基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003775

骨髓间充质干细胞修复IFN-γ诱导的卵巢颗粒细胞免疫损伤的研究

聂　佳[1]，马闻擎[2]，卓爱萍[1]，杨铭欣[1]，毛梦丽[1]，付霞霏[1]
（1.南方医科大学珠江医院妇产科，广州　510220；2.苏州大学附属第一医院妇产科，苏州　215006）

【摘　要】**目的**：探讨骨髓间充质干细胞对干扰素-γ（interferon gamma，IFN-γ）诱导的卵巢颗粒细胞免疫损伤的修复作用。**方法**：构建IFN-γ诱导的卵巢颗粒细胞免疫损伤模型，将建模后的人卵巢颗粒细胞（human ovary granulosa cell line，KGN）与人骨髓间充质干细胞（human bone mesenchymal stem cells，hBMSC）共培养，分为3组：NC组，IFN-γ组和BMSC组。共培养结束后连续进行3 d的CCK-8实验检测细胞增殖情况，使用Annexin V-FITC和CytoFLEX流式细胞仪检测细胞凋亡情况，检测雌二醇水平和芳香化酶细胞色素P450家族19亚家族A成员1（cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1，CYP19A1）、卵泡刺激素受体（follicle-stimulating hormone receptor，FSH receptor，FSHR）mRNA表达水平以评估激素合成能力，检测乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）水平，NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）、半胱天冬酶1（caspase-1，CASP1）和白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）的mRNA表达及NLRP3、CASP1、焦孔素（gasdermin-D，GSDMD）的蛋白表达水平以评估细胞焦亡。**结果**：IFN-γ组和BMSC组24 h、48 h、72 h的颗粒细胞增殖率均低于NC组，且IFN-γ组低于BMSC组（$P<0.001$）。INF-γ组和BMSC组颗粒细胞凋亡数量高于NC组，且INF-γ组高于BMSC组（$P<0.001$）。INF-γ组和BMSC组雌二醇水平低于NC组，且INF-γ组低于BMSC组（$P<0.001$）。与IFN-γ组相比，BMSC组的CYP19A1及FSHR mRNA的表达下降（$P<0.001$）。与IFN-γ组相比，BMSC组LDH水平降低，NLRP3和CASP1的mRNA表达水平降低，caspase-1的蛋白表达水平降低，差异均有统计学意义。**结论**：hBMSC对IFN-γ诱导的KGN细胞免疫损伤有修复作用，具有恢复细胞增殖、抑制细胞凋亡、修复内分泌功能和减少细胞焦亡的作用。

【关键词】骨髓间充质干细胞；免疫；修复；干扰素-γ；早发性卵巢功能不全
【中图分类号】R711.75　　【文献标志码】A

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells in repairing IFN-γ-induced ovarian granulosa cell immune injury

Nie Jia[1]，*Ma Wenqing*[2]，*Zhuo Aiping*[1]，*Yang Mingxin*[1]，*Mao Mengli*[1]，*Fu Xiafei*[1]
（*1. Department of Obstetrics and Gynecology，Zhujiang Hospital of Southern Medical University；*
2. Department of Obstetrics and Gynecology，the First Affiliated Hospital of Soochow University）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the repair effect of bone marrow mesenchymal stem cells（BMSCs）on interferon gamma（IFN-γ）induced ovarian granulosa cell immune injury. ***Methods***：A model of IFN-γ-induced ovarian granulosa cell immune injury was established. KGN cells after modeling were co-cultured with human BMSCs（hBMSCs）and divided into three groups：negative control（NC）group，IFN-γ group，and BMSC group. After co-culture，cell proliferation was determined by a cell counting kit 8 assay for 3 consecutive days. Cell apoptosis was determined using an Annexin V-FITC apoptosis detection kit and a CytoFLEX flow cytometer. The estradiol level and the mRNA expression levels of aromatase CYP19A1 and FSHR were measured to evaluate the hormone synthesis ability. The level of lactate dehydrogenase（LDH），mRNA expression levels of NLRP3，caspase-1（CASP1），and interleukin-1β，and protein expression levels of NLRP3，CASP1，and gasdermin-D were determined to evaluate cell pyroptosis. ***Results***：The proliferation rate of granulosa cells in the IFN-γ group and the BMSC group was lower than that in the NC group at 24 h，48 h and 72 h，and that in the IFN-γ group was lower than that in the BMSC group（$P<0.001$）. The number of apoptotic granulosa cells in the INF-γ group and the BMSC group was higher than that in the NC group，and that in the INF-γ group was higher than that in the BMSC group（$P<0.001$）. The estradiol level in the INF-γ group and the BMSC group was lower than that in the NC group，and that in the INF-γ group was lower than that in the BMSC group（$P<0.001$）. Compared with the IFN-γ group，the mRNA expression of CYP19A1 and FSHR in the BMSC group decreased（$P<0.001$）. Compared with the IFN-γ group，the BMSC group had significantly decreased LDH level，mRNA expression levels of NLRP3 and CASP1，and protein expression level of CASP1. ***Conclusion***：hBMSCs repair the immune in-

