

论 著

· 基础研究 ·

小分子化合物对间充质干细胞复制性衰老的逆转作用

黎彦, 冀帅飞, 付小兵, 项江兵, 陈华婷, 刘艺琼, 周来显, 孙晓艳*, 吴旭*

南方医科大学南方医院胸外科, 广州 510515

[摘要] **目的** 构建基于小分子化合物的全化学培养体系, 探讨其在间充质干细胞(MSCs)复制性衰老过程中的作用。**方法** 年轻MSCs连续传至20代(P20), 建立复制性衰老细胞模型(P20-MSCs), 将P20-MSCs分为衰老模型组与小分子处理组, 取第5代脐带MSCs(P5-MSCs)作为对照组。衰老模型组与对照组于全化学培养体系中培养, 小分子处理组于含丙戊酸、Repsox的全化学培养体系中培养, 均培养7 d。采用 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色检测细胞衰老程度; 免疫荧光染色观察细胞中Ki-67、OCT4、Nanog、P16、P21蛋白的表达情况; RT-qPCR检测OCT4、Nanog、P16、P21 mRNA的相对表达量; 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况; 采用划痕实验、Transwell侵袭实验和克隆形成实验检测小分子化合物对衰老MSCs迁移、侵袭和克隆形成能力的影响。**结果** 光学显微镜下观察显示, 衰老MSCs体积增大, 胞质呈现凸起增多现象。小分子全化学培养体系孵育后细胞恢复为梭形或不规则三角形, 与年轻MSCs相似。SA- β -gal染色结果显示, 与衰老模型组相比, 经小分子处理后细胞SA- β -gal染色阳性率降低, 差异有统计学意义($45.00\% \pm 1.23\%$ vs. $84.80\% \pm 1.50\%$, $P < 0.001$)。免疫荧光染色显示, 与衰老模型组相比, 小分子处理组中Ki-67、OCT4、Nanog阳性细胞百分比增高(Ki-67: $89.00\% \pm 1.50\%$ vs. $25.00\% \pm 2.00\%$, $P < 0.001$; OCT4: $88.40\% \pm 0.80\%$ vs. $25.40\% \pm 1.20\%$, $P < 0.001$; Nanog: $76.30\% \pm 1.70\%$ vs. $10.50\% \pm 0.60\%$, $P < 0.001$), P16、P21阳性细胞百分比降低(P16: $64.00\% \pm 3.20\%$ vs. $98.00\% \pm 1.50\%$, $P < 0.05$; P21: $45.00\% \pm 1.10\%$ vs. $82.00\% \pm 2.00\%$, $P < 0.05$)。RT-qPCR检测结果显示, 与衰老模型组相比, 小分子化合物可上调OCT4、Nanog mRNA在老化MSCs中的表达($P < 0.001$), 下调P16、P21 mRNA在老化MSCs中的表达($P < 0.05$)。与衰老模型组相比, 小分子处理组细胞的抗凋亡能力($21.60\% \pm 1.20\%$ vs. $31.40\% \pm 0.80\%$)、迁移能力($49.30\% \pm 3.30\%$ vs. $30.60\% \pm 4.40\%$)、侵袭能力[(90.00 ± 12.00)个 vs. (34.00 ± 9.00)个]和克隆形成能力[(144.00 ± 10.00)个 vs. (68.00 ± 7.00)个]均明显提升, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 构建的小分子全化学培养体系能够抑制并部分逆转体外长期培养的MSCs的衰老进程。

[关键词] 间充质干细胞; 衰老; 小分子

[中图分类号] R329.2⁺5

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2021)07-0643-08

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.07.02

Small molecules efficiently ameliorate cellular senescence in aged mesenchymal stem cells

Li Yan, Ji Shuai-Fei, Fu Xiao-Bing, Xiang Jiang-Bing, Chen Hua-Ting, Liu Yi-Qiong, Zhou Lai-Xian, Sun Xiao-Yan*, Wu Xu*

Department of Thoracic Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

*Corresponding author. Wu Xu, E-mail: wuxu_southhospital@163.com; Sun Xiao-Yan, E-mail: yanzisun1979@sina.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81671905)

[Abstract] **Objective** To construct a complete chemical culture system based on small molecule compounds and study its role in promoting the reversal of senescence of mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** MSCs were transmitted to 20 generations (P20) continuously. The model of the replicative aging cells (P20-MSCs) was established, then divided into aging model group and small molecule treatment group, and the fifth generation of umbilical cord MSCs (P5-MSCs) was set as control group. The aging model group and control group were cultured in the whole chemical culture system for 7 days, and small molecular treatment group was cultured in the whole chemical culture system containing valproate and Repsox for 7 days. β -galactosidase staining was used to detect cell senescence, immunofluorescence staining was used to detect the protein expression levels of Ki-67, OCT4, Nanog, P16, and P21; RT-qPCR to detect the mRNA expression levels of OCT4, Nanog, P16 and P21. Flow cytometry was used to detect the anti-apoptotic ability of cells. Migration experiments, Transwell invasion experiments and clone formation experiments to detect small molecules effects on migration, invasion and self-cloning functions of senescent MSCs. **Results** The cell bodies of senescent

[基金项目] 国家自然科学基金(81671905)

