

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.13.007

脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔的治疗效果及机制研究*

张丽¹ 李启玉^{2△} 曾莉¹ 易华娅¹ 曹俊岩¹

(贵州中医药大学第二附属医院(1 妇科;2 院感办) 贵州 贵阳 550001)

摘要 目的:分析脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔的治疗效果及机制研究。**方法:**经腹腔连续注射 2 d 环磷酰胺 50 mg/(kg·d)建立卵巢早衰家兔模型。将建模成功的 10 只家兔随机分成模型组和治疗组,每组 5 只。建模一周后,治疗组家兔每天经耳缘静脉注射 5×10^6 /mL 脐带间充质干细胞混悬液 2 mL,连续注射 3 d。模型组家兔经耳缘静脉注射等量无菌生理盐水。于治疗后 0 d、7 d、14 d 和 28 d,取家兔静脉血检查血清激素表达水平。于治疗后 28 d,检测家兔卵巢中生长卵泡数、封闭卵泡数、黄体数、富半胱氨酸蛋白 61(CYR61)和结缔组织生长因子(CTGF)mRNA 及蛋白质相对表达量。**结果:**治疗前,模型组和治疗组家兔血清雌二醇(E_2)、促卵泡生成素(FSH)、FSH/ 黄体生成素(LH)、抑制素 B(INHB)和抗苗勒管激素(AMH)、均无显著差异($P>0.05$)。与模型组相比,治疗后治疗组家兔血清 E_2 和 INHB 水平显著上升($P<0.05$),FSH 水平显著下降($P<0.05$),FSH/LH 均无显著差异($P>0.05$)。随着治疗时间延长,治疗组家兔血清 E_2 和 FSH 水平周期性波动。治疗 28 d 后,与模型组相比,治疗组家兔血清 AMH 水平显著升高($P<0.05$);卵巢组织中 CYR61 和 CTGF mRNA 及蛋白质相对表达量均显著升高($P<0.05$);生长卵泡数显著升高($P<0.05$);封闭卵泡数和黄体数均显著降低($P<0.05$)。**结论:**静脉注射脐带间充质干细胞可通过上调 CYR61 和 CTGF 的表达,促进卵泡生成,恢复卵巢功能,达到治疗卵巢早衰的临床效应。

关键词:脐带间充质干细胞;卵巢早衰;富半胱氨酸蛋白 61;结缔组织生长因子;雌二醇;促卵泡生成素;黄体生成素;抑制素 B;抗苗勒管激素

中图分类号:R-33;R711.75;R331.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)13-2432-05

Therapeutic Effect and Mechanism of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Premature Ovarian Failure in Rabbits*

ZHANG Li¹, LI Qi-yu^{2△}, ZENG Li¹, YI Hua-ya¹, CAO Jun-yan¹

(1 Department of Gynecology; 2 Hospitals, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, 550001, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the therapeutic effect and mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cells on premature ovarian failure in rabbits. **Methods:** The rabbit model of premature ovarian failure was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide 50 mg/ (kg·d) for 2 days. Ten rabbits were randomly divided into model group and treatment group, with 5 rabbits in each group. One week after modeling, rabbits in the treatment group were injected with 2 mL of 5×10^6 /mL umbilical cord mesenchymal stem cells suspension via ear vein every day for 3 days. The rabbits in the model group were injected with the same amount of sterile normal saline through ear vein. After treatment for 0, 7, 14 and 28 days, the venous blood of rabbits was taken to check the level of serum hormone expression. On the 28th day after treatment, the number of growing follicles, blocked follicles and corpus luteum, the relative expression of Cyr61 and CTGF mRNA and protein were detected. **Results:** Before treatment, there was no significant difference in serum estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), FSH / luteinizing hormone (LH), inhibin B (inhb) and anti Mullerian hormone (AMH) between model group and treatment group($P>0.05$). Compared with the model group, the serum E_2 and inhb levels in the treatment group increased significantly ($P<0.05$), the FSH level decreased significantly ($P<0.05$), and the FSH / LH ratio had no significant difference ($P>0.05$). With the prolongation of treatment time, the serum E_2 and FSH levels of rabbits in the treatment group fluctuated periodically. After 28 days of treatment, compared with the model group, the serum AMH level of the treatment group was significantly increased ($P<0.05$); the relative expression levels of Cyr61 and CTGF mRNA and protein in ovarian tissue were significantly increased ($P<0.05$); the number of growing follicles was significantly increased ($P<0.05$); the number of blocked follicles and corpus luteum were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Intravenous injection of umbilical cord mesenchymal stem cells can up regulate the expression of Cyr61 and CTGF, promote follicle formation, restore ovarian function, and achieve the effect of treatment of premature ovarian failure.

