1 各组细胞增殖能力表达情况

Fig.1 Assessment of cell proliferation ability of normal endometrial stromal cells (HESCs) and human endometrial stromal cells (hEM15A) from endometriosis patients with different treatments ($n=6$). ** $P<0.01$ vs HESCs group, ## $P<0.01$ vs hEM15A group.

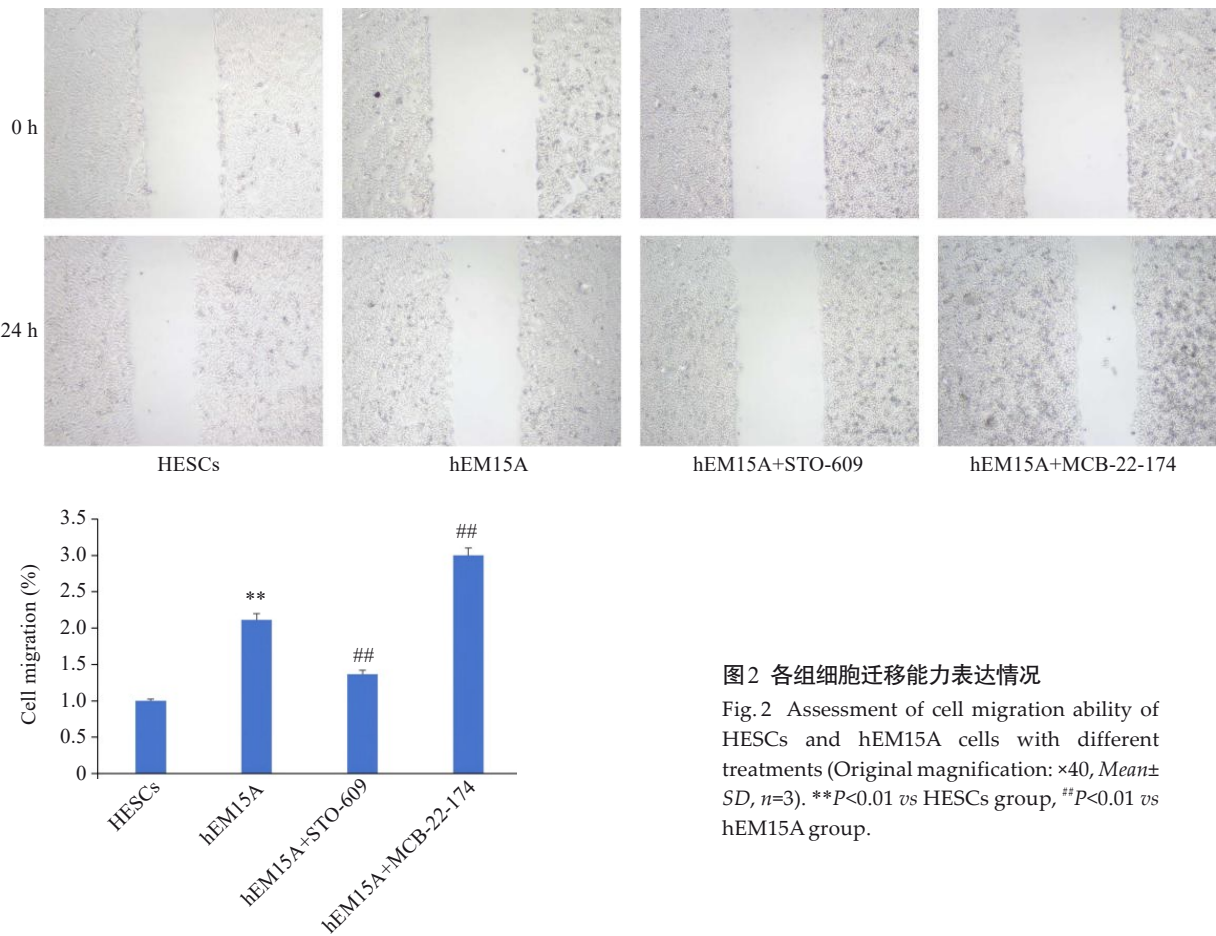


图2 各组细胞迁移能力表达情况

Fig.2 Assessment of cell migration ability of HESCs and hEM15A cells with different treatments (Original magnification: $\times 40$, $Mean \pm SD$, $n=3$). ** $P<0.01$ vs HESCs group, ## $P<0.01$ vs hEM15A group.

2.2 各组细胞血管生成能力表达

将HESCs细胞与hEM15A细胞分别经血管内皮细胞诱导后,观察其血管形成能力,结果发现,EMs患者的在位内膜间质细胞与HESCs细胞相比,血管形成能力更强($P<0.01$)。hEM15A细胞分别予以CaMKK β 抑

制剂组及其激动剂处理后再经HUVECs诱导,结果显示,与hEM15A细胞相比,加用抑制剂的hEM15A细胞血管生成能力降低($P<0.01$),而予以激动剂干预的hEM15A细胞的血管生成能力则明显升高($P<0.05$,图3)。

