

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2019.03.012

脐带间充质干细胞与卵巢早衰中颗粒细胞交互作用的研究进展

李慧, 陈曦, 昌晓红

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指女性在 40 岁之前出现的以卵巢功能过早衰竭 (如月经稀发、闭经、不孕等) 为主要临床表现的综合征^[1]。雌激素水平低和不孕是对育龄妇女的两大威胁。近年来, 癌症在育龄期女性中的发病率逐渐增加, 虽然化疗可延长癌症患者生存时间, 但也会出现一些副作用, 其中化疗引起的 POF 越来越受到关注。有研究报道化疗药物主要通过损害卵巢颗粒细胞 DNA 及激活细胞凋亡通路等诱导颗粒细胞凋亡, 继而引起卵泡闭锁, 降低卵巢功能^[2]。

颗粒细胞是一种卵巢合成和分泌抑制素、雌激素的主要功能细胞, 在女性卵泡的生长、发育和成熟, 黄体生成等方面发挥着重要作用。颗粒细胞在卵母细胞的成熟和发育中起到支持雌激素介导的调节作用, 并维持卵巢的激素平衡, 以通过自分泌和旁分泌机制促进卵母细胞成熟。颗粒细胞生长的好坏对卵泡的发育、成熟及激素的分泌具有至关重要的作用。颗粒细胞功能失调时, 常常引起卵泡发育障碍和激素分泌异常, 最终导致卵泡闭锁。

目前, POF 的治疗方法主要为激素替代疗法, 该疗法主要以改善症状为主, 长期使用可引发心血管疾病、肿瘤等患病风险。大量研究表明间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 可以抑制颗粒细胞凋亡, 改善卵巢早衰动物卵巢储备功能, 增加卵泡数和排卵^[3-5], 这些证据表明间充质干细胞治疗 POF 具有潜在的临床应用价值。MSCs 可从多种组织中分离出来, 包括骨髓、神经组织、脂肪组织、羊水、胎盘和脐带等, 具有自我更新及多系分化潜能, 可分化成不同的祖细胞^[6]。现就间充质干细胞对卵巢颗粒细胞影响方式进行综述。

1 MSCs 对 POF 中颗粒细胞干细胞特性的影响

颗粒细胞并不是终末分化的细胞, 它们可以进一步发生黄素化, 或者转变为 Sertoli 细胞, 在分裂方式及增殖方面虽然不具有干细胞的生物学特点, 但其可表达多种具有多潜能分化功能的基因, 该现象得到了大量研究支持。2009 年, Kossowska-Tomaszczuk 等^[7]研究发现当培养基中长期存在白血病抑制因子 (leukemia-inhibiting factor, LIF) 时, 颗粒细胞表面标志物 FSHR 表达逐渐消失, 分泌激素的功能逐渐降低, 同时出现干细胞标志 POU5F1、CD29、CD44、CD90、CD105 表达, 体外培养时可分化成骨、软骨及神经元细胞等, 该研究表明人卵巢中黄素化颗粒细胞具有干细胞的特性, 为后续颗粒细胞干细胞研究打下了基础。Dzafic

等^[8]发现从废弃的卵泡液里分离出的颗粒细胞表达干细胞标志物, 如 OCT-4、NANOG 和 SOX-2, 显示出高端粒酶活性, 同时在体外可分化成其他细胞类型。也有研究报道, 颗粒细胞表达多能干细胞标志物, 包括 Nanog、Sox-2 和 TERT 等^[9], 与上述结果一致。Yousefi 等^[10]比较了两种不同的体外培养条件, 即卵泡液与胎牛血清对颗粒细胞多能性的影响, 结果显示在体外培养不超过 14 d 时, 卵泡液更有利于颗粒细胞多能性的维持, 可为后续用于诱导人颗粒细胞中干细胞特异性因子表达的培养基添加物提供依据。Maleki 等^[11]比较了人体各种组织来源 MSCs 样细胞表面特异性干细胞标志物的表达, 其中颗粒细胞与脐带来源 MSCs 均表达 CD44、CD90、CD105、CD106、CD146、CD166 和 Stro-1 等常见的间充质干细胞的特征抗原, 其中 CD44 的高表达有助于细胞的干性功能维持。Dzafic 等^[12]应用 RT2 Profiler PCR array 技术, 分析了 87 种与干细胞 MSCs 相关的基因表达谱, 同时与骨髓间充质干细胞进行比较分析。结果发现, 颗粒细胞能够表达 57 种与骨髓间充质干细胞相同的基因, 其中 16 种基因表达上调, 20 种基因表达下调。而其中优势生长的颗粒细胞则能够分化为成骨细胞、脂肪细胞和胰腺细胞。尽管目前的研究表明颗粒细胞具有干细胞的特性, 然而大多数研究仅局限在颗粒细胞与间充质干细胞表面标志物表达情况的比较, 干细胞能否影响颗粒细胞干性特征仍未明确, 需进一步研究。

