

重型再生障碍性贫血模型小鼠骨髓间充质干细胞过度衰老的机制研究

欧议清 刘海燕 陆伟 闻梦静 刘红

【摘要】 目的 探讨重型再生障碍性贫血(SAA)模型小鼠骨髓间充质干细胞(BM-MSc)过度衰老的机制。方法 选择BALB/c小鼠40只,随机分为正常组20只、SAA组20只。应用白消安灌胃联合IFN- γ 腹腔注射诱导建立SAA小鼠模型;分离培养两组小鼠的BM-MSc。观察BM-MSc细胞形态和细胞骨架;CCK-8和流式细胞术检测细胞增殖与细胞周期情况;比较衰老相关 β -半乳糖苷酶(Senescence-associated β -Galactosidase, SA- β -gal)的染色阳性细胞比例;Western blot法检测mTOR蛋白的表达水平。结果 正常组小鼠的BM-MSc细胞呈纺锤状、边界清晰,应力纤维平行排列、整齐;而SAA小鼠的BM-MSc细胞体积增大,呈平铺、边界不清状,应力纤维紊乱模糊。CCK-8结果显示,SAA小鼠的BM-MSc的增殖速率较正常组缓慢,在第2天开始差异有统计学意义($P < 0.05$)。SAA组小鼠BM-MSc的G₀/G₁期细胞比率[(77.461 \pm 1.567)%对(46.045 \pm 2.055)% , $t = -34.384$, $P < 0.001$]、SA- β -gal阳性细胞比例[(75 \pm 11)%对(28 \pm 8)% , $t = 15.454$, $P < 0.001$]较正常组升高;SAA小鼠BM-MSc的mTOR表达水平高于正常小鼠。结论 SAA小鼠模型中BM-MSc是衰老的MSC,且mTOR通路激活可能是导致其衰老发生的机制。

【关键词】 贫血,再生障碍性; 间质干细胞; 衰老

基金项目:江苏省医学创新团队与领军人才基金(LJ201136);2013社会事业科技创新与示范基金(HS2013067);南通市科技项目临床医学研究中心建设基金(HS2015004)

The mechanism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells excessive senescence in severe aplastic anemia mouse model Ou Yiqing, Liu Haiyan, Lu Wei, Wen Mengjing, Liu Hong. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China
Corresponding author: Liu Hong, Email: hongliu63@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of excessive senescence in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSc) of mouse model with severe aplastic anemia (SAA). **Methods** 40 BALB/c mice were randomly assigned to two groups of control ($n=20$) and AA ($n=20$). SAA mouse model was induced by intraperitoneal injection with IFN- γ and intragastric infusion with busulfan. BM-MSc were isolated and cultured from bone marrow of SAA and healthy mice. The cell morphology was observed by inverted microscope and cell cytoskeleton was stained by Rhodamine-Phalloidin; The level of proliferation was analyzed by CCK-8 method, and cell cycle was tested by flow cytometry. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) assay was used to detect senescent BM-MSc; The expression of mTOR protein was detected by Western blot method. **Results** BM-MSc from normal mice presented spindle-shaped, clear boundaries and stress fibers were arranged in parallel, neat. while BM-MScs from SAA mice presented cell volume increases, tiled, ill-shaped and the stress fiber appeared to be disordered. The decreased activity of proliferation [more cells restricted in G₀/G₁ phase [(77.461 \pm 1.567)% vs (46.045 \pm 2.055)% , $t = -34.384$, $P < 0.001$], increased percentage of SA- β -gal positive cells [(75 \pm 11)% vs (28 \pm 8)% , $t = 15.454$, $P < 0.001$] and notably enhanced expression of mTOR of BM-MSc from SAA mice were observed when compared with those from normal mice. **Conclusion** This study clarified senescent BM-MScs from SAA model mice, which could be caused by the excessive activation of mTOR pathway.

