



解放军医学院
解放军总医院

博士学位论文

分类号: R715

密 级: 公开

自体脂肪间充质干细胞线粒体移植在 辅助生殖技术中应用的初步研究

Study of autologous transplantation of mitochondrial from mesenchymal stem cells in assisted reproductive techniques

作者姓名: 王元芬

学科专业: 妇产科学

指导教师: 姚元庆 教授

答辩委员会主席: 

论文答辩日期: 二〇一七年五月二十五日

院校地址: 北京市海淀区复兴路 28 号

邮政编码: 100853

解放军医学院

研究生学位论文原创性声明

秉承我院“忠诚、敬业、和谐、创新”的学风，本人声明：所呈交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的的研究成果。据我所知，除了中文特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得我院或其他教育机构的学位及证书而使用过的材料，对本文的研究作出贡献的个人和集体，均已在文中做了明确的说明并表示感谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：王元芳 日期：2017.5.31
指导教师签名：姜海波 日期：2017.5.31

解放军医学院

研究生学位论文版权使用授权书

本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名为解放军医学院或解放军总医院。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文原件、复印件和电子版本，可以采用影印、缩印、扫描或其它手段保存论文以供查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外）。

论文作者签字：王元芳 日期：2017.5.31
指导教师签字：姜海波 日期：2017.5.31

目 录

缩略词表·····	1
中文摘要·····	2
英文摘要·····	4
前言·····	6
第一部分 人脂肪间充质干细胞分离、培养及鉴定 ·····	12
引言·····	12
材料与方法·····	13
实验结果·····	16
讨论·····	19
第二部分 人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞线粒体功能比较 ·····	21
引言·····	21
材料与方法·····	22
实验结果·····	25
讨论·····	29
第三部分 一例高龄女性自体脂肪间充质干细胞线粒体移植的可行性研究 ···	31
引言·····	31
材料与方法·····	31
实验结果·····	39
讨论·····	44
参考文献·····	48
文献综述·····	51
在读期间发表文章·····	63
致谢·····	64

.

英文缩略词表 (Abbreviations)

英文缩写	英文全称	中文全称
ART	Assisted Reproduction Technique	辅助生殖技术
HADSCs	Human Adipose-derived Stem Cells	人脂肪间充质干细胞
MtDNA	Mitochondria DNA	线粒体 DNA
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲溶液
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
DMEM	Dulbecco's modification of eagle's medium	改良的伊格尔培养基
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
$\Delta\psi_m$	mitochondrial membrane potential	线粒体跨膜电位
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
rpm	rotation per minute	每分钟转速
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection	单精子卵细胞内注射
IVF-ET	In-vitro Fertilization & Embryo transfer	体外受精和胚胎移植
ET	Embryo Transfer	新鲜胚胎移植
FET	Frozen Embryo Transfe	冷冻胚胎移植
OT	Ooplasmic Transfer	卵母细胞胞浆移植
HTF	Human Tubal Fluid	人输卵管液
PGS	Preplantation Genetic Screening	胚胎植入前遗传学筛查

作者：王元芬

学科专业：妇产科学

导师：姚元庆 教授

自体脂肪间充质干细胞线粒体移植在 辅助生殖技术中应用的初步研究

中文摘要

研究背景及目的：

女性的生殖能力在 25 岁左右达高峰，35 岁以后生殖能力明显下降。在辅助生殖技术工作中，37 岁以上不孕患者的妊娠率仅在 20% 左右。多项研究表明，年龄相关的妊娠率下降以及 IVF 反复种植失败是由于卵子线粒体功能障碍，生成 ATP 能力减低，影响染色体正常分离、受精及胚胎发育潜能等。因此，为了提高高龄女性辅助生殖成功率，本实验研究，通过人自体脂肪间充质干细胞中线粒体进行卵细胞内移植的初步研究，改善卵母细胞质量及胚胎发育潜能，进而提高 IVF 成功率。

方法：

第一部分：整形外科吸脂术获得腹部皮下脂肪，0.1% I 型胶原酶消化，贴壁培养获得人脂肪间充质干细胞，绘制细胞增殖曲线，进行流式细胞检测细胞表型，并通过人脂肪间充质干细胞成脂、成骨诱导验证其是否具有多功能分化潜能。

第二部分：通过流式细胞术检测线粒体膜电位及活性氧（ROS）含量，化学发光检测仪（luminometer）测定 RLU 值，进而反映 ATP 浓度。比较脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中线粒体功能。数据分析采用配对 t 检验， $P < 0.05$ 具有统计学意义。

第三部分：进行临床上首例自体脂肪间充质干细胞线粒体移植。通过差速离心法提取线粒体。于取卵当日，线粒体与制动的精子一同注入卵细胞胞浆内，作为实验组，单纯 ICSI 的胚胎作为对照组。之后观察卵子的受精情况及胚胎发育情况，并对胚胎进行植入前遗传学筛查以及线粒体 DNA 拷贝数的测定。

结果:

第一部分: 获得形态均一、长梭形、贴壁生长的人脂肪间充质干细胞, 细胞增殖良好, 有明显的指数生长期, 体外能长期培养存活, 并保持不分化状态; 流式检测细胞高表达 CD105、CD90, 低表达 CD34、CD45。能向成脂、成骨诱导分化。

第二部分: 随着年龄的增长, 脂肪细胞、脂肪干细胞线粒体功能均下降。但来源于同一脂肪组织中, 脂肪间充质干细胞的线粒体 ATP 水平、膜电位高于脂肪组织, 活性氧水平低于脂肪细胞。

第三部分: 临床上首例行线粒体移植的胚胎受精与胚胎发育情况无明显异常, PGS 显示胚胎染色体均异常。实验组中胚胎线粒体 DNA 拷贝数高于对照组中未行线粒体移植的胚胎。

结论: 稳定分离培养脂肪间充质干细胞, 研究证实脂肪间充质干细胞中线粒体功能更优。开展临床首例自体脂肪间充质干细胞线粒体移植, 并且胚胎线粒体 DNA 拷贝数增加, 具有一定的可行性。

关键词: 脂肪间充质干细胞、线粒体、辅助生殖、胚胎

Study of autologous transplantation of mitochondrial from mesenchymal stem cells in assisted reproductive techniques

Abstract

Background and Object:

The reproductive ability of females reaches the peak at 25 years old, and it begins to decrease significantly over 35. In ART (assisted reproductive technology), the pregnancy rate of infertility patients over 37 years old is only about 20%. A number of studies have shown that the age-related decline in pregnancy rates and repeated IVF implantation failure is due to mitochondrial dysfunction in eggs, reducing the ability to generate ATP and affecting the normal separation of chromosomes and other physiological functions. Therefore, through the experimental study, the transference of mitochondrial from HADSCs (human adipose derived mesenchymal stem cells) into oocytes can improve the quality of embryo development and increase the success rate of IVF.

Methods:

First Part: Human adipose tissue was collected after liposuction surgery from the cosmetic and plastic surgery center, digested with 0.01 % collagenase I. Adherent culture could obtain HADSCs. Cell proliferation curve was drawn. Cell surface antigens were measured by flow cytometry. HADSCs were underwent osteogenic and adipogenic differentiation.

Second Part: Compare mitochondrial function in HADSCs and adipocytes by measuring the levels of mitochondrial ATP, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential using flow-cytometry. The data were analyzed by paired t test, $P < 0.05$ was statistically significant.

Third Part: The first case of mitochondrial transplantation from autologous HADSCs. Mitochondria were extracted by differential centrifugation. On the day of oocyte retrieval, mitochondria were injected into the cytoplasm of the egg cells with the brake sperm. Then, we observed the fertilization and embryo development, and conduct preimplantation genetic screening and mitochondrial DNA copy number determination.

Results:

First Part: HADSCs exhibited fibroblast-like morphology, well proliferation, with

obvious exponential growth phase, and could survive in vitro for a long time and maintain a undifferentiated state. Flow cytometry has shown that cells were highly positive for CD90, CD105, and weakly positive for CD34 and CD45. Cells could differentiate into osteogenic and adipogenic direction.

Second Part: With the increase of age, the function of mitochondrial in fat cells and ADSCs decreased. However, in the same adipose tissue, the level of mitochondrial ATP and membrane potential of ADSCs were higher than that of adipose tissue, and the level of reactive oxygen species (ROS) was lower than that of adipocytes, $P < 0.05$.

Third Part: There was no obvious abnormality of embryo fertilization and embryo development in the first case of mitochondrial transplantation. PGS showed that the chromosomes were abnormal. In the experimental group, the copy number of mitochondrial DNA was higher than that of the control group.

Conclusion:

Adipose tissue derived mesenchymal stem cells were isolated and cultured stably. The study showed that the mitochondrial function was better in ADSCs. To carry out the first clinical mitochondrial transplantation of autologous ADSCs, it showed that the copy number of mitochondrial DNA increased, and mitochondria transplantation in IVF has some feasible.

Key Words: human adipose-derived stem cells, mitochondria, assisted reproduction, embryo

前言 一

随着社会的发展及我国二孩政策的颁布, 高龄女性生育问题逐渐成为社会关注的焦点。根据美国疾病控制中心在 2015 年发表的《2013 年辅助生殖技术国家总结报告》的最新数据显示: 在美国 467 个生殖医学机构报告的 190773 个辅助生殖技术周期中, 62.5% 患者的年龄超过 35 岁[1]。根据英国人类胚胎和受精管理局 2014 年发表的《2013 生育治疗趋势和数据》显示: 在英国, 56.3% 接受辅助生殖技术治疗的患者年龄超过 35 岁[2]。在我国, 根据国家卫计委的预测, 目前, 全国符合全面二孩政策条件的夫妇约有 9000 万对, 约有 60% 在 35 岁以上[3]。因此, 高龄女性的生育问题是目前所面临的重大社会需求。

研究显示: 随着女性年龄的增长, 其生育能力下降, 不孕几率增加, 辅助生殖技术成功率下降。大量的临床数据显示: 30 岁时, 女性 1 年内的自然受孕率为 75%, 35 岁时女性 1 年内自然受孕率为 66%, 40 岁女性 1 年内自然受孕率时为 44%[4]。同时, 高龄女性妊娠后的流产率及生缺陷发生率也显著增高。人类辅助生殖技术是采用体外受精-胚胎移植 (IVF) 等人工方法获得妊娠的临床技术。高龄女性不孕症患者体外受精-胚胎移植 (IVF) 的临床结局较年轻患者明显差。根据美国和英国的最新统计数据[1, 2], 40 岁以上高龄女性的辅助生殖技术活产率低于 20%, 与 30 岁以下女性比较, 其活产率下降超过 50%。改善高龄女性不孕的临床结局, 降低出生缺陷的风险是人类辅助生殖技术发展的新趋势。

高龄女性生育能力下降, 辅助生殖技术失败率增高, 其主要原因之一为胚胎非整倍体。Franasiak 等检测了 15169 个 IVF 囊胚的染色体数目, 发现 6168 个胚胎为非整倍体 (40.7%)。女性年龄 35 岁以上, 胚胎非整倍体的比例为 35%, 37 岁以上超过 40%, 40 岁以上高达 50% 以上[5]。早期胚胎的非整倍体将造成大部分胚胎发育阻滞或种植失败, 造成妊娠失败或流产。如果妊娠继续, 将造成严重的出生缺陷。例如 21-三体综合征等。导致胚胎非整倍体重要原因是卵母细胞线粒体功能不全或受损。

导致胚胎非整倍体重要原因是卵母细胞线粒体功能不全或受损。线粒体是由内、外双层膜包被的细胞器。是细胞进行能量转化和有氧呼吸的主要场所。参与细胞生长、分化、凋亡和信号传导等基本生物学过程。线粒体为一种半自主细胞器, 拥有独立的遗传物质和遗传体系。人类线粒体 DNA (mitochondrial DNA,

mtDNA)为双链环状,长度为 16,569bp,含有 37 个基因,编码两种 rRNA(12S rRNA 和 16S rRNA)、22 种 tRNA 以及 13 种多肽。线粒体在细胞中的分布、形态、代谢具有组织和器官特异性。分化成熟的体细胞含有 1000-10000 个线粒体,形态通常为棒状或细丝状颗粒,氧化磷酸化为 ATP 转化途径。成熟的人卵母细胞含有超过 10 万个线粒体,是人体含有线粒体最多的细胞。卵母细胞线粒体形态特点是圆形,内、外膜厚度大,嵴数目少。ATP 转化途径为糖酵解和磷酸戊糖途径。胚胎中线粒体遗传自母方,故线粒体对于卵母细胞成熟、受精及胚胎发育等密切相关。

卵母细胞的线粒体通过对纺锤体形成、染色体分离、细胞周期等的调节在早期胚胎发育中起重要作用。高龄女性的卵母细胞 mtDNA 受到几十年的活性氧作用而出现累积性损伤,mtDNA 拷贝数下降、突变和缺失增加,导致线粒体功能不全和 ATP 水平下降,引起纺锤体形成缺陷和染色体分离异常,造成胚胎染色体非整倍体。同时,卵母细胞线粒体损伤也使早期胚胎发育所需能量供应下降,造成胚胎卵裂和囊胚形成受阻,导致胚胎停育、流产等不良妊娠结局。因此,高龄女性卵母细胞线粒体功能不全是生育力下降,不孕及辅助生殖技术不良临床结局的主要分子生物学机制。

前言 二

针对高龄女性卵母细胞中线粒体功能下降,导致卵母细胞成熟受阻,受精卵/胚胎发育异常这一辅助生殖技术的问题,研究者试图通过增加卵母细胞中线粒体的个数,或改善线粒体的功能,进而改善卵母细胞质量,促进受精卵/胚胎的发育,提高辅助生殖技术的成功率。

1982 年, Muggleton-Harris 等在《自然》杂志发表了经典论文,将健康小鼠的卵母细胞胞浆注射到两细胞发育阻滞的小鼠卵母细胞中,克服小鼠胚胎发育的两细胞阻滞。此后,卵母细胞胞浆移植(ooplasmic transfer, OT)开始应用于 IVF 中。将年轻女性卵母细胞胞浆通过显微注射的方式移植到高龄女性的卵母细胞胞浆中。1998 年, Cohen 等报告了首例采用 OT 技术诞生的新生儿。至今,约有超过 30 个 OT 技术的辅助生殖技术婴儿出生,主要应用于高龄、反复流产和 IVF 失败的患者[9]。OT 技术的具体机制仍然不明。大部分学者认为,供者卵母

细胞胞浆中的线粒体对受者卵母细胞的补充可能发挥了重要作用。

此外，2011年，英国开展了一项技术为人卵母细胞线粒体置换技术（mitochondrial replacement）。正常生理状态下，胚胎细胞的线粒体基因组来源于母体，具有匀一性（homoplasmy）。当胚胎细胞同时存在突变或缺失的 mtDNA 和正常的 mtDNA 时，处于异质状态（heteroplasmy）。当异常 mtDNA 的比例在胚胎细胞中超过一定的阈值，通常是 50-60% 时，线粒体的功能出现异常，有可能导致胚胎发育异常或线粒体疾病。而导致线粒体疾病发生的异常 mtDNA 比例的阈值称为“瓶颈（bottleneck）”。目前，mtDNA 突变或缺失造成的遗传性疾病尚无有效的临床治疗和预防方法。2011年，英国人类胚胎和受精管理局组织专家委员会对人卵母细胞线粒体置换技术（mitochondrial replacement）防止 mtDNA 异常导致的线粒体疾病的可行性和安全性进行了系统评估，正式批准在英国临床应用人卵母细胞线粒体置换技术，并于 2013 年和 2014 年进行了两次再评估[10]。2014年，美国药品和食品管理局（FDA）也在考虑批准人卵母细胞线粒体置换技术的初步临床试验[11]。人卵母细胞线粒体置换可以通过核移植技术（nuclear transfer, NT）和母体纺锤体移植（maternal spindle transfer, MST）技术完成。前者将 mtDNA 异常患者卵母细胞核移植到 mtDNA 正常供者去除核的卵母细胞，重构成为一个新的卵母细胞。后者则将 mtDNA 异常患者受精卵的纺锤体（含雌原核和雄原核）移植到 mtDNA 正常供者去除纺锤体的受精卵，重构成为一个新的受精卵。两者的共同点是，核移植或纺锤体移植后，重构的卵母细胞或受精卵的胞浆和 mtDNA 是来自第三方供者，mtDNA 正常。英国人类胚胎和受精管理局组织的专家委员会对 NT 和 MST 从技术可行性、安全性及涉及的医学伦理、法律法规、社会影响等方面进行了全面的综合评估，并两次依据新的研究结果再评估，展现了对于新的生殖医学技术在临床应用上的高度慎重和积极进取，值得借鉴。

然而，人卵母细胞胞浆移植技术及人卵母细胞线粒体置换技术仍然存在着安全性和伦理方面的问题和广泛争议。主要问题如下：

（1）卵母细胞胞浆移植导致的线粒体异质性可能引起线粒体疾病正常生理状态下，胚胎的线粒体基因组来源于母体，具有匀一性。而移植了异体线粒体的卵母细胞含有两个来源的线粒体，具有异质性。研究显示，采用体卵母细胞胞

浆移植的体外受精-胚胎移植“试管婴儿”含有母体和供体的两种线粒体，比例从0-80%不等。线粒体的异质性的后代存在发生代谢综合征和线粒体疾病的风险[12]。实验研究发现，异体卵母细胞胞浆移植出生的小鼠发生高血压、体重指数增加、电解质和血液指标紊乱等代谢综合征表现。其可能的机制是两个来源的mtDNA 编码不同的氨基酸造成类似于线粒体疾病的表现。

