

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002619

高压氧暴露协同骨髓间充质干细胞移植对卵巢早衰大鼠
卵巢功能重建的研究李 琴¹, 敖洪峰², 李 蕾³, 罗 华³

(上海市奉贤区中心医院 1. 高压氧舱; 2. 病理科; 3. 中心实验室, 上海 201499)

【摘要】目的:探讨高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)协同骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植对卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)大鼠卵巢功能的重建, 探究其治疗机制。**方法:**雌性大鼠采用腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)建立卵巢早衰模型。造模成功后随机分为 3 组(模型组、BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组), 每组各 12 只; 另取空白组 12 只。BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组给予不同干预后, 分别记录大鼠动情周期, 测定血清 E2、FSH 激素水平, 各级卵泡计数, 观察卵巢显微结构、移植细胞在体内存活分布、生殖能力情况, 评价卵巢功能。**结果:**HBO+BMSCs 移植组动情周期恢复进程优于移植组; HBO+BMSCs 移植组 E2 水平(82.463 ± 4.108)较 BMSCs 移植组(77.233 ± 3.714)升高($P=0.047$); HBO+BMSCs 移植组 FSH 水平(21.292 ± 2.458)较 BMSCs 移植组(24.574 ± 2.389)降低($P=0.043$); HBO+BMSCs 移植组 GF(11.50 ± 1.27)、MF(4.50 ± 0.53)数量较 BMSCs 移植组(13.50 ± 1.43 , 5.40 ± 0.70)呈不同程度增加($P=0.024$, $P=0.028$), HBO+BMSCs 移植组 PF(46.00 ± 3.74)、AF(16.10 ± 2.18)较 BMSCs 移植组(41.30 ± 3.20 , 13.30 ± 1.89)呈不同程度减少($P=0.044$, $P=0.040$)。HBO+BMSCs 移植组在 BMSCs 移植 30 d 后可见到绿色荧光表达多于 BMSCs 移植组; HBO+BMSCs 移植组大鼠娩出乳鼠多于 BMSCs 移植组。**结论:**HBO 联合 BMSCs 移植具有协同的、安全有效的促进卵巢功能重建的作用。

【关键词】高压氧; 卵巢早衰; 骨髓间充质干细胞; 干细胞移植

【中图分类号】R764.431

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-01-18

Ovarian functional reconstruction in rats with premature ovarian failure
through hyperbaric oxygen combined with bone marrow mesenchymal stem
cell transplantationLi Qin¹, Ao Hongfeng², Li Lei³, Luo Hua³(1. Hyperbaric Oxygen Chamber; 2. Pathology Department; 3. Central Laboratory,
Fengxian District Central Hospital)

【Abstract】Objective: To study the ovarian functional reconstruction in rats with premature ovarian failure (POF) through hyperbaric oxygen (HBO) combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation. **Methods:** Female sprague dawley (SD) rats were subjected to intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX) to induce POF. Successful modeling (36 rats) were randomly divided into the model group, the BMSCs transplantation group, and HBO+BMSCs transplantation group, 12 in each group. Another 12 rats were taken from the blank group. After the BMSCs transplantation group and the HBO+BMSCs transplantation group were given individual intervention, rats estrus cycle, serum E2, FSH hormone level, the amount of follicles at all levels were recorded respectively, and ovarian microstructure, distribution of transplanted cells in ovarian tissue and reproductive ability were observed so as to evaluate the ovarian function. **Results:** The recovery of estrus cycle in the HBO+BMSCs transplantation group was better than that in the BMSCs transplantation group. E2 in the HBO+BMSCs transplantation group (82.463 ± 4.108) was higher than that in the BMSCs transplantation group (77.233 ± 3.714) ($P=0.047$) and FSH in the HBO+BMSCs transplantation group (21.292 ± 2.458) was lower than

that in the BMSCs transplantation group (24.574 ± 2.389) ($P=0.043$). Compared with the BMSCs transplantation group (13.50 ± 1.43), (5.40 ± 0.70), the number of GF (11.50 ± 1.27) MF (4.50 ± 0.53) in the HBO+BMSCs transplantation group increased at varying degrees ($P=0.024$, 0.028). Compared with the BMSCs transplantation group (41.30 ± 3.20 , 13.30 ± 1.89), the number of

