

不同年龄大鼠血清对骨髓间充质干细胞衰老影响的实验研究

张大勇 项晓霞 陈 律 王骏浩 张余斌 王俊波*

(浙江大学城市学院, 医学与生命科学学院, 杭州 310015)

摘要 制备成年(8~12周龄)和老年(64~72周龄) SD大鼠血清, 实验随机分为两组: 年轻血清组和老年血清组, 分别采用成年和老年SD大鼠血清培养成年MSCs 36小时后, 衰老相关 β -半乳糖苷酶和活性氧染色观察细胞衰老, MTT法检测细胞增殖, AO/EB法和Hoechst 33342染色法观察细胞凋亡及存活情况。免疫细胞化学和Western blot法检测衰老相关蛋白 γ -H2A.X、p53表达, RT-PCR法观察p53、p21 mRNA表达。结果发现, 与年轻血清组相比, 老年血清组MSCs衰老细胞数明显增加((96.2±24.1)/500细胞vs (30.8±8.2)/500细胞, $P < 0.01$)、增殖能力减弱, 凋亡率升高, γ -H2A.X、p53蛋白表达水平升高, p53、p21 mRNA表达升高。这些结果说明, 老年SD大鼠血清可促进MSCs发生衰老变化, 并抑制MSCs增殖及存活能力, 这一作用可能与DNA损伤反应和p53/p21信号通路有关。

关键词 骨髓间充质干细胞; 血清; 衰老; DNA损伤反应; p53

干细胞衰老是一个复杂的过程, 众多因素参与其中。干细胞衰老研究表明, 导致干细胞衰老的因素主要可分为两大类: 一类是细胞内在因素, 如细胞自身端粒的缩短、端粒酶减少等因素^[1]; 另一类则是细胞外在因素, 主要指干细胞微环境内应激压力等因素, 这些应激压力的增高也可引起细胞的“早熟性衰老”^[2]。干细胞微环境狭义来讲仅指干细胞巢(niche), 而广义的干细胞微环境指能影响干细胞功能的一切环境因素, 包括干细胞巢、组织环境和系统环境等^[3]。新近的研究提示^[4-5], 干细胞微环境对干细胞衰老发挥重要作用, 对其具体作用及其作用机制的研究有助于我们更好地认识干细胞衰老。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于其体外易获取、低免疫原性、良好的多向分化潜能、对外源性基因的高效表达能力等特点, 已成为临床干细胞移植治疗疾病的重要细胞类型之一^[6]。研究显示, MSCs也可发生衰老变化, 老年个体来源的MSCs移植疗效要低于年轻个体来源的MSCs^[7-8]。但目前, 老年干细胞微环境对MSCs衰老及其功能的影响尚未见研究报道。本研究利用不同年龄的大鼠血清培养MSCs, 观察其对MSCs衰老及增殖、存活能力的影响, 并检测衰老相关因子 γ -H2A.X、p53、p21表达情况, 以期明确老年干细胞微环境对MSCs衰老及其功能的影响及其作用机制, 为更好地认识

MSCs衰老调控机制, 以及提高临床老年患者接受MSCs移植治疗提供有价值的实验数据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

成年(8~12周龄, 体重200~300 g)和老年(64~72周龄, 体重500~600 g) Spragus Dawley (SD)大鼠由复旦大学实验动物中心提供(SYXK(沪) 2009-0019)。DMEM购自美国Hyclone公司, 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司, β -半乳糖苷酶检测试剂盒、ROS染色试剂盒购自美国Genmed公司, Hoechst 33342染色液购自碧云天生物技术有限公司, RT-PCR引物购自上海生物工程技术公司, RT-PCR试剂盒、琼脂糖购自日本TaKaRa公司, 兔抗大鼠多克隆p53抗体和 γ -H2AX抗体购自美国Santa Cruz公司, FITC标记的羊抗兔IgG购自美国ICN Cappel公司, HRP标记的羊抗兔IgG购自美国DAKO公司, BCA蛋白浓度测定试剂盒和ECL显影试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

收稿日期: 2011-04-08 接受日期: 2011-06-29

浙江省自然科学基金(No. Y207159)、浙江省医药卫生科学研究基金(No. 2009B126)、浙江大学城市学院教师科研基金(No. J-10010)和浙江大学城市学院大学生科研项目(No. XZ2011562096)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-88285753, E-mail: wangjb@zucc.edu.cn