* 基金项目:贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY-2019-035)

作者简介:张丽(1987-),女,硕士,住院医师,研究方向:妇科内分泌或复发性流产,电话:15085989548,E-mail:zhangli871128@163.com

△ 通讯作者:李启玉(1985-),男,硕士,主治医师,研究方向:中医药防治动脉粥样硬化疾病,

电话:18166715119,E-mail:452984587@qq.com

(收稿日期:2021-02-04 接受日期:2021-02-28)

Key words: Umbilical cord mesenchymal stem cells; Premature ovarian failure; Cysteine rich protein 61; Connective tissue growth factor; Estradiol; Follicle stimulating hormone; Luteinizing hormone; Inhibin B; Anti Mullerian hormone

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R711.75; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)13-2432-05

前言

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指 40 岁之前的女性出现卵巢功能过早衰竭的一种综合性疾病,临床以血清中雌激素水平降低,促性腺激素水平升高为主要特征,以月经稀发、性欲减退、闭经、不孕为主要表现^[1-3]。30~39 岁妇女 POF 的发病率为 1%,呈上升趋势,已成为影响女性不孕的主要原因之一^[4]。POF 的病因及发病机制尚不明确,其引发因素可能有自身免疫损伤、代谢异常^[5]、精神刺激、环境破坏、不良工作或生活方式等,其中抗肿瘤治疗等医源性因素占 37%,遗传和免疫因素各占 19%。目前 POF 的治疗研究主要从卵巢功能和生育力恢复和改善为研究方向^[6,7]。近年来,研究发现干细胞具有自我复制和多项分化的潜能,干细胞分泌的细胞因子具有免疫调节、支持造血、修复损伤组织等功能^[8,9]。间充质干细胞是来源于中胚层的成体干细胞,间充质干细胞疗法被认为是一种修复受损组织、重建正常组织功能的替代治疗手段^[10]。人脐带间充质干细胞具有取材方便、免疫原性低等优点,是一种理想的种子源细胞,已被广泛用于各种损伤组织的修复。本研究以家兔为研究对象,通过静脉注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)建立卵巢早衰家兔模型,通过对治疗后家兔卵巢中生长卵泡数、封闭卵泡数、黄体数、CYR61 和 CTGF 表达检测,评测脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔的治疗效果及机制研究进行分析,报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

注射用环磷酰胺购自山西普德药业股份有限公司;兔雌二醇(E₂)ELISA 检测试剂盒购自上海信帆生物科技有限公司;兔促卵泡激素(FSH)、抑制素 B(INH-B)ELISA 检测试剂盒和购自上海将来实业股份有限公司;兔黄体生成素(LH)ELISA 检测试剂盒购自上海仁捷生物科技有限公司;兔抗苗勒管激素(AMH)ELISA 检测试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司;反转录试剂盒购自北京智杰方远科技有限公司;CRY61 兔抗兔多克隆抗体购自美国 Novus Biologicals; CTGF 兔抗兔多克隆抗体和 GAPDH 小鼠抗兔单克隆抗体购自博士德生物工程有限公司;DMEM-F12 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;APC Mouse anti-Human CD29、PE Mouse anti-Human CD34、PE Mouse anti-Human CD44、BB515 Mouse anti-Human CD45 购自美国 BD BIOSCIENCES;实时荧光定量 PCR 仪购自德国耶拿分析仪器股份公司;荧光显微镜购自日本 Olympus。

1.2 脐带间充质干细胞的培养及鉴定

收集妇产科足月剖腹产健康胎儿脐带,用 PBS 冲洗干净后,剔除血管,采用无菌剪刀将脐带剪成 1~2 mm 组织块,加入适量 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基,置于 5% CO₂、37℃培养箱中培养。5~7 d 后传代、扩增。取第三代间脐带充质

