

miR-205-5p 负靶向调控血管内皮生长因子 A 对子宫内膜异位症的影响

闵逸飞, 应小燕

【摘要】 目的 研究 miR-205-5p 和血管内皮生长因子 A (VEGFA) 在子宫内膜异位中的作用机制。 **方法** 采用 RT-PCR 技术检测子宫异位内膜组织中 miR-205-5p 的表达。利用 CCK8、EdU 和流式细胞仪分别检测子宫内膜基质细胞的活力、增殖和凋亡。利用 Western blot 实验检测增殖相关蛋白和凋亡相关蛋白的表达。利用划痕实验和 Transwell 检测 miR-205-5p 过表达对子宫内膜基质细胞迁移和侵袭的影响。利用生物信息学预测 miR-205-5p 与 VEGFA 的结合位点, 并利用双荧光素酶报告、RT-PCR 和 Western blot 实验验证 VEGFA 是 miR-205-5p 的靶标。利用拯救实验验证 miR-205-5p 通过负调控 VEGFA 在子宫内膜异位症中发挥作用。 **结果** 子宫内膜异位症患者的组织和血液中 miR-205-5p 的表达显著降低 ($P < 0.01$)。过表达 miR-205-5p 后, 可显著抑制子宫内膜基质细胞的增殖 ($P < 0.01$), 迁移与侵袭 ($P < 0.01$), 并促进凋亡 ($P < 0.01$)。miR-205-5p 负靶向调控 VEGFA。与 miR-205-5p 模拟+质粒组相比, miR-205-5p 模拟+VEGFA 组的细胞活力和细胞增殖显著升高 ($P < 0.01$), 细胞的凋亡显著降低 ($P < 0.01$), 细胞的迁移和侵袭能力显著升高 ($P < 0.01$)。 **结论** miR-205-5p 通过负靶向调控 VEGFA 影响子宫内膜异位症的发展。

【关键词】 子宫内膜异位症; miR-205-5p; 血管内皮生长因子 A; 子宫内膜基质细胞

【中图分类号】 R711.71 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2022)06-0561-08

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2022.06.001

MiR-205-5p affects the development of human endometriosis by negatively targeting vascular endothelial growth factor A

MIN Yi-fei¹, YING Xiao-yan²

(1. Department of Gynecology, the Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, Jiangsu, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective This study aims to figure out the mechanism of miR-205-5p and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in endometriosis. **Methods** The expression of miR-205-5p in ectopic endometrial tissues was detected by RT-PCR. Viability, proliferation, and apoptosis of the endometrial stromal cells were measured using CCK8 assay, EdU assay, and flow cytometry, respectively. The expressions of proliferation related and apoptosis related proteins were detected using Western blot assay. Scratch assay and Transwell assay were utilized to detect the effect of miR-205-5p overexpression on endometrial stromal cell migration and invasion. Bioinformatics was used to predict the binding sites of miR-205-5p and VEGFA, and dual luciferase reporter, RT-PCR and Western blot experiments were used to validate that VEGFA was a target of miR-205-5p. Rescue experiments were utilized to verify that miR-205-5p played a role in endometriosis by negatively regulating VEGFA. **Results** MiR-205-5p expression was significantly reduced in the tissues and blood of women with endometriosis ($P < 0.01$). Overexpression of miR-205-5p significantly inhibited endometrial stromal cell proliferation ($P < 0.01$), migration and invasion ($P < 0.01$), and promoted apoptosis ($P < 0.01$). MiR-205-5p negatively targeted regulation of VEGFA. Compared with the miR-205-5p mimic + vector group, the miR-205-5p mimic + VEGFA group exhibited significantly higher cell viability and cell proliferation ($P < 0.01$), significantly lower cell apoptosis ($P < 0.01$), and significantly lower cell migration and invasion abilities ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-205-5p negatively regulates VEGFA and affects the development of the endometriosis.

作者单位: 213000 常州, 南京医科大学附属常州第二人民医院妇科(闵逸飞); 210000 南京, 南京医科大学第二附属医院妇产科(应小燕)

通信作者: 应小燕, E-mail: xiaoyanying_cool@163.com

【Key words】 endometriosis; miR-205-5p; vascular endothelial growth factor A; endometrial stromal cells

0 引言

子宫内膜异位症是一种良性的妇科炎症性疾病,子宫内膜组织异常,育龄妇女发病率高,高达 10%^[1]。流行病学研究结果显示,育龄妇女子宫内膜异位症的发病率高达 15%,全球患者数量超过 2 亿,近年来发病率逐年上升。治疗方案主要是药物治疗和手术治疗,但药物治疗的不良反应普遍比较大,手术治疗风险高,并发症多^[2]。有文献报道,miRNAs 在乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌等多种妇科疾病中起调控作用,但在子宫内膜异位症中的研究较少^[3-5]。miR-205-5p 在子宫内膜异位症患者中表达降低,且通过靶向子宫内膜基质细胞中的 ANGPT2 抑制人类子宫内膜异位症的进展^[6],但其作用机制尚不完全清楚。众所周知,miRNAs 通常与其靶 mRNA 共同作用,通过 mRNA 的降解影响癌症的发生发展^[7]。血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 属于血小板衍生生长因子 (PDGF)/血管内皮生长因子 (VEGF) 家族,以二硫键连接的同二聚体形式存在^[8]。此外,VEGFA 可诱导血管生成,促进内皮细胞生长和转移,抑制细胞凋亡,并参与内皮细胞的生理和病理生物学过程^[7]。本研究旨在探讨 miR-205-5p 通过靶向 VEGFA 对子宫内膜异位症患者异常表达的影响机制,为子宫内膜异位症的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本 收集 2019 年 8 月-2020 年 12 月因良性妇科疾病在南京医科大学附属常州第二人民医院 60 例行子宫切除术患者的组织和血清样本,将患者样本分为子宫内膜异位症 (EC) 组 ($n=30$) 与正常子宫内膜 (EN) 组 ($n=30$),接受激素治疗或同时患有恶性肿瘤的患者被排除在外。本研究经南京医科大学附属常州第二人民医院伦理委员会批准 (伦理批准号:[2019]YLB016)。