1.2 成年、老年SD大鼠血清制备

实验前12 h, 成年(8~12周龄)或老年(64~72周龄)SD大鼠禁食, 仅供应饮水, 减少血清内脂肪含量。腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠后心脏取血, 4 °C过夜后吸取析出血清, 迅速4 °C, 2 500 r/min 20 min离心2次, 获得血清。56 °C水浴30 min灭活补体后, -20 °C保存备用。

1.3 SD大鼠骨髓间充质干细胞培养

拉颈处死成年SD大鼠(8~12周龄), 剪去腹壁、用碘酒、75%乙醇擦拭后肢皮毛, 取出乳鼠双侧股骨和胫骨, 清楚周围的肌肉和韧带, 切除骨两端的干骺端, 暴露骨髓腔, 用含有8%肝钠素(500 U/mL)的PBS冲洗骨髓腔, 收集冲洗液, 离心(1 000 r/min, 8 min), 用含15% FBS、584 mg/L谷氨酰胺、 10^5 U/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养液混悬沉淀细胞。以 5×10^5 /mL的细胞密度均匀接种到25 mL培养瓶中, 在37 °C和5% CO₂培养箱中培养, 48 h后换液除去悬浮细胞, 以后每3天换液一次, 待细胞生长至80%融合时进行传代。后续实验均选用3~4代的MSCs。

1.4 实验分组

实验分为成年血清组(young serum, YS)和老年血清组(old serum, OS)两组, 各组MSCs吸去原培养液后, 经PBS清洗三遍, 分别采用含10% YS或OS的DMEM培养液培养36 h后进行后续实验检测。

1.5 各组MSCs衰老检测

1.5.1 衰老相关 β -半乳糖苷酶染色 将YS和OS组的MSCs接种到培养皿中的盖玻片上, 当细胞生长到80%融合时, 用PBS清洗3次, 用4%多聚甲醛固定5 min, 后用酸性液清洗细胞2次。加入适量的衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)染色液, 37 °C下孵育12 h。在相差显微镜下随机选择3个视野, 计数每500个细胞中阳性细胞数目, 每组实验重复5次。

1.5.2 细胞内活性氧染色 将各组MSCs接种到培养皿中的盖玻片上, 当细胞生长至80%汇合时, 用PBS清洗3次, 加入适量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)染色液, 37 °C孵育20 min。用PBS清洗3次, DAPI复染细胞核, 在荧光显微镜下观察和照相记录。

1.6 各组MSCs增殖检测

取对数生长期MSCs制成细胞悬液, 调整细胞浓度至 3×10^4 /mL, 将细胞悬液接种于96孔板中, 每孔

接种0.1 mL。YS和OS组分别采用10% YS或OS培养1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d (期间每3天换液1次), 每天培养结束后各孔加入5 mg/mL的MTT 孵育4 h, 然后弃去孔内液体, 每孔加入150 μ L DMSO, 震荡10 min后, 酶标仪上读取波长为570 nm的吸光度值, 绘制细胞增殖曲线。每组实验设5个复孔。

1.7 各组MSCs凋亡和存活检测

1.7.1 AO/EB染色 将各组MSCs接种到培养皿中的盖玻片上, 当细胞生长至80%汇合时, 用PBS清洗3次。为增加氧化应激压力, 部分培养皿内加入100 μ mol/L H₂O₂ 1 h, 用PBS清洗3次, 加入AO/EB染料30 min, 混合均匀, PBS清洗3次。荧光显微镜下观察, 可见四种细胞形态: 活细胞(VN), 核染色质着绿色并呈正常结构; 早期凋亡细胞(VA), 核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状; 晚期凋亡细胞(NVA), 核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状; 死亡细胞(NVN), 核染色质着橘红色并呈正常结构。细胞凋亡率由以下公式计算: 细胞凋亡率=(VA+NVA)/(VN+NVN+VA+NVA) \times 100%, 每组实验重复4次。

1.7.2 Hoechst 33342染色 将各组MSCs接种到培养皿中的盖玻片上, 当细胞生长至80%汇合时, 用PBS清洗3次, 部分培养皿内加入100 μ mol/L H₂O₂ 1 h。用PBS清洗3次后, 加入适量Hoechst 33342染色液, 37 °C 孵育10 min。荧光显微镜观察, 凋亡细胞可见细胞核固缩。

1.8 衰老相关蛋白 γ -H2A.X、p53表达检测

1.8.1 免疫荧光化学染色 将各组MSCs接种到培养皿中的盖玻片上, 当细胞生长至80%汇合时, 用PBS清洗3次, 在室温条件下用4%多聚甲醛固定20 min, 再用10%山羊血清在37 °C条件下封闭30 min后, 加入兔抗大鼠p53 (1:1 000)、 γ -H2A.X (1:1 000)抗体, 37 °C下孵育1 h。用PBS浸洗3次后, 加入FITC标记的羊抗兔IgG (1:500), 37 °C 孵育1 h。DAPI复染细胞核, 磷酸甘油封片, 在荧光显微镜下观察和照相记录。实验中以PBS代替一抗, 作为阴性对照。

