文章编号:1000-5404(2010)01-0057-03

论著

脐带基质干细胞移植在卵巢早衰模型小鼠体内的分布

李彩霞,王凤英,冷少华,梁志清,李玉艳 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 观察人脐带基质干细胞(umbilical cord-matrix stem cells, UC-MSCs)移植后在卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)小鼠模型中的分布与生长情况。**方法** 用环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)和白消安(busulfan, BUS)处理,建立小鼠POF模型;分离扩增UC-MSCs,采用腺病毒介导Ad-GFP转染方式对其进行标记;将GFP阳性细胞移植入POF小鼠体内,分别于移植后1、10、20 d留取组织,通过激光共聚焦显微镜观察UC-MSCs在小鼠卵巢及其他组织中的定位与生长情况。**结果** 腺病毒介导Ad-GFP转染UC-MSCs效率达95%左右。POF小鼠经尾静脉接受UC-MSCs移植后1 d,卵巢可见GFP阳性细胞,移植后10 d及20 d的卵巢GFP阳性细胞明显增加,而小鼠骨髓、大脑、肝脏、肾脏、胰腺等组织无明显GFP阳性细胞存在。**结论** 人UC-MSCs经尾静脉移植可向POF小鼠卵巢归巢,并能在局部存活生长,提示其可能具有卵巢损伤修复的作用。

[关键词] 脐带;基质干细胞;干细胞移植;卵巢功能早衰;生殖细胞
[中图法分类号] R711.75; R329.2; R-332 **[文献标志码]** A

Localization of transplanted UC-MSCs in mice with premature ovarian failure

Li Caixia, Wang Fengying, Leng Shaohua, Liang Zhiqing, Li Yuyan (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the localization of transplanted human umbilical cord-matrix stem cells (UC-MSCs) in mouse premature ovarian failure (POF) model. **Methods** POF animal model was established by cyclophosphamide (CPA) and busulfan (BUS) chemotherapy. After UC-MSCs were isolated and proliferated from UC, recombinant Ad-enovirus-green fluorescent protein (Ad-GFP) was transfected in them *via* Ad-enovirus. The GFP-transfected UC-MSCs (2×10^6 to 3×10^6) were transplanted into POF mice through caudal vein, and tissues from POF mice were obtained for frozen section at 1, 10 and 20 d after transplantation. GFP-positive cells in the ovary, brain, liver, kidney and pancreas were determined by laser confocal microscopy. **Results** Transfection efficiency of Ad-GFP by Ad-enovirus was about 95%. After transplantation, GFP-positive cells were found in the harmed ovaries and more GFP-positive cells were found at 10 and 20 d after transplantation than those at 1 d after transplantation. However, no GFP-positive cells were found in the bone marrow, brain, liver, kidney and pancreas. **Conclusion** Human UC-MSCs can home and survive in the ovaries of POF mouse model. It suggests that UC-MSCs maybe have the potential for POF therapy.

[Key words] umbilical cord; matrix stem cells; stem cell transplantation; premature ovarian failure; germ cells

Corresponding author: Wang Fengying, Tel: 86-23-68765903, E-mail: fyw018@163.com

近年来,干细胞向生殖细胞分化的研究已成为大众关注的焦点。研究发现,小鼠胚胎干细胞(embryo stem cells,ESCs)、骨髓干细胞、猪皮肤干细胞及大鼠胰腺干细胞等可在体外或体内衍生成为卵母细胞样细胞,初步表明ESCs和部分成体干细胞具有向生殖细胞分化的潜能[1-3]。本研究小组前期已从脐带中成功分离出人脐带基质干细胞(umbilical cord-matrix stem cells, UC-MSCs),并通过检测干细胞标记物表达、体外诱导分化等研究证实其具有干细胞多分化潜能[4]。此外,我们还发现UC-MSCs表达OCT4、Stella、Ifitm3等生殖系特异性标记物,提示其具有向生殖细胞分化的潜能,在体内可能具有卵巢损伤修复的作用[4]。故本研究拟通过小鼠卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)模型,观察UC-MSCs移植后在POF小鼠受损卵巢及其他组织中的分布与生长情况,探讨UC-MSCs在体内向生殖细胞分化及用于卵巢早衰治疗的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