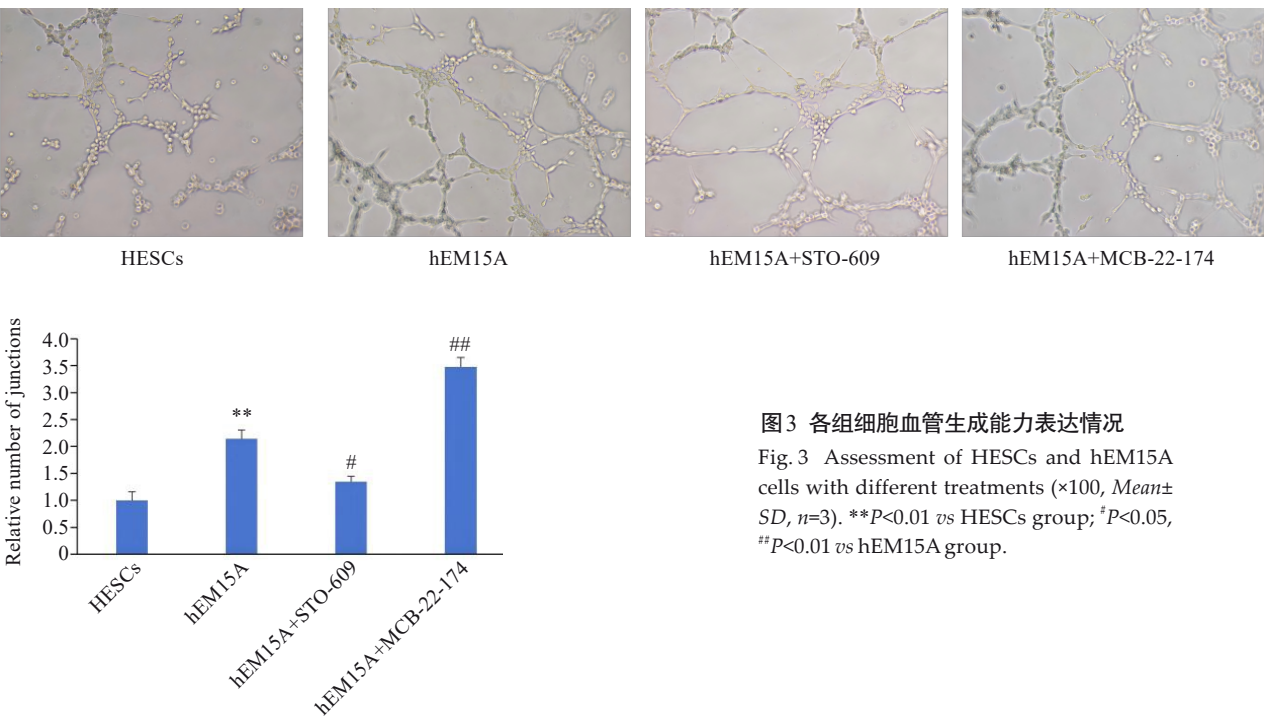


图3 各组细胞血管生成能力表达情况

Fig.3 Assessment of HESCs and hEM15A cells with different treatments ($\times 100$, $Mean \pm SD$, $n=3$). ** $P<0.01$ vs HESCs group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs hEM15A group.

2.3 各组细胞线粒体自噬情况

Mito Tracker Green 染色观察各组细胞线粒体形态显示, HESCs 组线粒体荧光信号较弱且分布分散; hEM15A 组荧光强度显著增强、线粒体聚集程度升高; hEM15A+抑制剂组荧光较 hEM15A 组减弱、聚集状态缓解; hEM15A+激动剂组荧光最强、线粒体呈高度密集簇状分布。定量分析显示, 与 HESCs 组相比, hEM15A 组细胞相对线粒体数量呈高表达 ($P<0.01$); 与 hEM15A 细胞相比, 予以激动剂干预的 hEM15A 细胞相对线粒体数量进一步升高 ($P<0.01$), 反之, 予以抑制剂干预的 hEM15A

细胞相对线粒体数量则呈下降趋势 ($P<0.01$, 图4)。

新型荧光探针 MitoSOX Red 检测细胞中 mtROS 水平显示, HESCs 组细胞红色荧光信号较弱且分布分散; hEM15A 组细胞信号显著增强, 颗粒密集且集中; hEM15A+抑制剂组细胞信号较 hEM15A 组减弱, 颗粒密度降低; hEM15A+激动剂组细胞信号最强, 颗粒最为密集集中。与 HESCs 细胞相比, hEM15A 组细胞中 mtROS 高表达 ($P<0.01$), 该效应可被 CaMKK β 抑制剂逆转、被 CaMKK β 激动剂进一步增强, 且差异具有统计学意义 ($P<0.01$, 图5)。

