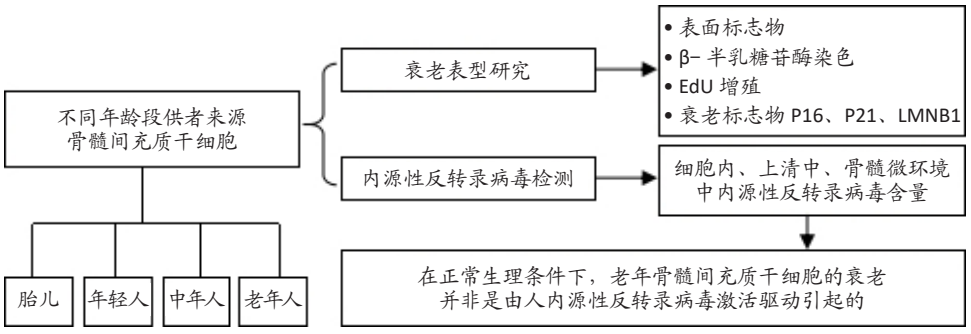
人骨髓间充质干细胞增龄衰老不依赖于内源性反转录病毒的介导

王亚萍[1]，高天芸[2]，王 斌[1, 2]

https://doi.org/10.12307/2026.539
采用日期：2025-01-25
修回日期：2025-04-23
在线日期：2025-04-29
中图分类号：
R459.9；R318；R329.2
文章编号：
2095-4344(2026)01-00010-11
文献标识码：A

文章快速阅读： 不同年龄段人骨髓间充质干细胞衰老：是否通过内源性反转录病毒激活介导？



文题释义：

骨髓间充质干细胞： 为骨髓基质成纤维细胞，是一类起源于中胚层的成体干细胞，具有自我更新及多向分化潜能，可分化为多种间质组织，如骨髓、软骨、脂肪、骨髓造血组织等。此外，还具有独特的细胞因子分泌功能，使骨髓间充质干细胞在多种疾病中发挥一定的治疗效果。

内源性反转录病毒： 是几百万年前古老的反转录病毒入侵人类基因组并整合的遗迹，约占人类基因组序列的8%，绝大多数的内源性反转录病毒会积累各种突变，从而在宿主基因组中失活或片段化，异常激活后会诱导疾病的发生，也会增加病毒蛋白的翻译以及病毒样颗粒在衰老细胞中的累积。

摘要

背景： 人体增龄衰老可能是由于体内各种干细胞的衰老和耗竭。骨髓间充质干细胞具有重要的生理功能并对多种疾病展现出一定的疗效，研究骨髓间充质干细胞的衰老及机制具有重要意义。

目的： 探讨人骨髓间充质干细胞是否伴随供者年龄的增加而呈现衰老表型，并进一步检测内源性反转录病毒是否驱动骨髓间充质干细胞的增龄衰老，为干细胞衰老机制研究提供新参考。

方法： 采用流式细胞术、β-半乳糖苷酶染色、qPCR、免疫印迹法及EdU荧光成像对不同年龄段的骨髓间充质干细胞进行衰老表征研究。收集不同年龄段供者的骨髓间充质干细胞及细胞培养上清，通过qPCR法检测人内源性反转录病毒的含量，进一步采用高灵敏的液滴式数字PCR检测细胞培养上清中内源性反转录病毒颗粒的表达，并用ELISA检测不同年龄段骨髓血浆样本中的内源性反转录病毒含量。

结果与结论： 骨髓间充质干细胞具有明显的增龄衰老，包括显著的形态学改变、β-半乳糖苷酶染色阳性细胞比例升高、衰老标志物P16和P21蛋白表达升高，LMNB1蛋白表达下降，细胞增殖能力减弱。不同年龄段骨髓间充质干细胞中的内源性反转录病毒含量无显著性差异，培养上清中几乎不存在内源性反转录病毒颗粒，不同年龄段骨髓血浆样本中内源性反转录病毒无显著性差异。结果表明，人骨髓间充质干细胞具有正常生理性增龄衰老，但不是通过内源性反转录病毒的异常激活介导的，可能具有更加复杂的驱动机制。

关键词： 骨髓间充质干细胞；衰老机制；细胞衰老；骨髓血浆；内源性反转录病毒；内源性反转录病毒颗粒；液滴式数字PCR

Senescence of human bone marrow mesenchymal stromal cells with increasing age is not dependent on the mediation of endogenous retroviruses

Wang Yaping[1], Gao Tianyun[2], Wang Bin[1, 2]

