

- in treatment of cervical cancer in vitro and in vivo. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2013, 33: 735-742.
- [6] Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, 2010, 40:1-13.
- [7] Jung YS, Kato I, Kim HR. A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435: 339-344.
- [8] Johansson H, Bjelkenkrantz K, Darlin L, et al. Presence of High-Risk HPV mRNA in Relation to Future High-Grade Lesions among High-Risk HPV DNA Positive Women with Minor Cytological Abnormalities. *PLoS One*, 2015, 10: e0124460.
- [9] 姜俊, 陈宜刚, 王华, 等. 人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 的检测在宫颈筛查中的初步评价. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33:1261-1264.
- [10] 刘桐宇, 谢裕, Lulu Zhang, 等. TCT 标本检测高危 HPV E6/E7mRNA 及在宫颈病变中的应用研究. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2011, 7: 202-205.
- [11] Burger EA, Kornor H, Klemp M, et al. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 2011, 120: 430-438.
- [12] Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, et al. The APTIMA HPV assay versus the hybrid capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *Int J Cancer*, 2013, 132:101-108.
- [13] 杜彩英, 李芳. 人乳头瘤病毒 DNA 及 E6/E7 mRNA 检测在宫颈病变诊断中的比较研究. *中国优生与遗传杂志*, 2015, 23:38-40.
- [14] Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, et al. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 2643-2645.
- [15] Waldstrom, M, Ornskov D. Clinical performance of a human papillomavirus messenger RNA test (Aptima HPV Assay) on residual material from archived 3-year-old Preserv Cyt samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135:1052-1056.
- [16] Ovestad IT, Lanssen E, Kjelleveold K, et al. HPV tests at Stavanger University Hospital. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2010, 130:2219-2222.
- [17] Monsonego J, Hudgens MG, Zerat JC, et al. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *Int J Cancer*, 2011, 129:691-701.
- [18] Rijkaart DC, Heideman DA, Coupe VM, et al. High-risk human papillomavirus (hrHPV) E6/E7 mRNA testing by PreTect HPV-Proofer for detection of cervical high-grade intraepithelial neoplasia and cancer among hrHPV DNA-positive women with normal cytology. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 2390-2396.

(收稿日期: 2017-05-20)

人脐带间充质干细胞治疗早发性卵巢功能不全的研究进展

李慧 张琛 崔恒 昌晓红

【摘要】 早发性卵巢功能不全(卵巢早衰)引发的月经紊乱、不孕和更年期症状等严重影响育龄期女性的身心健康。常用雌孕激素替代治疗,然而该疗法仍存在一定的局限性。近年来,国内外试图应用脐带间充质干细胞治疗卵巢早衰,利用动物模型进行了探索,为早发性卵巢功能不全(卵巢早衰)患者的治疗提供了可能的新希望。现就脐带间充质干细胞的特点、临床应用的安全性、可能的有效性及机制进行综述。

【关键词】 人脐带间充质干细胞;早发性卵巢功能不全;卵巢早衰

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI): 指女性在 40 岁之前卵巢活动衰退的临床综合征,以月经紊乱(如停经或稀发月经)伴有高促性腺激素和低雌激素为特征。停经或月经稀发 4 个月,间隔 >4 周连续两次 FSH>25 U/L (ESHRE 的诊断阈值)^[1]。POI 主要引起雌激素缺乏症状,进一步发展会导致卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF)^[2], 生育能力下降,严重影响女性的身心健康。目前,最常用的方法是激素补充疗法 (hormone replacement therapy, HRT)。该疗法虽然对 POI/POF 的临床症状具有一定的缓解作用,但尚无法从根本上修复受损的

卵巢,恢复卵巢功能。而且长期 HRT 治疗有增加心脏病和中风风险的担忧,同时可能加剧免疫性 POI/POF 患者的相关性自身免疫病的发生^[3]。近年来,国内外应用间充质干细胞在卵巢早衰动物模型实验中取得的研究成果,为 POI/POF 患者有可能改善卵巢功能及恢复生育能力带来了希望。