【Key words】 Anemia, aplastic; Mesenchymal stem cells; Senescence

再生障碍性贫血(AA)是一种骨髓造血衰竭综合征,其发病机制尚未完全明确,尽管近十年的研究更强调免疫异常的主导作用,普遍认为AA是一种由活化的T淋巴细胞及其分泌的淋巴因子导致的造血干细胞过度凋亡^[1]。但造血微环境,尤其骨髓间充质干细胞(BM-MSc)的异常仍应引起重视。BM-MSc是骨髓造血微环境的重要组分,其分化产生的成骨细胞、成软骨细胞等基质细胞也是构成骨髓微环境的组分,并且能分泌IL-6、IL-11、IL-12等多种细胞因子共同维持造血微环境的稳定^[2-3]。既往研究证实AA患者BM-MSc体外培养的增殖能力以及支持造血的能力显著低于健康对照者^[4]。细胞增殖能力的下降以及生理功能的减退是细胞衰老的特征之一,BM-MSc是否由于衰老而影响了骨髓微环境正常的支持造血的功能?已知细胞衰老后通常表现出衰老相关 β -半乳糖苷酶(Senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)活性的增加^[5]。而mTOR信号通路通过降低多潜能基因Nang和Oct-4的表达等方式参与了多种细胞的衰老过程^[6]。为此,我们比较了正常小鼠与重型AA(SAA)模型小鼠BM-MSc细胞的形态、骨架、增殖、SA- β -gal活性及mTOR蛋白表达等情况,验证SAA小鼠BM-MSc是否衰老,并探寻AA发病中骨髓造血微环境缺陷的可能机制。

对象与方法

1. 研究对象及分组:近交系雌性BALB/c小鼠40只,SFP级,8~9周龄,体重18~22 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(合格证号:2015000511717),均饲养于南通大学医学院实验动物中心。取40只小鼠随机分为2组,设为SAA组与正常组,每组20只。SAA组参照文献^[7]方法,通过白消安灌胃及腹腔注射IFN- γ 10 d诱导建立BALB/c SAA模型小鼠。同时给予正常组小鼠等量等浓度生理盐水灌胃及腹腔注射。

2. 主要试剂和仪器: BALB/c小鼠BM-MSc完全培养基购自赛业(广州)生物科技有限公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、罗丹明-鬼笔环肽购自美国Invitrogen公司;CCK-8试剂购自日本Dojindo公司;细胞周期与凋亡检测试剂盒、SA- β -gal染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗鼠mTOR单克隆抗体购自英国Abcam公司;GADPH购自美国Bioworld公司;FACS Calibur流式细胞仪购自美国BD公司;Western blot全套仪器购自美国

Bio-Rad公司。

3. 分离培养BM-MSc:采用颈椎脱臼法处死小鼠,于75%乙醇中浸泡3 min,无菌条件下分离双侧股骨和胫骨,修剪干骺端后用完全培养基冲洗骨髓,制成细胞悬液并用70 mm滤网过滤。离心收集细胞后用完全培养基重悬调整细胞密度为 25×10^6 个/ml接种于25 cm²培养瓶(5 ml),置于37℃、5%CO₂培养箱培养。48 h后首次换液,去除非贴壁细胞,以后每3~4 d换液1次。倒置显微镜下观察贴壁细胞培养至90%融合时,消化细胞并按1:2比例传代培养,并记为第一代(P1代)细胞。

4. 细胞形态观察和骨架荧光染色:倒置显微镜下观察P4代BM-MSc的细胞形态并拍照记录。将接种培养于盖玻片的P3代BM-MSc细胞用4%多聚甲醛固定15 min后用PBS洗涤3次,每次5 min;正常驴血清(1:50)和羊血清(1:50)混匀后滴于盖玻片上,室温放置30 min。将罗丹明-鬼笔环肽(红)(1:50)滴于盖玻片上孵育1 h后PBS洗涤,后用DAPI染核20 min。甘油封固后用荧光显微镜观察细胞骨架。