1.2 主要试剂与设备 RIPA 裂解液 (KL131008250) 和双荧光素酶报告试剂盒 (RG027) 及 Tunel 试剂盒 (C1098) 均购自上海碧云天生物科技有限公司。Trizol 试剂盒 (15596-026) 购自 Invitroge。荧光定量 PCR 仪 (7300) 购自美国 ABI 公司,显微镜是上海光学仪器厂生产。

1.3 子宫内膜基质细胞获取及处理 收集子宫内膜组织,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌眼剪剪破碎,加入 5 mL I 型胶原酶 (1 mg/mL),在 37 °C 培养箱中消化 60 min,每 20 min 搅拌一次。然后将混合的细胞悬液通过 200 和 400 目不锈钢细胞过滤器进行过滤。然后在 DMEM/

F-12 培养基和 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。

使用免疫细胞化学荧光染色鉴定子宫内膜基质细胞纯度。用 0.3% Triton-X-100 37 °C 孵育 30 min,4% 甲醛固定 30 min,用 5% 牛血清白蛋白室温封闭 20 min,然后用波形蛋白一抗 (ab8978 和 Abcam) 抗体 4 °C 过夜。使用一抗孵育之后,分别采用 0.3% Triton-X-100 和 PBS 冲洗 3~4 次,加入一抗所对应的二抗,37 °C 的环境下孵育 40 min。最后,加入 100 μL 4,6-生物胺-2-苯甲酰 (DAPI) 15 min,冲洗,甘油密封,荧光显微镜观察。

使用转染技术在子宫内膜基质细胞中转染 miR-205-5p 模拟,将细胞分为 NC 模拟组、miR-205-5p 模拟组、NC 模拟+质粒组、miR-205-5p 模拟+质粒组和 miR-205-5p 模拟+VEGFA 组。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术检测 mRNA 的表达量 利用 RT-PCR 技术检测组织、细胞和血液样本中 miR-205-5p 的表达。使用 Trizol 试剂提取组织、细胞和血液样本中的总 RNA。使用 SYBRGreen 定量 PCR 试剂盒完成 PCR 反应,反应的体系及反应的条件,均按照试剂盒的说明进行实验,并放置实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相关因子的表达量。

1.5 CCK-8 细胞增殖实验 将不同方法处理的细胞接种于 96 孔的反应板中,接种后,分别于 24 h、48 h、72 h 后加入 CCK-8 的溶液,并放置酶标仪中进行检测。

1.6 采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (Edu) 法检测细胞增殖情况 将细胞浓度调整到 1×10^6 /mL,以每孔 500 μL 接种于,预覆盖玻片的 24 孔板中,培养基每 3 d 更换一次。在每个设定时间点前 2 h,加入 50 μL Edu 培养物,冲洗细胞,加入细胞固定液。按照 Edu 试剂盒的说明书进行染色,并拍照并计数。

1.7 蛋白印迹法检测增殖和凋亡相关蛋白的表达 采用蛋白印迹法检测增殖[增殖细胞核抗原 (PCNA)、Ki67]相关蛋白和凋亡 (Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase 3 和 Cleaved-caspase 9) 相关蛋白的表达水平。加入含 PMSF (Bio-Rad) 的细胞裂解液,冰下裂解细胞 20 min,4 °C,离心 5 min,收集上清液,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,进行蛋白定量。10% SDS-PAGE 电泳,转膜上,5% 的脱脂奶粉封闭,加入一抗,4 °C 孵育过夜。加入一抗对应的二抗孵育 2 h,用 TBST 洗涤显影。利用 ImageJ 软件对其灰度值进行分析。

1.8 细胞凋亡 根据凋亡试剂盒说明,在不同方法处理的细胞中加入缓冲液,将细胞悬液转移到含有 5 μL Annexin V/FITC 和 10 μL 碘化丙啶的流动管中,室温孵育 0.5 h,流式细胞术分析。

1.9 划痕实验 将不同方法处理的细胞接种于 6

个孔的反应板中,培养 24 h。当细胞满 85%时,使用微采样器垂直交叉,PBS 洗涤,加入基础培养基,在 37 ℃,5%CO₂培养箱中培养。观察并记录了细胞的迁移情况。使用 ImageJ 软件从 6~8 条水平线中计算细胞间距离的平均值。

