

reverse transcription-polymerase chain reaction; the expressions of IL-12 and SOD protein in ovarian tissues were detected by Western blot. **Results** The expressions of IL-12 mRNA and protein in ovarian tissues of mice in the model group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$); the expressions of IL-12 mRNA and protein in ovarian tissues of mice in the stem cell group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). The expressions of SOD mRNA and protein in ovarian tissues of mice in the model group and stem cell group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$); the expressions of SOD mRNA and protein in ovarian tissues of mice in the stem cell group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** UC-MSC transplantation can reduce the expression of IL-12, increase the expression of SOD, inhibit inflammation and improve oxidative stress injury in ovarian tissue of mice with ischemia reperfusion injury, which is beneficial to the recovery of damaged ovarian function.

Key words: ovarian; ischemia reperfusion injury; human umbilical cord mesenchymal stem cells; superoxide dismutase; interleukin-12

卵巢扭转为女性常见急症,多由于剧烈运动后及肿瘤压迫、肠扭转、肠套叠、嵌顿疝时肠系膜静脉和动脉受压等所致,如处理不及时可出现卵巢梗死或卵巢破裂,恢复血液供应是最为有效的治疗方法^[1-2]。发生扭转的卵巢恢复正常解剖位置后血液供应得到恢复,卵巢组织损伤反而较单纯缺血阶段更为严重,即出现卵巢组织缺血再灌注损伤,其多由免疫微环境紊乱、炎症反应、氧化应激、自由基增多等因素引起,临床上尚无特效药物和效果好的处理手段^[3-5]。近年来,部分干细胞技术应用于临床,取得了较好的治疗效果^[6-8]。间充质干细胞(matrix stem cells, MSC)在免疫系统疾病及组织再生领域不断显示出其优势,其治疗效用的维持依赖于细胞替代及“伪旁观者效应”2种机制^[9]。本研究选用脐带间充质干细胞(umbilical cord-matrix stem cell, UC-MSC)对卵巢扭转小鼠进行干预治疗,探讨其对缺血再灌注损伤卵巢炎症反应及氧化应激损伤的影响,为卵巢缺血再灌注损伤提供新的治疗手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 无特定病原体级 C57BL/6N^{Cr} 雌性小鼠 30 只,体质量 18 ~ 23 g,购自华阜康生物科技股份有限公司(北京),品系编码:213。将小鼠随机分为假手术组、模型组和干细胞组,每组 10 只。各组小鼠于 18.5 ~ 21.5 °C、湿度 38.8% ~ 43.5% 环境分笼喂养,给予充足的洁净饮水和食物,每日日光照射时间为 12 h。

1.2 主要试剂与仪器 UltraCULYURETM 培养基(美国 Lonza 公司),白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)多克隆抗体(美国 Sigma 公司),胎牛血清、过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)多克隆抗体(美国 Gibco 公司),CD90、CD73、CD105 流式抗体(美国 BD 公司),RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)仪(美国 MJ Research 公司),Western blotting 电泳仪、Western blotting 电转仪(美国 Bio-Rad 公司),CX23

生物显微镜(日本 Olympus 公司),生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 UC-MSC 分离与扩增 脐带来源于本院产妇,均经产妇本人及家属知情同意,并签订相关的医疗文书及脐带使用知情同意书。将洁净脐带去除血液和表皮组织,剥离脐带内的 2 条动脉及 1 条静脉,剩余组织为华通胶,将华通胶剪切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的组织块,加入培养基,置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱进行培养,第 7 天可见有 UC-MSC 自华通胶内爬出,第 10 天细胞长满培养瓶底部,按照 1 传 5 的比例进行传代扩增,然后按照 1 传 2 的比例进行扩增,选取第 3 代细胞用于本研究。质量控制标准为 CD73、CD90、CD105 阳性细胞数 > 95%, CD34 阳性细胞数 < 3%, 细胞活力 ≥ 95%, 病原菌排查未检出细菌。