作者介绍：聂　佳，Email：nie_542@163.com，
研究方向：妇科内分泌。
通信作者：付霞霏，Email：fxf1997@smu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82271657）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250224.1607.010（2025-02-25）

jury of KGN cells induced by IFN-γ by restoring cell proliferation, inhibiting cell apoptosis, repairing endocrine function, and reducing pyroptosis.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cell; immune; repair; interferon gamma; premature ovarian insufficiency

早发性卵巢功能不全（premature ovarian insufficiency，POI）定义为女性在40岁以前出现卵巢功能减退，主要表现为月经稀发或停经至少4个月，卵泡刺激素（follicle stimulating hormone，FSH）>25 U/L、雌激素水平波动性下降[1]，影响全球约1%的妇女[2]。目前大多数POI患者的发病原因仍不能完全明确，主要有：遗传性、免疫性、代谢、感染、手术及放化疗的医源性因素等，其中免疫性POI约占POI病例总数的4%~30%[3-4]。目前的治疗方法主要为激素补充治疗（hormone replacement therapy，HRT）和免疫抑制治疗，以及冻卵、辅助生殖等生育力保护措施，但现有的这些疗法无法逆转卵巢功能，目前尚无有效的病因疗法。研究表明，干扰素-γ（interferon gamma，IFN-γ）能够在体外诱导颗粒细胞主要组织相容性复合体Ⅱ类（major histocompatibility complex class Ⅱ，MHC-Ⅱ）抗原的高表达，而在自身免疫性卵巢早衰（premature ovarian failure，POF）患者的卵巢组织中，颗粒细胞表面MHC-Ⅱ抗原高表达，可能引发免疫异常[5]。间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）是来源于中胚层的成体干细胞，在各种疾病中被广泛研究[6]。目前已有一些将各类MSCs应用于治疗POI或POF的研究，均提示对卵巢功能存在一定修复作用[7]。本课题组前期研究也表明骨髓间充质干细胞（bone mesenchymal stem cells，BMSCs）对化疗性POI大鼠的卵巢功能具有修复作用[8]。在临床工作中，本研究发现免疫性POI患者比化疗性POI患者常见，但使用干细胞治疗免疫性POI的研究相对缺乏。颗粒细胞是卵巢的基础功能单位，能传递信息、营养，提供重要的支持与保护作用，其异常增殖、分化、凋亡直接影响卵母细胞发育，引起卵泡闭锁加快，从而造成POI[9]。因此，本研究试图探讨BMSCs对IFN-γ诱导的卵巢颗粒细胞免疫损伤是否具有修复作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人卵巢颗粒细胞（human ovary granulosa cell line，KGN）细胞株购自广州一科生物科技有限公司；本实验研究间充质干细胞共培养所采用的人骨髓间充质干细胞（human bone mesenchymal stem cells，hBMSC）细胞株，来自南方医科大学珠江医院再生研究所的慷慨馈赠，初始代数第3代。

1.2 主要试剂与仪器

本研究使用主要试剂如下：DMEM-F12培养基、胎牛血清（FBS）及青霉素-链霉素双抗溶液（Gibco）；0.25%胰蛋白酶消化液、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE上样缓冲液、BeyoECL Plus超敏化学发光底物（碧云天）；干扰素-γ（IFN-γ，Biovision）；睾酮（Meryer）；注射用尿促性素（丽珠制药）；细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）细胞增殖检测试剂（Apexbio）；TRIzol总RNA提取试剂（康为世纪）；HRP标记山羊抗兔IgG二抗（康为世纪）；AG RNAex Pro RNA提取试剂、Evo M-MLV反转录试剂盒及SYBR Green Pro Taq HS qPCR预混试剂（艾科瑞）；RIPA裂解液（凯基）；磷酸酶抑制剂与蛋白酶抑制剂PMSF（白鲨）。

