

人脐带间充质干细胞联合高压氧治疗对高原缺氧小鼠卵巢损伤的修复作用及其机制

杜静^{1,2}, 常瑞亚¹, 王玲^{1,3*}

¹解放军联勤保障部队第940医院生殖医学中心, 甘肃兰州 730050; ²四川省人民医院川东医院(达州市第一人民医院)生殖医学中心, 四川达州 635000; ³解放军联勤保障部队第940医院甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 甘肃兰州 730050

[中图分类号] R594.3; R711.75

[文献标志码] A

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2600.2026.0708

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 杜静, 常瑞亚, 王玲. 人脐带间充质干细胞联合高压氧治疗对高原缺氧小鼠卵巢损伤的修复作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(20): 27-36.

[收稿日期] 2025-12-16

[录用日期] 2026-03-30

[上线日期] 2026-07-08

[摘要] **目的** 探究人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)联合高压氧治疗(HBO)对模拟高原环境下小鼠卵巢损伤的修复作用。**方法** 将64只BALB/c雌性小鼠随机分为对照组、模型组、hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组, 每组16只。除对照组外, 小鼠于模拟海拔6500米的低压氧舱中饲养15 d, 建立卵巢缺氧损伤模型。hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组小鼠尾静脉注射0.2 ml hUCMSCs(1×10^6 个细胞), 1次/周, 共5次, 对照组和模型组注射等量生理盐水; hUCMSCs+HBO组同时接受HBO干预, 100 min/次, 1次/d, 共30 d。观察小鼠的一般状况、体重、动情周期、血清性激素水平、卵巢湿重指数、各级卵泡计数, 卵巢组织病理学变化、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、Smad家族成员3(Smad3)蛋白表达水平。评估各组小鼠生育能力和子代一般情况。**结果** 干预30 d后, 与对照组比较, 模型组小鼠体重、双侧卵巢湿重、卵巢指数、原始卵泡数量、TGF- β_1 表达水平、窝仔数均明显降低或减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 卵巢组织间质区域纤维化面积占比明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组小鼠体重、卵巢湿重与卵巢指数均明显增高($P < 0.001$), 卵巢组织间质区域纤维化面积占比明显降低($P < 0.05$); hUCMSCs+HBO组TGF- β_1 、Smad3蛋白表达水平明显增高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 窝仔数明显增多($P < 0.05$)。各组小鼠血清性激素水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组子代小鼠除数量外, 一般情况无明显差异。**结论** 对模拟高原缺氧环境引起的小鼠卵巢损伤, hUCMSCs联合HBO干预的修复作用优于单一hUCMSCs, 其机制可能与减缓组织纤维化、上调TGF- β_1 /Smad3信号通路及促进卵泡生长有关。

[关键词] 高原; 卵巢损伤; 高压氧; 人脐带间充质干细胞; 联合治疗

Restoration of ovarian function following hypoxic injury in a murine model of simulated high-altitude exposure

Du Jing^{1,2}, Chang Rui-Ya¹, Wang Ling^{1,3*}

¹Reproductive Medicine Center, ²Gansu Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine, 940th Hospital, Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou, Gansu 730050, China

³Reproductive Medicine Center, Chuandong Hospital of Sichuan Provincial People's Hospital/Dazhou First People's Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China

*Corresponding author, E-mail: SZYXZX2020@163.com

This work was supported by the Military Logistics Research Project (2023HQZZ-04)

[Abstract] **Objective** To evaluate whether the addition of hyperbaric oxygen (HBO) to human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUCMSC) therapy offers incremental benefits in repairing hypoxic ovarian injury evoked by simulated high-altitude

[基金项目] 军队后勤科研项目(2023HQZZ-04)

[作者简介] 杜静, 硕士研究生, 主要从事高原环境致生殖功能损伤防治方面的研究

[通信作者] 王玲, E-mail: SZYXZX2020@163.com

exposure in mice. **Methods** A total of 64 female BALB/c mice were randomized into control group, model group, hUCMSCs group, and hUCMSCs+HBO group, with 16 mice in each group. Except for control group, all mice were placed in a hypobaric chamber mimicking an altitude of 6500 m for 15 days to generate ovarian hypoxic lesions. Mice in hUCMSCs group and hUCMSCs+HBO group received 0.2 ml of hUCMSC suspension (1×10^6 cells) via the tail vein once per week for five consecutive weeks, whereas mice in control group and model group were given sterile saline at matching volumes. Mice in hUCMSCs+HBO group was additionally subjected to 100-min HBO sessions once daily for 30 days. Multiple parameters were recorded, including general health status, body-weight fluctuations, estrous cycle regularity, serum sex hormone concentrations, ovarian wet-weight index, differential follicle counts, ovarian histomorphological features, and protein levels of TGF- β 1 and Smad3 as determined by immunoblotting. Fertility performance and offspring condition were also documented. **Results** After 30 days of treatment, compared with control group, mice in model group showed a significant reduction in body weight, bilateral ovarian wet weight, ovarian index, primordial follicle stock, TGF- β 1 protein content, and litter production ($P < 0.01$ or $P < 0.001$), concurrent with a pronounced expansion of fibrotic deposition within the ovarian stroma ($P < 0.05$). Compared with model group, mice in hUCMSCs group and hUCMSCs+HBO group showed a significant increase in body weight, ovarian mass, and ovarian index ($P < 0.001$), and a notable regression of stromal fibrotic areas ($P < 0.05$); and mice in hUCMSCs+HBO group showed a significant increase of TGF- β 1 and Smad3 expression ($P < 0.01$ or $P < 0.001$) and augmented litter size ($P < 0.05$). Serum sex hormone assays revealed no significant intergroup differences ($P > 0.05$). Other than litter-size variations, all offspring appeared phenotypically unremarkable across four groups. **Conclusions** In the setting of simulated high-altitude-induced ovarian injury, combining HBO with hUCMSCs produces superior restorative outcomes compared with hUCMSC administration alone. The improved efficacy likely arises from coordinated actions involving fibrosis mitigation, TGF- β 1/Smad3 pathway engagement, and stimulation of follicular maturation.

[Key words] plateau; ovarian injury; hyperbaric oxygen; human umbilical cord mesenchymal stem cells; combination therapy

高原地区低压、低氧、寒冷、干燥及强紫外线照射的环境,可造成急进高原人员的一系列应激性损伤。其中,低压低氧是改变人体血流动力学并诱发应激反应的关键因素之一,而生殖系统对低氧尤为敏感^[1-4]。早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是女性因多种因素刺激导致的卵巢功能减退,如放化疗、手术损伤、遗传性、自身免疫性疾病等。POI常表现为内分泌紊乱、卵泡受损及生育力下降等,若不及时干预可发展为卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)^[5-6]。本课题组前期研究显示,高原环境可导致小鼠卵巢功能受损及内分泌紊乱^[7-8];钟艳等^[9]关于雌鼠生殖系统的研究也得出类似结论。