一、人脐带间充质干细胞的特点

1. 间充质干细胞的来源: 干细胞是一类具有自我复制和多向分化潜能的早期未分化细胞,根据其来源不同分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞研究存在来源较少、伦理争议大、存在致瘤性及免疫排斥风险等问题,使其临床应用受到较大限制。成体干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 广泛存在于人体全身组织,易分离培养、扩增,免疫原性低,具有强大的迁移、免疫调节能力,对于

修复组织缺陷及组织工程中作为种子细胞等方面都具有独特的优势^[4]。一般包括:骨髓来源 MSCs、外周血来源 MSCs、脐带来源 MSCs、胎盘来源 MSCs 及羊水来源 MSCs 等,目前研究较多的是脐带来源 MSCs。

2. 人脐带间充质干细胞优势:脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)来源于脐带,主要从华尔通氏胶分离得到相较于其他间充质干细胞,脐带间充质干细胞取材方便,来源广泛,易于收集、保存、冷冻,不受伦理、道德及法律方面的限制,相对纯净;hUCMSCs 含量丰富,较为原始,分化能力强,可在体外进行分离、培养,扩增迅速,且生物性能稳定,多次传代扩增仍能保持增殖旺盛,能够产业化,可以为实验室和临床提供充足的细胞来源;不表达主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) II 型或低表达 MHC I 型,免疫原性低,减弱了同种异体移植免疫排斥反应,适宜于不同个体之间的移植;具有自我更新和向多组织细胞分化潜能,使其拥有广泛的临床应用前景^[5-7]。

3. 人脐带间充质干细胞治疗 POI/POF 相关临床试验研究:目前,全球范围内共有 8 项临床试验处于不同阶段(I 期, II 期等),用于评估 hUCMSCs 治疗 POI/POF 的效果。在 8 项临床试验中,有 2 项应用 hUCMSCs 进行研究,且均处于招募阶段(<https://clinicaltrials.gov/>)。由此可见, hUCMSCs 治疗 POI/POF 临床研究进展缓慢,是否对 POI/POF 有效,我们还要拭目以待。但在其他疾病中临床治疗中获得的进展,有助于避免我们对 hUCMSCs 治疗 POI/POF 的安全性的担忧^[8]。

二、人脐带间充质干细胞在 POF 动物模型和临床应用中的安全性

近年来,间充质干细胞治疗在动物实验和临床研究领域获得了很大的进展,部分研究成果已开始应用于恶性肿瘤、自身免疫系统疾病、神经系统疾病、心血管疾病等多种临床试验中得到应用^[8-9]。其中 hUCMSCs 在狼疮性肾炎^[10]、类风湿关节炎^[11]、糖尿病^[12]、神经障碍性疾病^[13]、失代偿期肝硬化、肝衰竭等疾病的临床治疗研究中取得的成果,可以间接评估 hUCMSCs 在临床中治疗 POI 安全性。以下就 hUCMSCs 在动物实验及临床试验方面的安全性进行阐述。

在 Wang 等^[14]对人脐带间充质干细胞应用的安全性进行了研究,评估 hUCMSCs 在食蟹猴体内进行重复给药的总体毒理反应。研究分为实验组,阴性对照组和生理盐水组。其中实验组分为高剂量组和低剂量组,分别为 1×10^7 和 2×10^6 个细胞/每千克体重。每 2 周 1 次静脉注射 hUCMSCs,持续 6 周。对各组进行观察和实验室检查,免疫学分析及病理学分析。发现 hUCMSCs 输注并不影响食蟹猴的体重,体温等,仅有少数动物在输注后出现一过性的恶性、呕吐,然而其他组也出现类似症状。实验组的血细胞计数,生化,尿分析及骨髓涂片均未见明显异常。hUCMSCs 输注不足以诱发干扰素- γ 和白介素-4 的产生,

且 T 细胞各种表型所占百分比与其他分组相比无明显差别。因此,该研究认为 hUCMSCs 的移植并不影响食蟹猴的总体健康状况。

我国中国人民解放军 302 医院肝病生物治疗研究中心进行了多项人脐带间充质干细胞治疗急性慢性肝衰竭(ACLF)和失代偿性乙型肝炎肝硬化的临床研究,每 4 周给予 hUCMSCs 治疗 1 次,共 3 次。在试验期间没有观察到显著的副作用。hUCMSCs 输注显著提高了 ACLF 患者的生存率;终末期肝病评分模型(model for end stage liver disease, MELD)评分减少,研究认为 hUCMSCs 输注治疗在临床上是安全的^[15-17]。其他研究表明, hUCMSCs 在治疗脑卒中、儿童异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病(aGVHD)及糖尿病足时均未发生与治疗有关严重的并发症或不良反应^[18-20]。因此, hUCMSCs 的临床应用无严重不良事件的发生,除了短暂的发热,不需要特殊处理。