1.8.2 Western blot法检测 取各组MSCs 2 mL于试管中, 加入1 mL细胞裂解液, 得到细胞总蛋白。BCA法测定总蛋白含量后, 每孔20 μ g总蛋白混合加样缓冲液后SDS-PAGE电泳, 湿法转移至PVDF膜。取下PVDF膜后, 用TBST洗膜, 放入5%脱脂奶粉封闭液中室温封闭90 min, 用TBST洗膜后, 兔抗大鼠p53 (1:1 000)、 γ -H2A.X (1:1 000)抗体, 4 °C下孵育过夜,

再放入HRP标记的羊抗兔IgG (1:1 000)中, 常温孵育2 h, 后将PVDF膜浸入10 mL ECL溶液中, 1 min后, 取出PVDF膜, 并尽快覆以与PVDF膜相同大小的X光胶片, 放入曝光盒曝光, 显影、定影曝光后的X光胶片, 摄影分析。

1.9 衰老相关基因*p53*、*p21* mRNA表达检测

将各组MSCs接种到25 mL的培养瓶中, 当细

胞生长到80%汇合, 通过RT-PCR检测各组MSCs中特异基因*p53*、*p21*的表达。按试剂盒中方法进行总RNA提取, 在 D_{260}/D_{280} 条件下进行RNA纯度鉴定和定量, 同时用琼脂糖凝胶电泳确定RNA质量。引物序列见表1。按试剂盒中方法进行RT-PCR操作。RT反应体系如下: 10×RNA PCR缓冲液 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, RNase抑制剂0.5 μ L, 逆转录酶1 μ L, 引物

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

目的基因 Target genes	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物长度(bp) Product length (bp)
<i>p53</i>	(F)5'-ACC ATG AGC GCT GCT CAG AT-3' (R)5'-AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG-3'	216
<i>p21</i>	(F)5'-TGA ATG AAG GCT AAG GCA GAA GA-3' (R)5'-AGG CAG ACC AGC CTA ACA GAT T-3'	146
β -actin	(F)5'-AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT-3' (R)5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3'	218

1 μ L, 总RNA 2 μ L, 加入无RNase水至反应总量为20 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C水浴1 h, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 逆转录为cDNA作为模板, -20 $^{\circ}$ C下保存待测。PCR反应体系: 10×RNA PCR缓冲液2 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, Taq DNA聚合酶1 μ L, 上游引物0.5 μ L, 下游引物0.5 μ L, 模板cDNA 10 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 此后90 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共作30个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。取RT-PCR产物5 μ L, 与1 μ L溴酚蓝指示剂充分混匀后, 于质量分数为2%的琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察拍照。

1.10 统计学分析 采用SPSS 11.5统计软件处理数据, 结果用均数 \pm 标准差表示, 各组间的差别采用单因素方差分析进行比较, 当 $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。

2 结果

2.1 OS对MSCs衰老的影响

2.1.1 SA- β -半乳糖苷酶染色 SA- β -半乳糖苷酶染色显示, 在YS组中仅见少量细胞呈SA- β -半乳糖苷酶染色阳性, 而OS组SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞增多, 阳性细胞体积变大、形态扁平、且常聚集分布(图1)。细胞计数结果也表明, YS组SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞数目为(30.8 \pm 8.2)/500细胞, 而OS组SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞数目为(96.2 \pm 24.1)/500细胞, 较YS组明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$,