作者介绍: 李 琴, Email: 2889607663@qq.com,

研究方向: 高压氧治疗。

基金项目: 上海市奉贤区科委社会发展科技发展基金项目(编号:
20171002)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200717.1314.016.html>
(2020-07-20)

PF(46.00 ± 3.74), AF(16.10 ± 2.18) in the HBO+BMSCs transplantation group decreased at varying degrees ($P=0.044, 0.040$). The expression of green fluorescence in the HBO+BMSCs transplantation group was more than that in transplantation group after 30 days of transplantation. SD rats in the HBO+BMSCs transplantation group had more offspring than that in the BMSCs transplantation group.

Conclusion: The HBO+BMSCs transplantation has a synergistic effect on functional reconstruction of POF, and it may play a safe and effective role in the treatment of POF.

[Key words] hyperbaric oxygen; premature ovarian failure; bone marrow mesenchymal stem cells; stem cell transplantation

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指妇女在 40 岁以前出现以闭经、不育、雌激素缺乏及促性腺激素水平升高为特征性疾病^[1]。目前尚无有效的治疗措施恢复或保护受损的卵巢功能, 防治已成为临床关注的热点。高压氧 (hyperbaric oxygen, HBO) 可以缓解组织缺氧, 增加组织氧分压^[2], 使大鼠下丘脑释放促性腺激素, 提高卵巢对性激素的敏感性, 直接激发卵巢的储备功能。有研究报道, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs) 移植可增加卵巢各级卵泡数, 促进颗粒细胞生长, 抗颗粒细胞凋亡, 改善卵巢内分泌功能^[3-4]。HBO 协同 BMSCs 移植重建 POF 大鼠卵巢功能的研究未见相关报道。本研究采用连续腹腔注射环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 的方法建立 POF 模型, 探讨 HBO 暴露协同 BMSCs 移植对 POF 功能恢复的重建, 为临床防治 POF 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 周龄清洁级雌性 SD 大鼠体重 (190 ± 20) g, 均购自上海杰思捷实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0004; 实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2017-0002。

1.1.2 主要药物、试剂 CTX (江苏盛迪医药有限公司, 规格: 0.2 g/瓶, 国药准字 H32020857, 批号: 16121725); 胎牛血清 (澳大利亚 Cellsera 公司); L-DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 荧光标记抗大鼠抗体 CD34 (英国 Abcam 公司)、CD44 (美国 Bio-rad 公司), 大鼠雌二醇 (estradiol, E2)、卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海联科生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 JA1103N 精密分析天平 (上海菁华科技仪器有限公司), SW-CJ-IF 型单人双面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂), 3111 型 CO₂ 培养箱 (德国 Thermo 公司);

Centrifug 5804R 低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Cellometer Mini 型全自动细胞计数仪 (美国 Nexcelom 公司); IX73+DP80 型荧光倒置显微镜成像系统 (日本奥林巴斯公司); FACSCanto 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); Epoch2 型全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司); MICROM-EC350 型石蜡包埋机 (德国 Thermo 公司); RM-2135 型轮转切片机 (德国 Leica 公司); CM1900 型冰冻切片机 (德国 Leica 公司); SHC 3200/10000-16/4 型空气加压氧舱 (上海七零一所杨园高压氧舱有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 分离、培养、鉴定、扩增 将 SD 大鼠麻醉后用 75% 酒精浸泡 5 min, 分离出股骨、胫骨, 用含 L-DMEM 的培养液冲出骨髓, 用吸管吹打成细胞悬液, 并移入离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清及脂肪层, 将沉淀的细胞充分混匀于完全培养基 (含 L-DMEM、10% FBS、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素) 中, 接种于 6 cm² 培养皿中, 并标记为 P1, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中进行原代培养, 整个过程无菌操作, 72 h 首次换液, 之后每 3 天换液 1 次, 倒置相差显微镜下观察, 待贴壁细胞融合达 85% 后进行传代, 一般 12~14 d 首次传代, 按 1:2 进行传代、扩增培养并标记为 P2, 直至贴壁细胞彼此融合铺满瓶底时, 重复上述操作, 反复传至 P3 代。取 P3 代 BMSCs, 胰酶消化后, 制成细胞密度为 1×10^6 单细胞/mL 悬液, 加入荧光标记的抗 CD34、CD44 抗体, 应用流式细胞仪进行表面标志鉴定^[5], 后续实验均采用 P3 代 BMSCs。