脐带取自本科,产妇及家属均知情同意。重组携带绿色荧

[通信作者] 王凤英,电话:(023)68765903,E-mail:fyw018@163.com

光蛋白的腺病毒株(Ad-GFP)、人胚胎肾细胞系 HEK293 细胞均由西南医院骨科侯天勇博士惠赠,DMEM、胰蛋白酶购自 HyClone 公司,胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。BALB/c nu/nu 裸鼠 16 只,6 周龄,体质量 16~18 g,雌性,由第三军医大学实验动物中心提供,饲养条件:3 级动物饲养环境。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 按文献[4]分离培养并鉴定 UC-MSCs。HEK293 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液常规培养。

1.2.2 重组腺病毒扩增与纯化 重组腺病毒感染对数生长期的 HEK293 细胞,36~72 h 后,出现细胞完全溶解(cytopathic effect, CPE)时,收集细胞及上清液,置 -196 ℃、37 ℃各 5 min 冻融,重复 3 次。2 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,并用 0.22 μm 过滤器过滤。

1.2.3 腺病毒转染 UC-MSCs 当 UC-MSCs 生长至 90% 融合状态时,弃去培养基,PBS 清洗 2 次,以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100 的重组腺病毒感染细胞,24 h 后更换为常规培养基,荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞表达情况,计算细胞阳性感染率。

1.2.4 UC-MSCs 移植 干细胞移植前 1 d,按文献[5]给予小鼠环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA) 120 mg/kg 腹腔注射,白消安(busulfan, BUS) 12 mg/kg 皮内注射,建立 POF 模型。细胞移植组 14 只,每只小鼠经尾静脉注射 2×10^6~3×10^6 个绿色荧光蛋白(GFP)阳性的 UC-MSCs;对照组 2 只,给予 DMEM 0.5 ml 尾静脉注射。

1.2.5 小鼠卵巢及其他组织的组织学检查 在细胞移植后 1、10、20 d 各取小鼠 2、5、5 只,对照组于移植后 10 d 取材。断颈法处死小鼠,分别留取小鼠卵巢、肾脏、肝脏、胰腺及大脑等组织,用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定后进行连续冰冻切片,切片干燥后甘油封片,于激光共聚焦显微镜下观察各种组织 GFP 阳性细胞的聚集与生长情况。

2 结果

2.1 细胞转染效率

腺病毒转染 HEK293 细胞后 24 h,感染率达 99% 以上。UC-MSCs 转染腺病毒介导的 GFP 后 24 h,荧光显微镜下可见部分阳性细胞,48 h 后细胞感染率可达 95% 左右(图 1)。

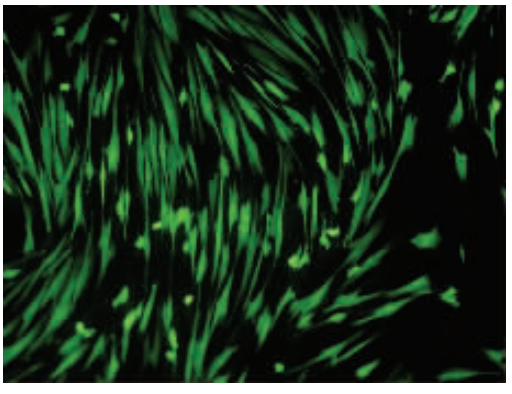


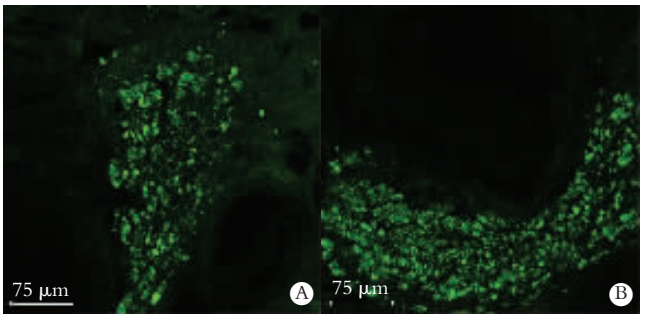
图 1 重组腺病毒转染后 UC-MSCs 表达的 GFP (荧光显微镜 ×100)