图1)。

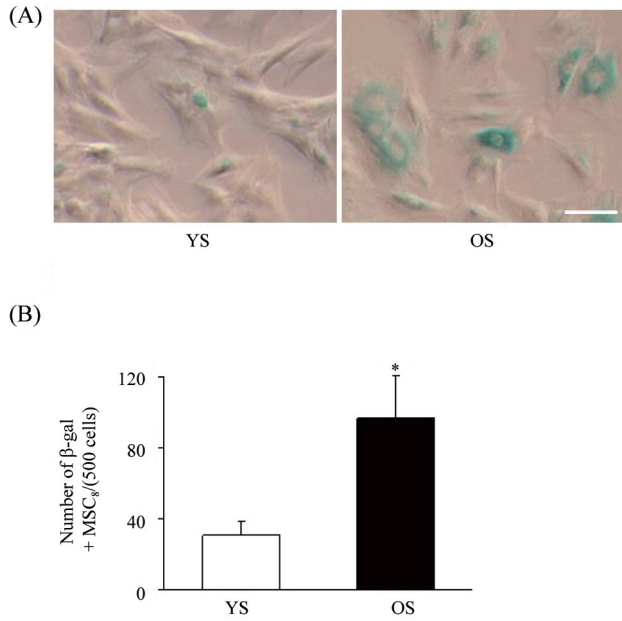
2.1.2 ROS染色结果 细胞衰老的同时常常伴随着细胞内活性氧成分的增多^[9], 本实验通过ROS染色检测进一步观察不同年龄血清对细胞衰老的影响作用。结果显示, 在YS组MSCs中仅可见少量ROS阳性细胞, 荧光强度较弱, 而OS组ROS阳性细胞数目明显增多, ROS荧光强度增高(图2)。

2.2 OS对MSCs增殖能力的影响

MTT检测结果显示(图3), 较YS培养而言, OS培养减弱了MSCs的增殖能力, 尤其是对数生长期(4~7 d), 老年血清组吸光度值明显低于成年血清组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 OS对MSCs存活能力的影响

2.3.1 AO/EB双染法检测结果 AO/EB双染法检测细胞凋亡情况, 结果显示在非氧化应激条件下, YS组和OS组均未出现明显的细胞凋亡情况, 100 μ mol/L H_2O_2 处理1 h后, YS组MSCs表现出较强的耐受能力, 只有少量细胞表现出凋亡细胞的形态学表现。然而, OS组MSCs则出现明显的凋亡情况, 大量细胞出现皱缩、细胞核染色质浓集等凋亡细胞表现(图4A)。凋亡率的计数结果也显示, H_2O_2 处理后的OS组凋亡率(40.9% \pm 7.8%)明显升高, 与同样氧化应激条件下YS组凋亡率(12.6% \pm 2.1%)和未经 H_2O_2 处理的OS组凋亡率(8.2% \pm 1.5%)的差异均具有统计学意义($P < 0.01$, 图4B)。

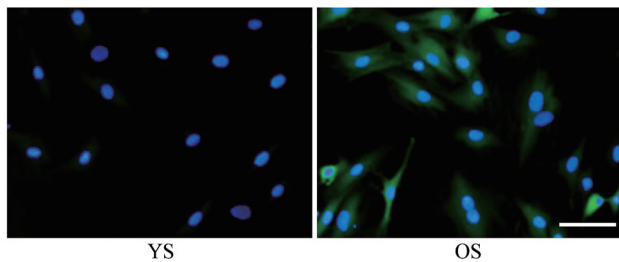


A: YS组仅有少量蓝染的SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞, OS组阳性染色细胞数量增多, 阳性染色细胞体积较大、形态扁平。标尺=25 μm; B: 不同血清组每500个细胞中SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞数目。与YS组比较, OS组SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞数目显著增多, 差异具有统计学意义, * $P < 0.01$ ($n=5$)。

A: compared with the YS group, the number of SA-β-gal positive cells in the OS group was obviously increased, and those SA-β-gal positive cells showed a flat and enlarged cell shape. Bar=25 μm; B: the total number of SA-β-gal positive cells in random 500 cells was counted by phase contrast microscope. The results showed that the number of SA-β-gal positive MSCs/500 cells in the OS group was significantly higher than that in the YS group. * $P < 0.01$ ($n=5$).

图1 SA-β-半乳糖苷酶染色

Fig.1 SA-β-gal staining

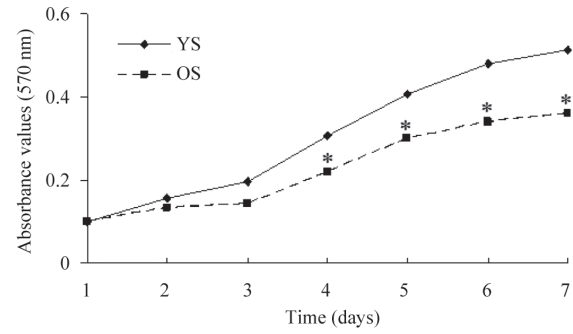


YS组仅见少量ROS阳性细胞, 荧光强度较弱。OS组内ROS阳性细胞数目明显增多, ROS荧光强度增强。绿色为ROS荧光染色, 蓝色为DAPI荧光染色。标尺=25 μm。

In the OS group, more ROS stained cells could be observed by fluorescence microscope, ROS fluorescent level of the cells was obviously higher compared with the YS group. Green, ROS staining; blue, DAPI staining. Bar=25 μm.