研究显示,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及其外泌体可减轻自噬及缺氧造成的氧化应激,减少颗粒细胞凋亡及促进血管生成,维持正常的性激素水平并减轻卵巢组织的结构性损伤^[10-13]。人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)因来源广泛且伦理争议较小,成为卵巢损伤修复研究的重要选择^[14-15]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)可迅速提高肺氧分压、增加组织含氧量,快速改善缺血缺氧状态,减少再灌注损伤及局部CO₂潴留,减轻缺氧损伤^[16-21]。本研究采用hUCMSCs联合HBO对高原缺氧环境下的POI小鼠模型进行干预,观察其对小鼠卵巢组织损伤的修复作用及相关机制,旨在为高原缺氧环境下的生育力保护提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 6周龄SPF级BALB/c雌性小鼠64只、雄性小鼠12只,体重18~21 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2024-0001;合格证号:110324241101775671]。小鼠在室温18—22℃、湿度60%±10%、昼夜比=1:1的环境下适应性饲养2周。选择连续2周动情周期正常的64只雌性小鼠,按随机数表法分为对照组、模型组、hUCMSCs组、hUCMSCs+HBO组($n=16$)。对照组外的雌性小鼠均制备卵巢缺氧损伤模型。本研究获解放军联勤保障部队第940医院伦理委员会审批(2023KYLL178)。

1.2 主要试剂与仪器 MSC无血清基础培养基套装、胎牛血清、胰酶、细胞冻存液(46100802、46162209、46206003、46180201、46084603,浙江百迪生物科技有限公司);小鼠生殖性激素酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司);兔抗转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、Smad家族成员3(Smad3)抗体,山羊抗兔IgG二抗(ab215715、ab84177、ab205718,英国Abcam公司);兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(9880689,江苏亲科生物研究中心有限公司)。单人双面净化工作台(SW-CJ-IF型,苏州净化设备有限公司);CO₂培养箱(美国赛默飞世尔科技公司);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);扫描电子显微镜(日本日立公司);透射电子显微镜(JEM-

1400FLASH, 日本电子株式会社); 低温高通量组织研磨仪(Scientz-48L, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 全波长多功能微孔板分析系统(Infinite M200PRO, 瑞士 TECAN 公司); 病理切片机(RM2016, 上海徕卡仪器有限公司); 流式细胞仪(LongCyte™ C2060, 北京层浪生物科技有限公司); 动物高压氧舱(ProOx-820V, 上海塔望智能科技有限公司); 低压低氧动物试验舱(贵州风雷航空军械有限责任公司)。

1.3 hUCMSCs 分离、培养、鉴定与诱导分化 经解放军联勤保障部队第 940 医院伦理委员会审批, 所有入组产妇均自愿签署知情同意书。

1.3.1 hUCMSCs 分离、培养 选择 30 例无基础疾病、妊娠并发症、传染病、遗传病及羊水污染等高危因素且定期产检产妇。经产妇同意, 待胎盘娩出后, 在无菌条件下留取 10 cm 脐带血管无迂曲扩张、华通胶组织丰富的新鲜脐带组织, 立即放入 4℃ 组织保存液中保存并 1h 内转送至生物超净工作台。立即使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗数次, 75%乙醇消毒 10~20 s 后再次清洗 2 次, 使用眼科镊及眼科剪剔除脐带外包膜及动静脉血管, 将留取的华通胶组织剪碎后均匀贴附于 T75 细胞培养瓶底部, 加入适量完全培养基, 放入 37℃、5%的 CO₂ 培养箱中静置培养 3 d, 随后每 3 天半量换液, 观察组织周围贴壁细胞生长情况, 待细胞密度达 70%~80% 融合时, 用重组胰蛋白酶(含 EDTA)消化 2 min, 离心后 1 ml 完全培养基重悬, 以 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 密度传代, 记为第 1 代细胞(P1)。

1.3.2 hUCMSCs 细胞冻存及复苏 P1 贴壁细胞生长密度达 85% 以上, 用重组胰蛋白酶(含 EDTA)消化, 按照重组胰蛋白酶: 完全培养基=1:2 终止消化后离心, 加入细胞冻存液 1 ml, 按细胞冻存程序降温方式降温, 再 -80℃ 冻存。复苏将细胞冻存管迅速投入预热至 37℃ 的水浴锅中, 摇晃冻存管加速溶解, 时间 <1min, 快速放入生物超净台上, 按冻存液: 完全培养基=1:10 加入完全培养基, 离心 5 min 后去上清, 加入适量完全培养基重悬后按比例放入培养瓶中, 加入合适培养基后放入 CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 hUCMSCs 鉴定 选取细胞生长状态良好的 P3 hUCMSCs、重组胰酶消化离心后制成单细胞悬液, 分别加入 5 μl 抗人 CD105、CD73、CD90、CD29、CD44、CD45、CD34、CD19、CD11B、CD106、CD14、CD133、HLA-DR 单抗, 小鼠 IgG1、IgG2a 为同型对照, 4℃ 孵育 30 min 后行流式细胞仪检测。

1.3.4 hUCMSCs 成骨、成脂、成软骨三系诱导分化 分别在已加好明胶的六孔板和离心管内加入 $2 \times$

10^4 个细胞/ cm^2 、 $(3 \sim 4) \times 10^5$ 个细胞/ cm^2 已重悬的 P3 hUCMSCs, 分别按说明说换液及观察细胞生长情况, 适时加入成骨、成脂及成软骨诱导分化培养液。待诱导完成后按步骤分别使用茜素红、油红 O 及阿利新蓝染色, 显微镜下观察拍照。

1.4 小鼠卵巢损伤模型构建、分组干预及取材

1.4.1 模型构建和分组干预 取 4 组 64 只动情周期正常雌性小鼠适应性饲养 1 周后, 给予 0.36 mg/kg 左炔诺孕酮炔雌醚片(2 倍人体常用剂量)灌胃, 使 $\geq 80\%$ 的小鼠达动情周期同步化; 除对照组外, 其余 3 组小鼠放入模拟海拔 6500 m 高原环境的低压低氧舱, 持续饲养 15 d, 完成卵巢损伤模型构建。该模型构建方法是本课题组前期实验探索所得^[7-8]。

小鼠模型构建成功后第一天开始, hUCMSCs 组和 hUCMSCs+HBO 组每隔 7 d, 尾静脉注射 0.2 ml (1×10^6 个细胞) hUCMSCs 细胞悬液, 共 5 次。考虑到尾静脉注射相较于原位注射安全性更高且不易造成损伤, 采用小鼠安全剂量 0.2 ml/只 (1×10^6 个细胞) 的尾静脉多次注射方案, 以克服 hUCMSCs 聚团问题^[22-24]。对照组和模型组小鼠尾静脉注射等量生理盐水。hUCMSCs+HBO 组小鼠同时予以 HBO 干预: 高压氧舱参数设置为 15 min 压力上升至 0.12 MPa, 氧气浓度 $87\% \pm 2\%$, 持续稳定压力吸氧 60 min, 随后降压 25 min; 1 次/d, 共 30 d。

1.4.2 取材 小鼠模型构建成功后 30 d 取材观察。(1)血清。各组小鼠均使用 1% 戊巴比妥进行腹腔注射麻醉, 内眦静脉取血, 离心管收集静脉血(0.5~1) ml/只。室温静置 30 min~1 h, 低速(3000~5000) rpm 离心 15 min, 留取上层血清用于性激素测定, 多余血清 -80℃ 保存。(2)卵巢组织。颈椎脱臼法处死小鼠, 按解剖位置沿着子宫找到双侧卵巢组织, 并将其周围组织完整剥离后, 称重计算双侧卵巢指数(卵巢指数=双侧卵巢湿重/小鼠体质量 $\times 100\%$)。左侧卵巢组织使用 4% 多聚甲醛溶液固定、室温保存, 用于 HE 染色; 右侧卵巢留取 2 例放于电镜固定液中 4℃ 保存, 用于透射电镜检查, 其余卵巢组织于 -80℃ 低温保存, 用于后续实验。

