

· 论著 ·

人参皂苷 Rg1 联合人羊膜间充质干细胞移植治疗卵巢功能不全的功用及机制^{*}

祝 叶, 张青云, 莫晓莉, 张 林, 何连利^{**}

(遵义市第一人民医院/遵义医科大学第三附属医院妇产科, 遵义 563000)

【摘要】 目的:评估人参皂苷 Rg1 (Ginsenoside Rg1) 联合人羊膜间充质干细胞 (hAD-MSCs) 移植治疗卵巢功能不全 (POI) 的疗效优势。**方法:**共使用 40 只大鼠, 随机分为对照 (Control) 组、模型 (Model) 组、单纯 hAD-MSCs 治疗 (hAD-MSCs) 组和 hAD-MSCs 联合 Rg1 治疗 (hAD-MSCs+Rg1) 组, 每组 10 只, 其中 5 只用于采集卵巢和血液等组织样本, 另 5 只进行卵母细胞诱导和卵母细胞线粒体功能测定相关实验。模型组构建放疗辐射诱导的 POI 大鼠模型。**结果:**与 Control 组相比, Model 组大鼠卵巢存在较大程度的卵泡耗竭和器质性病变, 初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡和排卵前卵泡均减少, 卵巢指数下降, 血清 FSH 升高, E₂ 降低, 卵巢组织 TUNEL 阳性细胞数量增加, ROS 水平上升, 卵母细胞线粒体膜电势降低, ATP 生成量减少 ($P<0.05$)。与单纯 hAD-MSCs 组相比, hAD-MSCs+Rg1 联合组 POI 大鼠卵巢组织卵泡耗竭和器质性病变明显缓解, 初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡和排卵前卵泡明显增加, 卵巢指数回升显著, 血清 FSH 降低, E₂ 回升, 卵巢组织 TUNEL 阳性细胞数量明显下降, ROS 水平明显降低, 卵母细胞线粒体膜电势回升, ATP 生成量回升显著 ($P<0.05$)。**结论:**Rg1 通过增强 hAD-MSCs 移植改善卵母细胞线粒体功能的机制并缓解 POI 大鼠模型疾病进展。

【关键词】 人参皂苷 Rg1; 人羊膜间充质干细胞; 放疗; 卵巢功能不全

中图分类号:R713.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-7379(2023)03-0201-07

DOI:10.13283/j.cnki.xdfckjz.2023.03.004

The effects and mechanisms of ginsenoside Rg1 combined with human amniotic mesenchymal stem cell transplantation for treating premature ovarian insufficiency. Zhu Ye, Zhang Qingyun, Mo Xiaoli, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, the First People's Hospital of Zunyi/the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000

【Abstract】 **Objective:** To evaluate the therapeutic advantages of the combination with transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells and oral administration of Ginsenoside Rg1 in the treatment of premature ovarian insufficiency (POI). **Methods:** A total of 40 rats were used and randomly divided into control group, Model group, hAD-MSCs group and hAD-MSCs+Rg1 group. Each group had 10 rats, 5 of which were used to collect ovary and blood samples, and the other 5 were used to test oocyte mitochondrial function. A rat model of POI induced by radiation was constructed. **Results:** Compared with the control group, the model group rats had a greater degree of follicular exhaustion with ovaries pathological lesions, including primary follicles, secondary follicles, antral follicles and preovulation follicles decreased, ovarian index decreased, serum FSH increased, E₂ decreased, the number of TUNEL-positive cells in ovarian tissue increased, ROS levels in ovarian tissue increased, mitochondrial membrane potential of oocytes decreased, and ATP production decreased ($P<0.05$). Compared with

* 基金资助: 遵义市科技计划项目 [遵市科合 HZ 字(2022)56 号]; 贵州省科学技术厅, 黔科合基础-ZK[2022]一般 580

** 通信作者 Email:heartseal@163.com

hAD-MSCs group, POI rats in the hAD-MSCs+Rg1 treatment group were relieved of ovarian follicle exhaustion and ovaries pathological lesions. The primary follicles, secondary follicles, antral follicles and preovulatory follicles increased significantly, the ovarian index rose significantly, serum FSH decreased, E₂ rebounded, the number of TUNEL-positive cells in ovarian tissue decreased significantly, the level of ROS in ovarian tissue decreased significantly, the mitochondrial membrane potential of oocytes rebounded, ATP production increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Rg1 enhances the effects of hAD-MSCs transplantation in alleviating disease progression of POI rat models by additional improvement of oocyte mitochondrial function.

【Key words】 Ginsenoside Rg1; Human amnion-derived mesenchymal stem cells; Radiotherapy; Premature ovarian insufficiency

