

## 脐带间充质干细胞治疗多囊卵巢综合征的作用及机制

刘麒薇<sup>1</sup>, 张俊辉<sup>2</sup>, 杨袁<sup>3</sup>, 王金娟<sup>1</sup><https://doi.org/10.12307/2024.115>

投稿日期: 2022-12-08

采用日期: 2023-03-23

修回日期: 2023-04-10

在线日期: 2023-05-04

中图分类号:

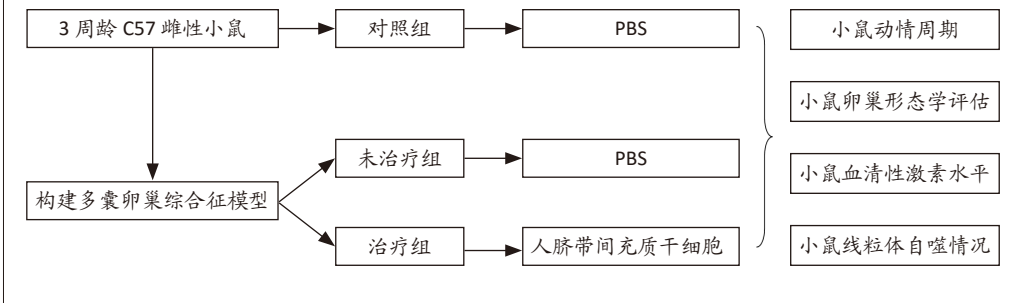
R459.9; R318.08; R714.14+7

文章编号:

2095-4344(2024)07-01015-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 人脐带间充质干细胞对多囊卵巢综合征的治疗作用



## 文题释义:

**多囊卵巢综合征:** 是女性常见的内分泌紊乱性疾病, 在生育期女性中的患病率为17.8%, 主要临床特征包括少排卵或不排卵、高雄激素血症、卵巢多囊, 还表现出多种全身性并发症, 例如不孕症, 代谢障碍性疾病如肥胖、糖代谢紊乱、心血管疾病等, 心理障碍类疾病如抑郁症等, 严重危害女性身心健康。

**线粒体自噬:** 是一种细胞选择性清除过剩或者受损线粒体的过程, 是维持线粒体稳态和保障细胞正常存活的重要环节。线粒体自噬在决定卵母细胞的发生发展过程中起到重要作用。卵母细胞中的大部分线粒体缺乏膜电位, 一旦过度激活自噬, 这部分线粒体可能被误认为受损线粒体而被降解, 从而影响卵母细胞中线粒体的数量, 导致细胞功能障碍, 最终影响胚胎的发育。

## 摘要

**背景:** 目前对多囊卵巢综合征的治疗大多是超指征用药, 对其治疗仍面临很大的挑战。研究证明人脐带间充质干细胞可修复卵巢功能, 但鲜有研究报道其对多囊卵巢综合征的治疗作用。

**目的:** 观察人脐带间充质干细胞对多囊卵巢综合征的治疗作用, 并初探线粒体自噬与人脐带间充质干细胞改善多囊卵巢综合征症状的相关性。

**方法:** C57BL/6J小鼠皮下连续注射20 d脱氢表雄酮构建多囊卵巢综合征模型, 通过尾静脉注射人脐带间充质干细胞( $2 \times 10^6$ ), 治疗后连续10 d取阴道内分泌物检测小鼠的发情周期。治疗后2周, 采用ELISA检测小鼠外周血性激素水平, 包括黄体生成素和卵泡刺激素; 苏木精-伊红染色进行卵巢组织病理学评估, 最后通过透射电镜观察卵巢组织中线粒体自噬反应。

**结果与结论:** ①经人脐带间充质干细胞治疗后, 多囊卵巢综合征小鼠卵巢中出现了处在原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡等各阶段的卵泡, 而且可见黄体组织, 说明小鼠排卵功能明显改善; ②经人脐带间充质干细胞治疗后, 多囊卵巢综合征小鼠性激素水平恢复至正常; ③未经治疗的多囊卵巢综合征小鼠长期处在动情期, 缺乏动情间期和动情前期, 经过人脐带间充质干细胞治疗的多囊卵巢综合征小鼠动情周期恢复到正常水平; ④经人脐带间充质干细胞治疗后, 多囊卵巢综合征小鼠卵巢组织中的线粒体自噬明显减少; ⑤结果表明, 人脐带间充质干细胞可有效改善多囊卵巢综合征小鼠内分泌紊乱, 促进排卵, 这可能与抑制线粒体自噬相关。

**关键词:** 脐带间充质干细胞; 多囊卵巢综合征; 排卵障碍; 内分泌紊乱; 线粒体自噬

## Role and mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cells on polycystic ovary syndrome

Liu Qiwei<sup>1</sup>, Zhang Junhui<sup>2</sup>, Yang Yuan<sup>3</sup>, Wang Jinjuan<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Gynecological Minimal Invasive Center, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China;<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China; <sup>3</sup>Hunan Yuanpin Cell Technology Co., Ltd. (Yuanpin Biotech), Changsha 410100, Hunan Province, China