1.4 小鼠卵巢缺血再灌注模型制备及各组干预措施

各组小鼠仰卧位固定于手术操作台上,给予 100 g · L⁻¹ 水合氯醛(0.004 mL · g⁻¹)麻醉,切下腹部皮肤、肌肉,暴露卵巢组织;其中假手术组小鼠仅在卵巢动脉下穿线,不阻断卵巢动脉的血流供应;模型组与干细胞组小鼠阻断卵巢动脉血液供应 30 min,而后剪断卵巢动脉的结扎线,恢复卵巢血液供应。干细胞组小鼠于恢复卵巢血液供应后 24 h 后经尾静脉注射 1.0 × 10⁶ 个 UC-MSC,假手术组、模型组小鼠均于同时间点尾静脉注射相同体积的生理盐水;各组小鼠均于尾静脉注射 72 h 后采用安乐死方法处死,取手术侧卵巢组织标本待检。

1.5 实时定量 PCR 检测各组小鼠卵巢组织中 IL-12 和 SOD mRNA 表达 应用 TRIzol 试剂提取各组小鼠手术侧卵巢组织总 RNA,根据试剂盒说明反转录合成 cDNA。IL-12 引物序列:上游引物序列为 5'-TTTCTAGATGCTGGCCAATACA-3',下游引物序列为 5'-ATCTCGGTGGACCAAATTCC-3'。SOD 引物序列:上游引物序列为 5'-AGCGTGACTTTGGGTCTTT-3',下游引物序列为 5'-GCGACCTTGCTCCTTATTG-3'。β-actin 引物序列:上游引物序列为 5'-GTGTGGATTGGTGGCTCTATC-3',下游引物序列为

5'-CAGTCCGCCTAGAAGCATTT-3'。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 29 个循环;72 ℃ 再延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用快速凝胶成像系统拍摄电泳图谱条带,利用图像分析软件分析条带灰度值。

1.6 Western blot 法检测各组小鼠卵巢组织中 IL-12 和 SOD 蛋白表达 取各组小鼠手术侧卵巢组织 100 mg,加入 1 mL 蛋白磷酸酶细胞裂解液(4 g · L⁻¹),液氮研磨,4 ℃、12 000 r · min⁻¹、离心半径 15 cm 条件下离心 20 min。取总蛋白样本 50 μg,分离胶进线分离总蛋白,将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜,封闭 5 h,加入一抗(IL-12 多克隆抗体或 SOD 多克隆抗体),4 ℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,曝光、扫描底片,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,对各组目的基因条带的灰度值进行分析,计算其相对表达量,灰度值越高,表示蛋白表达量越大。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 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,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠卵巢组织中 IL-12 及 SOD mRNA 表达比较 结果见表 1。3 组小鼠卵巢组织中 IL-12、SOD mRNA 表达比较差异均有统计学意义(*F* = 3.761、3.134, *P* < 0.01)。模型组小鼠卵巢组织中 IL-12 mRNA 表达显著高于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);干细胞组小鼠卵巢组织中 IL-12 mRNA 表达显著低于模型组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);干细胞组与假手术组小鼠卵巢组织中 IL-12 mRNA 比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。模型组和干细胞组小鼠卵巢组织中 SOD mRNA 表达高于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);干细胞组小鼠卵巢组织中 SOD mRNA 表达水平高于模型组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 1 3 组小鼠卵巢组织中 IL-12 及 SOD mRNA 表达比较
Tab.1 Comparison of the expression of IL-12 and SOD mRNA in ovarian tissues of mice among the three group

($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	IL-12 mRNA	SOD mRNA
假手术组	10	0.194 ± 0.041	0.258 ± 0.109
模型组	10	0.568 ± 0.186 ^a	0.290 ± 0.131 ^a
干细胞组	10	0.309 ± 0.163 ^b	0.741 ± 0.228 ^{ab}
<i>F</i>		3.761	3.134
<i>P</i>		<0.01	<0.01

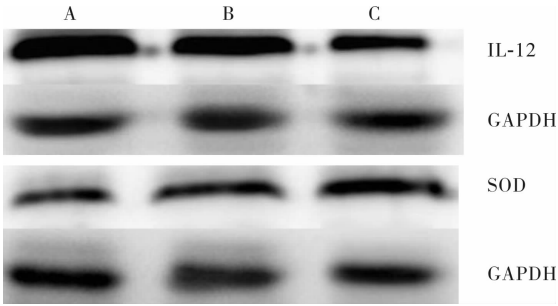
注:与假手术组比较^a*P* < 0.05;与模型组比较^b*P* < 0.05。

