

人脐带间充质干细胞卵巢原位注射对大鼠卵巢早衰的治疗作用

吴芸^{1#} 王皓^{2#} 王喆³ 於洪亮² 戴宏健³ 魏全伟³ 石放雄³ 严丽^{2*} 韩临晓^{4*}

(¹乌鲁木齐市妇幼保健院, 乌鲁木齐 830001; ²上海泉生生物科技有限公司, 上海 201403;

³南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; ⁴东莞常安医院, 东莞 523583)

摘要 卵巢早衰(POF)是女性不育的主要原因之一, 其相关机理复杂, 其中涉及自身免疫缺陷。人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)可用于组织再生和修复, 因此, 该研究旨在探究hUCMSCs在自身组织抗原免疫诱导的大鼠POF中的作用。将不同浓度的hUCMSCs注射入诱导的POF大鼠卵巢中, 通过评估发情周期、卵泡形态、激素分泌以及颗粒细胞的增殖和凋亡来检查卵巢功能。结果表明, hUCMSCs移植后, 大鼠的发情周期恢复正常, 卵泡发育得到明显改善。此外, 血清17 β -雌二醇(E₂)浓度, 治疗后孕酮(P₄)和抗苗勒氏激素(AMH)水平显著上升。hUCMSCs的移植也减少了颗粒细胞的凋亡并促进了颗粒细胞的增殖。而且, 上述结果均呈现剂量依赖性。此外, 相关基因表达的结果表明, 移植hUCMSCs后, POF大鼠卵巢中*Bcl-2*、*AMH*和*FSHR*的表达升高, *caspase-3*的表达下降。因此, 研究结果进一步验证了hUCMSCs促进细胞生长因子释放和增强组织再生的潜在机制, 并为干细胞在卵巢早衰治疗中的临床应用提供了理论基础。

关键词 卵巢早衰; 人脐带间充质干细胞; 大鼠; 卵巢; 原位注射

The Effect of *In Situ* Injection of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Premature Ovarian Failure in Rats

WU Yun^{1#}, WANG Hao^{2#}, WANG Zhe³, YU Hongliang², DAI Hongjian³, WEI Quanwei³,

SHI Fangxiong³, YAN Li^{2*}, HAN Linxiao^{4*}

(¹Urumqi Maternal and Child Health Hospital, Wulumuqi 830001, China; ²Asia Cellular Therapeutics (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201403, China; ³College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

⁴Changan Hospital of Dongguan, Dongguan 523583, China)

Abstract POF (premature ovarian failure) is one of the principal causes of female infertility. Although its causes are complex, autoimmune deficiency must be involved. hUCMSCs (human umbilical cord mesenchymal stem cells) can be used for tissue regeneration and repair. Therefore, the present study was designed to determine the role of hUCMSCs in immune factor-induced POF in rats. In the present study, different concentrations of hUCMSCs were injected into induced POF rats. Ovarian functions were examined by evaluating the estrus cycle, follicle-

收稿日期: 2021-06-29 接受日期: 2021-10-15

自治区创新环境建设专项——自然科学基金计划(批准号: 2019D01A17)、东莞市社会科技发展(重点)项目(批准号: 2019507150102149)和国家自然科学基金(批准号: 31972565)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 13999193467, E-mail: 605921279@qq.com; Tel: 13926833369, E-mail: slrmhanxiao@163.com

Received: June 29, 2021

Accepted: October 15, 2021

This work was supported by the Autonomous Region Innovation Environment Construction Project—Natural Science Plan (Grant No.2019D01A17), the Key Social Science and Technology Development Project of Dongguan, China (Grant No.2019507150102149) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31972565)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-13999193467, E-mail: 605921279@qq.com; Tel: +86-13926833369, E-mail: slrmhanxiao@163.com

ular morphology, hormonal secretion, and the proliferation and apoptosis of granulosa cells. The results showed that the estrus cycle of rats returned to normal and follicular development was significantly improved after transplantation of hUCMSCs. In addition, serum concentrations of E_2 (17-estradiol), P_4 (progesterone), and AMH (anti-Müllerian hormone) increased significantly with treatment. Transplantation of hUCMSCs also reduced the apoptosis of granulosa cells and promoted the proliferation of granulosa cells. All of these improvements were dose dependent. Furthermore, the results of related gene expression showed that transplanted human hUCMSCs upregulated the expression of *Bcl-2*, *AMH*, and *FSHR* in the ovary of POF rats and downregulated the expression of *caspase-3*. Thus, these results further validated the potential mechanisms of hUCMSCs in promoting the release of cell growth factors and enhancing tissue regeneration and provided a theoretical basis for the clinical application of stem cells in the treatment of premature ovarian failure.

Keywords POF; hUCMSCs; rat; ovarian; *in situ* injection

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指女性进入青春期并发育形成正常月经周期后, 由卵巢功能衰竭所导致的, 在40岁之前即出现闭经、卵巢萎缩、雌激素水平低和促性腺激素水平高等病症的疾病^[1]。随着社会压力的增大, POF患者的年龄也呈现年轻化趋势。目前, 全世界的POF发病率高达3%^[2]。POF的发病并没有明显的前兆, 并且发病过程不可逆, 严重时会出现卵泡池枯竭, 无法排卵, 从而造成不孕不育^[3]。POF的这些危害不仅给女性带来生理上的困扰, 更会给有生育需求的夫妻带来精神伤痛^[4]。因此, 在临床上寻找安全有效的治疗方法十分重要。