2 间充质干细胞对 POF 中颗粒细胞凋亡的调控

目前 POF 的病因仍未明确, 可能与遗传、内分泌、代谢、线粒体障碍、DNA 损伤等影响卵泡的发育相关。有研究报道 POF 发生最重要的机制是卵泡功能障碍和卵泡耗竭^[13]。卵巢颗粒细胞的凋亡是影响卵巢储备和功能下降的重要机制。因此, 抑制卵巢颗粒细胞的凋亡, 避免卵泡闭锁, 就有可能延缓或避免卵巢早衰的发生。一些研究表明, MSCs 可抑制 POF 动物模型中和体外颗粒细胞的凋亡。Yin 等^[14]将人胎盘来源的间充质干细胞 (hPMSCs) 用于 POF 小鼠后, 小鼠卵巢功能得到明显改善, 性周期、卵泡发育及激素

基金项目: 北京大学人民医院研究与发展基金 (RDH2017-06)

作者单位: 100044 北京, 北京大学人民医院妇产科 (李慧、昌晓红), 妇科肿瘤中心 (李慧、昌晓红), 生殖中心 (陈曦)

通信作者: 昌晓红, Email: changxiaohong@pukph.edu.cn

收稿日期: 2019-02-28

分泌均恢复正常,颗粒细胞凋亡数量明显减少,进一步研究发现 hPMSCs 可能通过 Treg 细胞和细胞因子等改善小鼠卵巢功能。Xia 等^[15]将窦前卵泡与间充质干细胞进行体外共培养,一段时间后发现,MSCs 以剂量依赖方式改变卵泡存活率,增加卵泡生长速度,改善窦前卵泡的生存能力。进一步分析显示, MSCs 可促进卵母细胞 GDF9 和 BMP15 的表达,促进颗粒细胞抑制素 β 和 TGF β 的表达。该研究提示: MSCs 可促进窦前卵泡的发育,通过促进体外卵泡生长,为生育力保护和保存提供很好的策略。Ding 等^[16]将人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)与自然衰老的人颗粒细胞共培养,培养一周后发现,颗粒细胞增殖率明显增加,细胞表面 AMH、FSHR、FOXL2、CYP19A1 的表达明显增加,提示 hAMSCs 可能通过改善颗粒细胞的功能阻止人自然年龄卵巢功能的减退。Manshadi 等^[17]建立 POF 小鼠模型,分为人子宫内膜间充质干细胞(HuMenSCs)治疗组和对照组, HuMenSCs 治疗组颗粒细胞表面 AMH、FSHR 的表达明显增加,雌激素分泌增加,卵巢功能明显改善。通过标记 HuMenSCs,发现细胞主要定位在卵泡周围颗粒细胞层,该研究认为 HuMenSCs 能够分化颗粒细胞,同时具有分泌激素的能力。骨髓间充质干细胞 BMSCs 同样具有改善颗粒细胞生长,恢复 POF 模型卵巢功能的能力^[18-19]。Fu 等^[20]在体外培养 BMSC 时,发现细胞分泌 VEGF、HGF、IGF-1 等生长因子,同时发现该细胞可抑制颗粒细胞凋亡和 Bcl2 蛋白的表达。BMSCs 可以改善围绝经期和顺铂诱导的颗粒细胞的凋亡^[21]。