

## 间充质干细胞治疗卵巢早衰的机制研究进展

巴雅力格, 韩霞, 云升\*

内蒙古医科大学附属医院 干细胞研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010050

**摘要:** 卵巢早衰(POF)是一种卵巢功能减退引起的妇科内分泌疾病, 间充质干细胞(MSCs)可以有效治疗卵巢早衰, 具有修复卵巢结构、改善卵巢功能的作用, 其具体机制可通过MSCs的归巢作用, 直接分化为颗粒细胞或抑制其凋亡, 诱导、分化为原始生殖细胞, 促进卵巢血管生成, 免疫调节、降低氧化应激反应及旁分泌等作用, 促进卵巢功能的恢复, 从而改善育龄期女性的生育能力。

**关键词:** 卵巢早衰; 间充质干细胞

**中图分类号:** 文献标志码:A

**DOI:** 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.12.1891

## Research progress on the mechanism of mesenchymal stem cells therapy for premature ovarian failure

Bayalige, HAN Xia, YUN Sheng\*

Stem Cell Research Center, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010050, China

**Abstract:** Premature ovarian failure (POF) is a gynecological endocrine disease caused by ovarian dysfunction. Mesenchymal stem cells (MSCs) can effectively treat premature ovarian failure, and play a role in repairing ovarian structure and improving ovarian function. The specific mechanism can be a direct differentiation into granulosa cells or inhibition of their apoptosis through the homing effect of MSCs or differentiate into primordial germ cells. Benefit of MSCs can also be attributed to ovarian angiogenesis promotion, immune regulation, reduce oxidative stress response and paracrine, all potentially promote recovery of ovarian function, and thus improve the fertility of women of childbearing age.

**Key words:** premature ovarian failure (POF); mesenchymal stem cells (MSCs)

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是一种常见的妇科内分泌疾病, 病因复杂, 发病率呈逐年上升趋势。其特征是促性腺激素水平升高和雌激素水平降低, 并伴有原发性或继发性闭经, 严重影响着患者的身心健康。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。目前, 主要治疗方法为激素替代疗法, 虽然能改善临床症状, 但无法从根本

上修复受损的卵巢, 改善卵巢功能以解决生育问题, 还存在致癌风险<sup>[1]</sup>。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类起源于中胚层的多能干细胞, 具有干细胞的共性, 即自我更新和多向分化能力。与来源于血液系统的造血干细胞不同, 在胎盘、脐带、脂肪等组织中都可以获取。它们因其自我更新、多能性和免疫

调节等特性而广泛应用于细胞治疗、组织工程和再生医学领域中<sup>[2]</sup>。卵巢局部注射 MSCs, 通过调节线粒体功能和减少细胞凋亡, 有效改善卵巢功能低下<sup>[3]</sup>。其他多项基础研究也阐述了其良好的治疗效果, 显示出较好的临床转化和应用前景。本文对 MSCs 治疗 POF 涉及的相关机制进行系统综述, 为进一步的临床应用提供理论依据。

## 1 MSCs 的归巢作用

归巢是指 MSCs 定向迁移到受损组织并促进组织修复的过程。体内或外来的干细胞在机体出现缺血、缺氧、损伤等时, 能够向受损部位优先分布。胚胎干细胞来源的间充质干细胞 (embryonic stem cells-derived mesenchymal stem cells, ES-MSCs) 治疗化疗诱导的 POF 模型小鼠, 在移植前用绿色荧光蛋白 (GFP) 标记 ES-MSCs, 移植后 1 周用荧光显微镜观察, GFP 标记的 ES-MSCs 迁移至卵巢组织中, 并且改善了 POF 小鼠血清激素水平<sup>[4]</sup>。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs) 移植后可迁移到受损的卵巢组织并到达损伤部位<sup>[5]</sup>。然而, 尽管 BMSCs 具有归巢效应, 但它们不能直接分化为卵母细胞, 而是到达卵巢基质, 分泌多种细胞因子, 通过旁分泌途径改善卵巢功能<sup>[6]</sup>。其表面的趋化因子和生长因子受体, 如 IL-8 和 HGF 受体, 参与 BMSCs 的迁移和归巢。以上研究结果说明 MSCs 可以迁移至损伤的卵巢组织并且存活, 修复其组织结构及功能。因此, MSCs 的归巢能力是有效治疗 POF 的关键因素, 决定着是否进一步在体内发挥作用。

