

子宫内膜基底层,在形态、表面抗原及多向分化潜能检测中均符合 MSCs 的鉴定标准^[11,20],且经血样本在体外 4 ℃ 环境下存储 72 h 内对分离培养后的 MenSCs 生物学活性无显著影响,表明 MenSCs 分离提取具有较长的时间窗,提示其具有较强的抗凋亡能力^[11]。

1.2 MenSCs 符合 MSCs 标准 研究发现, MenSCs 不仅阳性(>95%)表达 MSCs 表面标志物如 CD73、CD90 及 CD105,还表达 ESCs 相关标志物如 OCT4、SOX2 及 Nanog 等,提示其具有高度增殖和定向分化能力^[10-11,19]。随着对 MenSCs 异质性(包括 MSCs、内皮祖细胞及上皮祖细胞等)、不同亚型(CD146⁺、SUSD2⁺、ICAM1⁺及 ABCG2⁺等)及其生物学活性研究的不断深入发现, MenSCs 异位种植于免疫缺陷小鼠肾包膜下可形成具有功能的子宫内膜样组织,并对外源雌激素具有与典型子宫内膜相似的反应;而新生的人源化血管侵入小鼠肾脏组织形成完善的血液循环系统;且原始的 MenSCs 比单一亚型 MenSCs 植入具有更强的子宫内膜样组织重构能力^[21-23]。基于上述研究结果推测,临床使用原始 MenSCs 治疗疾病可能比某种亚型 MenSCs 具有更好的效果。

迄今为止,体外诱导分化实验已证明, MenSCs 在不同诱导培养基的作用下,除可向典型的成骨、成脂及成软骨方向分化外,还可向心肌样细胞、神经样细胞、肝样细胞、内皮样细胞、胰腺样细胞、子宫内膜样细胞等分化^[24-30]。随后,基于免疫缺陷鼠体内研究发现, MenSCs 移植后可定向分化为肌细胞、心肌细胞及子宫内膜细胞^[30-32]。尽管 MenSCs 的多向分化潜能已获得多方验证,但由于机体免疫系统的作用,其在体内通过转分化来改善疾病的可能性较低^[33],而 MenSCs 通过发挥免疫调控和旁分泌营养支持作用改善疾病获得一致认可。

此外, MenSCs 丰富的来源和较强的增殖活性均可满足临床上异体或自体移植的需要。有研究表明,1 位健康的供体所提供的 MenSCs 可满足 2 万例患者的细胞需求量^[34]。基于本课题组前期对 MenSCs 分离培养经验,从 5 mL 经血样本中可分离获得约 0.5×10^5 个种子干细胞,培养至第 3 代时细胞数量达 10^8 个,可满足临床对干细胞数量及质量的要求^[35]。

2 MenSCs 的临床应用

MenSCs 因其优良的生物学特性,作为种子细胞

在相关难治性疾病的治疗中获得了广泛关注,动物实验发现,其在心肌梗死、假肥大性肌营养不良、自身免疫性疾病、结肠炎及子宫内膜损伤等疾病的治疗中展示出了良好的改善效果^[25,31,36-38];临床试验也验证了 MenSCs 对相关疾病具有良好的治疗效果。2010 年,1 例 23 岁男性假肥大性肌营养不良患者肌肉注射 1.16×10^8 个 MenSCs 后体内营养不良蛋白恢复至正常水平,肌肉力量增强^[39];1 例 74 岁心力衰竭患者分 5 次经静脉输入 1.5×10^7 个 MenSCs 和 1.28×10^7 个 CD34⁺ 造血干细胞,随访 7~22 个月发现,患者左心室射血分数从 30% 提高到 40%,且心力衰竭标志物利钠肽水平降低^[40]。而 Medistem 公司启动了 MenSCs 治疗充血性心脏衰竭的 II 期临床试验,采用微创逆行冠状动脉窦给药系统将 MenSCs 移植到充血性心力衰竭患者体内,评估 MenSCs 对心力衰竭的治疗效果^[34]。2016 年,中国医科大学附属盛京医院通过自体移植将 MenSCs 输入到 7 例重度宫腔粘连并发不孕症患者子宫腔内,其中 5 例患者的子宫内膜显著增厚,达到可进行胚胎移植的标准;4 例患者接受冷冻胚胎移植后,其中 2 例患者成功受孕;另有 1 例患者在 MenSCs 输入后自然受孕^[41]。2019 年,阿根廷国际辅助生殖中心对 29 例子官内膜壁薄患者进行子宫内膜下 MenSCs 移植,患者子宫内膜厚度显著增加,且子宫内膜病理学结果显示子宫内膜趋于正常化,体外受精胚胎移植后患者临床妊娠及婴儿活产率显著增加^[42]。2020 年,伊朗科学家对 2018 年开展的一项 I、II 期临床实验(IRCT20180619040147N2)结果进行分析发现,15 例自体移植 MenSCs 后的卵巢低反应性患者中有 7 例成功临床妊娠,并产下 5 名婴儿;而 16 例常规治疗患者中仅有 2 例成功妊娠,产下 1 名婴儿^[43]。上述临床研究结果表明,来源于生殖系统的 MenSCs 在生殖系统相关疾病的改善方面疗效明显,具有较好的临床应用价值。