Liu Qiwei, MD, Physician, Department of Gynecological Minimal Invasive Center, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China

**Corresponding author:** Wang Jinjuan, Chief physician, Department of Gynecological Minimal Invasive Center, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China<sup>1</sup>首都医科大学附属北京妇产医院 / 北京妇幼保健院妇科微创中心, 北京市 100006; <sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院妇产科, 安徽省合肥市230022; <sup>3</sup>湖南省长沙干细胞与再生医学工业技术研究院, 湖南省长沙市 410100**第一作者:** 刘麒薇, 女, 1988年生, 云南省祥云县人, 汉族, 2017年同济大学医学院毕业, 博士, 医师, 主要从事女性妇科内分泌、间充质干细胞、女性生育力保护等研究。**通讯作者:** 王金娟, 主任医师, 首都医科大学附属北京妇产医院 / 北京妇幼保健院妇科微创中心, 北京市 100006<https://orcid.org/0000-0002-8474-6656> (刘麒薇)**基金资助:** 北京市自然科学基金资助项目 (7214228), 项目负责人: 刘麒薇**引用本文:** 刘麒薇, 张俊辉, 杨袁, 王金娟. 脐带间充质干细胞治疗多囊卵巢综合征的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(7):1015-1020.

## Abstract

**BACKGROUND:** At present, many drugs used in the treatment of polycystic ovary syndrome are super-designated drugs, and the treatment of patients with polycystic ovary syndrome still faces great challenges. Studies have shown that human umbilical cord mesenchymal stem cells can repair ovarian function, but few studies have reported their therapeutic effect on polycystic ovary syndrome.

**OBJECTIVE:** To investigate the therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on polycystic ovary syndrome, and to preliminarily explore the correlation between mitochondrial autophagy and the improvement of polycystic ovary syndrome by human umbilical cord mesenchymal stem cells.

**METHODS:** Polycystic ovary syndrome mouse model was established by subcutaneous injection of dehydroepiandrosterone for 20 days into C57BL/6J mice. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ( $2 \times 10^6$ ) were injected through the caudal vein. After treatment, vaginal secretions were collected for 10 consecutive days to detect the estrus cycle of mice. At 2 weeks after treatment, the levels of sex hormones in the peripheral blood of mice, including luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, were detected by ELISA. Hematoxylin-eosin staining was used to evaluate ovarian histopathology. Finally, mitochondrial autophagy in ovaries was observed by transmission electron microscopy.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) After human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy, follicles at different stages (primitive follicles, primary follicles, and secondary follicles) appeared in the ovary of polycystic ovary syndrome mice, and luteal tissue could be seen, indicating that ovulation function of mice was effectively improved. (2) Polycystic ovary syndrome mice treated with human umbilical cord mesenchymal stem cells had sex hormone levels. (3) Untreated polycystic ovary syndrome mice were found to be in the estrous stage for a long time, lacking estrous interphase and estrous phase, but after human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy, the estrous cycle returned to a normal level. (4) After treatment with human umbilical cord mesenchymal stem cells, the mitochondrial autophagy of polycystic ovary syndrome mice was significantly reduced. (5) The results show that human umbilical cord mesenchymal stem cells can effectively improve the symptoms of endocrine disorders and promote ovulation in polycystic ovary syndrome mice, which may be related to the inhibition of mitochondrial autophagy.

**Key words:** umbilical cord mesenchymal stem cell; polycystic ovary syndrome; ovulatory dysfunction; endocrine disorder; mitochondrial autophagy

**Funding:** Natural Science Foundation of Beijing, No.7214228 (to LQW)

**How to cite this article:** LIU QW, ZHANG JH, YANG Y, WANG JJ. Role and mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cells on polycystic ovary syndrome. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(7):1015-1020.

## 0 引言 Introduction

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是由基因和环境等多因素引起的代谢紊乱性疾病, 是育龄期女性最常见的内分泌疾病之一。PCOS 在育龄期女性中的发病率为 6%~20%, 影响全球约 2 亿女性的健康<sup>[1-2]</sup>。PCOS 主要临床特征包括少排卵或不排卵、高雄激素血症、卵巢多囊, 还可导致其他疾病, 例如子宫内膜癌、代谢障碍性疾病等<sup>[3-4]</sup>。同时, PCOS 易引发妊娠期合并症, 例如妊娠期高血压、妊娠期糖尿病等, 危害孕期女性健康<sup>[5]</sup>。目前在临床上主要依据临床表现和患者个人需求对 PCOS 患者进行个体化治疗, 治疗方案包括调整生活方式、口服避孕药、口服二甲双胍、来曲唑、中药以及手术射频消融等, 但是现有治疗方案往往临床治疗效果不佳, 病情易复发, 不能根治疾病<sup>[6-7]</sup>。因此寻求一种更有效、全面的治疗方案一直是科研和临床工作者的共同目标。