图2 ROS染色结果

Fig.2 ROS staining

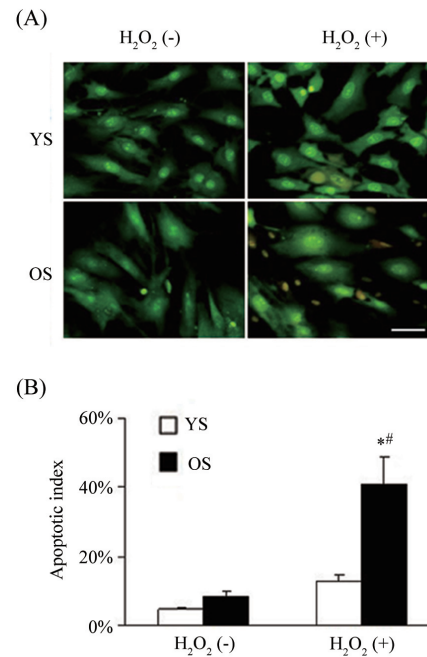


MTT检测结果显示, 培养4~7 d, OS组吸光度值显著低于YS组, 差异具有统计学意义, * $P < 0.05$ ($n=5$)。

MTT assay showed, from 4 to 7 days, that the absorbance values in the OS group were significantly lower than that in the YS group, * $P < 0.05$ ($n=5$).

图3 细胞增殖曲线

Fig.3 Cell proliferation curves of MSCs

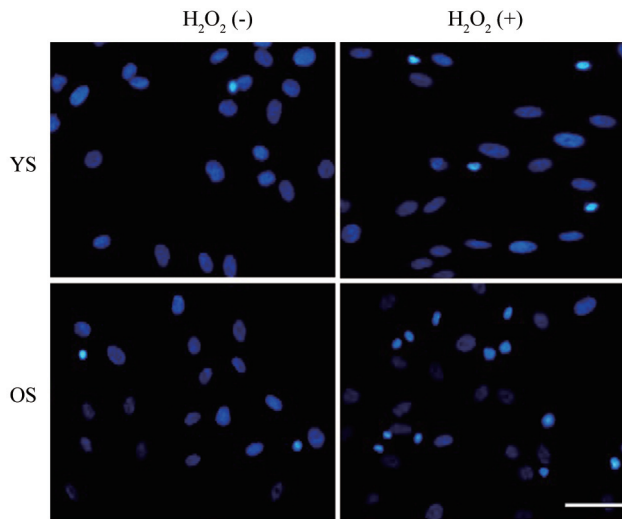


A: 未经100 μmol/L H₂O₂处理时, YS和OS组均未见明显的细胞凋亡情况。而经H₂O₂处理1 h后, YS组凋亡细胞数量仍较少, 而OS组MSCs存活能力明显减弱, 大量细胞出现了凋亡细胞的形态学表现。标尺=25 μm; B: 各组细胞凋亡率。经H₂O₂处理1 h后, OS组凋亡率显著高于YS组(* $P < 0.01$)和非氧化应激条件下的OS组($^{\#}P < 0.01$, $n=4$)。

A: in the YS and OS group, most cells showed normal cell morphology. After 100 μmol/L H₂O₂ treatment for 1 h, the number of apoptosis cells still was very few in the YS group. However, in the OS group, the apoptotic and necrotic cells were obviously increased. Bar=25 μm; B: apoptotic index of MSCs. After treatment with 100 μmol/L H₂O₂ in the OS group, the apoptotic index of the cells was significantly increased compared with that in the YS group (* $P < 0.01$) or that in the OS group without H₂O₂ treatment ($^{\#}P < 0.01$, $n=4$).

图4 AO/EB双染法检测细胞存活情况

Fig.4 AO/EB staining to check the survival conditions of cells



未经H₂O₂处理时, YS和OS组未出现明显的染色质浓缩现象, 凋亡细胞数量少。经H₂O₂处理 1 h后, OS组MSCs在氧化应激条件下的存活能力明显减弱, 大量细胞出现了核染色质浓集现象。标尺=25 μm。
After 100 μmol/L H₂O₂ treatment for 1 h, the number of apoptosis cells still was very few in the YS group. However, in the OS group, the apoptotic cells with condensation-like nucleus were obviously increased. Bar=25 μm.

