

人胎盘来源的间充质干细胞移植对递增负荷训练诱导的 POI 大鼠卵巢功能的影响

杨璐¹, 魏翠^{2,3}, 李红兰^{2,3}, 徐妍^{2,3*}

(1. 南京体育学院 运动健康学院, 中国江苏 南京 210014; 2. 三和(南京)生物科技有限公司 再生医学研究中心, 中国江苏 南京 210031; 3. 南京市再生医学工程技术研究中心, 中国江苏 南京 210031)

摘要: 随着女性生育年龄的推迟, 30~39 岁早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)患者的治疗需求增加。先前的研究证实, 不同组织来源的干细胞可以恢复 POI 小鼠的卵巢功能。本研究旨在探讨人胎盘间充质干细胞(human placenta-derived mesenchymal stem cell, hpMSC)移植治疗递增负荷训练诱导的 POI 的效果和潜在机制。首先, 采用为期 9 周的递增负荷跑台训练建立 POI 大鼠模型; 然后, 通过尾静脉注射给予 hpMSC 移植治疗; 最后, 通过激素水平和组织学分析评估卵巢功能, 利用 hpMSC 示踪、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹分析、免疫组织化学染色和实时荧光定量 PCR 评估损伤和修复的分子机制。结果显示, 移植后的 hpMSC 定植在卵巢间质; hpMSC 移植增加了卵母细胞的端粒长度, 减少了氧化应激反应, 下调了 Bax (Bcl-2-associated X protein)和胱天蛋白酶-3 (caspase-3)的蛋白质水平, 与此同时, 卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的水平、FSH 与黄体生成素(luteinizing hormone, LH)的比值(FSH/LH)下降, 各级卵泡数量增加。实验结果表明, hpMSC 移植可以修复递增负荷训练诱导的 POI 大鼠的卵巢损伤, 改善卵巢功能。

关键词: 早发性卵巢功能不全(POI); 间充质干细胞(MSC); 端粒; 氧化应激; 颗粒细胞

中图分类号: Q492, R711.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)02-0114-14

Effects of Human Placenta-derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Ovarian Function in Rats with Incremental Load Training-induced POI

YANG Lu¹, WEI Cui^{2,3}, LI Honglan^{2,3}, XU Yan^{2,3*}

(1. Department of Sport and Health Sciences, Nanjing Sport Institute, Nanjing 210014, Jiangsu, China; 2. Institute of Regenerative Medicine, Sanhe (Nanjing) Biotechnology Co., Ltd., Nanjing 210031, Jiangsu, China; 3. Nanjing Regenerative Medicine Engineering and Technology Research Center, Nanjing 210031, Jiangsu, China)

Abstract: With the delay of female childbearing age, the need for treatment of premature ovarian insufficiency (POI) in women aged 30~39 is increasing. Previous studies confirmed that different tissue-derived stem cells could restore ovarian function of POI mice. The purpose of this study was to explore the efficacy and underlying mechanisms of human placenta-derived mesenchymal stem cell (hpMSC) transplantation for incremental load training-induced POI. After establishment of a POI rat model by 9-week treadmill training with incremental load, the POI rats were administered with hpMSCs by tail vein injection. Ovarian function was evaluated by detection of hormone levels and histological analysis. hpMSC tracking, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Western-blot, immunohistochemistry staining, and real-time fluorescence quantitative PCR were used to assess the molecular mechanisms of ovarian function injury and repair. The results

收稿日期: 2022-06-10; 修回日期: 2022-11-30; 网络首发日期: 2023-04-19

基金项目: 南京市生命健康科技专项-临床前沿突破项目(202110012)

作者简介: 杨璐(1988—), 女, 江苏南京人, 硕士研究生; *通信作者: 徐妍(1980—), 女, 江苏南京人, 博士, 主要从事再生医学领域的基础研究及应用研究, E-mail: drxuyan@tom.com。

showed that hpMSCs colonized the ovarian stroma. hpMSC transplantation increased oocyte telomere length, reduced oxidative stress, downregulated Bcl-2-associated X protein (Bax) and caspase-3 expression levels. In addition, after transplantation, the follicle-stimulating hormone (FSH) levels and ratio of FSH to luteinizing hormone (FSH/LH) decreased, and the number of follicles at all stages increased. These results demonstrated that hpMSC transplantation could repair ovarian injury and improve ovarian function in incremental load training-induced POI rats.

Key words: premature ovarian insufficiency (POI); mesenchymal stem cell (MSC); telomere; oxidative stress; granulosa cell

(*Life Science Research*, 2023, 27(2): 114-127)

早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是女性生殖系统健康的主要威胁之一,其诊断标准是:女性在 40 岁之前出现 4 个月以上的月经稀发或停经,并且间隔 1 个月以上的两次卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)检测值高于 25 U/L^[1]。一直以来,如何治疗各种原因导致的 POI 都比较棘手,当前临床上多采用激素替代疗法^[2]、免疫调节^[3]以及褪黑激素疗法^[4]等治疗手段,虽然它们具有一定的缓解作用,但无法从根本上治疗功能早衰的卵巢,并且长期使用药物还会带来许多副作用。此外,POI 是一种高度异质性疾病,大多数 POI 患者的病因并不明确^[5]。因此,通过不同的方式建立 POI 动物模型,并探索其治疗方式,阐明修复机制,对于 POI 的预防、诊断及治疗十分重要。

近年来,针对卵巢早衰疾病,国内外的科研工作者都在努力探索新的治疗办法。其中,干细胞疗法被认为是最有希望应用于治疗卵巢损伤的方法。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^[6],间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)来源于胚胎发育早期的中胚层,人体几乎所有的组织都含有 MSC, MSC 普遍具有自我更新能力、多向分化潜能和免疫调节功能^[7]。研究表明,骨髓^[8-9]、脂肪^[10]、羊膜^[11]以及脐带^[12]来源的 MSC 均可以修复 POI 模型鼠的卵巢损伤,甚至可在临床上帮助 POI 女性获得自然妊娠^[12]。人胎盘间充质干细胞(human placenta-derived MSC,

hpMSC)来源于胎盘的胚外中胚层,易于获取,没有伦理限制,已被广泛用于心脑血管疾病、肺部疾病、肝脏疾病等多种疾病的治疗研究,并在动物实验和临床试验中获得了很好的效果^[13]。

本研究创新地采用递增负荷训练方案构建 POI 模型,通过移植 hpMSC 对 POI 大鼠进行治疗,并分析了 hpMSC 移植对递增负荷训练诱导的 POI 大鼠卵巢功能的影响以及对卵母细胞和颗粒细胞的调控,以确定 hpMSC 治疗 POI 大鼠的作用机制,拓展 MSC 在 POI 治疗领域的研究,为 POI 的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

从斯贝福(北京)生物技术有限公司购买无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 2 月龄雌性 SD 大鼠,许可证号: SCXK(京)2019-0010。适应性饲养 1 周后采用阴道涂片检测法观察动情周期,将连续 3 个动情周期正常的 30 只大鼠纳入实验。所有涉及大鼠的实验程序均经过先声药业实验动物研究及使用计划批准(IACUC No.SL-019-00)。

为了研究 hpMSC 移植对 POI 模型大鼠的影响,30 只大鼠被随机分为 3 组:空白对照组(10 只)、POI 组(10 只)和 POI+hpMSC 组(10 只)。大鼠的实验程序示意图见图 1。

1.2 hpMSC 的制备和鉴定

hpMSC 由南京市再生医学工程技术研究中

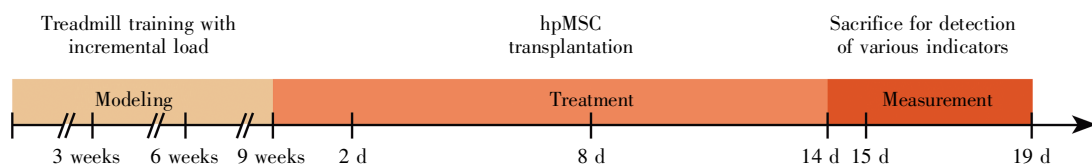


图 1 大鼠实验程序示意图

Fig.1 Schematic of the experimental procedure with rats

心提供。对细胞进行复苏后,每3 d按照1:3的比例传代,进行扩增培养,使用光学显微镜观察细胞的形态。用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗后,经胰酶消化制成单细胞悬液,加入CD29-PE (Abcam, ab218273)、CD34-FITC (Abcam, ab18227)、CD71-FITC (Abcam, ab253356)和CD90-PE (Abcam, ab157072),在4 °C下孵育30 min,用流式细胞仪进行检测。为了证明其多向分化能力,取第3代hpMSC以 $3 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ 接种于低糖DMEM培养基(BasalMedia, L170KJ)中,当细胞融合率为90%左右时,用诱导培养基取代低糖DMEM培养基。成骨诱导培养基是在低糖DMEM培养基中补充50 $\mu\text{mol/L}$ 的抗坏血酸、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的地塞米松和10 mmol/L的 β -甘油磷酸钠;成脂诱导培养基是补充1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的地塞米松、10 mg/L的胰岛素、100 $\mu\text{mol/L}$ 的吡啶美辛和500 $\mu\text{mol/L}$ 的3-异丁基-1-甲基黄嘌呤。细胞诱导培养20 d,成脂诱导采用油红O染色检测脂滴,成骨诱导采用茜素红S染色检测钙质。后续实验均采用第3代hpMSC,使用PKH26红色荧光细胞标记试剂盒(Sigma-Aldrich, MINI26)对hpMSC进行PKH26标记。

1.3 递增负荷训练构建POI大鼠模型

POI组和POI+hpMSC组大鼠进行跑台适应性训练3 d后开始为期9周的递增负荷跑台训练,每周运动6 d,休息1 d。参照Bedford动物负荷训练标准^[14]及过度训练动物模型^[15]的建立方法,采用KW-PT型小动物跑台(南京卡尔文生物科技有限公司)进行训练,大鼠的运动负荷方案见表1。