5. 细胞增殖和细胞周期检测:收集P3代细胞,按细胞密度为5 000/100 μ l接种于96孔板中,分别培养1、2、3、4、5 d后加入CCK-8溶液继续培养2 h,用酶联免疫检测仪测定450 nm处吸光度(A)值,实验设3个复孔,重复3次。收集P3代细胞,预冷PBS洗涤后用70%乙醇固定12 h,用PBS洗涤后加入碘化丙锭(PI)300 μ l,37℃避光温育30 min后用流式细胞仪检测,实验设2个复孔,重复4次。

6. SA- β -gal检测细胞衰老:收集P3代细胞接种培养于12孔板中,PBS洗涤后每孔加入500 μ l SA- β -gal染色固定液,室温反应15 min,PBS洗涤后加入染色液工作液500 μ l,保鲜膜封住孔板防止蒸发,37℃孵育6 h。显微镜下观察、拍照并计算每100个BM-MSc中SA- β -gal阳性比例,实验设3个复孔,重复3次。

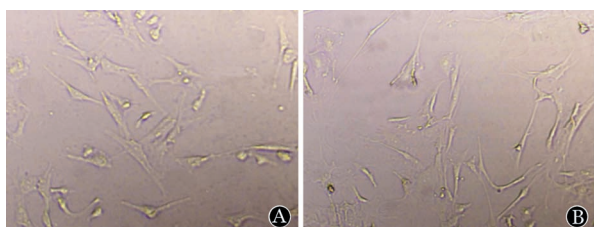
7. Western blot检测mTOR蛋白的表达:收集P3代BM-MSc,RIPA+PMSF裂解液冰浴裂解,提取总蛋白。BCA法测蛋白浓度。加入适量SDS上样缓冲液后沸水煮15 min,-80℃保存备用。用SDS-PAGE凝胶电泳、转膜,脱脂奶粉封闭2 h后加一抗稀释液(1:1 000)4℃孵育过夜。洗膜后加HRP标记的二抗(1:4 000)室温孵育2 h。洗膜后ECL显色,以GADPH为内参。

8. 统计学处理:采用SPSS 16.0软件进行数据

处理。CCK-8、细胞周期各期比率、SA- β -gal 阳性比例的数据用均数 \pm 标准差(数据符合正态分布)表示,细胞增殖率采用重复测量方差分析进行比较,两组的细胞周期各期比率及SA- β -gal 阳性比例采用 t 检验进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

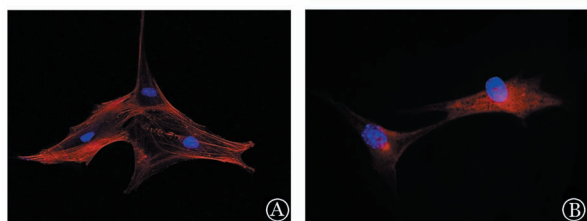
结 果

1. 细胞形态和骨架的改变:在倒置显微镜下观察两组小鼠BM-MSc的P4代细胞形态,正常组小鼠的BM-MSc细胞仍保持纺锤状形态,边界清晰。而SAA小鼠的BM-MSc细胞体积增大,呈平铺、边界不清的状态(图1)。在荧光显微镜下观察,正常小鼠的BM-MSc中可清晰观察到贯穿细胞全长的应力纤维,且平行排列整齐。而SAA小鼠的BM-MSc的细胞应力纤维紊乱模糊(图2),提示SAA小鼠BM-MSc存在形态异常及衰老。



A: 正常小鼠;B: 重型再生障碍性贫血模型小鼠

图1 BALB/c小鼠第4代骨髓间充质干细胞(BM-MSc)形态(中倍)