临幊上,40岁以下女性出现闭经4个月以上、性激素缺乏、血清促卵泡激素(FSH)水平高于25IU/L被认为是早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)^[1]。POI的病因有多种,包括自身免疫、遗传异常、化疗、放疗或手术所致^[2]。POI会导致雌激素(E₂)水平低下,FSH和促黄体生成素水平升高,如不加以治疗,长期卵巢功能障碍会增加骨质疏松症、心血管疾病,以及认知能力下降的风险^[1]。因此,必须探索有效治疗POI的方法。欧洲人类生殖与胚胎学会指南推荐使用激素替代疗法(hormone replacement therapy, HRT)治疗POI的雌激素水平低下症。HRT可预防骨质疏松症和心血管疾病,但并不能有效恢复卵巢的生殖功能。目前保存POI患者生育力的治疗方法有体外卵泡激活、卵母细胞冷冻保存和卵巢组织移植等。干细胞移植在恢复POI女性卵巢功能方面表现出了巨大潜力^[3]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有低免疫原性的多能非造血干细胞^[3],最初是从骨髓中分离出来的,也可从脐带、脂肪组织、胎盘和羊膜中分离^[3]。MSCs除了具有多能性,还具有其他广泛的生理作用,包括免疫调节活性、器官稳态的保持和受损组织的再生^[4]。目前MSCs移植广泛应用于POI的研究,其具有归巢、免疫调节和抗凋亡活性等^[4]。人参皂苷Rg1(Ginsenoside Rg1)是从人参提取的植物雌激素有效单体化合物,其分子式为C₄₂H₇₂O₁₄。Rg1作为小分子物质,具有抗炎,抗氧化,清除自由基,抑制细胞凋亡,促进血管生成等作用^[5]。本研究拟通过构建放疗辐射诱导POI大鼠模型,比较hAD-MSCs移植联合Rg1治疗与单纯hAD-MSCs移植治疗的疗效,评估hAD-MSCs移植联合Rg1治疗的优势。

1 材料与方法

1.1 实验材料 5~6周龄雌性SD大鼠(体质量200~250g, SPF级)由遵义医学院实验动物中心提供。hAD-MSCs购自中国科学院上海干细胞库。透明质酸酶(hyaluronidase)

(H1115000)购自Sigma-Aldrich(美国)。人参皂苷Rg1(RSZD-121106,纯度98.3%)购自吉林宏久(中国)。DCFH-DA荧光探针(C2938),MitoProbe JC-1 Assay Kit(M34152)购自Thermo Fisher(美国)。大鼠FSH(CSB-E06869r)和E₂(CSB-E05110r)ELISA检测试剂盒购自武汉华美生物(中国)。一步法TUNEL检测试剂盒(C1088)购自碧云天(中国)。怀孕母马血清促性腺激素(HOR-272)和人绒毛膜促性腺激素(HOR-250)购自ProSpec(以色列)。G-MOPSplus(10129)和G-IVFplus(10134)培养液购自Vitrolife(瑞士)。RPMI 1640培养液(11875101),胎牛血清(10099141)购自Gibco(美国)。ATP定量检测试剂盒(ab83355)购自Abcam(英国)。鼠抗人CD44(555479),鼠抗人CD73(550257),鼠抗人CD90(555596),鼠抗人CD105(560839),鼠抗人CD11b(555388),鼠抗人CD19(555413),鼠抗人CD34(555822),鼠抗人CD45(555483),鼠抗人HLA-DP/DQ/DR(562008),鼠抗人IgG(FITC)同型对照(560952)或鼠抗人IgG(PE)同型对照(560951)购自BD(美国)。酶标仪(FLX800)购自BioTek品牌(美国),倒置荧光显微镜(IX71-F22FL/DIC)、3D激光共聚焦显微镜(OLS5000)购自Olympus品牌(日本),流式细胞仪(NAVIOS)购自BECKMAN COULTER品牌(美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 hAD-MSCs培养 hAD-MSCs细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养液,并添加1%青霉素-链霉素。培养于含5%CO₂,37℃湿润恒温细胞培养箱。将细胞连续传代在第3代的细胞用于后续实验。

1.2.2 流式细胞术对hAD-MSCs的鉴定 取培养第3代hAD-MSCs细胞,流式细胞术分析表面标志物,以确定其干细胞特性。收获细胞,250×g室温离心5min,将细胞沉淀重悬于PBS中制备单细胞悬液,调整细胞浓度 $1 \times 10^5/mL$ 。细胞分别与抗人CD-133、抗人CD-45、抗人CD-73、抗人CD-105和抗人CD-90单抗于室温避光孵育20min。用PBS清洗细胞2次去除一抗。细胞与偶联有FITC或PE的山羊抗鼠IgG二抗于4℃避光孵育30min。用1%多聚甲醛溶液固定细胞,上机BECKMAN COULTER流式细胞仪,使用Kaluza软件(BECKMAN COULTER,v1.3)进行分析,表面标志物CD11b-/CD19-/CD34-/CD45-/HLA-DP/DQ/DR-/CD44+/CD73+/CD90+/CD105+为目的细胞类型。

1.2.3 辐射诱导构建POI大鼠模型^[6] 将5~6周龄雌性SD大鼠饲养于温度受控、具有标准光/暗循环的鼠房内,大鼠可自由饮水和进食。适应性饲养1周后,将其随机分为4组,每组10只大鼠:(1)Control组:正常对照组大鼠,仅对