1.2.2 BMSCs 的标记 取 P3 代 BMSCs 用携带绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 基因的慢病毒进行标记, 以每孔 6×10^7 细胞/mL 接种后, 加入感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100 的病毒感染细胞。在完全培养基中孵育 24 h 后, 更换培养基继续培养。标记后在荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况。

1.2.3 实验分组与 POF 大鼠模型构建 48 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 筛选出阴道涂片示动情周期正常 (动情周期 4~5 d, 连续出现 2 个动情周期) 大鼠。取有规律周期 12 只大鼠为空白组, 其余为造模组。造模给药方案^[6]: 首次腹腔注射 CTX 负荷剂量 50 mg/kg, 再以 8 mg/(kg·d) 的剂量连续腹腔注射 14 d, 各组每日称重, 按体质量调整药量, 每日 8:00 用棉签轻取阴道分泌物涂片, 亚甲蓝染色, 观察阴道脱落细胞变化, 当连续 10 d 观测到动情周期紊乱、无规律交替, 或持

续停留在动情间期,提示 POF 建模成功。造模成功的大鼠随机分为 3 组:模型组、BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组,每组 12 只。

1.2.4 BMSCs 移植 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组于建模成功后第 1 天,分别通过尾静脉注射 20 μ L 经 GFP 标记的 BMSCs 细胞悬液(1×10^6 细胞/mL)。模型组和空白组注射等量生理盐水。

1.2.5 HBO 治疗 造模成功后第 1 天将装有 HBO+BMSCs 移植组大鼠的鼠笼置于氧舱内,升压 15 min,压力升为 0.12 MPa 时稳压吸氧 60 min,减压 25 min,总时间 100 min,1 次/d,连续 30 d。

1.3 观察指标

1.3.1 动情周期观察 每天上午 8:00 对各组大鼠分别完成阴道脱落细胞涂片,光镜下观察,判定动情周期,以 2 个动情周 8~10 d 作为观察点期,即以造模结束后第 1~10 天,第 11~20 天,第 21~30 天作为时间点。

1.3.2 血清 E2、FSH 激素水平测定 空白组、模型组于第 15 天和 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组于第 45 天,麻醉处死后心室取血(为避免大鼠动情各期激素水平差异,选择处于间期大鼠),室温静置 1 h,3 000 r/min 离心 20 min,取上清,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存,所有血清均用同一批 ELISA 试剂盒检测。

1.3.3 卵泡计数 各组大鼠选取右侧卵巢最大剖面石蜡包埋,连续性 3 μ m 切片,隔 3 张取 1 张,进行 HE 染色,参照大鼠各级卵泡分级标准^[7]。光镜下分别计数各组具有正常卵泡结构的各级卵泡数,包括原始卵泡(primitive follicle, PF)、生长卵泡(growing follicle, GF; 初级卵泡+次级卵泡)、成熟卵泡(mature follicle, MF)、闭锁卵泡(atresic follicle, AF),3 张切片各级卵泡数相加。

1.3.4 移植细胞存活情况 取左侧卵巢组织冰冻切片,荧光显微镜下观察绿色荧光信号分布。

1.3.5 生育能力评估 BMSCs 移植后 30 d,4 组各剩余雌性 SD 大鼠(2 只)分别与 12 周龄健康雄性 SD 大鼠按 2:1 比例合笼 10 d(约 2 个发情周期),发现阴栓后(出现阴栓判定为妊娠第 1 天),雌鼠单独饲养至自然分娩,观察各组大鼠产仔鼠数目。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);方差不齐,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐, Welch 法校正后采用 Dunnett T3 分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSCs 培养