POF的致病原因十分复杂, 具体致病因素仍不明确, 大部分研究认为POF的产生原因多与卵巢损伤、遗传缺陷、自身免疫和环境毒害等因素有关^[5]。相关临床研究表明, 部分自身免疫性疾病与POF的病因存在关系, 这可能与免疫系统对卵巢组织的识别有误存在关系^[6]。POF女性中, 由自身免疫因素致病的约有30%, 这是最为常见的致病因素^[7]。目前, 对于POF采用最多的治疗方法为激素替代疗法(menopausal hormone therapy, HRT), 这种方法主要是通过给予患者雌激素, 进而调节病患体内的激素水平, 帮助卵泡恢复发育的环境从而排卵^[8]。HRT的治疗方法虽然能够暂时性解决女性的生育需求, 但并不能够从根源上治愈POF, 并且长期使用此方法会增加乳腺癌、中风、子宫癌等疾病的患病风险^[9]。因此, 找到一种能够恢复POF患者正常生理功能和生殖能力的安全治疗方法十分迫切。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有分化成各种特化细胞类型的潜力。MSCs对某些疾病的治疗效果已在多项临床试验中得到证实,

包括治疗心肌梗死^[10]、系统疾病^[11]和糖尿病^[12]等疾病, 并且包括骨髓、羊水和脂肪组织在内等许多不同来源的MSCs均已被证明对长期不孕和卵巢损伤有积极的治疗作用^[13-14]。虽然MSCs对于POF的作用机制仍然不明确, 但已有研究证明其能够成功到达卵巢并发挥一些作用, 并且越来越多的研究表明它们可以通过分泌生长因子来抑制基质细胞的凋亡^[15]。脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)不仅具备其他间充质干细胞的全部功能, 还具备便于采集与培养、增殖能力强、无免疫原性、无致瘤性等优点^[16-17]。尤其对于自身免疫性疾病, UC-MSCs的治疗效果更为突出, UC-MSCs及其分泌的细胞因子在多种免疫类疾病上得到了很好的应用^[18]。因此, 对于免疫性POF的治疗, UC-MSCs不失为最理想的细胞种子。然而, 目前关于人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)对于免疫性POF治疗作用的研究仍十分匮乏。

通过向大鼠注射卵巢抗原引起其自身免疫性卵巢炎症, 以此为基础研究hUCMSCs治疗免疫性POF的可行性, 这方面我们已经在前期发表了相关研究工作^[19]。为了进一步完善和推广我们的研究成果, 本研究通过卵巢形态学研究, 并对卵泡数量进行统计分析, 在上述基础上进一步检测细胞的增殖与凋亡, 进而探究人脐带间充质干细胞卵巢原位注射对POF的治疗效果, 从而为hUCMSCs治疗POF的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 从青龙山动物饲养场(中国南

京)购买了30只8周龄雌性无特定病原(SPF)级SD(sprague-dawley)大鼠。所有处理动物的程序均在南京农业大学动物福利委员会批准的规程下进行[许可证号: SYXY(苏)2017-007]。大鼠饲养环境昼夜节律正常,可自由采食饮水。所有模型建立环节均在无菌条件下进行,手术器械需严格消毒,术后饲养环境相同。

1.1.2 细胞 hUCMSCs制剂(aStem-M-POF™)以及相关材料和样品由Asia Stem Cell Regenerative Pharmaceutical Co., Ltd.提供,并储存于液氮中。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将hUCMSCs从液氮中取出,在37 °C水浴中解冻并以1 000 r/min的速度离心5 min,然后将细胞转移到培养皿中。用含10%胎牛血清的 α -MEM基础培养基培养细胞12 h。当细胞融合度达80%~90%时,用TrypLE在37 °C消化5 min,然后在显微镜下观察细胞的形态。同时,制备单细胞悬液并计数。以1 000 r/min的速度离心5 min,除去上清液,然后添加新的PBS以将细胞调整至所需浓度。

1.2.2 卵巢抗原制备 收集SD雌性大鼠($m \approx 250$ g)的卵巢组织。称重,生理盐水漂洗。在Tris-HCl缓冲液中低温超声粉碎5 min。离心(10 000 r/min、15 min、4 °C),取出上清液,调整浓度,使每毫升混合液中包含卵巢抗原原液200 mg。

1.2.3 POF大鼠模型建立 大鼠适应性饲养1周后,通过阴道涂片的方法观察动情周期,选取动情周期正常的健康雌性大鼠30只。随机分为对照组($n=10$)和早衰模型组($n=20$)。将模型组大鼠按每只0.35 mL卵巢抗原皮下多点注射免疫。建立卵巢早衰模型,共连续注射3次,每隔10天1次。第1次免疫时卵巢抗原与弗氏完全佐剂1:1混匀注射。第2、3次免疫时卵巢抗原与弗氏不完全佐剂1:1混匀注射。卵巢抗原注射后,连续2周观察大鼠发情周期变化规律,并结合血液中 E_2 、 P_4 和AMH水平变化,以及卵巢切片组织形态学观察综合评定卵巢早衰情况。

1.2.4 实验分组 实验分为卵巢原位注射组($n=9$)、POF空白对照组($n=6$)和空白对照组($n=6$)。在卵巢抗原注射2周后,挑选建模实验模型组中建模成功大鼠9只作为卵巢原位注射组进行单侧干细胞移植治疗;挑选建模实验模型组中建模成功大鼠6只作为POF对照组。空白对照组与尾静脉注射的空白对照组为同一组。空白对照组与POF组不进行任何处理,

保持正常饲养。

1.2.5 hUCMSCs原位移植治疗 取冻存好的F5代细胞进行细胞复苏后,用生理盐水轻轻吹洗细胞,制作成细胞悬液,并将其调至 1.6×10^7 个/mL,且细胞悬液应现用现配,保存在37 °C环境中,2 h内完成使用。大鼠单侧卵巢以原位注射间充质干细胞的方式进行治疗。通过腹腔注射,按照60 mg/kg剂量向每只大鼠注射苯巴比妥钠。15 min后,待大鼠完全麻醉,将大鼠腹部朝上固定于动物手术台上。用75%酒精进行皮肤消毒。用眼科镊捏住大鼠下腹部皮肤,用眼科剪横向剪一小口,眼科镊钝性分离,切开筋膜,将脂肪垫拖出,确定卵巢位置后用镊子固定住卵巢,然后用微量注射器向卵巢组织中注入25 μ L(包含 4×10^5 个细胞)hUCMSCs。