鼠行腹腔注射氯胺酮(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)麻醉,不进行放疗辐照;(2) Model 组:向大鼠腹腔注射氯胺酮(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)麻醉,进行 CT 定位,利用精密 VMAT 医用直线加速器,避开心、肝、脾、肺、肾,并准确限定至盆腔放疗照射目标区域,照射距离 1m,设置单次照射剂量 4.8Gy,建立 POI 大鼠模型。大鼠在接受放疗照射后每周行 CT 检查一次,连续 4 周,在大鼠接受放疗照射后第 29d 对大鼠行 CO₂ 窒息法安乐死;(3) AD-MSCs 组(hAD-MSCs 治疗组):大鼠接受放疗照射,将制备好的重悬于 0.5mL PBS 中的 3×10⁶ hAD-MSCs,每周 1 次,连续 4 周,通过尾静脉注射入大鼠体内;(4) hAD-MSCs+Rg1 组(hAD-MSCs 联合 Rg1 治疗组):大鼠接受放疗照射造模后当天开始,每日上午 10 时,将溶解于 3mL 无菌去离子水、单次剂量为 20mg/(kg·d) 的 Rg1 通过口服管饲法对大鼠进行治疗,直至安乐死当天。每组 10 只实验大鼠,其中 5 只用于采集卵巢和血液等组织样本,另 5 只进行卵母细胞诱导,进行卵母细胞线粒体功能测定相关实验。

1.2.4 H & E 染色与病理学分析 收集大鼠新鲜卵巢组织,立即浸入 10% 中性福尔马林固定液,于 4℃ 固定超过 48h,经石蜡包埋并切成 5μm 切片。切片经二甲苯脱蜡,再经梯度酒精(100% ×2—95% ×2—80%—75%)水化。H & E 染色:使用苏木精染色液染细胞核—使用 1% 盐酸乙醇进行分化—伊红染色液染细胞质。

卵巢组织病理学分析:从一个卵巢组织切片样本中选择 10 张卵泡中含有卵母细胞并且是间隔开的组织切片,对每张组织切片进行卵泡计数。根据颗粒细胞、卵泡腔或卵丘细胞的存在和分布,将卵泡分为初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡(antral follicles)或排卵前卵泡(prechondulatory follicles)^[15]。当卵母细胞被单层立方体颗粒细胞覆盖时确定为初级卵泡;当有一层以上颗粒细胞覆盖时,确定为次级卵泡;窦卵泡的特征是存在由卵泡液形成的窦腔;排卵前卵泡通常具有卵丘细胞边缘。

1.2.5 卵巢指数测定 以颈椎脱臼法处死大鼠并采集大鼠卵巢,收样前称量大鼠体质量。采集卵巢组织并称量其质量,计算卵巢指数(ovarian index)。卵巢指数(mg/g)=卵巢质量(mg)/大鼠体质量(g)。

1.2.6 ELISA 测定 FSH 和 E₂ 从眼眶静脉丛采集血样,以 1500×g/min 于 4℃ 离心 15min 分离获得血清。使用 FSH 和 E₂ ELISA 检测试剂盒进行检测。按试剂盒制造商说明书进行操作,使用 BioTek 酶标仪在 450nm 下读取光密度值。

1.2.7 TUNEL 染色 使用一步法 TUNEL 检测试剂盒进行检测。石蜡组织切片于室温浸入二甲苯中 5min,重复一次,以彻底脱蜡。于室温无水乙醇浸泡 5min,重复一次。梯度乙醇(95% ×2, 80%, 75%)水化,室温每次 3min。使用 PBS 润洗切片,滴加 PBS 稀释好的蛋白酶 K 工作液(终浓度为 20μg/mL)于组织切片,室温孵育 20min。PBS 清洗组织切片除去蛋白酶 K 工作液,滴加 100μL 1×平衡缓冲液(试剂盒自带)至组织切片,室温孵育 20min。于冰上融化 FITC-12-dUTP Labeling Mix,于冰上混合 FITC-12-dUTP Labeling Mix, Recombinant TdT Enzyme 和 5×平衡缓冲液,配制“TdT 孵育缓冲液”。向组织切片上滴加 TdT 孵育缓冲液,随后将组织切片放于湿盒中,于 37℃ 避光孵育 60min。PBS 室温避光清洗切片 5min,重复 1 次。使用含 0.1% Triton X-100 的 5mg/ml

BSA 的 PBS 缓冲液,室温避光清洗切片 2 次,每次 5min。向组织切片滴加 DAPI 工作液(PBS 稀释,终浓度为 1μg/mL),室温避光孵育 5min。PBS 室温避光清洗切片 5min,重复 3 次。立即于 Olympus 倒置荧光显微镜下镜检分析样品,使用标准荧光过滤装置在(520±20)nm 下观察 FITC 绿色荧光,在 454nm 下观察 DAPI 蓝色荧光。

1.2.8 诱导排卵和卵母细胞孵化 大鼠用 50IU 怀孕母马血清促性腺激素超排卵^[16]。48h 后,向大鼠腹膜内注射 50IU 人绒毛膜促性腺激素(HCG),触发卵母细胞成熟。HCG 给药后 24h 收样输卵管。通过用针撕裂输卵管将卵母细胞释放到 37℃ 预热的 G-MOPSplus 培养液中。加 0.3mg/mL 透明质酸酶去除颗粒细胞,从卵母细胞-冠状-卵丘复合物(oocyte-corona-cumuluscomplex)中收获无卵丘卵母细胞。用 37℃ 预热的 G-MOPSplus 培养液洗涤 3 次,将细胞培养于 G-IVFplus 培养液,置 37℃、6% CO₂ 湿润细胞培养箱培养。

1.2.9 DCFH-DA 荧光探针测定卵母细胞活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)水平 使用荧光探针 DCFH-DA 标记并定量卵母细胞内 ROS 水平。含 10μmol/L DCFH-DA 的 G-IVFplus 培养液(37℃ 预热)与采集好的活卵母细胞于 37℃ 共孵育 20min。用培养液冲洗细胞 3 次,使用 Olympus 3D 激光共聚焦显微镜进行观察并使用 Image J v1.8.0 定量荧光。