2.2 UC-MSCs 移植后小鼠一般情况

在接受 UC-MSCs 移植的 14 只小鼠中,2 只小鼠死亡(原因不明),其他小鼠在细胞移植后出现一过性精神萎靡、摄食差等变化,1 d 左右好转;对照组 2 只小鼠活动、摄食等一般情况正常。

2.3 UC-MSCs 在小鼠各组织的聚集及生长

UC-MSCs 移植后 1 d,移植组小鼠卵巢可见 GFP 阳性细胞,移植后 10、20 d,卵巢中 GFP 阳性细胞明显增多,呈散在分布或聚集成团(图 2A、B)。对照组小鼠卵巢未见任何 GFP 阳性细胞。但无论是移植后 10 d,还是 20 d,干细胞移植小鼠卵巢的结构及卵巢内各级卵母细胞数量、形态与对照组无明显差别。除卵巢组织外,在干细胞移植后 10 d 及 20 d,小鼠骨髓、肝脏、肾脏、大脑、胰腺等组织均未发现明显 GFP 阳性细胞。



A:UC-MSCs 移植 10 d;B:UC-MSCs 移植 20 d

图 2 UC-MSCs 移植后卵巢的组织学观察 (激光共聚焦显微镜)

3 讨论

POF 是指妇女 40 岁以前由于卵巢内卵泡耗竭或因医源性损伤而发生的卵巢功能衰竭,以雌激素缺乏、闭经及不育等为主要表现特征,严重影响妇女的生活质量。

目前,POF 还缺乏理想的治疗方法。干细胞治疗所取得的进展促使人们探索用干细胞移植治疗 POF 的可能性。研究表明,某些条件下,卵泡是可能再生的[6,7]。Johnson 等[1]给化疗后小鼠移植骨髓干细胞后,发现小鼠卵巢中形成了来源于供体的卵母细胞。其后又发现接受骨髓干细胞移植的 POF 小鼠的远期生殖能力也有所改善[8]。Liu 等[9]报道了 4 例经过大剂量化疗后诊断为 POF 的妇女接受干细胞移植后恢复了生育能力,并获得健康后代。这些研究结果提示移植的干细胞能够向卵巢定向迁移,移植后的干细胞要么可能在卵巢微环境条件下分化为卵母细胞,要么可能促进损伤卵巢的功能恢复。

骨髓干细胞及其他成体干细胞等已被证明具有向生殖细胞分化的潜能[1-3],但由于这些干细胞来源有限,并存在伦理、免疫排斥等诸多问题。故本研究采用一种新的成体干细胞——UC-MSCs 作为 POF 治疗的干细胞。我们通过化学药物处理建立小鼠 POF 动物模型,采用腺病毒介导 Ad-GFP 转染 UC-MSCs,将标记后的 UC-MSCs 移植到 POF 小鼠,结果发现 UC-MSCs

经尾静脉移植入受体鼠24 h后即可向卵巢组织迁移；细胞移植后10 d及20 d，卵巢中GFP阳性细胞增多，而其他组织内无GFP明显阳性细胞存在，表明UC-MSCs具有向卵巢归巢的能力。

UC-MSCs移植后最终定位于卵巢而在其他组织无明显分布的原因，我们分析可能与下列因素有关：第一，这些组织可能对CPA等化学药物的敏感性不同。卵巢组织对CPA非常敏感，临床上CPA化疗后15%～60%的患者可出现POF。在SD大鼠，20 mg/kg CPA腹腔单次注射即可引起卵巢组织学损害[10]。我们前期研究则表明，120 mg/kg腹腔单次注射处理可导致POF[5]。而以往的研究表明引起其他组织损伤所需的剂量和给药方式与本研究有所不同：有人给予大鼠CPA 150 mg/kg及200 mg/kg处理后，发现肝脏和肾脏组织结构无明显异常[11]。因此，本模型引起的损伤可能主要在卵巢，而卵巢组织的损伤可能引发细胞因子、趋化因子及其信号转导发生改变，形成与干细胞趋化密切相关的微环境，从而促进UC-MSCs向卵巢归巢。因为已有研究表明局部微环境可影响移植细胞的迁移、黏附、定植及长期存活与细胞分化[12]。第二，UC-MSCs自身特异性表达的细胞粘附分子与卵巢细胞因子相互作用，吸引和促进了移植细胞向卵巢的迁移。