细胞培养 72 h 后即可见有部分 BMSCs 贴壁,并逐渐转

变成梭形。培养至 12~14 d, BMSCs 贴壁面积可达 85%。培养细胞传代稳定, 6~7 d 即可铺满全层,细胞呈旋涡状生长(图 1)。

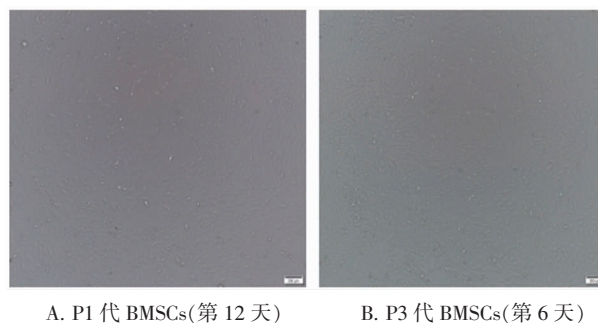


图 1 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(40 $\times$)

2.2 BMSCs 的流式鉴定

培养的 BMSCs 表面标志抗原 CD34、CD44 阳性表达率分别为 0.1%、91.3%。本实验中采用贴壁细胞分离培养法得到纯度较高、处于未分化状态的 BMSCs,符合 BMSCs 表面标志表达的特征(图 2)。

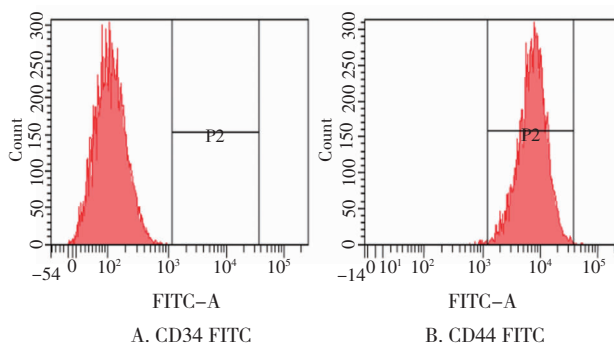


图 2 P3 代 SD 大鼠 BMSCs 细胞免疫表型定图

2.3 动情周期

模型组、BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组大鼠均在注射 CTX 后 15 d 内表现为动情周期紊乱,停滞在动情间期。模型组 CTX 注射结束后 30 d,动情周期仍未恢复。BMSCs 移植组 30%(3/10)的大鼠在移植后 25~30 d 内恢复正常动情周期, HBO+BMSCs 移植组 60%(6/10)的大鼠在移植后 15~30 d 内恢复正常动情周期。阴道涂片^[11]结果如下。①动情前期:以椭圆形的有核上皮细胞为主;②动情期:以无核角质化上皮细胞为主;③动情后期:角质化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞 3 种细胞均可见且比例相当;④动情间期:以体积小白细胞为主(图 3)。

2.4 性激素

模型组 E2 低于空白组、BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组,组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。空白组 E2 高于 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组,组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。模型组 FSH 高于空白组、

BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组, 组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。空白组 FSH 低于 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组, 组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。BMSCs 移植组与 HBO+BMSCs 移植组 E2、FSH 组间比较, 差异均有统计学意义($P=0.047, P=0.043$)(表 1)。

2.5 病理观察

空白组卵巢体积大, 卵泡生长活跃, 可见不同时期卵泡。模型组卵巢萎缩, PF、GF、MF 数量少, AF 显著增多, 间质纤维组织增多。BMSCs 移植组与 HBO+BMSCs 移植组 GF、MF 数量比模型组不同程度增多, PF、AF 数量比模型组不同程度减少(图 4)。模型组 PF、GF、MF、AF 低于空白组、BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组, 组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$); 空白组 PF 低于 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组, 组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$); 空白组 GF、MF 高于 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组, 组间比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$); 空白组 AF 低于 BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组, 组间比较差异均有统计学意