1.2.10 JC-1 探针测定卵母细胞线粒体膜电势水平 线粒体膜电势荧光探针 JC-1 是线粒体膜电势的双发射和膜电势敏感性指标:当膜电势高时,JC-1 优先在线粒体基质内积累并形成 J-聚集体(红色荧光);反之,分解为 J-单体(绿色荧光),代表膜电势处于低位。使用 MitoProbe JC-1 Assay Kit 进行检测。将含 JC-1 的 G-IVFplus 培养液(37℃ 预热)与采集好的活卵母细胞于 37℃ 共孵育 20min^[15]。孵育结束后,卵母细胞立即用 MitoProbe JC-1 Assay Kit 自带的 4℃ 预冷的 JC-1 staining buffer 冲洗两次,重新将卵母细胞放置于不含 JC-1 的 G-IVFplus 培养液中,Olympus 3D 激光共聚焦显微镜进行观察并使用 ImageJ v1.8.0 定量荧光。

1.2.11 卵母细胞线粒体 ATP 生成水平测定 采集好的单个卵母细胞被转移到一个含 100μL 裂解液的无菌管中,作为一个独立样本,释放胞内 ATP。根据 ATP 定量检测试剂盒说明书,建立标准曲线并对样品进行检测,在 BioTek 酶标仪上于 Ex/Em=535/587nm 读取荧光值。

1.3 统计学分析 使用 GraphPad Prism v8 软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA)及 Turkey's 事后检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Rg1 能增强 hAD-MSCs 改善 POI 大鼠卵巢功能的疗效 HE 染色结果显示,与正常 Control 组大鼠卵巢比较,Model 组大鼠卵巢存在较大程度的卵泡耗竭和器质性病变,尤其是初级卵泡数明显减少($P<0.05$),次级卵泡、窦卵泡和排卵前卵泡也相应减少($P<0.05$)。与 Model 组相比,hAD-MSCs 治疗组卵泡耗竭有所缓解,初级卵泡和排卵前卵泡数有所增加($P<0.05$),但器质性病变仍存在;与 hAD-MSCs 组相比,而 hAD-MSCs+Rg1 组显著提高了初

级、次级卵泡、窦卵泡和排卵前卵泡数($P<0.05$)，明显改善了卵巢器质性病变。卵巢指数分析结果显示，与 Control 组相比，Model 组的卵巢指数明显下降($P<0.05$)；与 Model 组相比，hAD-MSCs 治疗组改善了大鼠的卵巢指数($P<0.05$)；与 hAD-MSCs 组相比，hAD-MSCs+Rg1 组则显著提高了大鼠的卵巢指

数($P<0.05$)。Model 组大鼠发生了激素紊乱，与 Control 组相比，Model 组 FSH 增加、 E_2 减少($P<0.05$)；与 Model 组相比，hAD-MSCs 治疗组对大鼠的 FSH 紊乱有所缓解($P<0.05$)；与 hAD-MSCs 组相比，hAD-MSCs+Rg1 组显著改善了 FSH 和 E_2 ($P<0.05$)紊乱。见图 1、2。