2.2 3 组小鼠卵巢组织中 IL-12 及 SOD 蛋白表达比较 结果见表 2、图 1。3 组小鼠卵巢组织中 IL-12、SOD 蛋白表达比较差异均有统计学意义(*F* = 2.520、4.458, *P* < 0.01)。模型组小鼠卵巢组织中 IL-12 蛋白表达显著高于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);干细胞组小鼠卵巢组织中 IL-12 蛋白表达显著低于模型组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);干细胞组与假手术组小鼠卵巢组织中 IL-12 蛋白表达比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。模型组和干细胞组小鼠卵巢组织中 SOD 蛋白表达高于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);干细胞组小鼠卵巢组织中 SOD 蛋白表达高于模型组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 2 3 组小鼠卵巢组织中 IL-12 及 SOD 蛋白表达比较
Tab.2 Comparison of the expression of IL-12 and SOD protein in ovarian tissues of mice among the three group

($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	IL-12 蛋白	SOD 蛋白
假手术组	10	0.231 ± 0.101	0.194 ± 0.089
模型组	10	0.649 ± 0.214 ^a	0.224 ± 0.091 ^a
干细胞组	10	0.254 ± 0.070 ^b	0.579 ± 0.243 ^{ab}
<i>F</i>		2.520	4.458
<i>P</i>		<0.01	<0.01

注:与假手术组比较^a*P* < 0.05;与模型组比较^b*P* < 0.05。



注:A:假手术组;B:模型组;C:干细胞组。

图 1 3 组小鼠卵巢组织中 IL-12 及 SOD 蛋白表达 (Western blot)

Fig.1 Expression of IL-12 and SOD protein in ovarian tissues of mice in the three groups (Western blot)

3 讨论

卵巢扭转是女性常见病,可见于剧烈运动后及血管外肿瘤压迫、肠扭转、肠套叠、嵌顿疝时肠系膜静脉和动脉受压等情况下,如果处理不当,轻者可出现输卵管粘连、阻塞,重者可出现卵巢梗死、破裂等^[1-3]。恢复血流灌注是该病的有效治疗方法,但在扭转的卵巢恢复正常解剖部位及血液供应后,往往卵巢组织损伤较缺血阶段更为严重,相继出现各类

并发症,临床处理棘手,治疗效果差,因此,对卵巢扭转的处理仍需高度重视^[3-5]。

MSC是一类具有体外扩增和多向分化潜能的细胞,可分化为神经元、胶质细胞、心肌细胞、骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等^[6-8]。研究表明,不同组织来源的MSC及其分泌的细胞因子和外泌体可通过改善卵巢组织微环境、免疫调节而促进卵泡发育,恢复卵巢早衰患者的卵巢功能及生育能力^[9]。另有研究证实,UC-MSC及骨髓来源的MSC外泌体可通过调节血清激素水平,降低顺铂对卵巢的损伤,修复卵巢功能^[10]。在体外培养的UC-MSC可通过旁分泌或自分泌方式产生多种具有生物活性的因子,如缺血诱导的因子、神经源性生长因子、血管生成素、血管内皮生长因子、基质起源的因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子、纤维母细胞生长因子等,对损伤组织的恢复及组织重建具有促进作用^[8]。UC-MSC在抑制炎症反应和免疫调节过程中具有双重作用,可通过抑制炎症进程及发挥免疫调节作用而抑制炎症反应,维持机体免疫微环境稳定^[8,11-12]。本课题组前期研究亦发现,使用UC-MSC培养上清液提取物进行治疗亦可起到与细胞治疗类似的效果,UC-MSC的治疗作用机制涵盖细胞替代作用及“无细胞”的“伪旁观者效应”2种途径^[9,13-14]。