[作者简介] 黎彦, 硕士研究生, 主要从事细胞衰老及间充质干细胞的相关研究

[通信作者] 吴旭, E-mail: wuxu_southhospital@163.com; 孙晓艳, E-mail: yanzisun1979@sina.com

mesenchymal stem cells were enlarged and presented dendritic processes. After incubation in the full chemical culture system, the cells return to a spindle shape or irregular triangle similar to young MSCs. SA- β -gal staining results showed that compared with aging model group, the positive rate of galactosidase in cells treated with small molecules was significantly reduced, and the difference was statistically significant ($45.00\% \pm 1.23\%$ vs. $84.80\% \pm 1.50\%$, $P < 0.001$). The immunofluorescence results showed that compared with aging model group, the proportion of positive cells expressing Ki-67, OCT4 and Nanog increased (Ki-67: $89.00\% \pm 1.50\%$ vs. $25.00\% \pm 2.00\%$, $P < 0.001$; OCT4: $88.40\% \pm 0.80\%$ vs. $25.40\% \pm 1.20\%$, $P < 0.001$; Nanog: $76.30\% \pm 1.70\%$ vs. $10.50\% \pm 0.60\%$, $P < 0.001$), the proportion of positive cells expressing P16, P21 decreased (P16: $64.00\% \pm 3.20\%$ vs. $98.00\% \pm 1.50\%$, $P < 0.05$; P21: $45.00\% \pm 1.10\%$ vs. $82.00\% \pm 2.00\%$, $P < 0.05$) in small molecule treatment group. RT-qPCR results showed that compared with aging model group, small molecule compounds could up-regulate the mRNA expression levels of OCT4 and Nanog in aging MSCs ($P < 0.001$), down-regulate the mRNA expression levels of P16 and P21 ($P < 0.05$). Compared with aging model group, the abilities of anti-apoptosis ($21.60\% \pm 1.20\%$ vs. $31.40\% \pm 0.80\%$), migration ($49.30\% \pm 3.30\%$ vs. $30.60\% \pm 4.40\%$), invasion [(90.00 \pm 12.00) cells vs. (34.00 \pm 9.00) cells] and self-cloning abilities [(144.00 \pm 10.00) cells vs. (68.00 \pm 7.00) cells] in small molecule treatment group were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The constructed small molecule full chemical culture system can inhibit and partially reverse the aging process of long-term cultured MSCs *in vitro*.

[Key words] mesenchymal stem cells; senescence; small molecules

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有强大自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞^[1]。MSCs具有其他成体干细胞无法比拟的优势,包括来源广泛、取材容易^[2]、分离操作简单、免疫原性低、伦理争议少等,因此以其为基础的干细胞疗法近年来受到广泛关注,为治疗各种难治性疾病带来了新的契机^[3-5]。能够获得足够“数量”和“质量”的干细胞,是MSCs作为干细胞药物应用于临床规模化治疗的前提条件。但大量基础及临床研究发现,经过体外扩增培养后, MSCs的生物学属性(如植入性、分化潜能、免疫调节活性及归巢能力等)发生了显著改变,增加了制备批次间和疗效的不确定性,特别是随着体外传代次数的递增,胞内积累的DNA复制压力和染色体缩合缺陷可引发染色体高频畸变^[6],增加了MSCs产品临床输注的潜在风险^[7]。因此,在体外培养体系中延缓或逆转MSCs的衰老进程,并维持MSCs的原始生物学特性,将有助于进一步开发和完善MSCs的制备工艺,改善MSCs的临床治疗效果。基于小分子化合物的诱导重编程是近年来再生医学的研究热点^[8],特别是小分子化合物因靶点清晰、便于定量、作用相对可控,被广泛应用于对体细胞的命运调控及功能干预方面的研究^[9]。鉴于小分子化合物在体细胞重编程过程中的优势,本课题组提出通过靶向干性相关的信号通路筛选获得异性的小分子化合物组合,以作用于老化的MSCs,逆转其衰老进程,使其在体外重新获得可与年轻MSCs相媲美的生物学特性。本研究探索小分子全化学培养体系在延缓MSCs衰老进程、维持MSCs固有属性中的作用,以期优化MSCs的生产工艺、保证临床级干细胞制备过程中MSCs的质量及其临床应用效果提

供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 丙戊酸、Repsox购自美国Sigma公司;抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)购自美国SouthernBiotech公司;Ki-67、OCT4、Nanog、P16、P21鼠单克隆抗体及Alex Fluor-594标记的二抗购自美国Abcam公司;DyLight™ 488-鬼笔环肽(phalloidin)购自美国CST公司; β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色试剂盒、山羊血清、4%多聚甲醛、Triton X-100、牛血清白蛋白(BSA)、细胞凋亡诱导剂购自北京索莱宝科技有限公司;cDNA第一链合成预混试剂、SuperReal荧光定量预混试剂购自北京天根生化科技有限公司;OCT4、Nanog、P16、P21引物购自上海生工生物工程股份有限公司;细胞凋亡试剂盒购自美国BD公司。激光共聚焦显微镜、光学显微镜购自美国Leica公司;流式细胞仪购自美国BD公司;实时荧光定量PCR仪购自美国Thermo Fisher公司。

1.2 复制性衰老细胞模型的建立及小分子处理 人脐带MSCs由本实验室保存。年轻MSCs在含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的低糖DMEM/F12培养基中培养,连续传至20代(P20),建立复制性衰老细胞模型(P20-MSCs)。将细胞密度为50%~60%的衰老MSCs随机分为小分子处理组(SP20-MSC)与衰老模型组(P20-MSC)。小分子处理组于含丙戊酸(500 μ mol/L)、Repsox(10 μ mol/L)、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的低糖DMEM/F12全化学培养体系中培养,衰老模型组继续于含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的低糖DMEM/F12培养体系中培养,每2~3 d更换1次全新培养基,培养7 d后进