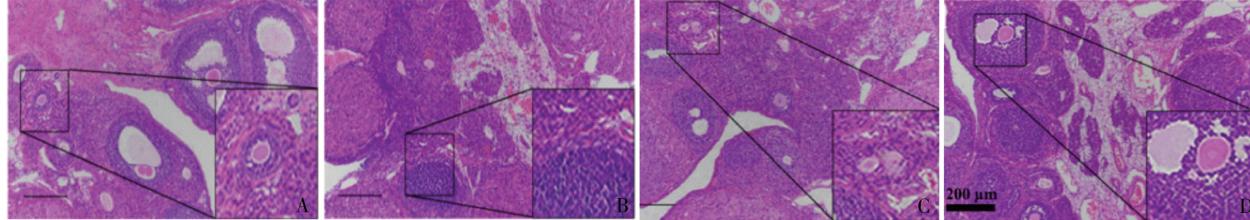


图 1 HE 染色结果

A: Control; B: Model; C: hAD-MSCs 组; D: hAD-MSCs+Rg1 组

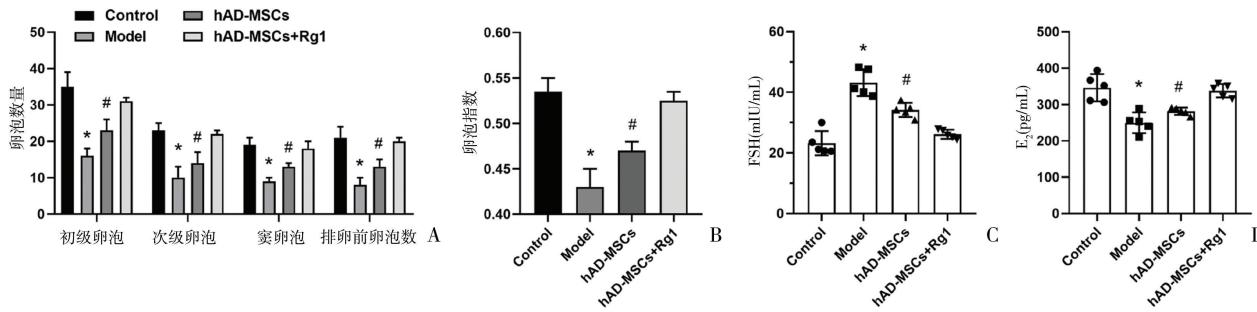


图 2 Rg1 联合 hAD-MSCs 治疗 POI 大鼠模型的疗效检测

* $P<0.05$ vs Control 组；# $P<0.05$ vs Model 组、hAD-MSCs+Rg1 组

2.2 Rg1 增强 hAD-MSCs 的抗凋亡和抗氧化应激作用 TUNEL 染色结果显示，Control 组几乎没有 TUNEL- 阳性细胞，与 Control 组相比，Model 组 TUNEL- 阳性细胞数明显增加($P<0.05$)；与 Model 组相比，hAD-MSCs 组 TUNEL- 阳性细胞数有所减少($P<0.05$)；与 hAD-MSCs 组相比，hAD-MSCs+Rg1 组减少更显著($P<0.05$)。见图 3、4。

2.3 Rg1 增强 hAD-MSCs 对卵母细胞线粒体功能的保护作用 卵母细胞中 ROS 水平指示剂 DCFH-DA 绿色荧光探针染色结果显示，与 Control 组相比，Model 组大鼠卵母细胞 DCFH-DA 绿色荧光着色强度显著增强($P<0.05$)；与 Model 组相比，hAD-MSCs 治疗组 DCFH-DA 绿色荧光着色强度有所减弱($P<0.05$)；与 hAD-MSCs 组相比，hAD-MSCs+Rg1 组显著减弱($P<0.05$)。线粒体膜电势指示剂 JC-1(红色/绿色)荧光比值测定结果显示，与 Control 组相比，Model 组大鼠卵母细胞 JC-1(红色/绿色)荧光比值显著降低($P<0.05$)；与 Model 组相比，hAD-MSCs

治疗组 JC-1(红色/绿色)荧光比值仅略有回升($P>0.05$)；与 hAD-MSCs 组相比，hAD-MSCs+Rg1 组则明显回升($P<0.05$)。卵母细胞内线粒体 ATP 生成水平测定结果显示，与 Control 组相比，Model 组大鼠卵母细胞线粒体 ATP 生成水平显著降低($P<0.05$)；与 Model 组相比，hAD-MSCs 治疗组仅有所回升($P<0.05$)；与 hAD-MSCs 组相比，hAD-MSCs+Rg1 组线粒体 ATP 生成水平显著回升($P<0.05$)。见图 5、6。