三、脐带间充质干细胞治疗 POI/POF 的有效性

尽管目前卵巢功能减退的干细胞治疗已初步进行到临床试验阶段,大多数研究仍处于患者招募阶段,仍未有相关有效性临床数据的报道,但动物研究证明干细胞移植可改善卵巢功能,提示干细胞移植治疗有可能是未来卵巢早衰治疗的一个方向。

1. 激素评估: Song 等^[21]通过建立环磷酰胺诱导的卵巢早衰的动物模型,探讨了 hUCMSCs 在 POF 治疗中的潜力。将 POF 模型分为阴性对照组,经尾静脉注射治疗 hUCMSCs 组,原位注射 hUCMSCs 组。经 hUCMSCs 治疗 2、4、6 周时分别检测血清中雌激素(E2)、FSH、抗苗勒管激素(AMH)。与阴性对照组相比,尾部和原位注射 hUCMSCs 治疗组均出现血清 FSH 水平均显著降低, E2 显著增加。Elfayomy 等^[22]探讨人脐带血来源的 MSC 对紫杉醇诱导 POF 大鼠的卵巢上皮细胞的影响。研究发现经治疗后大鼠血清中(E2)升高, FSH 明显下降,卵巢上皮细胞形态稳定,窦状卵泡数增加。吕晓丹^[23]通过 huMSCs 输注治疗小鼠卵巢早衰,发现各级卵泡在第 14、21、28 和 60 天均有不同程度的恢复。E2 的水平在各时间点均有显著升高, FSH 水平仅在第 60 天显著下降。

2. 生育力评估: Zhang 等^[24]通过评估 hUCMSCs 对受损卵巢功能的影响。在治疗的 2 周和 1 个月时,分别通过卵泡数、激素水平、发情周期和生育测试等指标来评估卵巢的储备功能。结果表明, hUCMSCs 能明显改善受损卵巢的储备功能,卵泡数增加,雌孕激素升高,且规律性发情周期百分比增加,每窝的产仔数增加。Zhu 等^[25]通过注射 hUCMSCs 治疗环磷酰胺所致 POF 的大鼠模型,也取得了类似的结论。这些动物实验研究结果表明, hUCMSCs 治疗后造模动物的卵巢功能得到一定程度的恢复,并且发现卵巢各级卵泡数明显增加,颗粒细胞生长增加,凋亡减少,内分泌功能得到改善等,部分实验动物生育力得到恢复。

四、hUCMSCs 治疗 POI/POF 的机制

hUCMSCs 改善卵巢功能的作用机制尚不清楚。现有的研究表明, hUCMSCs 可能通过旁分泌的方法改善卵巢

的功能。Li 等^[26]研究通过经尾静脉注射 hUCMSCs 治疗围绝经期大鼠,发现治疗组 E2、AMH 增加、FSH 下降,卵泡数增加,卵巢结构改善,卵巢组织表达的肝细胞生长因子(HGF),血管内皮细胞生长因子(VEGF)和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)较未治疗组明显增加。研究认为,hUCMSCs 可能通过旁分泌的方式,促进在卵巢组织中 HGF、VEGF 和 IGF-1 等的表达,从而改善卵巢储备功能,延缓卵巢功能减退。Wang 等^[27]将 hUCMSCs 输入 POF 小鼠,10 d 后卵巢功能开始恢复,与转录、蛋白修复及信号转导相关的蛋白分泌增加,并未发现移植的 hUCMSCs 分化为卵泡成分。研究认为,hUCMSCs 可能通过旁分泌的途径刺激卵巢颗粒细胞生长并减少其凋亡,从而起到治疗作用。