行后续实验。取第5代脐带MSCs(P5-MSC)作为对照组。

1.3 细胞形态学观察 取各组细胞各一皿，于光学显微镜下随机挑选5个视野观察细胞形态并拍照。

1.4 SA-β-gal染色检测细胞衰老程度 取各组细胞分别铺于6孔板中，待细胞融合至80%时，用细胞固定液固定15 min，按照SA-β-GAL染色试剂盒说明书配制染色液，每孔加入2 ml染色液，置于37℃、无CO₂环境中孵育过夜，光学显微镜下观察细胞染色情况。各组随机选取5个视野，计算阳性细胞率，取平均值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 各组取1 × 10⁶个细胞重悬于1 ml PBS中，加入50 μmol/L细胞凋亡诱导剂作用20 min，300 × g离心5 min，取细胞沉淀重悬于100 μl流式上样缓冲液(含0.5% BSA的PBS)中，调整细胞密度为1 × 10⁵个/ml，加入5 μl Annexin V-FITC室温孵育10 min，再加入5 μl PI室温孵育5 min，补充上样缓冲液至400 μl，30 min内上机检测细胞凋亡情况。

1.6 免疫荧光染色观察细胞中Ki-67、OCT4、Nanog、P21、P16蛋白的表达情况 取小分子处理组与衰老模型组细胞，分别铺于共聚焦皿中，待细胞融合至80%时，用4%多聚甲醛溶液固定30 min，加入0.2% Triton X-100室温通透20 min，加入5%山羊血清封闭30 min，加入一抗Ki-67(1:200)、OCT4(1:200)、Nanog(1:200)、P21(1:200)、P16(1:200)，4℃孵育过夜，加入二抗室温孵育1 h，加入phalloidin孵育20 min，DAPI染核，封片，荧光显微镜下拍照观察，计算阳性细胞百分比。

1.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测OCT4、Nanog、P21、P16 mRNA的表达水平 取小分子处理组与衰老模型组细胞，提取总RNA，根据天根cDNA第一链合成试剂盒说明书步骤反转录成cDNA，以其为模板行RT-qPCR检测。反应条件：95℃预变性2 min；95℃ 10s，60℃ 30s，40个循环后进行熔链分析。反应结束后取Ct值，以β-actin为内参，采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量，实验重复3次。引物序列如表1所示。

1.8 划痕实验检测细胞迁移能力 将各组细胞铺在6孔板中，小分子处理组于添加小分子的DMEM/F12完全培养基中培养，对照组和衰老模型组于DMEM/F12完全培养基中培养。待细胞融合至100%时，用10 μg/ml丝裂霉素C处理1 h，然后用1000 μl枪头在6孔板中垂直划痕；PBS洗涤1次，清除划痕周围细胞团块，加入2 ml相应培养基，置于37℃、5% CO₂孵箱中培养，24 h后观察划痕愈合情况，计算划痕愈合百分比。

表1 RT-qPCR引物序列

Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

基因	引物序列(5'-3')
β-actin	正向: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	反向: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
P16	正向: GATCCAGGTGGGTAGAAGGTC
	反向: CCCCTGCAAACCTTCGTCCT
P21	正向: TGTCCGTCAGAACCCATGC
	反向: AAAGTCGAAGTTCATCGCTC
OCT4	正向: CTGGGTTGATCCTCGGACCT
	反向: CCATCGGAGTTGCTCTCCA
Nanog	正向: TTTGTGGCCTGAAGAAAACCT
	反向: AGGGCTGTCTGAATAAGCAG

1.9 Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力 将各组细胞用胰蛋白酶消化后，重悬于无血清培养基中；用细胞计数器计数，取10 000个细胞接种于Transwell上室中，补充无血清培养基至250 μl；下室中加入含15%胎牛血清的完全培养基，置于细胞孵箱中培养；6 h后取出上室，用2 ml PBS洗涤2次；浸入4%多聚甲醛溶液中固定30 min；PBS洗涤2次，加入0.1%结晶紫染色10 min；PBS洗涤3~5次，直至无紫色液体，显微镜下观察上室透膜细胞染色情况，计数侵袭细胞数。

1.10 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 将各组细胞用胰蛋白酶消化后，重悬于培养基中；用细胞计数器计数，取5000个细胞，混匀于2 ml DMEM/F12培养基(含20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)中，均匀铺于100 mm皿中，置于37.5℃、5% CO₂孵箱中培养2周，期间按时补充培养基，培养结束后，弃掉培养基，加入1 ml 4%多聚甲醛溶液固定30 min；PBS洗涤2次，加入0.1%结晶紫染色10 min；PBS洗涤3~5次，直至无紫色液体，显微镜下观察细胞染色情况，计数细胞集落数。

1.11 统计学处理 采用SPSS 22.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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-t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小分子化合物对MSCs形态的影响 光学显微镜下观察显示，对照组细胞呈梭形或不规则三角形；衰老模型组细胞体积增大、边界模糊，细胞形态由梭形或不规则三角形逐渐变为扁平状，胞质呈现凸起增多现象；小分子处理组细胞凸起减少，形态为梭形及不规则三角形，少数呈椭圆状(图1)。

2.2 小分子化合物对MSCs衰老的影响 SA-β-gal染色结果显示，对照组、衰老模型组及小分子处理组细胞SA-β-gal染色阳性率依次为2.23% ± 1.00%、

84.80% ± 1.50%、45.00% ± 1.23%。与对照组比较,衰老模型组及小分子处理组细胞SA-β-gal染色阳性率增高,差异有统计学意义($P < 0.001$);与衰老模型组比较,小分子处理组细胞SA-β-gal染色阳性率降低,差异有统计学意义($P < 0.001$)(图2)。

2.3 小分子化合物对MSCs凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,对照组、衰老模型组及小分子处理组细胞凋亡率依次为5.96% ± 0.80%、31.40% ± 0.80%、21.60% ± 1.20%。与对照组比较,衰老模型组及小分子处理组细胞凋亡率增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与衰老模型组比较,小分子处理组细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图3)。