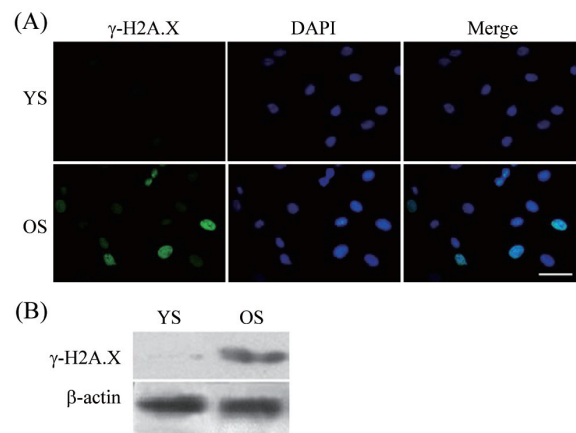
图5 Hoechst 33342染色结果
Fig.5 Hoechst 33342 staining

2.3.2 Hoechst 33342染色结果 Hoechst 33342染色结果显示, 非氧化应激条件下, YS组和OS组均未见明显的核染色质浓缩情况, 说明YS和OS培养对MSCs非氧化应激条件下的存活能力无明显影响。H₂O₂处理1 h后, OS组细胞核浓集现象较YS组明显增多(图5)。

2.4 OS促进了MSCs内衰老相关因子的表达

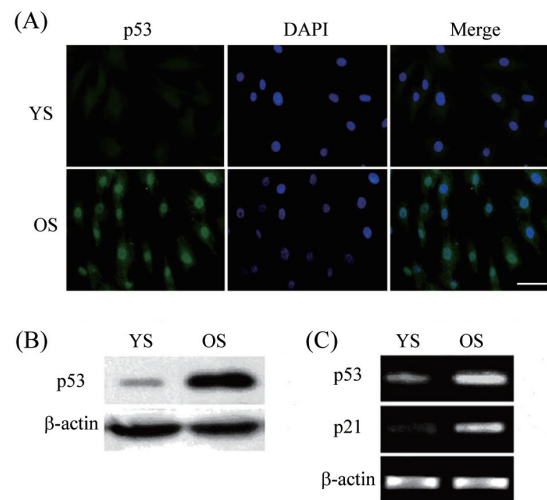
2.4.1 OS引起MSCs内的DNA损伤反应 研究表明, DNA损伤反应是引起衰老个体体内多种干细胞老化的主要原因之一^[10]。γ-H2A.X是组蛋白H2A.X的磷酸化形式, 在DNA发生损伤时, H2A.X可被磷酸化为γ-H2A.X, 而γ-H2A.X则可特异性的结合在DNA链的损伤部位, 进行修复, 因此γ-H2A.X已成为检测DNA损伤反应的特异性指标之一。为了探讨老年系统环境引起MSCs衰老的机制, 我们分别通过免疫荧光化学染色和Western blot法检测了各组γ-H2A.X的表达情况。免疫荧光染色结果显示, γ-H2A.X阳性反应出现在胞核内, YS组MSCs核内未发现明显的γ-H2A.X表达, 而OS组可以观察到大量的γ-H2A.X阳性细胞, 荧光强度增强(图6A)。Western blot检测结果OS组γ-H2A.X表达较YS组明显增加(图6B)。

2.4.2 OS促进MSCs内p53、p21表达 研究表明,



A: 各组γ-H2A.X免疫荧光染色结果。结果表明, OS组γ-H2A.X阳性细胞数量增多, 蛋白表达强度明显增强。标尺=25 μm; B: Western blot检测各组MSCs细胞γ-H2A.X蛋白表达情况, β-actin为内参蛋白。与YS组相比, OS组γ-H2A.X蛋白表达水平增高。
A: immunofluorescence staining of γ-H2A.X. The number of γ-H2A.X positive cells and the expression level of γ-H2A.X were markedly increased in the OS group than that in the YS group. Green, γ-H2A.X; blue, DAPI. Bar=25μm; B: Western blot analysis of the γ-H2A.X expression. β-actin was used as an internal control. The expression of γ-H2A.X was significantly increased in the OS group than that in the YS group.

图6 γ-H2A.X蛋白表达情况
Fig.6 The expression of γ-H2A.X protein



A: 各组p53免疫荧光染色结果。OS组p53表达强度明显增强, 尤其是在胞核内, 可见p53高表达。标尺=25 μm; B: Western blot检测各组MSCs细胞内γ-H2A.X蛋白表达情况, β-actin为内参蛋白。结果表明, 与YS组相比, OS组p53表达强度明显增强; C: RT-PCR检测各组p53、p21 mRNA表达变化情况, β-actin mRNA为内参mRNA。结果显示, 与YS组相比, OS组p53、p21 mRNA表达水平增高。

A: immunofluorescence staining of p53. The OS group showed an obvious increase in the p53 expression. Green, p53; blue, DAPI. Bar=25μm; B: Western blot analysis of the expression of p53 protein. β-actin was used as an internal control; C: the expression of p53 and p21 mRNA was assessed by RT-PCR. β-actin was used as an internal control. The results showed there was obviously upregulated expression of p53 and p21 mRNA in the OS group compared with that in the YS group.