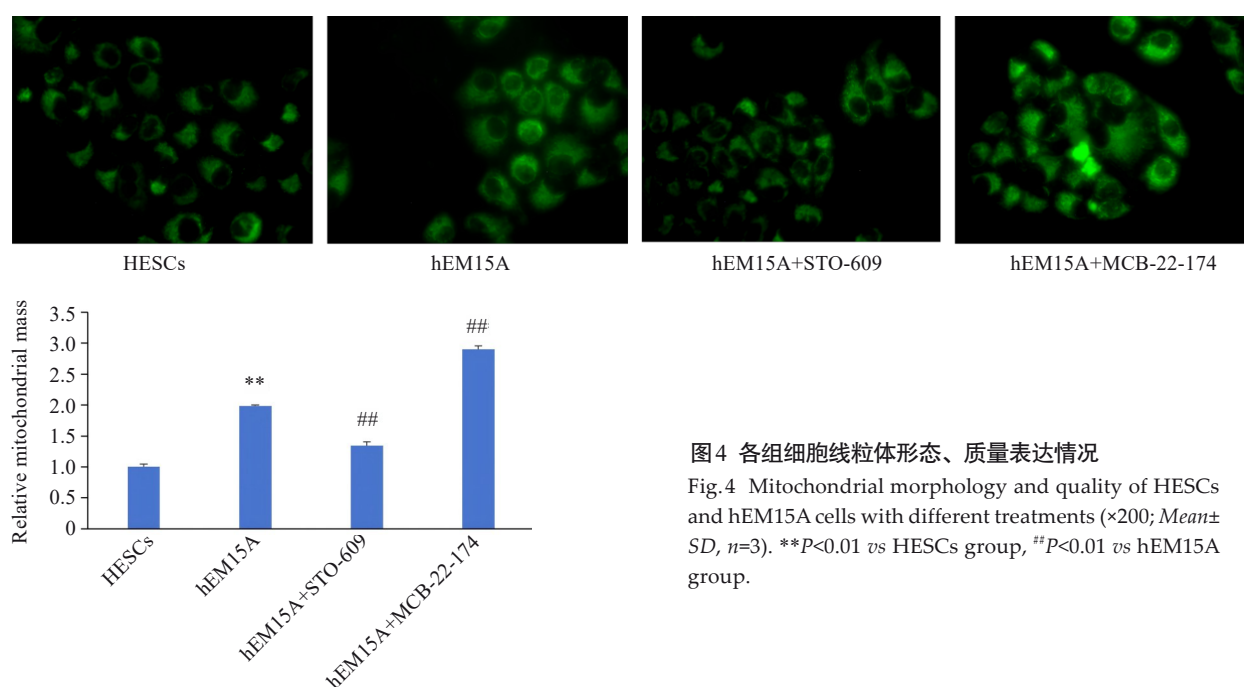


图4 各组细胞线粒体形态、质量表达情况

Fig.4 Mitochondrial morphology and quality of HESCs and hEM15A cells with different treatments ($\times 200$; $Mean \pm SD$, $n=3$). ** $P<0.01$ vs HESCs group, ## $P<0.01$ vs hEM15A group.

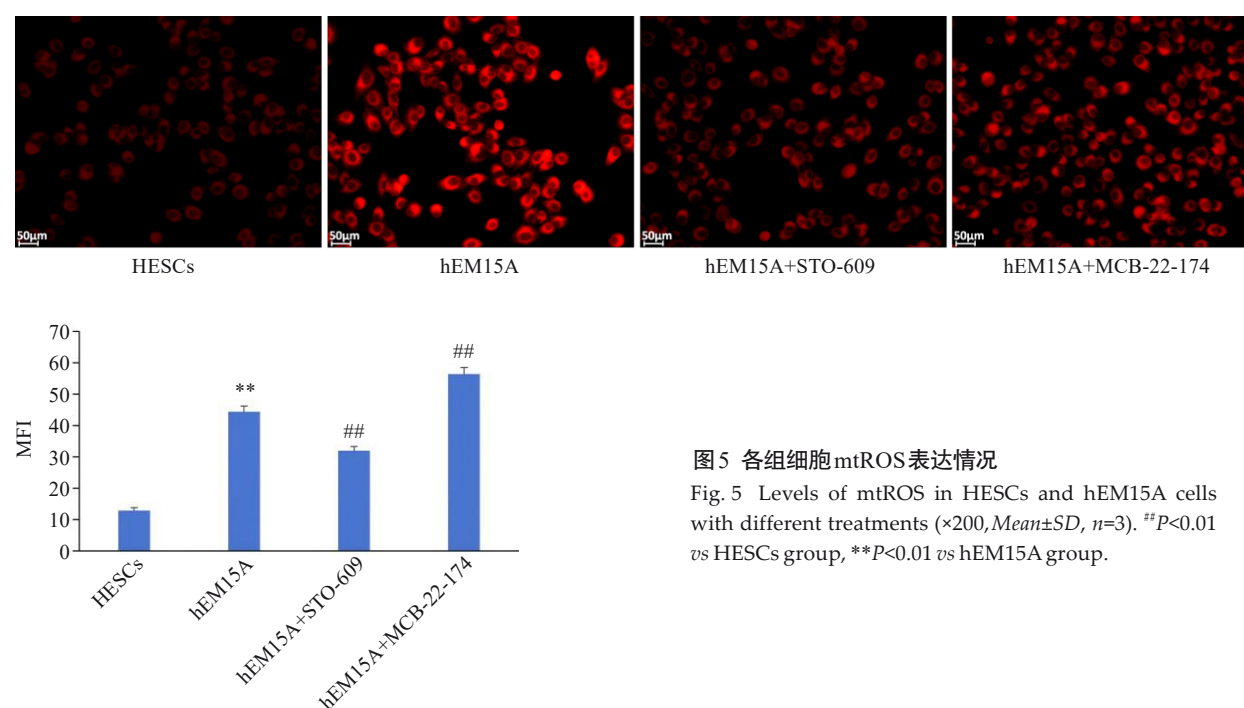


图5 各组细胞mtROS表达情况

Fig.5 Levels of mtROS in HESCs and hEM15A cells with different treatments ($\times 200$; $Mean \pm SD$, $n=3$). ## $P<0.01$ vs HESCs group, ** $P<0.01$ vs hEM15A group.