## 2 MSCs 与原始生殖细胞

MSCs 可以诱导并分化为原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC)。小鼠 BMSCs 在较高剂量的维甲酸存在下可诱导分化成雄性生殖细胞。CD61(整合素  $\beta$ 3) 通过激活 TGF- $\beta$  途径促进脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs) 分化为原始生殖细胞<sup>[7]</sup>。而脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cell, UCMSCs) 可以分化为卵母细胞样结构, 并表达生殖细胞特异性标志物的 mRNA 和蛋白质。但大量研究还表明 MSCs 并不能直接分化为卵母细胞, 而是

通过旁分泌途径而改善卵巢功能, 活体研究中也没有报道过 MSCs 分化的生殖细胞是否可以受精并形成胚胎。因此, MSCs 是否能直接分化为卵母细胞尚不能得到确切的结论, 仍存在争议, 今后的研究中需进一步深入探索与证实。

## 3 MSCs 与颗粒细胞

颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 是卵巢中最主要的基质细胞, 卵母细胞的发育和卵泡的成熟由颗粒细胞提供营养, 能够参与促性腺激素的调节, 并通过自分泌和旁分泌机制维持细胞成熟的微环境<sup>[8]</sup>。因此, GCs 在卵泡发育的所有阶段起重要作用, GCs 异常可以导致卵泡发育障碍, 甚至卵泡闭锁<sup>[9]</sup>。因此, 增强 GCs 功能和抑制 GCs 凋亡可以有效预防 POF 的发生。体外将化疗药物损伤的 GCs 与 BMSCs 进行共培养时, BMSCs 能够抑制 GCs 凋亡。进一步证实, BMSCs 移植可通过释放 VEGF、HGF 和 IGF-1 并上调 Bcl-2 表达, 减少 GC 凋亡, 改善卵巢功能。另一项研究发现, 在 POF 小鼠模型的卵巢组织中, MSCs 可以被诱导分化为卵巢组织样细胞, 尤其是卵巢颗粒样细胞。因此, MSCs 可产生抗凋亡生长因子, 从而有效调控 GCs 的凋亡, 并诱导分化为 GCs, 从而改善卵巢功能, 达到治疗卵巢早衰的效果。

## 4 MSCs 与血管生成

卵巢血管系统的建立和重塑是卵巢发育和功能恢复的基础。卵巢血管可以向卵泡和黄体提供营养支持, 并向靶器官分泌激素。有研究者通过标记 BMSCs 的特异性标志物, 如 CD44、CD90 等, 并观察其在卵巢中的分布, 发现 BMSCs 主要分布在受损卵巢的血管中。这意味着 BMSCs 可能在卵巢血管生成中发挥作用。在卵巢中, 颗粒细胞产生的血管相关因子, 如 VEGF、HGF、IGF 和 FGF 有助于维持优势卵泡的血管系统和健康。VEGF 是血管内皮细胞的有丝分裂原, 它可以刺激血管通透性, 在卵泡期提高 VEGF 的表达可能有助于增加卵巢血管生成和排卵前优势卵泡的数量<sup>[10]</sup>。除 VEGF 外, HGF 是卵泡内环境的一个重要组成部分, 可加速卵泡的生长, 增强卵巢表面上皮的增殖, 以修复排卵期间因卵子排出而受损的区域。VEGF 促进诱导血管的长度、面

积和分支点数, HGF 促进血管面积的增长, VEGF 和 HGF 的结合可以增加血管直径。而 MSCs 可以通过分泌 VEGF、IGF-1、GCSF 和 HGF 促进卵巢血管生成并减少间质纤维化<sup>[11]</sup>。