在训练的第3周、第6周、第9周以及建模完成后2 d共4个时间点,对各组大鼠进行体重测定、疲劳程度检查、血液生化指标检测和阴道脱落细胞检测,以监控造模过程。其中,大鼠的疲劳程度判断标准见表2。血液生化指标包括血红蛋白(hemoglobin, Hb)、血乳酸(blood lactate, BLA)、血清总睾酮(serum total testosterone, T)、血尿素(blood

表1 大鼠运动负荷方案

Table 1 The exercise load protocol for rats

Stage/week	Speed/(m·min ⁻¹)	Duration/min	Slope/(°)
1	15	20	10
	20	40	10
2	20	20	10
	22	40	10
3	20	20	10
	25	40	10
4	25	20	10
	30	40	10
5	25	20	10
	28	20	10
6	30	30	10
	28	20	10
	30	20	10
7	35	30	10
	30	30	10
	35	40	10
8	40	30	10
	45	40	10
9	45	30	10
	50	40	10

urea nitrogen, BUN)、血清游离睾酮与皮质醇比值(ratio of serum testosterone to cortisol, T/C),采血时间为休息日。阴道脱落细胞检测方法为:取无菌棉签,经阴道顺时针轻转一周,涂布于细胞计数板或载玻片上,斜角轻缓加盖盖玻片,显微镜下计数或拍照。

在建模完成后2 d检测各组大鼠FSH、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)、雌二醇(estradiol, E2)等卵巢储备功能评价指标,结合体重及阴道脱落细胞检测结果评估建模是否成功。

1.4 活体大鼠移植实验

将大鼠固定于大鼠固定器上,用75%酒精擦拭尾部后进行静脉注射。空白对照组注射1 mL生理盐水,POI组注射1 mL生理盐水,POI+hpMSC组注射1 mL hpMSC细胞悬液,细胞密度为 $1.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。移植疗程为:建模结束后2 d第1次注射,每次注射间隔5 d,共注射3次,即在建模结

表2 大鼠疲劳程度判断标准

Table 2 Criteria for judging fatigue degree of rats

Degree	Loading	Scleral color	Fur gloss	Injury level	Flexibility	Excitability	Wheeze severity	Stimulus response
1	Very relax	Red	Bright	None	Good	Very high	Very slight	Very obvious
2	Relax	Red	Bright	Slight	Good	High	Slight	Obvious
3	Laborious	Reddish	Lusterless	Moderate	Acceptable	Moderate	Moderate	Moderate
4	Very laborious	Grey	Sparse	Severe	Poor	Poor	Severe	Poor
5	Incomplete	Pale	Depilated	Severe	Poor	Escaped	Severe	Very poor

束后2 d、8 d、14 d注射。

1.5 标本的采集与分析

建模完成后2 d、15 d(即移植疗程完成后1 d)、19 d(即移植疗程完成后5 d)经腹主动脉采血,通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测FSH、LH、AMH和E2的水平,对比FSH/LH。建模完成后的15 d和19 d,分别处死大鼠,每个时间点每组各检测3只大鼠,取卵巢、肝、肾进行活体成像。成像结束后右侧卵巢用组织固定液固定,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色及免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色。提取左侧卵巢蛋白质Bcl-2、Bax (Bcl-2-associated X protein)、胱天蛋白酶-3 (caspase-3)进行免疫印迹实验;采用ELISA检测各组大鼠左侧卵巢组织的活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;收集卵母细胞,采用实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)检测各组大鼠卵母细胞的端粒相对长度,采用ELISA检测端粒酶(telomerase, TE)活性。

1.6 活体成像实验

取卵巢、肝、肾后在PBS中洗去表面血渍,置于活体成像仪中。预览拍照记录位置,以530 nm激发波长和595 nm发射波长成像,并将两张图合并,保存原始图像,检测标记了PKH26的hpM-SC在大鼠体内的归巢和分布。

1.7 ELISA 检测

建模结束后15 d、19 d收集每组3只大鼠的血液和卵巢组织匀浆,分离出上清液。采用大鼠FSH ELISA检测试剂盒(mlbio, ml002872)、LH ELISA检测试剂盒(mlbio, ml002860)、MIS/AMH ELISA检测试剂盒(mlbio, ml003371)、E2 ELISA检测试剂盒(江莱生物, JL11525)检测血清FSH、LH、AMH、E2水平;采用大鼠ROS ELISA检测试剂盒(江莱生物, JL21051)、MDA含量检测试剂盒(Solarbio, BC0025)、SOD ELISA试剂盒(哈灵生物, H-LE20008)检测卵巢组织ROS、MDA、SOD水平;采用大鼠端粒酶ELISA试剂盒(CUSABIO, CSB-E08023r)检测端粒酶活性。

1.8 HE 染色

为了分析卵巢形态和卵泡计数,卵巢在4℃下用4%多聚甲醛固定过夜,石蜡包埋后,连续切片并使用HE染色。使用光学显微镜观察卵巢形

态。卵泡计数方法:每5张切片计数各级卵泡数量,计算总数为整个卵巢中的卵泡数。

1.9 免疫印迹分析

用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液(Sbjbio, BI-WB015)裂解匀浆细胞和卵巢组织,裂解完成后4℃离心10 min,收集上清液。采用BCA蛋白质浓度测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 23225)进行蛋白质定量,严格按照其说明书要求测量总蛋白质的浓度。根据各样本蛋白质浓度,计算相同蛋白质量所需体积。对蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后,实施湿转膜,随后将其置于含5%脱脂奶的TBST封闭液,室温摇床上封闭;加入特异性一抗,在4℃的冰箱中孵育过夜,然后与相应的二抗室温孵育。使用Tanon 4600全自动化学发光成像系统(上海天龙科技有限公司)检测蛋白质条带。本研究使用的抗体包括:Bax单克隆抗体(Proteintech, 60267-1-Ig)、Bcl-2多克隆抗体(Proteintech, 26593-1-AP)和anti-caspase-3抗体(Abcam, ab32351)。

1.10 免疫组织化学分析

将卵巢组织切片置于EDTA抗原修复缓冲液中,于微波炉内进行抗原修复,PBS洗涤3次。将3%的过氧化氢滴加于切片组织上,室温孵育15 min, PBS洗涤3次后甩干。用组化笔在组织周围画圈以防止抗体流走,甩干PBS,封闭30 min,并与一抗平放于湿盒内4℃孵育过夜,然后将切片与滴加辣根过氧化物酶标记的二抗在37℃下孵育30 min。过氧化物酶底物由3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液显色,载玻片用苏木素复染30~60 s后晾干,使用Image-Pro Plus 6.0软件进行光密度值量化分析。

1.11 DNA 提取以及实时荧光定量PCR分析

使用哺乳动物基因组DNA抽提试剂盒(Beyotime, D0061)提取DNA。RT-qPCR反应体系为20 μL: 2× PerfectStart™ Green qPCR SuperMix 10 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各0.4 μL, DNA模板1 μL, 无核酸酶水(nuclease-free water) 8.2 μL。反应步骤包括:95℃预变性30 s; 95℃、10 s, 58℃、20 s, 72℃、30 s, 共40个循环。引物序列如下: GA-PDH-F, 5'CAACAGCAACTCCCATTCTTCC3'; GA-PDH-R, 5'GTAGGCCATGAGGTCCACCAC3'; TE-F, 5'GTAATTGCGTAAGACTTAAACC3'; TE-R,

5'CCTAGAAATAAGAGGATTTAAACC3'。反应中 Ct 值数据的采集采用校正的阈值;以 *GAPDH* 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。

1.12 统计学处理

数据采用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。使用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hpMSC 的鉴定

形态鉴定结果显示,第 1 代和第 3 代细胞表现出与成纤维细胞样的贴壁细胞相同的形态特征

(图 2A)。流式细胞分析结果显示,培养的细胞阳性表达 CD29 和 CD90,阴性表达 CD34 和 CD71 (图 2B)。细胞在成脂诱导培养 20 d 后,经油红 O 染色可见明显的脂滴(图 2C);在成骨诱导培养 20 d 后,茜素红 S 染色呈阳性(图 2C)。这些结果表明,培养所得的细胞为间充质干细胞。

2.2 POI 大鼠模型的建立

建模过程监控结果显示,随着训练的进行,POI 组和 POI+hpMSC 组大鼠的疲劳程度加深(图 3B)。与空白对照组相比,POI 组和 POI+hpMSC 组大鼠的体重(图 3A)和血液生化指标(图 4)均存在显著变化:体重降低,且训练至第 9 周时体重有明显降低($P<0.05$) (图 3A);Hb 水平自第 3 周起下

