

张娟,王晶,周丽,等. 脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔性激素、CYR61 和 CTGF 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 56-62.

Zhang J, Wang J, Zhou L, et al. Effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the expression of sex hormones CYR61 and CTGF in rabbits with premature ovarian failure [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 56-62.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.03.010

脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔性激素、CYR61 和 CTGF 表达的影响

张娟^{1*}, 王晶¹, 周丽², 庾平¹, 王刚³, 朱楚超¹

(1.中国人民解放军中部战区总医院妇产科,武汉 430070; 2.湖北中医药大学,武汉 430065;
3.中国人民解放军中部战区总医院医学实验科,武汉 430070)

【摘要】 目的 探讨脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔性激素、CYR61 和 CTGF 表达的影响,揭示其治疗作用及其内在机制。**方法** 将 10 只家兔随机分为模型组和治疗组各 5 只,均采用腹腔注射 CTX (50 mg/(kg·d),连续 2 d)建造 POF 模型,其中治疗组采用耳缘静脉注射 UCMSCs (5×10⁶/mL,每次 2 mL,连续 3 d)治疗,模型组注射等量的灭菌用水。分别在 UCMSCs 治疗后 0 d、7 d、14 d 和 28 d 抽取静脉血,分析血清激素水平变化;在 UCMSCs 治疗 28 d 后取卵巢组织标本,检测卵巢组织内 CYR61 和 CTGF 蛋白及其 mRNA 的表达。**结果** 1、模型组和治疗组在未治疗前血清 E2 和 FSH 水平无差异,有可比性($P>0.05$)。治疗后家兔血清 E2 水平上升,FSH 水平下降,与模型组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),并且随着时间出现周期性波动;而模型组家兔一直处于低 E2 和高 FSH 水平,随着时间未出现周期性的波动。2、与模型组相比,治疗组 CYR61 和 CTGF 蛋白表达明显增多,差异均有统计学意义($t_{CYR61}=8.688, P<0.05; t_{CTGF}=10.142, P<0.05$)。3、与模型组相比,治疗组 CYR61 和 CTGF mRNA 表达水平明显升高,差异均有统计学意义($t_{CYR61}=38.156, P<0.05; t_{CTGF}=14.646, P<0.05$)。4、CYR61 和 CTGF 主要表达在颗粒细胞和卵泡细胞膜,与模型组相比,治疗组表达明显增多,差异均有统计学意义($t_{CYR61}=3.981, P<0.05; t_{CTGF}=4.111, P<0.05$)。**结论** 脐带间充质干细胞治疗能改善 POF 家兔性激素水平,上调 CYR61 和 CTGF 的表达,从而激活休眠卵泡生成、恢复卵巢功能,对 POF 起到治疗作用。

【关键词】 脐带间充质干细胞;卵巢早衰;环磷酰胺;性激素;家兔

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0056-07

Effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the expression of sex hormones CYR61 and CTGF in rabbits with premature ovarian failure

ZHANG Juan^{1*}, WANG Jing¹, ZHOU Li², TUO Ping¹, WANG Gang³, ZHU Chuchao¹

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070, China.
2.Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065.
3.Department of Medical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2018CFC806)。