(2) 卵母细胞胞浆移植和线粒体置换技术子代存在三方基因组，引发争议和伦理问题。人卵母细胞胞浆移植和卵母细胞线粒体置换技术均由供体提供卵母细胞胞浆，mtDNA 来自第三方，出生的后代中存在三种来源的基因组 DNA。因此，异体卵母细胞线粒体移植在医学伦理上也存在巨大和广泛争议。这些争议包括了父母认定、家庭价值、供者风险、社会公义、宗教因素等方面。

(3) 卵母细胞线粒体置换技术存在潜在技术风险。卵母细胞线粒体置换所采用的卵母细胞核移植技术和纺锤体移植技术涉及卵母细胞和受精卵重构，存在胞核和纺锤体损伤的潜在风险。

(4) 卵母细胞核移植技术和纺锤体移植技术均需要卵母细胞捐赠。供卵者来源困难，这将极大限制技术的临床应用。

综上所述，高龄女性卵母细胞线粒体功能不全导致胚胎非整倍体、发育阻滞和种植失败。目前解决的办法：卵母细胞胞浆移植和卵母细胞线粒体置换技术均存在着线粒体异质性造成的子代安全性风险和伦理问题。因此，我们提出新的研究思路和临床策略。将自体脂肪组织间充质干细胞线粒体移植到高龄女性的卵母细胞，纠正线粒体功能不全，改善辅助生殖技术的临床结局。

人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, HMSC)，广泛存在于人类脐带、胎盘、脂肪及骨髓等多种组织，可被诱导分化成硬骨、软骨、脂肪和其他类型的细胞，具有多向分化潜能、间充质干细胞线粒体移植被应用于治疗心肌细胞和呼吸道上皮细胞线粒体功能障碍，显示了崭新的应用前景[13]。

自体脂肪间充质干细胞线粒体移植的优势在于：

- (1) 不存在异体线粒体移植所造成的线粒体异质性；
- (2) 避免子代存在第三方基因组所带来的争议和伦理问题；
- (3) 不需要卵母细胞或受精卵重构，降低了损伤风险；
- (4) 不需要第三方供卵，提高了临床应用的可行性；

(5) 不涉及生殖细胞的基因编辑, 避免了相关的争议和伦理问题;

(6) 自体间充质干细胞技术成熟、简单、可行性高。

开展自体脂肪间充质干细胞线粒体移植在高龄不孕女性患者体外受精-胚胎移植中应用的探索性研究将成为解决高龄女性生育问题和阻断线粒体疾病提供一个新的临床思路及途径, 对于辅助生殖技术的发展具有重要的临床应用价值, 对于进一步了解高龄女性生殖生理和遗传性线粒体疾病具有理论意义, 也将有助于我国在人类辅助生殖技术保持在世界前沿领域。

参考文献

1. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Division of Reproductive Health, Women's Health and Fertility Branch. 2013 Assisted Reproductive Technology national summary report. <http://www.cdc.gov/art/ART2013>
2. Human Fertilisation and Embryology Authority. Fertility treatment in 2013: trends and figures. <http://www.hfea.gov.uk>
3. 国家卫生和计划生育委员会副主任王安培接受记者采访新闻稿。《光明日报》2015 年 11 月 02 日
4. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, VanSteirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B; ESHRE Capri Workshop Group. Fertility and ageing. Hum Reprod Update. 2005;11(3): 261-276.
5. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. Fertil Steril. 2014; 101(3): 656-663.e1.
6. Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Lüke S, Seidel T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. Mitochondrion 2011, 11: 783-796.
7. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. Reprod Biomed online 2004; 8: 45-58.
8. Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. Fertil Steril 2006; 85: 584-591.

9. Bredenoord AL, Pennings G, de Wert G. Ooplasmic and nuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disorders: conceptual and normative issues. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(6) 669-678.
10. Human Fertilisation and Embryology Authority: Government decision on mitochondria replacement regulations <http://www.hfea.gov.uk/9025.html>. 2014
11. FDA: Cellular Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee. Briefing Document-Oocyte Modification in Assisted Reproduction for the Prevention of Transmission of Mitochondrial Disease or Treatment of Infertility. 2014. [www.fda.gov homepage](http://www.fda.gov/homepage)
12. Takeda K, Tasai M, Iwamoto M, Onishi A, Tagami T, Nirasawa K, Hanada H, Pinkert CA. Microinjection of cytoplasm or mitochondria derived from somatic cells affects parthenogenetic development of murine oocytes. *Biol Reprod*. 2005; 72(6): 1397-1404
13. Hsu YC, Wu YT, Yu TH, Wei YH. Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: From cellular differentiation to mitochondrial transfer. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 Feb 8.

第一部分：人脂肪间充质干细胞分离、培养及鉴定

引言

干细胞 (stem cell) 是一类可进行自我复制、并在一定诱导环境中具有多向分化潜能的细胞。单一来源的干细胞经过不同诱导剂诱导后, 可形成多种不同类型的细胞, 同时也具有在生物机体中分化、重建组织的功能。是人类医疗科研中理想的组织种子。2001 年, Zuk 等[2]首次成功从人类脂肪组织分离、培养出脂肪间充质干细胞 (human adipose derived stem/stromal cells, HADSCs)[2-7]。人脂肪干细胞经过不同的诱导剂诱导后可分化为: 脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、肝脏细胞、骨骼肌细胞等多种中胚层分化而来的细胞, 并且, 可以分化成其他胚层的细胞, 由此显示, 脂肪干细胞是具有多向分化潜能的干细胞[8]。流式细胞技术分析脂肪间充质干细胞表达的分子, 发现和其他组织间充质分离出的干细胞相似[9]。

HADSCs 作为“组织种子”应用于科研、医疗, 具有以下优势:

1、取材便捷、组织量多、同时患者痛苦小

与其他间充质干细胞一样, HADSCs 可分化成为多种类型的组织细胞, 但在取材方面, 抽脂培养 HADSCs 比骨髓干细胞较容易[11]。骨髓穿刺过程中, 患者十分痛苦, 同时存在一定的操作风险。并且获取的骨髓量很有限。然而, HADSCs 可以从患者吸脂术后得到, 局麻下操作腹部吸脂术, 所获取的脂肪组织极其丰富, 取材便捷, 操作过程相对简单。在临床上, 患者自体脂肪经过分离、培养出 HADSCs, 可直接用于患者自身, 是优化个体化治疗的良好选择。

2、自体 HADSCs 应用不存在免疫排斥

多项研究显示, 间充质干细胞表面表达人类主要组织相容性复合体 (MHC) 较低, 其本身的免疫源性若。在本研究中我们采用了高龄女性自体的脂肪间充质干细胞进行分离、培养, 并提取线粒体, 不存在免疫排斥反应, 在线粒体移植中更具有优势。

3、HADSCs 临床应用的安全性

HADSCs 在临床科研研究中具有较好的安全性。HADSCs 与胚胎干细胞相比

较，胚胎干细胞可以无限增殖、传代，研究证明胚胎干细胞具有致癌风险（例如畸胎瘤）[10]，目前尚未发现人类脂肪干细胞具有致癌的风险。

同时在该研究中，高龄女性自体 HADSCs 分离、培养，提取线粒体进行移植，不存在医学伦理的问题，可以被人们所接受。

本部分实验，将通过经典的胶原酶消化法，分离、培养出 HADSCs，研究其生物学行为，分析鉴定细胞表面分子。为进行自体脂肪间充质干细胞线粒体移植保证稳定的细胞来源。

材料和方法

一、试剂与耗材

1. 脂肪组织

人脂肪组织来源于解放军总医院整形外科，取自女性吸脂患者术后弃用、无菌的脂肪组织。术前告知患者脂肪组织用途，患者同意并签字后取得。

2. 原代人脂肪间充质干细胞分离、培养及鉴定试剂

2.1 主要试剂

DMEM 低糖培养基	GIBCO 公司 11885-084
DPBS 溶液	GIBCO 公司
双抗/青霉素和链霉素	GIBCO 公司
胶原酶 I 型	GIBCO 公司
胰蛋白酶/含 0.25%Trypsin-EDTA	Hyclone 公司
FBS 胎牛血清	GIBCO 公司 1600044
油红 “O” 染色试剂	Sigma 公司
茜素红	Sigma 公司
FITC 标记的抗人 CD45	BD 公司
FITC 标记的抗人 CD90	BD 公司
FITC 标记的抗人 CD11a	BD 公司
FITC 标记的抗人 HLA-DR	BD 公司
PE 标记的 IgG1	BD 公司
PE 标记的 IgG2a	BD 公司

PE 标记的 CD34	BD 公司
PE 标记的 CD105	BD 公司
PE 标记的 CD73	BD 公司

2.2 主要耗材

35mm 培养皿	Corning 公司
60mm 培养皿	Corning 公司
100mm 培养皿	Corning 公司
6 孔板	Corning 公司
24 孔板	Corning 公司
15ml 离心管	Corning 公司
50ml 离心管	Corning 公司
CO ₂ 培养箱	Thermor 公司
光学倒置显微镜	Olympus 公司
低温离心机	Thermor 公司
流式细胞仪	Merck Millipore 公司

2.3 主要实验试剂的配制方法

(1) 0.1% I 型胶原酶配制: 将 10mg 型胶原酶干粉充分溶解于 10mlPBS 中, 为浓度为 1%I 型胶原酶溶液, 于-20℃保存。待用时, 将 1%I 型胶原酶稀释 10 倍。

(2) 完全培养基配制: 100ml 完全培养基中加入 89ml DMEM、10ml 胎牛血清及 1ml 双抗, 混匀后置于 4℃待用。

(3) HASCs 成脂诱导试剂配制: 44.5ml 高糖培养基中加入 5mlFBS、0.5ml 双抗、1umol/L 地塞米松, 10ug/ml 胰岛素, 0.5mmol/L1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤, 100umol/L 吡啶美辛。

(4) HASCs 成骨诱导试剂配制: 44.5ml 高糖培养基中加入 5mlFBS、0.5ml 双抗、β-甘油磷酸钠 10mM/L, 地塞米松 5umol/L, 维生素 C 50mg/L, 谷氨酰胺 10mmol/L。

(5) 磷酸盐缓冲液 (Phosphate-Buffer Saline, PBS): NaCl 4g, KCl 100mg, Na₂HPO₄·12H₂O 1.75g, KH₂PO₄ 100mg, 溶解于 500ml 超纯水中, PH 值调控在 7.2—7.4, 120℃高压蒸汽灭菌 20min, 于 4℃冰箱密封保存。

二、实验方法

1. 人脂肪间充质干细胞分离、培养

1.1 将脂肪组织用含 5%双抗（链霉素+青霉素）的 PBS 溶液漂洗 3 次，洗去组织油脂及血液；并于培养皿中，用眼科剪、眼科镊剔除脂肪组织中小血管及胶原纤维组织，之后剪碎呈大小约 1mm 脂肪粒，置于无菌瓶中；

1.2 加入浓度为 0.1%的 I 型胶原酶，量约脂肪组织的 2 倍，磁力搅拌棒搅拌，37℃ 消化 40min；

1.3 按照 1:1 体积加入完全培养基终止消化，先后用 100 目、200 目细胞筛过滤脂肪组织消化液；

1.4 将过滤液离心 1500rpm/10min，离心后，离心管最底层为血管基质细胞混合物，去除上清液与油脂，再次加入 PBS 溶液重悬细胞，反复、轻柔吹打，离心 1000rpm/5min；

1.5 去除上清液，加入完全培养基 4ml，吹打均匀，铺种在 60mm 培养皿中，将培养皿置于 37℃、5%CO₂、95%湿度的培养箱中孵育；

1.6 细胞铺种后 24h 后吸出培养基（内含为贴壁生长的细胞），重新加新鲜的入完全培养基。之后每 3d 换液并观察细胞生长状态，待细胞贴壁达 70%--80%时，进行传代。

2. 人脂肪间充质干细胞的传代及冻存、复苏

2.1 当人脂肪间充质干细胞贴壁生长达 70%--80%时，吸出培养基，用 PBS 缓慢冲洗细胞表面 2 次，旨在去除培养皿中未贴壁的细胞、油脂以及残留的培养基；

2.2 加入 0.25%胰蛋白酶常规消化，同时光学倒置显微镜下观察，可见细胞胞质回缩，细胞间隙增大，由长梭形、贴壁生长转为圆形、游离状态；

2.3 待大部分培养皿中贴壁细胞消化后，及时加入完全培养基（比例为 1:1）终止消化，避免胰蛋白酶过度消化，损伤人脂肪间充质干细胞的状态；

2.4 1000rpm/5min 离心 2 次后，重悬细胞，按照 1:3 进行传代；

2.5 细胞冻存：将待用的细胞加入细胞冻存液 DMSO，移入冻存管密封后，置于冰箱梯度冻存细胞（4℃30min，-20℃2h，-80℃）。长期冻存细胞需放入液氮罐中；

2.6 细胞复苏：将细胞冻存管迅速放入 37℃水浴箱中，同时摇晃冻存管，待冻存

液溶化后, 迅速加入完全培养基, 1000pm/5min 离心 2 次后, 重悬细胞, 按照 1:3 进行铺种。

3. 人脂肪间充质干细胞成脂、成骨多能性鉴定

3.1 HASCs 成脂诱导分化

选取第三代 HASCs, 常规消化细胞、重悬。以 5×10^4 细胞/ cm^2 密度接种于 6 孔板培养皿中, 每孔加入 2.5ml 完全培养基。待细胞贴壁达 70%后, 加入成脂诱导培养液。诱导培养 2 周后, 油红“O”染色并观察;

3.2 HASCs 成骨诱导分化

选取第三代 HASCs, 常规消化细胞、重悬。以 5×10^4 细胞/ cm^2 密度接种于 6 孔板培养皿中, 每孔加入 2.5ml 完全培养基。待细胞贴壁达 70%后, 加入成骨诱导培养液。诱导培养 3 周后, 茜红素染色并观察;

4. 人脂肪间充质干细胞的表型鉴定

4.1 选取第三代 HASCs, 常规消化细胞, 离心后, 加入 1mlPBS 溶液重悬细胞;

4.2 加入一抗, 37℃孵育 30min(一抗包括 FITC 标记的抗人 CD45、CD90、CD11a、HLA-DR, PE 标记的 CD34、CD105、CD73, 同型对照为 FITC 标记的 IgG1、IgG2a);

4.3 流式洗液洗 2 次, 加入 0.5ml/管上机液, 流式细胞仪分析。

实验结果

一、稳定分离、培养人脂肪间充质干细胞

抽取我院整形科吸脂术后无菌脂肪组织 20ml, 稳定分离、培养人脂肪间充质干细胞。光学倒置显微镜下观察: 人脂肪间充质干细胞呈长梭形、贴壁生长。原代人脂肪间充质干细胞培养 7 天后, 可见细胞贴壁达 80%, 传代后细胞生长速度较原代细胞增快, 3 天后可见细胞贴壁达 80%。传代后及冻存复苏后的脂肪间充质干细胞形态无明显差异, 并绘制细胞生长曲线, 典型的生长曲线包括四个阶段: 生长缓慢的潜伏期、斜率较大的指数生长期、平台期及退化衰亡。(图 1)。

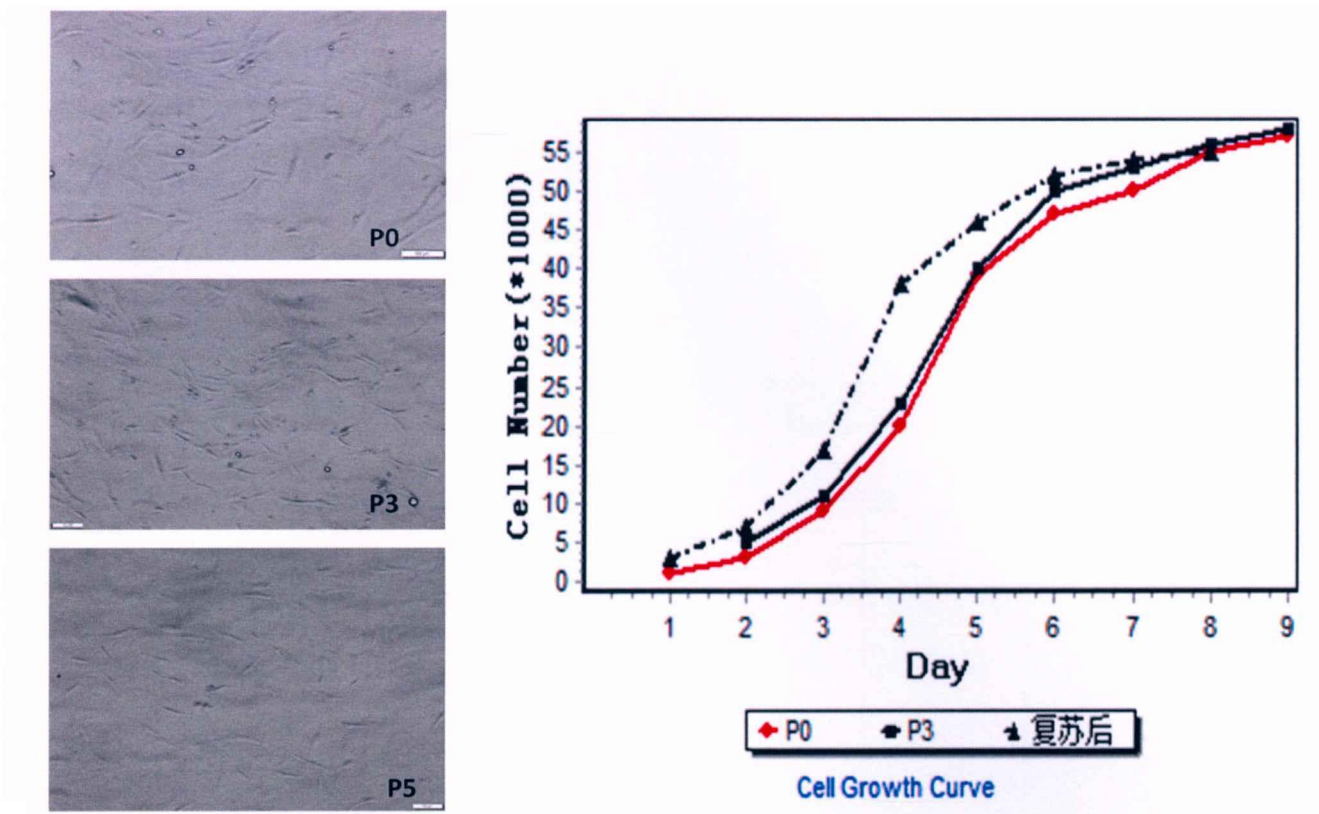


图 1. 显微镜 (x100um) 下观察人脂肪间充质干细胞：原代 (P0)、第三代 (P3) 及复苏后第五代 (P5) 生长形态无明显变化，呈长梭形，轮廓清晰。对应的生长曲线显示：细胞传代、冻存复苏后，出现对数生长期，细胞状态良好。