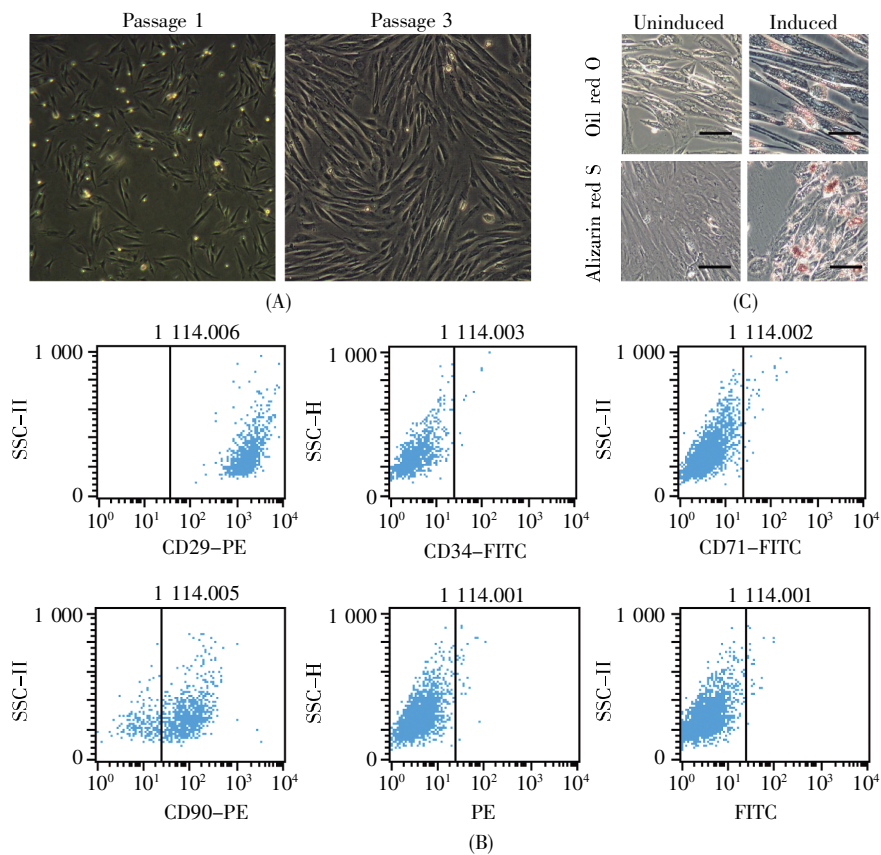


图 2 hpMSC 的鉴定

(A) hpMSC 的形态学观察。细胞在第 1 代和第 3 代都表现出典型的成纤维细胞样形态(倒置显微镜, $\times 100$); (B) 流式细胞仪检测结果。hpMSC 阳性表达 CD29 (99.9%)和 CD90 (80.5%), 阴性表达 CD34 (1.3%)和 CD71 (1.2%), 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)为空白对照; (C) hpMSC 的成脂、成骨诱导分化结果。诱导 20 d 后用油红 O 和茜素红 S 染色, 细胞可以成功分化为脂肪细胞和骨细胞, 未经诱导的细胞用作阴性对照, 标尺: 50 μm 。

Fig.2 Identification of hpMSCs

(A) Morphological observations of hpMSCs. Cells exhibited typical fibroblast-like morphology at both passage 1 and passage 3 (inverted microscope, $\times 100$); (B) Flow cytometry analysis confirmed that the cells expressed CD29 (99.9%) and CD90 (80.5%), but did not express CD34 (1.3%) and CD71 (1.2%), with fluorescein isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE) as blank control; (C) Adipogenic and osteogenic differentiation of hpMSCs. After 20 days of induction, cells were stained with oil red O and alizarin red S respectively, showing that cells could differentiate into osteocytes and adipocytes successfully (scale bar: 50 μm). The uninduced cells served as negative control.

降,从第 6 周开始显著降低($P<0.001$);BLA 含量自第 3 周起显著升高($P<0.001$),并随训练时间增加逐步上升;T 水平在训练第 3 周结束时略有升高,自第 6 周起显著降低($P<0.001$);BUN 含量自第 3 周起显著升高($P<0.001$),并呈现先升高、后降低、又升高的趋势;T/C 比值在训练第 3 周结束时显著升高($P<0.001$),自第 6 周起显著降低($P<0.001$) (图 4)。此外,POI 组和 POI+hpMSC 组大鼠白细胞与上皮细胞的比值在各监测点均高于空白对照组(图 5)。

图 6 的卵巢储备功能评价指标检测结果显示,与空白对照组相比,POI 组和 POI+hpMSC 组

的 FSH 水平均显著升高($P<0.01$)、AMH 和 E2 含量均显著降低($P<0.05$)、FSH/LH 均显著升高($P<0.05$)。

这些结果表明,通过递增负荷跑台训练成功建立了 POI 大鼠模型。

2.3 hpMSC 的体内追踪

为了追踪移植的 hpMSC 在体内的定位,用 PKH26 预先标记 hpMSC,其在荧光显微镜下呈红色(图 7)。

每组在建模完成后 15 d、19 d 分别处死 3 只大鼠,取材卵巢、肝、肾以追踪标记了 PKH26 的 hpMSC 的归巢和分布。结果如图 8 所示,在建模

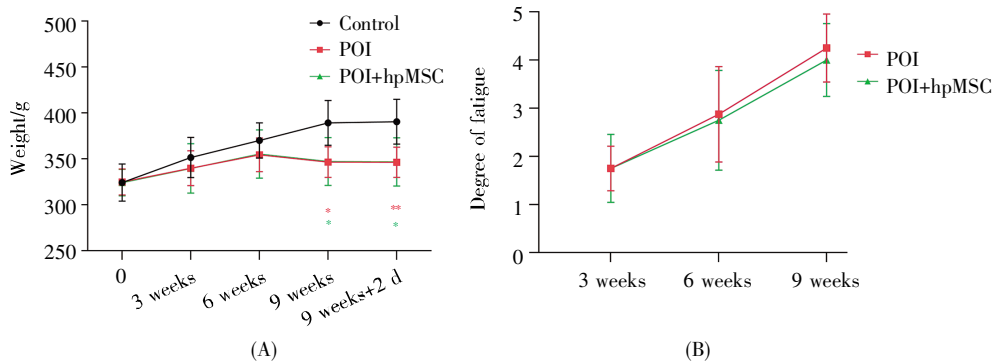


图 3 大鼠体重(A)及疲劳程度(B)评估

与空白对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ 。与 POI 组相比, #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$; ###: $P<0.001$ 。后续图版中的统计分析同此图。

Fig.3 Weight (A) and fatigue degree (B) evaluation of rats

Compared with the control group, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. Compared with the POI group, #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$; ###: $P<0.001$. The same statistical analysis is used in the following figures.

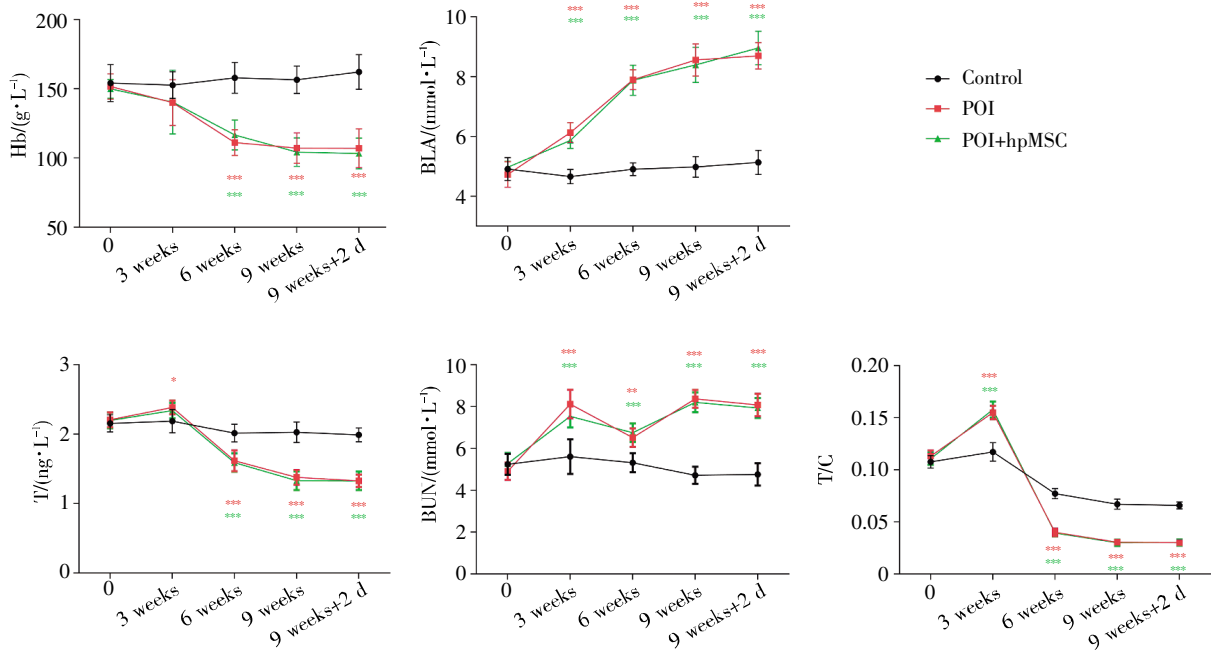


图 4 大鼠血液生化指标

Fig.4 Blood biochemical profile in rats

完成后 15 d、19 d, 卵巢组织均存在 PKH26 标记的 hpMSC, 并且其主要定位于卵巢间质; 肝、肾组织也存在 PKH26 标记的 hpMSC, 但其数量少于卵巢组织。

2.4 hpMSC 对 POI 大鼠激素水平的影响

为了研究 hpMSC 移植对大鼠激素水平的影响, 检测了建模完成后 15 d、19 d 各组大鼠 FSH、LH、AMH、E2 的水平。结果显示: 与空白对照组相比, POI 组在建模完成后 15 d 和 19 d 时, 血清 FSH 水平显著升高 ($P < 0.01$), FSH/LH 显著升高 ($P < 0.05$), AMH 和 E2 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 POI 组相比, POI+hpMSC 组在建模完成后 15 d 时, FSH、AMH 和 E2 的水平以及 FSH/LH 的比值均无显著差异, 在建模完成后 19 d 时, FSH 水平、FSH/LH 比值均显著降低 ($P < 0.05$), AMH 及 E2 的水平虽有升高,

但无统计学差异(图 9)。

2.5 hpMSC 对 POI 大鼠卵泡数量的影响

在建模完成后 15 d 和 19 d 分别收集各组大鼠的卵巢用于组织学分析。图 10A 的结果显示, 空白对照组大鼠在两个取样点均表现为: 卵巢体积大, 卵泡生长活跃, 各级卵泡可见, 颗粒细胞层次多, 黄体细胞丰富且发育较好。相比之下, POI 组大鼠卵巢萎缩明显, 卵泡数量少, 闭锁卵泡数量增多, 卵泡颗粒细胞层减少, 黄体数量减少。POI+hpMSC 组的卵巢皮质内则可见大量初级卵泡及生长卵泡, 较多接近于成熟卵泡, 颗粒细胞层次多, 黄体发育细胞较多。