1.5 观察指标

1.5.1 小鼠体重及动情周期 小鼠出氧舱后第一天开始, 每天 8:00 观察各组小鼠阴道脱落细胞涂片, 判断动情周期。一个动情周期为 4~5 d, 记为一个完整动情周期观察期, 即分为 6 个时间段: 分别是出氧舱后第 1~5 d、第 6~10 d、第 11~15 d、第 16~20 d、第 21~25 d、第 26~30 d。同时记录小鼠体重变化情况。

1.5.2 小鼠血清性激素水平 血清性激素抗缪勒管激素(AMH)、雌二醇(E2)、卵泡刺激素(FSH)、黄体

生成素(LH)、孕酮(PROG),均使用同一批ELISA试剂盒,按照说明书进行检测。各试剂盒测定的灵敏度分别为0.08 ng/ml(AMH)、0.29 pg/ml(E2)、0.58 mIU/ml(FSH)、0.75 mIU/ml(LH)、38.87 pg/ml(PROG)。

1.5.3 HE染色观察小鼠卵巢组织病理变化及卵泡计数 卵巢组织使用石蜡包埋法进行脱水、浸蜡、包埋,选择卵巢组织最大面进行切片,HE染色封片后在显微镜下观察拍照。光学显微镜下分别记录原始卵泡(rimordial follicle, PF)、生长卵泡(growing follicle, GF; 初级卵泡+次级卵泡+窦卵泡)、成熟卵泡(mature follicle, MF)、闭锁卵泡(atresic follicle, AF)的数量。

1.5.4 Masson染色观察小鼠卵巢组织纤维化程度 对已固定的卵巢组织进行脱水、石蜡包埋、切片(5 μ m),待Masson染色封片后,显微镜下观察拍照。使用Aipathwell®软件手动圈出待测组织区域,软件自行及人工选择纤维化阳性区域,以纤维化面积占比判断卵巢组织间质的纤维化程度:纤维化面积占比(%)=(Masson阳性面积/组织面积) $\times$ 100%。

1.5.5 小鼠卵巢组织超微结构的透射电镜观察 电镜固定液固定新鲜卵巢组织,PBS漂洗,1%锇酸避光再固定、脱水,Epon-812纯包埋剂包埋,待样本干燥后使用半薄固定、超薄切片,依次使用醋酸铀染色10~15 min、柠檬酸铅染色1~2 min、室温下染色,扫描观察并采图。

1.5.6 Western blotting检测小鼠卵巢组织TGF- β_1 、Smad3蛋白表达水平 称取20 mg卵巢组织(约4颗)剪碎,按组织:RIPA裂解液=1 mg:10 μ l,加入4颗小号匀浆珠,在已预冷完成的研磨仪中匀浆,静置15~30 min后取上清,采用BCA法测定蛋白浓度,按等质量计算各组上样体积。SDS-聚丙烯酰胺凝胶制胶、上样、电泳、电转、5%脱脂牛奶封闭2 h、洗膜、一抗4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜、洗膜、二抗孵育、再次洗膜、在目的条带位置滴加1:1等体积混匀的超敏ECL发光液在暗室中曝光成像。最后采用Image J软件分析条带灰度值,蛋白表达量以GAPDH作为内参进行分析。

1.5.7 小鼠生育力评估 每组6只雌性小鼠,另选择成熟且正常的雄鼠3只合笼,合笼时间为19:00一次日8:00,期间为黑暗环境,合笼期间记录小鼠体重及阴栓情况,出现阴栓的第2 d记录为妊娠第1天,记录小鼠窝仔数及子代出生体重。

1.6 统计学处理 采用SPSS 27.0软件进行统计分析,GraphPad Prism 9软件作图。计量资料符合正态分布者以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法;非正态分布者采

用K个独立样本非参数检验。所有实验至少重复三次。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUCMSCs培养、鉴定及诱导分化

2.1.1 hUCMSCs培养 原代hUCMSCs细胞呈梭形生长,细胞生长状态良好,融合度达60%~70%;将复苏后细胞传第三代(P3),细胞生长状态良好,约第3天可铺满培养瓶瓶底,呈旋涡状可见细胞生长(图1A-C)。

2.1.2 hUCMSCs鉴定 取P3 hUCMSCs,流式细胞仪细胞表面抗原检测结果显示,CD105(99.94%)、CD90(99.93%)、CD73(99.97%)、CD44(99.85%)、CD29(99.99%)、CD133(0.26%)、CD106(0.45%)、CD45(0.01%)、CD34(0.04%)、CD19(0.05%)、CD14(0.00%)、CD11B(0.13%)、HLA-DR(0.06%)(附图1),均符合国际细胞治疗协会提出的MSCs鉴定标准,提示培养细胞为高纯度的hUCMSCs,且复苏率较高。

2.1.3 hUCMSCs的诱导分化 随着成脂诱导分化时间的延长,hUCMSCs由梭形逐渐变圆,2周后使用油红O染色可见红色脂滴形成;成骨诱导分化3周后使用茜素红染色,显微镜下可见红色钙结节形成;成软骨诱导分化3周,石蜡包埋切片,阿利新蓝染色后呈蓝色(图1D-F)。提示培养的hUCMSCs具有多向分化潜能,符合hUCMSCs特征。

2.2 各组小鼠经实验干预30 d后指标变化

2.2.1 小鼠一般情况、体重及动情周期的变化 各组小鼠毛发有光泽,饮食习性、活动度及灵敏度均良好,无明显差异(附图2)。干预30 d后,与对照组比较,模型组小鼠体重明显降低($P<0.001$),hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组小鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组小鼠体重明显增加($P<0.001$,图2)。

小鼠正常动情周期为4~5 d。对照组小鼠动情周期正常,模型组有25%(4/16)的小鼠动情周期紊乱,动情周期延长,停滞在动情间期或动情后期,部分小鼠阴道口可见少许淡粉色分泌物。hUCMSCs组及hUCMSCs+HBO组均恢复正常动情周期。

2.2.2 小鼠双侧卵巢湿重及卵巢指数 与对照组比较,模型组小鼠双侧卵巢湿重及卵巢指数均明显降低($P<0.001$);与模型组比较,hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组小鼠卵巢湿重与卵巢指数均明显增高($P<0.001$);与hUCMSCs组比较,hUCMSCs+HBO组的卵巢湿重及卵巢指数差异无统计学意义($P>0.05$,图3)。