二、人脂肪间充质干细胞流式鉴定结果

选取第三代人脂肪间充质干细胞进行流式细胞学测定，结果显示：人脂肪间充质干细胞高表达阳性抗体：CD105 (94.89%)、CD90 (95.72%)，低表达阴性抗体：CD45R (2.41%)、CD34 (2.47%)、CD73 (1.09%)、CD11a (0.09%)、HLA-DR (0.05%)、空白对照 (0.02%)，见图 2。CD105 及 CD90 为间充质干细胞表型，HLA-DR 为成纤维细胞的特异表型，CD34 及 CD45 为造血干细胞的特异表型。三者阴性表示该实验中分离培养的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞，而非成纤维细胞及造血干细胞。

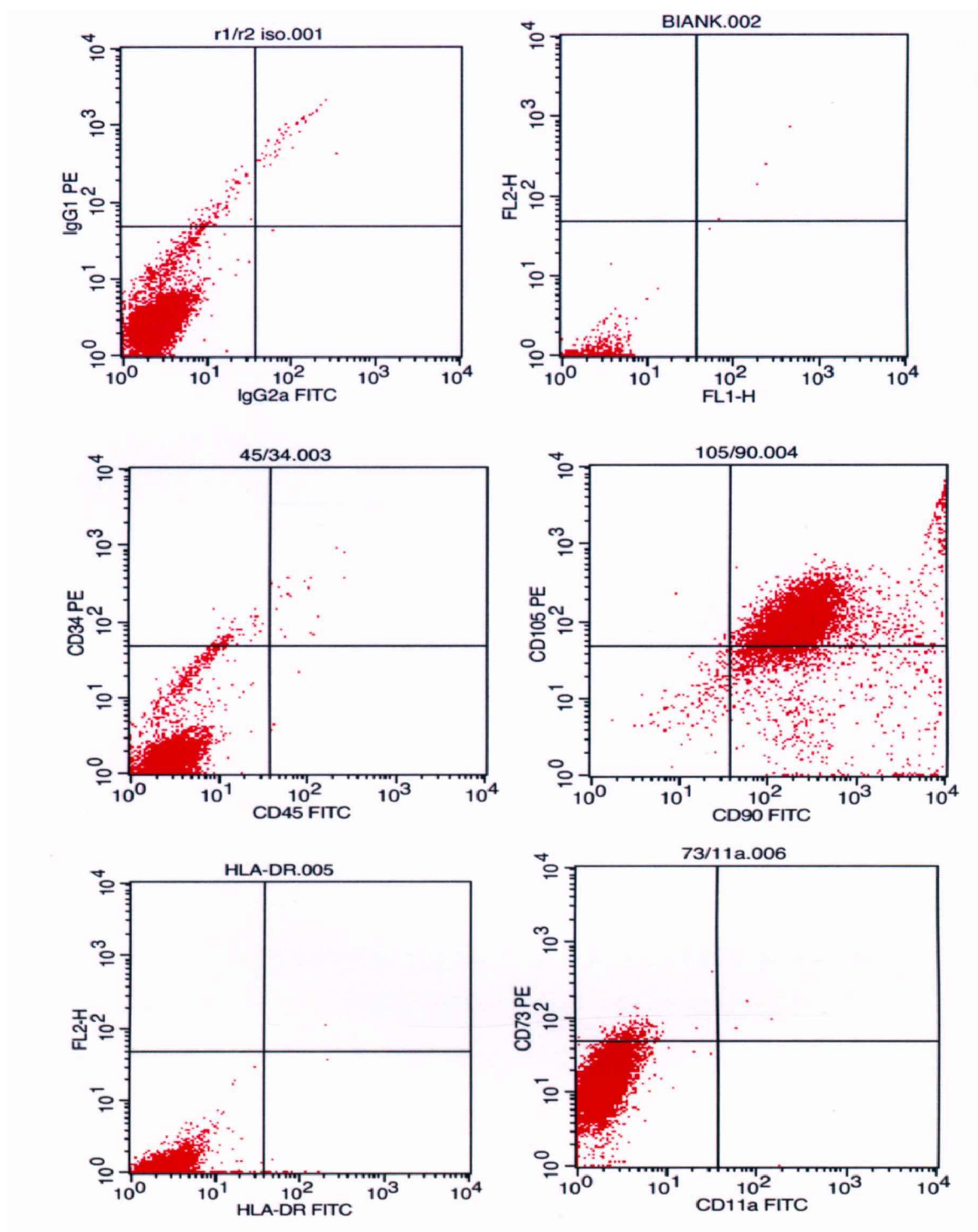


图 2. 脂肪间充质干细胞高表达 CD105(94.89%)、CD90(95.72%)，低表达 CD45R (2.41%)、CD34 (2.47%)、CD73 (1.09%)、CD11a (0.09%)、HLA-DR (0.05%)。

三、人脂肪间充质干细胞成脂、成骨诱导结果

选取第三代人脂肪间充质干细胞进行成脂诱导，两周后，使用油红染色（可将脂滴染成红色）。结果可见人脂肪间充质干细胞经过诱导后，细胞内出现脂滴，

油红染色呈阳性（图 3）。

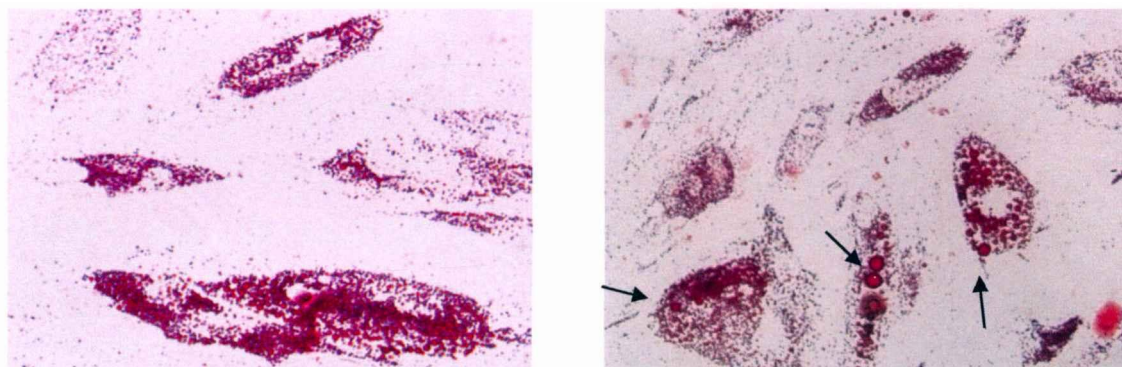


图 3. 人脂肪间充质干细胞成脂诱导 2 周后，细胞内出现被油红染色的脂滴（箭头指示）

选取第三代人脂肪间充质干细胞进行成骨诱导，三周后，使用茜红素染色（可将骨结节染成棕红色）。结果可见人脂肪间充质干细胞经过诱导后，细胞内细胞内出现被茜红素染色的骨结节（图 4）。

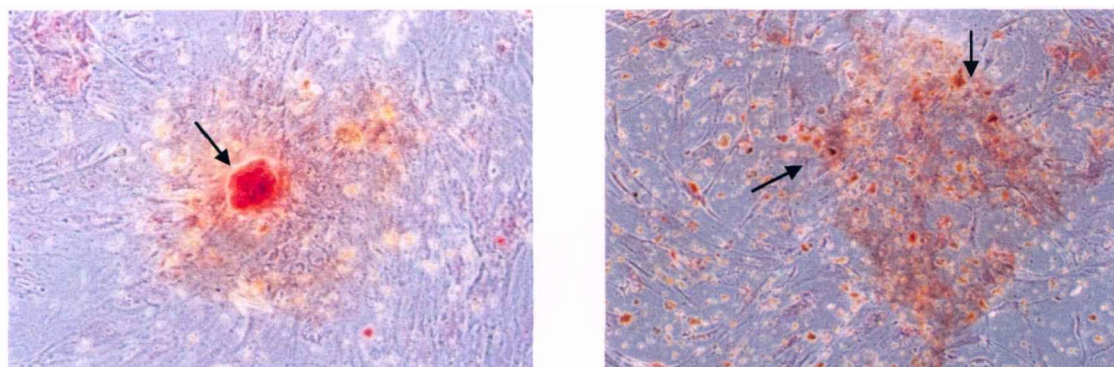


图 4. 人脂肪间充质干细胞成骨诱导 3 周后，细胞内出现被茜红素染色的骨结节（箭头指示）

讨 论

研究表明，人脂肪间充质干细胞具有和骨髓间充质干细胞相似的多向分化潜能。然而，与其他间充质干细胞相比，人脂肪间充质干细胞的分离培养，取材容易，主要通过局麻下腹部脂肪抽吸术获取，患者的痛苦明显减小。并且脂肪间充质干细胞有增殖快速优点，与已分化细胞相比，HADSCs 在体外扩增能获得相对较高的细胞浓度并易培养，经过计算 1 g 脂肪能得到 $(1.0-2.0) \times 10^6$ 的 HADSCs[13]。可以作为一种理想的种子细胞。流式细胞仪鉴定人脂肪间充质干细胞表型，高表达阳性抗体：CD105(94.89%)、CD90(95.72%)，低表达阴性抗体：CD45R(2.41%)、

CD34 (2.47%)、CD73 (1.09%)、CD11a (0.09%)、HLA-DR (0.05%)、空白对照 (0.02%)。CD105 及 CD90 为间充质干细胞表型，HLA-DR 为成纤维细胞的特异表型，CD34 及 CD45 为造血干细胞的特异表型。三者阴性表示该实验中分离培养的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞，而非成纤维细胞及造血干细胞。经过对细胞成骨、成脂诱导，证实了实验中分离、培养的细胞具有干细胞的多能性。

该部分实验主要验证了通过胶原酶消化法，可以从吸脂术获取的脂肪组织中稳定分离、培养形态均一、呈长梭形贴壁生长的细胞。并通过细胞表型鉴定以及多能性验证该贴壁细胞确实为脂肪间充质干细胞。通过描绘不同代数以及复苏后人脂肪间充质干细胞生长曲线，证实传代或复苏后的人脂肪间充质干细胞的生长特性并无明显的改变，均出现对数生长期。该部分为之后研究脂肪干细胞中线粒体功能以及自体脂肪间充质干细胞线粒体移植奠定了扎实的实验操作基础。

第二部分：人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞线粒体功能比较

引言

线粒体为真核细胞的重要细胞器之一，作为细胞“能量工厂”合成三磷酸腺苷 ATP，参与细胞生长、分化、增殖、凋亡、信号传导等细胞活动。线粒体由内、外两层膜包被，内含基质、嵴。线粒体嵴的形态反映细胞氧化代谢的能力。线粒体为一种半自主细胞器，拥有独立的遗传物质和遗传体系。人类线粒体 DNA (mtDNA) 呈双链环状，长度为 16,569bp，含有 37 个基因，编码两种 rRNA (12S rRNA 和 16S rRNA)、22 种 tRNA 以及 13 种多肽。线粒体的数量、分布、形态、代谢具有组织特异性，这取决于细胞的代谢水平。不同组织中线粒体数量差异巨大，细胞代谢活动越旺盛的细胞线粒体数量越多。不同细胞类型中，线粒体生成 ATP 方式不同。在成体细胞中，ATP 生成主要为氧化磷酸化途径，而在卵母细胞中，ATP 生成主要为糖酵解和磷酸戊糖途径。根据能量代谢方式不同，相对应的线粒体结构亦不同[13、14]。通过糖酵解和磷酸戊糖途径生成 ATP 的线粒体，呈圆形、含有少量的嵴；而通过氧化磷酸化途径生成 ATP 的线粒体，呈长形、含有较多的嵴。人的成熟卵母细胞中含有超过 10 万个线粒体，是人体含有线粒体最多的细胞，胚胎中线粒体遗传自母方。故线粒体对于卵母细胞成熟、受精及胚胎发育潜能等密切相关。

线粒体功能正常依赖于线粒体结构特点：线粒体膜电位，即线粒体呼吸链中电子的传递，质子移动的过程，质子通过跨膜移位形成质子梯度，作为细胞能量的储存形式。目前通过试剂罗丹明 123，JC-1 测定线粒体膜电位的变化，进而检测线粒体内膜的完整性。线粒体功能不足是表现为活性氧增加以及钙调节失衡 (reactive oxygen species, ROS)。线粒体是活性氧自由基主要产生的场所，机体大部分 ROS 来自线粒体。当线粒体功能下降，清除 ROS 能力下降，出现氧化应激反应。研究发现，高龄妇女卵泡中 ROS 含量较年轻女性显著增高。线粒体功能异常，表现 ATP 水平下降。ATP 生成不足会导致非整倍体发生[16-21]。人类中，卵母细胞中染色体分离易错率较高，达 15—20%[15]。该实验通过测定线粒体膜电位、活性氧含量、ATP 浓度来评估线粒体功能。

本研究最终目的是要改善高龄女性卵母细胞中线粒体不足，同时为了避免之前研究遇到的安全、伦理问题，旨在选择一种更优的自体细胞线粒体进行移植。

在自体脂肪抽吸后，可能会有个疑问，为何不直接提取脂肪细胞中的线粒体进行移植，而是选择分离、培养出脂肪间充质干细胞，进行线粒体提取、移植？

因此，在本部分实验中，通过比较脂肪细胞与脂肪间充质干细胞中线粒体功能，验证人脂肪间充质干细胞中线粒体是否优于脂肪细胞。

材料与方法

一、主要材料

根据整形外科吸脂女性患者的年龄，分为 3 个小组（>20 岁；≥30 岁；≥40 岁），每组 10 例组织，并且患者既往体健，未患线粒体相关疾病，否认家族遗传病史。

吸脂术后弃用、无菌脂肪约 40ml，分为两份（20ml/份），一份为脂肪细胞组，一份经胶原酶消化法分离、培养为人脂肪间充质干细胞组。

二、主要试剂及耗材

增强型 ATP 检测试剂盒	中国 Beyotime
活性氧（ROS）测试盒说明书	南京建成生物工程研究所
线粒体膜电位（JC-1）检测试剂盒	中国 Beyotime
Luminometer	德国 Pforzheim 公司
流式细胞仪	美国 Beckman 公司

三、实验方法

1. 检测人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中线粒体膜电位

1.1 配制 JC-1 染色工作液：

将 1ml/孔的 JC-1 染色工作液加入六孔板中。将 JC-1(200X)与超纯水混匀，稀释配比为 50 微升 JC-1: 8 毫升超纯水，为确保充分溶解、混匀 JC-1，将混合液剧烈 Vortex。然后将 2ml JC-1 染色缓冲液 (5X)加入稀释液中，配成 JC-1 工作液。

1.2. 设置阳性对照组：

按照 1:1000 的比例，用细胞培养液稀释 CCCP (10mM) 至 $10\mu\text{M}$ ，孵育细胞 30 分钟。处理后阳性对照组中细胞中，线粒体的膜电位消失，荧光显微镜下观察：

显示呈绿色荧光。

1.3 贴壁细胞（人脂肪间充质干细胞）样本的制备：

- a. 选择一个孔作为阴性对照，吸出培养液，PBS 洗涤细胞中，加入细胞培养液 1ml。
- b. 将配制的 JC-1 染色工作液 1ml 加入实验孔中，混匀，37℃ 30min 孵育
- c. 同时，按照 1:4 比例，加入蒸馏水，配制 JC-1 染色缓冲液（1X），冰浴中待用。
- d. 孵育结束后，将上清液吸出，并用 JC-1 染色缓冲液清洗 2 次。
- e. 每孔加入新的细胞培养液。
- f. 观察染色结果。

1.4 脂肪细胞的制备：

- a. 1ml 脂肪组织中含 1000000HADSCs
- b. 加入 1ml JC-1 染色工作液，混匀。37℃细胞培养箱中孵育 20 分钟。
- c. 孵育结束后，4℃1000r/min，离心 5 分钟。吸出上清液。
- e. JC-1 染色缓冲液洗涤细胞。
- f. 重新加入细胞培养液，用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察，也可以用流式细胞仪分析。