干细胞,制成单细胞悬液,取 200 μL 于 1.5 mL EP 管中,分别加入 20 μL CD29-APC、20 μL CD34-PE、20 μL CD44-PE、5 μL CD45-BB515,于室温下避光孵育 20 min,采用流式细胞仪检测。若细胞表达 CD29 和 CD44,不表达 CD34 和 CD45,则鉴定为脐带间充质干细胞。

1.3 实验动物

普通级健康日本大耳兔 10 只,体重 2.6~2.8 kg,购自上海奉贤辉煌养殖场。将所有大耳兔饲养在温度 20~24℃,相对湿度为 40%~60%,每天光照 12 h,自由摄食和饮水,适应性喂养一周,经阴道脱落细胞图片检查确定其动情周期正常后开始实验。

1.4 动物模型的建立与分组

经腹腔连续注射 2 d 环磷酰胺 50 mg/(kg·d)建立卵巢早衰家兔模型^[11,12]。采用随机数字法将建模成功的 10 只家兔随机分成模型组和治疗组,每组 5 只。建模一周后,治疗组家兔每天经耳缘静脉注射 5×10⁶/mL 脐带间充质干细胞混悬液 2 mL,连续注射 3 d。模型组家兔经耳缘静脉注射等量无菌生理盐水。

1.5 正常观察指标与评价方法

1.5.1 血清激素水平测定 细胞注射治疗后 0 d、7 d、14 d 和 28 d,取家兔静脉血检查血清激素雌二醇(E₂)、促卵泡生成素(FSH)、黄体生成素(LH)、抑制素 B(INHB)和抗苗勒管激素(AMH)表达水平。

1.5.2 卵巢组织 CYR61 和 CTGF mRNA 表达 细胞注射治疗 28 d 后,经静脉注射空气处死家兔,取一次卵巢,切取适量新鲜卵巢组织按 Trizol 法提取总 RNA,检测其纯度和浓度后,逆转录、扩增。采用实时荧光定量 PCR 技术检测组织中 CYR61 和 CTGF mRNA 表达量。

1.5.3 蛋白免疫印迹法检测卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白表达 切取适量新鲜卵巢组织于液氮中速冻,组织研磨后,加入 1000 μL RIPA 裂解液,匀浆、裂解,12000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。然后,采用蛋白免疫印迹法检测卵巢组织中 CYR61 和 CTGF 蛋白表达情况,获得的图片采用 Image J 1.8.0 软件对灰度值进行分析。

1.5.4 HE 染色 取部分组织放入 4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋后切片、HE 染色,计算卵巢中生长卵泡、封闭卵泡与黄体数。

1.5.5 免疫组化检测卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白表达 将剩余组织放入 4%多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋后,切片、脱蜡、封闭后,一抗孵育过夜。二抗于常温下孵育 30 min 后,清洗、显色。然后滴加 200 μL 苏木素染液孵育 30 s,封片、拍照,并对平均光密度值进行统计、分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,以 t 检验作差异显著性分析。 $P < 0.05$ 为方差有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 E₂、FSH 水平测定

治疗前, 模型组和治疗组家兔血清 E₂ 和 FSH 水平均无显

著差异 ($P>0.05$)。治疗组家兔治疗后血清 E₂ 水平上升, FSH 水平下降, 与模型组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。随着治疗时间延长, 治疗组家兔血清 E₂ 和 FSH 水平周期性波动, 见表 1。

表 1 两组家兔不同时间点 E₂ 和 FSH 水平比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of E₂ and FSH levels of two groups of rabbits at different time points ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Surveillance project	Groups	0 d	7 d	14 d	28 d
E ₂ (pg/mL)	Model group	477.78± 4.57	433.86± 6.09	427.56± 5.09	408.38± 4.68
	Treatment group	476.98± 5.48	607.22± 5.71*	515.32± 3.00*	614.38± 8.02*
FSH(mIU/mL)	Model group	65.68± 1.18	70.60± 1.90	76.74± 0.82	79.64± 1.24
	Treatment group	64.90± 1.54	50.30± 1.33*	59.38± 1.05*	42.78± 1.51*

Note: *Compared with the model group, $P<0.05$.