2.2.3 小鼠血清生殖性激素水平变化 各组小鼠血

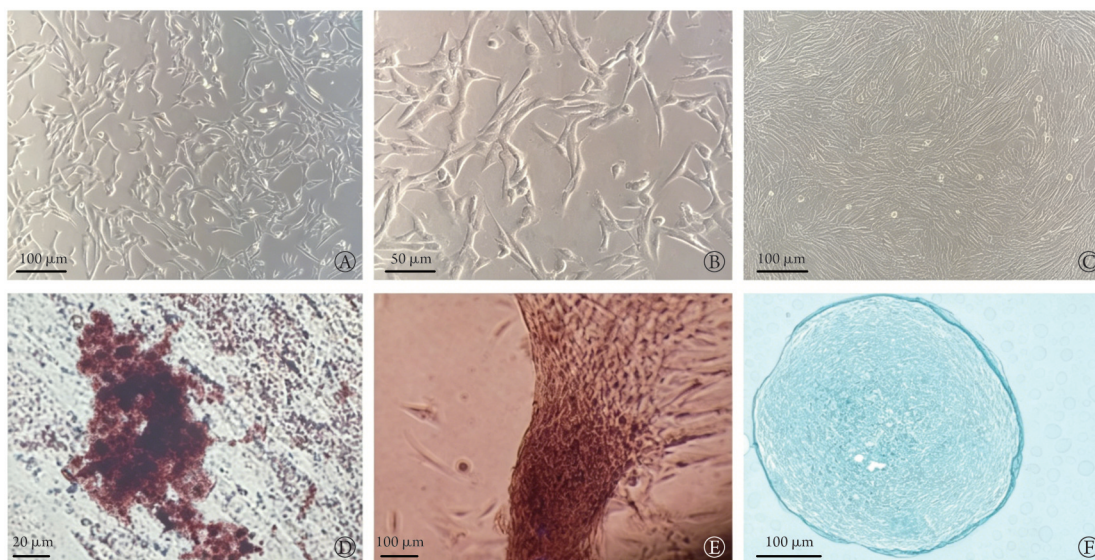


图1 人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)形态及其诱导分化

Fig.1 Cell morphology and induced differentiation of hUCMSCs

A. 原代细胞贴壁生长情况; B. 原代细胞形态; C. 原代细胞复苏后第三代(P3)生长情况; D. 成脂诱导分化; E. 成骨诱导分化; F. 成软骨诱导分化

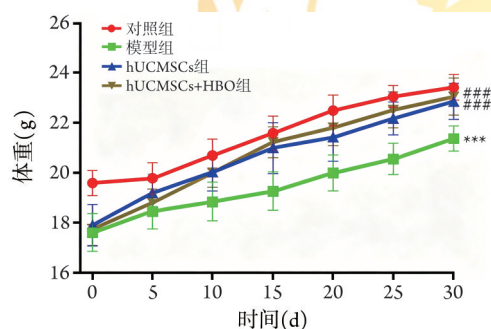


图2 各组小鼠体重比较

Fig.2 Comparison of body mass of mice in each group

与对照组比较, $^{***}P<0.001$; 与模型组比较, $^{***}P<0.001$. hUCMSCs. 人脐带间充质干细胞; HBO. 高压氧

清AMH、E2、PROG、FSH、LH水平比较, 均差异无统计学意义($P>0.05$, 图3)。

2.2.4 小鼠卵巢组织形态学改变及卵泡计数 与对照组比较, 模型组小鼠卵巢萎缩、体积缩小, 部分可见淤血区; hUCMSCs+HBO组卵巢组织体积略小。与模型组比较, hUCMSCs组及hUCMSCs+HBO组卵巢组织体积增大(图4A)。

HE染色结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠卵巢组织原始卵泡数量明显减少($P<0.001$), 生长卵泡、成熟卵泡、闭锁卵泡数量差异无统计学意义($P>0.05$), 髓质中可见部分毛细血管扩张充血、可见少许血池存下, 部分纤维化组织形成。与模型组比较, hUCMSCs组及hUCMSCs+HBO组卵泡结构正常, 原始卵泡数量明显增多($P<0.01$), 生长卵泡、成熟卵泡、闭锁卵泡数量差异无统计学意义($P>0.05$), 髓质

间毛细血管正常、无扩张, 组织间可见个别纤维化(图4B、附表1)。

2.2.5 小鼠卵巢组织纤维化程度及超微结构变化 Masson染色结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠卵巢组织间质区域纤维化面积占比明显升高($P<0.05$); 与模型组比较, hUCMSCs组和hUCMSCs+HBO组卵巢组织内纤维化面积占比明显降低($P<0.05$, 图5A)。

电镜观察显示, 对照组颗粒细胞形态结构正常, 细胞核可见, 染色质分布均匀, 核仁明显, 线粒体形态结构正常, 呈长梭形, 线粒体嵴结构清晰, 粗面内质网形态结构正常, 表面有核糖体颗粒附着, 高尔基体形态正常。模型组颗粒细胞形态异常, 细胞核呈椭圆形, 核仁明显, 核周隙轻度增宽, 包浆内线粒体肿胀明显, 线粒体嵴溶解断裂, 基质大量丢失, 粗面内质网扩张, 扁平囊结构间隙增宽, 高尔基体部分扩张。hUCMSCs组颗粒细胞形态结构轻度异常, 细胞核呈椭圆形或不规则形, 少量异染色质边集, 核仁明显, 胞浆中极少数线粒体轻微肿胀, 基质电子密度不均匀, 外膜破裂, 粗面内质网结构较正常高尔基体形态正常。hUCMSCs+HBO组颗粒细胞形态结构轻度异常, 细胞核呈类椭圆形, 少量异染色质边集, 胞浆中少数线粒体轻微肿胀, 基质电子密度不均匀, 粗面内质网少许扩张(图5B)。

2.2.6 小鼠卵巢组织TGF- β_1 、Smad3蛋白表达水平 Western Blotting检测结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠卵巢组织TGF- β_1 表达水平降低($P<0.01$), Smad3蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$); 与