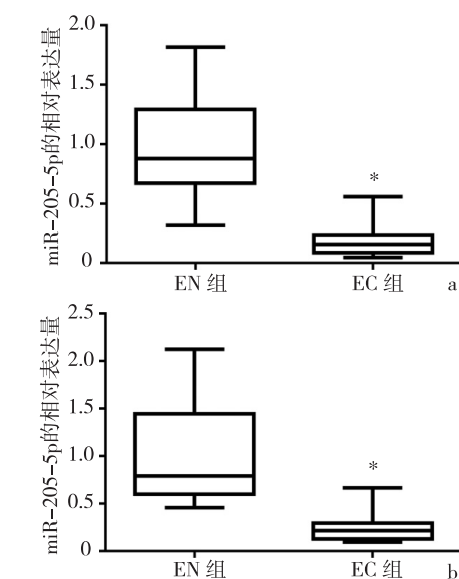
1.10 Transwell 实验 在 Transwell 上室中加入 200 μL 不同方法处理的细胞悬液,下室中加入 600 μL10%胎牛血清培养基。孵育 24 h 后,固定中性甲醛,染色 1%结晶紫,显微镜下计算 NC 模拟组、miR-205-5p 模拟组、NC 模拟+质粒组、miR-205-5p 模拟+质粒组和 miR-205-5p 模拟+VEGFA 组细胞数量。

1.11 双荧光素酶报告基因实验 使用双荧光素酶检测试剂盒(Promega)检测细胞中荧光素酶的反应强度,使用相对荧光素酶活性(%)表示丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)基因的表达水平。

1.12 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行数据分析,使用配对 *t* 检验比较 miR-205-5p 在正常和异位子宫内膜组织和血清中的表达差异。使用非配对 *t* 检验比较两组独立样本之间的差异性。使用单因素方差分析两组及以上的差异性。使用双因素方差分析 CCK-8 实验不同组间的差异性。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-205-5p 在组织和血液中的表达 与正常子宫内膜(EN)组相比,子宫内膜异位症(EC)组患者的组织和血液中 miR-205-5p 的表达明显降低($P < 0.01$),见图 1。



a; 组织样本; b; 血液样本

* $P < 0.01$

图 1 miR-205-5p 在组织和血液中的表达情况

2.2 子宫内膜基质细胞纯度检测 培养 24 h 后,细胞大多数呈梭形,细胞生长达满视野需要 7 d,传代后细胞生长达满视野需要 3 d。通过免疫荧光鉴定出两种细胞的特性,波形蛋白(vimentin)阳性是基质细胞,角蛋白(cytokeratin)阳性是上皮细胞,见图 2。

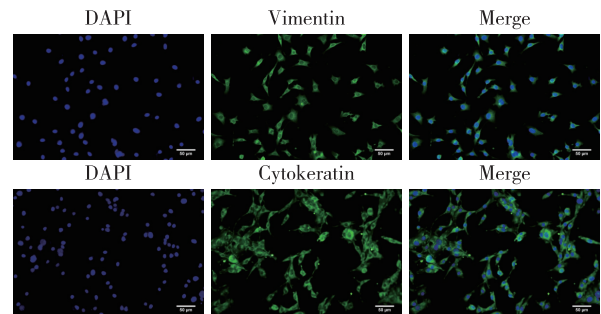
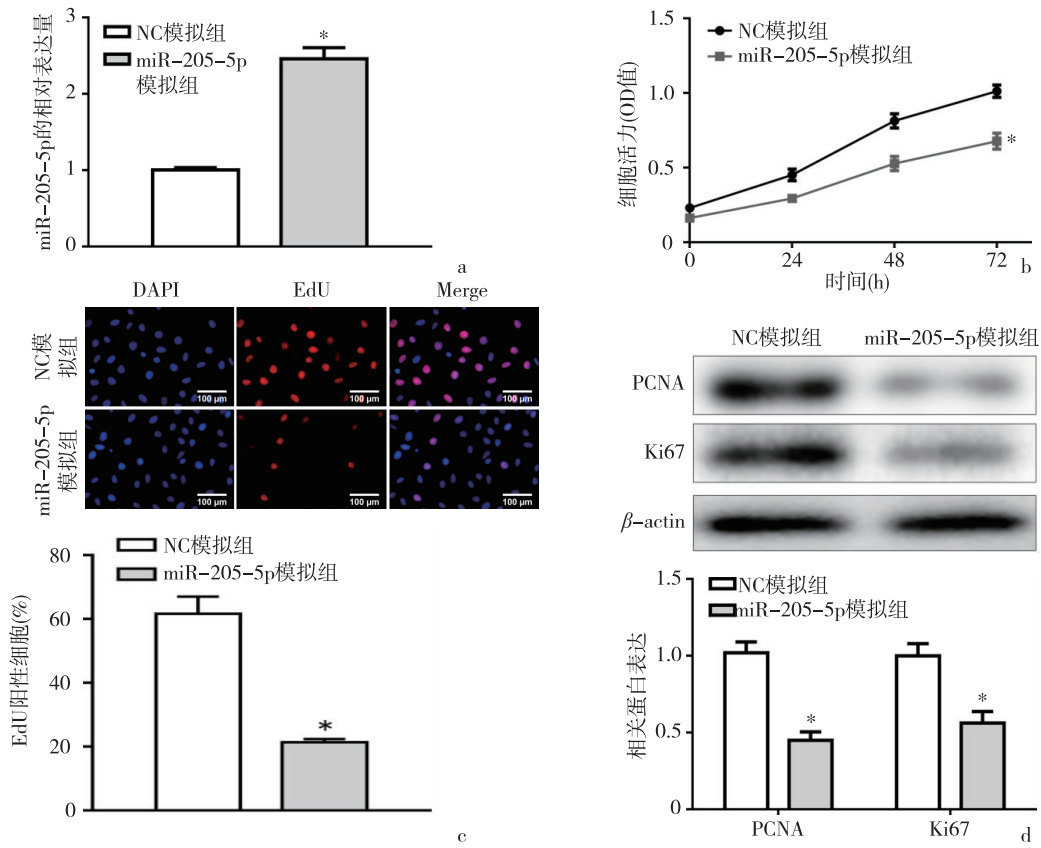