2.2 卵巢储备功能比较

治疗前, 模型组和治疗组家兔血清 FSH/LH、INHB 和 AMH 水平均无显著差异 ($P>0.05$)。与模型组相比, 治疗后治

疗组家兔血清 FSH/LH 均无显著差异 ($P>0.05$); 血清 INHB 表达水平显著升高 ($P<0.05$); 血清 AMH 表达水平显著升高, 治疗 28 d 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 两组家兔卵巢储备功能比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of ovarian reserve function of the two groups of rabbits ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Surveillance project	Groups	0 d	7 d	14 d	28 d
FSH/LH	Model group	1.60± 0.27	1.59± 0.25	1.59± 0.27	1.59± 0.29
	Treatment group	1.56± 0.04	1.55± 0.06	1.55± 0.08	1.57± 0.12
INHB(pg/mL)	Model group	923.3± 58.7	791.7± 13.7	780.4± 15.2	755.4± 10.6
	Treatment group	925.7± 65.0	935.2± 6.7*	971.0± 7.6*	987.0± 6.8*
AMH(ng/mL)	Model group	10.70± 1.57	10.98± 1.61	11.26± 1.66	11.44± 1.69
	Treatment group	10.64± 1.69	11.42± 0.89	12.00± 0.97	13.48± 0.74*

Note: *Compared with the model group, $P<0.05$.

2.3 卵巢组织 CYR61 和 CTGF mRNA 表达

治疗 28 d 后, 与模型组相比, 治疗组家兔卵巢组织中

CYR61 和 CTGF mRNA 相对表达量均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 3。

表 3 两组家兔卵巢组织 CYR61 和 CTGF mRNA 相对表达量比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the relative expression of CYR61 and CTGF mRNA in the ovarian tissues of the two groups of rabbits ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Groups	CYR61 mRNA	CTGF mRNA
Model group	0.0031± 0.0003	0.0019± 0.0003
Treatment group	0.0103± 0.0006*	0.0162± 0.0005*

Note: *Compared with the model group, $P<0.05$.

2.4 蛋白免疫印迹法检测卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白表达

治疗 28 d 后, 与模型组相比, 治疗组家兔卵巢组织中

CYR61 和 CTGF 蛋白相对灰度值均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 4。

表 4 两组家兔卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白相对灰度值比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative gray values of CYR61 and CTGF proteins in the ovarian tissues of the two groups of rabbits ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Groups	CYR61 relative gray value	CTGF relative gray value
Model group	0.39± 0.07	0.20± 0.05
Treatment group	0.76± 0.04*	0.66± 0.05*

Note: *Compared with the model group, $P<0.05$.

2.5 卵巢组织 HE 染色结果

治疗 28 d 后, 与模型组相比, 治疗组家兔卵巢组织中生长

卵泡数显著升高, 封闭卵泡数和黄体数均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 5。

表 5 两组家兔卵巢组织卵泡等计数比较($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of follicle counts in ovarian tissue of two groups of rabbits ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Groups	Growing follicle	Closed follicles	Corpora luteum
Model group	18.0 $\pm$ 5.4	22.2 $\pm$ 4.4	15.4 $\pm$ 2.1
Treatment group	28.4 $\pm$ 3.6*	11.0 $\pm$ 2.5*	10.0 $\pm$ 1.2*

Note: *Compared with the model group, $P<0.05$.

2.6 免疫组化检测卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白表达

治疗 28 d 后,与模型组相比,治疗组家兔卵巢组织中

CYR61 和 CTGF 蛋白平均光密度均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 6。

表 6 两组家兔卵巢组织 CYR61 和 CTGF 蛋白平均光密度比较($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of the average optical density of CYR61 and CTGF protein in ovarian tissues of two groups of rabbits ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Groups	CYR61 average optical density	CTGF average optical density
Model group	0.169 $\pm$ 0.006	0.196 $\pm$ 0.005
Treatment group	0.222 $\pm$ 0.006*	0.229 $\pm$ 0.007*

Note: *Compared with the model group, $P<0.05$.