1.2.6 发情周期检查 大鼠的正常发情周期包括以下连续的4个阶段:发情前期、发情期、发情后期和间情期。我们根据白细胞、角质化上皮细胞和有核上皮细胞的存在或不存在来确定阶段。阴道细胞用盐水洗涤并转移到载玻片上,风干,并用吉姆萨染料溶液染色。在第3次免疫接种和hUCMSCs治疗后,每天连续观察大鼠阴道涂片2周。

1.2.7 动物处理及取材 治疗3周后,对大鼠进行摘眼球取血,所取血静置30 min后,4 000 r/min离心10 min,取上层血清至少0.5 mL。-20 °C保存,待测定血清中雌激素浓度。取血后将各组大鼠麻醉处死并解剖。取两侧新鲜卵巢组织,分别固定于组织固定液(4%多聚甲醛),用于制作组织切片。其中,卵巢原位注射组所制作切片区分为hUCMSCs原位移植注射侧和hUCMSCs原位移植非注射侧。

1.2.8 卵巢卵泡计数和形态分析 以每片5 μ m的厚度进行连续切片,每隔20 μ m取一张,每个组织取切片20片,经HE染色后,使用光学显微镜进行观察。根据各级卵泡特征按照如下标准对卵泡进行分级。

(1) 原始卵泡(primordial follicles): 卵母细胞由单层扁平状颗粒细胞包围。

(2) 初级生长卵泡(primary follicles): 一个完整的、扩大的卵母细胞,有可见的核,周围有一层或多层立方颗粒细胞。卵泡外围出现结缔组织的卵泡膜。

(3) 次级生长卵泡(secondary follicles): 具有两层或三层不含囊腔的立方颗粒细胞,早期的窦卵泡含有新出现的囊腔,并形成颗粒层,卵泡内壁有紧

密排列的卵泡细胞。卵泡膜分为内外两层。

(4) 成熟卵泡(mature follicles): 具有明显的卵丘和较大的卵泡腔。具有明确的卵丘颗粒细胞层。卵泡内膜细胞呈多边形, 可见微小的毛细血管; 外膜细胞呈梭形, 位于最外层, 与周围结缔组织分界不明显。

(5) 闭锁卵泡(atretic follicles): 卵细胞结构不完整, 卵泡壁塌陷, 颗粒细胞层松散甚至消失, 透明带皱缩。

根据以上标准对HE染色切片中的全部原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡进行镜下计数。

1.2.9 激素测定 为了评估 E_2 、 P_4 和AMH的血清水平, 在麻醉下对大鼠进行眼睑穿刺, 在建模和UCMSCs移植后收集血液, 并以3 000 r/min的速度离心血样10 min。所得血清采用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测血清中雌激素的浓度。

检测程序: 准备血清样品、稀释标准品, 向酶标包被板上分别滴加准备好的样品和相应浓度的稀释后标准品, 37 °C反应30 min后洗板5次, 加入酶标试剂, 37 °C反应30 min后洗板5次, 加入显色液A、B, 37 °C反应30 min, 加入终止液, 在15 min之内读取D值。计算检测范围为 E_2 : 3~80 ng/L, P_4 : 1~32 μ g/L, AMH: 6~200 pg/mL。批内变异系数<10%, 批间变异系数<15%。

1.2.10 PCNA的免疫组织化学染色 通过免疫组织化学SABC法标记增殖细胞核抗原PCNA检测卵巢组织细胞的增殖情况。将组织黏附到显微镜载玻片上来制备石蜡切片, 并在脱蜡和水合后, 用PBS清洗切片3次, 每次5 min。抗原热修复是在10%柠檬酸三钠中进行的。冷却至室温后, 将切片再次用PBS洗涤3次, 每次5 min。我们处理了新鲜的3% H_2O_2 用PBS摇动切片30 min以去除内源性过氧化氢酶。在PBS中摇晃后, 在室温下滴加正常的山羊血清封闭溶液1 h。去除多余的液体并添加第一抗体, 将切片在4 °C下孵育过夜。在PBS中摇晃后, 逐滴添加生物素化的第二抗体, 并将切片在室温下孵育2 h。在PBS中振摇后, 添加试剂SABC, 将切片在室温下孵育1 h。在PBS中摇晃后, 使用DAB显色试剂盒显色。最后, 用苏木精复染2 min, 用盐酸醇进行区分。最终用荧光显微镜观察切片。

1.2.11 凋亡测定 使用原位细胞死亡检测试剂盒通过TUNEL检测了组织化学片段化的DNA。将荧光素标记的核苷酸原位掺入到凋亡细胞DNA链断

裂的3'端。将石蜡切片在二甲苯中脱蜡(2次, 每次5 min), 然后逐渐用乙醇(分别为100%、90%、80%和75%)对切片进行再水化。将载玻片用PBS洗涤3次, 每次5 min, 然后在37 °C下与蛋白酶K一起温育20 min。将50 μ L的TdT酶反应混合物添加至样品中, 并将全部凝结物在37 °C的湿润气氛中于黑暗中孵育30 min。在PBS中将凝结物洗涤5 min, 向切片中加入抗生蛋白链菌素-荧光素试剂, 然后在37 °C的潮湿黑暗环境中孵育1 h。用PBS洗涤3次后, 细胞核用DAPI染色5 min, 卵巢中的凋亡细胞染成绿色。用荧光显微镜观察切片。

1.3 统计学分析

用SPSS 20.0采用One-Way ANOVA法进行方差分析和显著性检验。每组至少重复3次, 数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。 $*P<0.05$ 表示差异显著, $**P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 hUCMSCs原位移植后大鼠动情周期变化