主要仪器包括：流式细胞仪（Beckman Coulter）；紫外分光光度计与普通PCR仪（Thermo Fisher）；实时荧光定量PCR系统、化学发光成像仪（Bio-Rad）；垂直电泳槽及转印系统（韦克斯科技）。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 KGN细胞及hBMSC细胞，均按照细胞株标准培养方法，在含有10%胎牛血清和1%双抗（青霉素-链霉素）的DMEM/F12培养基中培养。细胞培养环境为37 ℃含5% CO_2的潮湿孵箱。使用transwell培养皿进行间接共培养，即通过transwell将培养载体分为上下2个小室，下层接种KGN细胞，上层即transwell培养皿的滤膜上接种hBMSCs细胞。2种细胞以1∶1细胞数量的比例，共培养24 h。

1.3.2 实验建模与分组 本实验采用IFN-γ 50 ng/mL诱导KGN细胞产生免疫损伤，构建免疫性POI细胞模型。将KGN细胞提前12~24 h铺板，细胞充分贴壁后更换新鲜培养基，加入50 ng/mL IFN-γ，培养24 h后更换培养基，换出药物后继续培养48 h，显微镜下观察到KGN细胞形态由纺锤形变为扁平的不规则形状，细胞碎片增多，与对照组相比异常细胞达到50%即为建模完成。

实验共设3组，采用随机分组，分别为对照组（negative control，NC组），模型组（interferon-γ，IFN-γ组），共培养治疗组（bone mesenchymal stem cells，BMSC组）。对照组为KGN细胞常规培养；模型组为建模完成的已产生免疫损伤的KGN细胞；共培养治疗组处理为hBMSC细胞与免疫损伤的KGN细胞按1:1的比例间接共培养24 h。

1.3.3 CCK8法检测细胞增殖 在共培养结束后连续进行3 d的CCK-8实验（检测时机分别为加入transwell后的24、48、72 h）。每次检测前更换单纯培养基500 μL/孔，在每孔中加入50 μL CCK-8溶液，37 ℃培养4 h后，将含有CCK-8溶液的培养液转入100 μL/孔的96孔板，用酶标仪对各孔在波长450 nm处吸光度值进行检测。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 使用Annexin V-FITC细

胞凋亡检测试剂盒和CytoFLEX流式细胞仪检测细胞凋亡情况。检测时间分别为加入transwell后的24、48、72 h，收集细胞培养液，使用Annexin V-FITC和碘化丙啶染色处理，室温下避光孵育10~20 min。随后置于冰浴，在1 h内进行流式检测。

1.3.5 化学发光分析仪及实时定量聚合酶链反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）法检测激素合成能力 激素合成能力检测项目是雌二醇水平和芳香化酶细胞色素P_{450}家族19亚家族A成员1（cytochrome P_{450} family 19 subfamily A member 1，CYP19A1）、卵泡刺激素受体（follicle-stimulating hormone receptor，FSH receptor，FSHR）的mRNA表达水平。在建模过程中加入激素合成底物，使用睾酮及尿促性素（human menopausal gonadotropin，hMG）作为合成雌二醇的底物，具体浓度为：睾酮5~10 mol/L+hMG 500 mIU/mL。将KGN细胞提前12~24 h铺板，细胞充分贴壁后加入50 ng/mL IFN-γ，培养24 h后更换培养基，加入底物继续培养，在共培养结束当天收集培养基用于检测。

雌二醇水平的检测，委托南方医科大学珠江医院检验科进行，使用仪器为I1000化学发光分析仪。芳香化酶CYP19A1及FSHR的mRNA表达水平使用RT-qPCR法检测。使用TRIzon试剂提取细胞总RNA；取1 μg RNA逆转录为cDNA，使用SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR试剂盒和Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪进行qPCR分析。所有样本都重复检测3次，为了量化mRNA的相对表达量，将数据标准化为GAPDH的表达水平。RT-qPCR引物序列如表1所示。