间充质干细胞是一种多能成体干细胞, 具有强大的免疫调节特性, 包括抑制单核细胞成熟、降低肥大细胞脱颗粒、抑制 B 细胞增殖等<sup>[8-9]</sup>, 还具有自我修复功能、多向分化潜能, 并产生旁分泌因子发挥抗凋亡、抗炎症和抗氧化的作用<sup>[10]</sup>。有研究报道间充质干细胞可释放细胞微泡 (其中包含细胞增殖所需的蛋白质、mRNA 和生物活性脂质), 发挥保护和修复组织的作用<sup>[11]</sup>。基于这一特性, 间充质干细胞逐渐应用到很多疾病的治疗, 例如 Asherman 综合征、肝细胞癌、系统性硬化病、1 型糖尿病等<sup>[12-13]</sup>。

近年来, 间充质干细胞修复卵巢功能的研究获得了广泛关注, 已有动物研究显示, 间充质干细胞能有效修复异常受损的卵巢功能, 使其卵泡数量增多、性激素分泌正常<sup>[14-17]</sup>。近年一些研究证明自噬在卵巢功能发挥过程中起到重要作用, 参与了卵巢中卵泡排卵、性激素产生、颗粒细胞代谢及凋亡等过程, 逐步受到研究者关注<sup>[18-19]</sup>。由于 PCOS 具有炎症和过度氧化应激等特点, 导致线粒体自噬和凋亡<sup>[20]</sup>。该实

验拟探究人脐带间充质干细胞对 PCOS 的治疗作用, 以及人脐带间充质干细胞在治疗 PCOS 过程中与线粒体自噬的相关性, 为 PCOS 的临床治疗提供新思路。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验, 采用单因素方差分析方法进行多重比较分析, 使用 Fisher 最小显著性差异法 (LSD) 检验进行组间比较。

**1.2 时间及地点** 实验于 2021 年 6 月至 2022 年 9 月在安徽医科大学出生人口健康教育重点实验室完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物及分组** C57BL/6J 健康雌鼠 30 只, 3 周龄, 购买于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 在安徽医科大学动物实验中心饲养。随机选取 20 只小鼠, 通过连续 20 d 皮下注射脱氢表雄酮 (DHEA) 构建 PCOS 模型, 将构建好的 PCOS 模型随机均分为治疗组和未治疗组。余下 10 只小鼠每天注射 PBS 作为对照。实验方案经安徽医科大学动物实验伦理委员会批准, 审批号为 No. LLSC20170062。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**1.3.2 实验试剂及仪器** PBS(GIBCO, 美国); 双抗 (青霉素 / 链霉素)(GIBCO, 美国); 胎牛血清 (GIBCO, 美国); 胰酶 (GIBCO, 美国); L-15 培养基 (GIBCO, 美国); 高糖培养基 (DMEM/F12)(GIBCO, 美国); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(GIBCO, 美国); 锥虫蓝 (GIBCO, 美国); 胶原酶 I (GIBCO, 美国);  $\alpha$ -MEM 培养基 (GIBCO, 美国); 二甲基亚砷 (GIBCO, 美国); 异丙醇 (国药, 中国); 油红 O 染料 (SIGMA, 美国); 番红 O 染料 (SIGMA, 美国); 茜素红 S 染料 (SIGMA, 美国); 多聚甲醛 (SIGMA, 美国); 成脂肪诱导培养基 (GIBCO, 美国); 成软骨诱导培养基 (GIBCO, 美国); 成骨诱导培养基 (GIBCO,

美国); 脱氢表雄酮 (MCE, 美国); ELISA 试剂盒 (Elabscience, 中国); 流式细胞仪 (BD FACSVerse, 美国); 酶标仪 (Bio-Rad, 美国); 姬姆萨染色剂 (碧云天, 中国); 透射电镜 (Thermo-scientific Talos, 美国)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 人脐带间充质干细胞培养及鉴定** 人脐带组织来源于南华大学附属第二医院妇产科新生儿脐带, 经产妇和家属知晓并同意。实验获得南华大学附属第二医院干细胞临床伦理委员会批准, 审批号为 202205-01。人脐带间充质干细胞由湖南源品生物科技有限公司协助完成培养与鉴定。采用组织贴壁法从人脐带华通氏胶组织中分离和培养出间充质干细胞<sup>[21]</sup>, 当细胞达到 90% 融合时, 以 5 000 个/cm<sup>2</sup> 进行传代, 平放到 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 传代至第 6, 7 代为实验所用。利用流式细胞术对获得的间充质干细胞进行表面标记物鉴定 (CD44, CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD11b, CD19 和 HLA-DR), 并对间充质干细胞进行多向分化潜能鉴定 (成脂肪细胞分化、成软骨细胞分化、成骨细胞分化)。