1.5 荧光显微镜下观察：

JC-1 聚合物(J-aggregates)时，设定 585nm 最大的激发波长，设定 590nm 为最大发射波长。JC-1 单体时，设定 514nm 为最大激发波长为，设定 529nm 为最大发射波长。

2. 人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中活性氧（ROS）检测

2.1 人脂肪间充质干细胞（HADSCs）活性氧检测

2.1.1 0.25%含 EDTA 胰蛋白酶常规消化 HADSCs，完全培养基终止消化后制成细胞悬液，1000rpm 离心 5min，PBS 洗涤 2 次后收集 HADSCs 至 10ml 离心管中，细胞密度约 $10^6/L$ ；

2.1.2 DCFH-DA 按照 1:1000 比例稀释于无血清培养基 DMEM 中，工作浓度为 10 μ mol/L；

2.1.3 吸取 1ml DCFH-DA 稀释液加入收集 HASCs 的离心管中,吹打均匀,置于 37℃ 细胞培养箱中孵育 30min。孵育过程中,间隔 5min,摇晃离心管使得 DCFH-DA 探针与细胞充分接触;

2.1.4 将加入探针孵育后的细胞,用 PBS 洗涤 3 次后,并用 PBS 重悬细胞,待上机检测;

2.1.5 将加入探针孵育后的细胞,用 PBS 洗涤 3 次后,并用 PBS 重悬细胞,待上机检测;

2.2 人脂肪细胞中活性氧检测

2.2.1 取同一样本的脂肪组织约 1ml,立即放入预冷的 PBS 中,清洗血迹,去除组织中的纤维血管;

2.2.2 利用离心分离法将脂肪组织封层,139g 离心 3min,离心后顶层、中层及底层,上层为油滴,中层为脂肪组织,底层为血管及纤维细胞等;

2.2.3 收集中层的细胞悬液,并用 PBS 洗涤 2 次,再次 139g 离心 3min,弃上清,PBS 重悬脂肪细胞。通过该法,每 1ml 脂肪组织中可提取 10^6 个细胞;

2.2.4 加入 1ml DCFH-DA 稀释液,吹打均匀,置于 37℃ 细胞培养箱中孵育 30min。孵育过程中,间隔 5min,摇晃离心管使得 DCFH-DA 探针与细胞充分接触;

2.2.5 收集孵育(探针标记)后的单细胞悬液,139g 离心 3min 收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,离心后用 PBS 重悬,待上机检测;

2.2.6 流式细胞仪检测不同年龄人脂肪间充质干细胞平均荧光强度,激发波长为 490nm,发射波长为 525nm;

3. 人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中 ATP 水平测定

3.1 样品的制备(样品裂解需在 4℃ 或冰上操作)

3.1.1 对于人脂肪间充质干细胞:

吸去培养基,调整细胞密度 10^5 /孔,将 200ul 裂解液加入 6 孔板每孔。反复吹打细胞,充分裂解细胞。4℃ 12000g 离心 5min,除去上清液,测定 ATP 浓度。

3.1.2 对于脂肪组织

按照每 20mg 脂肪组织中加入 200ul 裂解液,脂肪细胞约 10^5 个,用玻璃

匀浆器进行匀浆。充分匀浆可以确保组织被完全裂解。裂解后 4℃ 12000g 离心 5min, 取上清, 用于后续的测定。

3.2 配制 ATP 检测工作液

按照 1:5 的比例, 适量 ATP 检测试剂中滴加稀释剂稀释。ATP 检测工作液放置在冰上待用

3.3 测定 ATP 浓度

3.3.1 每个检测孔加 100ulATP 检测工作液, 室温中 5 分钟, 充分消耗本底的 ATP

3.3.2 将 20ul 样品加入至每个检测孔中, 迅速混匀, 用 Luminometer 测定 RLU 值。

4. 统计学处理

所得实验数据用 SPSS 20.0 进行处理, 不同年龄女性, 人脂肪间充质干细胞中线粒体功能与脂肪细胞比较, 运用 t 检验。设定 $P < 0.05$ 认为两组间的差异有显著性。

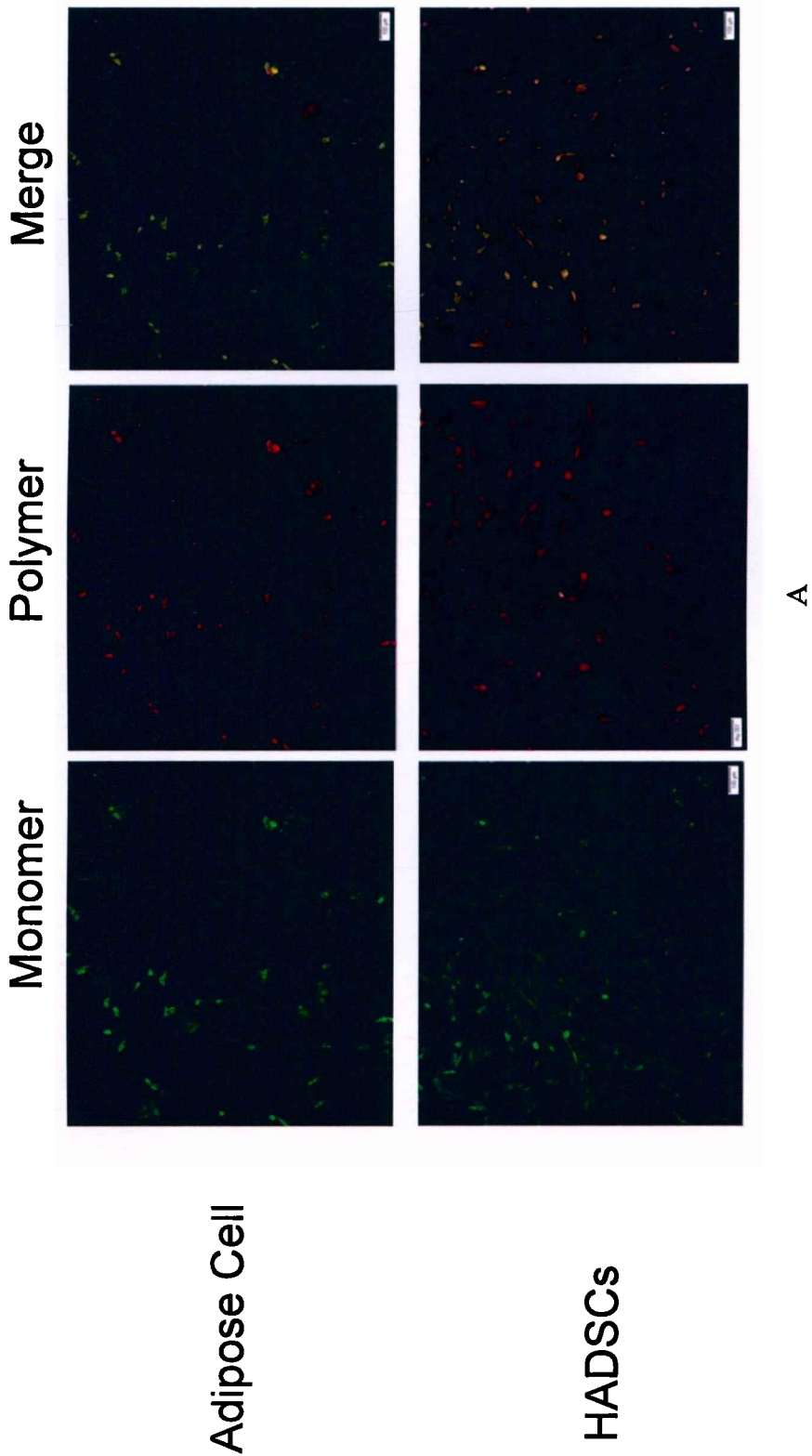
实验结果

一、人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)的比较

线粒体功能的正常依赖其完整的膜结构。线粒体内膜上存在质子泵, 在线粒体呼吸过程中, 质子泵将基质内的质子泵入内、外膜间隙, 产生浓度梯度, 最终形成跨内、外膜的电势, 即为线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)。正常线粒体膜电位是维持线粒体进行呼吸运动、产生 ATP 前提, 维持线粒体功能所必需。在细胞凋亡前, 最早出现的变化就是线粒体膜电位丧失。

运用流式细胞术检测 JC-1 荧光强度, 通过红/绿荧光强度比值, 比较人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中线粒体功能(图 5)。

结果显示: 人脂肪间充质干细胞线粒体膜电位($\Delta\psi_m$, 即红/绿荧光强度比值)为 1.071 ± 0.043 , 人脂肪细胞线粒体膜电位 0.727 ± 0.188 , 差异具有统计学意义。如图 5 所示, 来自同一脂肪组织中, 脂肪间充质干细胞线粒体膜电位较脂肪细胞高, 即人脂肪间充质干细胞中线粒体功能优于脂肪细胞。



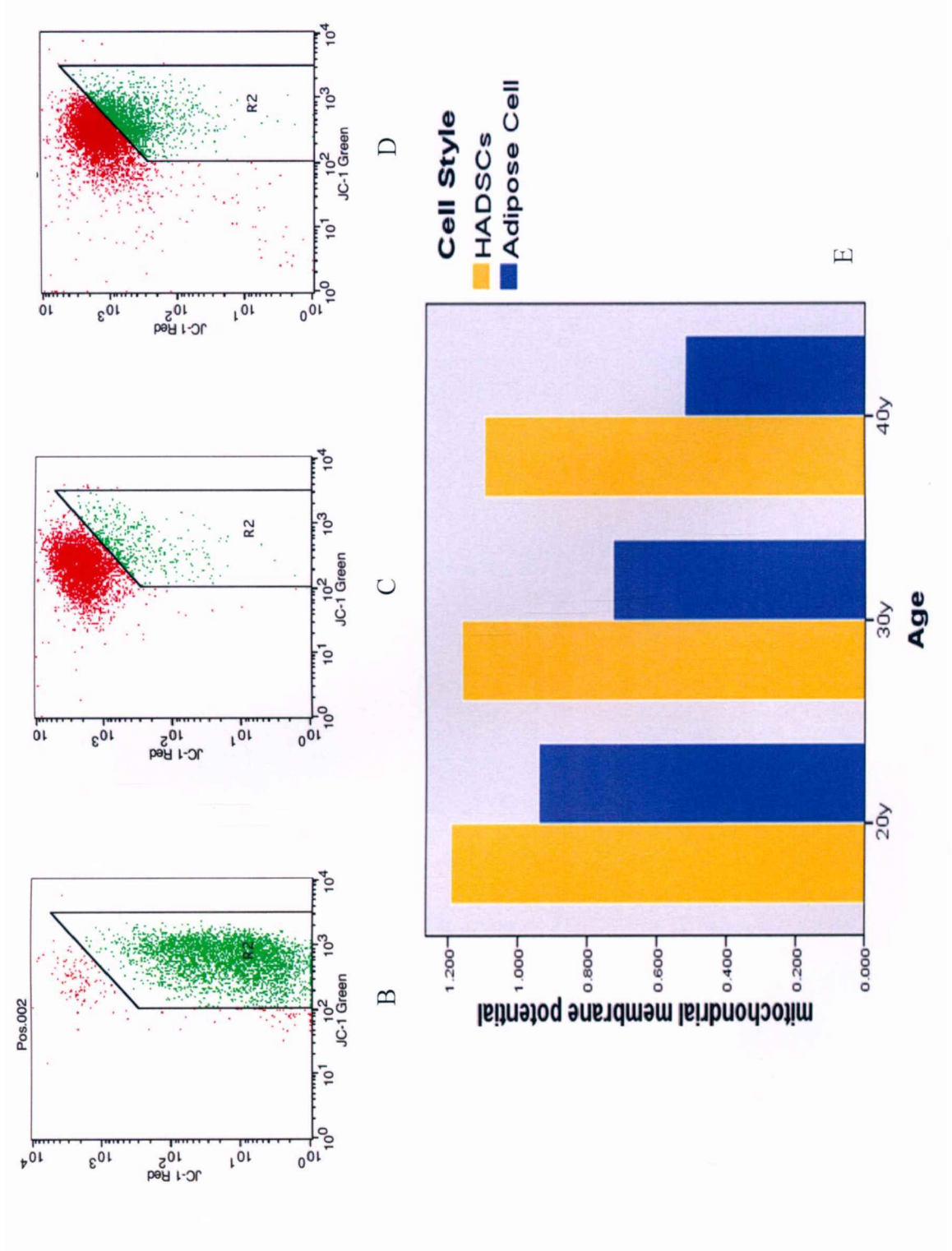
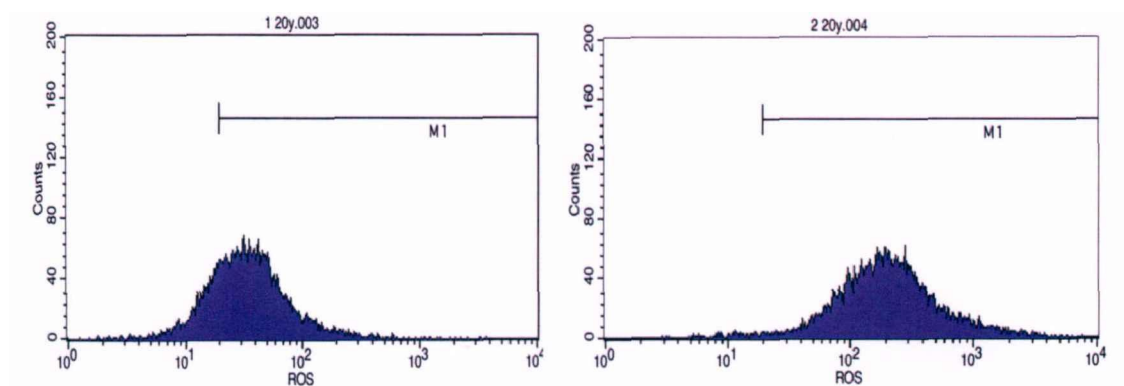


图 5.A 图利用 JC-1 探针荧光共聚焦显微镜下观察，脂肪细胞及脂肪间充质干细胞中线粒体膜电位荧光图像。红色荧光与绿色荧光融合后显示，脂肪细胞中线粒体膜电位荧光颜色偏绿，比脂肪间充质干细胞线粒体膜电位低，线粒体功能差；B 图为阳性对照，双氧水处理细胞使其死亡，流式鉴定结果中绿色荧光表示细胞死亡；C、D 图中所示为实验组中脂肪干细胞、脂肪细胞流式检测结果图，通过比较红色荧光强度/绿色荧光强度，分析线粒体膜电位的差异；E 图根据实验对象年龄分层，配对 t 检验结果：人脂肪间充质干细胞线粒体膜电位($\Delta\psi_m$ ，即红/绿荧光强度比值)为 1.071 ± 0.043 ，人脂肪细胞线粒体膜电位 0.727 ± 0.188 ($P < 0.05$)，表示人脂肪间充质干细胞线粒体功能优于来自同一组织的脂肪细胞。

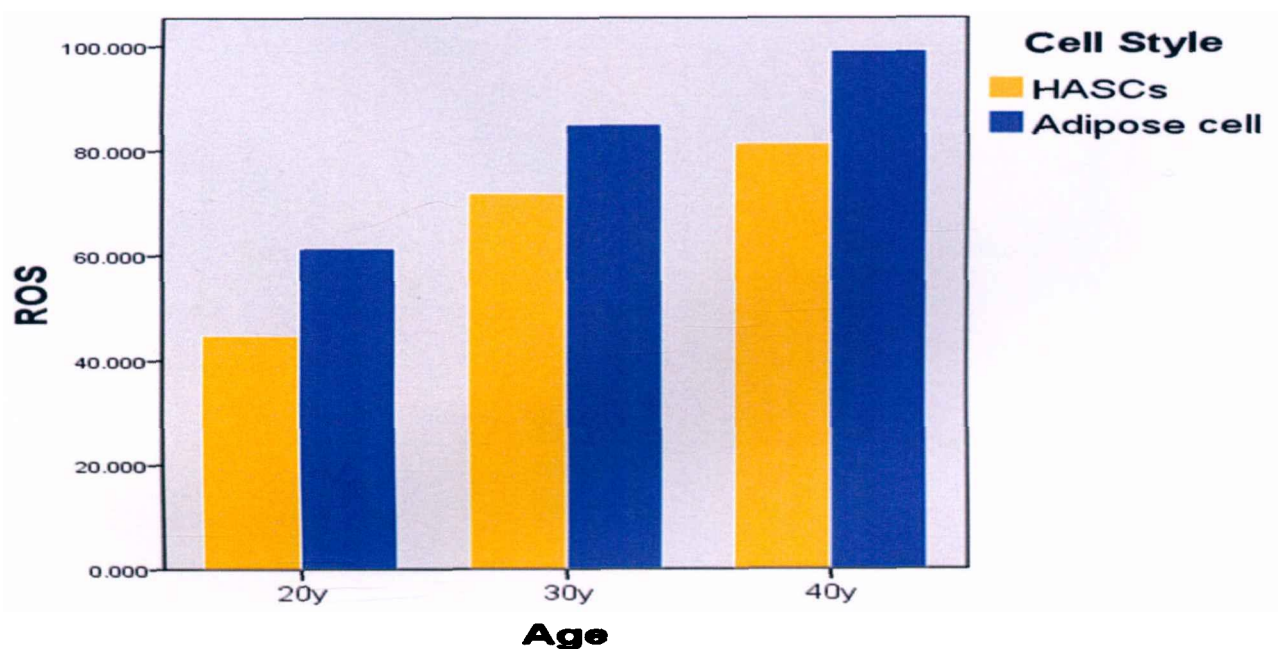
二、人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中线粒体活性氧（ROS）的比较