[作者简介] 张娟(1971—),女,副主任医师,博士,硕士生导师,研究方向:不孕不育生殖内分泌研究。E-mail:ZHANGL27@126.com

expression of sex hormones CYR61 and CTGF in rabbits with premature ovarian failure, and to reveal the treatment effects and associated mechanism. **Methods** Ten rabbits were randomly divided into a model group and a treatment group. The model of premature ovarian failure (POF) was established by intraperitoneal injection of CTX [50 mg/(kg·d), 2 consecutive days]. The treatment group was treated with UCMSCs (5×10^6 /ml, 2 ml each time for 3 days), and the model group was injected with the same amount of sterile water. Venous blood was taken at 0, 7, 14, and 28 days after UCMSC treatment, and analyzed for changes in hormone levels by ELISA. Ovarian tissue samples were taken 28 days after UCMSC treatment to detect CYR61 and CTGF proteins and their associated mRNA expression. **Results** There were no differences in E2 and FSH levels between the two groups before treatment ($P > 0.05$). After treatment, E2 level in the treatment group increased and the level of FSH decreased. Compared with the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and in the treatment group, the level of sexual hormone fluctuated periodically with time. Meanwhile, the model group rabbits always had a low E2 level and a high FSH level, and they did not show periodic fluctuations over time. Also, compared with the model group, the expression of CYR61 and CTGF in the treatment group was significantly increased, and the difference was statistically significant ($t_{CYR61} = 8.688, P < 0.05$; $t_{CTGF} = 10.142, P < 0.05$). In addition, compared with the model group, the expression levels of CYR61 and CTGF mRNA in the treatment group were significantly increased, and the differences were statistically significant ($t_{CYR61} = 38.156, P < 0.05$; $t_{CTGF} = 14.646, P < 0.05$). CYR61 and CTGF were mainly expressed in the granulosa cells and follicular cell membranes. Compared with the model group, this expression of the treatment group was significantly increased, and the difference was statistically significant ($t_{CYR61} = 3.981, P < 0.05$; $t_{CTGF} = 4.111, P < 0.05$). **Conclusions** Umbilical cord-mesenchymal stem cell therapy can improve sex hormone levels, and upregulate the expression of CYR61 and CTGF in rabbits with POF, thereby activating sleep follicles, restoring ovarian function, and treating POF.

[Keywords] umbilical cord-derived mesenchymal stem cell; premature ovarian failure; cyclophosphamide; sex hormone; rabbit

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指 40 岁以下的妇女卵巢内卵泡迅速减少, 没有或几乎没有卵泡残留的一种疾病, 临床以无生育能力和闭经为主要表现^[1]。该病临床发病率为 1%, 但一旦发病, 常给患者带来身体上和心理上的双重打击, 患者会出现焦虑、抑郁等精神症状^[2]。研究显示, 该病的发生可能与自身免疫、代谢、感染和医源性因素等有关^[3-4]。目前临床上普遍的治疗方式为激素替代疗法^[5], 虽能改善临床症状, 但很难恢复卵巢功能, 而且长期使用会增加患癌症的风险, 所以临床上亟待寻求一种更加有效和安全的治疗方法。研究阐明^[6], 脐带间充质干细胞 (umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UCMSCs) 具有自我更新、多方向分化、促进损伤修复和调节免疫等功能, 并且有取材简单、免疫原性低、无伦理学争议等优点。近来有研究显示^[7-8], UCMSCs 能依赖于旁分泌提高卵巢储备, 在治疗 POF 中起到一定疗效, 是针对 POF 的非常有前景的一种疗法。本实验研究以家兔为对象, 观察 UCMSCs 治疗后富半胱氨酸蛋白 61 (CYR61) 和结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达、mRNA 的表达和激素水平变化, 探讨研究 UCMSCs 对卵巢早衰的治疗作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取普通级 5 月龄雌性未交配日本大耳兔 10 只, 体重 2.6~2.8 kg, 购自武汉市万千佳兴生物科技有限公司 [SCXK (鄂) 2016-0011], 饲养于中国人民解放军中部战区总医院医学实验中心 [SYXK (鄂) 2014-0082], 室温为 (22±2)℃, 相对湿度为 50~60%, 12 h 明暗交替光照, 自由饮食饮水, 适应性饲养 1 周, 经阴道脱落细胞涂片检查确定其动情周期正常后开始实验。实验方案经我院伦理委员会批准 (2016020), 按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

注射用环磷酰胺 (Baxter Oncology GmbH, 注册证号: H20110407); 兔雌二醇酶联免疫试剂盒 (武汉博欧特生物科技有限公司, 产品编号: orb409999); 兔促卵泡激素酶联免疫试剂盒 (武汉博欧特生物科技有限公司, 产品编号: orb410001); cDNA 第一链合成试剂盒 (RevertAid RT Reverse Transcription Kit, K1621, Thermo)、反转录试剂盒 (SYBR FAST qPCR Master Mix, KK4604, sigma); CYR61 兔抗兔多克隆抗体 (Novus, NB100-356); CTGF 兔抗兔多克隆抗