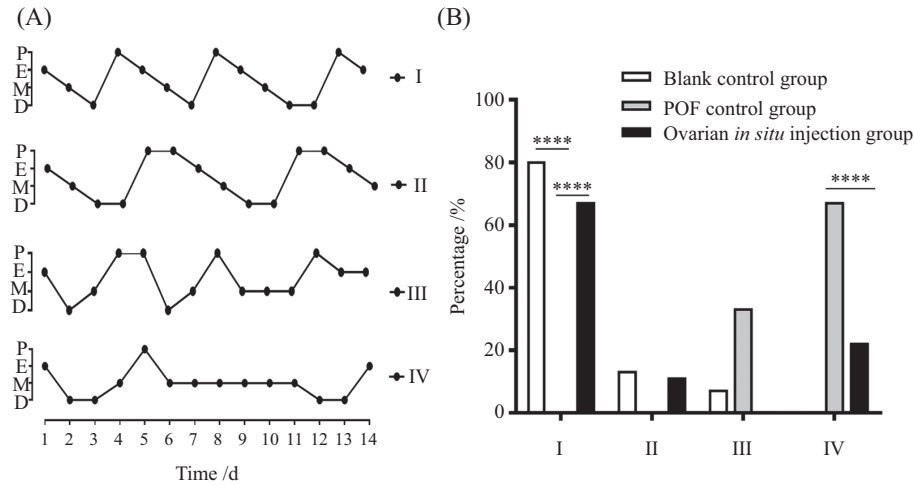
hUCMSCs原位注射后, 将大鼠动情周期按照循环情况进行分级(图1A), 循环异常程度(I~IV)分级如下: I, 正常; II, 发情周期延长的常规周期; III, 不规则的周期, 持续发情或出现某情期延长; IV, 无周期性。结果显示, 80%的空白对照组大鼠仍维持正常的动情周期。相比之下, POF组无大鼠显示出规律的循环; hUCMSCs原位注射组有66.7%的大鼠在hUCMSCs移植后显示出规律的循环(图1B)。结果表明, hUCMSCs原位注射对POF大鼠动情周期紊乱具有一定改善作用。

2.2 hUCMSCs原位移植后大鼠血清 E_2 、 P_4 和AMH测定

根据ELISA法测定大鼠血清中 E_2 、 P_4 和AMH的激素水平。结果显示, 与POF对照组相比, hUCMSCs原位移植血清中 P_4 含量显著提升(图2B) ($P<0.05$), E_2 和AMH水平有所提升, 但未表现出显著性差异。与健康的空白对照组大鼠相比较, E_2 和AMH含量存在显著差异($P<0.05$)(图2A和图2C), P_4 含量无差异。

2.3 hUCMSCs原位注射后卵巢组织HE染色形态学观察与各级卵泡计数

对hUCMSCs原位注射后的卵巢进行组织学检查以评估卵巢组织效应(图3A和图3C), 观察到健康

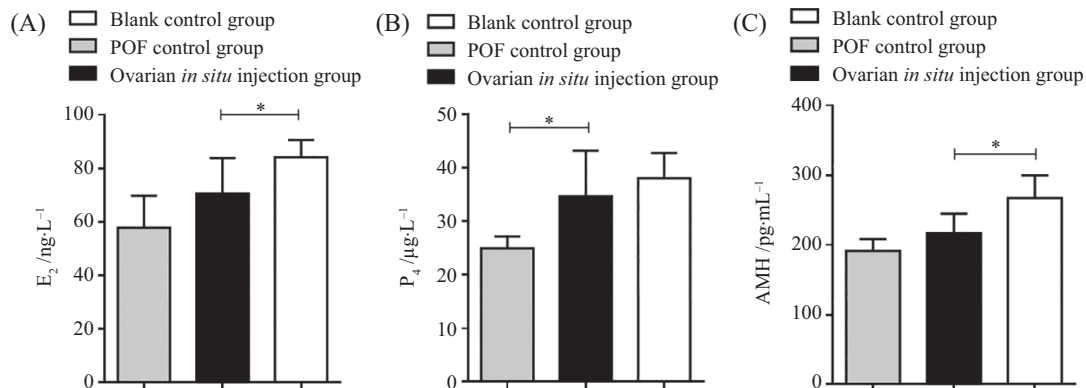


A: 鼠动情周期循环异常程度分级; B: hUCMSCs原位注射后, 各评级下空白对照组、POF组和hUCMSCs原位注射组的大鼠所占百分比。**** $P < 0.0001$ 。

A: classification of the degree of abnormality of the estrous cycle in rats; B: percentage of rats in the blank control group, POF group and hUCMSCs *in situ* injection group after *in situ* injection of hUCMSCs. **** $P < 0.0001$ 。

图1 hUCMSCs原位注射后大鼠动情周期循环异常程度分级及数量统计

Fig.1 Grading and statistics of the estrous cycle abnormality of rats after *in situ* injection of hUCMSCs



A: 血清中E₂的水平; B: 血清中P₄的水平; C: 血清中AMH的水平。* $P < 0.05$ 。

A: E₂ level in serum; B: P₄ level in serum; C: AMH level in serum. * $P < 0.05$ 。