[1]Clinical Stem Cell Center, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China; [2]Clinical Stem Cell Center, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Wang Yaping, Master candidate, Clinical Stem Cell Center, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Wang Bin, MD, Professor, Researcher, Clinical Stem Cell Center, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China; Clinical Stem Cell Center, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

[1] 临床干细胞研究室，南京鼓楼医院，南京中医药大学鼓楼临床医学院，江苏省南京市 210008；[2] 临床干细胞研究室，南京大学医学院附属鼓楼医院，江苏省南京市 210008

第一作者： 王亚萍，女，2001 年生，湖北省十堰市人，汉族，南京中医药大学在读硕士，主要从事间充质干细胞临床应用的研究。

通讯作者： 王斌，博士，教授，研究员，临床干细胞研究室，南京鼓楼医院，南京中医药大学鼓楼临床医学院，南京大学医学院附属鼓楼医院，江苏省南京市 210008

https://orcid.org/0000-0003-3981-8849(王斌)

基金资助： 国家自然科学基金面上项目 (82070459，82270701)，项目负责人：王斌

引用本文： 王亚萍，高天芸，王斌 . 人骨髓间充质干细胞增龄衰老不依赖于内源性反转录病毒的介导 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):10-20.

Abstract

BACKGROUND: Aging of human body may be due to the senescence and depletion of various stem cells in the body. Bone marrow mesenchymal stromal cells have important physiological functions and have shown certain therapeutic effects on various diseases. It is of great significance to study the senescence and mechanism of bone marrow mesenchymal stromal cells.

OBJECTIVE: To investigate whether human bone marrow mesenchymal stromal cells exhibit senescence phenotypes with increasing donor age, and further determine whether endogenous retrovirus drives the senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells, offering a novel reference for the investigation of stem cell senescence mechanism.

METHODS: The senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages was characterized by flow cytometry, β-galactosidase staining, qPCR, western blotting, and EdU fluorescence imaging. Bone marrow mesenchymal stromal cells and cell culture supernatant were collected from donors of different ages. The content of human endogenous retrovirus was detected by qPCR. Furthermore, highly sensitive droplet digital PCR was used to detect the expression of endogenous retrovirus-like particles in the cell culture supernatant. The content of endogenous retrovirus in bone marrow plasma samples of different ages was detected by ELISA.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone marrow mesenchymal stromal cells exhibited obvious senescence with increasing age, including significant morphological changes, increased proportion of β-galactosidase positive cells, increased expression of senescence markers P16 and P21 protein, decreased expression of LMNB1 protein, and reduced cell proliferation ability. There was no significant difference in the content of endogenous retrovirus in bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages, almost no endogenous retrovirus-like particles in the cell culture supernatant. There was no significant difference in endogenous retrovirus-like particles detected in bone marrow plasma samples at different ages. These findings indicate that human bone marrow mesenchymal stromal cells have normal physiological senescence with increasing age, but the mechanism of senescence is not mediated by abnormal activation of endogenous retroviruses, which may have a more complex driving mechanism.

Key words: bone marrow mesenchymal stromal cell; aging mechanism; cellular senescence; bone marrow plasma; endogenous retrovirus; endogenous retrovirus-like particle; droplet digital PCR

Funding: *National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 82070459 and No. 82270701 (to WB)*

How to cite this article: *WANG YP, GAO TY, WANG B. Senescence of human bone marrow mesenchymal stromal cells with increasing age is not dependent on the mediation of endogenous retroviruses. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):10-20.*

0 引言 Introduction

衰老随着年龄的增长而发生，由多种因素引起，如端粒缩短[1]、DNA 损伤[2-3]、线粒体功能障碍[4]、表观遗传改变[5-8]、氧化应激等[9]。一方面衰老细胞分化能力降低[10]，另一方面衰老细胞释放出的因子会加速机体衰老[11]。衰老会诱导相关疾病，如糖尿病[12]、阿尔茨海默病[13]、帕金森病[14]、多发性硬化症[15]、心血管疾病等[16]。预计到 2050 年，全球老年人口将显著增加，且全世界 80 岁及以上的成年人将诊断出 690 万新发癌症病例，其中超过 1/4 将发生在中国，对于衰老机制的研究近年来成为医学研究的热点[17]。