体 (Boster, BA0752); GAPDH 小鼠抗兔单克隆抗体 (Abcam, ab8245); 流式抗体 APC Mouse anti-Human CD29 (BD, 559883)、PE Mouse anti-Human CD34 (BD, 550761)、PE Mouse anti-Human CD44 (BD, 561858)、BB515 Mouse anti-Human CD45 (BD, 564585); LightCycle 96 型荧光定量 PCR 仪 (ROCHE); L600 型离心机 (湘仪仪器厂); RM2016 型轮转式切片机 (上海徕卡仪器有限公司); BX51 型奥林巴斯荧光显微镜; YD-6 L 生物组织包埋机 (金华市益迪医疗设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

根据团队前期研究^[9],以 50 mg/kg 剂量连续注射 2 d 是建立环磷酸胺 (CTX) 诱导家兔 POF 模型的最佳造模方式。故本实验采取 CTX 腹腔注射的方法建造 POF 模型,10 只家兔均用 CTX 50 mg/(kg·d) 腹腔注射,连续注射 2 d。造模后家兔出现不同程度脱毛,进食减少,活动反应降低,体重下降等症状,并且采血检查显示有血清雌二醇 (E2) 水平下降,促卵泡生成素 (FSH) 水平上升。

1.3.2 分组

采用随机数字表法将 10 只家兔随机分为模型组和治疗组各 5 只。

1.3.3 干预

(1)UCMSCs 培养及鉴定

取中国人民解放军中部战区总医院妇产科足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带,产妇签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准。所取标本用 PBS 冲洗干净,并剔除血管,将组织处理至 1~2 mm,加入培养基 (10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养液),置于 5% CO₂、37℃ 饱和湿度培养箱中培养。5~7 d 后第 1 次传代后每 3 d 按 1:3 比例传代,进行扩增培养。取第 3 代 UCMSCs,制成单细胞悬液 200 μL 于 EP 管,分别加入抗体 CD29-APC (20 μL)、CD34-PE (20

μL)、CD44 -PE (20 μL)、CD45-BB515 (5 μL),室温避光孵育 20 min,流式细胞仪检测结果显示:贴壁细胞表达 CD29 和 CD44,不表达 CD34 和 CD45,为人体脐带间充质干细胞。详见图 1。

(2)干预治疗

治疗组 5 只 POF 家兔在造模一周后,通过耳缘静脉注射 5×10⁶/mL 的 UCMSCs,每天注射 2 mL,连续注射 3 d。模型组注射等量的灭菌用水。

1.3.4 观察指标

(1)激素水平测定

UCMSCs 治疗后 0 d、7 d、14 d 和 28 d,分别取模型组和治疗组家兔各 3 只,抽取静脉血查激素水平。

(2)卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白表达

采用蛋白免疫印迹法检测。治疗 28 d 后,将两组家兔处死后取一侧卵巢,切取适量新鲜组织液氮速冻,放入 -80℃ 冰箱中,后取 100 mg 剪切成细小的碎片,加入 1000 μL RIPA 裂解液,匀浆,充分裂解,12000 r/min 离心 5 min,取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。每个样本取 40 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,按浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳,至溴酚蓝刚出胶。将凝胶上蛋白转至 PVDF 膜,按 150 mA 恒流转膜。稀释一抗 (CRY61:1/200, CTGF:1/1000, GAPDH:1/2000),4℃ 过夜,二抗 (TBST 溶解的 5%脱脂牛奶)稀释 10000 倍,室温下 30 min,TBST 洗膜,滴加等体积混匀 ECL 显影液,放入凝胶成像仪中曝光成像。以 GAPDH 作为内参,采用 Image J 1.8.0 软件分析灰度值。

(3)卵巢组织 CYR61 和 CTGF mRNA 表达

采用实时荧光定量 PCR 技术检测。卵巢组织按 Trizol 法提取总 RNA,测定纯度和浓度,逆转录后进行扩增。引物:GAPDH:上游 5'-TTCCACGGCACGGTCAAG-3',下游 5'-ACTCGGCACCAGCATCAC-3';CYR61:上游 5'-GAAGTCTCCCGAAGCAGTCAG-