##### 人脐带间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新生儿脐带
原代培养方法:	组织块贴壁法
培养基介绍:	α-MEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 胎牛血清 +1% 青链霉素
原代培养时间:	原代细胞培养至第 10 天换液, 之后两三天换液 1 次, 培养至第 10-15 天开始传代
细胞传代:	细胞融合至 70%-80% 用胰酶消化传至下一代, 按 1:5 比例传代, 每 4 d 传 1 代, 传至 7 代
细胞鉴定:	流式细胞术鉴定、多向分化能力鉴定
伦理学批准:	该实验经南华大学附属第二医院伦理委员会批准, 批件号: 202205-01

**1.4.2 动物建模及分组** 3 周龄 C57 小鼠每天皮下注射脱氢表雄酮 (60 μg/g, 溶于 90 μL 玉米油和 10 μL 体积分数为 95% 乙醇中), 连续注射 20 d, 构建 PCOS 模型。通过观察动情周期、卵巢形态和检测性激素水平明确是否成功构建 PCOS 模型, 主要包括以下 3 个方面: ①动情周期紊乱, 为造模成功的初步判断标准; ②从卵巢形态上, 卵巢多囊化, 膜细胞层变薄, 黄体数量变少; ③从性激素水平: 黄体生成素/卵泡刺激素比值显著增加<sup>[22]</sup>。

**1.4.3 小鼠性激素指标检测** 将人脐带间充质干细胞培养至第 7 代, 取 2×10<sup>6</sup> 个细胞溶于 50 μL PBS 中, 在连续注射脱氢表雄酮 20 d 后, 通过尾静脉一次性注射入治疗组小鼠体内。同时, 未治疗组和对照组小鼠注射相同剂量的 PBS。注射 2 周后称量小鼠体质量, 麻醉后从眼眶中采静脉血, 采用 ELISA 方法检测小鼠血浆中睾酮、卵泡刺激素和黄体生成素水平, 具体操作如下: ①加样: 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μL, 标准孔加入试剂盒中的标准品, 待测样品孔加待测样品 100 μL; ②加抗体:

弃去板内标准品液体和样品稀释液, 甩尽孔内液体, 并在洁净的吸水纸上拍干, 随后在每孔中加入生物素化抗体工作液 100 μL, 酶标板加上覆膜, 37 °C 孵育 1 h; ③清洗: 弃去孔内生物素抗体稀释液, 甩尽孔内液体, 在洁净的吸水纸上拍干, 每孔加洗涤液 350 μL, 每次浸泡一两分钟, 小心吸出洗涤液, 重复 3 次; ④加酶: 每孔加入酶合物工作液 100 μL, 加上覆膜, 37 °C 温育 30 min; ⑤清洗: 弃去孔内酶结合工作液, 甩干, 洗板 5 次; ⑥孵育: 每孔加入显色底物溶液 90 μL, 酶标板加上覆膜 37 °C 避光孵育 15 min; ⑦终止反应: 每孔加入反应终止液 50 μL, 终止反应; ⑧酶标仪检测: 立即用酶标仪在 450 nm 波长检测各孔的吸光度值。

**1.4.4 卵巢组织学评估** 注射 2 周后, 在小鼠动情期过量麻醉处死并剖腹取出卵巢组织, 用 40 g/L 多聚甲醛固定过夜, 经过石蜡包埋、切片及苏木精-伊红染色后, 在显微镜下观察卵巢组织形态、卵泡数量和生长情况。

**1.4.5 卵巢自噬体的检测** 将卵巢组织切成小片, 用 2.5% 戊二醛固定, 经过包埋、切片、醋酸铀酰和柠檬酸铅双染色后, 用透射电镜捕获图像, 观察自噬体的数量。

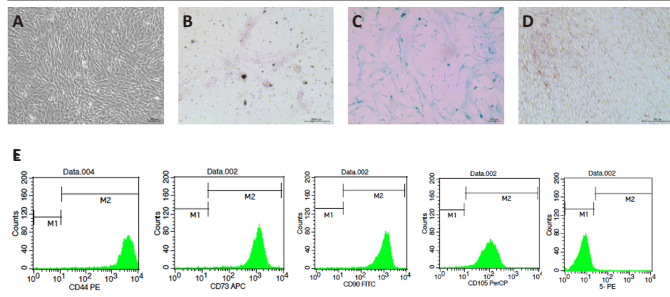
**1.4.6 小鼠发情周期监测** PCOS 模型建立后, 连续 10 d 监测小鼠的发情周期。取小鼠阴道分泌物用姬姆萨染色剂染色 3 min, 在光学显微镜下观察小鼠阴道分泌细胞 (包括有核上皮细胞、角化上皮细胞及白细胞) 形态, 根据 3 种细胞在镜下所占比例确定小鼠所处的动情阶段。处在动情前期的小鼠, 其阴道分泌细胞含有大量有核上皮细胞; 动情期小鼠的阴道分泌物中则存在大量的角化上皮细胞和少量有核上皮细胞; 到了动情后期, 则可在分泌物中找到白细胞及角化上皮细胞, 而在动情间期只能找到大量白细胞和黏液。