五、结语

基于上述分析,hUCMSCs 作为一种成体 MSCs,具有一定的安全性,且卵巢早衰动物模型研究表明具有一定的有效性。hUCMSCs 治疗安全性的数据多来自一些其他疾病治疗中早期探索研究。hUCMSCs 在临床研究中未见严重不良反应,未发现与治疗相关的肿瘤形成,死亡等严重不良反应;一些不良反应只出现在特定的移植方式和部位,如局部肿胀只在局部注射时出现等。hUCMSCs 脐带间充质干细胞治疗卵巢早衰的有效性仅来自动物模型方面的研究,在临床试验的有效性仍缺乏相关证据。因此,hUCMSCs 治疗 POI/POF 安全性和有效性临床上仍需要规范性,大样本的临床证据,同时还需进一步明确 hUCMSCs 修复卵巢功能的机制。

参考文献

- [1] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 早发性卵巢功能不全的激素补充治疗专家共识. 中华妇产科杂志, 2016, 51:881-886.
- [2] Welt CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. Clin Endocrinol (Oxf), 2008, 68:499-509.
- [3] Beata Komorowska. Autoimmune premature ovarian failure. Menopause Rev, 2016,15: 210-214.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284:143-147.
- [5] El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20: 523-544.
- [6] Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, et al. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8:144-155.
- [7] Paladino FV, Peixoto-Cruz JS, Santacruz-Perez C, et al. Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells. Cell and Tissue Banking, 2016, 17: 123-136.
- [8] Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. Biosci Rep, 2015, 35: e00191.
- [9] Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, et al. Umbilical cord as prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. Stem Cells International, 2016, 2016:17.
- [10] Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, et al. A randomised double-blind, placebo-controlled trial of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cell for lupus nephritis. Ann Rheum Dis, 2017 May 6. pii: annrheumdis-2017-211073.
- [11] Sun Y, Kong W, Huang S, et al. Comparable therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in collagen-induced arthritis to TNF inhibitor or anti-CD20 treatment. Clin Exp Rheumatol, 2017, 35:288-295.
- [12] Qin HL, Zhu XH, Zhang B, et al. Clinical evaluation of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation after angioplasty for diabetic foot. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2016, 124:497-503.
- [13] Miao X, Wu X, Shi W. Umbilical cord mesenchymal stem cells in neurological disorders: A clinical study. Indian J Biochem Biophys, 2015, 52:140-146.
- [14] Wang Y, Han ZB, Ma J, et al. A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys. Stem Cells Dev, 2012, 21:1401-1408.
- [15] Shi M, Zhang Z, Xu R, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. Stem Cells Transl Med, 2012, 1: 725-731.
- [16] 于双杰, 陈黎明, 吕飒, 等. 脐带间充质干细胞治疗失代偿性乙型肝炎肝硬化的安全性与疗效. 中华肝病杂志, 2016, 2: 51-55.
- [17] Wang L, Li J, Liu H, et al. Pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 1:85-92.
- [18] Jiang Y, Zhu W, Zhu J, et al. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. Cell Transplant, 2013, 22:2291, 2298.
- [19] 乔淑敏, 陈广华, 王易, 等. 脐带间充质干细胞治疗儿童异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病疗效观察. 中国实验血液学杂志, 2013, 21: 716-720.
- [20] Qin HL, Zhu XH, Zhang B, et al. Clinical evaluation of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation after angioplasty for diabetic foot. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2016, 124: 497-503.
- [21] 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, 2517514.
- [22] Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny 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 and Cell, 2016, 48:370-382.
- [23] 吕晓丹. 脐带间充质干细胞移植治疗卵巢早衰的实验研究. 中国医学科学院北京协和医学院硕士研究生学位论文, 2016.
- [24] Zhang J, Xiong J, Fang L, et al. The protective effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on damaged ovarian function: A comparative study. Biosci Trends, 2016, 10:265-276.
- [25] Zhu SF, Hu HB, Xu HY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. J Cell Mol Med, 2015, 19:2108-2117.
- [26] Li Jia, Mao Qiu Xian, He Jing Jun, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. Stem Cell Res Ther, 2017, 10:265-276.
- [27] Wang S, Yu L, Sun M, et al. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. BioMed Research International, 2013, 2013:307-315.

(收稿日期: 2017-06-02)