进一步对各组大鼠的卵泡数量进行统计分析, 结果如图 10B~C 所示。与空白对照组相比, POI 组在建模完成后 15 d 和 19 d 时的生长卵泡

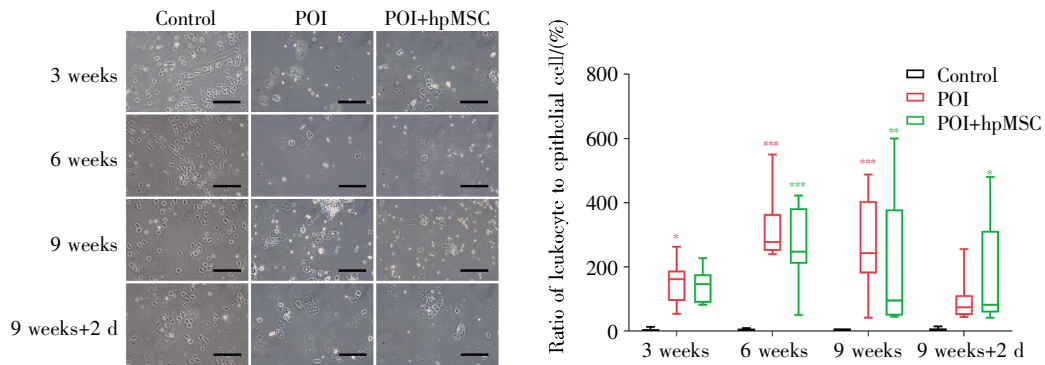


图 5 大鼠阴道脱落细胞检测结果(标尺: 400 μm)

Fig.5 Vaginal cytology of rats (scale bar: 400 μm)

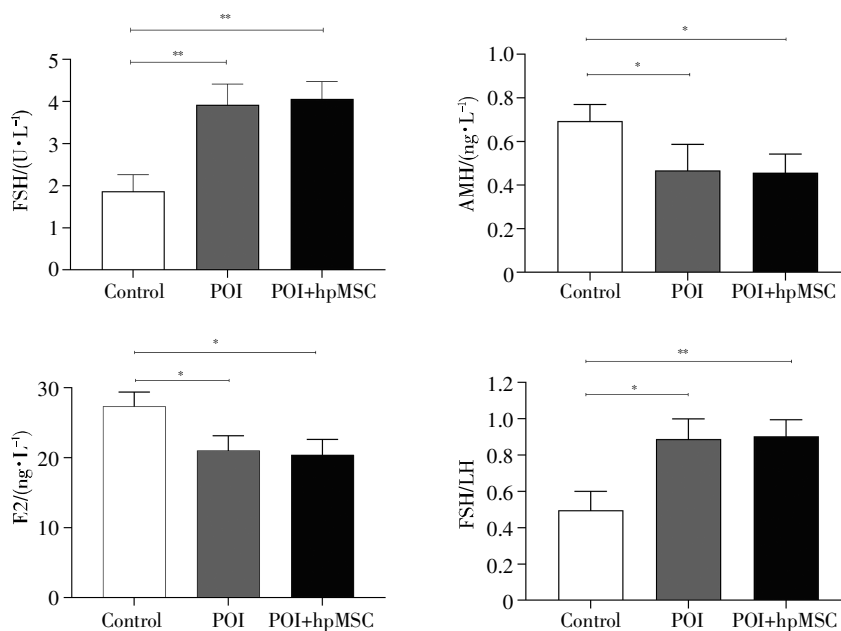


图 6 建模完成后 2 d 时大鼠卵巢储备功能的评估

Fig.6 Evaluation of ovarian reserve function in rats 2 days after modeling

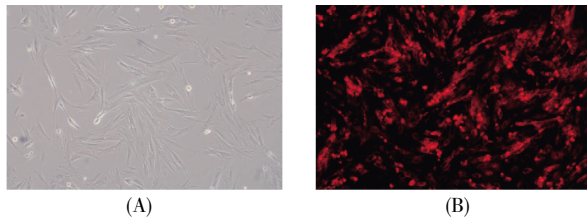


图 7 PKH26 标记的 hpMSC 在 200 倍显微镜下的观察结果

(A) 光镜下观察 PKH26 标记的 hpMSC; (B) 荧光显微镜下观察 PKH26 标记的 hpMSC。

Fig.7 PKH26-labelled hpMSCs observed at 200× magnification

(A) PKH26-labelled hpMSCs observed by light microscopy; (B) PKH26-labelled hpMSCs observed by fluorescent microscopy.

数量显著降低($P<0.001$), 虽然闭锁卵泡数量升高, 黄体数量减少, 但这两个指标无统计学差异。与 POI 组相比, POI+hpMSC 组在建模完成后 15 d、19 d 的生长卵泡数量均有升高, 且 19 d 时差异显著($P<0.001$), 此时, 闭锁卵泡数量减少, 黄体数量升高, 但差异无统计学意义。此外, 与空白对照组相比, POI+hpMSC 组的生长卵泡数量在建模完成后 15 d 时明显降低($P<0.01$), 在 19 d 时无明显差异, 说明其在建模完成后 19 d 已经恢复到正常水平。

2.6 hpMSC 对 POI 大鼠卵巢细胞端粒长度和端粒酶活性的影响

为了研究 hpMSC 移植对卵巢细胞的影响, 在建模完成后 15 d、19 d 分别收集各组大鼠的卵巢细胞, 对其端粒长度和端粒酶活性进行检测。图

11 的结果显示: 建模完成后 15 d, 与空白对照组相比, POI 组端粒酶活性显著降低($P<0.01$), 端粒长度明显缩短($P<0.001$); 建模完成后 19 d, 与空白对照组相比, POI 组端粒酶活性显著降低($P<0.01$), 端粒长度明显缩短($P<0.001$)。此外, 建模完成后 15 d, POI+hpMSC 组较 POI 组的端粒酶活性升高(无统计学差异), 端粒长度显著增加($P<0.05$); 建模完成后 19 d, POI+hpMSC 组较 POI 组的端粒酶活性升高(无统计学差异), 端粒长度显著增加($P<0.01$)。

2.7 hpMSC 对 POI 大鼠卵巢氧化应激指标的影响

为了进一步探究 hpMSC 移植对卵巢细胞的影响, 在建模完成后 15 d、19 d, 对各组大鼠取卵巢组织, 分析 ROS、MDA 和 SOD 含量。图 12 的结果显示, 与空白对照组相比, 建模完成后 15 d, POI 组 ROS 和 MDA 含量明显上升($P<0.05$), SOD 含量明显降低($P<0.001$); 建模完成后 19 d, POI 组 ROS 含量明显上升($P<0.001$), MDA 含量明显上升($P<0.01$), SOD 含量明显降低($P<0.001$)。同样与空白对照组相比, 建模完成后 15 d, POI+hpMSC 组 SOD 含量明显降低($P<0.001$), ROS 和 MDA 含量虽有上升, 但差异无统计学意义; 建模完成后 19 d, POI+hpMSC 组 ROS 含量明显上升($P<0.001$), MDA 含量明显上升($P<0.05$), SOD 含量明显降低($P<0.001$)。此外, 建模完成后 19 d, POI+hpMSC 组较 POI 组的 ROS 和 MDA 含量下降(无统计学差异), SOD 含量显著上升($P<0.05$)。

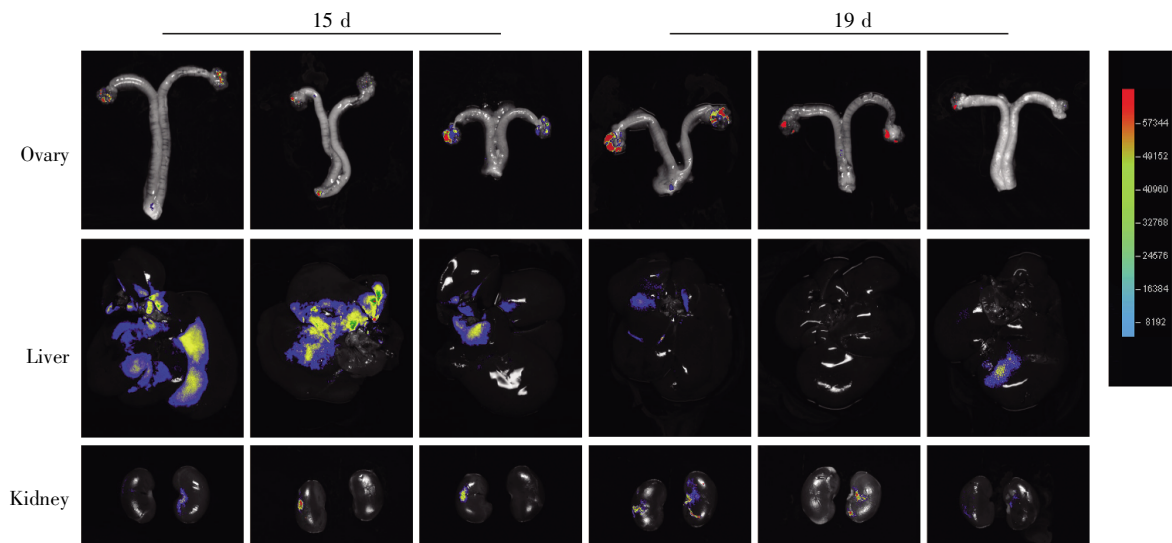


图 8 PKH26 标记的 hpMSC 在体内的归巢与分布
颜色标尺表示荧光强度。

Fig.8 *In vivo* tracking of PKH26-labelled hpMSCs

Color bar indicates relative fluorescence intensity.