A: 正常小鼠;B: 重型再生障碍性贫血模型小鼠

图2 BALB/c小鼠第4代骨髓间充质干细胞(BM-MSc)骨架

2. 增殖能力的改变:正常组和SAA组BM-MSc培养1~5 d CCK-8结果比较显示,不同时间点的数据差异有统计学意义($P<0.05$),两组之间的差异有统计学意义($P<0.05$),且两组的增殖趋势大致相同,均随时间的增加呈升高趋势,但SAA组小鼠的BM-MSc的增殖速率较正常组的缓慢,差异有统计学意义($P<0.05$)(图3)。进一步检测细胞周期显示,SAA组小鼠BM-MSc G₀/G₁期细胞的比例明显高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

3. SA- β -gal 阳性细胞比例和mTOR表达的改变:本实验分别检测正常小鼠和SAA小鼠BM-MSc的SA- β -gal 阳性细胞的比例,结果显示,SAA组的

SA- β -gal 阳性细胞比例为(75 \pm 11)%,高于正常组的(28 \pm 8)%,差异有统计学意义($t=15.454, P<0.001$)。进一步通过Western blot检测正常和SAA小鼠BM-MSc的mTOR表达水平,SAA小鼠1和SAA小鼠2 mTOR相对表达水平分别为1.51、1.37,显著高于正常小鼠1和正常小鼠2的0.65、0.60(图4)。

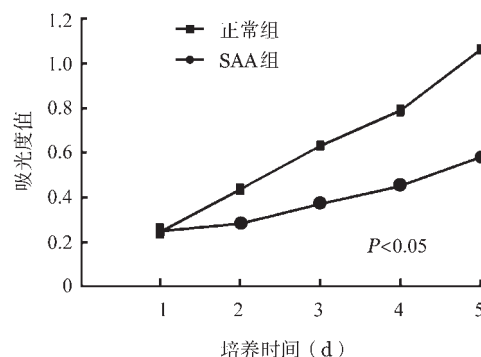
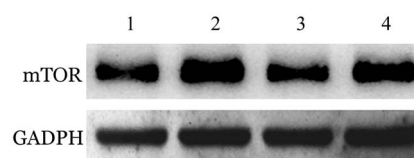


图3 CCK-8检测正常和重型再生障碍性贫血(SAA)模型小鼠骨髓间充质干细胞增殖情况(实验设3个复孔,重复3次)

表1 两组小鼠骨髓间充质干细胞的细胞周期比率的比较(%)

组别	鼠数(只)	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
正常组	8	46.045 \pm 2.055	30.739 \pm 3.468	23.216 \pm 5.407
SAA组	8	77.461 \pm 1.567	9.420 \pm 2.057	13.122 \pm 2.749
t 值		-34.384	14.955	4.707
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:SAA:重型再生障碍性贫血。实验设2个复孔,重复4次



1: 正常小鼠1;2:SAA小鼠1;3:正常小鼠2;4:SAA小鼠2

图4 Western blot法检测正常和重型再生障碍性贫血模型小鼠骨髓间充质干细胞mTOR蛋白表达水平

讨 论

BM-MSc是骨髓造血微环境的重要组成部分,与造血干细胞(Hematopoietic stem cells, HSC)均是维持骨髓正常造血的重要细胞。HSC通过自我更新和分化维持造血功能,BM-MSc则提供HSC所需细胞因子,并通过细胞接触与HSC相互作用,维持正常造血^[8]。临床已证实MSC和HSC的联合输注可提高AA患者的造血重建率^[9-10]。既往的研究表明AA

患者中BM-MSc存在增殖异常且更易分化成抑制造血的脂肪细胞,难以分化成促进造血的成骨细胞^[11-13],但其机制尚不清楚。作为骨髓微环境的重要组成部分,BM-MSc的质和量的变化都对于骨髓造血情况有着重要的调节作用。