随着国家对干细胞治疗的大力支持以及相关制度的不断规范,截至 2020 年 6 月,国家卫生健康委员会已备案干细胞相关治疗项目 74 项,其中包括 6 项与 MenSCs 相关的临床备案项目,分别为:宫血干细胞治疗肝功能衰竭的临床研究和宫血干细胞治疗 2019-nCoV 病毒导致的急性肺损伤(肺炎)的临床研究(浙江大学医学院附属第一医院)、宫血干细胞治疗乙型肝炎后肝硬化失代偿期的临床研究(树兰医

院)、应用自体经血源 MSCs 修复宫腔粘连的临床研究(中国医科大学附属盛京医院)、宫血干细胞治疗轻度阿尔茨海默病的安全性和初步有效性的临床研究(浙江医院)及宫血干细胞治疗酒精性肝硬化失代偿期的临床研究(海南省人民医院)。上述临床研究项目的备案与开展不仅表明 MenSCs 有巨大的应用前景,同时也说明建立子宫内膜干细胞相关质量标准的紧迫性和必要性。本课题组通过对不同年龄段女性 MenSCs 分化潜能和增殖活性比较发现,年轻女性 MenSCs 优于年龄较大个体,为建立子宫内膜干细胞库、鼓励适龄女性尽早储存 MenSCs 提供了理论依据^[11]。

3 MenSCs 改善疾病的作用机制

尽管 MSCs 可通过转分化来弥补受损组织中相关受损细胞,但多数体内研究结果表明,同种异体移植入体内的 MSCs 仅有极少数能够定植在受损部位^[33-44]。MenSCs 可在体外特定条件下分化为十几种类型的细胞,但体内研究结果证明其仅可分化为肌样细胞和子宫内样细胞,且局限于免疫缺陷动物体内^[30]。因此,同种异体 MenSCs 移植后,其通过转分化的作用修复受损组织的可能性较低;但自体移植 MenSCs 通过转分化作用有可能达到对疾病的改善和组织修复效果。

随着对干细胞治疗疾病机制研究的不断深入,大量研究表明, MSCs 移植入体内后所引发的旁分泌作用(包括分泌大量细胞因子、趋化因子及促生长因子等)是患者病情获得改善的主要机制之一^[45-46]。2017 年,CHEN 等^[47]通过建立小鼠肝脏疾病模型发现, MenSCs 移植后可通过旁分泌细胞间黏附分子-1、血管生成素-2、胰岛素样生长因子结合蛋白 6、护骨因子、白细胞介素(interleukin, IL)-6 及 IL-8 等靶向肝星状细胞,通过提高细胞抗凋亡能力来缓解模型动物暴发性肝衰竭。本课题组前期研究也发现,体外培养的 MenSCs 可分泌更高水平的血管生成因子,如血管内皮细胞生长(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝生长因子、血管生长素和基质金属蛋白酶-1 等,提示 MenSCs 移植后具有较强的促血管再生能力^[11]。MSCs 经体外预处理后再进行干细胞治疗已逐渐从基础研究转入临床研究,有研究发现,低氧预处理可显著提高 MSCs 存活率、抗氧化应激能力和迁移能力^[48-49]。目前,