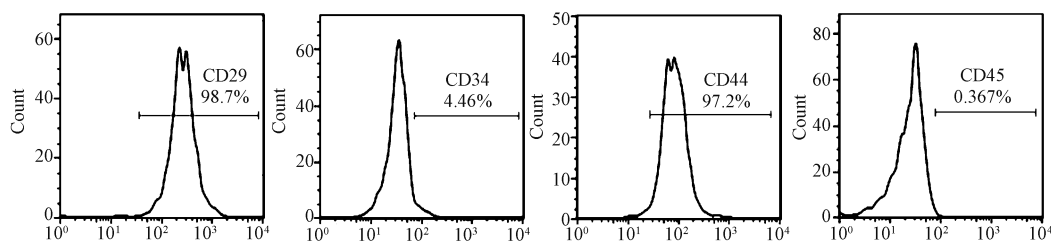


图 1 UCMSCs 流式细胞仪检测结果

Figure 1 Changes of UCMSCs detected by flow cytometry

3',下游 5'-GTCTCGCCGTCCTCACAG-3';CTGF:上游 5'-GGAGTGGGTGTGTGACGAG-3',5'-CCGCAGGTCTTGAACAGG-3',采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量分析。

(4)免疫组化检测卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白表达

除上述冻存新鲜组织外,剩余组织放入 4%多聚甲醛常温固定,石蜡包埋后,6 μm 连续切片使用,切片组织脱蜡、抗原修复后封闭,滴加 100 μL 稀释的一抗 (CRY61:1/200、CTGF:1/100),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 冲洗。滴加 100 μL 生物素标记二抗工作液(1/150 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 冲洗,孵育 SABC,滴加 DAB 显色液,室温显色。滴加 200 μL 苏木素染色液孵育 30 s,饱和磷酸氢二钠溶液浸泡 1 min 返蓝,以中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 版统计软件进行统计学分析。先采用单样本 Shapiro-Wilk 检验法对数据进行正态性检验,符合正态分布的计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组不同时间点采血激素水平比较采用重复测量方差分析,组间比较采用 SNK- q 检验,两组表达量和光密度值比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组激素水平比较

模型组和治疗组在未治疗前血清 E2 和 FSH 水平无差异,有可比性($P>0.05$)。治疗后家兔血清 E2 水平上升,FSH 水平下降,与模型组相比差异具有统计学意义($P<0.05$),并且随着时间出现周期性波动;而模型组家兔一直处于低 E2 和高 FSH 水平,随着时间未出现周期性的波动。详见表 1、2 和图 2、3。

2.2 两组 CYR61 和 CTGF 蛋白表达比较

模型组 CYR61 和 CTGF 蛋白表达较低,分别为 0.390 ± 0.040 和 0.186 ± 0.054 ,治疗组蛋白表达量明显增多,分别为 0.756 ± 0.085 和 0.693 ± 0.098 ,与模型组相比较,差异均有统计学意义($t_{\text{CYR61}}=8.688, P<0.05; t_{\text{CTGF}}=10.142, P<0.05$),见图 4 和图 5。

2.3 两组 CYR61 和 CTGF mRNA 表达比较

模型组 CYR61 和 CTGF mRNA 表达水平较低,分别为 0.003 ± 0.001 和 0.002 ± 0.001 ,而治疗组 mRNA 的表达水平明显升高,分别为 0.010 ± 0.001 和 0.016 ± 0.002 ,与模型组比较,差异均有统计学意义($t_{\text{CYR61}}=38.156, P<0.05; t_{\text{CTGF}}=14.646, P<0.05$),详见图 6。

表 1 两组不同采血点 E2 水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)					
Table 1 Comparison of E2 levels at different blood collection points in the two groups					
组别 Groups	例数 Number	0 d	7 d	14 d	28 d
模型组 Model group	3	477.18 $\pm$ 4.61	433.91 $\pm$ 7.93	430.16 $\pm$ 7.55	410.61 $\pm$ 7.14
治疗组 Treatment group	3	470.92 $\pm$ 6.96	605.42 $\pm$ 7.34	515.97 $\pm$ 3.73	616.39 $\pm$ 13.20
t value		1.299	27.489	17.656	23.748
P value		0.264	<0.001	<0.001	<0.001

注: $F_{\text{组间}}=321.914, P_{\text{组间}}<0.001; F_{\text{时间}}=51.745, P_{\text{时间}}<0.001; F_{\text{交互}}=186.620, P_{\text{交互}}<0.001$ 。
Note. $F_{\text{intergroup}}=321.914, P_{\text{intergroup}}<0.001. F_{\text{time}}=51.745. P_{\text{time}}<0.001. F_{\text{interaction}}=186.620, P_{\text{interaction}}<0.001$.