图 2 Vimentin/Cytokeratin 免疫荧光染色鉴定分离的子宫内膜基质细胞(×400)

2.3 miR-205-5p 对异位子宫内膜基质细胞增殖和凋亡的影响 RT-PCR 结果显示,转染 miR-205-5p 模拟后,miR-205-5p 的表达显著提高($P < 0.01$)。CCK8、EdU 和 Western Blot 实验结果表明,与 NC 模拟组相比,miR-205-5p 模拟组细胞活力和增殖下降($P < 0.01$),细胞中增殖相关蛋白(PCNA、Ki67)水平降低($P < 0.01$)。提示 miR-205-5p 显著抑制子宫内膜基质细胞的增殖和活力。见图 3。

流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,与 NC 模拟组相比,miR-205-5p 模拟组细胞凋亡增加($P < 0.01$)。Western blot 结果显示凋亡相关蛋白(Bax、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9)表达升高($P < 0.01$),Bcl-2 表达降低($P < 0.01$)。提示 miR-205-5p 促进子宫内膜基质细胞凋亡。见图 4。

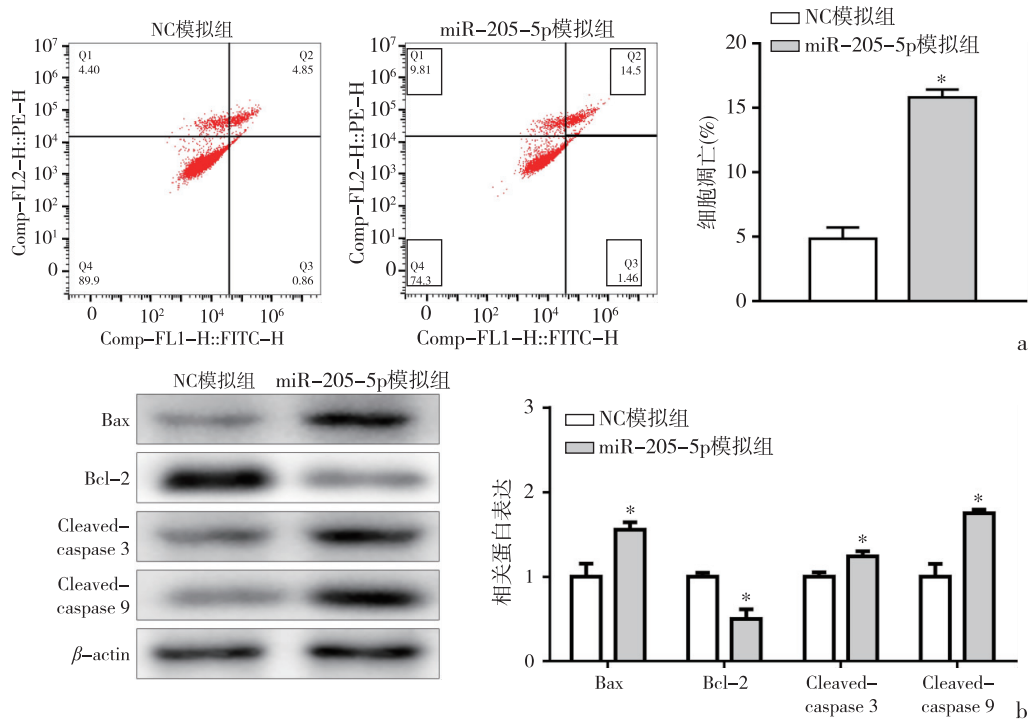
2.4 miR-205-5p 对异位子宫内膜基质细胞迁移侵袭的影响 进一步使用划痕实验和 Transwell 来检测 miR-205-5p 过表达对子宫内膜基质细胞迁移和侵袭的影响。结果显示,miR-205-5p 模拟组子宫内膜基质细胞的迁移和侵袭能力明显降低($P < 0.01$)。与 NC 模拟组相比,miR-205-5p 组的迁移和侵袭相关蛋白(Cox-2、MMP-2 和 MMP-9)的表达水平显著降低($P < 0.01$)。提示 miR-205-5p 可抑制子宫内膜基质细胞的迁移和侵袭。见图 5。