3 讨论

POF 是由多种病因导致的卵泡功能衰退,国外普通人群的发病率约为 1%,中国约为 1%~3.8%,其中特发性 POF 约占 80%^[13,14]。POF 发病率近年来呈上升趋势,已成为威胁女性生殖系统健康的最大问题之一。POF 的致病因素较多,发病机制尚不明确。目前,临床上常用激素替代疗法进行治疗,该方法虽然有一定的缓解作用,但无法从根本上修复卵巢,恢复卵巢功能^[15]。干细胞被誉为医学界的“万用细胞”,具有自我复制和多向分化潜能,研究证实间充质干细胞(mesenchyma stem cell, MSCs)对卵巢功能具有一定的修复作用^[16,17]。MSCs 是来源于中胚层的成体干细胞,存在于多种组织器官中,如骨髓、脐带、脐血、胎盘、脂肪组织等^[18,19],其中脐带间充质干细胞(Umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)取材简单,来源广泛,易于收集、保存,可保证实验室和临床应用,应用前景广阔。研究证实,UCMSCs 对糖尿病^[20]、类风湿关节炎^[21]、肝衰竭^[22]、神经障碍性疾病^[23]等均有较好的修复和治疗效果。Mu Y^[24]研究表明, MSCs 通过调节胰岛素靶器官和胰岛的巨噬细胞极化和自噬恢复,改善 T2D 患者的胰岛素抵抗和 β 细胞功能。Shichang Zhang^[25]等研究表明,UCMSCs 可通过改变巨噬细胞表型,抑制炎症因子的产生,促进血管内皮细胞功能的恢复,从而促进糖尿病小鼠创面愈合。Bi Z-M 等^[26]证明 HUCMSCs 可能通过抑制 miR-199 激活 KGF 而改善肝硬化。UCMSCs 可通过成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)抑制类风湿关节炎(RA)中钙粘蛋白-11(CDH11)的表达来治疗类风湿性关节炎。近年来多项研究证明,UCMSCs 可通过增加卵泡数量,提高雌激素水平,减少颗粒细胞凋亡,恢复卵巢,其作用机制可能为 UCMSCs 可通过旁分泌方式促进卵巢组织中 VEGF、HGF 和 IGF 等表达,改善卵巢功能。也可能是 UCMSCs 通过增加 SOD2 和过氧化氢酶的表达,增强抗氧化和抗凋亡酶基因表达,减少细胞凋亡,恢复卵巢氧化损伤。本研究结果表明,UCMSCs 对可通过上调 CYR61 和 CTGF 的表达,促进卵泡生成,恢复卵巢功能,达到治疗卵巢早衰的作用。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是临床上常用的烷化剂类细胞毒性药物,用于恶性肿瘤、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾病综合征等治疗^[27-29]。CTX 会造成颗粒细胞损伤,可通过 DNA 链的断裂,抑制蛋白合成,对卵巢产生不可逆损伤,造成卵巢功能障碍。本研究选择 CTX 经腹腔连续注射 2 d 建立卵巢早衰家兔模型。

卵巢储备功能即卵巢皮质区卵泡生长、发育、形成可受精卵母细胞的能力,卵巢储备功能的评估就是评估对卵巢卵泡数量和质量等的评估,临床上多用性激素检测和妇科阴道超声两种方法,其中 E2、FSH、FSH/LH、INHB、AMH 是常用参考指标。AMH 为转化生长因子 β 超家族的一员,是一种二聚糖蛋白,由卵巢窦状卵泡、窦前卵泡中的颗粒细胞分泌,与女性卵巢功能密切联系^[30]。INHB 由卵巢中、小窦卵泡的颗粒细胞产生,变化较 FSH、E₂、LH 等有更早、更准确的反应卵巢储备功能^[31]。E₂、FSH、FSH/LH、INHB、AMH 联合检测可提高卵巢储备功能评价准确性,因此选用 5 个指标联合检测进行评价。

CYR61 是 CNN 家族成员,是一个重要的信号传导因袭,对细胞的黏附、迁移、增殖、炎症反应、血管生成等生理和病理过程中发挥这重要的调节作用。另外, CYR61 受雌激素激素调节,与卵巢上皮癌和子宫内膜异位症的发生和发展密切相关^[32]。CTGF 也是 CNN 家族成员,是一种多效能生物因子,参与组织的纤维化、转移、增殖等过程,在卵巢癌、多囊卵巢综合征患者体内高表达^[33]。血管内皮生长因子(VEGF),是一种促进血管生成的因子, CYR61 和 CTGF 均可上调 VEGF 的表达,间接促进血管生成。张娟等^[34]研究表明 UCMSCs 可能通过上调 CYR61 和 CTGF 在局部组织内的表达,影响 VEGF 等表达,促进新生血管的形成,从而促进卵泡再生和组织修复,与本研究结果类似。