表 2 两组不同采血点 FSH 水平比较($\bar{x}\pm s$,mIU/mL)					
Table 2 Comparison of FSH levels at different blood collection points in the two groups					
组别 Groups	例数 Number	0 d	7 d	14 d	28 d
模型组 Model group	3	65.21 $\pm$ 0.76	70.84 $\pm$ 2.23	77.13 $\pm$ 1.23	80.25 $\pm$ 1.64
治疗组 Treatment group	3	63.02 $\pm$ 1.29	49.02 $\pm$ 2.14	59.91 $\pm$ 1.53	43.24 $\pm$ 1.69
t value		2.535	12.217	15.165	27.236
P value		0.064	<0.001	<0.001	<0.001

注: $F_{\text{组间}}=694.561, P_{\text{组间}}<0.001; F_{\text{时间}}=33.990, P_{\text{时间}}<0.001; F_{\text{交互}}=126.616, P_{\text{交互}}<0.001$ 。
Note. $F_{\text{intergroup}}=694.561, P_{\text{intergroup}}<0.001. F_{\text{time}}=33.990. P_{\text{time}}<0.001. F_{\text{interaction}}=126.616, P_{\text{interaction}}<0.001$.

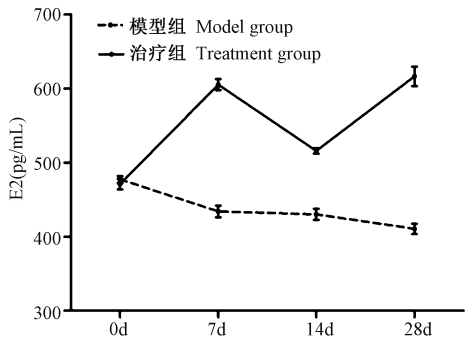


图 2 两组不同采血点 E2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Figure 2 Comparison of E2 levels at different blood collection points in the two groups

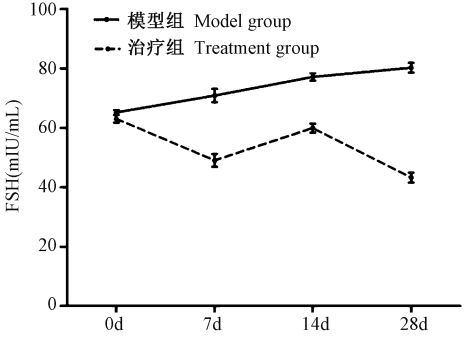


图 3 两组不同采血点 FSH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mIU/mL)

Figure 3 Comparison of FSH levels at different blood collection points in the two groups

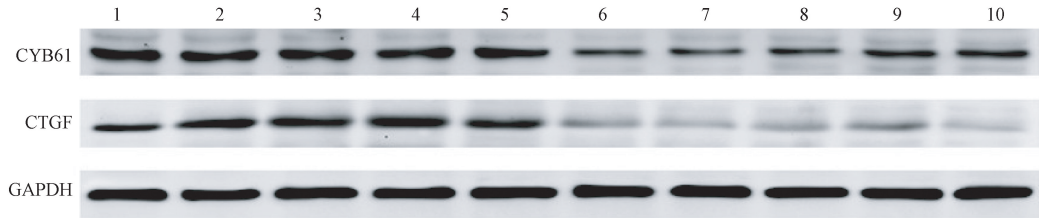


图 4 两组家兔卵巢组织内 CYR61 和 CTGF 蛋白表达 (1-5: 治疗组, 6-10: 模型组)

Figure 4 Expression of CYR61 and CTGF in ovarian tissue of rabbits (1-5, treatment group. 6-10, model group)