图2 hUCMSCs原位注射后大鼠血清E₂、P₄和AMH含量

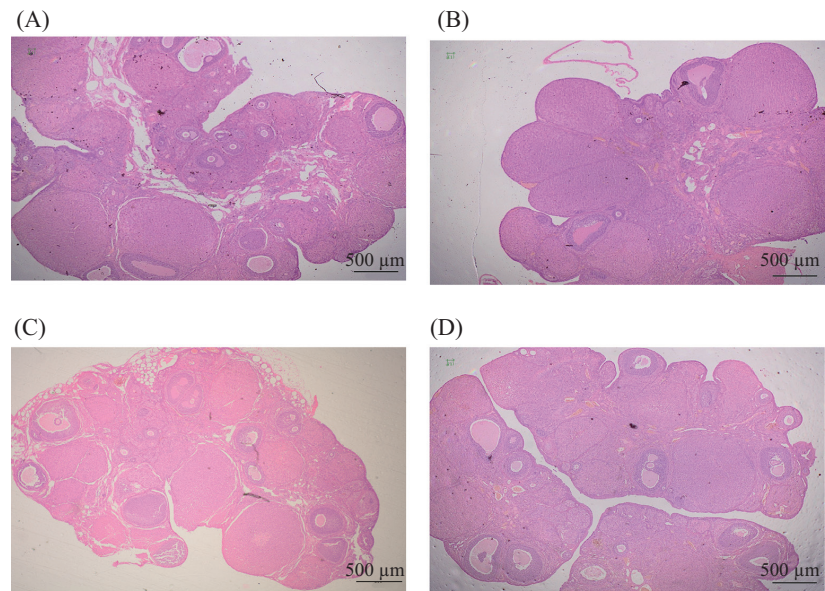
Fig.2 Serum concentrations of E₂, P₄ and AMH in rats after *in situ* injection of hUCMSCs

的空白对照组大鼠的卵巢包含大量各个阶段的健康卵泡, 包括原始卵泡、初级卵泡, 次级卵泡和成熟卵泡(图3A)。相反, POF对照组大鼠的卵巢显示萎缩的卵巢, 生长卵泡少, 闭锁卵泡增多, 可见黄体, 少有成熟卵泡, 各个阶段的卵泡数量减少(图3B)。相比之下, 接受hUCMSCs原位注射后的大鼠卵巢结构得到了一定程度的改善, 卵巢结构相对完整, 发育良好, 可见各级卵泡, 存在较多黄体 and 成熟大卵泡(图3C)。采用与之前相同的卵泡分类方法进行卵泡计数与统计学比较(表1)。结果表明, 与空白对照组的健康大鼠相比hUCMSCs原位注射组大鼠的各级卵泡数量

并无显著性差异; 与POF对照组相比较, hUCMSCs原位注射组大鼠的初级卵泡、成熟卵泡和黄体的数量显著增加($P < 0.05$)。结果说明, hUCMSCs原位注射对POF治疗起到了一定积极作用。

2.4 原位注射hUCMSCs后检测PCNA

PCNA是一种DNA聚合酶的辅助蛋白, 可作为评价细胞增殖状态的指标。PCNA免疫组化检测卵巢组织中的细胞增殖情况。结果显示, 健康的空白对照组大鼠卵巢显示存在细胞增殖(图4A), 而POF对照组卵巢组织中只能观察到极少数的增殖细胞(图4B)。hUCMSCs原位注后, 增殖细胞数量明显增



A: 空白对照组; B: POF组; C: 卵巢原位注射组注射侧; D: 卵巢原位注射组非注射侧。
A: blank control group; B: POF group; C: injection side of ovarian *in situ* injection group; D: non-injection side of ovarian *in situ* injection group.

图3 hUCMSCs原位注射后卵巢组织HE染色图

Fig.3 HE staining of ovarian tissue after *in situ* injection of hUCMSCs

表1 hUCMSCs原位注后的大鼠卵巢的卵泡和黄体计数

Table 1 Follicle and corpus luteum counts of rat ovaries after *in situ* injection of hUCMSCs

组别	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡	成熟卵泡	黄体
Group	Primordial follicles	Primary follicles	Secondary follicles	Mature follicles	Corpus luteum
Blank control group	598.3±36.91 ^a	95.25±10.99 ^a	53.75±7.16 ^a	6.75±0.48 ^a	13.75±1.11 ^a
POF control group	432.5±30.24 ^b	48.95±6.12 ^b	36.58±5.03 ^b	2.37±0.61 ^b	5.25±0.46 ^b
Ovarian <i>in situ</i> injection group	537.7±38.63 ^a	81.67±11.29 ^a	40.33±8.29 ^{ab}	5.75± 0.85 ^a	13.00±1.16 ^a

字母相同代表无显著性差异, 字母不同代表具有显著性差异, $P<0.05$ 。
The same letter represents no significant difference, and different letters represent significant difference, $P<0.05$.

多(图4C和图4D)。

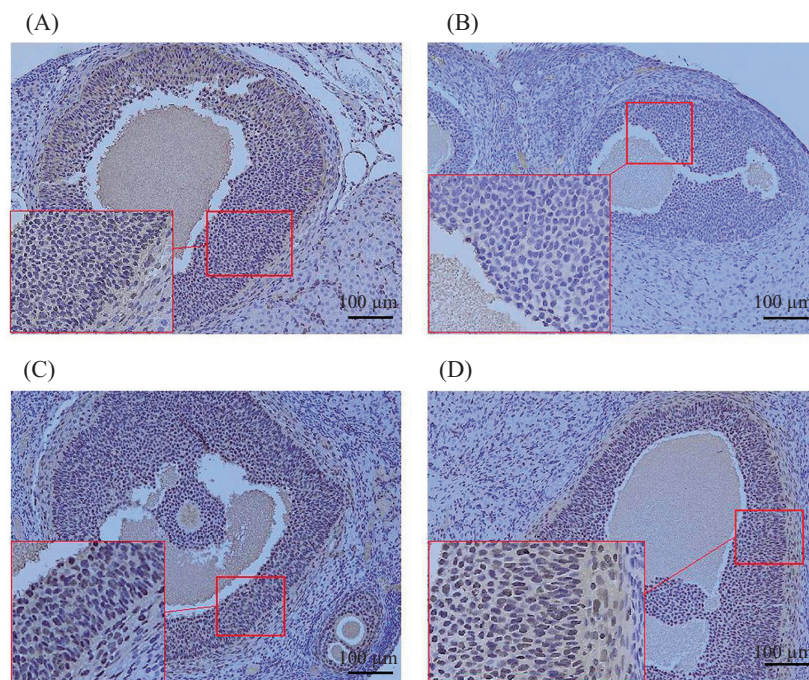
2.5 hUCMSCs原位注射后TUNEL法检测卵巢细胞细胞凋亡

通过TUNEL检测卵巢组织中的细胞凋亡。如图5结果显示, 健康的空白对照组大鼠卵巢大多数为健康卵泡, 细胞凋亡无明显增加。POF对照组卵巢组织中观察到大量的凋亡细胞。经hUCMSCs原位注射后, 卵巢切片中的凋亡细胞(绿色荧光部分)的数量明显减少。这表明hUCMSs移植减少了POF大鼠卵巢中的细胞凋亡。