表1 RT-qPCR引物序列

引物名称	引物序列（5'~3'）
CYP19A1	F：GAGGTGACCAATGAATCGGGCTATG
	R：CAAGAAGAGCGTGTTAGAGGTGTCC
FSHR	F：GTGGTCATCTGTGGCTGCTATATCC
	R：TGGCGATCCTGGTGTCACTAGAG
GAPDH	F：GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA
	R：GCCCCTCCTGTTATTATGG
NLRP3	F：GCCCAAGGAGGAAGAGGAGGAG
	R：GCTTCTGGTTGCTGCTGAGGAC
CASP1	F：ATGGACAAGTCAAGCCGCACAC
	R：TCCCACAAATGCCTTCCCGAATAC
IL-1β	F：GCGGCATCCAGCTACGAATCTC
	R：CGGAGCGTGCAGTTCAGTGATC

1.3.6 RT-qPCR法及Western blot法检测细胞焦亡分子 细胞焦亡的检测项目包括乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）水平，经典焦亡通路关键分子NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）、半胱天冬酶1（caspase-1，CASP1）和白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）的mRNA表达及NLRP3、CASP1、焦孔素（gasdermin-D，GSDMD）3个关键分子的蛋白表达水平。在共培养结束当天收集培养基用于检测。

LDH的检测，委托南方医科大学珠江医院检验科进行，采用IFCC试剂盒法。

NLRP3、CASP1和IL-1β的mRNA表达水平使用RT-qPCR法检测。RT-qPCR法检测方法同激素合成能力中芳香化酶CYP19A1及FSHR的mRNA表达水平的检测。

使用Western blot法检测NLRP3、CASP1、GSDMD3个关键分子的蛋白表达水平。收集细胞，使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解细胞。用SDS-PAGE蛋白上样缓冲液分离总量为20 μg的蛋白提取物，电泳后转移到PVDF膜上，置入封闭液中孵育1.5 h，加入一抗（Abmart、proteintech、Affinity、Bioworld稀释比例分别为1∶1 000、1∶3 000、1∶1 000、1∶8 000）后4 ℃孵育过夜。用TBST洗脱液洗涤3次后，加山羊抗兔IgG（稀释比例为1∶8 000）孵育1.5~2 h。采用超敏ECL化学发光试剂盒BeyoECL Plus检测免疫反应性蛋白条带。采用Image J软件分析，记录每条蛋白电泳带的灰度值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 27.0软件和GraphPad Prism 10.1软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组样本采用单因素方差分析、LSD分析，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 各组颗粒细胞增殖情况

成功建模后，与hBMSC细胞共培养24 h，检测各组的后续增殖情况。对每个时间点进行单因素方差分析，结果显示：每个时间点的3组增殖情况差异均有统计学意义（24 h，F=344.5，P=0.001；48 h，F=70.68，P<0.001；72 h，F=193.9，P<0.001）。通过增殖曲线观察到：每个时间点的BMSC组的OD_{450}值均高于IFN-γ组，差异有统计学意义（24 h，P<0.001；48 h，P=0.012；72 h，P<0.001）（图1）。提示hBMSC与细胞模型的间接共培养，使受到IFN-γ诱导免疫损伤的颗粒细胞的增殖率得到回升，从而在细胞增殖方面具有一定修复作用。

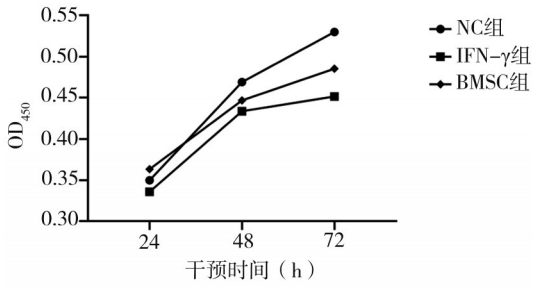


图1 各组KGN细胞增殖情况

2.2 各组颗粒细胞凋亡情况

对各时间点细胞凋亡率水平的统计分析结果显示：3组间的凋亡率在各个时间点差异均有统计学意义（24 h，F=137.3，P<0.001；48 h，F=261.4，P<0.001；72 h，F=138.1，P<0.001）。与IFN-γ组相比，BMSC组的凋亡率均降低（24 h，P=0.003；48 h，P<0.001；72 h，P<0.001），说明BMSC组能够一定程度上降低KGN细胞的凋亡率，说明在凋亡方面与hBMSC细胞间接共培养能够对细胞模型有一定治疗修复作用（图2）。