**1.5 主要观察指标** ①各组小鼠的卵巢形态学和性激素水平改变情况; ②各组小鼠动情周期的差异; ③各组小鼠卵巢组织的线粒体自噬情况。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示计量资料, 采用单因素方差分析方法进行多重比较分析, 并使用 Fisher 最小显著性差异法 (LSD) 进行组间比较。P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已通过安徽医科大学统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 人脐带间充质干细胞的鉴定结果** 脐带组织爬片过程中, 可见细胞贴壁, 细胞突起逐渐伸展伸长, 呈梭形, 见图 1A。间充质干细胞在成骨诱导培养基中培养 3 周, 茜素红 S 染色后可见红色钙盐沉积, 见图 1B; 间充质干细胞在成软骨诱导培养基中培养 3 周, 阿尔新蓝染色后可见细胞呈蓝色, 见图 1C; 间充质干细胞在成脂诱导培养基中培养 2 周, 油红 O 染色后可见红色脂滴, 见图 1D。流式鉴定细胞表面抗原 CD44, CD73, CD90, CD105 呈阳性表达, 而 CD45, CD34, CD11b, CD19 和 HLA-DR 呈阴性表达, 说明该细胞为间充质干细胞, 见图 1E。



图注：图 A 为第 3 代人脐带间充质干细胞，呈梭形，细胞突起逐渐伸展伸长 (×10)；B 为成骨诱导培养 3 周，茜素红 S 染色后可见红色钙盐沉积 (×10)；C 为成软骨诱导培养 3 周，阿尔新蓝染色后可见细胞呈蓝色 (×10)；D 为成脂诱导培养 3 周，油红 O 染色后细胞呈红色 (×10)；E 为流式鉴定细胞表面抗原 CD44, CD73, CD90, CD105 呈阳性表达，而 CD45, CD34, CD11b, CD19 和 HLA-DR 呈阴性表达

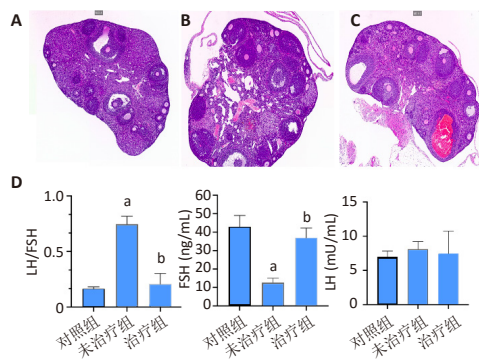
图 1 | 人脐带间充质干细胞的鉴定

Figure 1 | Identification of human umbilical cord mesenchymal stem cells

**2.2 实验动物数量分析** 随机选取 20 只小鼠构建 PCOS 模型，由于每天注射可能会导致小鼠伤口的反复感染引起全身性感染、个体差异等因素造成部分小鼠死亡，最终有 17 只小鼠存活。通过动情周期初步筛选出 14 只造模成功的 PCOS 小鼠进行接下来的实验，成功率约 70%，将 PCOS 小鼠分为治疗组 7 只和未治疗组 7 只。对照组最终有 7 只正常小鼠存活。

**2.3 卵巢组织形态学评估结果** 苏木精-伊红染色结果显示，未治疗组小鼠的卵巢组织中可见初级卵泡和次级卵泡，但是缺乏黄体，说明卵巢组织有排卵障碍；治疗组小鼠卵巢组织中可见处在不同时期的卵泡，同时可见黄体，窦前卵泡数量明显减少，说明人脐带间充质干细胞有效改善了 PCOS 小鼠的卵巢排卵功能并恢复了正常的性周期，见图 2A-C。

**2.4 血清中性激素水平比较** 与未治疗组相比，治疗组黄体生成素 / 卵泡刺激素比值显著降低 ( $P < 0.05$ )，卵泡刺激素水平显著升高 ( $P < 0.05$ )，黄体生成素水平无显著变化 ( $P > 0.05$ )，见图 2D。治疗组各项指标与对照组无显著统计学差异 ( $P > 0.05$ )，见图 2D。