## 5 抗炎与免疫调节作用

抗炎作用是 MSCs 恢复卵巢功能的关键机制。研究显示, MSCs 不仅可以分泌抗炎因子, 还可以抑制促炎因子的分泌。另外, MSCs 可能抑制炎性前细胞因子的分泌, 抑制淋巴细胞的激活和增殖, 抑制抗原呈递细胞的功能, 向免疫细胞传递调节信息。羊膜来源的间充质干细胞 (amnion-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs) 通过减少卵巢中的炎性细胞因子, 如 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ , 抑制化疗诱导的炎性反应。POF 小鼠中促炎性 IFN- $\gamma$  水平升高, 抗炎性 TGF- $\beta$  水平降低, 而胎盘间充质干细胞 (placental mesenchymal stem cell, PMSCs) 移植可以逆转这种情况, 并且能够改善卵巢功能<sup>[12]</sup>。进一步研究发现, POF 小鼠的卵巢功能可能通过平衡 Th17/Tc17 和 Th17/Treg 细胞的比例来恢复。PMSCs 移植可逆转 POF 患者的卵巢功能, 并通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路降低 Th17/Tc17 和 Th17/Treg 细胞的比率<sup>[13]</sup>。PI3K/Akt 信号通路对卵泡激活、卵母细胞质量和 GCs 发育至关重要<sup>[14-15]</sup>。UCMSCs 移植到 POF 小鼠体内可上调 CD8+Treg 细胞的比例, 这种细胞具有典型的免疫抑制功能, 可以减少免疫排斥反应<sup>[16]</sup>。由此可见, MSCs 可通过抗炎及免疫调节等功能改善 POF 患者的卵巢功能。

## 6 MSC 与氧化应激

氧化应激是 POF 的潜在病因, 是由于细胞内的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生过多而破坏氧化系统和抗氧化系统之间平衡所导致。减少 ROS 可以保护卵巢线粒体的功能和结构稳定, 提高抗氧化和抗凋亡酶的水平, 从而减少卵巢细胞的凋亡和氧化损伤。因此, 氧化应激被认为是一种重要的凋亡介质, 卵巢细胞的命运最终取决于促凋亡基因和抗凋亡基因表达的平衡<sup>[17]</sup>。化疗导致的卵巢早衰大鼠体内会产生大量的 ROS, 进而产生氧化应激反应。UCMSCs 可通过降低超氧化物歧化酶

(SOD1) 和解偶联蛋白 2 (UCP2) 表达水平, 减轻氧化应激反应, 提高卵巢线粒体的功能, 修复卵巢组织损伤。AMSCs 通过影响丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), 以保护细胞免受氧化应激介导的功能障碍。

## 7 MSCs 的旁分泌作用

MSCs 自身分泌的包括细胞因子、生长因子、趋化因子及外泌体等物质, 释放到细胞外, 可通过旁分泌作用来发挥其修复、血管生成、免疫调节等作用。MSCs 的这种旁分泌作用可促进卵巢细胞增殖并改善卵巢功能<sup>[18]</sup>。为了评估 AD-MSCs 治疗早发性卵巢功能不全的机制是否通过旁分泌途径, 以及 AD-MSCs 旁分泌产生的因子是否有效干预 POF 大鼠的卵巢功能, 将 AD-MSCs 条件培养基注射到大鼠卵巢, 结果显示, AD-MSCs 条件培养基改善了 POF 大鼠卵巢的局部微环境, 导致卵巢细胞 Bax 表达减少, Bcl-2 和内源性 VEGF 表达增加, 从而抑制化疗诱导的 GCs 凋亡, 促进血管生成和调节卵泡发育, 从而改善了卵巢功能。此外, 还发现 MSCs 条件培养基可通过上调 CYP19A1 和 StAR 基因表达来刺激雌激素的产生<sup>[19]</sup>。而 MSCs 的主要旁分泌产物之一外泌体与其修复作用密切相关<sup>[20]</sup>。ADMSCs 来源的外泌体通过调节 SMAD2 信号通路, 促进 POF 中颗粒细胞的增殖率并抑制颗粒细胞的凋亡率。还可以通过 miR-144-5p 的递送来阻止环磷酰胺导致的大鼠卵巢滤泡闭锁, 并且通过靶向 PTEN 抑制颗粒细胞凋亡<sup>[21]</sup>。另外, BMSCs 外泌体通过 Akt/mTOR 信号通路进一步刺激血管生成。因此, MSCs 治疗卵巢早衰的相关机制是通过其本身还是分泌的相关因子发挥作用尚未明确。但是, 利用 MSCs 分泌的细胞因子和外泌体来进行无细胞疗法<sup>[22]</sup>, 可规避细胞免疫原性, 可能有更广的临床使用价值。

综上所述, 来源不同的 MSCs 具有一些共同的特点, 通过多种机制在治疗 POF 方面具有相似的疗效。可以同时激活多种机制, 如归巢作用、血管生成、免疫调节、氧化应激等, 并通过许多信号分子、受体和通路参与卵巢功能的恢复, 影响并改善受损卵巢组织再生的各个阶段。这些预示着 MSCs 移植治疗 POF 具有良好的临床转化前景。