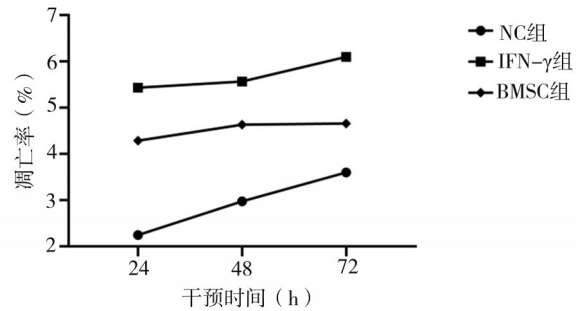


图2　各组KGN细胞凋亡情况

2.3　各组颗粒细胞激素合成能力比较

3组的雌二醇水平结果显示：与NC组相比，BMSC组的雌二醇水平降低，但差异无统计学意义（P=0.248）；而相比于IFN-γ组，BMSC组的雌二醇水平升高（P<0.001），说明hBMSC细胞一定程度上能够修复受损的KGN细胞的激素合成能力（图3）。mRNA表达的统计结果显示：CYP19A1 mRNA，F=27.724，P=0.001；FSHR mRNA，F=39.848，P<0.001，差异均有统计学意义（表2）。说明对于IFN-γ诱导的模型组CYP18A1及FSHR mRNA的表达上调，BMSC组均可对这种上调作用进行一定程度的恢复。

2.4　各组颗粒细胞焦亡情况比较

LDH水平（图4A）检测的统计结果显示：F=27.693，P=0.001；其中BMSC组LDH水平低于IFN-γ组（P=0.001），说明hBMSC细胞共培养能够降低培养基中的LDH水平。mRNA水平上（图4B），NLRP3和CASP1能够使IFN-γ组中二者升高的表达水平得到恢复，表现出hBMSC细胞共培养的治疗作用，而IL-1β mRNA的表达水平差异无统计学意义（P=0.214）。蛋白水平上（图4C、4D），caspase-1的蛋白表达在3组间差异有统计学意义（F=100.142，P<0.001）；BMSC组的caspase-1表达量明显低于IFN-γ组（P<0.001）。NLRP3蛋白和GSDMD蛋白表达在3组间差异无统计学意义。上述结果表明间接共培养的hBMSC细胞能够抑制IFN-γ诱导的KGN中细胞焦亡的发生。

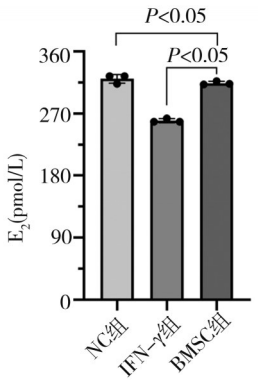
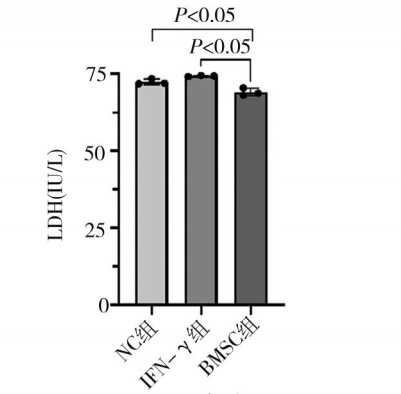


图3　各组KGN细胞雌二醇水平

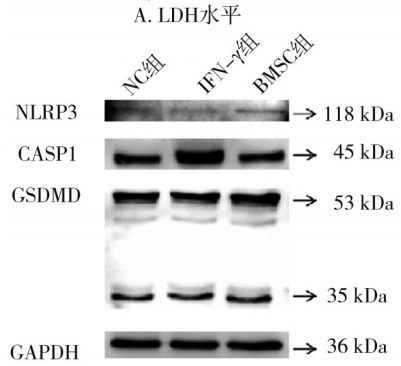
表2　CYP19A1和FSHR的mRNA表达水平

变量	NC组	IFN-γ组	BMSC组	F值	P值
CYP19A1	1.00 ± 0.12[a]	3.92 ± 0.91	1.20 ± 0.14[a]	27.724	0.001
FSHR	1.07 ± 0.48[a]	4.13 ± 0.39	0.84 ± 0.62[a]	39.848	<0.001