已有 1 项主要目的为评估经低氧或缺血预处理的 MSCs 对非缺血性扩张型心肌病患者症状的改善作用的临床二期研究正在开展^[50]。有报道表明,经过缺氧饥饿预处理的 MenSCs 可提高自身抗凋亡能力,并显著上调 VEGF、脑源性神经营养因子和神经营养蛋白 3 的分泌,促进中风模型动物症状的改善^[28]。据此推测,相比于移植原始的 MenSCs,移植细胞体外预处理(包括缺氧、低温、饥饿及活性因子诱导等)后可全面提高 MenSCs 活性(抗凋亡及活性因子分泌等),增强 MenSCs 在组织受损部位停留,最终达到更佳的改善疾病效果。

此外,现已明确由损伤和疾病引发的炎症会间接加重组织损伤,而 MSCs 移植后通过直接(与免疫细胞接触)或间接(分泌免疫调节因子)的方式所诱导的免疫调控作用也获得越来越多的验证,被认为是其改善疾病的重要机制^[51-52]。同时,孕期子宫内膜必须耐受并支持新生胚胎的着床与生长,上述现象提示 MenSCs 自身可能具有较强的免疫抑制能力^[53]。研究发现, MenSCs 不表达主要组织相容性复合体 II,且可以通过减少实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 Th1 和 Th17 细胞在中枢神经系统的募集,提高抗炎因子(IL-10 和 IL-27)表达,从而降低神经炎症反应^[13,19,24]。

在重症肢体缺血模型小鼠中, MenSCs 移植能够抑制淋巴细胞增殖和炎症因子分泌,如 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[14];在脂多糖诱导的急性肺损伤模型中, MenSCs 移植能够下调支气管肺泡灌洗液和受损肺组织中炎症因子 IL-1 β 的表达,同时上调抗炎因子 IL-10 的表达^[15]。另外,在四氯化碳引起的急性肝损伤模型中, MenSCs 移植可通过调节细胞因子表达(下调血清和肝组织中的促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 上调抗炎因子 IL-10)及免疫细胞比例(下调脾组织中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞比例,上调 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ 调节性 T 淋巴细胞比例)减轻肝组织病理损伤,达到改善肝功能的作用^[16]。另有研究发现, MenSCs 可根据所处微环境调节促炎因子(IL-6、IL-8 和 IFN- γ)和抗炎细胞因子(IL-4、IL-10 和 IL-13)的分泌来发挥其免疫调节功能^[11]。上述研究结果表明, MenSCs 不仅能够通过分泌细胞因子来调节免疫系统活性,还可能通过与淋巴细胞相互作用而发挥其免疫调节功能。

4 展望

MenSCs 凭借其无创伤采集方式、同一供体可多次采集、可获得大量遗传背景一致的种子细胞及自体移植等方面的优势,获得了国内外学者的广泛关注,并已在多种难治性疾病的改善中取得了良好效果。尽管对 MenSCs 改善相关疾病的机制仍有待进一步研究,但建立标准化、规范化的 MenSCs 生产制备方案,不仅能够为 MenSCs 临床治疗提供保障,还对 MenSCs 临床使用的安全性、细胞移植量、细胞移植时间窗及细胞移植途径等临床使用关键参数的优化提供支持。因此,本课题组近年来除对 MenSCs 改善相关疾病(糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化、帕金森以及多发性硬化)的机制进行深入研究外,同时也致力于研究 MenSCs 分离、培养基制备的标准操作程序,并建立公益性、科研性的 MenSCs 资源库,推动 MenSCs 的临床应用。

参考文献:

[1] SNEDDON J B,TANG Q,STOCK P,et al. Stem cell therapies for treating diabetes: progress and remaining challenges[J]. *Cell Stem Cell*,2018,22(6):810-823.

[2] SMOLEN J S,ALETAHA D,MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*,2016,388(10055):2023-2038.

[3] GOSWAMI D,CONWAY G S. Premature ovarian failure[J]. *Hum Reprod Update*,2005,11(4):391-410.

[4] DE LUCA M,AIUTI A,COSSU G,et al. Advances in stem cell research and therapeutic development[J]. *Nat Cell Biol*,2019,21(7):801-811.

[5] RIKHTEGAR R,PEZESHKIAN M,DOLATI S,et al. Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts[J]. *Biomed Pharmacother*,2019,109:304-313.

[6] LI W,MA N,ONG L L,et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. *Stem Cells*,2007,25(8):2118-2127.

[7] MUNDRA V,GERLING I C,MAHATO R I. Mesenchymal stem cell-based therapy[J]. *Mol Pharm*,2013,10(1):77-89.