3 讨论

我们的研究结果表明, 单侧原位注射后的POF大鼠的双侧卵巢功能均得到了改善, 主要表现为动情周期趋于规律化, 血液中E₂、AMH、P₄等雌激素

水平恢复至正常水平。在PCNA细胞增殖的免疫组化以及TUNEL细胞凋亡的检测中, 我们发现原位移植hUCMSCs减少了卵巢内细胞凋亡, 促进了颗粒细胞增殖和卵泡发育。单侧注射后, 双侧卵巢功能均得到改善, 这可能与一侧优势卵巢对另一侧劣势卵巢的补足有关^[20]。相关研究表明, 干细胞可以通过血液循环将其自身和其外泌体扩散至机体各个器官处^[21-22], 这也可能为双侧卵巢功能恢复的原因。内分泌调节同样恢复了各类雌激素的正常水平。这使受损卵巢的组织形态得到改善, 提升卵泡发育的数量和质量。除激素变化外, 通过卵巢组织病理学的观察, 发现健康卵泡数量也增加, 卵巢组织中卵巢颗粒细胞(granulosa cells, GCs)凋亡减少。在我们的研究中, 我们对卵巢组织中的细胞增殖进行了检测, 发现在hUCMSCs移植后, 卵泡发育得到了明显的改



A: 空白对照组; B: POF对照组; C: 卵巢原位注射组注射侧; D: 卵巢原位注射组非注射侧。

A: blank control group; B: POF control group; C: injection side of ovarian *in situ* injection group; D: non-injection side of ovarian *in situ* injection group.

图4 PCNA免疫组织化学染色检测卵巢中的细胞增殖

Fig.4 PCNA immunohistochemical staining detection of cell proliferation in ovaries

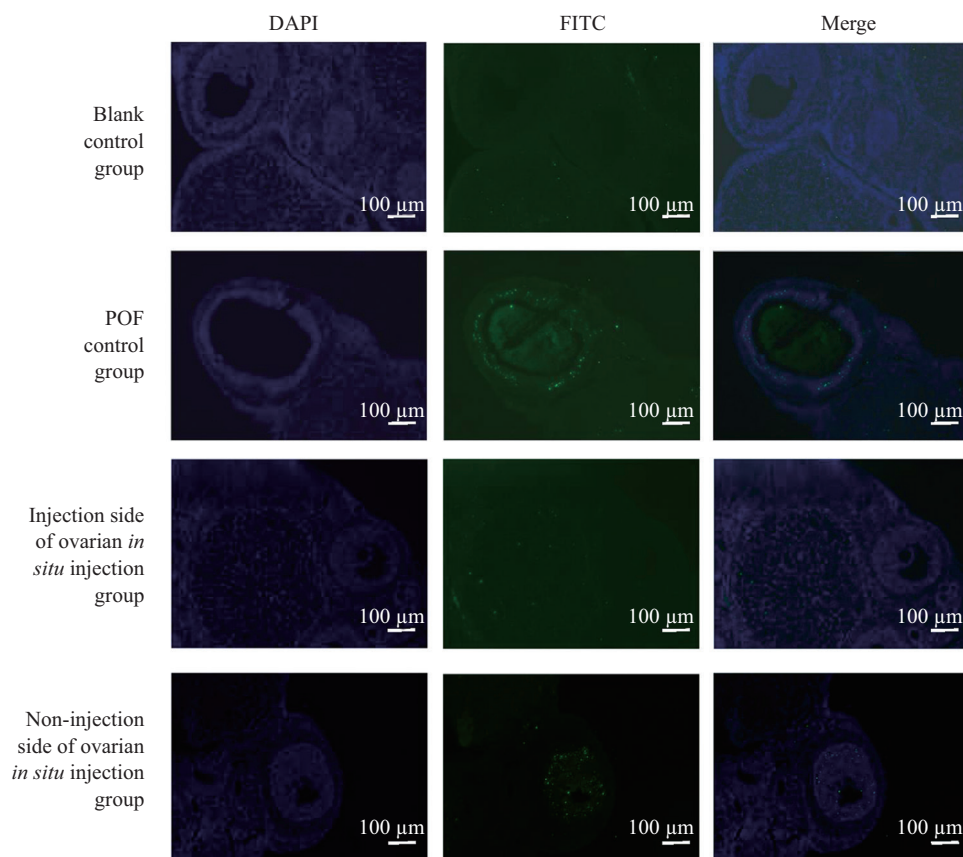


图5 TUNEL法检测卵巢细胞细胞凋亡

Fig.5 TUNEL assay detection of apoptosis in ovarian cells

善,且观察到明显的细胞增殖现象,尤其体现在发育卵泡中。据报道,卵巢GCs在卵母细胞生成过程中发挥关键作用^[23]。我们的卵巢GCs细胞凋亡结果显示,hUCMSCs的移植减少了大的二级和窦卵泡中GCs的凋亡。移植hUCMSCs对GCs凋亡的抑制作用可能对POF大鼠恢复卵泡发育起到促进作用;然而,hUCMSCs改善卵巢功能的作用究竟是基于何种机制仍有待于进一步研究。