2.4 各组细胞中线粒体自噬标志蛋白 BNIP3、LC3 定位情况

免疫荧光试验显示,与HESCs细胞相比,hEM15A组细胞中BNIP3和LC3的定位显著增加($P<0.01$),在EMs的发生过程中线粒体自噬被异常激活。使用

CaMKK β 抑制剂干预后,hEM15A细胞中BNIP3和LC3的定位情况减少($P<0.01$),使用CaMKK β 激动剂后,hEM15A细胞中BNIP3和LC3的共定位情况增加($P<0.01$,图6)。

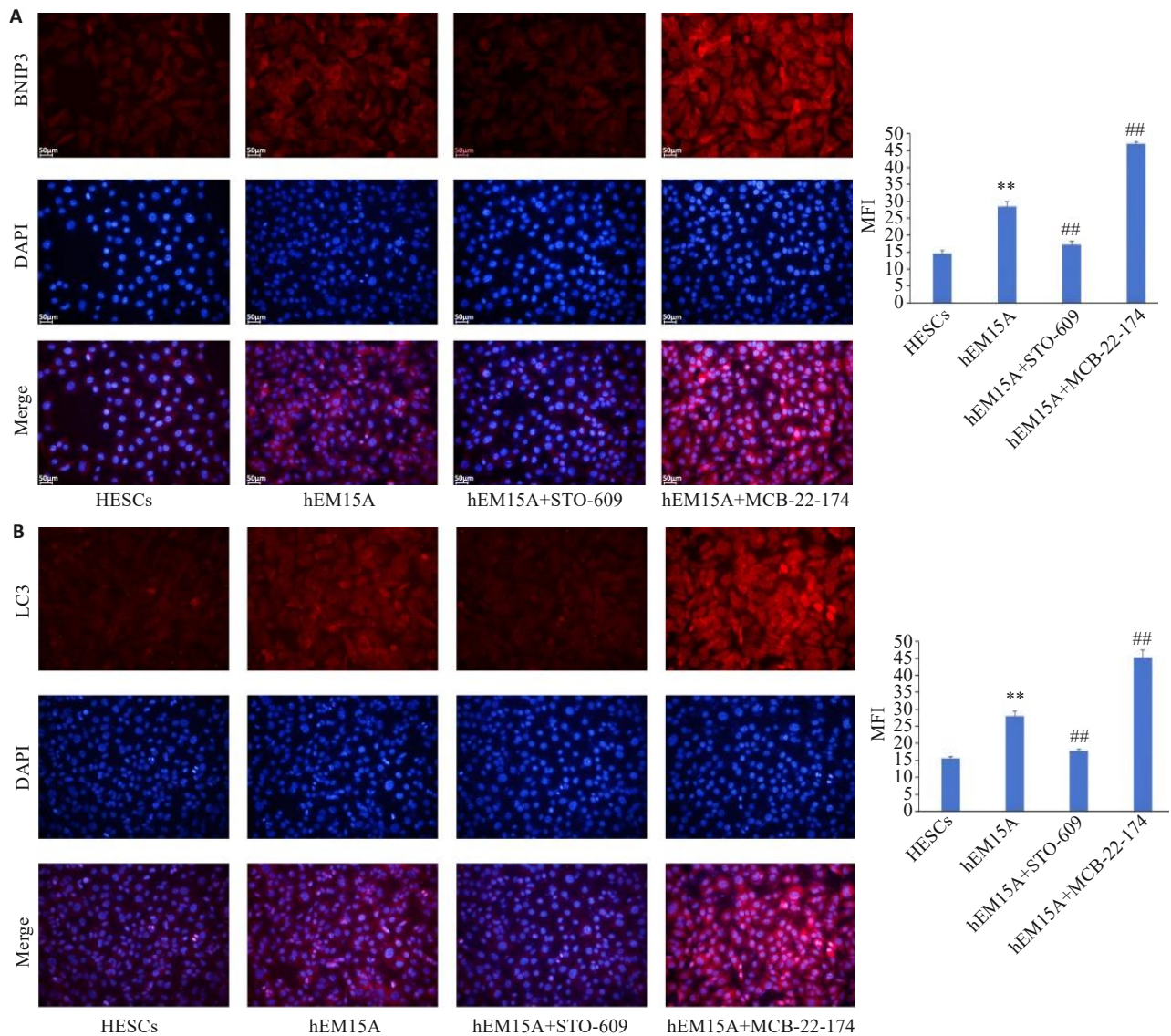


图6 各组细胞线粒体自噬标志蛋白BNIP3、LC3定位情况

Fig.6 Localization of mitophagy marker proteins BNIP3 (A) and LC3 (B) in HESCs and hEM15A cells with different treatments ($\times 200$, Mean $\pm$ SD, $n=3$). ** $P<0.01$ vs HESCs group, ## $P<0.01$ vs hEM15A group.

2.5 各组细胞相关信号通路及血管生成关键蛋白的表达

Western blotting结果显示,与HESCs组相比,hEM15A组细胞中CaMKK β 、AMPK与HIF-1 α 的蛋白表达上升($P<0.01$),分别使用CaMKK β 激动剂和抑制剂干预hEM15A细胞后,与hEM15A组细胞相比,CaMKK β 抑制剂降低了hEM15A中CaMKK β 、AMPK与HIF-1 α 的蛋白表达,使用CaMKK β 激动剂则可升高hEM15A中CaMKK β 、AMPK与HIF-1 α 的蛋白表达($P<0.01$)。与HESCs组相比,hEM15A组细胞中血管生

成相关蛋白VEGF、CD31的表达升高,而使用CaMKK β 抑制剂后,VEGF、CD31的表达降低($P<0.01$);相反,使用CaMKK β 激动剂后,VEGF、CD31的蛋白表达则呈升高趋势($P<0.01$,图7)。