2.4 小分子化合物对MSCs增殖的影响 免疫荧光染色结果显示,小分子处理组Ki-67阳性细胞百分比高于衰老模型组,差异有统计学意义($89.00\% \pm 1.50\% \text{ vs. } 25.00\% \pm 2.00\%$, $P < 0.001$, 图4)。

2.5 小分子化合物对MSCs衰老相关基因mRNA和蛋白以及干性相关基因mRNA和蛋白表达的影响 RT-qPCR检测结果显示,小分子处理组中P16、P21 mRNA相对表达量低于衰老模型组(P16: $69.00\% \pm 6.20\% \text{ vs. } 100.00\% \pm 12.00\%$, $P < 0.05$; P21: $55.00\% \pm 7.00\% \text{ vs. } 100.00\% \pm 20.00\%$, $P < 0.05$), OCT4、Nanog mRNA的相对表达量较衰老模型组分别上调3.30 ± 0.23、5.20 ± 0.97倍,差异有统计学意义($P < 0.001$, 图5)。

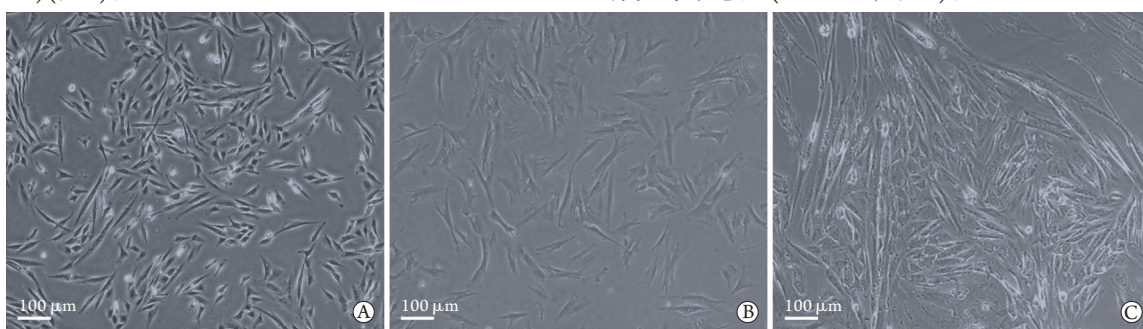


图1 显微镜下观察小分子化合物对MSCs形态的影响

Fig.1 Effects of small molecule compounds on the morphology of MSCs

A. 对照组; B. 衰老模型组; C. 小分子处理组

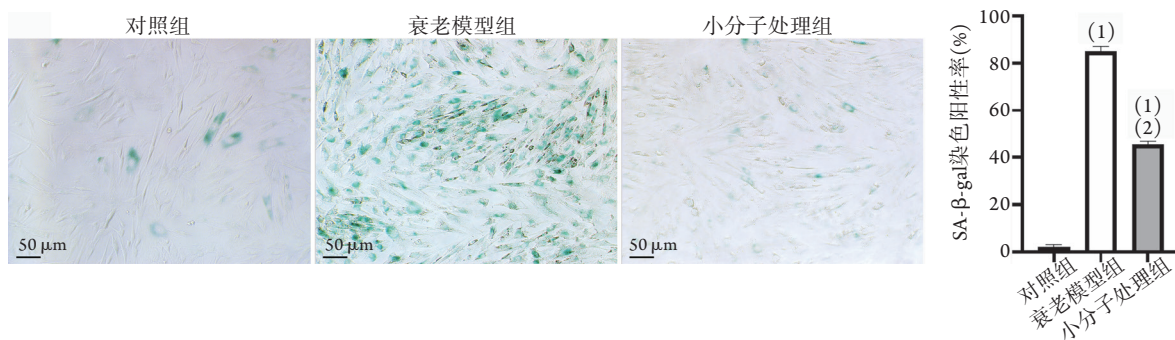


图2 小分子化合物对MSCs衰老的影响(SA-β-gal染色)

Fig.2 Effects of small molecule compounds on the senescence of MSCs (β-galactosidase staining)

SA-β-gal. β-半乳糖苷酶; 与对照组比较, (1) $P < 0.001$; 与衰老模型组比较, (2) $P < 0.001$ 。

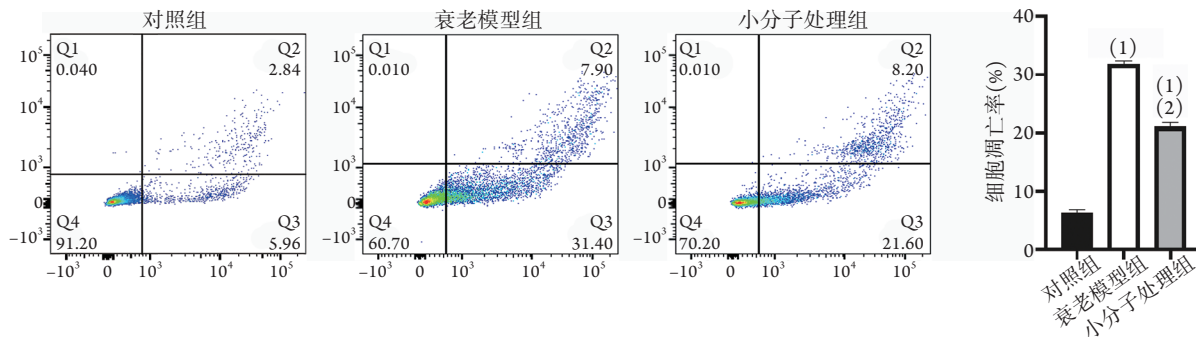


图3 流式细胞术检测小分子化合物对MSCs凋亡的影响

Fig.3 Effects of small molecule compounds on the apoptosis of MSCs (Flow cytometry)