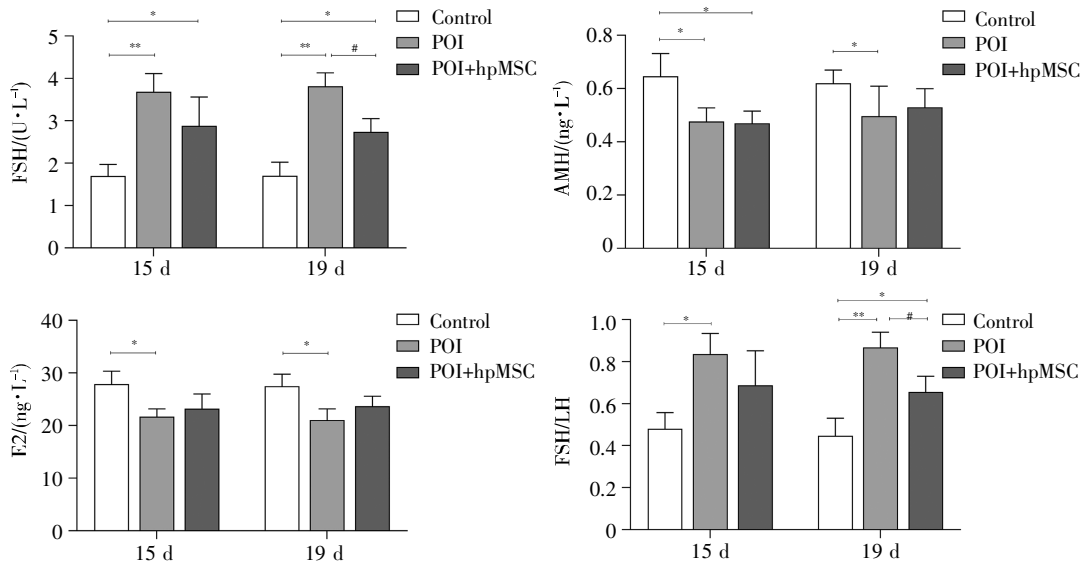


图 9 建模完成后 15 d 和 19 d 各组大鼠激素水平的变化
Fig.9 Hormone level changes in rats of each group 15 and 19 days after modeling

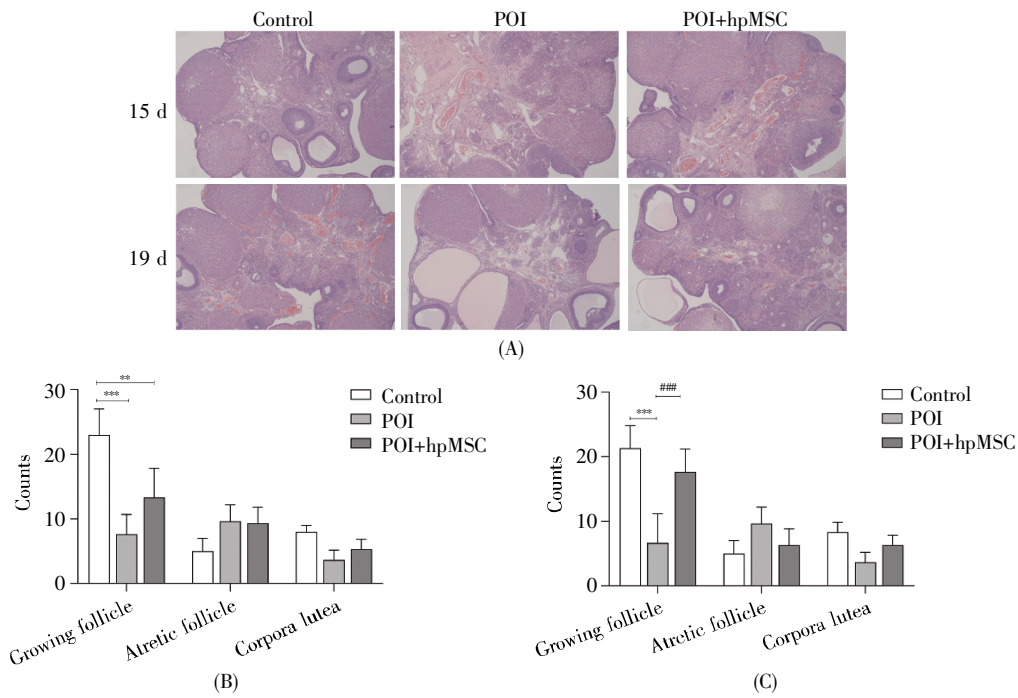


图 10 大鼠卵巢组织学分析
(A) HE 染色观察组织形态($\times 40$); (B) 建模完成后 15 d 时的卵泡数量; (C) 建模完成后 19 d 时的卵泡数量。

Fig.10 Histological analysis of ovarian tissue in rats

(A) Observation of tissue morphology by HE staining ($\times 40$); (B) Number of follicle 15 days after modeling; (C) Number of follicle 19 days after modeling.

2.8 hpMSC 对 POI 大鼠卵巢 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 表达的影响

为了探讨 hpMSC 移植对 POI 大鼠卵巢颗粒细胞的影响, 对各组大鼠颗粒细胞 3 种关键凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 的表达进行免疫印迹和免疫组织化学分析。

图 13 的免疫印迹分析结果显示: 与空白对照组相比, 建模完成后 15 d (即移植完成后 1 d), POI 组 Bax 和 caspase-3 的表达量明显增多($P < 0.001$), Bcl-2 的表达量明显降低($P < 0.01$); 建模完成后 19 d (即移植完成后 5 d), POI 组 Bax 和 caspase-3 的表达量明显增多($P < 0.001$), Bcl-2 的表达量明显降

低($P<0.001$)。此外,与POI组相比,建模完成后15 d, POI+hpMSC组 Bax ($P<0.05$)、caspase-3 ($P<0.01$)的表达量均明显减少, Bcl-2的表达量虽有增加,但差异无统计学意义;建模完成后19 d, POI+hpMSC组 Bax 的表达量明显减少($P<0.05$),虽然 caspase-3 的表达量也有减少,但差异无统计学意义,同样 Bcl-2 的表达量增加也无统计学意义。

图14的免疫组织化学结果显示:与空白对照组相比,建模完成后15 d, POI组 Bax 的表达量明显增多($P<0.001$), Bcl-2 的表达量明显降低($P<0.001$), caspase-3 的表达量明显增多($P<0.05$);建模完成后19 d, Bax 的表达量明显增多($P<0.001$), Bcl-2 的表达量明显降低($P<0.001$), caspase-3 的表达量明显增多($P<0.05$)。此外,建模完成后15 d和19 d(即移植完成后1 d和5 d),与POI组相比, POI+hpMSC组 Bax 和 caspase-3 的表达量有所降低, Bcl-2 的表达量略有升高,但差异均无统计学意义。

3 讨论

POI在30~39岁女性中的发生率为1%,严重损害了女性的身心健康,已成为女性不孕症的主要原因之一^[16]。卵泡耗竭或卵泡功能障碍是导致POI的主要原因,卵泡耗竭表明卵巢中没有原始卵泡,卵泡功能障碍表明卵巢中有卵泡,但病理

变化让它们无法发挥正常功能^[17]。因此,减少卵泡闭锁、改善卵泡质量以增加健康卵泡的数量,对于恢复卵巢功能和患者的生育能力非常重要。

本研究通过递增负荷跑台训练成功建立POI大鼠模型后,采用标记了PKH26的hpMSC通过尾静脉移植进行体内治疗。结果显示, hpMSC成功定植到卵巢间质,其通过增加端粒长度和调节氧化应激水平减缓卵母细胞衰老,同时通过调节颗粒细胞凋亡蛋白水平减少颗粒细胞凋亡,从而提高了卵泡质量,增加了健康卵泡的数量,改善了卵巢功能。

诱发POI的因素包括染色体异常、遗传因素、自身免疫性疾病、医源性因素等^[18],但70%的患者是特发性的,病因不明^[17]。目前,科研人员广泛使用化疗药物诱导^[19-22]、胸腺切除术^[23]、基因及受体敲除^[24-25]3种方式建立POI模型。但由于POI的高度异质性,使用不同方式建立POI动物模型十分有必要,以便为POI的临床诊断及治疗提供更完善的思路和方法。本研究尝试通过递增负荷跑台训练导致卵巢损伤来建立POI大鼠模型,建模期间的监控数据显示,大鼠的体重、疲劳程度、血液生化指标均符合递增负荷训练要求(图3~4),并且建模大鼠的阴道脱落白细胞与上皮细胞比明显升高(图5)。同时,组织学分析显示:建模大鼠的卵巢

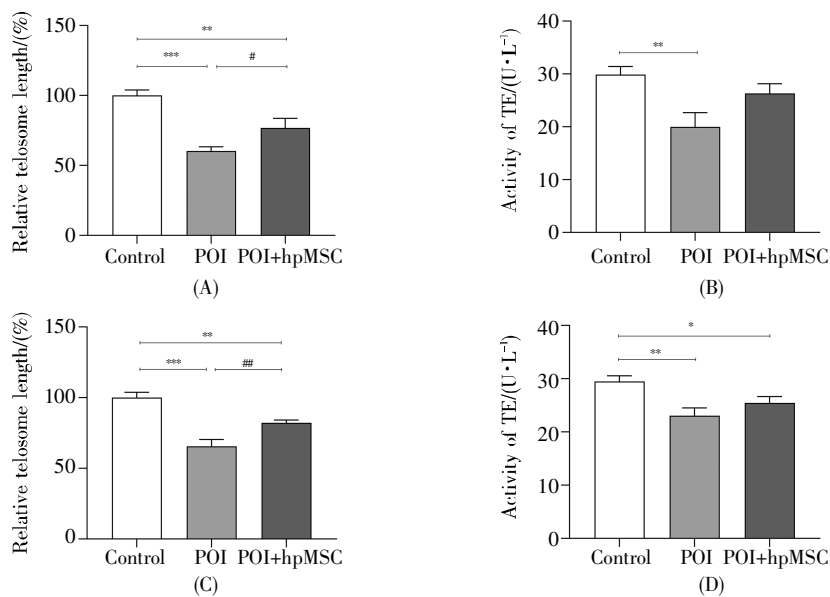


图11 hpMSC移植对各组大鼠端粒长度及端粒酶活性的影响

(A) 建模完成后15 d的端粒长度; (B) 建模完成后15 d的端粒酶活性; (C) 建模完成后19 d的端粒长度; (D) 建模完成后19 d的端粒酶活性。

Fig.11 Effects of hpMSC transplantation on telomere length and TE activity

(A) Telomere length 15 days after modeling; (B) TE activity 15 days after modeling; (C) Telomere length 19 days after modeling; (D) TE activity 19 days after modeling.