义($P=0.000, P=0.018$); BMSCs 移植组与 HBO+BMSCs 移植组 PF、GF、MF、AF 组间比较, 差异均有统计学意义($P=0.044, P=0.024, P=0.028, P=0.040$)(表 2)。

2.6 移植细胞的存活与分布

本实验采用 MOI=100 的 GFP(MOI=100, 细胞形态、生长均不受影响)感染 BMSCs, 24 h 后即可见到绿色荧光蛋白表达, 并逐渐增强, 72 h 可见较强绿色荧光, 且转染率(暗视野绿色荧光表达细胞数/明视野细胞数)近 90% 且表达趋于稳定。BMSCs 移植组、HBO+BMSCs 移植组移植 30 d 后分别在荧光显微镜下观察右侧卵巢组织切片, 均在卵巢组织内见到绿色荧光表达, 且 HBO+BMSCs 移植组绿色荧光表达量多于 BMSCs 移植组(图 5、图 6)。

2.7 生育能力评估

与正常雄鼠合笼后 8 周, 造模组无一例妊娠, 空白组($n=2$)、BMSCs 移植组($n=2$)、HBO+BMSCs 移植组($n=2$)大鼠与雄鼠平均合笼 21、31、28 d 后, 共分别娩出外观正常乳鼠 29 只、14 只、20 只。

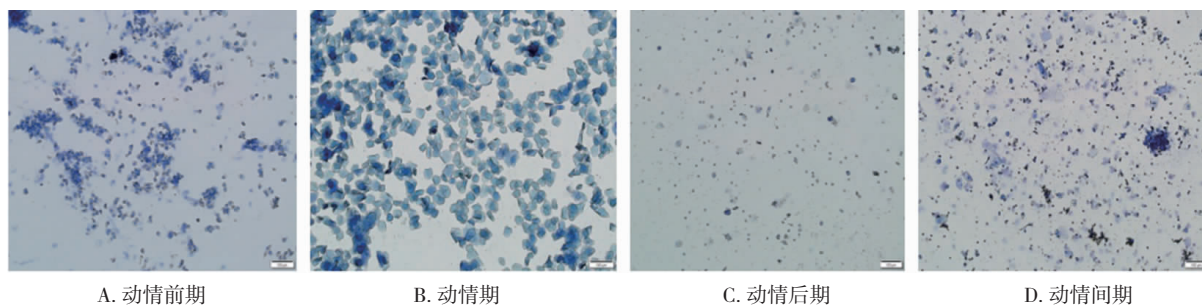


图 3 空白组大鼠阴道脱落细胞图片(亚甲蓝染色, 100×)

表 1 各组大鼠卵巢激素水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	E2/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	FSH/ $\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组($n=10$)	97.052 ± 4.350^a	16.297 ± 2.274^a
模型组($n=10$)	54.081 ± 3.450	32.973 ± 3.489
BMSCs 移植组($n=10$)	77.233 ± 3.714^b	24.574 ± 2.389^b
HBO+BMSCs 移植组($n=10$)	82.463 ± 4.108^c	21.292 ± 2.458^d
F 值	207.140	67.505
P 值	0.000	0.000

注: 与模型组比较, $^aP=0.000$; 与空白组比较, $^bP=0.000$; 与 BMSCs 移植组比较, $^cP=0.047, ^dP=0.043$