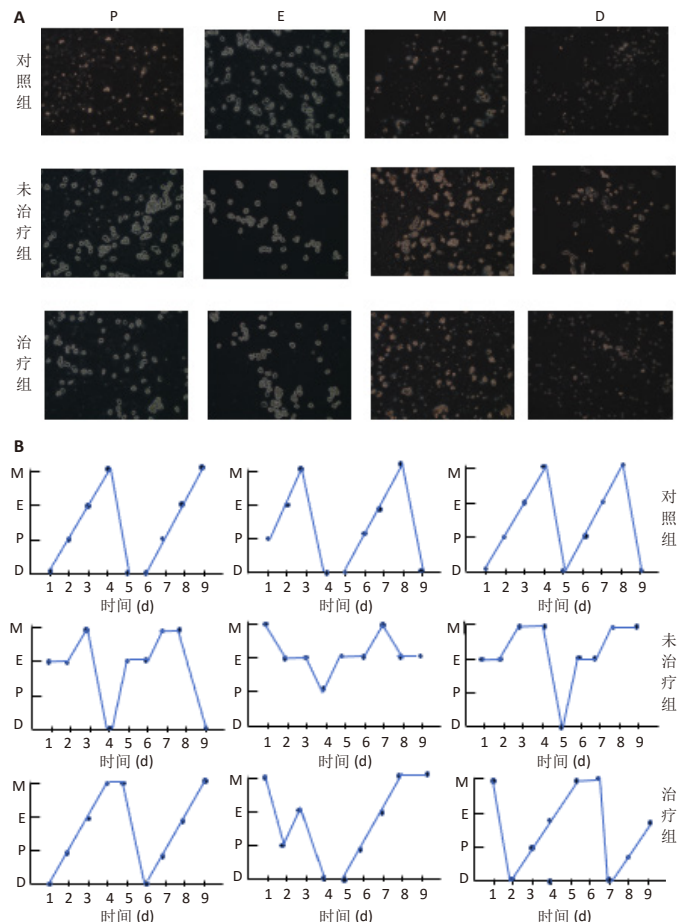


图注：图 A 为对照组，苏木精-伊红染色可见卵巢组织中存在原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、即将成熟的卵泡组织及黄体组织 (×50)；B 为未治疗组，苏木精-伊红染色可见卵巢组织中存在初级卵泡和次级卵泡，但未见黄体 (×50)；C 为治疗组，苏木精-伊红染色可见原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡等处在不同阶段的卵泡以及黄体组织，说明卵巢恢复了排卵 (×50)；D 为各组小鼠血清中性激素水平，与对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，与未治疗组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。LH：黄体生成素；FSH：卵泡刺激素

图 2 | 各组小鼠卵巢形态学评估和性激素水平比较

Figure 2 | Evaluation of morphology of ovary and comparison of sex hormone level in mice of each group

**2.5 小鼠动情周期的示踪与比较** 人脐带间充质干细胞可有效改善 PCOS 小鼠的性行为能力，见图 3。由图 3A 可看出，未经治疗的 PCOS 小鼠失去了正常的发情周期，动情期未见明显的无核角化细胞，由此可推测 PCOS 小鼠因排卵障碍而影响了发情周期，使性功能下降。经过人脐带间充质干细胞治疗后，PCOS 小鼠恢复了正常的动情周期，即恢复了排卵功能。通过观察单只小鼠连续 10 d 的动情周期变化情况，未经治疗的 PCOS 小鼠长期处在动情期，缺乏动情间期和动情前期，经过人脐带间充质干细胞治疗后动情周期得到明显改善，恢复了正常水平，见图 3B。



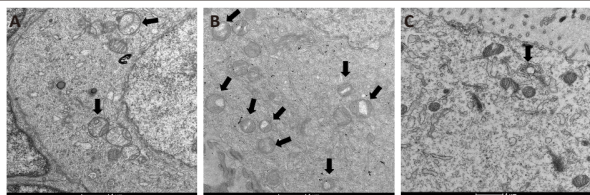
图注：图 A 为相差显微镜下观察小鼠阴道分泌细胞 (×50)，未治疗组小鼠长期处在动情期，经过人脐带间充质干细胞治疗后动情周期得到明显改善，恢复了正常水平；B 为小鼠每天所处的性周期阶段，每个图分别代表 1 只小鼠的动情周期。P 为动情前期；E 为动情期；M 为动情后期；D 为动情间期

图 3 | 各组小鼠动情周期表现

Figure 3 | Estrous cycle performance of mice in each group

**2.6 各组小鼠线粒体功能比较** 透射电镜观察显示，未治疗组 PCOS 小鼠的线粒体自噬明显多于对照组，经过人脐带间充质干细胞治疗后 PCOS 小鼠卵巢组织中的线粒体自噬明显减少，并与对照组相似，从超微结构看线粒体功能获得了改善，见图 4。

**2.7 生物相容性** 来源于人脐带的间充质干细胞生物相容性较好，小鼠无明显不良反应。



图注：图 A 为对照组，小鼠卵母细胞质中线粒体具有正常形态的脊，极少量线粒体发生自噬；B 为未治疗组，小鼠卵母细胞质中线粒体发生大量的自噬，只有极少数线粒体具有正常形态的线粒体脊；C 为治疗组，小鼠卵母细胞质中线粒体的形态得到恢复，只有极少数的线粒体发生自噬。箭头所示为发生自噬的线粒体

图 4 | 透射电镜观察各组小鼠自噬体数量

Figure 4 | Number of autophagosome in mice of each group by transmission electron microscopy