与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与衰老模型组比较, (2) $P < 0.05$ 。

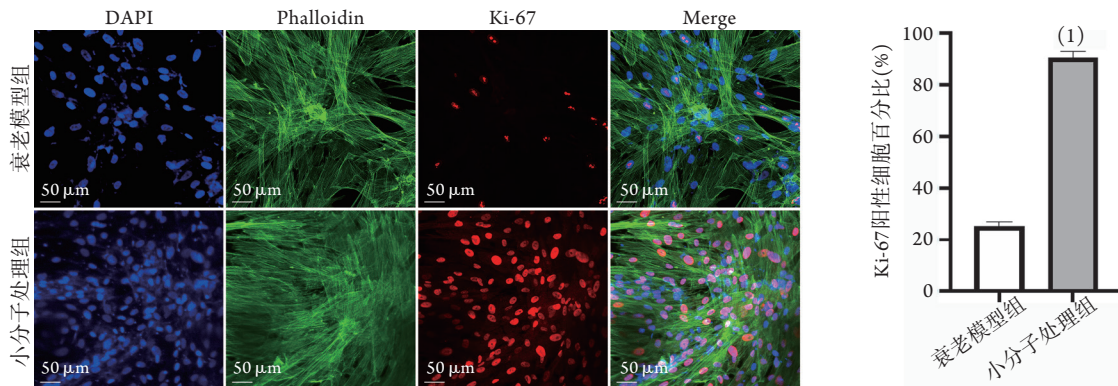


图4 小分子化合物对MSCs增殖的影响(免疫荧光染色)

Fig.4 Effects of small molecule compounds on the proliferation of MSCs (Immunofluorescence staining)

与衰老模型组比较, (1) $P < 0.001$ 。

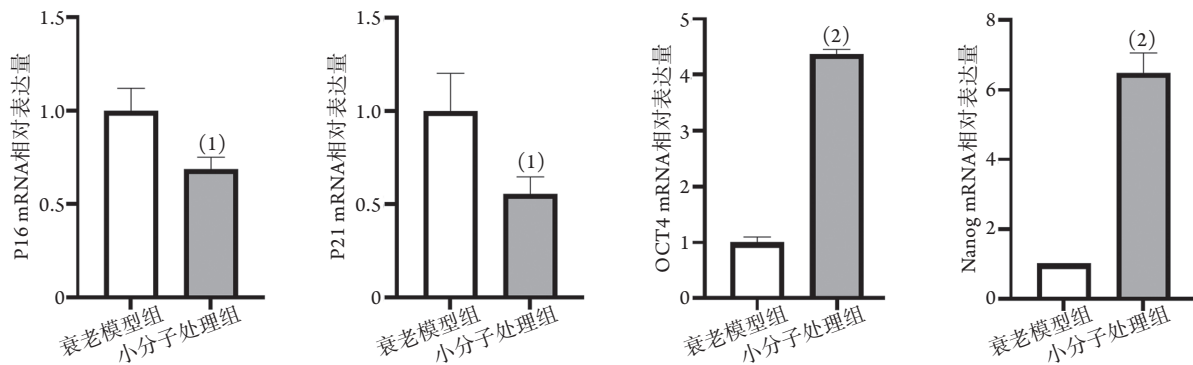


图5 小分子化合物对MSCs衰老相关基因P16、P21及干性相关基因OCT4、Nanog mRNA表达的影响(RT-qPCR)

Fig.5 Effects of small molecule compounds on the mRNA expressions of cellular senescence genes P16, P21 and cell stem genes OCT4, Nanog of MSCs

与衰老模型组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.001$ 。

免疫荧光染色结果显示, 小分子处理组中P16、P21阳性细胞百分比均低于衰老模型组(P16: $64.00\% \pm 3.20\%$ vs. $98.00\% \pm 1.50\%$, $P < 0.05$; P21: $45.00\% \pm 1.10\%$ vs. $82.00\% \pm 2.00\%$, $P < 0.05$, 图6A、B), OCT4、Nanog阳性细胞百分比均高于衰老模型组(OCT4: $88.40\% \pm 0.80\%$ vs. $25.40\% \pm 1.20\%$, $P < 0.001$; Nanog: $76.30\% \pm 1.70\%$ vs. $10.50\% \pm 0.60\%$, $P < 0.001$, 图6C、D)。

2.6 小分子化合物对MSCs迁移能力的影响 划痕实验结果显示, 对照组、衰老模型组及小分子处理组24 h划痕愈合百分比依次为 $58.10\% \pm 5.45\%$ 、 $30.60\% \pm 4.40\%$ 、 $49.30\% \pm 3.30\%$ 。与对照组比较, 衰老模型组24 h划痕愈合百分比降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与衰老模型组比较, 小分子处理组24 h划痕愈合百分比增高, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图7)。

2.7 小分子化合物对MSCs侵袭能力的影响 Transwell侵袭实验结果显示, 对照组、衰老模型组及小分子处理组侵袭细胞数分别为(140.00 ± 17.00)个、(34.00 ± 9.00)个、(90.00 ± 12.00)个。与对照组

比较, 衰老模型组及小分子处理组侵袭细胞数减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与衰老模型组比较, 小分子处理组侵袭细胞数增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图8)。

2.8 小分子化合物对MSCs克隆形成能力的影响 克隆形成实验结果显示, 对照组、衰老模型组及小分子处理组细胞集落数依次为(247.00 ± 20.00)个、(68.00 ± 7.00)个、(144.00 ± 10.00)个。与对照组比较, 衰老模型组及小分子处理组细胞集落数减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与衰老模型组比较, 小分子处理组细胞集落数增多, 差异有统计学意义($P < 0.001$)(图9)。