POF 的发病机制与代谢异常、化疗药物损伤、自身免疫功能、遗传等相关,激素替代治疗虽可改变一些临床症状,但不能有效恢复卵巢功能和生育力。近年来,大量研究表明不同来源的间充质干细胞可通过对卵巢组织微环境、激素水平、卵巢发育等均有一定的改善效果。但 UCMSCs 在临床上的应用较少,体内试验主要集中在对小鼠和大鼠的研究,对其他动物的研究

较少。本研究通过腹腔连续注射环磷酰胺建立卵巢早衰家兔模型,观察了 UCMSCs 的治疗效果并全面分析了其对相关激素水平、卵巢功能等影响。结果显示,UCMSCs 对 POF 具有较显著的治疗效果。本研究揭示了 UCMSCs 对 POF 的作用机制,详细分析了 UCMSCs 对卵巢早衰家兔的治疗效果,为 UCMSCs 应用于临床卵巢衰竭治疗提供了一定的理论依据。

综上所述,UCMSCs 对 POF 具有一定治疗效果,可能与 CYR61 和 CTGF 表达上调,卵泡生成增多等有关。本研究为 UCMSCs 应用于临床卵巢衰竭治疗提供了一定的理论依据,但在临床上应用剂量、毒副作用等亟待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Lee Da-Hye, Pei Chang-Zhu, Song Jae-Yun, et al. Identification of serum biomarkers for premature ovarian failure [J]. *Biochimica biophysica acta. Proteins and proteomics*, 2019, 1867(3): 219-226
- [2] Lianli He, Li Ling, Tianqin Wei, et al. Ginsenoside Rg1 improves fertility and reduces ovarian pathological damages in premature ovarian failure model of mice [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2017, 242(7): 683-691
- [3] Duros S, Pimentel C, Grynberg M. Management of premature ovarian failure in the era of fertility preservation(Review)[J]. *Medecine Therapeutique Medecine de la Reproduction, Gynecologie et Endocrinologie*, 2018, 20(1): 59-69
- [4] Liu TE, Wang Suwei, Zhang Lina, et al. Growth hormone treatment of premature ovarian failure in a mouse model via stimulation of the Notch-1 signaling pathway [J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2016, 12(1): 215-221
- [5] Madani T, Aghdani N, Mirzadeh E, et al. Evaluating of safety and efficacy of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AMSC) transplantation in women with premature ovarian failure[J]. *BioImpacts*, 2018, 8: e18
- [6] Sook Young Yoon, Jung Ah Yoon, Mira Park, et al. Recovery of ovarian function by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in cisplatin-induced premature ovarian failure in mice[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020, 11(1): 1-13
- [7] Hongxing Li, Wei Zhao, Li Wang, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit apoptosis of granulosa cells induced by IRE1 α pathway in autoimmune POF mice [J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(8): 899-909
- [8] Boyd Alexander, Newsome Philip, Lu Wei-Yu. The role of stem cells in liver injury and repair[J]. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 2019, 13(7): 623-631
- [9] Shao Xiaowen, Ai Guihai, Wang Lian, et al. Adipose-derived stem cells transplantation improves endometrial injury repair [J]. *Zygote (Cambridge, England)*, 2019, 27(6): 367-374
- [10] Ross Christina L, Ang Dennis C, Almeida-Porada Graça. Targeting Mesenchymal Stromal Cells/Pericytes (MSCs) With Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) Has the Potential to Treat Rheumatoid Arthritis[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: e266
- [11] Aref Delkhosh, Masoud Delashoub, Ali Asghar Tehrani, et al. Upregulation of FSHR and PCNA by administration of coenzyme Q10 on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a mouse model[J]. *J Biochemical Molecular Toxicology*, 2019, 33(11): e12
- [12] Jalalie Ladan, Rezaee Mohammad Ali, Rezaie Mohammad Jafar, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve morphometric and histopathologic changes of cyclophosphamide-injured ovarian follicles in mouse model of premature ovarian failure [J]. *Acta Histochemica*, 2021, 123(1): e151658
- [13] Ivell Richard, Anand-Ivell Ravinder. Insulin-like peptide 3 (INSL3) is a major regulator of female reproductive physiology[J]. *Human reproduction update*, 2018, 24(6): 639-651
- [14] 肖清丰,付蓓,周慧芳.补肾祛瘀针法治疗卵巢早衰的临床观察[J]. *湖北中医杂志*, 2015, 37(1): 58-59
- [15] Nikita Naredi, K. Sandeep, V.D.S. Jamwal. Can hormone replacement therapy prior to oocyte donation cycle in women with premature ovarian failure improve pregnancy rate? [J]. *Medical Journal Armed Forces India*, 2013, 69(4): 357-360
- [16] Yoon Sook Young. Mesenchymal stem cells for restoration of ovarian function [J]. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 2019, 46(1): 1-7
- [17] Yanjun Yang, Lei Lei, Shanshan Wang, et al. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on a collagen scaffold improves ovarian function in a premature ovarian failure model of mice[J]. *Springer US*, 2019, 55(4): 302-311
- [18] Masoumeh Alishahi, Amir Anbiyaiee, Maryam Farzaneh, et al. Khoshnam. Human Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury [J]. *Springer US*, 2020, 15(4): 340-348
- [19] Darshana Kadekar, Vijayanti Kale, Lalita Limaye. Differential ability of MSCs isolated from placenta and cord as feeders for supporting ex vivo expansion of umbilical cord blood derived CD34+cells [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, 6(1): 1-20
- [20] Zhao Li-Ling, Xie Rui, Zeng Pingyu, et al. The Promotive Effects of ECFCs and UCMSCs Transplantation in Combination on Wound Healing in Diabetic Mice[J]. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2018, 8(3): 317-327
- [21] Zhao C, Zhang L, Kong W, et al. Umbilical Cord- Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Cadherin-11 Expression by Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 137695-137610
- [22] Fang XQ, Zhang JF, Song HY, et al. Effect of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on immune function and prognosis of patients with decompensated hepatitis B cirrhosis[J]. *Zhonghua gan zang bing za zhi*, 2016, 24(12): 907-910
- [23] Mahdi Eskandarian Boroujeni, Mossa Gardaneh. Umbilical cord:an unlimited source of cells differentiable towards dopaminergic neurons [J]. *Neural Regeneration Research*, 2017, 12(7): 1186-1192
- [24] Mu Y. MSCs improved insulin resistance and beta cell function in type 2 diabetes through modulation of macrophage polarisation and restoration of autophagy in insulin-targeted organs and islets[J]. *DIA-BETOLOGIA*, 2018, 61: S190-S191
- [25] Zhang Shichang, Chen Li, Zhang Guoying, et al. Umbilical cord-matrix stem cells induce the functional restoration of vascular endothelial cells and enhance skin wound healing in diabetic mice via the polarized macrophages [J]. *Stem cell research & therapy*, 2020, 11(1): 39-39
- [26] Bi ZM, Zhou QF, Geng Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate experimental cirrhosis through activation of keratinocyte growth factor by suppressing microRNA-199 [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2016, 20 (23): 4905-4912