MSCs可分化为机体的多种组织。研究表明,MSCs可参与机体免疫调节,其分泌的多种细胞因子能够促进内源性细胞增殖与组织生长,修复受损组织^[24-26]。目前,MSCs可通过外源性移植对自身免疫性疾病^[27]、内分泌系统疾病^[28]、心脑血管疾病^[29]、组织损伤等创伤^[30-31]进行治疗。在组织器官衰老退变等相关病症上,具有改善相关症状的作用^[32]。但干细胞对卵巢改善的作用以及其内在机制仍有待研究^[33]。有研究表明,干细胞能够通过其外泌体对免疫炎症进行治疗^[34]。也有研究显示,干细胞具有多向分化潜能,能够在靶器官和组织的环境内分化成特定细胞,从而进行组织修复^[35]。目前干细胞的移植主要包括尾静脉注射法^[36]、腹腔注射法和原位注射法^[37]。我们的实验主要通过单侧卵巢的原位注射,以证明其治疗效果。

干细胞疗法是治疗女性不孕症或恢复卵巢功能的新选择。许多研究已经证实,MSCs治疗对POF动物模型卵巢功能具有保护作用。有研究表明,干细胞可被诱导分化为特定的组织或器官样细胞,干细胞移植到特定微环境中,受到生态微环境刺激,其细胞生长因子释放从而促进周围组织再生^[38-39]。但具体机制仍需要进一步探究。原位注射法具备其特有的优点,这种方法更为直接,并且所需要消耗的细胞数量少。卵巢原位注射虽然会对患者卵巢造成物理性创伤,但局部注射能够保证丰富的移植剂量^[40]。相比较而言,我们之前的研究通过尾静脉注射不同剂量的hUCMSCs对POF大鼠进行治疗,在hUCMSCs移植2周后,观察到POF大鼠的卵巢功能得到大大改善,其中包括动情周期也趋于规律化^[19]。因此,该研究进一步补充了脐带间充质干细胞治疗效果方面的相关数据。MSCs已成为细胞治疗临床应用中最有效的细胞类型,我们结合本课题组先前的研究结果进一步验证了hUCMSCs可以通过上调颗粒细胞中抗苗勒管激素和促进激素相关基因的表达来抑制

颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁,从而促进卵巢功能的恢复。

4 结论

hUCMSCs移植治疗POF大鼠后,大鼠卵巢萎缩情况有所改善,各级卵泡数目增多,血清中的雌激素水平升高,这促进了卵巢组织中颗粒细胞增殖,同时,颗粒细胞的凋亡减少,表明了hUCMSCs对大鼠POF具有一定的治疗作用。因此,我们的研究进一步验证了MSCs制剂可以通过不同给药方式达到有效的治疗效果。因此,在未来的临床应用上,卵巢原位注射可作为治疗卵巢早衰的一项行之有效的办法。

参考文献 (References)

- [1] MCGUIRE M M, BOWDEN W, ENGEL N J, et al. Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(5): 1595-600.
- [2] SHELLING A N. Premature ovarian failure [J]. *Reproduction*, 2010, 140(5): 633-41.
- [3] BECK-PECCOZ P, PERSANI L. Premature ovarian failure [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1(1): 16-9.
- [4] TARACIUK M, NOLTING M, FERNANDEZ G, et al. Psychological assessment of patients with premature ovarian failure [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2009, 24(1): 44-53.
- [5] GOSWAMI R, GOSWAMI D, KABRA M, et al. Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders [J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(4): 1052-4.
- [6] LABARBERA A R, MILLER M M, OBER C, et al. Autoimmune etiology in premature ovarian failure [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 16(3): 115-22.
- [7] 冯念, 曹作增. 自身免疫性卵巢早衰患者血清TBP2, BMP15的临床意义[J]. 中国计划生育学杂志(FENG N, CAO Z Z. The clinical significance of TBP2 and BMP15 levels in autoimmune premature ovarian failure [J]. *Chin J Fam Plan*), 2020, 28(4): 550-2.
- [8] 朱建萍. 激素替代疗法联合补肾疏肝调经方治疗卵巢早衰患者的效果[J]. 中国民康医学(ZHU J P. Hormone replacement therapy combined with kidney oligo liver transfer effects to treat ovarian premature aging patients [J]. *Medical Journal of Chinese People's Health*), 2020, 32(23): 79-81.
- [9] ROBERTS H. Managing the menopause [J]. *BMJ*, 2007, 334(7596): 736-41.
- [10] YAMAWAKI-OGATA A, HASHIZUME R, FU X M, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysms [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(3): 278.
- [11] HARRIS V K, FAROQUI R, VYSHKINA T, et al. Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis [J]. *Stem Cell Transl Med*,