萎缩明显, 卵巢组织皮质较薄, 间质部分明显疏松、纤维化, 窦状卵泡数量明显减少, 黄体数量减少, 卵泡颗粒细胞层减少, 闭锁卵泡数量增加

(图10)。与空白对照组相比, 建模大鼠的 FSH 水平、FSH/LH 比值显著升高, AMH 和 E2 水平显著降低(图 6)。在运动医学领域, 研究人员通过急性

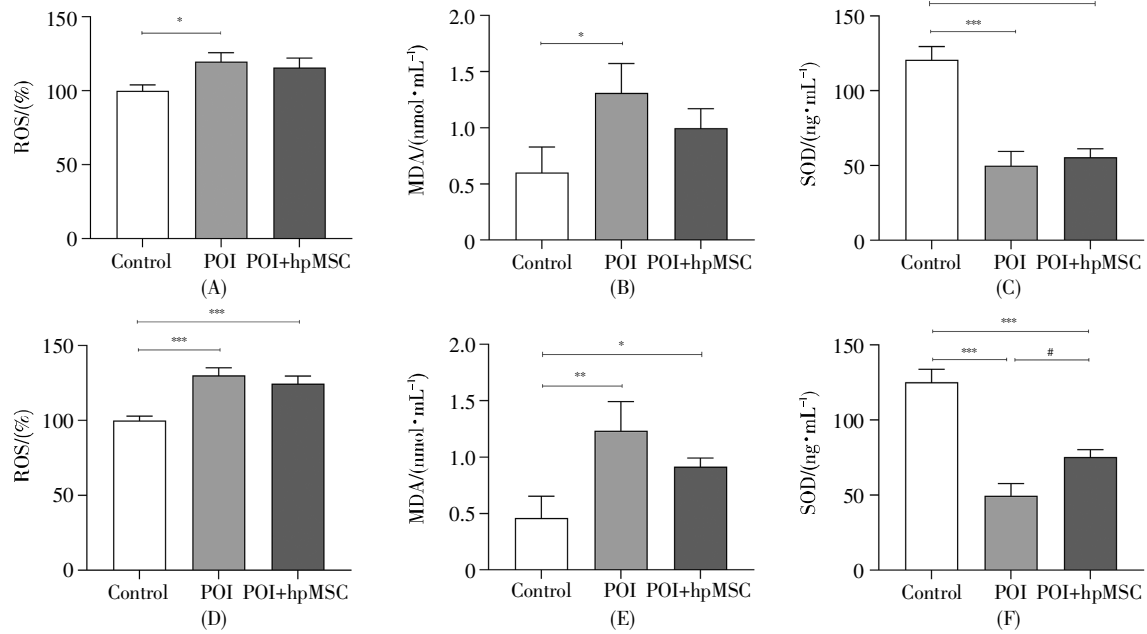


图 12 hpMSC 移植对各组大鼠 ROS、MDA、SOD 含量的影响

(A~C) 建模完成后 15 d 的 ROS、MDA 和 SOD 含量; (D~F) 建模完成后 19 d 的 ROS、MDA 和 SOD 含量。

Fig.12 Effects of hpMSC transplantation on contents of ROS, MDA and SOD in rats

(A~C) Contents of ROS, MDA and SOD 15 days after modeling; (D~F) Contents of ROS, MDA and SOD 19 days after modeling.

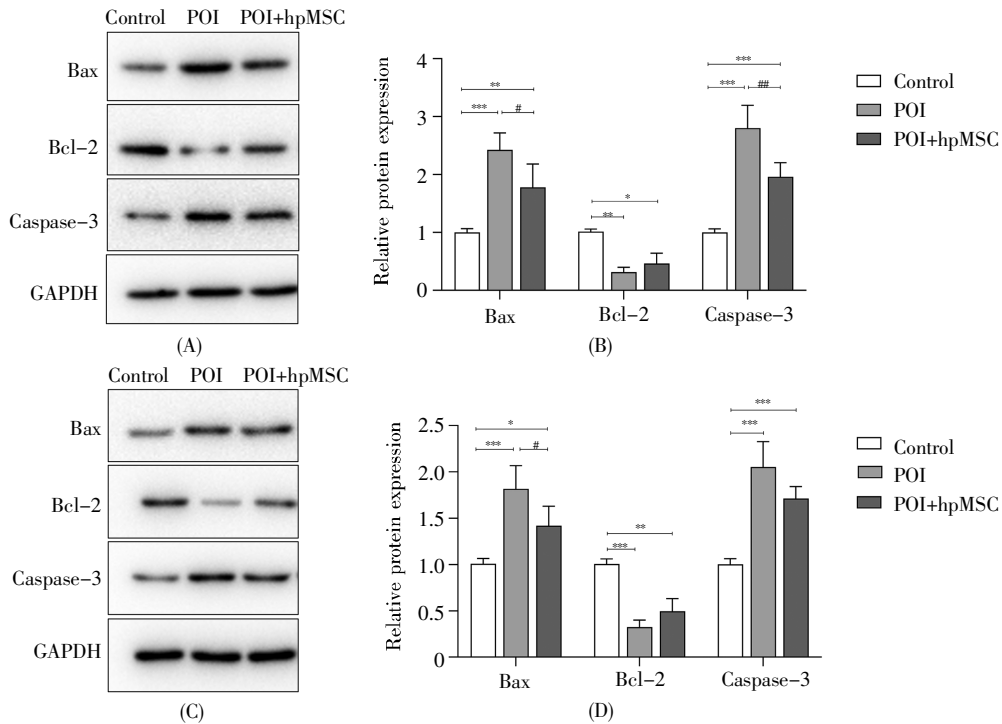


图 13 免疫印迹分析 hpMSC 移植对各组大鼠 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 表达量的影响

(A~B) 建模完成后 15 d; (C~D) 建模完成后 19 d。

Fig.13 Effects of hpMSC transplantation on expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 by Western-blot

(A~B) Fifteen days after modeling; (C~D) Nineteen days after modeling.

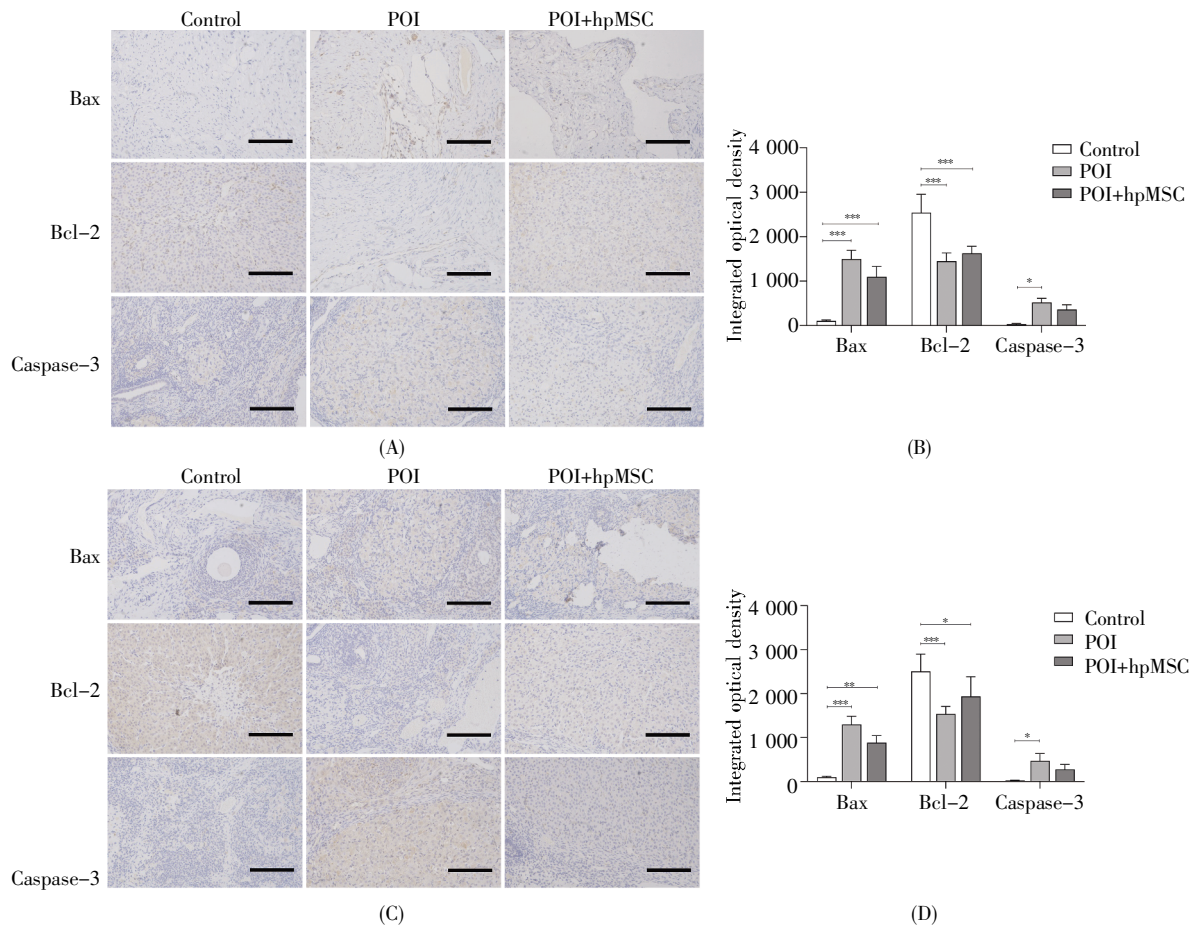


图 14 免疫组织化学检测 hpMSC 移植对各组大鼠 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 表达量的影响

(A~B) 建模完成后 15 d; (C~D) 建模完成后 19 d。标尺: 400 μm 。

Fig.14 Effects of hpMSC transplantation on expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 by immunohistochemistry

(A~B) Fifteen days after modeling; (C~D) Nineteen days after modeling. Scale bar: 400 μm .