- Orthop Trauma, 2018, 32(4): e123-e128
- [13] Nwankwo EC Jr, Labaran LA, Athas V, et al. Pathogenesis of Post-traumatic Osteoarthritis of the Ankle [J]. Orthop Clin North Am, 2019, 50(4): 529-537
- [14] 戚晓阳, 邱旭升, 施鸿飞, 等. 踝关节骨折术后关节功能的影响因素分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2017, 19(9): 762-768
- [15] Kang C, Hwang DS, Lee JK, et al. Screw Fixation of the Posterior Malleolus Fragment in Ankle Fracture [J]. Foot Ankle Int, 2019, 40(11): 1288-1294
- [16] 胡长青, 连勇, 范斌, 等. 胫骨平行定位法置入下胫腓螺钉治疗下胫腓联合分离的踝关节骨折[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(21): 1293
- [17] Smeeing DP, Houwert RM, Briet JP, et al. Weight-bearing and mobilization in the postoperative care of ankle fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and cohort studies[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0118320
- [18] 李昊, 卫志强, 乔梁, 等. 经皮加压空心螺钉内固定术对非粉碎性踝关节骨折患者术后骨折愈合及踝关节功能的影响[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(16): 2776-2778
- [19] 王永永, 贾代良, 张刚, 等. 两种固定方式治疗旋后外旋IV° 踝关节骨折合并下胫腓联合分离的疗效分析 [J]. 济宁医学院学报, 2017, 40(1): 28-31
- [20] Lilyquist M, Shaw A, Latz K, et al. Cadaveric Analysis of the Distal Tibiofibular Syndesmosis[J]. Foot Ankle Int, 2016, 37(8): 882-890
- [21] 李偏, 李小荣, 梁孟波. 双 Endobutton 钢板内固定治疗踝关节骨折合并下胫腓联合损伤疗效分析 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2016, 31(12): 1332-1333
- [22] 李建鹏, 陈玉宏, 尹梦帆, 等. 免打结锁扣带样钢板治疗下胫腓联合损伤合并复杂踝关节骨折 [J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(18): 1648-1652
- [23] 王林杰, 侯煜, 高文山, 等. 非刚性与传统螺钉内固定治疗闭合性踝关节骨折合并下胫腓损伤的疗效对比 [J]. 中国临床研究, 2017, 30(3): 374-376
- [24] 叶嘉豪, 杜绍龙, 陈浩龙, 等. 不同治疗方案在踝关节骨折并发下胫腓联合损伤患者中的疗效对比[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(9): 141-143
- [25] Olerud C, Molander H, Olsson T, et al. Ankle fractures treated with non-rigid internal fixation[J]. Injury, 1986, 17(1): 23-27
- [26] 麦建林, 郭建恩, 曾淳, 等. 踝关节骨折合并下胫腓联合韧带损伤的手术疗效分析[J]. 河南外科学杂志, 2018, 24(2): 75-76
- [27] Randall RM, Nagle T, Steckler A, et al. Dual Nonlocked Plating as an Alternative to Locked Plating for Comminuted Distal Fibula Fractures: A Biomechanical Comparison Study [J]. J Foot Ankle Surg, 2019, 58(5): 916-919
- [28] 李兴军, 保超宇, 李骅, 等. 踝关节有限元模型的建立及其生物力学研究[J]. 中华创伤杂志, 2018, 34(9): 827-832
- [29] Wang L, Wang B, Xu G, et al. Biomechanical comparison of bionic, screw and Endobutton fixation in the treatment of tibiofibular syndesmosis injuries[J]. Int Orthop, 2016, 40(2): 307-314
- [30] 张义, 金字, 张擎柱, 等. 下胫腓联合损伤单枚螺钉与双枚螺钉固定的生物力学研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(3): 553-556