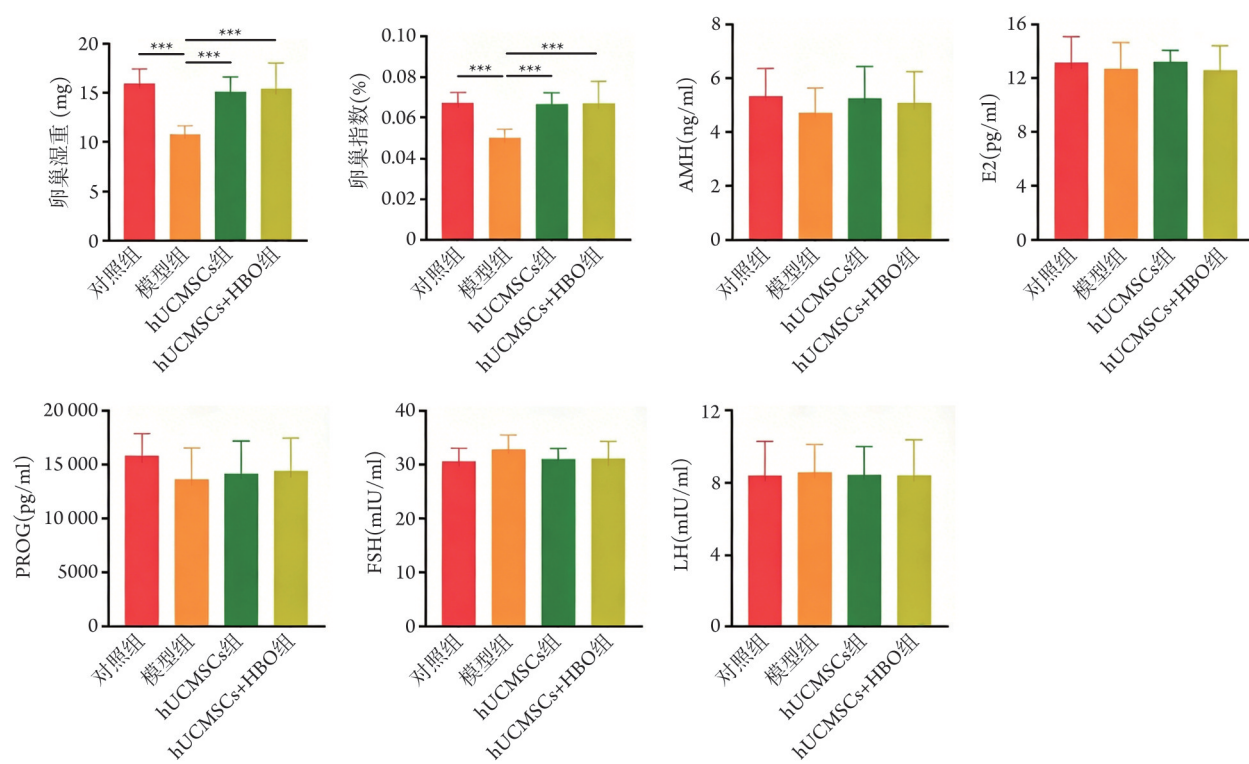


图3 各组小鼠卵巢湿重、卵巢指数、生殖性激素水平比较

Fig.3 Changes of ovary wet weight, ovary index and reproductive hormone levels in each group of mice

*** $P < 0.001$

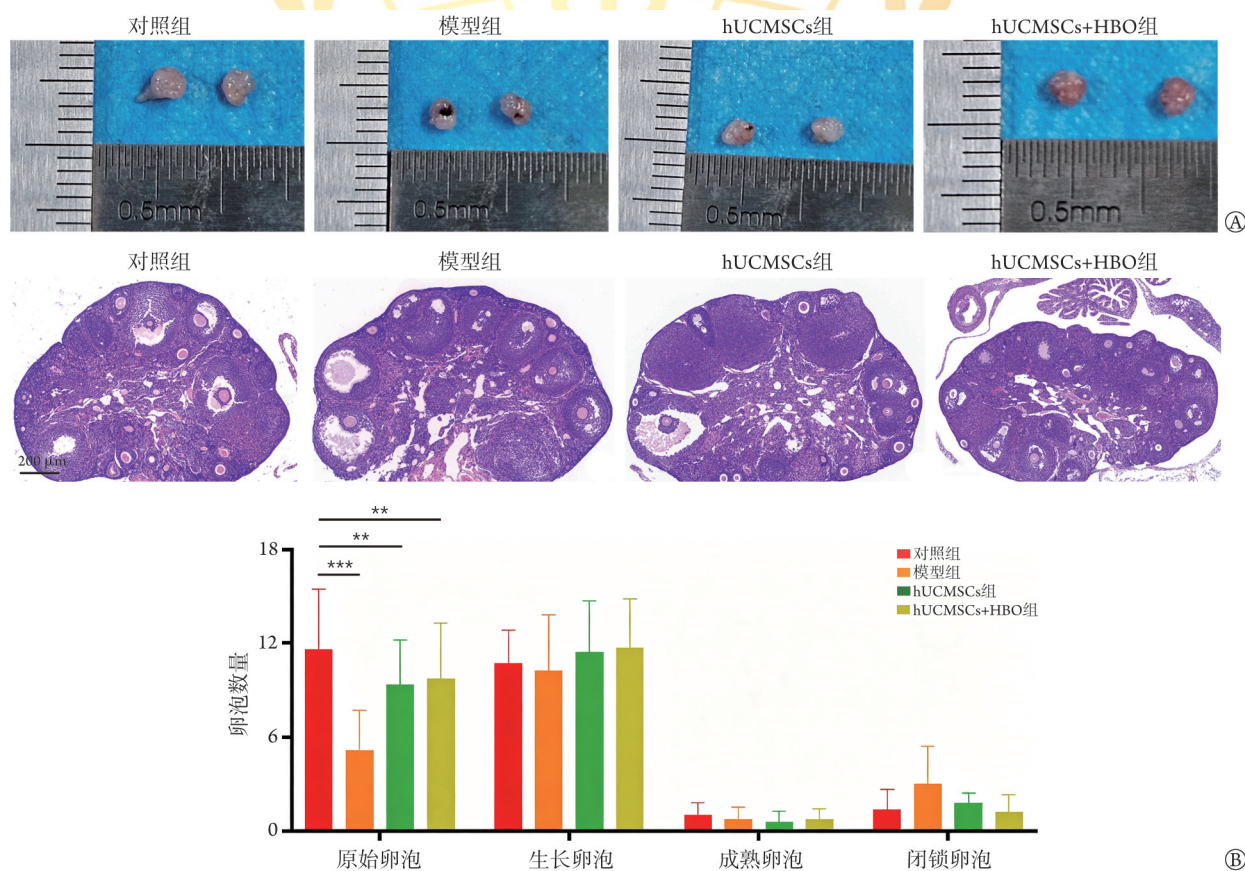


图4 各组小鼠卵巢大体观和左侧卵巢组织各级卵泡数量

Fig.4 Gross view ovarian and the number of follicles at all levels in the left ovarian tissue of mice in each group