a; RT-PCR 验证转染效率; b; CCK-8 检测细胞活力; c; EdU 检测细胞增殖; d; Western blot 检测增殖相关蛋白

* $P < 0.01$

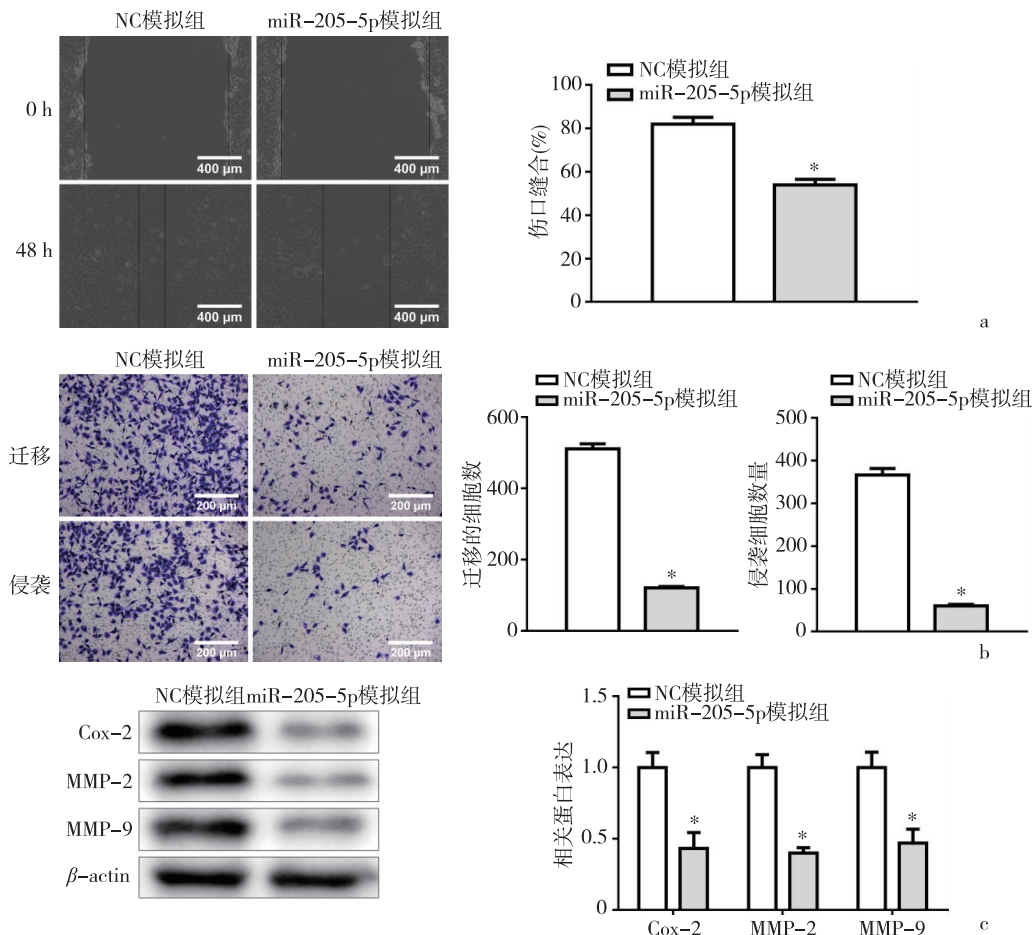
图 3 miR-205-5p 对异位子宫内膜基质细胞增殖凋亡的影响



a; 流式细胞仪检测细胞的凋亡; b; Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白

* $P < 0.01$

图 4 miR-205-5p 对异位子宫内膜基质细胞凋亡的影响



a: 迁移实验检测细胞的迁移能力; b: Transwell 检测细胞的迁移和侵袭能力; c: Western blot 实验检测迁移与侵袭相关蛋白
* $P < 0.01$

图 5 miR-205-5p 对异位子宫内膜基质细胞迁移和侵袭的作用

2.5 miR-205-5p 的下游靶基因筛选及鉴定结果

使用生物信息学来预测 miR-205-5p 的结合位点, 见图 6。并使用双荧光素酶报告基因分析来验证 VEGFA 是 miR-205-5p 的靶点, 见图 7。与健康个体相比, 子宫内膜异位症组织中 VEGFA 的表达明显增加 ($P < 0.01$), 见图 8, 提示 miR-205-5p 可能负调控 VEGFA。RT-PCR 和免疫印迹检测显示, 过表达 miR-205-5p 后, 子宫内膜基质细胞中 VEGF 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 9、图 10。这表明 VEGFA 是 miR-205-5p 的一个靶点, 并受到负调控。

2.6 拯救实验探索 miR-205-5p 和 VEGFA 对子宫内膜基质细胞的影响的结果 RT-PCR 结果显示, 转染过表达 VEGFA 质粒后, VEGFA 在细胞中的表达显著升高; CCK8 和 EdU 实验结果表明, 与 miR-205-5p 模拟+质粒组相比, miR-205-5p 模拟+VEGFA 组的细胞活力和细胞增殖显著升高 ($P < 0.01$); 见图 11。

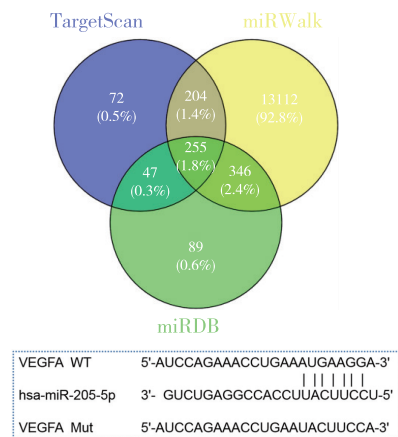
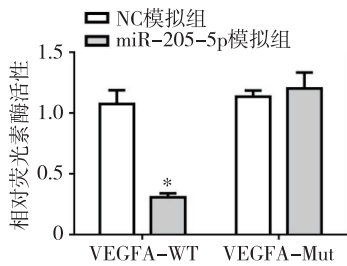


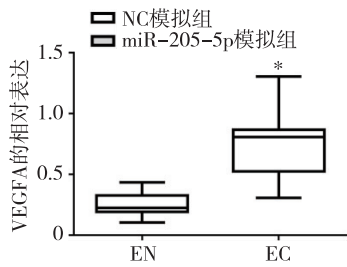
图 6 生物信息学预测 miR-205-5p 的靶标

流式细胞术检测细胞凋亡结果显示, 与 miR-205-5p 模拟+质粒组相比, miR-205-5p 模拟+VEGFA 组的细胞的凋亡显著降低 ($P < 0.01$), 见图 12。提示 VEGFA 的过表达可以逆转 miR-205-5p 过表达引起的细胞的凋亡升高。