2.6 各组细胞相关信号通路及线粒体自噬关键分子mRNA表达

PCR结果显示,与HESCs组细胞相比,hEM15A组细胞中CaMKK β 、AMPK、HIF-1 α 、BNIP3、LC3的mRNA表达升高($P<0.01$)。使用CaMKK β 抑制剂干预

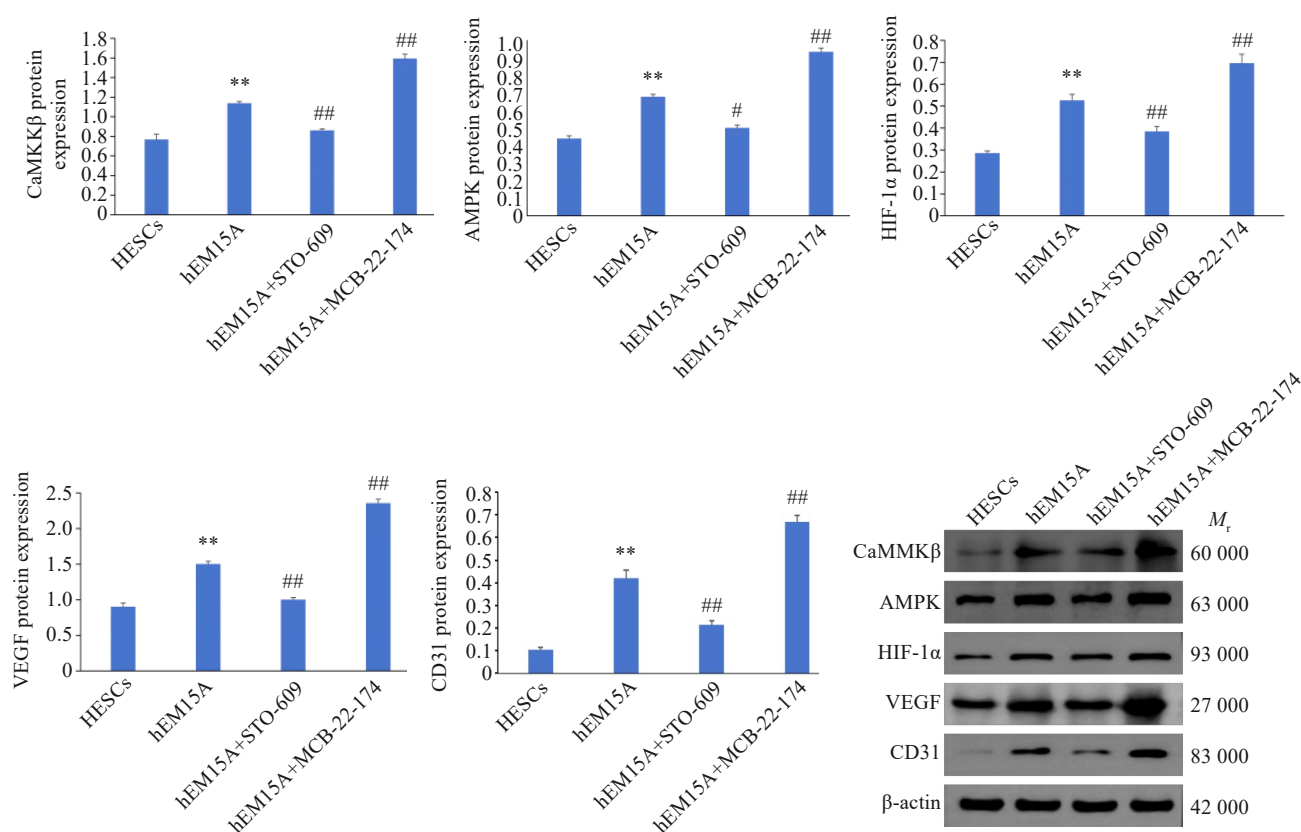


图7 各组细胞相关信号通路及血管生成关键蛋白的表达情况

Fig.7 Expression of cell-related signaling pathways and key proteins of angiogenesis in HESCs and hEM15A cells with different treatments (Mean±SD, n=3). **P<0.01 vs HESCs group; #P<0.05, ##P<0.01 vs hEM15A group.

后, hEM15A 组细胞中 CaMKKβ、AMPK、HIF-1α、BNIP3、LC3 的 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 相反, 使用 CaMKKβ 激动剂后, hEM15A 细胞中 CaMKKβ、AMPK、HIF-1α、BNIP3、LC3 的 mRNA 表达升高 ($P<0.01$, 图8)。

3 讨论

EMs 虽是一类良性疾病, 但具有类似恶性肿瘤种植、侵袭、转移的特点, 病势缠绵难愈, 是现代妇科临床中的常见病疑难病之一。新生血管形成是其重要的病理过程, 而异位病灶过度产生的新生血管则会进一步刺激与功能层分离的基底层发生降解, 继而诱导内皮细胞分化, 形成新的基底膜, 引发异位灶的周期性病理变化^[13, 14]。近年来研究表明, 在 EMs 的发生发展过程中, 新生血管的形成是逆流内膜得以在子宫腔外成功“种植”、存活并扩大的关键, 异位病灶的新生血管不仅为其提供生长所需的氧气和营养, 其伴随的神经纤维更是 EMs 特征性疼痛的结构基础^[15, 16]。因此, 揭示 EMs 患者在位内膜中促血管生成活性异常增强的内在因素, 是深入理解疾病本质和开发靶向治疗策略的关键。本研究证实 EMs 患者的在位内膜间质细胞具备固有的促血管生成能力, 且与正常内膜间质细胞相比, hEM15A 细胞具有更强的增殖、侵袭能力, 并能显著促进内皮细胞成