[8] FU X,LIU G,HALIM A,et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. *Cells*,2019,8(8):784.

[9] MENDT M,REZBANI K,SHPALL E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use[J]. *Bone Marrow Transplant*,2019,54(Suppl 2):789-792.

[10] GARGETT C E,SCHWAB K E,DEANE J A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years[J]. *Hum Reprod Update*,2016,22(2):137-163.

[11] LIU Y,NIU R,YANG F,et al. Biological characteristics of human menstrual blood-derived endometrial stem cells[J]. *J Cell Mol*

Med,2018,22(3):1627-1639.

[12] CHEN L,QU J,XIANG C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine[J]. *Stem Cell Res Ther*,2019,10(1):1.

[13] PERON J P S,JAZEDJE T,BRANDAO W N,et al. Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice[J]. *Stem Cell Rev Rep*,2012,8(3):940-952.

[14] MURPHY M P,WANG H,PATEL A N,et al. Allogeneic endometrial regenerative cells: an "off the shelf solution" for critical limb ischemia[J]. *J Transl Med*,2008,6:45.

[15] XIANG B,CHEN L,WANG X,et al. Transplantation of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells promotes the repair of LPS-induced acute lung injury[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(4):689.

[16] FATHI-KAZEROONI M,TAVOOSIDANA G,TAGHIZADEH-JAHED M,et al. Comparative restoration of acute liver failure by menstrual blood stem cells compared with bone marrow stem cells in mice model[J]. *Cytotherapy*,2017,19(12):1474-1490.

[17] GARGETT C E. Uterine stem cells: what is the evidence[J]. *Hum Reprod Update*,2007,13(1):87-101.

[18] CHAN R W,SCHWAB K E,GARGETT C E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells[J]. *Biol Reprod*,2004,70(6):1738-1750.

[19] MENG X,ICHIM T E,ZHONG J,et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population[J]. *J Transl Med*,2007,5(1):57-66.

[20] SUN Y,REN Y,YANG F,et al. High-yield isolation of menstrual blood-derived endometrial stem cells by direct red blood cell lysis treatment[J]. *Biol Open*,2019,8(5):bio038885.

[21] MASUDA H,MARUYAMA T,HIRATSU E,et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c (null) immunodeficient mice[J]. *PNAS*,2007,104(6):1925-1930.

[22] MASUDA H,ANWAR S S,BUHRING H J,et al. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells[J]. *Cell Transplant*,2012,21(10):2201-2214.

[23] LV H,HU Y,CUI Z,et al. Human menstrual blood: a renewable and sustainable source of stem cells for regenerative medicine[J]. *Stem Cell Res Ther*,2018,9(1):325.

[24] PATEL A N,PARK E,KUZMAN M,et al. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation[J]. *Cell Transplant*,2008,17(3):303-311.

[25] MASUDA H,MATSUZAKI Y,HIRATSU E,et al. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration[J]. *PLoS One*,2010,5(4):e10387.

[26] ALLICKSON J G,SANCHEZ A,YEFIMENKO N,et al. Recent studies assessing the proliferative capability of a novel adult stem cell identified in menstrual blood[J]. *Open Stem Cell J*,2011,3(2011):4-10.

[27] KHANJANI S,KHANMOHAMMADI M,ZARNANI A H,et al.