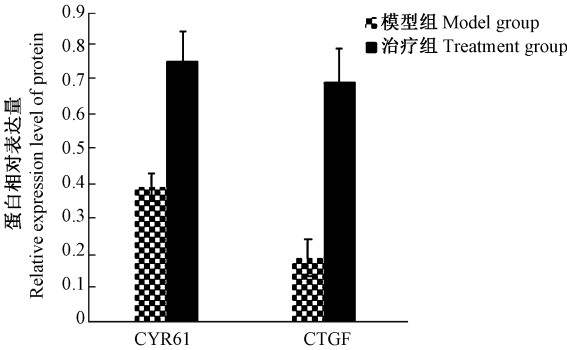


图 5 两组家兔卵巢组织内 CYR61 和 CTGF 蛋白相对表达量比较

Figure 5 Comparison of relative expression levels of CYR61 and CTGF in ovarian tissues of rabbits

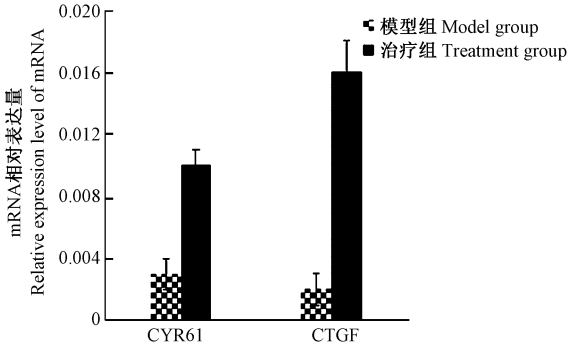


图 6 两组家兔卵巢组织内 CYR61 和 CTGF mRNA 相对表达量比较

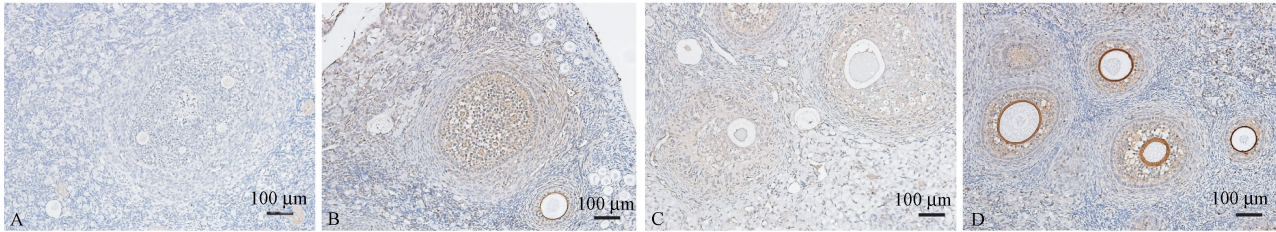
Figure 6 Comparison of relative expression levels of CYR61 and CTGF mRNA in ovarian tissues of rabbits

2.4 两组免疫组化检测结果比较

图 7、8 可知, CYR61 和 CTGF 蛋白表达在模型组较少, 散在分布, 平均光密度值分别为 (0.166 ± 0.009) 和 (0.193 ± 0.008) ; 治疗组表达明显增多, 呈深棕色颗粒状, 主要表达在颗粒细胞和卵泡细胞膜, 在卵泡细胞膜处更是呈深棕色环状, 平均光密度值分别为 (0.222 ± 0.030) 和 (0.224 ± 0.014) , 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($t_{CYR61} = 3.981, P < 0.05$; $t_{CTGF} = 4.111, P < 0.05$)。

3 讨论

随着社会的发展, 各种间充质干细胞越来越多的被应用于医学, 也是现代再生医学研究的一大热点。其中 UCMSCs 取材简单, 来源丰富, 无伦理学争议, 被认为是同种异体移植的最佳来源^[6-10], UCMSCs 是指存在于新生儿脐带组织中的一种多功能干细胞, 它能分化成许多种组织细胞, 在医学中具有广阔的应用前景。现代研究表明, UCMSCs 能



注:A:模型组;B:治疗组,CYR61 检测;C:模型组;D:为治疗组,CTGF 检测。

图 7 两组家兔卵巢组织内 CYR61 和 CTGF 表达

Note. A, model group. B, treatment group, CYR61. C, model group. D, treatment group, CTGF.