管, 其分子基础显示为 VEGF 及其相关标志物 CD31 的异常高表达, 但是驱动其持续高表达及血管生成发生的相关信号通路, 仍需进一步探索。

近年来, 随着对细胞器功能研究的深入, 线粒体自噬在疾病发生发展中的作用日益受到关注。线粒体自噬是细胞选择性清除受损、衰老线粒体的重要质量控制机制, 通过维持线粒体群体的健康状态, 确保细胞能量代谢稳态和正常功能^[17]。在 EMs 的发生发展过程中, 逆流至腹腔的内膜组织面临缺氧、营养缺乏及炎症因子攻击等多重应激, 这些因素均可导致线粒体功能受损^[18, 19]。有学者进一步研究发现, 异位内膜组织逆流至盆腔后会导致缺氧微环境的出现, 此时缺氧相关信号通路被异常激活, 诱导保护性自噬的发生, 同时, 异位内膜组织出现上皮间质转化, 进一步促进异位内膜在机体的黏附、侵袭^[20]。即在正常情况下, 细胞可通过启动线粒体自噬程序及时清除这些受损的细胞器, 维持细胞内环境稳定; 然而, 当盆腔微环境改变导致线粒体自噬功能发生紊乱时, 功能失调的线粒体在细胞内滞留, 影响细胞在机体的正常生理功能, 这些滞留的线粒体不仅产能效率低下, 还可能成为活性氧的持续来源, 通过激活炎症小体、促进促炎因子释放等方式, 加剧局部炎症反应; 同时, 受损线粒体积累导致的代谢重编程可能改变细胞

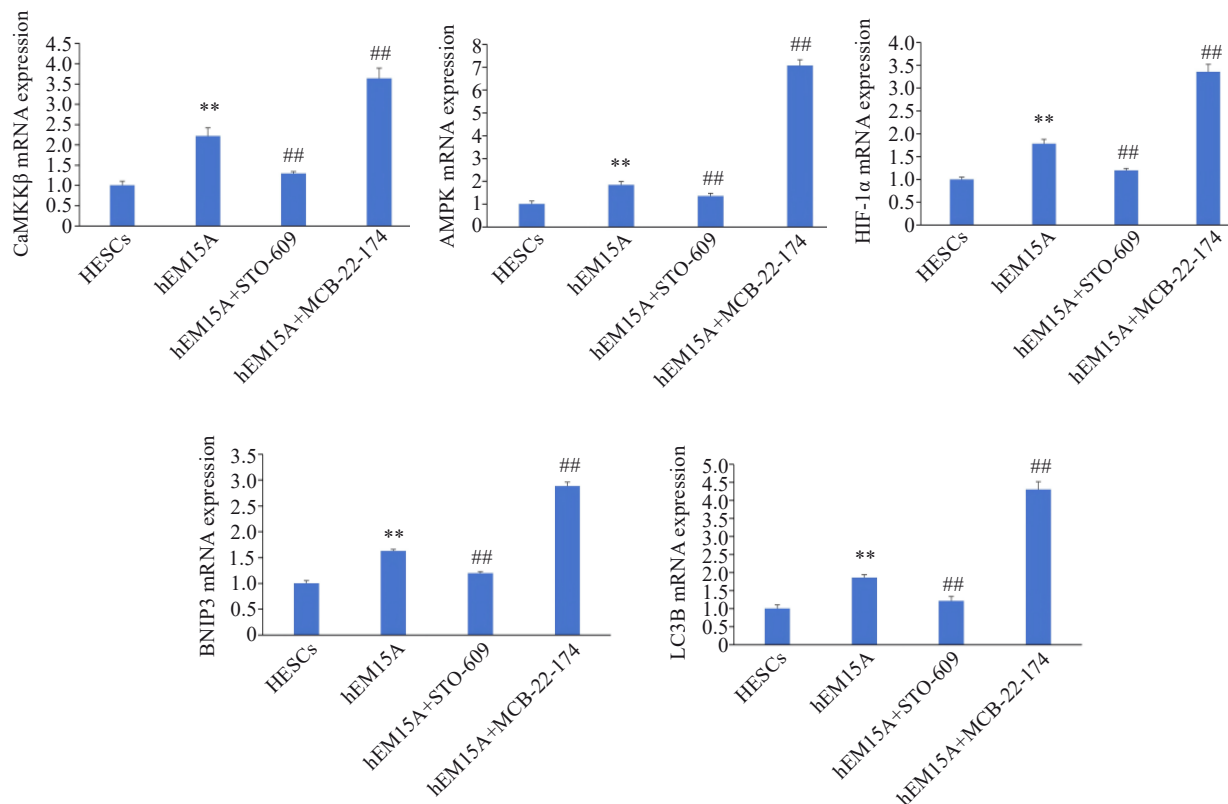


图8 各组细胞相关信号通路及线粒体自噬关键分子mRNA表达

Fig. 8 Cell-related signaling pathways and mRNA expression of key molecules of mitophagy in HESCs and hEM15A cells with different treatments (Mean±SD, n=3). **P<0.01 vs HESCs group, #P<0.01 vs hEM15A group.