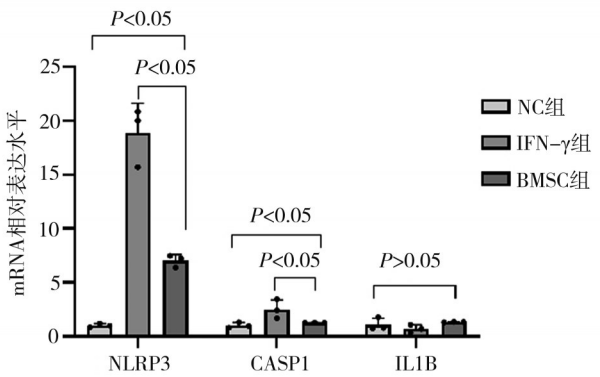
注：a，与IFN-γ组比较，P<0.05



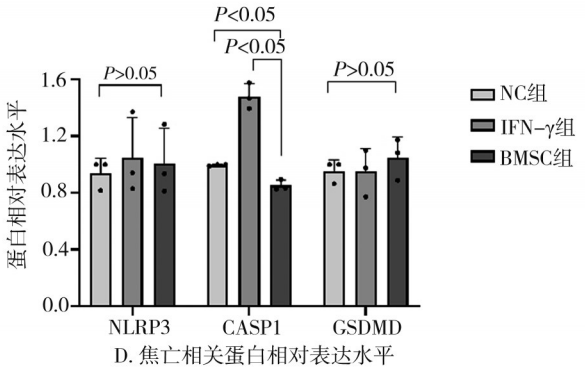
A. LDH水平



C. 经典焦亡通路分子的蛋白表达水平



B. 经典焦亡通路分子的mRNA相对表达水平



D. 焦亡相关蛋白相对表达水平

图4　各组KGN细胞焦亡情况

3 讨 论

POI的致病因素较多，近年来发病率逐年升高且发病年龄逐渐年轻化[10]。POI的病因和发病机制尚不明确，自身免疫是一个重要原因，但目前尚无有效的恢复卵巢功能的治疗方法。干细胞具有自我复制和多向分化潜能，其分泌的细胞因子具有免疫调节、修复损伤组织等功能[11]，因其具有恢复卵巢生殖内分泌功能的潜力而成为近年来的研究热点。MSCs是一种来源于中胚叶的多能干细胞，由于其具有多向分化、免疫调节和创伤修复等多方面的功能，而被广泛应用于各种组织修复、生物材料方面的研究中[12-13]。BMSCs是来源于骨髓的一种间充质干细胞。有研究表明，BMSCs能够有效修复化疗性的卵巢损伤[14]，BMSCs移植可使化疗性POF小鼠动情周期紊乱情况缓解、性激素和抗苗勒管激素（anti-Müllerian hormone，AMH）水平升高、卵泡数量升高。研究发现，人脐带间充质干细胞及人胎盘间充质干细胞可以通过调节T辅助细胞1/T辅助细胞2（T helper 1 cell/T helper 2 cell，Th1/Th2）、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）和IFN-γ等细胞因子比例及自然杀伤细胞的数量来恢复免疫性POI小鼠的卵巢功能[15-16]。关于骨髓间充质干细胞治疗免疫性POI的体外研究暂未见文献报道，本研究旨在研究hBMSC对IFN-γ诱导的KGN细胞免疫损伤的修复治疗作用。

IFN-γ是一种重要的免疫应答刺激细胞因子，具有调节抗原传递，促进炎症和趋化信号，激活和应答白细胞以及抗增殖和抗血管生成作用[17]。临床研究表明，POI患者血清IFN-γ水平升高。有研究结果表明在原代培养的卵巢颗粒细胞中，IFN-γ能够上调Fas，进而诱导卵巢颗粒细胞发生凋亡[18-19]。本研究使用IFN-γ诱导卵巢颗粒细胞发生免疫损伤，建立免疫性POI体外细胞模型，在细胞增殖、凋亡、内分泌功能、炎症发生等方面能模拟免疫性POI中颗粒细胞的状态。由于免疫性POI的具体机制不明，大多合并自身免疫性疾病，体外模型在模拟免疫性POI患者体内不同组织和器官之间的相互作用，以及模拟免疫细胞和细胞因子在卵巢局部免疫微环境中的作用方面存在一定的局限性，后续需要进一步通过动物实验以及临床观察更准确地评估骨髓间充质干细胞在免疫性POI患者体内的实际情况。