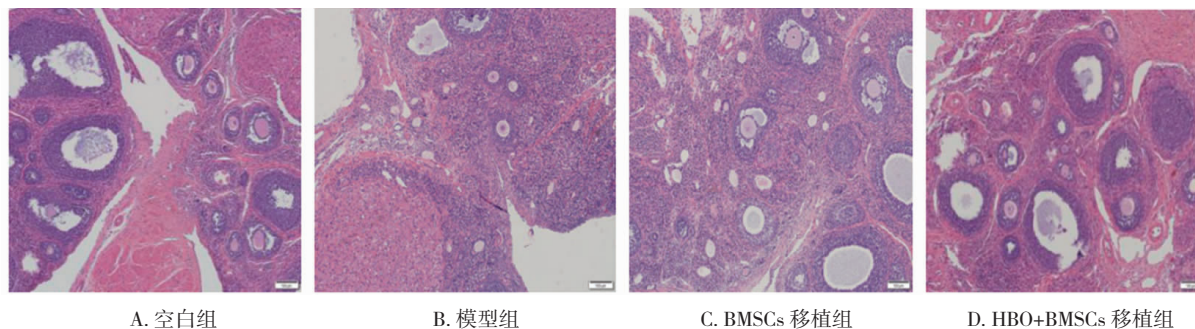


图 4 POF 大鼠卵巢组织 HE 染色(100×)

表 2 各组大鼠左侧卵巢组织各级卵泡数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PF	GF	MF	AF
空白组 ($n=10$)	36.60 ± 2.91^a	22.00 ± 1.89^a	13.10 ± 1.37^a	8.10 ± 0.74^a
模型组 ($n=10$)	12.40 ± 1.07	5.30 ± 0.95	1.60 ± 0.52	32.40 ± 2.91
移植组 ($n=10$)	46.00 ± 3.74^b	11.50 ± 1.27^b	4.50 ± 0.53^b	16.10 ± 2.18^b
HBO+移植组 ($n=10$)	41.30 ± 3.20^d	13.50 ± 1.43^e	5.40 ± 0.70^f	$13.30 \pm 1.89^{g*}$
F 值	263.924	234.365	331.099	253.334
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与模型组比较, $^aP=0.000$;与空白组比较, $^bP=0.000$, $^cP=0.018$;与 BMSCs 移植组比较, $^dP=0.044$, $^eP=0.024$, $^fP=0.028$, $^gP=0.040$

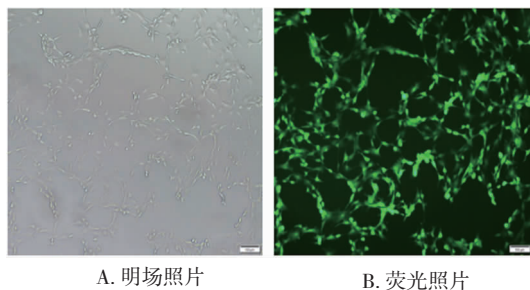


图 5 慢病毒感染后 BMSCs 的 GFP 表达图 (100×)

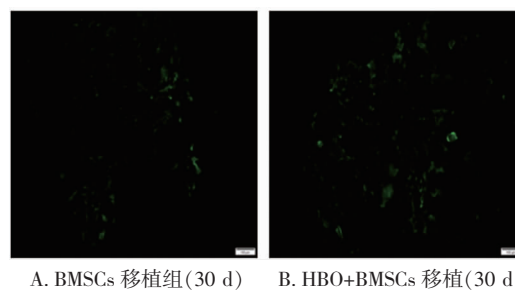


图 6 移植细胞的存活与分布图 (100×)

3 讨 论

3.1 POF 动物模型方案建立理论基础

CTX 是目前应用广泛的抗肿瘤药物^[8],在治疗肿瘤的同时存在显著的生殖毒性^[9]。本研究运用 CTX 进行 POF 造模,结果显示性成熟的雌性 SD 大鼠动情周期紊乱,呈现明显高 FSH、低 E2 特征,形态学表现各级卵泡数(PF、MF、GF)明显减少,可见大量 AF,这些结果均提示 POF 动物模型建立成功,与文献报道^[6]一致。