的增殖、侵袭和血管生成特性^[21, 22]。本研究通过免疫荧光技术观察到,在EMs患者的在位内膜细胞中,BNIP3与LC3在线粒体上的定位信号显著增强,表明在EMs的发生过程中线粒体自噬流被异常启动。然而,线粒体自噬在EMs中的研究仍有不足,且现有研究发现自噬在EMs中存在激活与抑制完全相反的双向调节情况^[23, 24],那么,线粒体自噬在该疾病中是否也存在相同的作用效果,然而其具体的启动机制如何,需进一步探讨。

CaMKKβ是钙信号的上游传感器,通过磷酸化激活能量感受器AMPK,在经典的缺氧模型中,HIF-1α的稳定性由氧浓度主导,但其转录活性则可被AMPK等激酶通过磷酸化修饰而增强,继而对低氧应答的核心调控因子HIF-1α进行精密调控^[25, 26]。因此,CaMKKβ/AMPK/HIF-1α信号轴正是整合钙信号、能量应激与低氧应答的核心网络。本研究证实,在EMs患者的在位内膜间质细胞中,CaMKKβ与AMPK的活性被显著激活,而HIF-1α的蛋白水平亦异常累积;同时,为了确立CaMKKβ在此信号轴中的上游主导地位,本研究同步展开了药理学增益与缺失功能实验,结果显示,激活CaMKKβ不仅进一步增加了AMPK活性,还增强了HIF-1α的累积;相反,使用CaMKKβ抑制剂则能有效逆转所有这些异常,即抑制AMPK和HIF-1α的表达。BNIP3是非泛素化线粒体自噬过程中的关键蛋白,研究

表明,HIF-1α能够直接转录上调线粒体自噬关键受体BNIP3,BNIP3通过其LC3相互作用区域,直接将待降解的线粒体锚定于自噬体,启动一条关键的“非泛素依赖性”线粒体自噬通路^[27-29]。本研究证实,在HIF-1α异常升高的情况下线粒体自噬被异常激活,即BNIP3在基因和蛋白水平的表达均显著上升,自噬流的关键蛋白LC3的转化也同步增多。同样,在激活CaMKKβ的情况下则可进一步增强HIF-1α的蛋白累积,继而显著上调BNIP3的表达水平,同时促进自噬标志蛋白LC3向活性形式LC3-II的转化;反之,抑制CaMKKβ则会降低HIF-1α的累积,从而减少BNIP3的表达并抑制LC3-II的生成。细胞成管试验显示,抑制CaMKKβ的表达能够进一步抑制EMs细胞的血管生成能力;而激活CaMKKβ的表达则能有效促进血管生成,表明CaMKKβ参与的信号通路可通过介导线粒体自噬促进EMs异位病灶的血管生成。

研究表明,在EMs中,线粒体自噬被抑制表达^[30, 31],而本研究结果则与之前的研究相反。推测原因是在异位灶的缺氧微环境下,导致在位内膜间质细胞中CaMKKβ被异常激活,活化的CaMKKβ通过磷酸化激活AMPK,并协同稳定或激活HIF-1α,HIF-1α的累积进而转录上调线粒体自噬关键受体BNIP3,驱动了过度活跃的线粒体自噬,这种异常激活的线粒体自噬可能导致

两方面后果:一方面,大量受损线粒体被非正常清除可能破坏细胞代谢稳态,产生持续的mtROS并加剧炎症信号,这些因素共同构成了一个促侵袭、促增殖的细胞微环境;另一方面,HIF-1 α 本身的积累及其可能因线粒体自噬紊乱而进一步放大的信号,直接强力驱动了VEGF等血管生成因子的高表达。最终,这两条路径汇合,显著增强了内膜细胞的侵袭存活能力及其促血管生成潜能,共同推动了异位病灶的建立与发展。

尽管本研究观察到CaMKK β 抑制可下调线粒体自噬并抑制血管生成,但线粒体自噬作为该信号轴的中间环节,其驱动血管生成的具体下游效应机制,例如代谢物变化、特定炎症因子分泌模式等,均有待进一步明确。本课题组下一步将围绕代谢重编程、mtROS及促血管生成炎症因子网络展开研究,以期阐明“CaMKK β /AMPK/HIF-1 α 信号通路—线粒体自噬—血管生成”中缺失的中间环节。