有研究者将自体 BMSCs 治疗特异性 POF 患者,结果显示,2 例(20%)在移植后 3 个月恢复月经,其中一例(10%)怀孕并分娩了一个健康的婴儿,提示间充质干细胞可用于 POF 的治疗,具体的作用机制仍需进一步探索^[22]。采用热休克 HS 技术预处理大鼠骨髓 MSCs,提高干细胞抗凋亡能力,保证用于移植干细胞的数量和活力。将 HS 预处理的细胞与化疗药物预处理的颗粒细胞 1:1 共培养,检测颗粒细胞凋亡情况,结果发现 HS 预处理可抑制化疗诱导的颗粒细胞凋亡。同时将 HS 预处理 MSCs 注射到 POF 大鼠双侧卵巢,发现可进一步改善化疗期间的卵巢结构和内分泌功能,且该组颗粒细胞凋亡数明显少于 POF 模型组及 MSCs 治疗组。颗粒细胞的凋亡与卵泡闭锁密切相关。随着颗粒细胞的凋亡减少,卵泡闭锁也减少。该研究认为,HS 预处理增强 MSCs 修复作用的能力与抑制颗粒细胞的凋亡有关^[23-25]。Xiao 等^[26]研究发现羊水干细胞(amniotic fluid stem cells, AFSCs)来源外泌体可在体外预防环磷酸胺诱导的颗粒细胞的凋亡。同时 AFSCs 来源外泌体可通过 miR-146a 和 miR-10a 抑制颗粒细胞凋亡,从而预防环磷酸胺诱导的小鼠模型的卵泡闭锁。Sun 等^[27]通过提取人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, huMSCs)来源的外泌体处理顺铂诱导的颗粒细胞,发现细胞活力增加,细胞凋亡相关基因 Bcl2、caspase3 表达上调, Bax、cleaved caspase3、cleaved PARP 的表达下调。该研究认为 huMSCs 来源的外泌体可在体外预防顺铂

诱导的颗粒细胞的损伤,为后续干细胞治疗 POF 提供了新的证据。

3 干细胞可发生颗粒细胞样改变

卵巢皮质中的卵泡数量和质量、卵泡生长能力、卵巢发育和卵母细胞的形成决定卵巢储备和功能。而卵巢储备和功能是衡量女性生殖内分泌功能和生育潜力的指标。卵母细胞的质量直接影响卵巢的储备和功能,而颗粒细胞质量差,最终可能导致 POF 的发生。有研究报道,人诱导多能干细胞可在体外多种因子的作用下分化成卵巢颗粒样细胞,细胞可表达 AMH、inhibin α 、inhibin β 及 FSH 受体分子,但不表达 OCT-4、Nanog 等干细胞标志物。当这些颗粒样细胞注入 POF 小鼠体内时,可改善小鼠卵巢颗粒样细胞的生长,修复卵巢损伤,维持卵巢结构的完整性,以及促进卵泡的生长和发育^[28]。Lan 等^[29]在体外培养条件下将胚胎干细胞诱导分化为有功能的颗粒样细胞,该细胞可分泌 AMH 和雌激素等,该研究为卵泡形成和激素分泌提供了可能,为后续深入研究提供了方向。以上研究表明,干细胞可在体外诱导分化为颗粒样细胞,具有颗粒细胞内分泌功能,可改善卵泡的生长和发育,为 POF 的治疗提供了新方向。