IL-12作为促进炎症反应的重要炎性因子,在炎症进程中的作用不可轻视,阻断IL-12的炎症反应通路对有效控制炎症有重要意义。缺氧或局部缺血情况下可引发活性氧(reactive oxygen specie, ROS)大量产生,过多的ROS可直接损伤细胞膜、DNA和蛋白质,导致细胞功能的改变和丧失,并抑制细胞增殖,诱导凋亡^[13-17]。樊志刚等^[13]研究证实,胚胎干细胞可以通过抑制氧化应激反应进程而逆转糖尿病肾病的发生、发展。袁春菊^[17]研究显示,依那普利对梗死心肌微环境的调节有助于提高UC-MSC的疗效,其主要作用机制为抑制炎症级联放大及降低氧化应激反应,而这二者对损伤心室的重构具有促进作用。基于上述研究,本课题组推测UC-MSC可通过抑制炎症反应及降低氧化应激反应而保护受损卵巢组织。脐带作为医疗废品,重新再利用可实现“变废为宝”;同时,UC-MSC体外扩增及分化能力强,是良好的“种子细胞”^[6,8,15]。基于上述原因,本研究选用无伦理学争议的UC-MSC,观察其对炎症因子IL-12及氧化应激损伤的代表性酶SOD的影响,以探讨其对卵巢扭转小鼠的治疗效果。

本研究结果显示,模型组小鼠卵巢组织中IL-12

mRNA、IL-12蛋白表达显著高于假手术组;而经过UC-MSC干预后,干细胞组小鼠卵巢组织中IL-12 mRNA、IL-12蛋白表达显著低于模型组,且干细胞组与假手术组小鼠卵巢组织中IL-12 mRNA、IL-12蛋白表达比较差异无统计学意义;提示UC-MSC干预可有效下调卵巢缺血再灌注小鼠卵巢组织中IL-12表达,因此,UC-MSC可作为卵巢扭转后控制炎症反应的重要干预手段之一。另外,本研究发现,模型组和干细胞组小鼠卵巢组织中SOD mRNA、SOD蛋白表达显著高于假手术组,且干细胞组小鼠卵巢组织中SOD mRNA、SOD蛋白表达高于模型组;提示卵巢缺血再灌注损伤小鼠卵巢组织中SOD表达有所上调,UC-MSC干预可进一步上调SOD表达,从而有效减轻小鼠缺血再灌注损伤卵巢组织的氧化应激反应和氧化损伤。

综上所述,UC-MSC移植可降低小鼠缺血再灌注损伤卵巢组织中IL-12表达,提高SOD表达,抑制炎症反应,改善氧化应激损伤,有益于受损卵巢功能的恢复。本研究为卵巢缺血再灌注损伤的干细胞治疗提供了理论基础和依据,但不足之处在于尚不能明确其分子机制及UC-MSC的作用机制,有待后续进一步研究。

参考文献:

- [1] 单舒. 二氧化碳气腹对大鼠卵巢功能影响的研究[D]. 唐山: 河北联合大学, 2014.
- [2] 张艳花. 附件扭转的复位手术治疗56例临床分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [3] 周敏, 范敏, 董世庆. 尼莫地平对大鼠卵巢缺血再灌注损伤后氧化应激反应的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(11): 1051-1053.
- [4] 邹晓萍, 董化江, 单娜娜, 等. 蕨麻正丁醇提取物对卵巢缺血再灌注损伤大鼠内皮素-1的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(9): 682-684.
- [5] 邹晓萍, 董化江, 单娜娜, 等. 蕨麻正丁醇提取物对急性卵巢缺血再灌注损伤大鼠肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(5): 321-323.
- [6] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [7] GLENN J D, WHARTENBY K A. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy[J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(5): 526-539.
- [8] DONG H J, SHANG C Z, LI G, et al. The distribution of transplanted umbilical cord mesenchymal stem cells in large blood vessel of rats with traumatic brain injury[J]. *J Craniofac Surg*, 2017, 28(6): 1615-1619.

dual pH-responsive and tumor-targeted nanovector for inhibiting tumor growth and spontaneous metastasis in orthotopic murine model of breast carcinoma[J]. *Theranostics*, 2017, 7(2):357-376.

[9] VARKI A. Sialic acids in human health and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(8):351-360.

[10] BENNEWITZ M F, LOBO T L, NKANSAH M K, et al. Biocompatible and pH-sensitive PLGA encapsulated MnO nanocrystals for molecular and cellular MRI[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(5):3438-3446.

[11] 王志慧,梁文辉,原志庆,等. 缺氧诱导因子 2- α 对乳腺癌细胞多药耐药的影响[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(11):961-964, 970.