### 3 讨论 Discussion

间充质干细胞因具有多向分化潜能、自我更新能力和低免疫原性等特征，并且其取材方便，可自体移植，不涉及伦理问题等，被认为是干细胞治疗中有效且安全的细胞来源<sup>[23]</sup>。目前研究认为间充质干细胞主要通过旁分泌作用促进血管生成，抑制细胞凋亡和炎症反应，调节免疫系统发挥治疗作用<sup>[24]</sup>。间充质干细胞广泛应用于治疗多种临床疾病，并取得了一定的疗效，其中包括女性卵巢早衰，研究发现间充质干细胞可促进卵母细胞成熟与排卵，并改善下丘脑-垂体-卵巢轴的性激素分泌功能，说明对女性内分泌系统有积极的疗效<sup>[17, 25]</sup>。该研究通过人脐带间充质干细胞治疗脱氢表雄酮诱导的 PCOS 小鼠模型，结果可见人脐带间充质干细胞能改善 PCOS 小鼠卵母细胞的成熟和排卵过程，以及性周期和性激素水平。

PCOS 患者因卵母细胞成熟及排卵障碍导致其不孕率可高达 70%–80%<sup>[26]</sup>。BEDNARSKA 等<sup>[27-28]</sup>研究发现 PCOS 发病机制可能与线粒体功能异常相关。卵母细胞的发生及成熟过程与线粒体密切相关。更重要的是，卵母细胞中的线粒体在遗传过程中起到十分重要的作用，这是因为受精卵中的线粒体全部来自卵母细胞，而精子中的线粒体则在受精后降解，因此一旦线粒体功能失常会造成下一代的疾病发生率增加<sup>[29]</sup>。线粒体是负责细胞能量产生的主要细胞器，具有高突变率和低修复的特点，因此线粒体在女性生殖系统中具有特殊的线粒体 DNA 遗传机制，称为“瓶颈效应”<sup>[30]</sup>。有研究显示，肥胖可破坏卵母细胞中的线粒体，并且这种损伤甚至能遗传给下一代，后代仍有体质量过重和糖耐量降低的问题<sup>[7, 27]</sup>。

研究发现线粒体功能异常与胰岛素抵抗密切相关，其主要原因是底物氧化受损导致活性氧和氧化应激反应过度增强，导致线粒体自噬和凋亡<sup>[31]</sup>。线粒体自噬是一种细胞选择性清除过剩或者受损线粒体的过程，是维持线粒体稳态和保障细胞正常存活的重要环节。近年一些研究证明自噬在卵巢功能发挥过程中起到重要作用，参与了卵巢中卵泡排卵、性激素产生、颗粒细胞代谢及凋亡等过程，逐步受到研究者关注<sup>[32]</sup>。线粒体自噬在决定卵母细胞的发生发展过程中起到重要作用<sup>[33-34]</sup>。有研究推测母体将异常线粒体遗传给下一代的

原因与卵母细胞中异常的线粒体自噬相关。正常情况下卵母细胞不主动激活线粒体自噬过程，因为卵母细胞中的大部分线粒体缺乏膜电位，一旦过度激活自噬，这部分线粒体可能被误认为受损线粒体而被降解，从而影响卵母细胞中线粒体的数量，导致细胞功能障碍，最终影响胚胎的发展。因此，在 PCOS 中卵母细胞存在过度激活的线粒体自噬，直接影响卵母细胞质量。

综上，PCOS 小鼠的卵母细胞中线粒体自噬数量较正常组明显增多，但人脐带间充质干细胞可抑制卵母细胞中线粒体自噬的发生，从而促进卵母细胞的发生发展，进而有效改善了 PCOS 小鼠排卵抑制及性激素分泌紊乱等问题，该研究为 PCOS 的治疗提供了新思路和方向。

**作者贡献：**刘麒麟设计、完成实验并撰写文章，张俊晖、杨袁完成实验，王金娟评估实验结果。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让：**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范：**该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

### 4 参考文献 References

- [1] PARKER J, O'BRIEN C, HAWRELAK J, et al. Polycystic Ovary Syndrome: An Evolutionary Adaptation to Lifestyle and the Environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(3):1336.
- [2] BATRA M, BHATNAGER R, KUMAR A, et al. Interplay between PCOS and microbiome: The road less travelled. *Am J Reprod Immunol*. 2022; 88(2):e13580.
- [3] HOSSEINKHANI A, ASADI N, PASALAR M, et al. Traditional Persian Medicine and management of metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome. *J Tradit Complement Med*. 2017;8(1):17-23.
- [4] DING J, SHANSHAN M, MENGCHENG C, et al. Integrated Network Pharmacology and Clinical Study to Reveal the Effects and Mechanisms of Bushen Huoxue Huatan Decoction on Polycystic Ovary Syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:2635375.
- [5] MILLS G, BADEGHIESH A, SUARTHANA E, et al. Polycystic ovary syndrome as an independent risk factor for gestational diabetes and hypertensive disorders of pregnancy: a population-based study on 9.1 million pregnancies. *Hum Reprod*. 2020;35(7):1666-1674.
- [6] GU Y, ZHOU G, ZHOU F, et al. Life Modifications and PCOS: Old Story But New Tales. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:808898.
- [7] ARMANINI D, BOSCARO M, BORDIN L, et al. Controversies in the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of PCOS: Focus on Insulin Resistance, Inflammation, and Hyperandrogenism. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(8):4110.
- [8] SHIN TH, LEE BC, CHOI SW, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation. *Oncotarget*. 2017;8(1):512-522.