3 讨论

本研究采用一种安全、有效的方法在体外抑制并逆转MSCs的衰老进程, 维持MSCs的固有生物学特征, 结果显示, 构建的含小分子丙戊酸、Repsox的全化学培养体系可下调衰老细胞中SA- β -gal的表达, 降低衰老细胞中P16、P21的表达水平, 促进细胞增殖, 并增强衰老细胞的迁移、侵袭和克隆形成

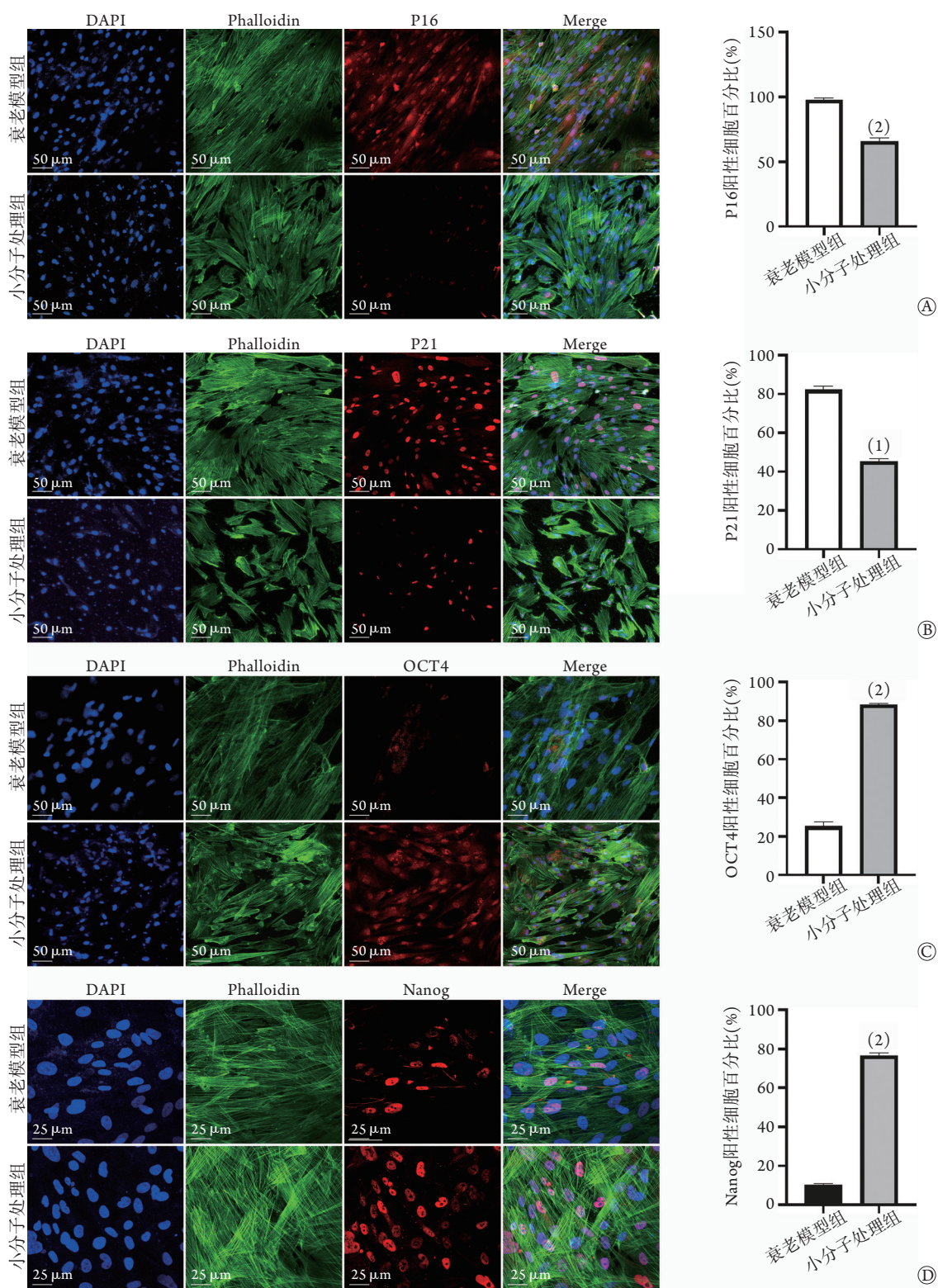


图6 小分子化合物对MSCs衰老相关蛋白P16、P21及干性相关蛋白OCT4、Nanog表达的影响(免疫荧光染色)

Fig.6 Effects of small molecule compounds on the expressions of cellular senescence proteins P16, P21 and cell stem proteins OCT4, Nanog of MSCs (Immunofluorescence staining)

A. 免疫荧光染色检测衰老相关蛋白P16的表达; B. 免疫荧光染色检测衰老相关蛋白P21的表达; C. 免疫荧光染色检测干性相关蛋白OCT4的表达; D. 免疫荧光染色检测干性相关蛋白Nanog的表达; 与衰老模型组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.001$ 。