综上所述, MSCs 在体内外与颗粒细胞共培养时,可能通过影响颗粒细胞干细胞潜能、调控颗粒细胞凋亡或诱导分化为颗粒细胞来发挥各种生物学功能,从而促进卵泡的生长和发育,改善卵巢储备和功能,逆转 POF。MSCs 具有高增殖潜力,自我更新潜力和多重分化潜能,大量研究表明 MSCs 可改善 POF 动物模型的卵巢结构和功能,这些都预示着 MSC 在 POF 治疗方面具有光明的临床转化应用前景。然而, MSCs 对卵巢早衰中颗粒细胞具体作用机制仍未明确,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Liu XM, Yan MQ, Ji SY, et al. Loss of oocyte Rps26 in mice arrests oocyte growth and causes premature ovarian failure. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12):1144.
- [2] Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol*, 2016, 12(20):2333-2344.
- [3] Song D, Zhong Y, Qian C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. *Biomed Res Int*, 2016, 2016:2517514.
- [4] Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouy SA, et al. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: possible direct and indirect effects. *Tissue Cell*, 2016, 48(4):370-382.
- [5] Zhu SF, Hu HB, Xu HY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9):2108-2117.
- [6] Sahu A, Foulsham W, Amouzegar A, et al. The therapeutic application of mesenchymal stem cells at the ocular surface. *Ocul Surf*, 2019, S1542-0124(18):30207-30216.
- [7] Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C, De Geyter M, et al. The

- multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells*, 2009, 27(1):210-219.
- [8] Dzafic E, Stimpfel M, Virant-Klun I. Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(10):1255-1261.
- [9] Mattioli M, Gloria A, Turriani M, et al. Osteo-regenerative potential of ovarian granulosa cells: an in vitro and in vivo study. *Theriogenology*, 2012, 77(7):1425-1437.
- [10] Yousefi S, Soleimanirad J, Hamdi K, et al. Distinct effect of fetal bovine serum versus follicular fluid on multipotentiality of human granulosa cells in in vitro condition. *Biologicals*, 2018, 52:44-48.
- [11] Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, et al. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells*, 2014, 7(2):118-126.
- [12] Dzafic E, Stimpfel M, Novakovic S, et al. Expression of mesenchymal stem cells-related genes and plasticity of aspirated follicular cells obtained from infertile women. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:508216.
- [13] Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*, 2009, 360(6):606-614.
- [14] Yin N, Zhao W, Luo Q, et al. Restoring ovarian function with human placenta-derived mesenchymal stem cells in autoimmune-induced premature ovarian failure mice mediated by Treg cells and associated cytokines. *Reprod Sci*, 2018, 25(7):1073-1082.
- [15] Xia X, Wang T, Yin T, et al. Mesenchymal stem cells facilitate in vitro development of human preantral follicle. *Reprod Sci*, 2015, 22(11):1367-1376.
- [16] 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. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):55.
- [17] Manshadi MD, Navid S, Hoshino Y, et al. The effects of human menstrual blood stem cells-derived granulosa cells on ovarian follicle formation in a rat model of premature ovarian failure. *Microsc Res Tech*, 2018. [Epub ahead of print]
- [18] He Y, Chen D, Yang L, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):263.
- [19] Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, et al. Human mesenchymal stem cells partially reverse infertility in chemotherapy-induced ovarian failure. *Reprod Sci*, 2018, 25(1):51-63.
- [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. *Cytotherapy*, 2008, 10(4):353-363.
- [21] Guo JQ, Gao X, Lin ZJ, et al. BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause. *BMC Cell Biol*, 2013, 14:18.
- [22] Edessy M, Hosni HN, Shady Y, et al. Autologous stem cells therapy, the first baby of idiopathic premature ovarian failure. *Acta Med Int*, 2016, 3(1):19-23.
- [23] Chen X, Wang Q, Li X, et al. Heat shock pretreatment of mesenchymal stem cells for inhibiting the apoptosis of ovarian granulosa cells enhanced the repair effect on chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):240.
- [24] Matsuda F, Inoue N, Manabe N, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*, 2012, 58(1):44-50.
- [25] Liu T, Huang Y, Zhang J, et al. Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(13):1548-1557.
- [26] Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, et al. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Sci Rep*, 2016, 6:23120.
- [27] Sun L, 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. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2552.
- [28] Liu T, Li Q, Wang S, et al. Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6):5053-5058.
- [29] Lan CW, Chen MJ, Jan PS, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into functional ovarian granulosa-like cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(9):3713-3723.