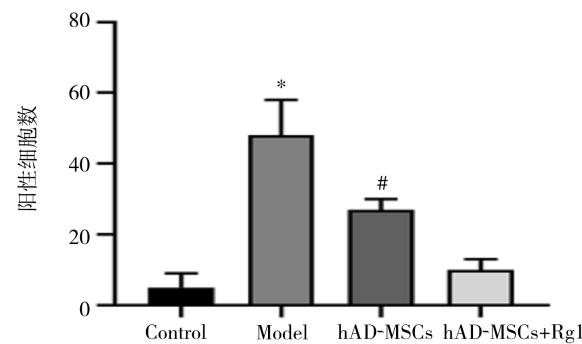


图 3 TUNEL 染色结果统计图

* $P<0.05$ vs Control 组；# $P<0.05$ vs Model 组、hAD-MSCs+Rg1 组

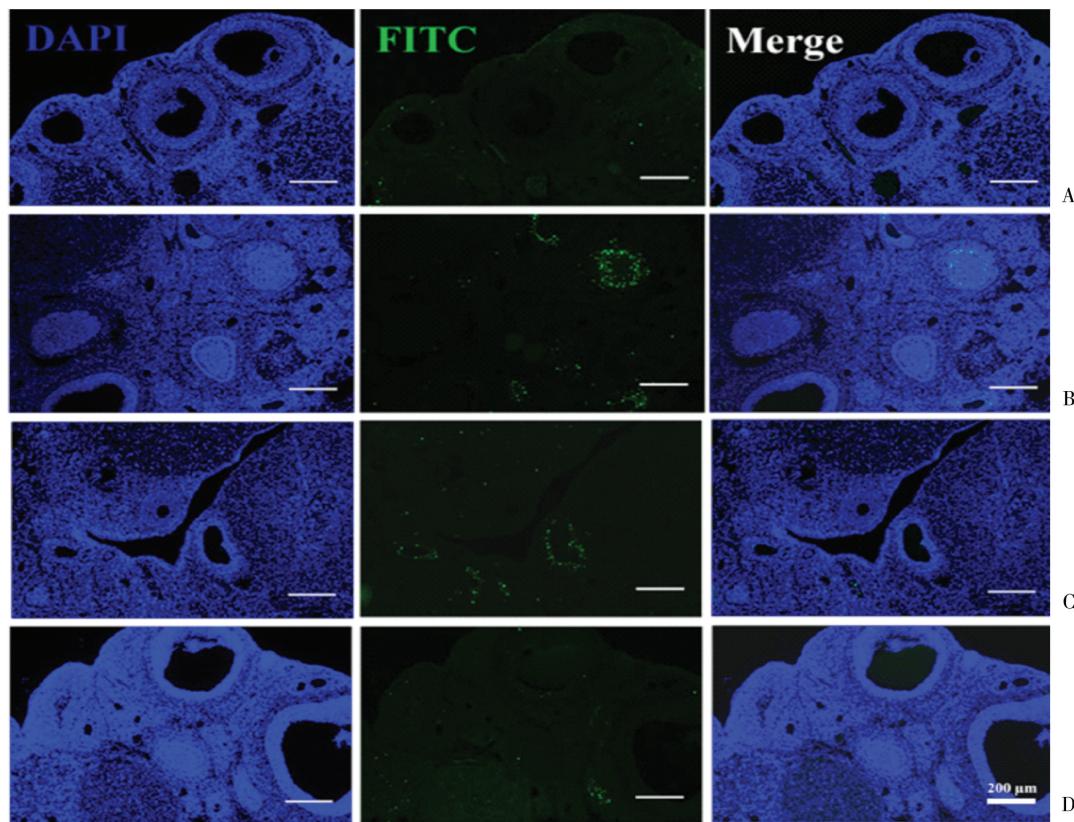


图 4 TUNEL 染色结果图

A : Control; B : Model; C : hAD-MSCs 组 ; D : hAD-MSCs+Rgl 组

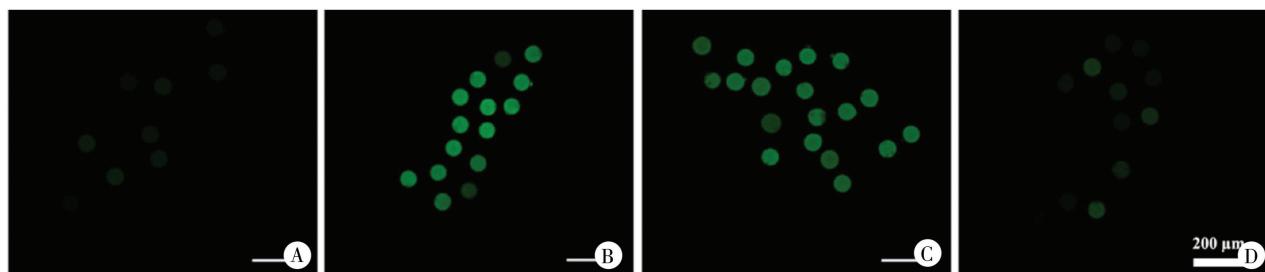


图 5 卵母细胞中 ROS 水平指示剂 DCFH-DA 绿色荧光探针染色结果图

A : Control; B : Model; C : hAD-MSCs 组 ; D : hAD-MSCs+Rgl 组

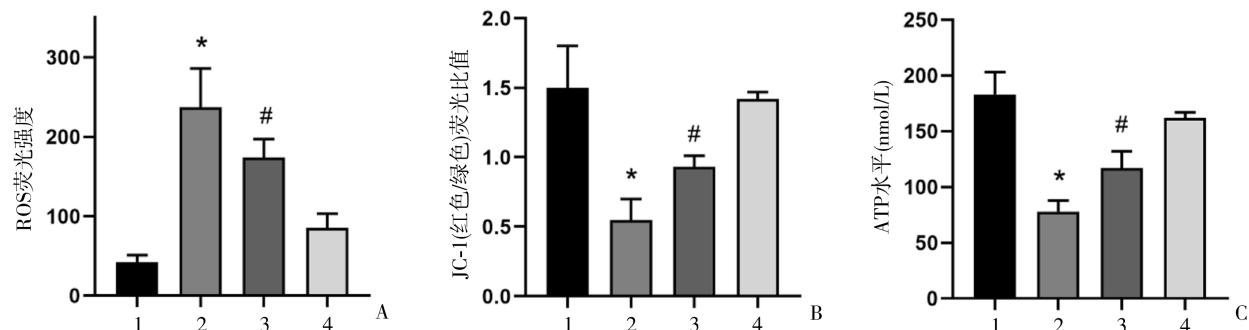


图 6 卵母细胞线粒体功能测定

* $P < 0.05$ vs Control 组 ; # $P < 0.05$ vs Model 组、hAD-MSCs+Rgl 组 ; 1 : Control; 2 : Model; 3 : hAD-MSCs; 4 : hAD-MSCs+Rgl

3 讨 论

卵巢是女性最重要的生殖器官,其执行卵子发生和雌性相关分泌功能。颗粒细胞(granulosa cells, GCs)和卵母细胞是卵巢功能系统的重要组成部分,它们组成了卵泡。卵巢中功能性卵母细胞的数量和质量代表了女性的生殖潜力^[7]。在月经周期中,少数卵泡被激活并发育为成熟的卵泡,而大多数原始卵泡处于休眠状态,从而避免了过早的卵泡耗竭。POI 卵巢的病理状态可导致卵泡功能障碍和耗竭^[2]。GCs 和卵母细胞的加速凋亡、卵泡成熟受阻以及卵泡激活异常导致的卵泡功能障碍或耗竭是 POI 的潜在分子机制^[2]。

越来越多的研究支持线粒体是卵母细胞质量的重要监测指标的观点^[8-9]。线粒体作为细胞内的能量工厂,不仅可以为卵母细胞的成熟和受精提供充足的 ATP,而且还对卵母细胞的生殖能力、受精维持、早期胚胎植入和发育至关重要^[8]。已证实线粒体功能受损导致卵母细胞老化^[8]。放疗将引起卵母细胞氧化应激和加速凋亡^[10]。本研究结果显示,放疗所致 POI 模型组大鼠卵巢存在较大程度的卵泡耗竭和器质性病变,尤其是初级卵泡数量减少明显;TUNEL 染色结果显示,POI 模型组卵巢组织凋亡增加明显,卵母细胞内 ROS 水平升高显著,线粒体膜电势和 ATP 生成下降明显。