线粒体是活性氧自由基（ROS）产生的主要场所，机体大部分 ROS 来自线粒体。当细胞线粒体功能下降，清除 ROS 能力下降，出现氧化应激反应。DCFH-DA 是目前最常用、最灵敏的细胞内活性氧检测探针，通过流式细胞术检测人脂肪间充质干细胞、脂肪细胞中 ROS 含量，比较二者线粒体功能（图 6）。



A

B



C

图 6. A 脂肪间充质干细胞 ROS 流式检测结果图；B 脂肪细胞 ROS 流式检测结果图；C 脂肪间充质干细胞 ROS 荧光强度为 65.97 ± 16.71 ，脂肪细胞 ROS 荧光强度为 96.19 ± 19.10 ，通过分层配对 t 检验，结果如图所示：人脂肪间充质干细胞中 ROS 含量低于脂肪细胞，反映人脂肪间充质干细胞中线粒体功能优于脂肪细胞。

三、人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中 ATP 浓度的比较

本实验利用化学发光检测仪(luminometer)测定 RLU 值,进而反映 ATP 浓度(图 7)。检测结果显示,随着实验对象年龄的增加,人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中 ATP 水平均下降。分层配对比较二者 ATP 水平,在各年龄阶段,人脂肪间充质干细胞中 ATP 水平均高于脂肪细胞,差异具有统计学意义。提示人脂肪间充质干细胞线粒体功能优于脂肪细胞。

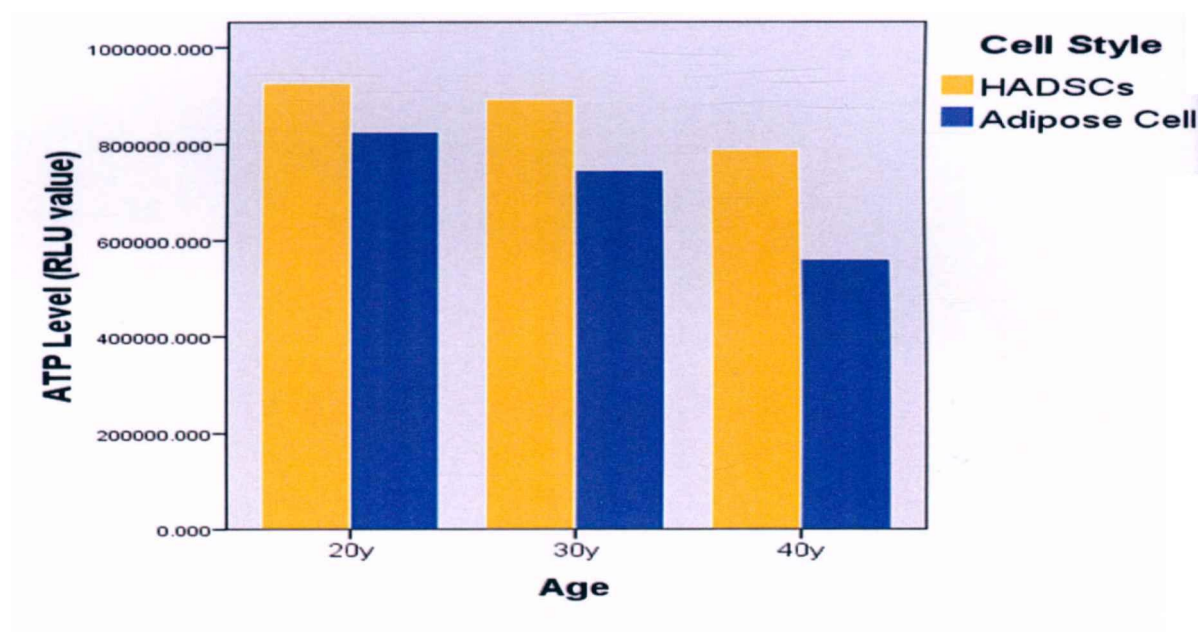


图 7. 随着实验对象年龄的增加,人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中 ATP 水平均下降。分层配对比较二者 ATP 水平,在各年龄阶段,人脂肪间充质干细胞中 ATP 水平均高于脂肪细胞,差异具有统计学意义。提示人脂肪间充质干细胞线粒体功能优于脂肪细胞。

讨 论

多项研究表明,线粒体老化与年龄相关。线粒体被认为是人体的“衰老钟”。

其功能的变化与年龄有着密切的关系。在早期的研究中，发现在人类肌肉细胞内伴随年龄增高出现的，ATP 水平相关指标下降。最近的动物研究再次表明，随着年龄的增长，卵母细胞中 ATP 水平下降。通常与 ATP 水平下降同时出现的是线粒体膜电位下降。正常线粒体膜电位是维持线粒体进行氧化磷酸化、产生 ATP 的前提，维持线粒体功能所必需的。研究表明，线粒体膜电位随着年龄的增长而呈下降趋势。线粒体是活性氧自由基主要产生的场所，机体大部分 ROS 来自线粒体。当线粒体功能下降，清除 ROS 能力下降，出现氧化应激反应。研究发现，高龄妇女卵泡中 ROS 含量较年轻女性显著增高。

该实验三组不同年龄女性比较线粒体功能，结果显示，脂肪细胞和脂肪间充质干细胞中线粒体膜电位、ATP 浓度随着年龄的增长下降，ROS 含量上升。提示随着女性年龄的增长，脂肪细胞和脂肪间充质干细胞中线粒体功能均下降。

按照女性年龄分层，对于来源于同一脂肪组织中的脂肪细胞与脂肪间充质干细胞线粒体功能配对比较时发现，脂肪间充质干细胞线粒体功能优于脂肪细胞。分析其原因可能是相对于体细胞（脂肪细胞），脂肪间充质干细胞具有一定“细胞干性”，维持在相对静止的状态，代谢较脂肪细胞慢，线粒体不易受到长期累积的活性氧的损伤。

第三部分：一例高龄女性自体脂肪间充质干细胞线粒体移植 在辅助生殖过程的可行性研究

引 言

已有大量研究表明, 30 岁时女性 1 年内的自然受孕率为 75%, 35 岁时 66%, 40 岁时为 44%[4]。同时, 高龄女性妊娠后的流产率及出生缺陷发生率也显著增高。同时, 高龄女性不孕症患者体外受精-胚胎移植 (IVF) 的临床结局较年轻患者明显差, 部分患者因胚胎质量差多次种植失败。根据美国和英国的最新统计数据[1, 2], 40 岁以上高龄女性的辅助生殖技术活产率低于 20%, 与 30 岁以下比较, 下降超过 50%, 这与卵细胞内线粒体功能不足或受损有关。

成熟的卵细胞中大约有 10 万个线粒体, 而精子中仅有 20 个左右, 因此前期胚胎发育, 尤其是囊胚发育阶段所需的能量主要来自于卵子所携带的线粒体。随着女性年龄增长, 线粒体 DNA 拷贝数减少或变异, 导致 ATP 能量产生不足, 进而影响卵母细胞成熟, 染色体分离异常, 生物合成, 受精卵及胚胎的发育。最终高龄女性体外受精-胚胎移植 (IVF) 成功率亦下降。

本研究经过前两部分实验证实: (1) 本实验中心可以稳定地从吸脂术后脂肪组织中分离、培养人脂肪间充质干细胞, 并通过细胞表型鉴定、干细胞多能性诱导证实所得细胞为人脂肪间充质干细胞, 此技术成熟; (2) 通过比较来源同一脂肪组织中, 脂肪间充质干细胞与脂肪细胞中线粒体功能, 得出人脂肪间充质干细胞线粒体功能优于脂肪细胞。因此, 经过解放军总医院伦理委员会批准 (批准文号: S2016-117-01), 开展了首例人自体脂肪间充质干细胞线粒体移植, 改善胚胎发育质量, 提高高龄女性 IVF 的成功率。

试验对象及方法

一、自体脂肪间充质干细胞线粒体移植对象

1、纳入标准:

- (1) 年龄 40 岁以上;

- (2) 自身无线粒体相关疾病;
- (3) 不明原因 IVF 反复失败 (胚胎形成困难、移植后未着床、胚胎停育等);
- (4) 不孕患者生育要求强烈, 同意自体脂肪间充质干细胞线粒体移植以提高妊娠率, 并接受可能出现的并发症以及再次 IVF 失败。

根据纳入标准, 选择首例行自体脂肪间充质干细胞线粒体移植高龄不孕女性。

一般信息:

患者: 何某某 年龄: 43 岁 身高: 162cm 体重: 56Kg

配偶: 李某某 年龄: 46 岁 身高: 165cm 体重: 64Kg

病史采集:

主诉	未避孕未孕 10 年, IVF 失败 3 次
现病史	孕 4 产 0, 1994 年、1995 年及 1997 年分别于孕 40 余天行人工流产术 2013 年 3 月, 于北大第三医院经长方案促排卵, 获卵 17 枚, 新鲜胚胎移植 (embryo transfer, ET) 1 次, 冷冻/解冻胚胎移植 (frozen/thawed embryo transfer, FET) 3 次, 均失败; 2014 年, 于北医三院行微刺激方案促排卵, 获卵 8 枚, 得胚胎 4 个, ET 1 次, FET 1 次, 均失败; 2015 年, 于北医三院再次行微刺激方案促排卵, 获卵 8 枚, FET 2 次, 胚胎停育 1 次, 失败 1 次。
月经史	初潮 15 岁, 平素月经规律, 5/26-28 天, 量中等, 无痛经, LMP: 2016-11-23。
婚育史	20 岁结婚, 孕 4 产 0, 末次妊娠时间为 2015 年, 配偶弱精症。
既往史	2013 年行腹腔镜下双侧输卵管切除术
个人史	无吸烟、酗酒等不良生活习惯, 无药物过敏史
家族史	父母体健, 否认家族遗传病史
体格检查	T 36.5℃; HR 80 次/分; R 20 次/分; BP 130/78mmHg。全身系统检查未见明显异常。
妇科查体	正常
主要检查	TCT 正常

二、主要试剂、药品及耗材

1、主要试剂及药品

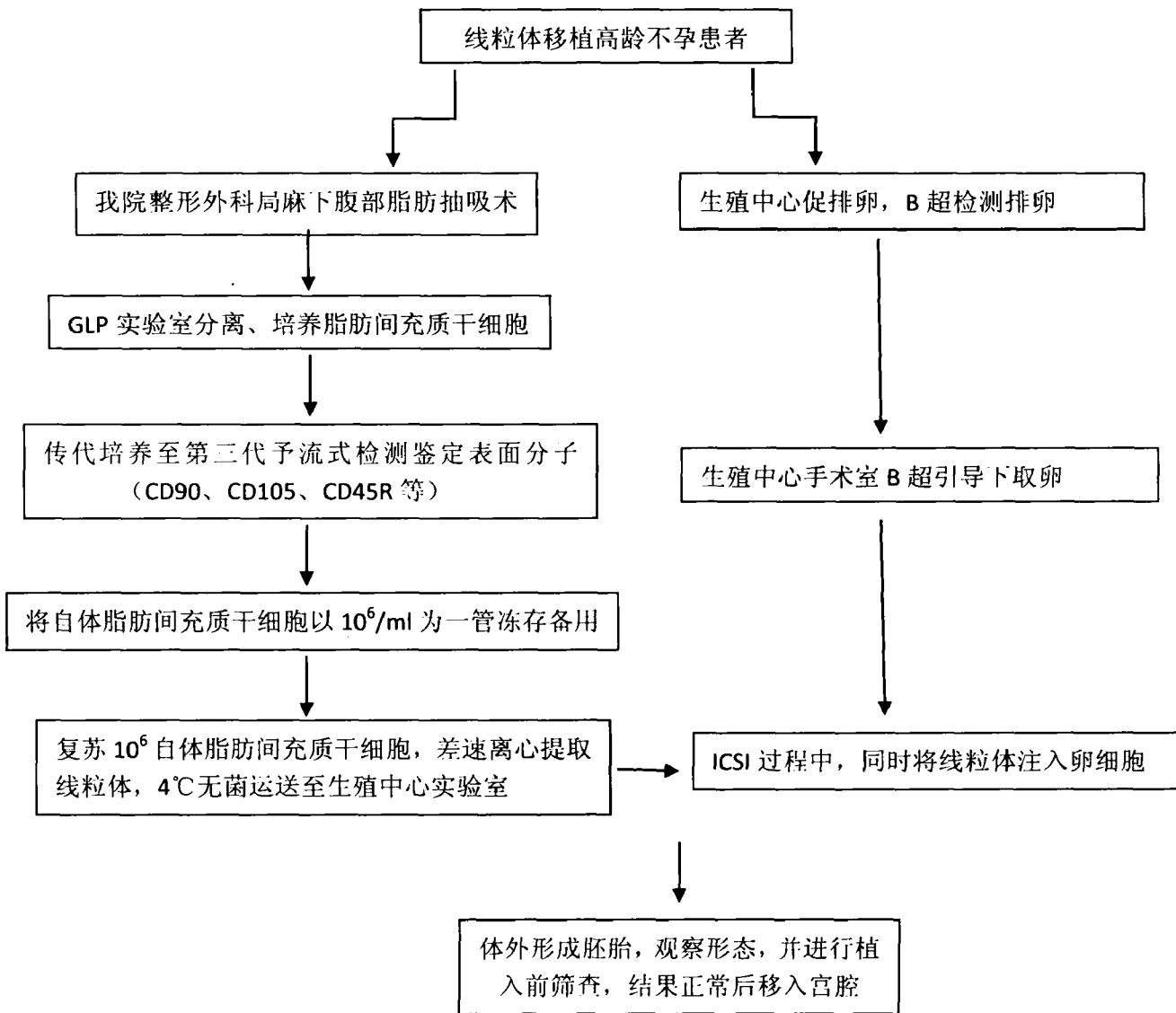
无血清培养基	军事医学科学院
氯化钠注射液	石家庄四药有限公司
达菲林	法国益普生制药有限公司
基因重组促性腺激素 (rFSH)	瑞典雪兰诺公司
透明质酸酶	Sigma 公司, 美国
人输卵管培养液 (HTF)	Irvine Science, 美国
人血白蛋白	Irvine Science, 美国
胚胎培养专用矿物油	Irvine Science, 美国

2、主要耗材

倒置显微镜	Leica DMIRB, 德国
培养箱	Thermo Scientific, 美国
台式冷冻离心机	Thermo Scientific, 美国
电动移液器	BRAND, 德国
玻璃匀浆器	上海玻璃仪器厂, 中国
低速台式离心机	北京时代北利离心机有限公司, 中国
电子恒温水浴箱	天津泰斯特仪器有限公司, 中国
显微注射针	Sunlight Medical, 美国
倒置显微镜 (IVF 实验室)	Nikon ECLIPSE TiU, 日本

三、自体脂肪间充质干细胞线粒体移植临床操作步骤

临床路径



1、自体腹部脂肪抽吸术

手术地点：解放军总医院整形外科门诊手术室

麻醉方式：局部麻醉

手术经过：麻醉成功后，患者取仰卧位，常规消毒手术区，铺无菌手术单，手术开始。沿脐环做 0.5cm 切口，应用吸脂膨胀液（每 1000ml 含利多卡因 200mg、肾上腺素 1mg）均匀注入腹部、腰部标记范围的脂肪层，至皮肤、皮下组织呈现紧绷感，皮肤略苍白，刺入吸脂针，接注射器负压于上腹部、下腹部、腰部由深

至浅匀速进行抽吸，抽吸时随时抓捏皮下脂肪，检测均匀度和对称性，抽出的脂肪组织经洗涤纱布过滤，共获得脂肪量约 40ml，检查双侧腰腹部基本对称，挤出残余液体，切口用 6-0 尼龙线缝合。

2、自体脂肪间充质干细胞分离、培养

2.1 将吸脂术脂肪组织 40ml 无菌环境下送至解放军总医院 GLP 实验室。用生理盐水清洗、离心 2 次，去除可见的红细胞及油脂；

2.2 眼科剪将脂肪组织剪成糊状，置入无菌玻璃瓶中，加入 0.25%胰蛋白酶，37℃ 水浴中震动消化约 40min；

2.3 1:1 加入无血清培养基终止消化，先后用 200 目细胞筛过滤。滤液 1500r/min 离心 10min，弃上清；

2.4 生理盐水重悬细胞，清洗，1000r/min 离心 5min，弃上清；

2.5 加入无血清培养基重悬细胞，均匀铺种于 10cm 培养皿中，放入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中；

2.6 原代培养细胞达 85%融合时，以 0.25%胰蛋白酶将贴壁细胞消化 3min，无血清培养基终止消化、离心后，1:3 接种于 25ml 培养瓶中。

3、自体脂肪间充质干细胞鉴定、冻存及复苏

(1) 选取第三代脂肪间充质干细胞，流式细胞仪检测表面特异抗原。

常规消化细胞，0.25%胰蛋白酶消化待检测细胞，1:1 加入培养基终止消化；1000r/min，离心 10min，在细胞沉渣中加入 CD90、CD73、CD105、CD34、CD45、D11a、HLA-DR 荧光抗体各 20ul，4℃孵育 30min；生理盐水清洗 2 次；上机检测抗原阳性率。