能力, 同时抑制老化MSCs的程序性凋亡, 提示小分子化合物作用于衰老MSCs能够促使细胞向年轻状态转化。

MSCs是再生医学基础与临床研究中重要的种子来源细胞之一, 也是少数被准许应用于临床治疗的成体干细胞之一, 其安全性已得到广泛验证。

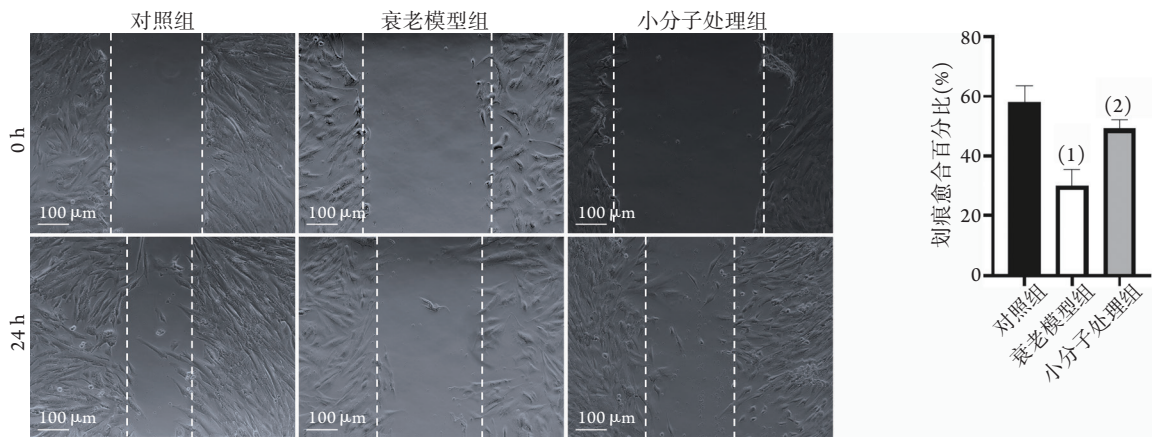


图7 划痕实验检测小分子化合物对MSCs迁移能力的影响

Fig.7 Effects of small molecule compounds on cell migration ability of MSCs detected by migration experiment 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与衰老模型组比较, (2) $P<0.01$ 。

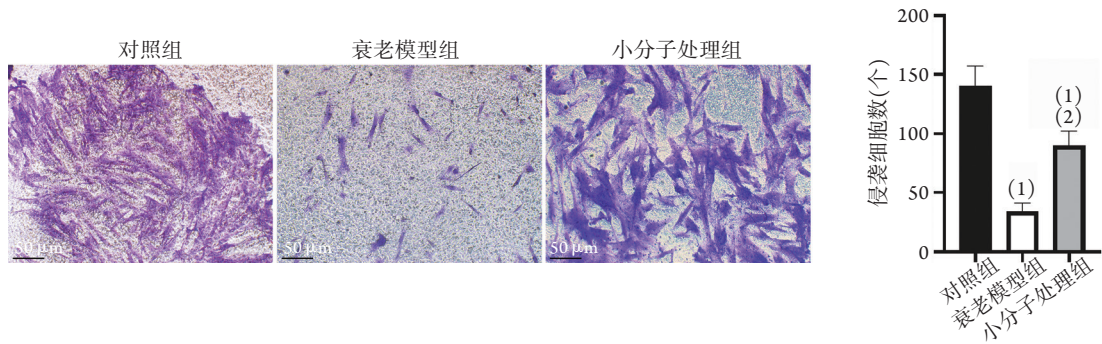


图8 小分子化合物对MSCs侵袭能力的影响(Transwell)

Fig.8 Effects of small molecule compounds on cell invasion ability of MSCs (Transwell) 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与衰老模型组比较, (2) $P<0.05$ 。

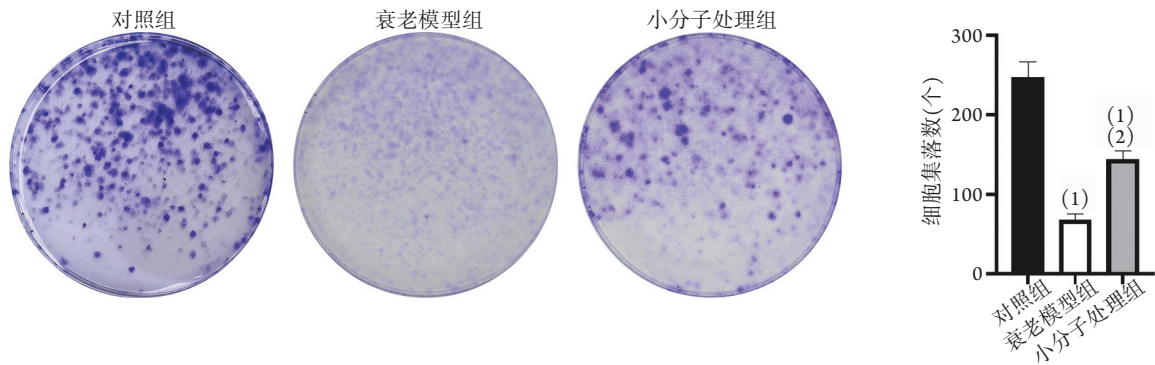


图9 小分子化合物对MSCs克隆形成能力的影响

Fig.9 Effects of small molecules on the clone forming ability of MSCs 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与衰老模型组比较, (2) $P<0.001$ 。

ClinicalTrials网站上注册的与MSCs相关的临床试验已经超过1050项, 已有10种基于MSCs的干细胞类药物获批上市, 并在临床应用于多种疾病的治疗, 如促进风湿性关节炎的愈合^[10]、缓解重症急性呼吸窘迫综合征的症状^[11]等。但不同体系与批次分离获得的MSCs在固有表征和分化潜能方面不同, 难以满足大规模临床治疗对细胞质量的要求。因此, 筛选靶向于性相关信号通路的小分子组合, 建立全化

学诱导体系, 在提供稳定、均一、优质种子细胞的同时, 逐步替代外源性基因的表达, 可从根本上解决MSCs临床应用中的安全性和效率问题。有研究发现, 含有Repsox的小分子组合能启动体细胞重编程, 成功将成纤维细胞重编程为多能干细胞^[12]。另有研究发现, Repsox作为一种选择性TGF-β通路抑制剂, 具有促进MSCs增殖、维持MSCs生物学特性的作用^[13]。Zhou等^[14]使用丙戊酸配合蛋白质转染