A. 卵巢大体观; B. HE染色及各级卵泡数量. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

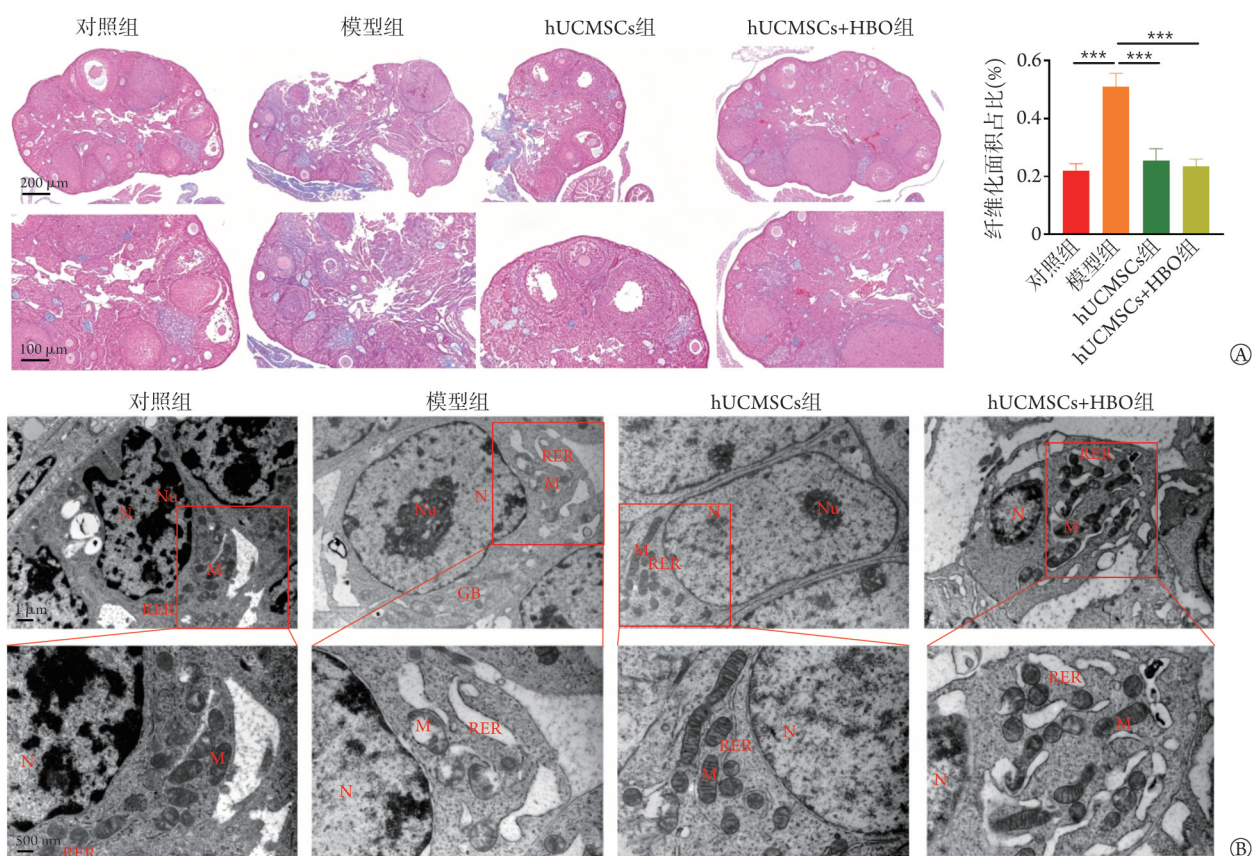


图5 各组小鼠卵巢组织纤维化情况及超微结构 (n=10)

Fig.5 Masson staining, and ultrastructure of ovarian tissue of mice in each group

A. Masson 染色及纤维化面积占比; B. 超微结构(电镜观察)。*** $P<0.001$ 。N. 细胞核; No. 核仁; M. 线粒体; RER. 粗面内质网; GB 示高尔基体; LD. 脂滴

模型组比较, hUCMSCs 组 TGF- β_1 、Smad3 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), hUCMSCs+HBO 组 TGF- β_1 、Smad3 蛋白表达水平明显增高($P<0.01$ 或 $P<$

0.001); 与 hUCMSCs 组比较, hUCMSCs+HBO 组 TGF- β_1 、Smad3 蛋白表达水平平均明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.001$, 图6)。

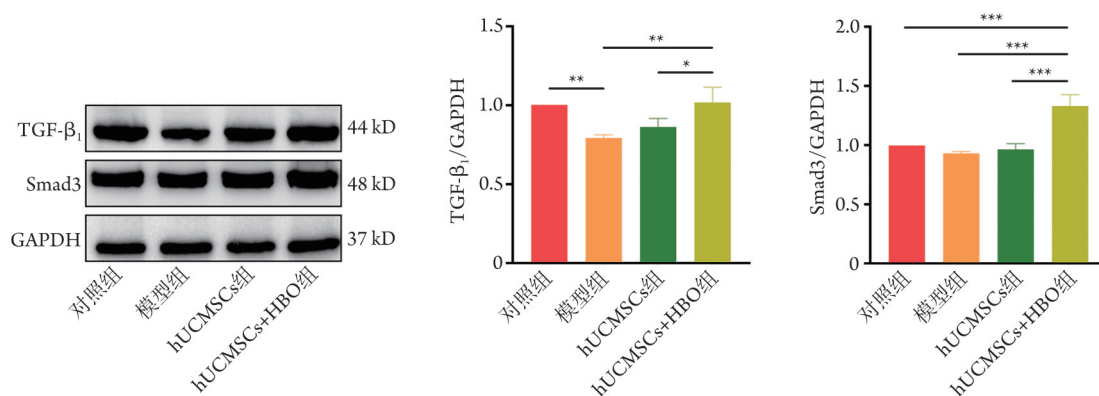


图6 各组小鼠卵巢组织 TGF- β_1 、Smad3 蛋白表达情况(Western blotting)

Fig.6 Expression of TGF- β_1 and Smad3 in ovarian tissue of mice in each group (Western blotting)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

2.2.7 小鼠生育力评估及子代一般情况 与对照组比较, 模型组小鼠窝仔数明显减少[9.0 ± 1.4 v.s. 6.5 ± 1.0 (个), $P<0.01$], 且模型组小鼠出生的部分子代体重更轻, 子代生长稍缓慢, 部分子代出现臀背部脱毛

情况(附图2)。与模型组比较, hUCMSCs 组小鼠窝仔数差异无统计学意义[8.0 ± 0.9 v.s. 6.5 ± 1.0 (个), $P>0.05$], hUCMSCs+HBO 组小鼠窝仔数明显增多[8.5 ± 1.0 v.s. 6.5 ± 1.0 (个), $P<0.05$], 子代小鼠出生体重、饮

食习性、反应灵敏度及活动无明显差异。与hUCMSCs组比较, hUCMSCs+HBO组小鼠窝仔数差异无统计学意义($P>0.05$, 附图3)。

3 讨 论

急性高原环境可造成肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)血流动力学改变和肠黏膜屏障损伤^[25-26];与简单鼻导管给氧比较, HBO干预可更有效地缓解损伤。此外,在糖尿病足溃疡、一氧化碳中毒、脑梗死、神经退行性疾病等多种疾病治疗中^[27-28], HBO均可改善组织缺血缺氧。因而, HBO在临床治疗中值得进一步探索。

当人体急进高原缺氧环境时,体内肺泡 O_2 与肺动脉血中 CO_2 交换速率降低,导致体内供氧不足。而卵巢髓质血管丰富、皮质对缺氧敏感性较高。因此,缺氧也将影响女性卵巢储备功能及生育力^[29]。为进一步探索高原缺氧与卵巢功能之间的关系,我们前期通过模拟海拔6500 m高原低压低氧环境持续饲养小鼠15 d,发现小鼠出现卵巢损伤及激素紊乱。本研究采用同样方法构建雌性小鼠卵巢组织缺氧损伤模型,观察了hUCMSCs和HBO治疗对小鼠受损卵巢组织的修复作用及其潜在机制。

本课题组的前期研究显示, hUCMSCs单一及联合HBO干预15 d后,小鼠生活习性、体重、卵巢指数、激素水平、卵巢结构、卵泡数量均比模型组明显好转,且联合干预较单一干预的效果更好,但联合干预组与对照组仍有一定差距^[30]。高原环境下的卵巢损伤多因急性缺氧导致,及时予以HBO及hUCMSCs干预后有明显改善效果。为进一步观察该干预效果是否随着时间延长出现正向作用,本研究进一步观察了hUCMSCs及联合HBO干预30 d,发现单一和联合干预组的激素水平与对照组比较相无明显差异,但卵巢组织病理及超微结构均有显著改善。相比单一hUCMSCs干预, hUCMSCs+HBO联合干预后小鼠性激素恢复与卵巢组织修复上更为显著。这提示对于模拟高原环境诱导的小鼠卵巢组织损伤, hUCMSCs单一及联合HBO干预时间延长至30 d均有一定的修复作用,其中联合HBO的修复效果略突出。这与既往研究结果一致^[31]。尽管延长干预时间有修复作用,但HBO及hUCMSCs干预成本高、费用昂贵,因此,未来需进一步探究最佳干预时间节点。