(2) 脂肪间充质干细胞冻存

常规消化细胞，0.25%胰蛋白酶消化待检测细胞，1:1 加入培养基终止消化；1000r/min 离心 5min；调节细胞密度 1×10^6 /ml，加入 1ml 胎牛血清。冻存管上详细标明冻存患者 ID 号、细胞名称、代数、冻存时间及冻存者；冻存管放入冻存盒，之后放入-80℃冰箱中过夜，第二天取出，移入液氮容器内。

(3) 脂肪间充质干细胞复苏

复苏时间：不孕患者取卵前三天复苏其自体脂肪间充质干细胞。

从液氮容器中取出冻存管，迅速放入 37℃温水中，并不时摇晃令其尽快融化；

从 37℃ 水浴中取出冻存管，打开盖子，将细胞悬液吸入 15ml 离心管中，按 1:10 比例加入培养基，混匀；1000r/min 离心 5min；调整细胞密度后，接种在培养瓶中，待不孕患者取卵当天同时提取线粒体。

4、差速离心法提取自体脂肪间充质干细胞线粒体（冰上操作）

（1）常规消化脂肪间充质干细胞约 1×10^6 个，生理盐水重悬后，置于 4℃ 预冷、1.5ml EP 管中；

（2）自动匀浆器充分裂解细胞后，4℃、800g，离心 20min，细胞核、大的膜碎片、未裂细胞等沉在管底；

（3）将匀浆后的上清液移至另一预冷的 EP 管中，4℃、15000g，离心 20min，离心后的上清含胞浆成分，线粒体沉淀于管底；

（4）在线粒体沉淀中加入 1ul 人输卵管液（HTF）重悬线粒体沉淀后，低温送至生殖中心实验室，放入 4℃ 冰箱备用。

5、根据该例患者情况采用控制性卵巢刺激

月经第二天予促性腺激素释放激素激动剂 0.1mg 至停促排卵日。月经第 3 天结合患者情况给予 FSH（果纳芬）每日 150IU 促排卵。B 超检测排卵，有一个 $\geq 1.8\text{cm}$ 或者两个 $\geq 1.7\text{cm}$ 或者三个 $\geq 1.4\text{cm}$ 的卵泡时停止促排卵，并于当晚予 HCG250ug 肌肉注射，注射后 36 小时，于生殖中心手术室 B 超检测下取卵。

6、显微授精操作及线粒体移植（准备工作同 ICSI）

（1）体外培养卵子 3h 后，进行 ICSI；

（2）吸取线粒体溶液，和制动后的精子注入卵细胞内；

7、观察卵子受精和胚胎质量

观察并评估受精后第一天、第二天、第三天及第五天

胚胎发育情况的评价标准

（1）细胞数；

（2）碎片：无碎片，碎片 $< 10\%$ ，碎片 10—30%，碎片 30—50%，碎片 $> 50\%$ ；

（3）卵裂球均匀程度

三位评分法：

（1）囊胚腔的大小：

1 分：不到整个胚胎的一半；

2 分：超过了胚胎体积的一半；

3 分：完全占据整个胚胎；

4 分：扩张囊胚；

5 分：孵化囊胚；

6 分：孵化后囊胚

(2) 内细胞团细胞分级：A 包裹紧密，大量细胞；B 结构松散，少量细胞；C 极少量细胞

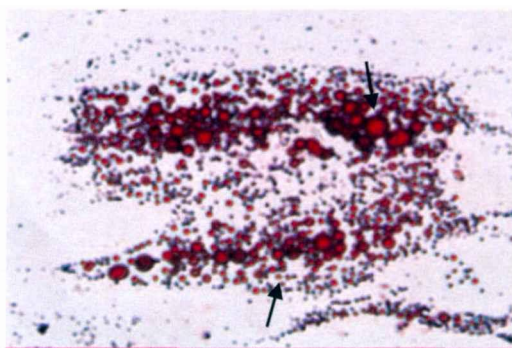
(3) 滋养层分级：A 许多细胞紧密结；B 少量细胞，结构松散；C 极少量细胞

四、胚胎植入前遗传学筛查（Preplantation Genetic Screening, PGS）及线粒体 DNA 拷贝术测定由贝瑞和康生物技术有限公司进行。

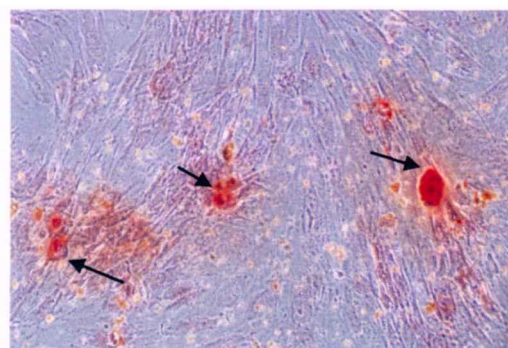
试验结果

一、自体脂肪间充质干细胞分离、培养、冻存

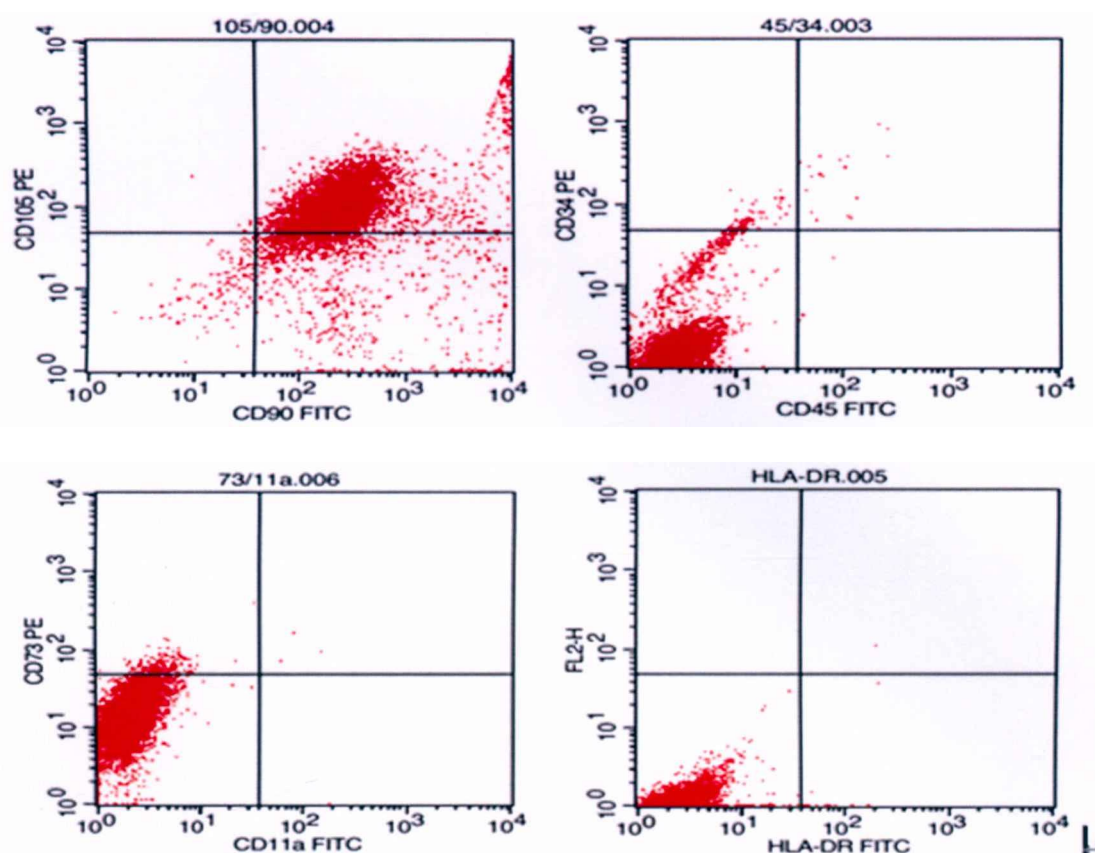
患者何某某，于 2016 年 10 月 28 日在解放军总医院整形外科进行局麻下腹部脂肪抽吸术。患者术中、术后生命体征平稳，切口愈合良好，无不适。共抽取脂肪组织 40ml，无菌环境下运送至解放军总医院 GLP 实验室。胶原酶消化法分离原代人脂肪间充质干细胞，铺种 3 个 100mm 培养皿。培养原代细胞 6 日后，按照 1:3 比例传代 P1，按照人脂肪间充质干细胞生长特性，之后间隔 3 天，细胞贴壁生长达 80% 传代至第三代 P3，以 10^6 /管的密度冻存自体脂肪间充质干细胞共 13 管，待用。镜下观察该患者自体脂肪间充质干细胞形态，无明显差异，生长良好。通过人脂肪间充质干细胞表型鉴定（图 6），确定贴壁细胞为脂肪间充质干细胞。



A



B



C

图 6. A、B 该患者脂肪间充质干细胞成脂、成骨诱导结果，均诱导后经油红“O”及茜红素染色，分别可看到油滴及骨结节；C 该患者脂肪间充质干细胞表型测定高表达 CD105 (97.56%)、CD90 (96.84%)，CD45R、CD34、CD73、CD11a、HLA-DR 阴性。

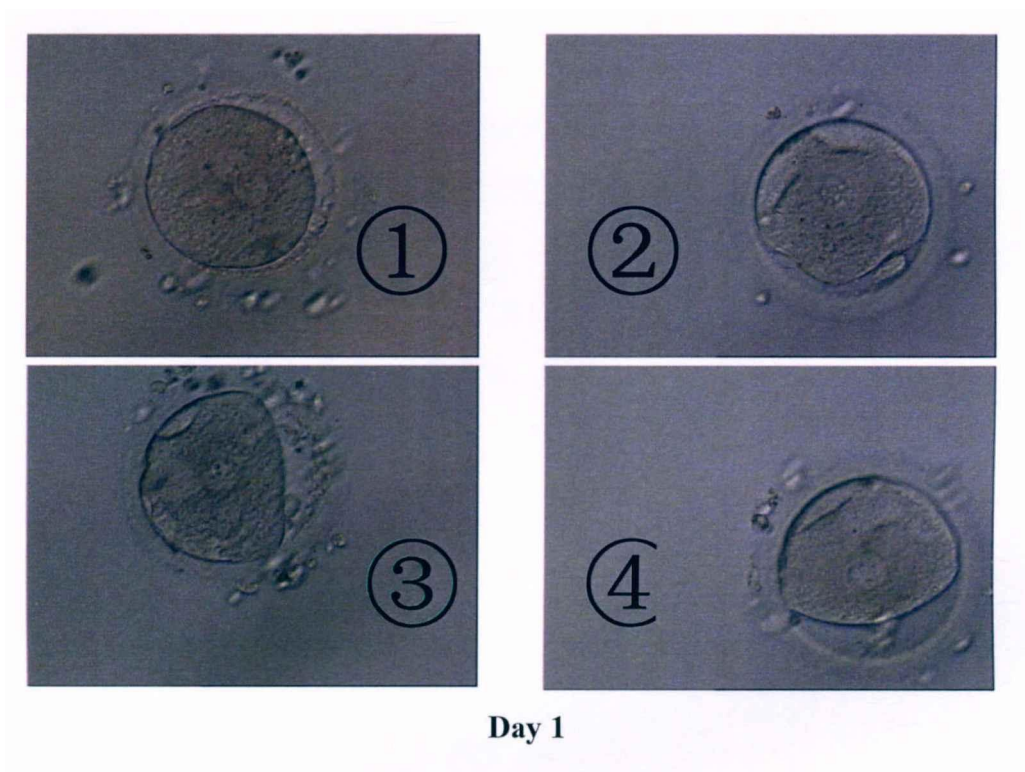
二、受精后及胚胎发育情况观察

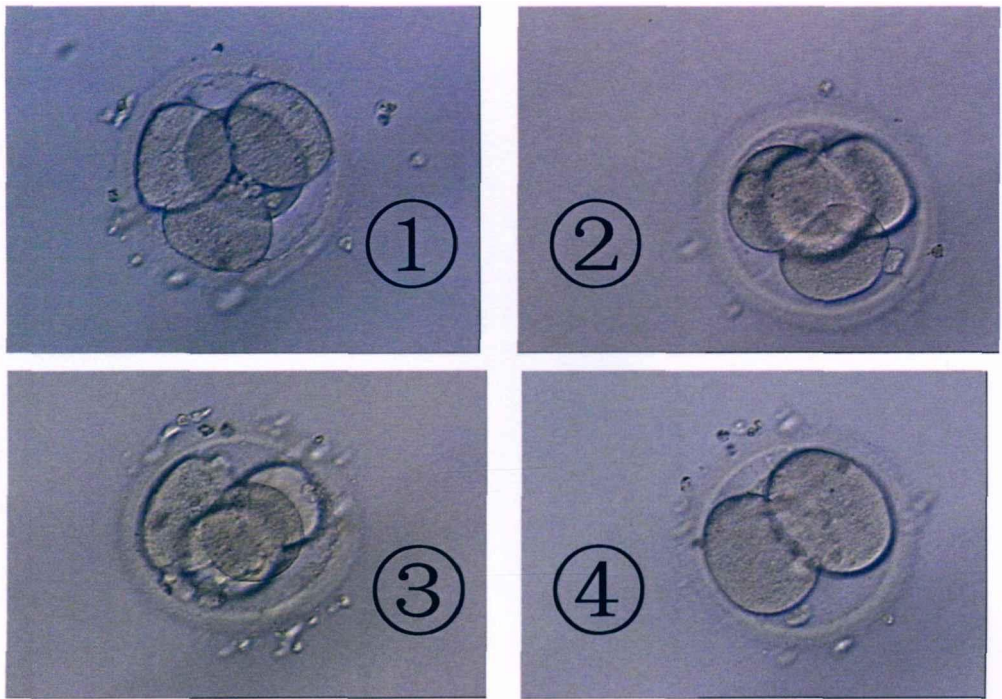
患者于 2016 年 12 月 4 日晨于解放军总医院生殖中心手术室，超声引导下取出 4 枚卵子。并在取卵后 3 小时进行 ICSI，其中两枚卵子只进行了 ICSI，作为对照组，胚胎标记为 1 和 2；另外两枚卵子行 ICSI+线粒体移植，作为实验组，胚胎标记为 3 和 4。

倒置显微镜下观察并评估受精后第一天 (Day1)、第二天 (Day2)、第三天 (Day3) 及第五天 (Day5) 的胚胎形态。根据胚胎三位评分法：囊胚腔的大小 (1 分：不到整个胚胎的一半；2 分：超过了胚胎体积的一半；3 分：完全占据整个胚胎；4 分：扩张囊胚；5 分：孵化囊胚；6 分：孵化后囊胚)、内细胞团细胞分级 (A

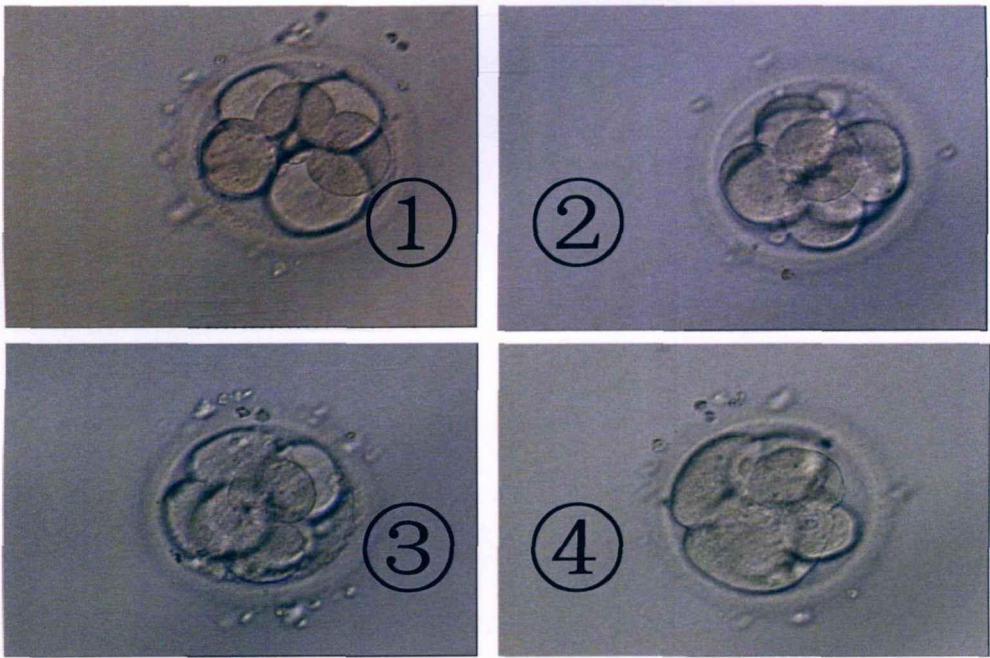
包裹紧密，大量细胞；B 结构松散，少量细胞；C 极少量细胞）、滋养层分级（A 许多细胞紧密结；B 少量细胞，结构松散；C 极少量细胞）评估胚胎发育情况。

结果显示：体外培养三日，对照组获 2 个 2 级胚胎，实验组获 1 个 1 级胚胎，1 个 2 级胚胎。体外培养 5 日，对照组获 1 个 4BB 囊胚，1 个 3AB 囊胚；实验组获 1 个 4BB 囊胚，1 个 3BC 囊胚（图 7；表 1）。