## 8 问题与展望

尽管MSCs在POF治疗中开展了很多动物实验并取得较好的结果,但MSCs的临床应用仍有局限性,包括细胞来源不足、免疫原性、伦理问题等,以及

移植后细胞的存活率、体内发挥作用时间的问题等。未来可能通过优化相关流程,并提高细胞治疗的有效性和安全性,以使MSCs移植在临幊上具有更高的治疗率。因此,需要开展更深入、更系统的治疗机制的研究,才能更好的发挥作用。

## 参考文献:

- [1] 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: 3497-3505.
- [2] Wu X, Jiang J, Gu Z, et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11:345
- [3] Wang L, Mei Q, Xie Q, et al. A comparative study of mesenchymal stem cells transplantation approach to antagonize age-associated ovarian hypofunction with consideration of safety and efficiency. *J Adv Res*, 2021, 38: 245-259.
- [4] Bahrebar K, Malakhond M, Gholami S, et al. Tracking of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in premature ovarian failure model mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 577: 6-11.
- [5] Park HS, Chugh RM, Elsharoud A, et al. Safety of intraovarian injection of human mesenchymal stem cells in a premature ovarian insufficiency mouse model [J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 0963689720988502. doi: 10.1177/0963689720988502.
- [6] Li J, Mao Q, He J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 1-11.
- [7] Fang J, Wei Y, Lv C, et al. CD61 promotes the differentiation of canine ADMSCs into PGC-like cells through modulation of TGF- $\beta$  signaling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43851. doi: 10.1038/srep43851.
- [8] Wang J, Liu W, Yu D, et al. Research progress on the treatment of premature ovarian failure using mesenchymal stem cells: a literature review [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 3583.
- [9] 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:e98749. doi: 10.1371/journal.pone.0098749.
- [10] Iijima K, Jiang J Y, Shimizu T, et al. Acceleration of follicular development by administration of vascular endothelial growth factor in cycling female rats [J]. *J Reprod Dev*, 2005, 51: 161-168.
- [11] Wang Z, Wang Y, Yang T, et al. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 1-14. doi: 10.1186/s13287-016-0458-1.
- [12] 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 [J]. *Reprod Sci*, 2018, 25: 1073-1082.
- [13] Yin N, Wang Y, Lu X, et al. hPMSC transplantation restoring ovarian function in premature ovarian failure mice is associated with change of Th17/Tc17 and Th17/Treg cell ratios through the PI3K/Akt signal pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9: 1-14. doi: 10.1186/s13287-022-03173-8.
- [14] Maidarti M, Anderson RA, Telfer EE, et al. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt signalling and DNA damage in the oocyte: implications for primordial follicle activation, oocyte quality and ageing [J]. *Cells*, 2020, 9: 200. doi: 10.3390/cells9010200
- [15] Yuan J, Deng Y, Zhang Y, et al. Bmp4 inhibits goose granulosa cell apoptosis via PI3K/AKT/Caspase-9 signaling pathway [J]. *Anim Reprod Sci*, 2019, 200: 86-95.
- [16] Yin N, Wu C, Qiu J, et al. Protective properties of heme oxygenase-1 expressed in umbilical cord mesenchymal stem cells help restore the ovarian function of premature ovarian failure mice through activating the JNK/Bcl-2

- signal pathway-regulated autophagy and upregulating the circulating of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 1-16.
- [17] 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: 1-7.
- [18] Ahmadian S, Mahdipour M, Pazhang M, et al. Effectiveness of stem cell therapy in the treatment of ovarian disorders and female infertility: a systematic review[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2020, 15: 173-186.
- [19] Park H, Chugh R M, El Andaloussi A, et al. Human BM-MSC secretome enhances human granulosa cell proliferation and steroidogenesis and restores ovarian function in primary ovarian insufficiency mouse model[J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 1-12.
- [20] Hong L, Yan L, Xin Z, et al. Protective effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived conditioned medium on ovarian damage[J]. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12: 372-385.
- [21] Yang M, Lin L, Sha C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN[J]. *Lab Invest*, 2020, 100:342-352.
- [22] Zhang S, Zhu D, Mei X, et al. Advances in biomaterials and regenerative medicine for primary ovarian insufficiency therapy[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6:1957-1972.