在前期研究中我们已发现UC-MSCs表达OCT4、Stella、Ifitm3等生殖系特异性标记物[4]。本研究通过小鼠POF模型，发现UC-MSCs能在卵巢局部存活并生长，提示UC-MSCs在体内微环境作用下，存在向生殖细胞转化的潜能，但我们发现移植后卵巢内各级卵母细胞数量、形态与对照组无明显差别，也未发现GFP标记的卵母细胞生成，表明在本研究中移植后的干细胞尚未能衍生出明显的卵母细胞，其原因可能与观察时间的限制有关。UC-MSCs最终能否在体内微环境的诱导下衍生为卵母细胞，或是否能对卵巢其他细胞发挥支持作用而促进卵巢功能修复以及其作用机制等尚需进一步研究。

目前，干细胞移植途径多采用经血管移植和目的部位局部移植2种，两者之间细胞归巢率并无明显差异，但血管移植比局部移植方法简便。我们也曾尝试局部移植方式，但发现该方式可对POF卵巢造成追加损伤，故放弃。本研究表明尾静脉移植是卵巢干细胞移植的有效途径之一，这与以前报道一致[1]。但在细胞移植过程中应注意细胞浓度及细胞溶液总量的控制。

本研究采用BALB/c nu/nu裸鼠作为卵巢早衰的动物模型，在UC-MSCs移植前未采用免疫移植剂处理，移植后未发现免疫排斥反应，证实UC-MSCs的确免疫状态低下，不会引起宿主免疫排斥反应。这与其他研究结果[13,14]一致，进一步表明UC-MSCs来源丰富，免疫状态幼稚，是理想的干细胞来源。

干细胞向生殖细胞分化的研究尚处于起步阶段，UC-MSCs向生殖细胞分化的潜能，细胞移植的方式、部位与数量，移植后干细胞在体内的归巢、转归及对卵巢损伤修复的作用评价指标等均处于探索阶段。本研究仅初步表明了UC-MSCs能够向卵巢归巢，提示UC-MSCs在体内环境下可能具有卵巢损伤修复作用，值得进一步研究。

参考文献：

[1] Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, *et al*. Oocyte generation in Ad-ult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood[J]. Cell, 2005, 122(2): 303－315.

[2] Dyce P W, Wen L, Li J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(4): 384－390.

[3] Danner S, Kajahn J, Geismann C, *et al*. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(1): 11－20.

[4] 李彩霞，梁志清，王凤英，等. 脐带多能干细胞的分离与鉴定[J]. 免疫学杂志，2008，24(5)：583－587.

[5] 李彩霞，王凤英，李玉艳，等. 小鼠卵巢早衰动物模型的构建[J]. 第三军医大学学报，2008，30(6)：506－509.

[6] Johnson J, Canning J, Kaneko T, *et al*. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary[J]. Nature, 2004, 428(6979): 145－150.

[7] Bukovsky A, Caudle M R, Svetlikova M, *et al*. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in Ad-ult human ovaries[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 2: 20.

[8] Lee H J, Selesniemi K, Niikura 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]. J Clin Oncol, 2007, 25(22): 3198－3204.

[9] Liu J, Malhotra R, Voltarelli J, *et al*. Ovarian recovery after stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 41(3): 275－278.

[10] 高慧，杨涓，韩冰，等. 药物型卵巢早衰动物模型的研究[J]. 国医论坛，2007，22(3)：22－26.

[11] 王青秀，施畅，吴纯启，等. 地塞米松的诱导效应对环磷酰胺大鼠毒性的影响[J]. 中国新药杂志，2005，14(2)：162－166.

[12] Wollert K C, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart[J]. Circ Res, 2005, 96(2): 151－163.

[13] Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, *et al*. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys[J]. Stem Cells, 2007, 25(2): 319－331.

[14] Weiss M L, Medicetty S, Bledsoe A R, *et al*. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease[J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 781－792.

（**收稿**：2009-05-14；**修回**：2009-07-06）

（编辑　王　红）