技术诱导出了诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 其原理可能是由于丙戊酸提升了胞内组蛋白乙酰化的水平, 从而帮助染色体解离, 进而提升了重编程的效果^[15]。

本研究发现, 在使用DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)的培养体系下, 经过15~20代次的培养, 80%以上的细胞SA- β -gal染色阳性, 表明此时绝大部分细胞开始衰老, 细胞形态也从长梭形变为摊开状, 细胞质凸起, 细胞增殖能力减弱。在种植密度为50%的情况下, 年轻细胞培养2~3 d即长满培养皿, 衰老细胞则需要7~10 d才可长满; 衰老细胞的迁移、侵袭能力明显下降, 且伴随部分细胞凋亡。

在相同的培养体系下, 加入丙戊酸(500 μ mol/L)和Repsox (10 μ mol/L)继续培养7 d, 细胞形态即出现明显变化, 从摊开状变为椭圆形, 且出现明显的细胞集落, 表明细胞的克隆能力增强, 与后续克隆形成实验的结果相吻合(图9)。本研究检测小分子处理组、衰老模型组细胞衰老相关及干性相关基因和蛋白的表达, 结果显示, 经小分子处理后, 衰老相关基因P16和P21 mRNA和蛋白的表达均明显下调, 与SA- β -gal染色结果相吻合, 而干性相关基因OCT4和Nanog mRNA和蛋白的表达均明显上调, MSCs的增殖能力、迁移能力、侵袭能力增强, 细胞凋亡减弱。

综上所述, 本研究结果表明, 构建的小分子全化学培养体系(含丙戊酸500 μ mol/L和Repsox 10 μ mol/L)能够抑制并部分逆转体外长期培养的MSCs的衰老进程。本研究借助小分子化合物, 采用纯化学手段在体外抑制并逆转了MSCs的复制性衰老进程, 避免了使用外源性基因出现的不可控风险, 且小分子来源普遍, 效果可靠, 作用明确, 是维持MSCs生物学属性良好的添加剂, 有助于维持体外培养的MSCs的各项功能, 为MSCs的科学研究与临床应用对接提供了新的思路。本研究发现小分子化合物组合对MSCs复制性衰老具有逆转作用, 且小分子Repsox及丙戊酸的作用靶点清晰, 但这两种小分子逆转细胞衰老的作用机制尚有待深入研究, 且在体外培养条件下, 导致细胞衰老的因素较多, 如氧化应激、高糖等, 复制性衰老仅为其中一种, 小分子化合物是否对其他原因导致的细胞衰老有效尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Potten CS, Loeffler M. Stem cells: Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt[J]. *Development*, 1990, 110(4): 1001-1020.
- [2] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, *et al.* Current concepts in adult stem cell therapy for stroke[J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(29): 3565-3574.
- [3] Wang LT, Liu KJ, Sytwu HK, *et al.* Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: Use of cell-free products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021. doi: 10.1002/sctm.21-0021.
- [4] Ke YN, Lin J. Progress in the application of mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis[J]. *Chin J Pract Intern Med*, 2019, 39(8): 677-680. [柯旖旎, 林进. 间充质干细胞治疗骨关节炎应用进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2019, 39(8): 677-680.]
- [5] Zhang XB, Shi JT, Zhang K, *et al.* Research progress in the treatment of disc degeneration by bone marrow mesenchymal stem cells and their exocrine[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(8): 862-868. [张晓勃, 施锦涛, 张凯, 等. 骨髓间充质干细胞及其外泌体治疗椎间盘退变的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(8): 862-868.]
- [6] Kenyon NS, Willman MA, Han D, *et al.* Extended survival vs accelerated rejection of nonhuman primate islet allografts: Effect of mesenchymal stem cell source and timing[J]. *Am J Transplant*, 2021. doi: 10.1111/ajt.16693.
- [7] Vegi Y, Charnley M, Earl SK, *et al.* Photothermal release and recovery of mesenchymal stem cells from substrates functionalized with gold nanorods[J]. *Acta Biomater*, 2021. doi: 10.1016/j.actbio.2021.05.008.
- [8] Ye J, Ge J, Zhang X, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds[J]. *Cell Res*, 2016, 26(1): 34-45.
- [9] Ghosh D, Pena CM, Quach N, *et al.* Senescent mesenchymal stem cells remodel extracellular matrix driving breast cancer cells to more invasive phenotype[J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(2): jcs232470.
- [10] Alavi M, Tavakkol-Afshari J, Shariati-Sarabi Z, *et al.* Intravenous injection of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the gene expression and plasma level of CCL5 in refractory rheumatoid arthritis[J]. *J Res Med Sci*, 2020, 25: 111.
- [11] Powell SB, Silvestri JM. Safety of intratracheal administration of human umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells in extremely low birth weight preterm infants[J]. *J Pediatr*, 2019, 210: 209-213.e2.
- [12] Hou P, Li Y, Zhang X, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. *Science*, 2013, 341(6146): 651-654.
- [13] Zhao XX, An XL, Zhu XC, *et al.* Inhibiting transforming growth factor- β signaling regulates *in vitro* maintenance and differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2018, 330(8): 406-416.
- [14] Zhou H, Wu S, Joo JY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(5): 381-384.
- [15] Giordano F, Naimo GD, Nigro A, *et al.* Valproic acid addresses neuroendocrine differentiation of LNCaP cells and maintains cell survival[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 4265-4274.

(收稿日期: 2021-02-23; 修回日期: 2021-05-27)

(责任编辑: 纪方方)