图7 p53蛋白和p53、p21 mRNA表达情况
Fig.7 The expression of p53 protein and p53、p21 mRNA

p53是细胞衰老过程中发挥重要作用的蛋白之一^[11], 可通过引起其靶基因*p21*的表达, 阻遏细胞的增殖, 进而促进其发生衰老变化^[12]。本实验分别通过免疫荧光化学染色、Western blot法、RT-PCR法检测各组p53、p21的表达变化情况。免疫荧光化学染色结果显示, p53蛋白可出现在细胞的胞质和胞核内, 与YS组相比, OS组p53表达增强(图7A)。Western blot检测结果(图7B)显示OS组p53表达较YS组明显增加。RT-PCR对*p53*、*p21* mRNA表达的检测表明, OS组内*p53*、*p21* mRNA均呈高表达, 表达量较YS组明显升高(图7C)。

3 讨论

衰老是生物界广泛存在的现象, 也是生命发展的必然。细胞衰老通常是指在正常状况下生物发育成熟后, 随年龄增加, 细胞增殖能力和生理功能逐渐下降, 细胞结构、组分逐步退化性变, 趋向死亡的一种不可逆转的现象。这种现象不但发生在我们所经常关注的体细胞, 干细胞的衰老也同样存在^[3]。MSCs是中胚层发育的早期细胞, 具有较强的自我更新能力和较低的免疫排斥性, 又由于取材方便、易于体外培养和扩增、易于外源基因的转染和表达等特点, 已成为组织修复、尤其是自体细胞移植的理想候选细胞^[6], 但目前的研究发现, MSCs的衰老也普遍存在, MSCs衰老影响了其移植疗效, MSCs衰老研究已成为目前干细胞衰老研究的热点之一^[7-8]。

骨髓内血窦丰富, 血清是影响MSCs功能的重要外在因素之一^[13], 本实验采用不同年龄大鼠血清模拟体内MSCs的细胞外微环境, 通过检测各组MSCs衰老、增殖、凋亡情况及其衰老相关基因、相关蛋白的表达情况来探讨及初步阐明老年微环境对MSCs衰老的影响和可能机制。SA- β -半乳糖苷酶染色和细胞内ROS染色检验MSCs衰老情况, 结果表明, 与YS组比较, OS组SA- β -半乳糖苷酶染色阳性的衰老MSCs数量明显增加((96.2 \pm 24.1)/500细胞 vs (30.8 \pm 8.2)/500细胞, $P < 0.01$)。MTT法检测结果显示, OS组MSCs增殖能力较YS组明显下降。AO/EB染色法和Hoechst 33342法检测结果发现, OS组凋亡MSCs比例较YS组显著增加(40.9% \pm 7.8% vs 12.6% \pm 2.1%, $P < 0.01$), MSCs存活能力下降。这些结果均表明, OS培养可以促进MSCs衰老变化, 并抑制其增殖和存活能力, 老年干细胞微环境对MSCs衰老发挥着重要调控作用。

研究提示, DNA损伤和p53/p21途径是造成干细胞衰老的重要原因^[10-11], 本实验也通过检测这些衰老相关基因和蛋白的表达, 初步探讨老年微环境导致干细胞衰老的可能机制。DNA双链断裂形成, 组蛋白H2A.X的Ser139被大量而迅速磷酸化, 形成的磷酸化H2A.X被称为 γ H2A.X。 γ H2A.X会结合在DNA链断裂处, 因此被认为是检测DNA双链断裂的“金标准”。p53/p21途径是导致细胞衰老的重要信号通路, Park等^[14]研究发现老年的干细胞p53表达增加, Stolzing等^[15]对比第3周和第56周大鼠MSCs, 结果发现后者的p53表达强度明显高于前者, 提示p53/p21途径对MSCs衰老发挥调控作用。本实验通过免疫荧光化学法、Western blot法及RT-PCR法检测衰老相关因子 γ H2A.X、p53和p21的表达情况。结果发现, OS组 γ H2A.X和p53蛋白表达较YS组明显增高, *p53*、*p21* mRNA表达也同时增高, 说明OS培养确实可以造成MSCs内的DNA损伤反应增加、并激活细胞内p53/p21途径, 这可能是OS培养导致MSCs衰老的重要原因。我们的结果提示, DNA损伤反应和p53/p21途径是OS导致MSCs衰老的重要介导因素, 这为后续探讨老年干细胞微环境影响干细胞衰老的可能机制提供了一个新的切入点。