高强度负荷训练^[26]、周期性耐力训练^[27]等方式建立运动闭经动物模型。这是因为过度训练可能会导致下丘脑-垂体轴异常,表现为垂体促性腺激素 FSH 和 LH 检测不到或异常低表达,机体发生低促性腺激素性腺功能减退;当训练停止后生殖激素水平逐渐恢复^[28]。郑陆等^[29-30]通过持续大运动量跑台训练建立了运动闭经大鼠模型,并对训练过程及训练停止后的 20 d 进行了连续、动态的观察,发现在训练停止后的 15 d 内,大鼠的生殖激素水平已经恢复。在本研究中,建模结果为 FSH 和 LH 的水平均升高,同时伴有 E2 水平降低(图 6),可以排除下丘脑功能障碍,推测模型大鼠是发生了高性腺激素性腺功能减退,即出现了原发性性腺功能障碍;并且,在训练停止后的 15 d 和 19 d, FSH、LH 和 E2 的水平均未恢复(图 9)。这与 Mcgowan 等^[31]的研究报道一致,该研究认为虽然下丘脑-垂体轴异常是长跑运动员闭经的原因之一,但研究案例中的 POI 长跑运动员的 FSH 和 LH 水平异

常升高,可以排除下丘脑功能障碍。综上所述,在本研究中,通过 9 周的递增负荷跑台训练,大鼠出现了高性腺激素性腺功能减退的症状,并且在停止运动后的 19 d 内未得到恢复,同时卵巢功能明显受损,这与 POI 的诊断标准以及以往研究建立 POI 动物模型的数据^[1, 32]一致,可以说明成功建立了 POI 模型。

近年来, MSC 在再生医学领域显示出巨大的潜力,多种来源的 MSC 已被用于治疗包括 POI 在内的各种卵巢损伤。Fu 等^[8]通过环磷酸腺苷诱导建立了 POI 大鼠模型,采用骨髓来源的 MSC 实施移植治疗后,大鼠的 E2 水平升高, Bcl-2 表达增加,颗粒细胞凋亡减少。Sun 等^[33]用人脂肪来源的 MSC 治疗 POI 小鼠后,检测到颗粒细胞凋亡减少,卵泡数量增加。Feng 等^[34]将人羊膜来源的 MSC 注射到 POI 大鼠的卵巢组织,结果显示大鼠的体重增加, AMH 水平和卵泡数量改善,卵巢功能得到了修复。Ding 等^[12]发现,利用胶原包裹脐带来源的

MSC 移植卵巢可降低 POI 患者的 FSH 水平, 提高雌激素浓度, 恢复卵巢功能。在我们的研究中, 培养的 hpMSC 具有 MSC 的共同特征, 符合国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)关于 MSC 的鉴定标准。这些 hpMSC 移植到 POI 大鼠体内 1 d 后, POI+hpMSC 组卵巢组织的功能和结构较 POI 组有明显改善, 包括卵巢体积增大、健康的卵泡数量增加、FSH 水平和 FSH/LH 比值降低、AMH 和 E2 水平增加; 移植 5 d 后, 卵巢功能恢复更为显著且几乎正常, 治疗效果与其他关于骨髓^[8]、脂肪^[33]、羊膜^[34]和脐带^[12]来源的 MSC 的研究相同。这些数据有力地表明, hpMSC 在递增负荷跑台训练诱导的 POI 大鼠中成功调节了激素水平, 增加了健康卵泡的数量, 修复了卵巢损伤, 恢复了卵巢功能。

卵巢的主要功能单位是卵泡, 卵泡对卵巢的功能起决定性作用。卵泡功能障碍和卵泡耗竭导致功能性卵巢储备下降, 进而引发 POI^[35-38]。卵泡由卵母细胞和包绕在其周围的颗粒细胞组成, 卵母细胞和颗粒细胞在促进卵泡启动、发育和维持卵巢功能中发挥决定性作用。研究已经证实, 端粒酶活性低、端粒缩短以及氧化应激损伤与雌性小鼠的卵母细胞衰老有关, 卵巢损伤女性的卵母细胞表现出更高的复制衰老和端粒缩短^[39]。本研究表明, POI 大鼠的端粒酶活性降低、端粒长度缩短(图 11), 且机体发生了氧化应激反应(图 12), 提示 POI 大鼠卵母细胞衰老; hpMSC 移植有效减少了卵母细胞端粒缩短, 调节了氧化应激水平, 减缓了卵母细胞衰老。颗粒细胞是包裹在卵泡表面的一层壁细胞, 支持卵泡的形成和发育, 并通过分泌性腺激素维持卵巢功能。颗粒细胞凋亡导致卵泡闭锁, 继而导致卵泡数量减少^[40-42]。所以, 抑制颗粒细胞凋亡对于改善 POI 至关重要。颗粒细胞凋亡在自身基因调控和细胞外环境因素的共同影响下发生, 颗粒细胞凋亡相关基因分为促进凋亡基因和抑制凋亡基因。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白, 通过调节线粒体膜电位及通透性来控制细胞凋亡^[43]。Bcl-2 缺失的小鼠颗粒细胞凋亡增加, 进而卵泡闭锁增加, 卵泡数量下降^[44]。Bax 是一种促凋亡蛋白, 通过促进凋亡信号, 控制线粒体释放细胞色素 c^[45], Bax 过表达会增加颗粒细胞凋亡^[46]。Caspase-3 是 caspase 家族中关键的凋亡执行分子^[47-48], 能较好地反映细胞凋亡程度, 通常在凋亡的早期阶段被激活, 它的活化说明细胞凋亡开始

进入不可逆阶段^[49]。本研究的实验结果表明, 递增负荷训练诱导的 POI 与卵巢中 Bcl-2 表达减少和 Bax、caspase-3 的表达增加有关, 而 hpMSC 移植可减少 Bax 和 caspase-3 的表达, 进而减少卵巢颗粒细胞的凋亡。

综上所述, hpMSC 移植可以调节递增负荷训练诱导的 POI 大鼠的激素水平, 提高健康卵泡的数量, 修复卵巢功能。当然, 动物模型实验与临床试验及应用存在一定的差距, hpMSC 移植治疗 POI 大鼠的效果不能准确地预测该方法应用于临床患者治疗时可能出现的生物学反应。后续我们仍需要采用不同方式、不同种类的动物建立 POI 模型, 进一步研究 hpMSC 的治疗效果及作用机制, 为临床实践提供更多的理论依据和参考。

参考文献(References):

- [1] The ESHRE Guideline Group on POI, WEBBER L, DAVIES M, *et al.* ESHRE guideline: management of women with premature ovarian insufficiency[J]. *Human Reproduction*, 2016, 31(5): 926-937.
- [2] MACHURA P, GRYMOWICZ M, RUDNICKA E, *et al.* Premature ovarian insufficiency-hormone replacement therapy and management of long-term consequences[J]. *Przegląd Menopauzalny*, 2018, 17(3): 135-138.
- [3] ZHANG Q W, HUANG Y T, SUN J Y, *et al.* Immunomodulatory effect of human amniotic epithelial cells on restoration of ovarian function in mice with autoimmune ovarian disease[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2019, 51(8): 845-855.
- [4] HUANG J, SHAN W Y, LI N, *et al.* Melatonin provides protection against cisplatin-induced ovarian damage and loss of fertility in mice[J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2021, 42(3): 505-519.
- [5] MELLONE S, ZAVATTARO M, VURCHIO D, *et al.* A long contiguous stretch of homozygosity disclosed a novel STAG3 biallelic pathogenic variant causing primary ovarian insufficiency: a case report and review of the literature[J]. *Genes*, 2021, 12(11): 1709.
- [6] THOMSON J A, ODORICO J S. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(2): 53-57.
- [7] NAN C R, GUO L, ZHAO Z M, *et al.* Tetramethylpyrazine induces differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(6): 2287-2294.
- [8] 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[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(4): 353-363.
- [9] GHADAMI M, EL-DEMERDASH E, ZHANG D, *et al.* Bone marrow transplantation restores follicular maturation and steroid hormones production in a mouse model for primary ovarian failure[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32462.
- [10] SU J, DING L J, CHENG J, *et al.* Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency[J]. *Human Reproduction*, 2016, 31(5): 1075-1086.