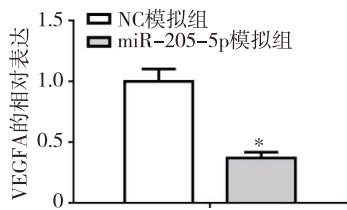
* $P < 0.01$

图7 双荧光素酶报告实验验证 miR-205-5p 的靶标



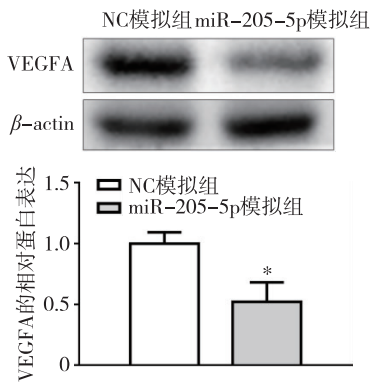
* $P < 0.01$

图8 RT-PCR 检测 VEGFA 的表达



* $P < 0.01$

图9 RT-PCR 检测转染 miR-205-5p 模拟后 VEGFA 的表达

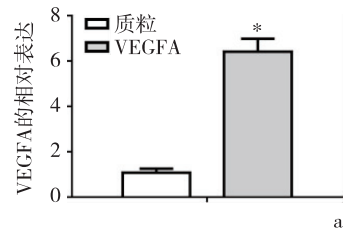


* $P < 0.01$

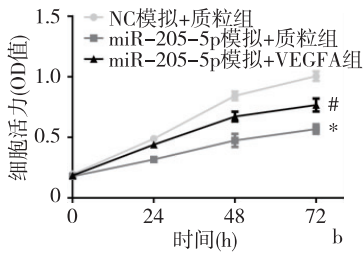
图10 Western blot 检测转染 miR-205-5p 模拟后 VEGFA 的表达

Transwell 和划痕实验结果表明,与 miR-205-5p 模拟+质粒组相比,miR-205-5p 模拟+VEGFA 组的

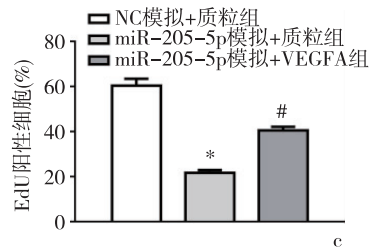
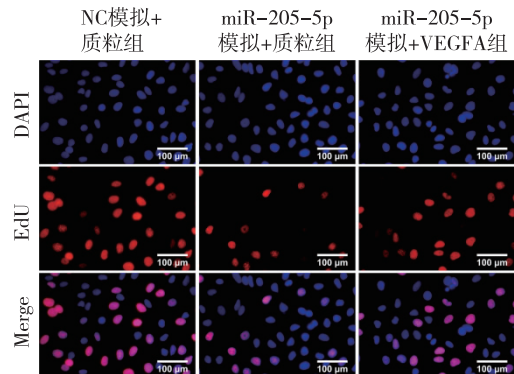
细胞的迁移和侵袭能力显著降低,见图 13。提示 VEGFA 的过表达可以逆转 miR-205-5p 过表达引起的细胞增殖、迁移和侵袭能力的降低,以及细胞凋亡的升高。即 miR-205-5p 通过负调控 VEGFA 抑制细胞的增殖、迁移和侵袭,降低细胞的活力,促进细胞的凋亡。