相关研究发现，BMSCs可以通过增强组织再生、结构修复、卵泡生成、刺激卵巢内分泌功能来修复受损的卵巢功能和结构[20]。hBMSC可诱导原始卵泡发育和更高级别的窦卵泡形成，调节卵泡膜细胞和颗粒细胞的DNA复制，抑制化疗所致卵巢颗粒细胞凋亡，促进细胞增殖，改善卵巢内分泌功能，恢复部分卵巢功能[14,21]。使用人骨髓间充质干细胞条件培养基（human bone mesenchymal stem cells-conditioned medium，hBMSC-CM）体外培养滤泡膜细胞、颗粒细胞和卵母细胞的实验表明，hBMSC-CM可以有效调节活性氧增加自由基，刺激滤泡膜和颗粒细胞的增殖，改善卵母细胞的功能[22-23]。Khanmohammadi N等[24]发现使用hBMSCs的条件培养基浓缩液与hBMSCs具有相似的治疗效果，Liu JB等[25]将BMSCs经尾静脉注入化疗诱导POF小鼠，发现受损卵巢髓质的血管周围有部分移植细胞迁移，说明hBMSCs通过旁分泌途径分泌相关细胞因子改善卵巢间质微环境，促进组织修复和卵泡发育。

本研究结果证实：hBMSC能够在细胞增殖、凋亡、内分泌功能、细胞焦亡方面较为全面的修复IFN-γ诱导的KGN细胞免疫损伤。细胞增殖与凋亡实验中，BMSC组与IFN-γ组相比，发生免疫损伤的KGN细胞的增殖率得到回升，说明hBMSC对发生免疫损伤的KGN细胞的增殖存在修复作用；BMSC组凋亡率升高幅度小于IFN-γ组，提示hBMSC对于KGN细胞具有抗凋亡作用。hBMSC能够使免疫损伤的KGN细胞分泌的E_2水平升高，CYP19A1 mRNA及FSHR mRNA的表达水平回落，说明hBMSC的修复作用在KGN细胞的内分泌功能恢复上也有所体现。细胞焦亡方面结果显示，与IFN-γ组相比，BMSC组LDH水平，NLRP3 mRNA表达水平和CASP1的mRNA及蛋白表达水平下降，说明hBMSC能够使免疫损伤的KGN细胞焦亡通路被激活的程度下降。NLRP3炎症小体的组装、GSDMD蛋白的释放反应经典焦亡途径的效应发挥阶段是否被激活，而本研究中发现NLRP3和GSDMD蛋白差异无统计学意义，说明可能hBMSC的修复治疗作用主要在细胞焦亡的准备阶段（即NLRP3及各种caspase家族成员进行mRNA合成、积累的阶段）发挥效应，而非细胞焦亡的激活阶段。

综上所述，本研究证明了hBMSC对IFN-γ诱导的KGN细胞免疫损伤有恢复细胞增殖、抑制细胞凋亡、修复内分泌功能和减少细胞焦亡的作用，从而说明了骨髓间充质干细胞在体外能够对免疫性POI起到一定修复治疗作用。

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临床诊疗专家共识（2023 版）[J]. 中华妇产科杂志，2023，58（10）：721-728.
Menopause Group，Society of Obstetrics and Gynecology，Chinese Medical Association. Consensus of clinical diagnosis and treatment of premature ovarian insufficiency（2023）[J]. Chin J Obstet Gynecol，2023，58（10）：721-728.

[2] Gao HN，Gao LY，Wang WJ. Advances in the cellular immunological pathogenesis and related treatment of primary ovarian insufficiency [J]. Am J Reprod Immunol，2022，88（5）：e13622.

[3] Szeliga A，Calik-Ksepka A，Maciejewska-Jeske M，et al. Autoimmune diseases in patients with premature ovarian insufficiency-our current state of knowledge[J]. Int J Mol Sci，2021，22（5）：2594.

[4] Kirshenbaum M，Orvieto R. Premature ovarian insufficiency（POI）and autoimmunity-an update appraisal[J]. J Assist Reprod Genet，2019，36（11）：2207-2215.

[5] Hill JA，Welch WR，Faris HM，et al. Induction of class II major histocompatibility complex antigen expression in human granulosa cells by interferon gamma：a potential mechanism contributing to autoimmune ovarian failure[J]. Am J Obstet Gynecol，1990，162（2）：534-540.

[6] Forte D，García-Fernández M，Sánchez-Aguilera A，et al. Bone marrow mesenchymal stem cells support acute myeloid leukemia bioenergetics and enhance antioxidant defense and escape from chemotherapy [J]. Cell Metab，2020，32（5）：829-843.

[7] Na J，Kim GJ. Recent trends in stem cell therapy for premature ovarian insufficiency and its therapeutic potential：a review[J]. J Ovarian Res，2020，13（1）：74.