Figure 7 Expression of CYR61 and CTGF in ovarian tissue of rabbits

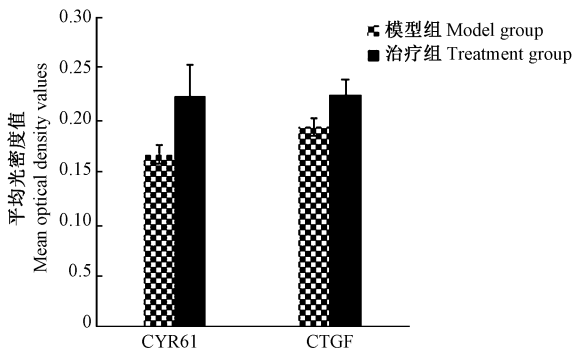


图 8 两组家兔卵巢组织内 CYR61 和 CTGF 表达平均光密度值比较

Figure 8 Comparison of mean optical density values of CYR61 and CTGF expression in ovarian tissue of rabbits

够在许多疾病的治疗中起到一定作用,如在治疗糖尿病方面^[11],UCMSCs 能阻断相关的炎症因子和炎症激活,有效缓解胰岛素抵抗;在治疗肝方面^[12],UCMSCs 能够通过调节 miR-20 来调控 Caspase-3 等活性因子减轻细胞凋亡和基因异常表达,从而改善肝脏缺血再灌注损伤;在治疗骨骼方面^[13],UCMSCs 联合骨胶原蛋白能够促进骨再生,修复腰椎板缺损。多项研究阐明,人体间充质干细胞能对 CTX 诱导的卵巢损伤起到一定的修复作用。Mchamed 等^[14]的动物试验研究就显示,人体的骨髓间充质干细胞能够刺激 POF 小鼠卵巢内卵泡的生成和改善相关激素水平。另有一项临床研究显示^[15],在自体骨髓间充质干细胞移植后,2 例 POF 患者第三个月恢复了月经,1 例 POF 患者成功受孕并产下健康胎儿,充分表明应用自体的骨髓间充质干细胞对治疗 POF 有很好的疗效。

本实验研究中应用注射 CTX 建造 POF 模型,始终具有高 FSH 和低 E2 水平,生理学上能代表人类 POF。有研究阐明^[16],虽然动物卵巢结构和激素周期和人体存在差异,但 CTX 诱导的动物 POF 模

型是目前该领域研究中最被接受的临床前模型。本研究显示经 UCMSCs 治疗后,POF 家兔体内的 E2 水平上升,FSH 水平下降,并且在治疗后恢复了周期性的波动,证实其治疗有效。最近的证据表明^[17],间充质干细胞的作用不是直接恢复受损的细胞,而是通过阻碍和抑制异常的免疫反应来帮助组织再生,并传递生长因子来实现修复的。CYR61 和 CTGF 均为 CCN 家族的一员,为细胞外基质相关蛋白^[18]。生理情况下,CYR61 保持低表达维持机体生理需要,但炎症刺激等多种因素均可导致 CYR61 表达增加;高表达的 CYR61 能分泌到胞外基质,通过与细胞表面受体结合,起到促进细胞增殖分化、血管形成以及组织损伤修复等多种作用^[19]。相关研究显示^[20],高表达 CYR61 的人子宫内膜血管周围细胞移植能促进子宫部分全层切除术后大鼠子宫血管生成以及内膜和肌层再生,提高大鼠的妊娠率。CTGF 具有促细胞增殖、迁移及分化等作用,与 CYR61 共同参与细胞内外信号传导。本实验研究中,治疗后 CYR61 和 CTGF 蛋白和 mRNA 的表达呈正相关,表达的主要部位为颗粒细胞和卵泡细胞膜,表明其具有协同作用,共同参与 UCMSCs 对 POF 的治疗调节机制。研究显示,CYR61 和 CTGF 除自身能促进新生血管生成外,还能一起上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达间接促进血管生成^[21]。另有研究阐明,E2 等雌激素能上调 CTGF 表达,并且此过程受 FSH 的负调控^[22]。UCMSCs 也能够分泌 VEGF,抑制次级卵泡和囊状卵泡凋亡,促进血管生成;也能分泌多种生长因子,逆转 CTX 阻断的 E2 对 FSH 的负反馈作用,阻止生长卵泡过度耗竭,最终改善卵泡的发育^[23-24]。