目前, 干细胞移植已成为临床治疗疾病的重要手段, 但现有的研究已经发现, 老年患者接受干细胞治疗的效果不如年轻患者, 老年微环境对移植入的干细胞功能产生了负面作用^[14]。MSCs是一种常见的移植细胞类型, 然而, 老年微环境对MSCs衰老、增殖、存活能力变化的影响作用尚未见报道, 对该问题的研究不仅有助于明确干细胞微环境对MSCs衰老的影响作用, 也为临床中老年患者接受自体或异体干细胞移植治疗提供有价值的基础实验数据。本研究从衰老、增殖、存活能力等多个方面阐述了老年微环境对MSCs功能的影响作用, 具有较强的基础和临床研究意义。

参考文献 (References)

- 1 Reddel RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 477-84.
- 2 Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(6): 748-53.
- 3 Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006; 441(7097): 1080-6.
- 4 Kan CD, Li SH, Weisel RD, Zhang S, Li RK. Recipient age de-

- termines the cardiac functional improvement achieved by skeletal myoblast transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(11): 1086-92.
- 5 Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24(6): 1505-11.
- 6 Dawn B, Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: Regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol* 2005; 100(6): 494-503.
- 7 Zhang H, Fazel S, Tian H, Mickle DA, Weisel RD, Fujii T, *et al.* Increasing donor age adversely impacts beneficial effects of bone marrow but not smooth muscle myocardial cell therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(5): 2089-96.
- 8 Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, Zhang WJ, Hong TH, Zhou G, *et al.* Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow derived stem cells. *BMC Cell Biol* 2008; 9: 60.
- 9 Page MM, Robb EL, Salway KD, Stuart JA. Mitochondrial redox metabolism: Aging, longevity and dietary effects. *Mech Ageing Dev* 2010; 131(4): 242-52.
- 10 Mallette FA, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* 2007; 6(15): 1831-6.
- 11 Matheu A, Maraver A, Serrano M. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6031-4.
- 12 Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: Aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(22): 7475-84.
- 13 Eslaminejad MB, Rouhi L, Arabnajafi M, Baharvand H. Rat marrow-derived mesenchymal stem cells developed in a medium supplemented with the autologous versus bovine serum. *Cell Biol Int* 2009; 33(5): 607-16.
- 14 Park JS, Kim HY, Kim HW, Chae GN, Oh HT, Park JY, *et al.* Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech Ageing Dev* 2005; 126 (5): 551-9.
- 15 Stolzing A, Scutt A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Ageing Cell* 2006; 5(3): 213-24.

The Study of Effects of Different Aged Serum on Mesenchymal Stem Cells Aging

Zhang Dayong, Xiang Xiaoxia, Chen Lü, Wang Junhao,
Zhang Yubin, Wang Junbo*

(School of Medicine and Life Sciences, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

Abstract Rat serum was extracted from young (8~12 weeks) and aged (64~72 weeks) SD rats. SD rats were randomly divided into two groups, young serum and old serum groups. Adult MSCs were cultured with 10% young rat or old rat serum for 36 h. Senescence-associated changes were examined with SA- β -galactosidase staining and ROS staining. The proliferation ability was detected by MTT assays. The survived and apoptotic cells were determined by AO/EB staining and Hoechst 33342 staining. To further explored the mechanisms of old rat serum on the MSC aging, we detected the expression of γ -H2A.X, a molecular marker of DNA damage response, p53, and p21 by reverse transcription-PCR, immunofluorescence and Western blot. The results showed that the expression of γ -H2A.X, p53 and p21 was increased in the senescent MSCs induced by culture with old rat serum. Taken together, this study indicates that old rat serum can induce the senescence of MSCs and inhibits the proliferation and survival ability of MSCs, and suggests that the DNA damage response and the p53/p21 pathways may be the two main mediators of old rat serum induced MSCs aging.

Key words mesenchymal stem cells; serum; aging; DNA damage response; p53

Received: April 8, 2011 Accepted: June 29, 2011

This work was supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y207159), Scientific Research Foundation of Zhejiang Medical and Healthy System (No.2009B126), Teacher Research Foundation of Zhejiang University City College (No.J-10010) and Student Research Projects of Zhejiang University City College (No.XZ2011562096)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88285753, E-mail: wangjb@zucc.edu.cn