- [11] LIU R X, ZHANG X Y, FAN Z H, *et al.* Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10: 299.
- [12] DING L J, YAN G J, WANG B, *et al.* Transplantation of UC-MSCs on collagen scaffold activates follicles in dormant ovaries of POF patients with long history of infertility[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(12): 1554-1565.
- [13] BARLOW S, BROOKE G, CHATTERJEE K, *et al.* Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2008, 17(6): 1095-1107.
- [14] BEDFORD T G, TIPTON C M, WILSON N C, *et al.* Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 1979, 47(6): 1278-1283.
- [15] 郑陆, 隋波, 潘力平, 等. 过度训练状态动物模型的建立[J]. *中国运动医学杂志*(ZHENG Lu, SUI Bo, PAN Liping, *et al.* Establishing overtraining model in rats[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*), 2000, 19(2): 179-181.
- [16] YANG M L, LIN L, SHA C L, *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]. *Laboratory Investigation*, 2020, 100(3): 342-352.
- [17] NELSON L M. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(6): 606-614.
- [18] RUDNICKA E, KRUSZEWSKA J, KLICKA K, *et al.* Premature ovarian insufficiency-aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation[J]. *Menopause Review*, 2018, 17(3): 105-108.
- [19] LEE H J, SELESNIEMI K, NIKURA Y, *et al.* Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, 25(22): 3198-3204.
- [20] LEE E H, HAN S E, PARK M J, *et al.* Establishment of effective mouse model of premature ovarian failure considering treatment duration of anticancer drugs and natural recovery time[J]. *Journal of Menopausal Medicine*, 2018, 24(3): 196-203.
- [21] BEN-AHARON I, BAR-JOSEPH H, TZARFATY G, *et al.* Doxorubicin-induced ovarian toxicity[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010, 8: 20.
- [22] CHANG E M, LIM E, YOON S, *et al.* Cisplatin induces over-activation of the dormant primordial follicle through PTEN/AKT/FOXO3a pathway which leads to loss of ovarian reserve in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144245.
- [23] MIYAKE T, TAGUCHI O, IKEDA H, *et al.* Acute oocyte loss in experimental autoimmune oophoritis as a possible model of premature ovarian failure[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1988, 158(1): 186-192.
- [24] GHADAMI M, EL-DEMERDASH E, SALAMA S A, *et al.* Toward gene therapy of premature ovarian failure: intraovarian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores folliculogenesis in FSHR(-/-) FORKO mice[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2010, 16(4): 241-250.
- [25] DURLINGER A L, KRAMER P, KARELS B, *et al.* Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12): 5789-5796.
- [26] 胡扬, 李国盛, 黄安萍, 等. 运动性闭经某些性激素分泌特点的动物模型建立[J]. *北京体育大学学报*(HU Yang, LI Guo-sheng, HUANG Anping, *et al.* Animal model of secretion characteristics of selected sexual hormones in sport amenorrhoea[J]. *Journal of Beijing Sport University*), 1991(1): 15-18, 93.
- [27] 王人卫, 陆爱云. 递增负荷的运动性闭经动物模型的建立[J]. *中国运动医学杂志*(WANG Renwei, LU Aiyun. Foundation of rat model of athletic secondary amenorrhea by endurance training with incremental intensity[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*), 2000, 19(3): 293.
- [28] STRAUSS J F III, BARBIERI R L. 生殖内分泌学: 中文翻译版 原书第7版[M]. 乔杰, 译. 北京: 科学出版社(STRAUSS J F III, BARBIERI R L. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*[M]. 7th ed. Translated by QIAO Jie. Beijing: Science Press), 2014: 445-468.
- [29] 郑陆, 潘力平, 隋波, 等. 运动性周期紊乱动物模型的建立[J]. *山东体育学院学报*(ZHENG Lu, PAN Liping, SUI Bo, *et al.* Establishment of athletic estrous cycle dysfunction model[J]. *Journal of Shandong Sport University*), 2005, 21(2): 46-49, 59.
- [30] 郑陆, 潘力平, 隋波, 等. 递增负荷运动过程中雌性大鼠生殖激素水平的变化特点及其机制[J]. *山东体育学院学报*(ZHENG Lu, PAN Liping, SUI Bo, *et al.* Changing characteristics and mechanism of the reproductive hormone level for female rats during progressive increasing load volume exercise[J]. *Journal of Shandong Sport University*), 2005, 21(3): 58-61, 64.
- [31] MCGOWAN M C, DOYLE E A, BOULWARE S D. Primary ovarian insufficiency in the prepubertal adolescent: a case report[J]. *Journal of Pediatric Health Care*, 2020, 34(3): 256-263.
- [32] Committee on Adolescent Health Care. Committee opinion No. 605: primary ovarian insufficiency in adolescents and young women[J]. *Obstetrics and Gynecology*, 2014, 124(1): 193-197.
- [33] SUN M, WANG S F, LI Y, *et al.* Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2013, 4(4): 80.
- [34] FENG X S, LING L, ZHANG W Q, *et al.* Effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation *in situ* on primary ovarian insufficiency in SD rats[J]. *Reproductive Sciences*, 2020, 27(7): 1502-1512.
- [35] ZHANG H Q, LUO Q Q, LU X Y, *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[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018, 9: 20.
- [36] GLEICHER N, WEGHOFER A, BARAD D H. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011, 9: 23.
- [37] SHESTAKOVA I G, RADZINSKY V E, KHAMOSHINA M B. Occult form of premature ovarian insufficiency[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2016, 32(sup2): 30-32.
- [38] ILIODROMITI S, IGLESIAS SANCHEZ C, MESSOW C M, *et al.* Excessive age-related decline in functional ovarian reserve in infertile women: prospective cohort of 15,500 women[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2016, 101(9): 3548-3554.
- [39] YAMADA-FUKUNAGA T, YAMADA M, HAMATANI T, *et al.* Age-associated telomere shortening in mouse oocytes[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, 11: 108.
- [40] GUO J Q, GAO X, LIN Z J, *et al.* BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause[J]. *BMC Cell Biology*, 2013, 14: 18.
- [41] NELSON L R, BULUN S E. Estrogen production and action[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2001, 45(3 Suppl.): S116-S124.

- [65] ZHAO Q, ZHOU L J, LIU J C, *et al.* Involvement of CAT in the detoxification of HT-induced ROS burst in rice anther and its relation to pollen fertility[J]. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(5): 741–757.
- [66] PENG H, ZHANG J. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: potential applications and challenges in plant breeding[J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(9): 1037–1045.
- [67] WANG P, YAN Y, BAI Y J, *et al.* Phosphorylation of RAV1/2 by KIN10 is essential for transcriptional activation of *CA1/6/7*, which underlies oxidative stress response in cassava[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(11): 110119.
- [68] HERTWIG B, STREB P, FEIERABEND J. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions[J]. *Plant Physiology*, 1992, 100(3): 1547–1553.
- [69] SCHMIDT M, DEHNE S, FEIERABEND J. Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the heme cofactor and reversible changes of the translation efficiency of mRNA[J]. *Plant Journal*, 2002, 31(5): 601–613.
- [70] SCHMIDT M, GRIEF J, FEIERABEND J. Mode of translational activation of the catalase (cat1) mRNA of rye leaves (*Secale cereale* L.) and its control through blue light and reactive oxygen[J]. *Planta*, 2006, 223(4): 835–846.
- [71] RAFIKOV R, KUMAR S, AGGARWAL S, *et al.* Endothelin-1 stimulates catalase activity through the PKC δ -mediated phosphorylation of serine 167[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 67: 255–264.
- [72] ZOU J J, LI X D, RATNASEKERA D, *et al.* *Arabidopsis* CA-LCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(5): 1445–1460.
- [73] DYE B T, SCHULMAN B A. Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins[J]. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, 2007, 36: 131–150.
- [74] CAO C, LENG Y M, LIU X, *et al.* Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(35): 10348–10353.
- [75] YOU X M, ZHANG F, LIU Z, *et al.* Rice catalase OsCATC is degraded by E3 ligase APIP6 to negatively regulate immunity[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(2): 1095–1099.
- [76] ZHANG Z S, XU Y Y, XIE Z W, *et al.* Association-dissociation of glycolate oxidase with catalase in rice: a potential switch to modulate intracellular H₂O₂ levels[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(5): 737–748.
- [77] YANG T, POOVAIAH B W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2002, 99(6): 4097–4102.
- [78] LI Y S, CHEN L C, MU J Y, *et al.* LESION SIMULATING DISEASE1 interacts with catalases to regulate hypersensitive cell death in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 1059–1070.
- [79] AL-HAJAYA Y, KARPINSKA B, FOYER C H, *et al.* Nuclear and peroxisomal targeting of catalase[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2022, 45(4): 1096–1108.

(上接第 127 页)

- [42] SUN B, MA Y J, WANG F, *et al.* miR-644-5p carried by bone mesenchymal stem cell-derived exosomes targets regulation of p53 to inhibit ovarian granulosa cell apoptosis[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10: 360.
- [43] TIAN W S, HEO S, KIM D W, *et al.* Ethanol extract of *Maclura tricuspidata* fruit protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against H₂O₂-induced oxidative damage via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6946.
- [44] LIEW S H, VAITHIYANATHAN K, COOK M, *et al.* Loss of the proapoptotic BH3-only protein BCL-2 modifying factor prolongs the fertile life span in female mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(4): 77.
- [45] CHEN J F, YU B X, YU R, *et al.* Monoclonal antibody Ztg4 targeting RON receptor tyrosine kinase enhances chemosensitivity of bladder cancer cells to epirubicin by promoting G1/S arrest and apoptosis[J]. *Oncology Reports*, 2017, 37(2): 721–728.
- [46] LÚ J L, ZHANG F, ZHAI C Y, *et al.* Bag-1 silencing sensitizes non-small cell lung cancer cells to cisplatin through multiple gene pathways[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12: 8977–8989.
- [47] WANG W M, LIU Y Z, ZHAO L. Tambulin targets histone deacetylase 1 inhibiting cell growth and inducing apoptosis in human lung squamous cell carcinoma[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1188.
- [48] HE M, SUN H G, HAO J Y, *et al.* RNA interference-mediated FANCF silencing sensitizes OVCAR3 ovarian cancer cells to adriamycin through increased adriamycin-induced apoptosis dependent on JNK activation[J]. *Oncology Reports*, 2013, 29(5): 1721–1729.
- [49] KHAN M S, ALOMARI A, TABREZ S, *et al.* Anticancer potential of biogenic silver nanoparticles: a mechanistic study[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(5): 707.