在急性缺氧状态下,氧化应激会产生大量活性氧(ROS)并破坏机体ROS平衡,造成大量ROS堆积^[32]。而特定条件如PH改变、活性氧ROS堆积及辐射等可激活转化生长因子- β (TGF- β)信号转导。本课题组前期研究及本研究中,联合干预15 d及30 d

的TGF- β_1 和Smad3蛋白表达水平均明显升高,这可能是由于小鼠急进缺氧环境造成卵巢组织损伤,引起机体ROS异常堆积,进而激活了TGF- β_1 /Smad3信号通路。在小鼠卵巢组织损伤模型构建完成后,立即退出低压低氧舱并给予hUCMSCs及HBO保护性干预,可迅速缓解缺血缺氧,可能进一步促进了TGF- β_1 和Smad3蛋白表达。

TGF- β 超家族配体不仅是哺乳动物卵泡生长发育的关键调节因子,还与组织纤维化有关联^[33]。组织纤维化是由细胞外基质(ECM)蛋白过度沉积或紊乱沉积引起,其形成与肾素-血管紧张素系统、炎症和氧化应激, TGF- β /Smad、Wnt/ β -catenin信号转导和脂质代谢等密切相关^[34-39]。同样,纤维化形成也可导致卵巢疾病发生。有研究显示, hUCMSCs可通过抑制TGF- β_1 /Smad3信号通路,减少卵巢组织纤维化形成,提高大鼠生育力^[40-41]。然而,本研究结果显示,尽管hUCMSCs及联合HBO干预后小鼠卵巢组织TGF- β_1 和Smad3蛋白表达明显增高,但纤维化程度较模型组明显降低;究其原因,可能是高原低压低氧环境造成组织缺血缺氧,进而激活缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)刺激上皮-间质转换,促进纤维化形成^[42-43]。联合HBO干预可通过高浓度氧气吸入快速打破机体缺血缺氧状态,抑制纤维化;而hUCMSCs还可促进血管生成。因此, hUCMSCs联合HBO干预对卵巢组织损伤的修复作用,相比单一hUCMSCs干预效果更佳。此前,苗竹林等^[44]发现, TGF- β_1 参与卵泡的生长发育及闭锁卵泡的调控,主要通过Smad2和Smad3信号转导。从原始卵泡到窦早期卵泡中持续表达,通常以自分泌及旁分泌形式协调卵泡从原始阶段到排卵的生长发育和黄体形成的全过程;若窦前卵泡对FSH刺激反应能力降低,可导致卵巢反应性低下及卵泡发育异常^[45-47]。本研究显示,经hUCMSCs及联合HBO干预后,小鼠卵巢组织内生长卵泡显著升高、闭锁卵泡减少, TGF- β_1 /Smad3蛋白表达显著升高。由此推测, TGF- β_1 /Smad3信号通路可能与卵泡的生长发育有直接关联。卵泡是卵巢的功能单位,其生长发育、成熟及优势卵泡的选择均与垂体分泌的FSH相关。研究显示, FSH可增强TGF- β 表达,促进黄体酮生成及LH受体表达,提高排卵前卵泡存活率。若TGF- β 和FSH失衡,可能导致PI3K/Akt通路异常,增加闭锁卵泡数目,降低生育力^[48]。本研究结果显示, hUCMSCs及联合HBO干预后小鼠性激素水平与对照组无明显差异,提示下丘脑-垂体-卵巢轴性腺激素分泌良好,这可快速提升TGF- β /Smad3蛋白表达及FSH水平,减少闭锁卵泡数量并促进卵泡生长发育。

正常激素分泌是恢复动情周期的前提,也是子宫内膜周期性改变的先决条件,优势卵泡的排出是妊娠的基础;可通过改善两者情况提高小鼠生育力。本研究显示,干预组子代小鼠的生活习性与对照组无明显差异,且与前期研究干预 15 d 相比,子代小鼠背部脱毛减少,暂未发现安全性问题。Park 等^[20]在 hBM-MSCs 干预的 POI 小鼠子代中也未发现人类 DNA 的存在。因此, hUCMSCs 及联合 HBO 干预有望成为未来治疗 POI 患者的潜在方案^[49]。

综上,本研究进一步延长干预时间发现,对模拟高原低氧环境引起的小鼠卵巢功能损伤,采用 hUCMSCs 联合 HBO 干预,相比单一 hUCMSCs 干预,可减少组织纤维化形成,上调 TGF- β 1/Smad3 信号通路,促进卵泡生长发育,提高生育力,且未见明显的安全性问题。未来需要聚焦于最佳干预时间窗的探索,同时结合蛋白质组学及代谢组学技术,探究 hUCMSCs 联合 HBO 协同作用的生物学机制,推动该联合疗法从基础研究向临床转化,以期为高原地区女性的生殖健康保护提供新方案。

【附加材料】

附图 1—3 及附表 1 见 <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.2600.2026.0708FJ>。
请扫描右方二维码获取。