[12] WANG C, WANG J, CHEN X, et al. Phenylboronic acid-cross-linked nanoparticles with improved stability as dual acid-responsive drug carriers[J]. *Macromol Biosci*, 2017, 17(3):227-235.

[13] LI L, YUAN C, ZHOU D, et al. Utilizing reversible interactions in polymeric nanoparticles to generate hollow metal-organic nanoparticles[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(44):12991-12995.

[14] ZHANG Y, ZHAO W, ZHAO Y, et al. Expression of ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc and ST8Sia in human hepatic carcinoma cell lines, HepG-2 and SMMC-7721 and normal hepatic cell line, L-02[J]. *Glycoconj J*, 2015, 32(1/2):39-47.

[15] SHEN Y, LU F, HOU J, et al. Incorporation of paclitaxel solid dispersions with poloxamer188 or polyethylene glycol to tune drug release from poly(ϵ -caprolactone) films[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(8):1187-1196.

[16] 吴迪. 基于肿瘤多药耐药机制构建多孔微球和苯硼酸靶向型小核酸递释体系的研究[D]. 吉林:吉林大学, 2016.

[17] JI M, LI P, SHENG N, et al. Sialic acid-targeted nanovectors with phenylboronic acid-grafted polyethylenimine robustly enhance siRNA-based cancer therapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(15):9565-9576.

[18] MOON J M, ARONOFF D M, CAPRA J A, et al. Examination of signatures of recent positive selection on genes involved in human sialic acid biology[J]. *G3 (Bethesda)*, 2018, 8(4):1315-1325.

[19] CHAI Z, MA L, WANG Y, et al. Phenylboronic acid as a glucose-responsive trigger to tune the insulin release of glycopolymer nanoparticles[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2016, 27(7):599-610.

[20] 安媛媛,徐祖顺,吴水林. 苯硼酸类糖敏感材料的研究进展[J]. 高分子通报, 2012(3):98-106.

[21] QIAN R, DING L, YAN L, et al. Fluorescence imaging for *in situ* detection of cell surface sialic acid by competitive binding of 3-(dansylamino) phenylboronic acid[J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 894:85-90.

[22] HAO Y, ZHENG C, WANG L, et al. Covalent self-assembled nanoparticles with pH-dependent enhanced tumor retention and drug release for improving tumor therapeutic efficiency[J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(11):2133-2144.

[23] 张金,任思其,李舒婷,等. 儿童恶性脑肿瘤放疗后继发肺损伤的早期诊断及治疗[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(23):1807-1810.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

(上接第 604 页)

[9] 刘荣霞,杨炳,余丽梅,等. 不同来源间充质干细胞治疗卵巢早衰的作用及机制研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(40):106-110.

[10] 周政,杜波,范雪,等. 骨髓间充质干细胞外泌体对 SD 大鼠早衰卵巢的影响[J]. 中国科技论文, 2018, 13(12):1429-1433.

[11] 赵高远. 脂肪间充质干细胞通过旁分泌抑制氧化应激反应缓解急性肝细胞衰竭的研究[D]. 青岛:青岛大学, 2018.

[12] HUAJIANG D, PING W, DINGWEI P, et al. Study on umbilical cord-matrix stem cells transplantation for treatment of acute trauma brain injury in rats[J]. *Turk Neurosurg*, 2019. DOI:10.5137/1019-5149. JTN. 25463-18. 2. [Epub ahead of print].

[13] 樊志刚,樊红亮. 胚胎干细胞尾静脉注射移植糖尿病肾病大鼠的氧化应激反应[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(14):2199-2204.

[14] DONG H J, ZHAO M L, LI X H, et al. Hypothermia-modulating matrix elasticity of injured brain promoted neural lineage specification of mesenchymal stem cells[J]. *Neuroscience*, 2018, 377(1):1-11.

[15] 刘聪慧. 脐带间充质干细胞来源胞外囊泡在小鼠卵巢功能和生育力重建中的作用[D]. 合肥:安徽医科大学, 2018.

[16] 赵先锋,徐予,朱中玉,等. 脐带间充质干细胞治疗慢性扩张型心肌病合并心力衰竭疗效观察[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(9):823-826.

[17] 袁春菊. Enalapril 联合人脐血间充质干细胞治疗 AMI 的作用及机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2013.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:孟 月)