Day 2



Day 3

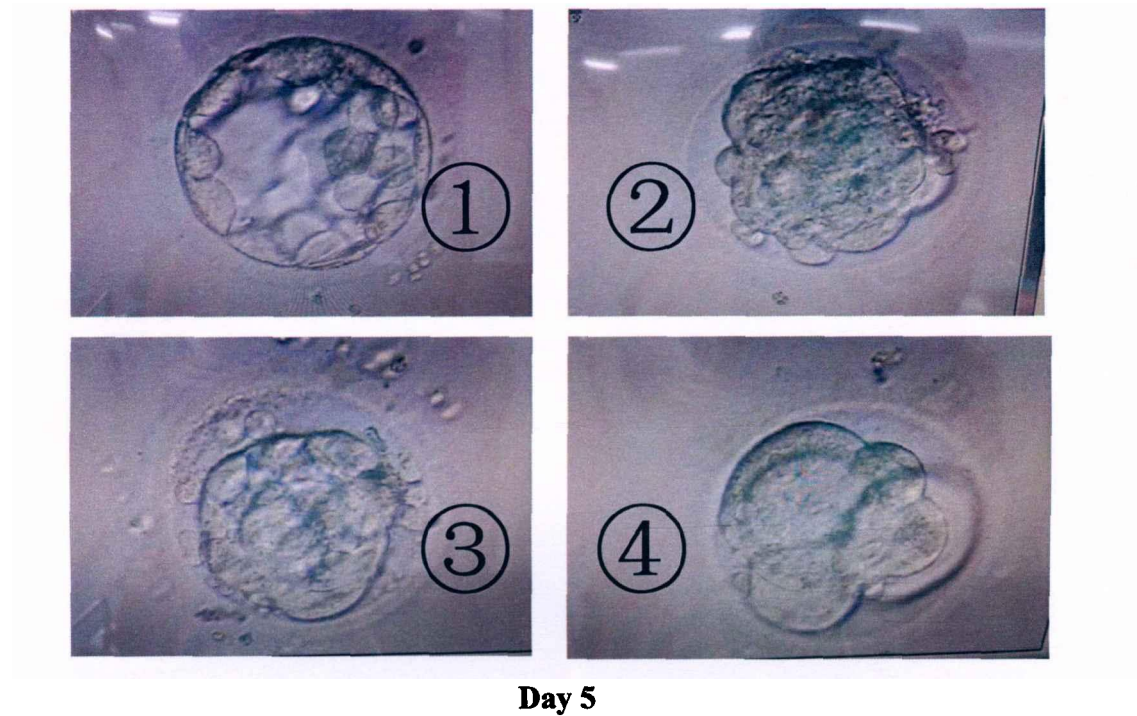


图 7. ①、②号胚胎为单纯 ICSI，③、④号胚胎为 ICSI+线粒体移植。Day1 受精后第一天。Day2、Day3 受精后第二、三天胚胎，对照组获 2 个 2 级胚胎，实验组获 1 个 1 级胚胎，1 个 2 级胚胎。Day5 对照组获 1 个 4BB 囊胚，1 个 3AB 囊胚；实验组获 1 个 4BB 囊胚，1 个 3BC 囊胚。

表 1. 体外受精及卵裂观察

	Day1 受精观察		Day2 卵裂观察		Day3 卵裂观察		Day5 发育情况	Day6 发育情况
日期	2016-12-5		2016-12-6		2016-12-7		2016-12-9	2016-12-10
编号	PN/PB	类型	细胞数 (碎片%)	分级	细胞数 (碎片%)	分级	发育情况	发育情况
1	2/2	Z	4(0)	1	7(0)	1	4BB	
2	2/2	Z	4(0)	1	8(0)	1	融合	3AB
3	2/2	Z	4(5)	1	7(0)	1	2 分	4BB
4	2/2	Z	4(5)	1	6(0)	2	部分融合	退化

三、胚胎植入前遗传学筛查结果

体外将受精卵培养到第五天，用显微操作法从囊胚期胚胎滋养外胚层吸取 5-10 个细胞作遗传学筛查。用囊胚期胚胎细胞检测的优势在于：无降解的细胞和碎片，在卵裂期，经常会有降解细胞和碎片。因为不影响内细胞团，故不会累及胚胎发育。

结果显示：对照组（单纯 ICSI）的 1 号、2 号胚胎测序结果显示具有小片段缺失，胚胎染色体为非整倍体；实验组（ICSI+线粒体移植）的 3 号胚胎测序结果显示染色体复合型异常，4 号胚胎未通过质检。

表 2 胚胎植入前遗传学筛查

IVF 胚胎编号	样本类型	CNV-Seq 结果	结果备注
01	多细胞	-(9q13q34.3,74.4Mb) -5	异常
02	多细胞	-(11q11.2q32.33,88.2Mb) -(22q11.21q13.33,33.4Mb)	异常
03	多细胞	复合型异常	异常
04	多细胞	无结果	未通过质检

四、两组胚胎线粒体 DNA 拷贝数结果

两组胚胎进行线粒体 DNA 拷贝数检测。对照组（单纯 ICSI）囊胚中线粒体 DNA 拷贝数为 85.25643314，实验组（ICSI+线粒体移植）囊胚中线粒体 DNA 相对拷贝数为 108.0901544，明显高于对照组（未行线粒体移植）。初步证实线粒体移植在临床上的可行性。

讨论

卵母细胞的线粒体通过对纺锤体形成、染色体分离、细胞周期等的调节在早期胚胎发育中起重要作用。高龄女性的卵母细胞 mtDNA 受到几十年的活性氧作用而出现累积性损伤，mtDNA 拷贝数下降、突变和缺失增加，导致线粒体功能不全和 ATP 水平下降，引起纺锤体形成缺陷和染色体分离异常，造成胚胎染色体非整倍体。同时，卵母细胞线粒体损伤也使早期胚胎发育所需能量供应下降，造成胚胎卵裂和囊胚形成受阻，导致胚胎停育、流产等不良妊娠结局。因此，高龄女性卵母细胞线粒体功能不全是生育力下降，不孕及辅助生殖技术不良临床结

局的主要分子生物学机制，因此，产生了一种新的临床思维，线粒体移植！

自体脂肪间充质干细胞线粒体移植的安全性

2001 年 Jacques Cohen[16]曾将供体卵母细胞的线粒体注入多名不孕女性的卵细胞中，这种所谓“细胞质移植”技术至少使得两名妇女成功妊娠。但此技术是婴儿携带供体卵母细胞的线粒体，即婴儿将获得来自母亲、父亲、第二位女性（供体）的遗传信息，这使得“细胞质移植”陷入伦理争议并就此搁浅。2015 年首例干细胞婴儿 ZainRajani 在加拿大出生，其母亲因卵子质量差，选择新型 IVF 技术，该技术中通过获取女性的卵巢干细胞，将卵巢干细胞中的线粒体移植入卵母细胞中。

然而，人卵母细胞胞浆移植技术及人卵母细胞线粒体置换技术仍然存在着安全性和伦理方面的问题和广泛争议。主要问题如下：

(1) 卵母细胞胞浆移植导致的线粒体异质性可能引起线粒体疾病正常生理状态下，胚胎的线粒体基因组来源于母体，具有匀一性。而移植了异体线粒体的卵母细胞含有两个来源的线粒体，具有异质性。研究显示，采用体卵母细胞胞浆移植的体外受精-胚胎移植“试管婴儿”含有母体和供体的两种线粒体，比例从 0-80% 不等。线粒体的异质性的后代存在发生代谢综合征和线粒体疾病的风险[17]。实验研究发现，异体卵母细胞胞浆移植出生的小鼠发生高血压、体重指数增加、电解质和血液指标紊乱等代谢综合征表现。其可能的机制是两个来源的 mtDNA 编码不同的氨基酸造成类似于线粒体疾病的表现。

(2) 卵母细胞胞浆移植和线粒体置换技术子代存在三方基因组，引发争议和伦理问题。人卵母细胞胞浆移植和卵母细胞线粒体置换技术均由供体提供卵母细胞胞浆，mtDNA 来自第三方，出生的后代中存在三种来源的基因组 DNA。因此，异体卵母细胞线粒体移植在医学伦理上也存在巨大和广泛争议。这些争议包括了父母认定、家庭价值、供者风险、社会公义、宗教因素等方面。

(3) 卵母细胞线粒体置换技术存在潜在技术风险。卵母细胞线粒体置换所采用的卵母细胞核移植技术和纺锤体移植技术涉及卵母细胞和受精卵重构，存在胞核和纺锤体损伤的潜在风险。

(4) 卵母细胞核移植技术和纺锤体移植技术均需要卵母细胞捐赠。供卵者来源困难，这将极大限制技术的临床应用。

本研究所选择的人脂肪间充质干细胞 HADSCs 具有以下特征与优势:

1、取材便捷、组织量多、同时患者痛苦小

与其他间充质干细胞一样, HADSCs 可分化成为多种类型的组织细胞, 但在取材方面, 抽脂培养 HADSCs 比骨髓干细胞较容易[11]。骨髓穿刺过程中, 患者十分痛苦, 同时存在一定的操作风险。并且获取的骨髓量很有限。然而, HADSCs 可以从患者吸脂术后得到, 局麻下操作腹部吸脂术, 所获取的脂肪组织极其丰富, 取材便捷, 操作过程相对简单。在临床上, 患者自体脂肪经过分离、培养出 HADSCs, 可直接用于患者自身, 是优化个体化治疗的良好选择。

2、自体 HADSCs 应用不存在免疫排斥

多项研究显示, 间充质干细胞表面表达人类主要组织相容性复合体 (MHC) 较低, 其本身的免疫源性若。在本研究中我们采用了高龄女性自体的脂肪间充质干细胞进行分离、培养, 并提取线粒体, 不存在免疫排斥反应, 在线粒体移植中更具有优势。

3、HADSCs 临床应用的安全性

HADSCs 在临床科研研究中具有较好的安全性。HADSCs 与胚胎干细胞相比较, 胚胎干细胞可以无限增殖、传代, 研究证明胚胎干细胞具有致癌风险 (例如畸胎瘤) [10], 目前尚未发现人类脂肪干细胞具有致癌的风险。

通过第一部分研究, 可以稳定分离、培养并鉴定人脂肪间充质干细胞; 第二部分通过比较同一个人脂肪间充质干细胞与脂肪细胞线粒体膜电位、ATP 水平以及活性氧 ROS 含量, 证实来源于同一脂肪组织中, 脂肪间充质干细胞线粒体功能优于脂肪细胞。因此, 在对患者抽吸脂肪后, 并未直接提取脂肪细胞中的线粒体, 而是分离、培养脂肪间充质干细胞中的线粒体进行移植。

经过解放军总医院伦理委员会审核通过, 选择我院生殖中心高龄不孕且反复 IVF 失败的患者。与患者充分沟通并告知线粒体移植的优势与风险, 患者及家属同意并签字。该患者在生殖中心进行了短方案促排卵并 B 超检测排卵后, 成功取出 4 枚成熟卵子, 其中两枚进行了线粒体移植。

常规观察受精后、卵裂期以及囊胚期 4 枚胚胎的发育。单纯单精子胞浆内注射 (ICSI) 的 2 枚胚胎, 发育良好, 其中一枚达 4BB, 而 ICSI+线粒体移植的 2

枚胚胎,发育良好,评估后胚胎标准达4BB。在胚胎发育第五天/囊胚期,对4枚胚胎进行染色体分析,结果显示:4枚囊胚染色体均异常。可能原因还是该患者自身的卵子老化,胚胎染色体的缺失。通过对4枚胚胎线粒体DNA拷贝数的测定结果显示,线粒体移植的胚胎mtDNA拷贝数明显高于未行线粒体移植的胚胎。尽管该患者本次PGS结果异常,但线粒体DNA拷贝数的差异肯定了之前的工作,通过显微注射线粒体,使得卵母细胞中线粒体数量增加,初步证实了自体脂肪间充质干细胞线粒体移植在临床上应用的可行性。

该例患者线粒体移植过程中不足:由于显微操作技术的限制,以及脂肪间充质干细胞中线粒体数量、卵子的体积存在差异,分离的线粒体的浓度不能准确测定,我们仅仅是限定了提取线粒体时细胞个数 10^6 。未能明确注入到每个卵母细胞中线粒体的个数。在改善高龄女性生育及辅助生殖成功率,提供了一个很好的方向:自体脂肪间充质干细胞线粒体移植。在进一步的研究中,我们将扩大纳入的不孕患者,并研究线粒体移植后的功能变化。

参考文献

1. Krisher RL, Prather RS: A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol Reprod Devel* 2012, 79(5):311–320.
2. Redel BK, Brown AN, Spate LD, Whitworth KM, Green JA, Prather RS: Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol Reprod Devel* 2012, 79:262–271.
3. Wang Q, Ratchford AM, Chi MM, Schoeller E, Frolova A, Schedl T, Moley KH: Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Mol Endocrinol* 2009, 23(10):1603–1612.
4. Zhong Z, Hao Y, Li R, Spate L, Wax D, Sun Q-Y, Prather RS, Schatten H: Analysis of heterogeneous mitochondria distribution in somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Microsc Microanal* 2008, 14(5):418–432.
5. Wakefield SL, Lane M, Mitchell M: Impaired mitochondrial function in the

preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biol Reprod* 2011, 84:572–580.

6. Chappel S: The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstet Gynecol Internat* 2013, 2013(1):1–10.

7. Schatten H, Sun Q-Y, Prather RS: Mitochondrial differentiation in early embryo cells and pluripotent stem cells. In *Cell and Molecular Biology and Imaging of Stem Cells*. Heide Schatten. Hoboken: Wiley; 2014. in press.

8. Wang ZB, Schatten H, Sun QY: Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging? *Physiology* 2011, 26(5):314–325.

9. Qiao J, Wang ZB, Feng HL, Miao YL, Wang Q, Yu Y, Wei YC, Yan J, Wang WH, Shen W, Sun SC, Schatten H, Sun QY: The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: Current status and future perspectives. *Mol Aspects Medicine* 2014, 38:54–85.

10. Moley KH, Chi MM, Mueckler MM: Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *Am J Physiol* 1998, 275:E38–E47.

11. Ou XH, Li S, Wang ZB, Li M, Quan S, Xing F, Guo L, Chao SB, Chen Z, Liang XW, Hou Y, Schatten H, Sun QY: Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. *Human Reprod* 2012, 27(7):2130–2145.

12. Zhang CH, Qian WP, Qi ST, Ge ZJ, Min LJ, Zhu XL, Huang X, Liu JP, Ouyang YC, Hou Y, Schatten H, Sun QY: Maternal diabetes causes abnormal dynamic changes of endoplasmic reticulum during mouse oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Biol Endocrinol* 2013, 11:31.

13. Miao Y, Kikuchi K, Schatten H, Sun Q-Y: Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reprod Update* 2009, 15(5):573–585.

14. Ge H, Tollner TL, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, Shan D, Zhang X, Lv J, Huang C, Dong Q: The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo

- developmental competence. *Mol Reprod Dev* 2012, 79(6):392–401.
15. Ge ZJ, Liang XW, Guo L, Liang QX, Luo SM, Wang YP, Wei YC, Han ZM, Schatten H, Sun QY: Maternal Diabetes Causes Alterations of DNA Methylation Statuses of Some Imprinted Genes in Murine Oocytes. *Biol Reprod* 2013, 88(5):117. 1-9.
16. Eichenlaub-Ritter U: Genetics of oocyte ageing. *Maturitas* 1998, 30(2):143–169.
17. Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Lüke S, Seidel T: Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 2011, 11:783–796.
18. Schatten H, Sun QY: New insights into the role of centrosomes in mammalian fertilisation and implications for ART. *Reproduction* 2011, 142:793–801.
19. Schatten H, Sun QY: Centrosome dynamics during meiotic spindle formation in oocyte maturation. *Mol Reprod Devel* 2011, 78:757–768.
20. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S: Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogen Genome Res* 2005, 111(3–4):206–212.
21. Hassold T, Hunt P: To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001, 2:280–291.
22. Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munné S, Levron J, Wu L, Brenner C, Warner C, Willadsen S: Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998, 4(3):269–280.
23. Yi YC, Chen MJ, Ho JY, Guu HF, Ho ES: Mitochondria transfer can enhance the murine embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2007, 24(10):445–449.
24. Malter HE, Cohen J: Ooplasmic transfer: animal models assist human studies. *Reprod Biomed Online* 2002, 5(1):26–35.
25. Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW: Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol Med* 2010, 16(6):268–276.
26. Reinhardt K, Dowling DK, Morrow EH: Mitochondrial replacement, evolution, and the clinic. *Science* 2013, 341(6152):1345–1346.