- 2012, 1(7): 536-47.
- [12] ANZALONE R, LO IACONO M, LORIA T, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2011, 7(2): 342-63.
 - [13] LIU T, HUANG Y, GUO L, et al. CD44⁺/CD105⁺ human amniotic fluid mesenchymal stem cells survive and proliferate in the ovary long-term in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure [J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(7): 592-602.
 - [14] TAKEHARA Y, YABUUCHI A, EZOE K, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(2): 181-93.
 - [15] LIU J, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats [J]. *Mol Cells*, 2014, 37(12): 865-72.
 - [16] FAN C, WANG D, ZHANG Q, et al. Migration capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells towards glioma *in vivo* [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(22): 2093-102.
 - [17] 姚映灵, 何玲, 毕杨, 等. 人滑膜间充质干细胞与人脐带间充质干细胞的生物学性状比较[J]. *中国细胞生物学学报*(YAO Y L, HE L, BI Y, et al. Comparison of biological characteristics of human synovial mesenchymal stem cells and human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Cell Biol*), 2021, 43(2): 302-10.
 - [18] 刘梦婷, 饶巍, 韩兵, 等. 人脐带间充质干细胞的体外免疫调节特性[J]. *中国组织工程研究*(LIU M T, RAO W, HAN B, et al. Immunomodulatory characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*), 2020, 24(7): 1063-8.
 - [19] WANG Z, WEI Q W, WANG H, et al. Mesenchymal stem cell therapy using human umbilical cord in a rat model of autoimmune-induced premature ovarian failure [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020(11): 1-13.
 - [20] FU X, HE Y, XIE C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(4): 353-63.
 - [21] 杨学军, 胡玉菊. 单、双侧卵巢切除对围绝经期女性生活质量的影响[J]. *中国妇产科临床杂志*(YANG X J, HU Y J. Effect of single, bilateral ovarian resection on the quality of women's life [J]. *Chin J Clin Obstetrics Gynecol*), 2017(1): 71-2.
 - [22] 杜磊, 汤间仪, 马伟琼, 等. MRI活体示踪PEG/PEI-SPIO标记脂肪源性干细胞移植治疗AD大鼠模型[J]. *中国介入影像与治疗学*(DU L, TANG J Y, MA W Q, et al. *In vivo* MRI tracking after transplantation of PEG/PEI-SPIO labeled adipose derived stem cells in AD rats models [J]. *Chinese Journal of Interventional Imaging and Therapy*), 2020, 17(11): 679-84.
 - [23] 衣志爽, 王植海, 李明, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体抑制髓母细胞瘤Daoy细胞增殖并促其凋亡[J]. *中国组织工程研究*(YI Z S, WANG Z H, LI M, et al. Exosomes from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells suppress the proliferation and promote the apoptosis of medulloblastoma Daoy cells [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*), 2021, 25(31): 4945-9.
 - [24] DOLMANS M M, DEMYLLE D, MARTINEZ-MADRID B, et al. Efficacy of *in vitro* fertilization after chemotherapy [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(4): 897-901.
 - [25] ZAREI-KHEIRABADI M, SADROSADAT H, MOHAMMAD-SHIRAZI A, et al. Human embryonic stem cell-derived neural stem cells encapsulated in hyaluronic acid promotes regeneration in a contusion spinal cord injured rat [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 148: 1118-29.
 - [26] DING C, ZOU Q, WANG F, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 55.
 - [27] CHEN Y, YU Q, HU Y, et al. Current research and use of mesenchymal stem cells in the therapy of autoimmune diseases [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(7): 579.
 - [28] WANG W, WU R D, CHEN P, et al. Liraglutide combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation inhibits beta-cell apoptosis via mediating the ASK1/JNK/BAX pathway in rats with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2019, 36(2): 3212.
 - [29] 李轩, 石春来, 王雪艳, 等. 干细胞移植治疗心肌梗死: 国际研究前沿与发展趋势可视化分析[J]. *中国组织工程研究*(LI X, SHI C L, WANG X Y, et al. Stem cell transplantation in the treatment of myocardial infarction: a visual analysis of international research forefront and development trend [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*), 2014, 18(50): 8189-95.
 - [30] BYDON M, DIETZ A B, GONCALVES S, et al. CELLTOP clinical trial: first report from a phase 1 trial of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of paralysis due to traumatic spinal cord injury [J]. *Mayo Clin Proc*, 2020, 95(2): 406-14.
 - [31] ALTAMIRANO D E, NOLLER K, MIHALY E, et al. Recent advances toward understanding the role of transplanted stem cells in tissue-engineered regeneration of musculoskeletal tissues [J]. *F1000Res*, 2020, 9: 118.
 - [32] 单莎瑞, 黄国志. 干细胞抗衰老的理论研究与进展[J]. *中国组织工程研究*(SHAN S R, HUANG G Z. Research and progress in stem cell anti-aging theory [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*), 2013, 17(23): 4347-54.
 - [33] 杨稍稍, 王焱, 申倩倩, 等. 胎盘间充质干细胞治疗卵巢早衰的机制[J]. *医学综述*(YANG S S, WANG Y, SHEN Q Q, et al. Mechanism of Placental mesenchymal stem cells in treatment of premature ovarian failure [J]. *Med Recapitulate*), 2020, 26(13): 2539-43,48.
 - [34] 马铭辰, 刘尧. 间充质干细胞外泌体对组织再生的作用及其机制的研究进展[J]. *中国医科大学学报*(MA M C, LIU R. The effects and underlying mechanisms of exosomes derived from mesenchymal stem cells on tissue regeneration [J]. *J Chin Med Univ*), 2019, 49(2): 161-4.
 - [35] 秦杰, 王晓春. 牙髓干细胞来源条件培养基促进组织修复与再生的研究进展[J]. *医学综述*(QIN J, WANG X C. Research progress of dental pulp stem cell-derived conditioned medium in promoting damaged tissue repair and regeneration [J]. *Med Recapitulate*), 2019, 25(12): 2316-20.
 - [36] LEE H J, SELESNIEMI K, NIKURA Y, et al. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure [J]. *Clin J Am Soc Nephro*, 2007, 25(22): 3198-204.

- [37] LAI D, WANG F, DONG Z, et al. Skin-derived mesenchymal stem cells help restore function to ovaries in a premature ovarian failure mouse model [J]. PLoS One, 2014, 9(5): 98749.
- [38] PATEL A N, GEFFNER L, VINA R F, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study [J]. J Thorac Cardiovasc, 2005, 130(6): 1631-8.
- [39] RANGANATH S, LEVY O, INAMDAR M, et al. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(3): 244-58.
- [40] 章婷婷, 章蒙蒙, 方小玲, 等. 脂肪间充质干细胞移植对环磷酰胺诱导的大鼠卵巢功能损伤的影响[J]. 中南大学学报(医学版)(ZHANG T T, ZHANG M M, FANG X L, et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on cyclophosphamide-induced ovarian damage in rats [J]. J C South Univ, Medical Science), 2019(7): 731-40.