3.2 HBO 对 POF 保护机制

HBO 疗法是指让患者进入加压舱内,在比大气压高的气压环境下吸入纯氧,利用增加血液中的溶解氧来达到和改善症状和治疗疾病的目的^[10]。在 HBO 下机体血氧含量增加,加大血氧弥散半径、速度,减少毛细血管内血小板的聚集、附壁,增加其通透性,降低血液黏度,促进血管再生,提高组织储氧能力,增强组织能量代谢^[11-12],改善末梢血管、神经及性腺的缺氧状态,从而恢复卵巢功能。HBO 对性激素、卵巢及肾上腺素功能有调节作用,特别是可以促使大鼠下丘脑释放促性腺激素,增加雌激素活性,提高卵巢对性激素的敏感性,直接激发卵巢的储备功能,进而恢复和改善卵巢功能^[13]。有研究对更年期综合征患者进行 HBO 治疗后,发现雌激素水平明显高于治疗前,表明 HBO 治疗能有效改善卵

巢功能。总之,HBO 对机体有多系统、多环节的整体调节改善作用,从而达到保护器官的目的^[14]。

3.3 BMSCs 对 POF 保护机制

BMSCs 因其具有修复及改善靶细胞的功能,是组织工程研究中有前途的种子细胞^[15]。Guo JQ 等^[4]将 BMSCs 移植到卵巢,可以降低围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡。BMSCs 移植修复损伤卵巢组织的机制可能如下。①BMSCs 移植后,在特定的微环境诱导下可分化为受损组织的细胞,部分补偿或替代其功能。②BMSCs 能分泌多种细胞因子,通过旁分泌途径参与颗粒细胞生长和凋亡调节过程。在体外和体内都能抑制靶细胞凋亡,修复受损组织。③BMSCs 分化成卵巢组织细胞后,可能分泌激素,调控体内激素水平。④BMSCs 中可能还存在生殖干细胞,分化发育成各级卵泡,促进损伤卵巢功能的修复。BMSCs 可分泌多种细胞外基质,也有助于损伤卵巢的恢复^[5,16]。

3.4 HBO 协同 BMSCs 对 POF 保护机制

由于人卵巢平均体积仅为 10 cm^3 ,移植后归巢于卵巢 BMSCs 的量非常有限,如何使 BMSCs 细胞最大限度地归巢于卵巢,发挥最佳治疗效果成为目前研究热点。本研究结果显示,造模后 HBO+移植组大鼠在移植后 30 d 内动情周期恢复进程优于移植组;大鼠血清 E2 水平降低,FSH 水平升高;HBO+移植组 E2 水平较模型组、移植组均升高,FSH 水平较模型组、移植组均降低,且组间差异均有统计学

意义。这些均提示 HBO+移植组能协同提高血清 E2 水平,降低血清 FSH 水平,使卵巢功能得到更好改善。卵巢组织形态观察及卵泡计数结果显示,造模组与空白组相比,PF、GF、MF 数量明显减少,AF 显著增多,经不同干预后,移植组、HBO+移植组 PF、GF、MF 数量较造模组呈不同程度增多,AF 呈不同程度减少,且组间差异均有统计学意义。移植 30 d 后移植组、HBO+移植组均在卵巢组织内见到绿色荧光显示,且 HBO+移植组见到绿色荧光的表达多于 BMSCs 移植组;HBO+移植组大鼠娩出乳鼠多于移植组,更直观地体现 HBO 联合 BMSCs 移植在治疗 POF 方面具有协同的、安全有效的促进卵巢功能重建作用。HBO 联合 BMSCs 移植治疗 POF 机制可能包括以下几种。①HBO 能促进内源性和外源性 BMSCs 存活、增殖,诱导移植的 BMSCs 向损伤部位迁移,并加速其分化^[17-18]。②HBO 能促进 BMSCs 及多种神经营养因子基因表达,从而改善损伤区域微环境,促进 BMSCs 适应及存活,并促进其发挥组织修复作用^[19]。③氧分压及氧浓度抑制移植 BMSCs 凋亡、抑制炎症因子水平、抑制大量炎症因子聚集引起继发性损伤,从而发挥保护作用^[10]。本研究在 HE 染色上清楚地发现 HBO+BMSCs 组损伤区域结构有显著改善,卵巢组织结构趋于完整,提示在 HBO 作用下,BMSCs 存活增加,迁移到损伤组织的数量增加,分泌更多营养因子,从而改善移植 BMSCs 生存微环境,更好地发挥受损卵巢的重建作用。