[8] 付霞霏，何援利，王雪峰，等. 骨髓间充质干细胞移植修复化疗所致卵巢损伤的实验研究[J]. 现代妇产科进展，2010，19（6）：410-414.
Fu XF，He YL，Wang XF，et al. *In vivo* effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation on ovarian recovery from chemotherapy-induced damage[J]. Prog Obstet Gynecol，2010，19（6）：410-414.

[9] Alam MH，Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells *in vitro*[J]. Reprod Med Biol，2019，19（1）：13-23.

[10] Sharif K，Watad A，Bridgewood C，et al. Insights into the autoimmune aspect of premature ovarian insufficiency[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab，2019，33（6）：101323.

[11] Ross CL，Ang DC，Almeida-Porada G. Targeting mesenchymal stromal cells/pericytes（MSCs）with pulsed electromagnetic field（PEMF）has the potential to treat rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol，2019，10：266.

[12] Zhao L，Chen SQ，Yang PX，et al. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation：prevention and treatment of graft-versus-host disease[J]. Stem Cell Res Ther，2019，10（1）：182.

[13] Chen YD，Yu Q，Hu YF，et al. Current research and use of mesenchymal stem cells in the therapy of autoimmune diseases[J]. Curr Stem Cell Res Ther，2019，14（7）：579-582.

[14] El-Derany MO，Said RS，El-Demerdash E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reverse radiotherapy-induced premature ovarian failure：emphasis on signal integration of TGF-β，wnt/β-catenin and hippo pathways[J]. Stem Cell Rev Rep，2021，17（4）：1429-1445.

[15] Lu XY，Cui JJ，Cui LL，et al. The effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation on endometrial receptivity are associated with Th1/Th2 balance change and uNK cell expression of uterine in autoimmune premature ovarian failure mice[J]. Stem Cell Res Ther，2019，10（1）：214.

[16] Yin N，Zhao W，Luo QQ，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（7）：1073-1082.

[17] Han JS，Wu MW，Liu ZW. Dysregulation in IFN-γ signaling and response：the barricade to tumor immunotherapy[J]. Front Immunol，2023，14：1190333.

[18] Stringer JM，Alesi LR，Winship AL，et al. Beyond apoptosis：evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life[J]. Hum Reprod Update，2023，29（4）：434-456.

[19] Chesnokov MS，Mamedova AR，Zhivotovsky B，et al. A matter of new life and cell death：programmed cell death in the mammalian ovary [J]. J Biomed Sci，2024，31（1）：31.

[20] Tork S，Sharifi ZN，Movassaghi S，et al. Evaluation of the effects of human bone marrow mesenchymal stem cells conditioned medium on growth and maturation of mouse ovarian follicle after vitrification[J]. Cells Tissues Organs，2022，211（5）：565-576.

[21] Abdullah Alqahtani N，Chandramoorthy HC，Shaik S，et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells（BMMSCs）augment osteointegration of dental implants in type 1 diabetic rabbits：an X-ray micro-computed tomographic evaluation[J]. Medicina（Kaunas），2020，56（4）：148.

[22] Jafarzadeh H，Nazarian H，Ghaffari Novin M，et al. Improvement of oocyte *in vitro* maturation from mice with polycystic ovary syndrome by human mesenchymal stromal cell-conditioned media[J]. J Cell Biochem，2018，119（12）：10365-10375.

[23] Amini MA，Karimi J，Khodadadi I，et al. Overexpression of ROMO1 and OMA1 are potentially biomarkers and predict unfavorable prognosis in gastric cancer[J]. J Gastrointest Cancer，2020，51（3）：939-946.

[24] Khanmohammadi N，Sameni HR，Mohammadi M，et al. Effect of transplantation of bone marrow stromal cell- conditioned medium on ovarian function，morphology and cell death in cyclophosphamide-treated rats[J]. Cell J，2018，20（1）：10-18.

[25] Liu JB，Zhang HY，Zhang Y，et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats[J]. Mol Cells，2014，37（12）：865-872.

（收稿：2024-08-04；修回：2024-12-03；录用：2024-12-16）
（责任编辑：周一青）

本文引用格式：
聂 佳，马闻擎，卓爱萍，等. 骨髓间充质干细胞修复 IFN-γ 诱导的卵巢颗粒细胞免疫损伤的研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50（11）：1525-1530.