a



b



c

a: RT-PCR 检测 VEGFA 的表达; b: CCK-8 检测细胞活力; c: EdU 检测细胞增殖

与 NC 模拟+质粒组相比, * $P < 0.01$; 与 miR-205-5p 模拟+质粒组相比, # $P < 0.01$

图11 miR-205-5p 和 VEGFA 对子宫内膜基质细胞增殖的影响

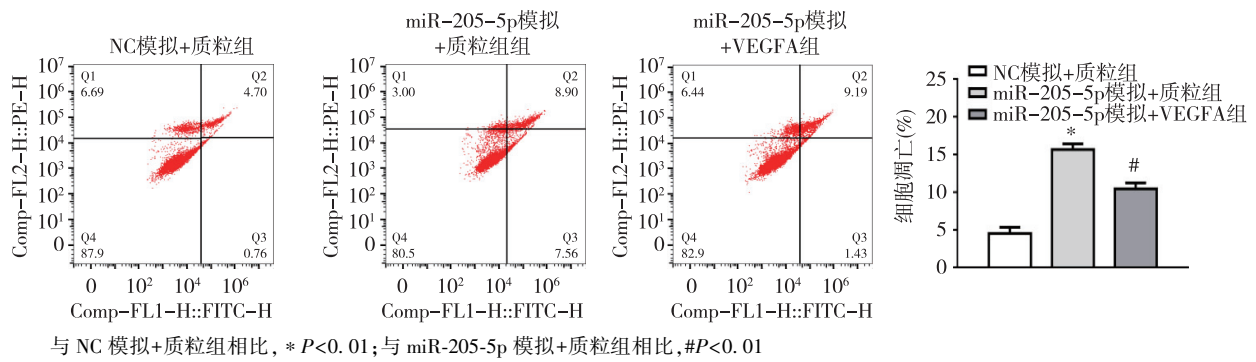


图 12 miR-205-5p 和 VEGFA 对子宫内膜基质细胞凋亡的影响

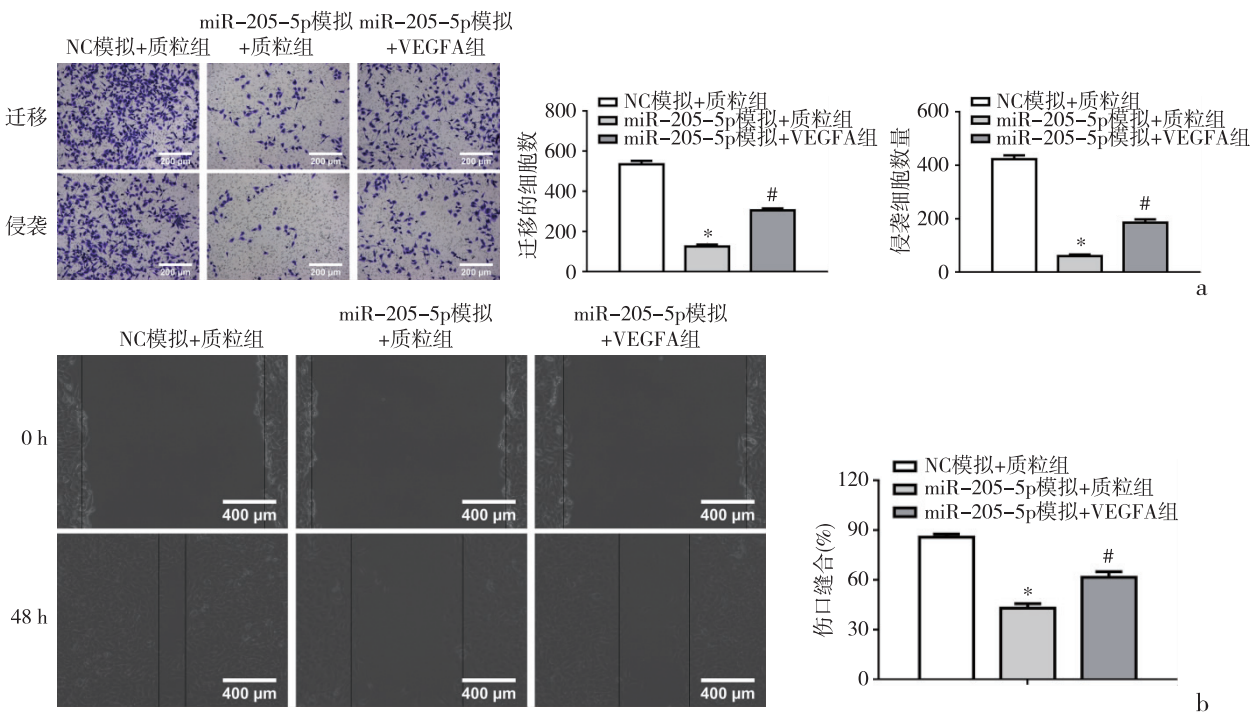


图 13 miR-205-5p 和 VEGFA 对子宫内膜基质细胞迁移和侵袭的影响

3 讨论

子宫内膜异位症(EM)是一种与雌激素相关的慢性良性妇科疾病,主要症状为痛经、盆腔疼痛,可引起不孕,育龄妇女较高,易复发,并发症较多^[9]。EM 具有生长迅速、侵袭性强、多器官转移等类似恶性肿瘤的特点。关于其发病机制有多种理论,但其发病机制尚不清楚^[10-11]。

微小 RNA(miRNA)是一组由 18~25 个核苷酸组成的非编码单链 RNA,在转录调控后水平调控相关基因的表达中起关键作用^[12]。有文献报道 miRNA 在多种细胞过程中发挥关键作用,影响肿瘤细胞的分化、凋亡、迁移^[13-14]。研究发现,肺癌、肝癌、乳腺癌等常见的恶性肿瘤的发生可能与 miRNA 的异常表达

有关^[1]。有文献研究发现,在子宫内膜异位症患者中,miR-34a-5p 和 AKT1 基因的表达水平在子宫内膜组织中呈负相关,提示 miR-34a-5p 可能通过靶向 AKT1 基因影响子宫内膜基质细胞的增殖和自噬,并影响细胞的迁移及侵袭能力,进而影响子宫内膜异位症的发病^[15-16]。miR-205-5p 在子宫内膜异位症患者的组织和血清中的表达与健康者相比显著降低^[6]。

为了进一步研究 miR-205-5p 对基质细胞的增殖凋亡的影响。本研究采用转染技术,以子宫内膜基质细胞为研究对象,转染 miR-205-5p 模拟,过表达 miR-205-5p。结果显示,过表达 miR-205-5p 后,细胞活力和细胞增殖降低,相反,细胞的凋亡增加。Ki67 和 PCNA 属于肿瘤细胞的增殖因子^[17-18],可以作为指标来评估细胞的增殖状态^[19-20]。Bcl-2、Bax、

裂解半胱天冬 3 和裂解半胱天冬 9 蛋白是细胞凋亡的重要因素, Bcl-2 表达升高提示抑制凋亡, 而 Bax、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9 蛋白表达升高可促进凋亡^[21-22]。过表达 miR-205-5p 后细胞的增殖相关蛋白(PCNA、Ki67)水平降低, 凋亡相关蛋白(Bax、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9)的表达升高, Bcl-2 的表达下降。提示 miR-205-5p 促进子宫内膜基质细胞的凋亡, 抑制其增殖和活力。