【参考文献】

- [1] Hackett PH, Rennie D, Levine HD. The incidence, importance, and prophylaxis of acute mountain sickness[J]. *Lancet*, 1976, 2(7996): 1149-1155.
- [2] Imray C, Wright A, Subudhi A, *et al.* Acute mountain sickness: pathophysiology, prevention, and treatment[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52: 467-484.
- [3] Meehan RT, Zavala DC. The pathophysiology of acute high-altitude illness[J]. *Am J Med*, 1982, 73: 395-403.
- [4] High-altitude hypoxia and the brain[J]. *Lancet*, 1986, 2(8508): 695.
- [5] Chon SJ, Umair Z, Yoon MS. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 672890.
- [6] Kim HK, Kim TJ. Current status and future prospects of stem cell therapy for infertile patients with premature ovarian insufficiency [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(2): 242.
- [7] 袁月, 蒲雯婕, 何毅刚, 等. 高原低氧环境对 C57BL/6 雌性小鼠卵巢功能的影响[J]. *医学理论与实践*, 2023, 36(6): 905-908, 918.
- [8] 蒲雯婕, 马薇, 马娟文, 等. 模拟海拔 6500 米低氧环境对雌性小鼠生殖功能的影响[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2023, 43(11): 1140-1145.
- [9] 钟艳, 张晓静, 常熙雯, 等. 高原缺氧环境对雌性大鼠生殖系统的影响[J]. *生态毒理学报*, 2024, 19(2): 252-261.
- [10] Dai W, Yang H, Xu B, *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) alleviate excessive autophagy of ovarian granular cells through VEGFA/PI3K/AKT/mTOR pathway in premature ovarian failure rat model[J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 198.
- [11] Lu G, Li HX, Song ZW, *et al.* Combination of bone marrow mesenchymal stem cells and moxibustion restores cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency by improving mitochondrial function and regulating mitophagy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 102.
- [12] Qu Q, Liu L, Cui Y, *et al.* miR-126-3p containing exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote angiogenesis and attenuate ovarian granulosa cell apoptosis in a preclinical rat model of premature ovarian failure [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 352.
- [13] Chen J, Jia Z, Zhang F, *et al.* HGF-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells rescue impaired ovarian reserve function in chemotherapy-induced POI rats by improving angiogenesis while decreasing apoptosis and fibrosis in the ovary[J]. *Tissue Cell*, 2023, 82: 102121.
- [14] Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development[J]. *Reproduction*, 2006, 132(2): 191-206.
- [15] Kaivo-oja N, Jeffery LA, Ritvos O, *et al.* Smad signalling in the ovary [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 21.
- [16] 王坤, 李世超, 杨朔, 等. 单人高压氧舱对急进极高海拔地区人员肠系膜上动脉血流动力学的影响研究[J]. *医疗卫生装备*, 2023, 44(10): 59-63.
- [17] 苏瑞, 韩晨肖, 杨熙玥, 等. 移居高海拔年轻男性高压复氧的动态生理效应[J]. *高原科学研究*, 2022, 6(3): 75-83.
- [18] Dai W, Xu B, Ding L, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency mouse model by suppressing ferritinophagy-mediated ferroptosis in granulosa cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 220: 1-14.
- [19] Lu G, Li HX, Song ZW, *et al.* Combination of bone marrow mesenchymal stem cells and moxibustion restores cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency by improving mitochondrial function and regulating mitophagy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 102.
- [20] Park HS, Chugh RM, Elsharoud A, *et al.* Safety of intraovarian injection of human mesenchymal stem cells in a premature ovarian insufficiency mouse model[J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 963689720988502.
- [21] 崔建华, 高亮, 金湘华, 等. 高压氧对急进高原和高原人体运动血液流变学的影响[J]. *中国血液流变学杂志*, 2007, 17(3): 421-424.
- [22] Lv X, Guan C, Li Y, *et al.* Effects of single and multiple transplantations of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the recovery of ovarian function in the treatment of premature ovarian failure in mice[J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 119.
- [23] Park HS, Chugh RM, Seok J, *et al.* Comparison of the therapeutic effects between stem cells and exosomes in primary ovarian insufficiency: as promising as cells but different persistency and dosage[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 165.
- [24] Gong X, McGee EA. Smad3 is required for normal follicular follicle-stimulating hormone responsiveness in the mouse[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(4): 730-738.
- [25] 周语嫣, 梁斌苗, 梁宗安. 高空、高原、地下空间环境对呼吸功能的影响[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2020, 19(2): 198-202.
- [26] 刘文青, 牛江涛, 付占磊. 高原低氧致肠黏膜屏障应激损伤机

- 制的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2025, 20251205.
- [27] Wang X, Li T, Bai X, *et al.* Therapeutic prospect on umbilical cord mesenchymal stem cells in animal model with primary ovarian insufficiency: a meta-analysis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2023, 10: 1211070.
- [28] Marcinkowska AB, Mankowska ND, Kot J, *et al.* Impact of hyperbaric oxygen therapy on cognitive functions: a systematic review[J]. *Neuropsychol Rev*, 2022, 32: 99-126.
- [29] 向玉, 杨惠林, 马英兰, 等. 高原不同海拔低氧环境对女性卵巢储备功能与生育力的影响分析[J]. 高原医学杂志, 2022, 32(4): 6-10.
- [30] 杜静, 常瑞亚, 张宗翠, 等. 人脐带间充质干细胞联合高压氧对模拟高原环境下小鼠卵巢功能损伤的修复作用研究[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2025, 45(2): 183-195.
- [31] 李琴, 张小琴, 敖洪峰, 等. 高压氧暴露对慢性应激所致卵巢功能减退模型大鼠的激素水平和 TGF- β 1, Smad3 表达影响[J]. 华南国防医学杂志, 2019, 33(6): 371-375.
- [32] 且华吉, 刘江涛, 文艺, 等. 高原高海拔环境暴露对大鼠肝脏功能的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(10): 961-967.
- [33] 范美玲, 应苗法, 赵蕊, 等. TGF- β 信号通路在纤维化疾病中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(11): 1171-1177.
- [34] Ying H, Fang M, Hang QQ, *et al.* Pirfenidone modulates macrophage polarization and ameliorates radiation-induced lung fibrosis by inhibiting the TGF- β 1/Smad3 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(18): 8662-8675.
- [35] Yang Z, Zhang H, Yin M, *et al.* TGF- β 1/Smad3 upregulates UCA1 to promote liver fibrosis through DKK1 and miR18a[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2022, 100(10): 1465-1478.
- [36] Jurado-Aguilar J, Barroso E, Bernard M, *et al.* GDF15 activates AMPK and inhibits gluconeogenesis and fibrosis in the liver by attenuating the TGF- β 1/SMAD3 pathway[J]. *Metabolism*, 2024, 152: 155772.
- [37] Weng L, Ye J, Yang F, *et al.* TGF- β 1/SMAD3 regulates programmed cell death 5 that suppresses cardiac fibrosis post-myocardial infarction by inhibiting HDAC3[J]. *Circ Res*, 2023, 133(3): 237-251.
- [38] Liu L, Guo J, Pang XL, *et al.* Exploration of the mechanism of NORAD activation of TGF- β 1/Smad3 through miR-136-5p and promotion of tacrolimus-induced renal fibrosis[J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1): 2147083.
- [39] Wang Y, Wang Z, Yang H, *et al.* Metformin Ameliorates Chronic Colitis-Related Intestinal Fibrosis via Inhibiting TGF- β 1/Smad3 Signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 887497.
- [40] 崔林璐. TGF- β 1/Smad3 在 hUMSCs 移植改善原发性卵巢功能不全大鼠卵巢纤维化的机制研究[D]. 滨州: 滨州医学院, 2021.
- [41] Cui L, Bao H, Liu Z, *et al.* hUMSCs regulate the differentiation of ovarian stromal cells via TGF- β 1/Smad3 signaling pathway to inhibit ovarian fibrosis to repair ovarian function in POI rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 386.
- [42] 卢鹏, 樊晶晶, 张晓炎, 等. 缺氧诱导因子-1 α 通过 miR-126/JAK2-STAT3 轴调控慢性肾病小鼠肾纤维化[J]. 解剖学杂志, 2024, 47(2): 120-125, 131.
- [43] Qiu ZK, Zhang MZ, Zhang WC, *et al.* Role of HIF-1 α in pathogenic mechanisms of keloids[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2023, 22(5): 1436-1448.
- [44] 苗竹林, 王自能, 杨艳东, 等. TGF- β 1 在 PCOS 卵巢间质纤维化形成中的作用[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(3): 174-179.
- [45] Knight PG, Glistler C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development[J]. *Reproduction*, 2006, 132(2): 191-206.
- [46] Kaivo-oja N, Jeffery LA, Ritvos O, *et al.* Smad signalling in the ovary[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 21.
- [47] Dragana Tomic, Kimberly P. Miller, *et al.* Flaws, Ovarian Follicle Development Requires Smad3[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(9): 2224-2240.
- [48] Chu YL, Xu YR, Yang WX, *et al.* The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(3): 305-321.
- [49] Wang X, Li T, Bai X, *et al.* Therapeutic prospect on umbilical cord mesenchymal stem cells in animal model with primary ovarian insufficiency: a meta-analysis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2023, 10: 1211070.