我们应用白消安联合IFN- γ 构建的SAA小鼠模型有显著的外周血三系减少、骨髓脂肪化明显、骨髓有核细胞计数和脾脏指数显著减低等表现,且外周血及脾脏存在调节性T细胞数量减少和Th17细胞数量增加,脾脏调节性T细胞凋亡率升高,Akt、TGF- β 表达水平的下降^[5,7,14]。本研究中我们观察到,与正常小鼠相比较,SAA小鼠的BM-MSc的细胞体积增大,呈平铺、边界不清的状态,明显异于正常小鼠BM-MSc的纺锤状。为进一步了解细胞的骨架变化,我们使用罗丹明-鬼笔环肽对细胞的肌动蛋白进行染色,观察到SAA小鼠BM-MSc的细胞应力纤维紊乱模糊,而正常组清晰且排列整齐,提示SAA小鼠BM-MSc存在形态异常。衰老的MSc典型特征除去有细胞体积增大、呈扁平形态、肌动蛋白应力纤维发生改变外,当细胞衰老时,细胞虽然维持着代谢活性,但因周期阻滞在G₁期而失去了进行有丝分裂的能力^[15-17]。本研究中,我们观察比较了SAA小鼠和正常小鼠的BM-MSc的细胞增殖情况和细胞周期改变,SAA小鼠的BM-MSc增殖活性显著降低,G₁期的比例则明显增高。提示SAA小鼠的BM-MSc呈衰老状态。Dimri等^[18]在1995年即首次报道SA- β -gal可以作为细胞衰老检测的良好指标,今已普遍作为衰老细胞的标志物^[19-21]。因此,我们还进行了SA- β -gal检测,发现SAA小鼠BM-MSc的SA- β -gal阳性细胞比例明显高于正常小鼠的BM-MSc,进一步证实了SAA小鼠BM-MSc过度衰老这一结论。相关研究表明,mTOR信号通路的激活与包括MSc在内的多种细胞衰老过程的发生发展密切相关^[22-24]。为进一步证明SAA小鼠BM-MSc衰老的机制,我们检测了小鼠BM-MSc mTOR的表达水平,结果显示SAA小鼠BM-MSc mTOR的表达水平显著高于正常组,提示mTOR信号通路可能参与了BM-MSc的衰老机制。有关mTOR信号通路如何介导BM-MSc的衰老尚有待进一步研究。

综上所述,SAA小鼠模型中BM-MSc是衰老的MSc,mTOR通路的过度激活可能是导致其衰老发生的机制。进一步探寻MSc衰老的分子机制有助于探索骨髓微环境障碍介导的AA发病机制,并为

新的治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia [J]. *Blood*, 2006, 108(8):2509-2519. DOI: 10.1182/blood-2006-03-010777.
- [2] 乔淑凯,任汉云,石永进. 间充质干细胞的生物学特性及其在血液系统疾病中的临床应用[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(8):683-686. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.08.029.
- [3] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(7308):829-834. DOI: 10.1038/nature09262.
- [4] El-Mahgoub ER, Ahmed E, Afifi RA, et al. Mesenchymal stem cells from pediatric patients with aplastic anemia: isolation, characterization, adipogenic, and osteogenic differentiation [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2014, 33(1):9-15. DOI: 10.3109/15513815.2013.839012.
- [5] Turinetti V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7):E1164. DOI: 10.3390/ijms17071164.
- [6] Gharibi B, Farzadi S, Ghuman M, et al. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(8): 2256-2266. DOI: 10.1002/stem.1709.
- [7] 宁方颖,林赠华,刘红,等. 干扰素- γ 与白消安合用诱导建立小鼠重型再生障碍性贫血模型的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(11):777-782. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.11.012.
- [8] Balderman SR, Calvi LM. Biology of BM failure syndromes: role of microenvironment and niches [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014, 2014(1):71-76. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.71.
- [9] Wang H, Wang Z, Xue M, et al. Co-transfusion of haplo-identical hematopoietic and mesenchymal stromal cells to treat a patient with severe aplastic [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(4):563-565. DOI: 10.3109/14653241003695059.
- [10] Jaganathan BG, Tisato V, Vulliamy T, et al. Effects of MSC co-injection on the reconstitution of aplastic anemia patient following hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Leukemia*, 2010, 24(10):1791-1795. DOI: 10.1038/leu.2010.164.
- [11] Hamzic E, Whiting K, Gordon SE, et al. Characterization of bone marrow mesenchymal stromal cells in aplastic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(6):804-813. DOI: 10.1111/bjh.13364.
- [12] Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, et al. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Haematologica*, 2014, 99(11):1686-1696. DOI: 10.3324/haematol.2014.105692.
- [13] Chao YH, Peng CT, Harn HJ, et al. Poor potential of proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells derived from children with severe aplastic anemia [J]. *Ann He-*