MSCs 是一种多能干细胞,其优势为容易获得,免疫原性弱,在转化医学领域应用广泛^[3]。已有使用小鼠脐带源 MSCs(mUMSCs)治疗 POI 的报道。POI 小鼠采用 mUMSCs 治疗后,卵丘细胞凋亡减少,卵巢功能恢复,性激素水平增加^[11]。此外,将人脐带源 MSCs(hUMSCs)移植到 POI 大鼠后第 14、21、28d 检测发现,FSH 降低, E₂ 和抗苗勒管激素(AMH)升高,卵巢中卵泡数量增加。hUMSCs 在临床转化医学方面的应用仍存在一些局限性,特别是对其长期安全性(致瘤性)的担忧限制了其应用^[12]。相较于此,hAD-MSCs 的特点为无致瘤性、低/无免疫原性、以及不存在伦理或法律问题,使其更具有临床应用价值^[13-14]。在支气管肺发育不良、代偿性肝硬化、中风和耐药克罗恩病等治疗的临床试验中,hAD-MSCs 都表现出了良好的安全性和有效性,没有出现包括肿瘤形成在内的长期不良事件^[15-18]。因此,开发以 hAD-MSCs 为基础的治疗 POI 的策略,更具有临床应用的潜力。本研究结果显示,与放疗所致 POI 模型组相比,hAD-MSCs 能缓解 POI 大鼠的器质性病变和卵泡耗竭,减少卵巢组织凋亡,降低了卵母细胞内 ROS 水平,提高了线粒体 ATP 的生成量。这归因于 hAD-MSCs 有较强的旁分泌作用和免疫调节功能,它们可分泌包括成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)、胰岛素样生长因子 1

(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等细胞因子,促进细胞增殖相关的基因表达,并抑制 GCs 凋亡^[19]。

本研究结果显示,联合使用 hAD-MSCs+Rg1,能进一步改善 POI 大鼠的器质性病变和卵泡耗竭,显著减少卵巢组织凋亡,明显降低卵母细胞内 ROS 水平,进一步提高卵母细胞线粒体膜电势和 ATP 生成量。表明 Rg1 可能通过某些途径辅助增强 hAD-MSCs 提高卵母细胞内线粒体功能的作用。可能原因包括 Rg1 具有抗衰老、抗氧化、抗炎性损伤、减少 MSCs 凋亡和促进 MSCs 向损伤处原驻细胞分化的功效。研究显示,Rg1 通过激活 NRF2 和 PI3K/Akt 信号通路抑制骨髓 MSCs 衰老和凋亡^[6]。Rg1 能够上调干细胞因子(stem cell factor, SCF)表达,进一步激活超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,并抑制炎性细胞因子 IL-6、IL-2、TNF-α 和干细胞衰老相关蛋白 p16、p21、p53 转录^[20]。Rg1 可以增加 microRNA-124 表达,降低神经元分化抑制剂小 C 端结构域磷酸酶-1 蛋白表达,提高巢蛋白和 β III-微管蛋白表达水平,从而促进异丁基甲基黄嘌呤(IB-MX)诱导脂肪 MSCs 向神经样细胞的分化^[21]。但 Rg1 通过何种分子机制在辅助增强 hAD-MSCs 改善 POI 大鼠器质性病变、提高卵母细胞内线粒体功能的过程中发挥关键作用的,需进一步深入研究。本研究初步结果显示,联合使用 hAD-MSCs+Rg1 治疗 POI 大鼠模型的功效显著优于单独使用 hAD-MSCs,提示 hAD-MSCs 治疗辅助给予 Rg1 在临床治疗女性 POI 中的重要临床价值。

参 考 文 献

- [1] Stuenkel CA, Gompel A. Primary ovarian insufficiency [J]. N Engl J Med, 2023, 388(2):154-163
- [2] Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(6):400-419
- [3] Li ZK, Zhang ML, Tian YP, et al. Mesenchymal stem cells in premature ovarian insufficiency: mechanisms and prospects [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:718192
- [4] Sheikhanzari G, Aghebati-Maleki L, Nouri M, et al. Current approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102:254-262
- [5] Wang Z, Wang L, Jiang R, et al. Ginsenoside Rg1 prevents bone marrow mesenchymal stem cell senescence via NRF2 and PI3K/Akt signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 174:182-194
- [6] He L, Long X, Yu N, et al. Premature ovarian insufficiency (POI) induced by dynamic intensity modulated radiation therapy via PI3K-AKT-FOXO3a in rat models [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021:7273846
- [7] Jarow JP. Personalized reproductive medicine: regulatory considerations [J]. Fertil Steril, 2018, 109(6):964-967
- [8] Qi L, Chen X, Wang J, et al. Mitochondria: the panacea to improve oocyte quality [J]. Ann Transl Med, 2019, 7(23):789

(下转第 213 页)