(上接第 2436 页)

- [27] Srabantika Mallick, Atish Barua, Goutam Paul, et al. Novel combination of 2-methoxyestradiol and cyclophosphamide enhances the anti-neoplastic and pro-apoptotic effects on S-180 ascitic tumour cells[J]. J Cell Communication Signaling, 2018, 12(2): 467-478
- [28] Chowdhury AC, Misra DP, Patro PS, et al. Toxic epidermal necrolysis due to therapy with cyclophosphamide and mesna. A case report of a patient with seronegative rheumatoid arthritis and rheumatoid vasculitis[J]. Zeitschrift fur Rheumatologie, 2016, 75(2): 200-202
- [29] Sudhir Mehta, Vikas Makkar, P Soha, et al. Cyclophosphamide-induced melanonychia in a patient with steroid dependent nephrotic syndrome: A rare presentation[J]. Saudi Journal Kidney Diseases and Transplantation, 2019, 30(4): 978-981
- [30] 曲晓力. AMH、LH、FSH、E2 的水平与卵巢功能减退的相关性分析 [J]. 中外女性健康研究, 2020, (6): 16-17+19
- [31] 苏比努尔买买提, 祖丽胡玛尔艾尼外尔, 阿比达阿布都卡德尔. AMH 和 INHB 与卵巢储备功能关系的研究进展[J]. 中国保健营养, 2018, 8: 43-44
- [32] 江玉, 孙磊, 张英等. 肿瘤相关成纤维细胞与上皮性卵巢癌顺铂耐药性的研究[J/OL]. 安徽医科大学学报, 2021, (2): 255-260
- [33] Attia, Ghalia Mahfouz, Elmansy, Rasha Ahmed, ELSayed, Mohamed H. Erratum to: Metformin Decreases the Expression of VEGF-A and CTGF-1 and Improves Histological, Ultrastructural and Hormonal Changes in Adult Rat Polycystic Ovary [J]. Folia Biologica, 2019, 67(4): e190
- [34] 张娟, 王晶, 周丽, 等. 脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔性激素、CYR61 和 CTGF 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 56-62