- [9] 邹旺辉, 钱楠楠, 张萌, 等. 间充质干细胞临床前研究启示: 间充质干细胞的细胞功能与 JAK/STAT 信号通路的关系 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19):3048-3055.
- [10] KADAM P, NTEMOU E, ONOFRE J, et al. Does co-transplantation of mesenchymal and spermatogonial stem cells improve reproductive efficiency and safety in mice? *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):310.
- [11] YANG Z, DU X, WANG C, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived microvesicles on premature ovarian insufficiency in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):250.
- [12] MOHAMED Y, BASYONY MA, EL-DESOUKI NI, et al. The potential therapeutic effect for melatonin and mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma. *Biomedicine (Taipei).* 2019;9(4):24.
- [13] GENTILE P. Breast Cancer Therapy: The Potential Role of Mesenchymal Stem Cells in Translational Biomedical Research. *Biomedicines.* 2022; 10(5):1179.
- [14] LIU F, HU S, YANG H, et al. Hyaluronic Acid Hydrogel Integrated with Mesenchymal Stem Cell-Secretome to Treat Endometrial Injury in a Rat Model of Asherman's Syndrome. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(14): e1900411.
- [15] ZHANG H, LUO Q, LU X, et al. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):20.
- [16] ARRIVABENE NEVES C, DOS SANTOS SILVA L, DE CARVALHO CES, et al. Culture of goat preantral follicles in situ associated with mesenchymal stem cell from bone marrow. *Zygote.* 2020;28(1):65-71.
- [17] 李仲康, 郑嘉华, 田彦鹏, 等. 间充质干细胞治疗卵巢早衰的最新进展及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(1):141-147.
- [18] KOBAYASHI M, YOSHINO O, NAKASHIMA A, et al. Inhibition of autophagy in theca cells induces CYP17A1 and PAI-1 expression via ROS/p38 and JNK signalling during the development of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;508:110792.
- [19] YEFIMOVA MG, LEFEVRE C, BASHAMBOO A, et al. Granulosa cells provide elimination of apoptotic oocytes through unconventional autophagy-assisted phagocytosis. *Hum Reprod.* 2020;35(6):1346-1362.
- [20] MALAMOULI M, LEVINGER I, MCAINCH AJ, et al. The mitochondrial profile in women with polycystic ovary syndrome: impact of exercise. *J Mol Endocrinol.* 2022;68(3):R11-R23.
- [21] VAN PHAM P, TRUONG NC, LE PT, et al. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(2):289-302.
- [22] DOU L, ZHENG Y, LI L, et al. The effect of cinnamon on polycystic ovary syndrome in a mouse model. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):99.
- [23] JIANG W, XU J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 2020;53(1):e12712.
- [24] WANG Y, CHEN X, CAO W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1009-1016.
- [25] LIU Q, ZHANG J, TANG Y, et al. The Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Female Fertility Restoration in Mice. *Curr Gene Ther.* 2022;22(4):319-330.
- [26] PASQUALI R, ZANOTTI L, FANELLI F, et al. Defining Hyperandrogenism in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Challenging Perspective. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(5):2013-2022.
- [27] BEDNARSKA S, SIEJKA A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(2):359-367.
- [28] COLLÉE J, MAWET M, TEBACHE L, et al. Polycystic ovarian syndrome and infertility: overview and insights of the putative treatments. *Gynecol Endocrinol.* 2021;37(10):869-874.
- [29] URBISZ AZ, CHAJEC Ł, MAŁOTA K, et al. All for one: changes in mitochondrial morphology and activity during syncytial oogenesis. *Biol Reprod.* 2022;106(6):1232-1253.
- [30] HARVEY AJ. Mitochondria in early development: linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction.* 2019;157(5):R159-R179.
- [31] SARPARANTA J, GARCÍA-MACIA M, SINGH R. Autophagy and Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2017;13(4):352-369.
- [32] BHARDWAJ JK, PALIWAL A, SARAF P, et al. Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary. *J Cell Physiol.* 2022;237(2):1157-1170.
- [33] HU J, DING X, TIAN S, et al. TRIM39 deficiency inhibits tumor progression and autophagic flux in colorectal cancer via suppressing the activity of Rab7. *Cell Death Dis.* 2021;12(4):391.
- [34] SHEN Q, LIU Y, LI H, et al. Effect of mitophagy in oocytes and granulosa cells on oocyte quality. *Biol Reprod.* 2021;104(2):294-304.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)