综上所述,UCMSCs 对 POF 具有一定的治疗作用,其作用机制可能是通过调节卵巢内 E2 和 FSH 水平以及上调 CYR61 和 CTGF 在局部组织内的表

达,进而影响 VEGF 等表达,促进新生血管的形成,从而促进卵泡再生和组织修复来实现的。

参考文献:

- [1] Ghahremani-Nasab M, Ghanbari E, Jahanbani Y, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering [J]. J Cell Physiol, 2019, 235(5): 4217-4226.
- [2] Lin J, Li XL, Song H, et al. A general description for Chinese Medicine in treating premature ovarian failure [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(2): 91-97.
- [3] Kovanci E, Amy K, SchuttMD, et al. Premature ovarian failure: clinical presentation and treatment [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2015, 42(1): 153-161.
- [4] Nelson LM. Clinical practice: Primary ovarian insufficiency [J]. N Engl J Med, 2009, 360(6): 606-614.
- [5] Cartwright B, Robinson J, Seed PT, et al. Hormone replacement therapy versus the combined oral contraceptive pill in premature ovarian failure; a randomised controlled trial of the effects on bone mineral density [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101(9): 3497-3505.
- [6] He Y, Chen D, Yang L, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 263.
- [7] Zheng Q, Fu X, Jiang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation prevents chemotherapy-induced ovarian failure via the NGF/TrkA pathway in rats [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 6539294.
- [8] Yang Y, Lei L, Wang S, et al. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on a collagen scaffold improves ovarian function in a premature ovarian failure model of mice [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019, 55(4): 302-311.
- [9] 张娟, 周月希, 刁波, 等. 环磷酸腺苷诱导家兔卵巢早衰动物模型的建立和评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 38-43.
- [10] Sriramulu S, Banerjee A, Di Liddo R, et al. Concise review on clinical applications of conditioned medium derived from human umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs) [J]. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2018, 12(3): 230-234.
- [11] Sun X, Hao H, Han Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in type 2 diabetes rats [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 241.
- [12] Zhang L, Song Y, Chen L, et al. MiR-20a-containing exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates liver ischemia/reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3698-3710.
- [13] Cui Y, Xu B, Yin Y, et al. Repair of lumbar vertebral bone defects by bone particles combined with hUC-MSCs in weaned rabbit [J]. Regen Med, 2019, 14(10): 915-923.
- [14] Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, et al. Human mesenchymal stem cells partially reverse infertility in chemotherapy-induced ovarian failure [J]. Reprod Sci, 2018, 25(1): 51-63.
- [15] Edessy M, Hala NH, Yusef S, et al. Autologous stem cells therapy, the first baby of idiopathic premature ovarian failure [J]. Acta Medica International, 2016, 3(1): 19-23.
- [16] Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, et al. Bone marrow transplanta-tion generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(22): 3198-3204.
- [17] Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties [J]. Immunotherapy, 2016, 8(12): 1405-1416.
- [18] Chaqour B. Caught between a “Rho” and a hard place: are CCN1/CYR61 and CCN2/CTGF the arbiters of microvascular stiffness? [J]. J Cell Commun Signal, 2019.
- [19] Liu YM, Zhang FY, Zhang ZB, et al. High expression levels of Cyr61 and VEGF are associated with poor prognosis in osteosarcoma[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(8): 895-899.
- [20] Li ZX, Yan GJ, Diao Q, et al. Transplantation of human endometrial perivascular cells with elevated CYR61expression induces angiogenesis and promotes repair of a full-thickness uterine injury in rat [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10: 179.
- [21] Ke-Xia Chai, Yu-Qi Chen, Pei-Lin Fan, et al. The correlation of Cyr61, CTGF, and VEGF with polymyositis/dermatomyositis [J]. Medicine, 2018, 97(34): e11775.
- [22] Cabar FR, Pereira PP, Schultz R, et al. Vascular endothelial growth factor and β -human chorionic gonadotropin are associated with trophoblastic invasion into the tubal wall in ectopic pregnancy [J]. Fertil. Steril, 2010, 94(5): 1595-1600.
- [23] Zhu SF, Hu HB, Xu HY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19: 2108-2117.
- [24] Sun LP, Li D, Song K, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2552-2564.

[收稿日期]2019-11-14