综上,在EMs发病的起始阶段,随经血逆流至缺氧腹腔微环境的在位内膜细胞,其CaMKK β /AMPK信号基础活性异常升高,进而驱动HIF-1 α 蛋白的异常累积;HIF-1 α 通过转录上调BNIP3,诱导线粒体自噬过度激活。这种失衡的线粒体质量控制机制非但未能有效维持稳态,反而可能因清除过程异常或功能受损线粒体的滞留,进一步加剧局部氧化应激与炎症反应,从而共同推动异位内膜的存活、侵袭及血管生成,最终促进异位病灶的建立与疾病进展。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Nothnick WB, Arachchige SP, Minchella P, et al. Targeting c-MYC: a potential non-hormonal therapeutic approach for endometriosis treatment[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1225055.
- [2] Chen LH, Lo WC, Huang HY, et al. A lifelong impact on endometriosis: pathophysiology and pharmacological treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7503.
- [3] Mamillapalli R, Dang T, Habata S, et al. Activation of hypocretin neurons in endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2022, 29(1): 243-9.
- [4] Kim MR, Yen CF, Lee CL. Epidemiologic factors associated with endometriosis in East Asia[J]. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2019, 8(1): 4.
- [5] 赵瑞华, 张永嘉. 子宫内膜异位症与抑郁、焦虑关系探讨[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(3): 259-65.
- [6] Thurnherr N, Burla L, Metzler JM, et al. Attitudes and perceptions of affected women towards endocrine endometriosis therapy: an international survey based on free-word association networks[J]. *Hum Reprod*, 2024, 39(1): 83-92.
- [7] 费玉叶, 马桦, 司雨, 等. 中医药靶向线粒体质量控制防治女性生殖障碍性疾病的研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(8): 788-93.
- [8] Taniguchi F. Apoptosis and endometriosis[J]. *Front Biosci*, 2011, E3(2): 648-62.
- [9] 黄灿灿, 万文文, 吉秀家, 等. 基于线粒体自噬探讨加味少腹逐瘀汤治疗子宫内膜异位症纤维化的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(6): 1177-85.
- [10] Chan YJ, Chen WJ, Chen YJ, et al. Yi-Zhi-Fang-Dai formula exerts a protective effect on the injury of tight junction scaffold proteins *in vitro* and *in vivo* by mediating autophagy through regulation of the RAGE/CaMKK β /AMPK/mTOR pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(12): 1847-58.
- [11] Yu ZY, Wang JN, Li TB, et al. Melatonin promotes diabetic wound healing by mediating mitochondrial function in endothelial cells through the AMPK/SIRT1/HIF-1 α pathway[J]. *Tissue Cell*, 2025, 95: 102884.
- [12] Suo YJ, Zhang L, Che YH. IL-4 alleviates CIRI by suppressing autophagy *via* the HIF-1 α /Bcl-2/BNIP3 pathway in rats[J]. *Acta Neurobiol Exp*, 2023, 83(3): 246-54.
- [13] 邓娟, 贺天虎, 程明军, 等. 血管内皮生长因子及其相关miRNA在子宫内膜异位症中的研究进展[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2022, 38(10): 1047-50.
- [14] 张美楠, 梁瑞宁. 子宫内膜异位症血管生成相关因子及抗血管生成治疗进展[J]. *江西中医药*, 2016, 47(11): 78-80.
- [15] Kim HW, Yoo JE. Inhibitory effect of traditional Korean medicine on the recurrent endometriosis after laparoscopic excision: a case report[J]. *Integr Med Res*, 2018, 7(3): 296-301.
- [16] 周奕含, 范玲秀, 张满丽, 等. COX-2、NFP在子宫内膜异位症不同证候的表达研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(10): 3534-30.
- [17] Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 233-42.
- [18] Yang RY, Yang F, Wei YJ, et al. Hypoxia-induced Semaphorin 3A promotes the development of endometriosis through regulating macrophage polarization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 138: 112559.
- [19] 陈元欢, 岳斌, 毛海燕, 等. 线粒体质量控制系统在子宫内膜异位症中作用机制的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(3): 406-10.
- [20] Liu HW, Du Y, Zhang ZB, et al. Autophagy contributes to hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition of endometrial epithelial cells in endometriosis[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(5): 968-81.
- [21] D'Amico R, Impellizzeri D, Cordaro M, et al. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of endometriosis[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2484.
- [22] Sreerangaraja Urs DB, Wu WH, Komrskova K, et al. Mitochondrial function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3592.
- [23] Zhang MJ, Zhang ZD, Wang JL, et al. Unveiling the role of PNMA2 in endometriosis: from proliferation and apoptosis to immunomodulation[J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2025, 29(9): e70576.
- [24] Liu HW, Liang JX, et al. ALKBH5 promotes autophagy and progression by mediating m6A methylation of lncRNA UBOX5-AS1 in endometriosis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2025, 328(2): C639-56.
- [25] Yao Y, Ji YS, Ren JH, et al. Inhibition of autophagy by CRMP2-derived peptide ST2-104 (R9-CBD3) *via* a CaMKK β /AMPK/

- mTOR pathway contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 123.
- [26] Faubert B, Boily G, Izreig S, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*[J]. Cell Metab, 2013, 17(1): 113-24.
- [27] 严海新, Kwan W, 刘志丹. HIF-1 α /BNIP3 信号通路调控低氧诱导下细胞自噬及凋亡的研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版), 2025, 35(5): 455-60.
- [28] Wang C, Li MX, Li YD, et al. Bloodletting acupuncture at Jing-well points alleviates myocardial injury in acute altitude hypoxic rats by activating HIF-1 α /BNIP3 signaling-mediated mitochondrial autophagy and decreasing oxidative stress[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(2): 170-8.
- [29] Wei R, Song L, Miao Z, et al. Hydroxysafflor yellow A exerts neuroprotective effects *via* HIF-1 α /BNIP3 pathway to activate neuronal autophagy after OGD/R[J]. Cells, 2022, 11(23): 3726.
- [30] Gou YL, Ding J, Wang HL, et al. Gut microbiota derived butyrate enhances ferroptosis sensitivity in endometriosis through FFAR2/PPAR- γ /PINK1/Parkin mediated mitophagy[J]. Free Radic Biol Med, 2025, 238: 640-52.
- [31] Deng YP, Lou T, Kong LL, et al. Prohibitin2/PHB2, transcriptionally regulated by GABPA, inhibits cell growth *via* PRKN/parkin-dependent mitophagy in endometriosis[J]. Reprod Sci, 2023, 30(12): 3629-40.

(编辑:林 萍)