27. Smeets HJM: Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders: Selecting the good guys or kicking out the bad guys. *Reprod BioMed Online* 2013, 27:599–610.
28. Amato P, Tachibana M, Sparman M, Mitalipov: Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases. *Fertil Steril* 2014, 101(1):31–35.
29. Mitalipov S, Wolf DP: Clinical and ethical implications of mitochondrial gene transfer. *Trends Endocrinol Metab* 2014, 25(1):5–7.
30. Chinnery PF, Craven L, Mitalipov S, Stewart JB, Herbert M, Turnbull DM: The challenges of mitochondrial replacement. *PLoS Genet* 2014, 10(4):e1004315.
31. Moraes CT, Bacman SR, Williams SL: Manipulating mitochondrial genomes in the clinic: playing by different rules. *Trends Cell Biol* 2014, 24(4):209–211.
32. Jacobson J, Duchen MR: Interplay between mitochondria and cellular calcium signaling. *Mol Cell Biochem* 2004, 256/257:209–218.
33. Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* 2004, 116:205–219.
34. Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ: Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 2004, 304:253–257.
35. Detmer SA, Chan DC: Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:870–879.
36. Smith PM, Fox JL, Winge DR: Biogenesis of the cytochrome bc(1) complex and role of assembly factors. *Biochim Biophys Acta* 1817, 2012:276–286.
37. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981, 290:457–465.
38. St John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y, Kelly R, Salah R: Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reprod Update* 2010,

- 16(5):488–509.
39. Takasugi M, Yagi S, Hirabayashi K, Shiota K: DNA methylation status of nuclear-encoded mitochondrial genes underlies the tissue-dependent mitochondrial functions. *BMC Genomics* 2010, 11(1):481–489.
40. Balaban RS: The mitochondrial proteome: a dynamic functional programming tissues and disease states. *Environ Mol Mutagen* 2010, 51(5):352–359.
41. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA: Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 1998, 18:231–236.
42. Antelman J, Manandhar G, Yi YJ, Li R, Whitworth KM, Sutovsky M, Agca C, Prather RS, Sutovsky P: Expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) during porcine gametogenesis and preimplantation embryo development. *J Cellular Physiol* 2008, 217(2):529–543.
43. Gray H, Wong TW: Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial polymerase. *J Biol Chem* 1992, 267:5835–5841.
44. Crompton M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999, 341(2):233–249.
45. Bernardi P: The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers Physiol* 2013, 4, Article 95(1):1–12.
46. Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, de Mesy Bentley KL, Molkentin JD, Sheu SS, Porter GA Jr: The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev Cell* 2011, 21(3):469–478.
47. Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, de Placido G: Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001, 16(5):909–917.
48. Zhang YZ, Ouyang YC, Hou Y, Schatten H, Chen DY, Sun QY: Mitochondrial behavior during oogenesis in zebrafish: a confocal microscopy analysis. *Dev Growth Differ* 2008, 50(3):189–201.
49. Sun Q-Y, Wu GM, Lai L, Park KW, Day B, Prather RS, Schatten H: Translocation

of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 2001, 122:155–163.

50. Katayama M, Zhong Z-S, Lai L, Sutovsky P, Prather RS, Schatten H: Mitochondria distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: Implications for developmental potential. *Dev Biol* 2006, 299:206–220.

51. Schatten H, Prather RS, Sun Q-Y: The significance of mitochondria for embryo development in cloned farm animals. *Mitochondrion* 2005, 5:303–321.

52. Calarco PG: Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocytes. *Dev Genet* 1995, 16:36–46.

53. Ai J-S, Li M, Schatten H, Sun Q-Y: Regulatory mechanism of spindle movements during oocyte meiotic division. *Asian Aust J Anim Sci* 2009, 22:1447–1486.

54. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenol* 2006, 65:126–136.

55. Swain JE, Pool TB: ART failure: Oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 2008, 14:431–446.

56. Fan H-Y, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick S, Richards JS: MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 2009, 324:938–941.

57. Gosden R, Lee B: Portrait of an oocyte: Our obscure origin. *J Clin Invest* 2010, 120:973–983.

58. Fan HY, Huo LJ, Meng XQ, Zhong ZS, Hou Y, Chen DY, Sun QY: Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biol Reprod* 2003, 69:1552–1564.

59. Voronina E, Wessel GM: The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* 2003, 58:53–110.

60. Brunet S, Maro B: Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: Integrating time and space. *Reproduction* 2005, 130:801–811.

61. Liang C-G, Su Y-Q, Fan H-Y, Schatten H, Sun Q-Y: Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: Roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007,

21:2037–2055.

62. Wai T, Ao A, Zhang XY, et al. The Role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod*, 2010, 83(1):52-62.

63. Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(5):425-9.

64. El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, et al. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, 2006, 131(2):233-45.

65. Igosheva N, Abramov AY, Poston L, et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS ONE*, 2010, 5(4):e10074.

66. 杨华, 刘锋. 年龄、线粒体与女性生殖能力的关系. *武警医院*, 2008, 19(3):272-4.

67. Wu J, Zhang LZ, Wang XY. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertile Steril*, 2000, 74 (6):1137-41.

68. Wright VC, Chang J, Jeng G. Assisted reproductive technology surveillance-United States, 2005. *MMWR Surveill Summ*, 2008, 57(5):1-23.

综述

线粒体功能在卵母细胞成熟中的作用

随着女性年龄的增长,其生育能力下降,辅助生殖临床结局差,原因在于高龄女性中卵母细胞老化,非整倍体发生率增加,导致受精失败或胚胎发育异常。不孕不育逐渐发展为世界性问题。近年来,多项研究显示线粒体功能异常与高龄女性不孕不育、辅助生殖临床结局差相关[1-5]。研究显示,在患有糖尿病、肥胖等代谢性疾病的女性患者中,线粒体功能异常与不孕具有相关性[1,8-10],该趋势同样出现在高龄女性中[6,9-12]。因此,分析研究线粒体在卵母细胞成熟过程中的影响,对改善卵母细胞中线粒体功能具有重要的意义。

线粒体及代谢方式

线粒体是真核细胞的重要细胞器之一,作为细胞“能量工厂”合成三磷酸腺苷 ATP,参与细胞生长、分化、增殖、凋亡、信号传导等细胞活动。线粒体为一种半自主细胞器,拥有独立的遗传物质和遗传体系。人类线粒体 DNA (mtDNA) 呈双链环状,长度为 16,569bp,含有 37 个基因,编码 22 种 tRNA、2 种 rRNA (12S rRNA 和 16S rRNA) 以及 13 种多肽。线粒体由内、外两层膜包被,内含基质、嵴。线粒体嵴的形态反映细胞氧化代谢的能力。线粒体的数量、空间分布、形态、代谢方式均具有组织特异性,这取决于细胞的代谢水平。不同细胞类型中,线粒体生成 ATP 方式不同:在成体细胞中,ATP 生成主要为氧化磷酸化途径,而在卵母细胞中,ATP 生成主要为糖酵解和磷酸戊糖途径。根据能量代谢方式不同,相对应的线粒体结构亦不同[3,4]:通过糖酵解和磷酸戊糖途径生成 ATP 的线粒体,呈圆形、含有少量的嵴;而通过氧化磷酸化途径生成 ATP 的线粒体,呈长形、含有较多的嵴。根据细胞活动所需能量不同,细胞所包含的线粒体数量差异巨大,细胞代谢活动越旺盛的细胞线粒体数量越多。人的成熟卵母细胞中含有超过 10 万个线粒体,是人体含有线粒体最多的细胞。在受精卵形成及早期胚胎发育过程中,线粒体绝大部分来自于卵母细胞中[21],故线粒体功能正常对于卵母细胞成熟、受精及胚胎发育潜能等密切相关。

线粒体的空间分布与卵母细胞成熟

线粒体通过微管动力蛋白及驱动蛋白,在细胞内移位至功能区[33]。线粒体

空间分布的改变依赖于细胞活动。在卵母细胞成熟过程中,线粒体的空间分布十分重要并且可作为评估卵母细胞质量的一项可靠的指标。在生发泡(germinal vesicle, GV)期,线粒体呈幼稚型,为圆形、少嵴或呈管泡状嵴,分布在细胞质中。当进行减数分裂时,即在生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)期,线粒体增多、浓集,成簇聚集于细胞核周围,线粒体呈成熟型,长梭形,基质加深,嵴呈板层状。线粒体空间分布的变化原因,可能是在卵母细胞发育成熟过程中,中心体形成、纺锤体的微管运动、蛋白分子水平的磷酸化及去磷酸化等活动,均需要线粒体提供大量的 ATP。MI/MII 期纺锤体的形成对染色体精准的分离十分重要,故在 MII 期纺锤体周围具有较多线粒体时,提示该卵母细胞具有较好的发育潜能。研究显示, MII 期卵母细胞中线粒体沿纺锤体分布,表示线粒体对于纺锤体的形成及完整性的维护十分重要[34]。刘珊等研究发现未成熟卵母细胞中线粒体分布与细胞周边,成熟卵母细胞中线粒体均匀分布在核周围[35]。线粒体空间分布的变化在其他哺乳动物卵母细胞同样存在。大多数哺乳类动物,线粒体主要分布在 MII 期卵母细胞纺锤体周围[16,17,29-32],显示线粒体的分布对于纺锤体形成及稳定性具有很大的作用。因此线粒体在细胞核周围聚集是优质卵母细胞的一个标志。

线粒体膜电位与卵母细胞成熟

线粒体膜电位正常对卵母细胞成熟十分重要,并且卵母细胞中线粒体膜电位降低造成异常胚胎发育。线粒体膜电位(Ψ_m)即线粒体的极性,其产生来自于线粒体的活动。线粒体内膜上存在有质子泵,线粒体呼吸运动中电子的传递产生,形成质子梯度,即跨膜电位。正常线粒体膜电位是维持线粒体进行呼吸运动,生成 ATP 等细胞活动等必须。目前有多重探针检测试剂盒如罗丹明-123, JC-1[9,28]。当线粒体功能受损或下降时,线粒体膜电位下降,检测时荧光试剂 JC-1 在细胞中以单体的形式存在,在荧光显微镜下呈绿色荧光; JC-1 形成多聚体,显示红色,线粒体膜电位正常。因此,可以通过检测荧光强度及红/绿荧光的比值反映细胞中线粒体功能。Van Blerkon 等研究发现, MII 卵母细胞中线粒体膜电位随着年龄的增加而降低,进而影响胚胎发育[23]。

活性氧与卵母细胞

线粒体生成 ATP 的过程中,同时产生了同时也产生了副产品--活性氧(reactive

oxygen species, ROS), 后者造成线粒体 DNA 氧化损伤, mtDNA 突变或缺失。卵母细胞的老化、损伤伴随着线粒体 DNA 突变、缺失。线粒体是活性氧自由基主要产生的场所, 机体大部分的活性氧自由基来自线粒体。当线粒体功能下降, 清除 ROS 能力下降。研究发现, 高龄妇女卵泡中 ROS 含量较年轻女性显著增高, 从多方面影响卵母细胞及受精[25,26]。当细胞内 ROS 含量增高时, 破坏细胞内膜上离子转换孔道 (mPT), 使钙离子外流, 线粒体膜电位消失, 进而启动细胞凋亡程序。在胚胎发育过程中则表现为卵裂球溶解, 出现细胞碎片。Van Blerkom J 等研究发现, 出现碎片的胚胎中 ROS 水平明显高于正常胚胎[27]。同样高浓度的 ROS 也会对 mtDNA 造成损害。由于线粒体 DNA 没有组蛋白保护, 且线粒体自身无有效的 DNA 损伤修复系统[20], 因此, 线粒体 DNA 容易受损或突变, 影响线粒体氧化磷酸化能力, 致其供能不足, 造成卵母细胞发育不成熟, 受精率低下, 胚胎发育潜能差或胚胎停育, 辅助生殖成功率降低。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 与卵母细胞成熟

MII 期获取的卵母细胞是卵母细胞成熟的最终产物。成熟的 MII 卵母细胞中含有 100000~200000 线粒体拷贝数。卵母细胞中 mtDNA 拷贝数与受精、胚胎发育潜能成正相关。Chan 等研究发现高龄女性(大于 35 岁)M II 卵母细胞中 mtDNA 拷贝数较年轻女性也是显著下降, 提示 mtDNA 拷贝数减少与卵母细胞老化相关[24]。Santos 等对卵母细胞体外受精, 比较受精卵、受精失败卵及退化的卵母细胞中 mtDNA 拷贝数, 结果表明受精失败、退化的卵母细胞中 mtDNA 拷贝数较受精后的卵母细胞显著下降[22]。Santos 等进而发现, 发育正常的受精卵中 mtDNA 拷贝数较发育停止的受精卵显著增高。提示 mtDNA 拷贝减低, 导致卵母细胞成熟、及胚胎发育受阻。

结语

线粒体是细胞活动中最重要的细胞器之一, 随着研究的深入, 线粒体的空间分布、线粒体膜电位, 活性氧及 mtDNA 拷贝数及完整性对卵母细胞成熟的影响逐渐清晰。然而对于线粒体在卵母细胞中作用的机制不明确, 需要进一步研究, 对改善高龄女性卵母细胞质量, 提高辅助生殖成功率具有重要的意义。

参考文献

- [1] [Anderson DJ,Gage FH,Weissman IL,et al.Can stem cells cross lineage boundaries .Nat Med.2001;7(4):393-395.
- [2] Zuk PA,Zhu M,Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001;7(2):211-228.
- [3] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P,et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.Mol Biol Cell.2002;12(13):4279-4295.
- [4] Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, et al.Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal(hADAS) cells.Stem Cells. 2005;23(3):412-423.
- [5] Brzoska M, Geiger H, Gauer S,et al. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. Biochem Bioph Res Co.2005;330(1):142-150.
- [6] Guilak F, Lott KE, Awad HA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipocyte-derived adult stem cells. Cell Physiol.2006;206(1):229-237.
- [7] Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.Cell Physiol Biochem. 2004;14(4-6):311-324.
- [8] Agnieszka Banas,Takumi Teratani,Yusuke, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Source of Human Hepatocytes. Hepatology. 2007;46(1):219-228.
- [9] Kern S, Eichler H, Stoeve J,et al.Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue.Stem Cells. 2006;24(5):1294-1301.
- [10] 刘琦,陈维平.胚胎干细胞体外培养及在眼科的研究进展[J].眼科研究,2009,27(5):429-433.
- [11] Thesleff T,Lehtimä ki K,Niskakangas T,et al.Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction [J].Neurosurgery,2011,68(6):1535-1540.
- [12] Ma S,Xie N,Li W,et al.Immunobiology of mesenchymal stem cells[J].Cell Death & Differentiation,2014,21(2):216-225.

- [13]Krisher RL, Prather RS: A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol Reprod Devel* 2012, 79(5):311–320.
- [14]Redel BK, Brown AN, Spate LD, Whitworth KM, Green JA, Prather RS: Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol Reprod Devel* 2012, 79:262–271.
- [15]Pellestor F, Anahory T, Hamamah S: Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogen Genome Res* 2005, 111(3–4):206–212.
- [16]Eichenlaub-Ritter U: Genetics of oocyte ageing. *Maturitas* 1998, 30(2):143–169.
- [17]Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Lüke S, Seidel T: Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 2011, 11:783–796.
- [18] Schatten H, Sun QY: New insights into the role of centrosomes in mammalian fertilisation and implications for ART. *Reproduction* 2011, 142:793–801.
- [19]Schatten H, Sun QY: Centrosome dynamics during meiotic spindle formation in oocyte maturation. *Mol Reprod Devel* 2011, 78:757–768.
- [20] Pellestor F, Anahory T, Hamamah S: Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogen Genome Res* 2005, 111(3–4):206–212.
- [21]Wang HW, He ZX, Wang ZH, et al. *Fudan Xuebao (Yixueban)*. 2009; 52(05):381-384.
- [22]Barrit JA, Brenner CA, Cohen J, et al. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5:927-933
- [23]Jansen RPS. Origin and persistence of the mitochondrial genome. *Hum reprod*, 2000; 15(suppl 2):1-10
- [24] Barrit JA, Brenner CA, Cohen J, et al. Mitochondrial deletion in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4:872 — 892
- [25] Human Fertilisation and Embryology Authority: Government decision on

mitochondria replacement regulations <http://www.hfea.gov.uk/9025.html>. 2014

[26] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-1301.

[27] Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, et al. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction [J]. *Neurosurgery*, 2011, 68(6):1535-1540.

[28] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2014, 21(2):216-225.

博士在读期间发表文章

王元芬，郝建秀，王辉，姚元庆。线粒体功能在卵母细胞成熟中的作用综述，Acad J Chin PLA Med Sch Sep 2017，38（9）

Wang YF，Niu ZR，Guo YF，Clinical significance of Human Leukocyte Antigen-G expression in early stage cervical squamous cell carcinoma.

Med Sci Monit

致 谢

岁月如梭，白驹过隙，转眼间博士学习生活即将结束。回望三年的学习经历，每一步成长的都离不开众多师长，同窗和亲友们支持与帮助，谨在此致以我最诚挚的感谢。

首先，感谢我的导师引我进入师门，进入妇产科学领域深造。感谢导师对我的临床能力精心的培养，完整安排相关科室的轮转。同时，对我的科研能力的指导，让我在临床和科研两方面均受益匪浅。感谢导师对我的谆谆教导和关怀，是导师的指引让我明确了未来的发展方向。三年来，导师高尚的医德医风，严谨勤奋的治学风范，国际化的视野，前沿而精髓的学术造诣，都深深感染着我，让我永志不忘。

感谢实验指导陈德云老师、刘杰杰老师，因为有你们的指导及帮助，使得实验可以顺利完成。

感谢妇产科全体主任、医师对我临床工作的指导与帮助，让我从一名医学生渐渐成长为一名医生。感谢妇产科全体教员三年来给予的帮助。

感谢师姐、师妹三年来一路同行，陪我同甘苦共分享；感谢郭一帆师姐逐字为我修改论文；感谢王辉师姐，蔚春华师姐，刘忠宇师兄，牛子儒师兄等同门师兄师姐师妹对我学习和生活上的关心和照顾，你们给我的工作和生活带来了无限欢乐，愿我们友谊长存。

感谢解放军总医院给我这个平台，感谢各位领导，老师及同窗给我的帮助。最后，谨以此文献给我挚爱的双亲，感谢家人的理解支持和艰辛付出。再一次向所有关心我的老师、朋友致以最诚挚的谢意！

北京 2017 年 5 月