HBO 与 BMSCs 移植单独应用对 POF 均有一定的修复作用。本研究显示,将 BMSCs 移植至化疗性 POF 动物模型卵巢组织后,通过 HBO 暴露,从 POF 大鼠动情周期、激素水平、BMSCs 移植细胞在体内的存活迁移、生殖能力评估,证实两者协同应用对 POF 的修复效果优于 BMSCs 移植单独使用,从而为 POF 治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Webber L, Davies M, Anderson R, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.
- [2] Cui HJ, He HY, Yang AL, et al. Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral haemorrhage: systematic review and stratified meta-analysis[J]. Brain Inj, 2017, 31(4): 456-465.
- [3] Kon E, Filardo G, Roffi A, et al. Bone regeneration with mesenchymal stem cells[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2012, 9(1): 24-27.

- [4] Guo JQ, Gao X, Lin ZJ, et al. BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause[J]. BMC Cell Biol, 2013, 14: 18.
- [5] Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits[J]. Cytotherapy, 2013, 15(1): 64-75.
- [6] 左侠, 张坤, 王懿, 等. 骨髓间充质干细胞对环磷酸腺苷诱导卵巢损伤的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(34): 6629-6633.
- [7] Akdemir A, Zeybek B, Akman L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor decreases the extent of ovarian damage caused by cisplatin in an experimental rat model[J]. J Gynecol Oncol, 2014, 25(4): 328-333.
- [8] Mulligan JM, Hill LA, Deharo S, et al. Identification and validation of an anthracycline/cyclophosphamide-based chemotherapy response assay in breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(1): djt335.
- [9] Chahvar ST, Al-Shawaf T, Tranquilli AL. Pharmacologic ovarian preservation in young women undergoing chemotherapy[J]. Curr Med Chem, 2014, 21(2): 223-229.
- [10] 黄玉琴, 李萌, 张晓菁, 等. HBO 联合 BMSCs 移植减轻脊髓损伤大鼠炎症反应与 NF- κ B 炎症信号通路有关[J]. 中华神经医学杂志, 2017, 16(8): 777-784.
- [11] Cui HJ, He HY, Yang AL, et al. Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral haemorrhage: systematic review and stratified meta-analysis[J]. Brain Inj, 2017, 31(4): 456-465.
- [12] Kaplan ST, Hemsinli D, Kaplan S, et al. Amputation predictors in diabetic foot ulcers treated with hyperbaric oxygen[J]. J Wound Care, 2017, 26(7): 361-366.
- [13] 王春莲, 郝娟, 邱丽丽, 等. 高压氧暴露对卵巢早衰大鼠卵巢、子宫及血清雌二醇的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2014, 21(3): 145-149.
- [14] Francis A, Baynosa R. Ischaemia-reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways: a review of cellular mechanisms[J]. Diving Hyperb Med, 2017, 47(2): 110-117.
- [15] Dong Y, Yang L, Yang L, et al. Transplantation of neurotrophin-3-transfected bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(16): 1520-1524.
- [16] 李惠敏, 李海波. 间质干细胞移植治疗卵巢早衰的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2013, 23(3): 237-240.
- [17] Lin SS, Ueng SW, Niu CC, et al. Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating Wnt3a/ β -catenin signaling—an in vitro and in vivo study[J]. Stem Cell Res, 2014, 12(1): 260-274.
- [18] Lee YS, Chin CC, Chang CP, et al. Long course hyperbaric oxygen stimulates neurogenesis and attenuates inflammation after ischemic stroke[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 512978.
- [19] Sheng Y, Zhao Y, Xu R, et al. Effect of hyperbaric oxygen on bone mesenchymal stem cells transplant in spinal cord injury rats[J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 9(2): 4655-4659.

(责任编辑:唐秋姗)