- tion to para-aortic lymph nodes in locally advanced cervical cancer necessary? [J]. *Cancer Res Treat*, 2014, 46 (4): 374-382
- [12] Zhu Y, Shen B, Pei X, et al. CT, MRI, and PET imaging features in cervical cancer staging and lymph node metastasis. [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13 (9): 10536-10544
- [13] Thelissen A, Jurgenliemk-Schulz IM, van der Leij F, et al. Upstaging by para-aortic lymph node dissection in patients with locally advanced cervical cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gynecol Oncol*, 2022, 164 (3): 667-674
- [14] De Cuypere M, Lovinfosse P, Goffin F, et al. Added value of para-aortic surgical staging compared to (18)F-FDG PET/CT on the external beam radiation field for patients with locally advanced cervical cancer: an ONCO-GF study [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2020, 46 (5): 883-887
- [15] Zhang G, Miao L, Wu H, et al. Pretreatment squamous cell carcinoma antigen (Sec-Ag) as a predictive factor for the use of consolidation chemotherapy in cervical cancer patients after postoperative extended-field concurrent chemoradiotherapy [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20: 2091180782
- [16] Wang W, Liu X, Meng Q, et al. Prophylactic extended-field irradiation for patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy: a propensity-score matching analysis [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28 (8): 1584-1591
- [17] Yap M, Cuartero J, Yan J, et al. The role of elective para-aortic lymph node irradiation in patients with locally advanced cervical cancer [J]. *Clin Oncol*, 2014, 26 (12): 797-803
- [18] Li H, Wang S, Liu Y, et al. Prophylactic extended-field irradiation for locally advanced cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2022, 166 (3): 606-613
- [19] Lei C, Ma S, Huang M, et al. Long-term survival and late toxicity associated with pelvic intensity modulated radiation therapy (IMRT) for cervical cancer involving CT-based positive lymph nodes [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 520
- [20] Liang Y, Feng S, Xie W, et al. Comparison of survival, acute toxicities, and dose-volume parameters between intensity-modulated radiotherapy with or without internal target volume delineation method and three-dimensional conformal radiotherapy in cervical cancer patients: a retrospective and propensity score-matched analysis [J]. *Cancer Med*, 2022, 11 (1): 151-165
- [21] Wakatsuki M, Kato S, Ohno T, et al. Multi-institutional observational study of prophylactic extended-field concurrent chemoradiation therapy using weekly cisplatin for patients with pelvic node-positive cervical cancer in east and southeast asia [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Physics*, 2019, 105 (1): 183-189
- [22] Yoon M, Lee HK, Park EY, et al. Randomized multi-center phase II trial of prophylactic irradiation of para-aortic lymph nodes in advanced cervical cancer according to tumor hypoxia: Korean Radiation Oncology Group (KROG 07-01) study [J]. *Int J Cancer*, 2022, 151 (12): 2182-2194

(收稿日期 2022-10-19)

第一作者简介:陈宝杰(1995-),男,川北医学院硕士在读。
主要研究方向:肿瘤临床研究。

(上接第 206 页)

- [9] 赵新永,孙岩,赵鸿森,等.左归丸对自然衰老小鼠卵母细胞线粒体功能的改善作用[J].*中药新药与临床药理*,2020,31(8):924-929
- [10] 杨开锋,李兰,周虹,等.氧化应激与细胞自噬凋亡对卵巢功能不全调控的研究进展[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(5):809-814
- [11] He L, Ling L, Wei T, et al. Ginsenoside Rg1 improves fertility and reduces ovarian pathological damages in premature ovarian failure model of mice[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242 (7): 683-691
- [12] Rodriguez-Eiguren A, Gómez-Alvarez M, Francés-Herrero E, et al. Human umbilical cord-based therapeutics: stem cells and blood derivatives for female reproductive medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (24): 15942
- [13] Abbasi-Kangevari M, Ghamari SH, Safaeinejad F, et al. Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, MMPs regulation, and remyelination stimulation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 238
- [14] Muttini A, Barboni B, Valbonetti L, et al. Amniotic epithelial stem cells: salient features and possible therapeutic role[J]. *Sports Med Arthrosc Rev*, 2018, 26 (2): 70-74
- [15] Baker EK, Malhotra A, Lim R, et al. Human amnion cells for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a protocol for a phase I dose escalation study [J]. *BMJ Open*, 2019, 9 (2): e026265
- [16] Phan TG, Ma H, Lim R, et al. Phase 1 trial of amnion cell therapy for ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 198
- [17] Lim R, Hodge A, Moore G, et al. A pilot study evaluating the safety of intravenously administered human amnion epithelial cells for the treatment of hepatic fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 549
- [18] Otagiri S, Ohnishi S, Miura A, et al. Evaluation of amnion-derived mesenchymal stem cells for treatment-resistant moderate Crohn's disease: study protocol for a phase I/II, dual-centre, open-label, uncontrolled, dose-response trial [J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2018, 5 (1): e000206
- [19] Abbasi-Kangevari M, Ghamari SH, Safaeinejad F, et al. Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, MMPs regulation, and remyelination stimulation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 238
- [20] Hu WX, Jing PW, Wang L, et al. The positive effects of Ginsenoside Rg1 upon the hematopoietic microenvironment in a D-Galactose-induced aged rat model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 15: 119
- [21] Dong J, Zhu G, Wang TC, et al. Ginsenoside Rg1 promotes neural differentiation of mouse adipose-derived stem cells via the miRNA-124 signaling pathway [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18 (5): 445-448

(收稿日期 2022-10-30)

第一作者简介:祝叶(1998-),女,遵义市第一人民医院住院医师。主要研究方向:生殖内分泌。