细胞的迁移和侵袭是一个复杂过程, 受黏附因子的调控, 从而实现在体内的迁移和侵袭^[23-24]。文献报道表明, 环氧化物酶 Cox-2 可上调 MMPs 的表达, 促进肺腺癌细胞的增殖和侵袭^[25]。在子宫内膜异位症的研究中, MMP-9 和 MMP-2 可以作为子宫内膜异位症组织或者细胞侵袭能力检测指标之一^[26]。本研究结果表明, miR-205-5p 过表达抑制子宫内膜基质细胞迁移与侵袭相关蛋白(Cox-2、MMP-2、MMP-9)的表达。提示 miR-205-5p 降低子宫内膜基质细胞的迁移和侵袭能力。

先前研究发现 VEGFA 在子宫内膜异位症组织和细胞中显著高表达, miR-17-5p 可以通过负调控 VEGFA 的表达来抑制子宫内膜异位症中的细胞增殖、迁移和侵袭^[7]。本研究进一步研究证实 VEGFA 的过表达可以逆转 miR-205-5p 过表达引起的细胞增殖的降低, 细胞迁移和侵袭能力的降低。

综上所述, miR-205-5p 通过负调控 VEGFA 抑制细胞的增殖, 降低细胞的活力, 促进其凋亡, 同样降低细胞的迁移和侵袭能力。

【参考文献】

- [1] Velho RV, Taube E, Schouli J, *et al.* Neurogenic Inflammation in the Context of Endometriosis-What Do We Know? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 13102.
- [2] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, *et al.* Reprint of: Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries [J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(4 Suppl1): e137-e152.
- [3] Adhami M, Haghdoust AA, Sadeghi B, *et al.* Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review [J]. *Breast Cancer*, 2018, 25(2): 198-205.
- [4] Buchynska LG, Borykun TV, Iurchenko NP, *et al.* Expression of microRNA in tumor cells of endometrioid carcinoma of endometrium [J]. *Exp Oncol*, 2020, 42(4): 289-294.
- [5] Dehghan Z, Mohammadi-Yeganeh S, Salehi M. MiRNA-155 regulates cumulus cells function, oocyte maturation, and blastocyst formation [J]. *Biol Reprod*, 2020, 103(3): 548-559.
- [6] Zhou CF, Liu MJ, Wang W, *et al.* miR-205-5p inhibits human endometriosis progression by targeting ANGPT2 in endometrial stromal cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 287.
- [7] Pang QX, Liu Z. miR-17-5p mitigates endometriosis by directly regulating VEGFA [J]. *J Biosci*, 2020, 45(1): 1-10.
- [8] Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, *et al.* Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively [J]. *Genomics*, 1996, 32(1): 168-169.
- [9] Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, *et al.* Endometriosis [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(4): 1048-1079.
- [10] Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2017, 108(6): 872-885 e1.
- [11] Taylor HS, Giudice LC, Lessey BA, *et al.* Treatment of Endometriosis-Associated Pain with Elagolix, an Oral GnRH Antagonist [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(1): 28-40.
- [12] Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, *et al.* miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(13): 1771-1792.
- [13] Bak RO, Mikkelsen JG. miRNA sponges: soaking up miRNAs for regulation of gene expression [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014, 5(3): 317-333.
- [14] Ferrante M, Conti GO. Environment and Neurodegenerative Diseases: An Update on miRNA Role [J]. *Microna*, 2017, 6(3): 157-165.
- [15] Hsu CY, Hsieh TH, Tsai CF, *et al.* Synthetic Steroid Hormones Regulated Cell Proliferation Through MicroRNA-34a-5p in Human Ovarian Endometrioma [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(3): 60.
- [16] Misir S, Hepokur C, Oksasoglu B, *et al.* Circulating serum miR-200c and miR-34a-5p as diagnostic biomarkers for endometriosis [J]. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, 2021, 50(4): 102092.
- [17] Jurikova M, Danihel L, Polak S, *et al.* Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer [J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(5): 544-552.
- [18] Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, *et al.* The cell proliferation antigen Ki-67 organizes heterochromatin [J]. *Elife*, 2016, 5: e13722.
- [19] Li N, Deng W, Ma J, *et al.* Prognostic evaluation of Nanog, Oct4, Sox2, PCNA, Ki67 and E-cadherin expression in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 433.
- [20] Qiu X, Wang H, Wang Z, *et al.* Expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 in breast cancer based on DCE-MRI image information [J]. *J Infect Public Health*, 2020, 13(12): 2032-2037.
- [21] Mirakhor Samani S, Ezazi Bojnordi T, Zarghampour M, *et al.* Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2018, 38(7): 999-1004.
- [22] Vardiyan R, Ezati D, Anvari M, *et al.* Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2020, 47(3): 155-160.
- [23] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 1-73.
- [24] Yang F, Xu J, Li H, *et al.* FBXW2 suppresses migration and invasion of lung cancer cells via promoting beta-catenin ubiquitylation and degradation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1382.
- [25] Wan Mohd Tajuddin WNB, Lajis NH, Abas F, *et al.* Mechanistic Understanding of Curcumin's Therapeutic Effects in Lung Cancer [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12). doi: 10.3390/nu11122989
- [26] 杨爱仲, 梁程程, 胡天祺, 等. miR-199a 通过 NF-κB 通路抑制子宫内膜干细胞黏附和侵袭的机制研究 [J]. *河北医药*, 2021, 43(10): 1451-1454, 1459.

(收稿日期: 2022-03-30; 修回日期: 2022-06-03)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)