- Comparative evaluation of differentiation potential of menstrual blood-versus bone marrow-derived stem cells into hepatocyte-like cells[J]. *PLoS One*,2014,9(2):e86075.
- [28] BORLONGAN C V, KANEKO Y, MAKI M, *et al.* Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuro-protection following transplantation in experimental stroke [J]. *Stem Cells Dev*,2010,19(4):439-452.
- [29] DARZI S, ZARNANI A H, JEDDI-TEHRANI M, *et al.* Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate[J]. *Tissue Eng Part A*,2012,18(15/16):1720-1728.
- [30] HIDA N, NISHIYAMA N, MIYOSHI S, *et al.* Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells[J]. *Stem Cells*,2008,26(7):1695-1704.
- [31] CUI C H, UYAMA T, MIYADO K, *et al.* Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic trans-differentiation[J]. *Mol Biol Cell*,2007,18(5):1586-1594.
- [32] ZHENG S X, WANG J, WANG X L, *et al.* Feasibility analysis of treating severe intrauterine adhesions by transplanting menstrual blood-derived stem cells[J]. *Int J Mol Med*,2018,41(4):2201-2212.
- [33] BAGNO L, HATZISTERGOS K E, BALKAN W, *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapy for cardiovascular disease: progress and challenges[J]. *Mol Ther*,2018,26(7):1610-1623.
- [34] BOCKERIA L, BOGIN V, BOCKERIA O, *et al.* Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic[J]. *J Transl Med*,2013,11(5):56.
- [35] LIU Y, NIU R, LI W, *et al.* Therapeutic potential of menstrual blood-derived endometrial stem cells in cardiac diseases[J]. *Cell Mol Life Sci*,2019,76(9):1681-1695.
- [36] RODRIGUES M C, GLOVER L E, WEINBREN N, *et al.* Toward personalized cell therapies: autologous menstrual blood cells for stroke[J]. *J Biomed Biotechnol*,2011,2011:194720.
- [37] WU X, LUO Y, CHEN J, *et al.* Transplantation of human menstrual blood progenitor cells improves hyperglycemia by promoting endogenous progenitor differentiation in type 1 diabetic mice[J]. *Stem Cells Dev*,2014,23(11):1245-1257.
- [38] LV Y, XU X, ZHANG B, *et al.* Endometrial regenerative cells as a novel cell therapy attenuate experimental colitis in mice[J]. *J Transl Med*,2014,12(1):344.
- [39] Ichim T E, Alexandrescu D T, SOLANO F, *et al.* Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories; implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Cell Immunol*,2010,260(2):75-82.
- [40] ICHIM T E, SOLANO F, LARA F, *et al.* Combination stem cell therapy for heart failure[J]. *Int Arch Med*,2010,3(1):5.
- [41] TAN J, LI P, WANG Q, *et al.* Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome[J]. *Hum Reprod*,2016,31(12):2723-2729.
- [42] TERSOGLIO A E, TERSOGLIO S, SALATINO D R, *et al.* Regenerative therapy by endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeated implantation failure: a novel strategy [J]. *JBRA Assist Reprod*,2020,24(2):118-127.
- [43] ZAFARDOUST S, KAZEMNEJAD S, DARZI M, *et al.* Improvement of pregnancy rate and live birth rate in poor ovarian responders by intraovarian administration of autologous menstrual blood derived-mesenchymal stromal cells: phase I/II clinical trial[J]. *Stem Cell Rev Rep*,2020,16(4):755-763.
- [44] BALSAM L B, WAGERS A J, CHRISTENSEN J L, *et al.* Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium[J]. *Nature*,2004,428(6983):668.
- [45] JIANG Z, HU X, YU H, *et al.* Human endometrial stem cells confer enhanced myocardial salvage and regeneration by paracrine mechanisms[J]. *J Cell Mol Med*,2013,17(10):1247-1260.
- [46] GOLPANIAN S, WOLF A, HATZISTERGOS K E, *et al.* Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue [J]. *Physiol Rev*,2016,96(3):1127-1168.
- [47] CHEN L, XIANG B, WANG X, *et al.* Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure[J]. *Stem Cell Res Ther*,2017,8(1):9.
- [48] HU X, YU S P, FRASER J L, *et al.* Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2008,135(4):799-808.
- [49] YAN F, YAO Y, CHEN L, *et al.* Hypoxic preconditioning improves survival of cardiac progenitor cells; role of stromal cell derived factor-1 α -CXCR4 axis[J]. *PLoS One*,2012,7(7):e37948.
- [50] BUTLER J, EPSTEIN S E, GREENE S J, *et al.* Intravenous allogeneic mesenchymal stem cells for nonischemic cardiomyopathy: safety and efficacy results of a phase II-A randomized trial [J]. *Circ Res*,2017,120(2):332-340.
- [51] SONG N, SCHOLTEMEIJER M, SHAH K. Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential [J]. *Trends Pharmacol Sci*,2020,41(9):653-664.
- [52] GOMZIKOVA M O, JAMES V, RIZVANOV A A. Therapeutic application of mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles for immunomodulation[J]. *Front Immunol*,2019,10:2663.
- [53] MAKRIGIANNAKIS A, KARAMOUTI M, DRAKAKIS P, *et al.* Fetomaternal immunotolerance[J]. *Am J Reprod Immunol*,2008,60(6):482-496.