- matol, 2010, 89(7):715-723. DOI: 10.1007/s00277-009-0892-6.
- [14] 刘海燕, 林赠华, 刘红, 等. 调节性T细胞和Th17细胞在新型小鼠重型再生障碍性贫血模型中的变化[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33 (8):653- 656. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.08.016.
- [15] 陆雯萍, 林赠华, 刘红, 等. 重型再生障碍性贫血模型小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺T细胞凋亡影响及机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34 (11):931- 935. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.11.005.
- [16] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells [J]. Ageing Res Rev, 2006, 5 (1):91- 116. DOI: 10.1016/j.arr.2005.10.001.
- [17] Ksiazek K. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence[J]. Rejuvenation Res, 2009, 12(2):105-116. DOI: 10.1089/rej.2009.0830.
- [18] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20):9363-9367.
- [19] Sikora E. Rejuvenation of senescent cells-the road to postponing human aging and age-related disease? [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(7):661-666. DOI: 10.1016/j.exger.2012.09.008.
- [20] Yao GD, Yang J, Li Q, et al. Activation of p53 contributes to pseudolaric acid B- induced senescence in human lung cancer cells in vitro [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37 (7):919- 929. DOI: 10.1038/aps.2016.8.
- [21] Bonney EA, Krebs K, Saade G, et al. Differential senescence in feto- maternal tissues during mouse pregnancy [J]. Placenta, 2016, 43:26-34. DOI: 10.1016/j.placenta.2016.04.018.
- [22] Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. Nature, 2013, 493(7432):338-345. DOI: 10.1038/nature11861.
- [23] Gharibi B, Farzadi S, Ghuman M, et al. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2014, 32(8):2256-2266. DOI: 10.1002/stem.1709.
- [24] Korotchikina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, et al. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway [J]. Aging (Albany NY), 2010, 2 (6):344-352. DOI: 10.18632/aging.100160.

(收稿日期:2016-08-03)

(本文编辑:刘爽)

中华医学会血液学分会第十届委员会委员名单

主任委员 王建祥

前任主任委员 黄晓军

候任主任委员 吴德沛

副主任委员 胡豫 邵宗鸿 周道斌 刘启发

常务委员(按姓氏笔画为序) 马 军 方美云 王建祥 王景文 任汉云 刘启发 吴德沛
 宋永平 张 曦 张连生 李军民 杨林花 邵宗鸿 陈协群 周剑峰 周道斌
 侯 明 侯 健 胡 豫 胡建达 黄 河 黄晓军

委员兼秘书长 肖志坚

委 员(按姓氏笔画为序) 马 军 方美云 牛 挺 王 欣 王建祥 王健民 王景文
 付 蓉 白 海 卢英豪 任汉云 江 明 纪春岩 刘 竞 刘 利 刘 林
 刘 霆 刘开彦 刘启发 刘卓刚 孙自敏 孙爱宁 朱尊民 吴广胜 吴德沛
 宋永平 张 梅 张 曦 张连生 张晓辉 李 娟 李 艳 李 薇 李 骥
 李文倩 李军民 苏雁华 杨仁池 杨同华 杨林花 沈建平 肖志坚 邵宗鸿
 陈 虎 陈协群 周剑峰 周道斌 金 洁 罗建民 姚红霞 郑 波 侯 明
 侯 健 胡 豫 胡建达 赵永强 赵维莅 赵谢兰 徐开林 梁爱斌 黄 河
 黄晓军 黄瑞滨 韩艳秋 彭志刚 曾庆曙 谭 荻