人体的衰老被认为与干细胞的衰老和耗竭有关[18-23]，如果能有效延缓体内干细胞衰老，或许能在一定程度上延缓机体的衰老。间充质干细胞是一种多能干细胞，最早是从骨髓中发现，称为骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stromal cells，BMSCs)[24]，不仅具有自我更新增殖能力，还具有成骨、成脂、成软骨分化潜能以及免疫调节功能[25-26]；此外，还通过旁分泌方式分泌各种细胞因子和生长因子，促进组织修复[27]，调节各种生理功能，包括血管生成，为维持造血干细胞提供所需的基本支持[28-29]，以及成骨功能，促进骨修复[30-32]。这些特性使 BMSCs 对多种生理功能的维持及多种衰老相关疾病都有一定的治疗效果[33-36]。然而与年轻 BMSCs 相比，衰老 BMSCs 对疾病的治疗效果显著下降[37-38]，并且体内衰老 BMSCs 不断累积，达到一定程度后不被及时清理，可能会使机体稳态失调，从而导致机体衰老。BMSCs 的衰老是一个动态过程，伴随着代谢、表观遗传、转录和翻译变化[39]，且衰老机制较为复杂，如何能有效延缓 BMSCs 衰老是目前迫切需要解决的一大难题。现阶段研究发现药物、自噬、基因修饰等能不同程度地延缓 BMSCs 衰老[40-41]，但是效果并不是十分理想，还应进一步研究出可以有效对抗 BMSCs 衰老的策略。

在人类基因组进化过程中，存在一类潜伏在基因组中的病毒起源的 LTR 反转录转座因子，它们是古代反转录病毒感染的遗迹，约占人类基因组的 8%，称为内源性反转录病毒。研究发现人类内源性反转录病毒 K(human endogenous retrovirus K，HERVK) 是最近整合到人体基因组且最活跃的内源性反转录病毒亚族，HERVK 维持开放的阅读框和编码病毒颗粒形成所需的蛋白质[42]，在健康的成体细胞中不表达，但在异常条件下可以被解锁转录病毒基因并产生反转录病毒样颗粒 (retrovirus-like particles，RVLPs)，进而诱导一些疾病的发生，如胎盘发育性疾病[43]、癌症[44]。此外，HERVK 与机体和细胞衰老也有一定的联系，最近有文献报道衰老体细胞中 HERVK 异常表达以及 RVLPs 积累，HERVK 与 RVLPs 构成了一个可传递的信息，在年轻体细胞中引发衰老表型。此外，在老年人血清中也观察到内源性反转录病毒的活化，抑制内源性反转录病毒能减轻细胞衰老和组织退化，并在一定程度上减缓机体衰老，内源性反转录病毒是延缓衰老的靶点[6，45]。

目前针对于内源性反转录病毒激活介导的体细胞程序性衰老的作用已被报道，然而内源性反转录病毒是否也驱动干细胞衰老的研究较少，尤其是间充质干细胞。间充质干细胞对人体生理功能维持及临床应用具有很大前景，然而随着间充质干细胞衰老，其功能特性及对疾病的疗效受到很大限制。该研究主要探讨 BMSCs 是否伴随供者年龄的增加而呈现出增龄衰老表型，以及 HERVK 是否被激活来介导细胞衰老过程，为 BMSCs 的衰老机制及延缓甚至逆转衰老提供新思路。

研究结果表明不同年龄段 BMSCs 具有明显的增龄衰老表型，然而 HERVK 在正常生理性衰老过程中并未异常激活，证明 BMSCs 增龄衰老与体细胞的衰老机制不同，并非是由 HERVK 异常激活而驱动的，可能具有更为复杂的驱动机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 11 月至 2024 年 7 月在南京大学医学院附属鼓楼医院临床干细胞研究中心完成。

1.3 材料

1.3.1 样本 人 BMSCs 及人骨髓血浆样本来源于南京大学医学院附属鼓楼医院，胎儿组 BMSCs 来源于无先天性疾病的流产胎儿，年轻组 BMSCs 来源于年轻供者，中年组 BMSCs 来源于中年供者，老年组 BMSCs 来源于老年供者；老年人皮肤组织样本来源于南京大学医学院附属鼓楼医院，所有样本均与供者或其家属签署知情同意书后，在无菌条件下获取。

临床组织标本的获取得到南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理委员会批准 (批准号：2017-161-08；审批日期：2023-11-29)。

1.3.2 实验试剂和仪器

(1) 实验试剂：DMEM 基础培养基 (10567014，GIBCO，美国)；胎牛血清 (12664025，GIBCO，美国)；细胞消化液 (Tryple) (12563011，GIBCO，美国)；DPBS(A12858-01，GIBCO，美国) 及青链霉素 (BC-CE-007，生航生物，南京)；β- 半乳糖苷酶试剂盒 (C0602，碧云天，上海)；EdU 检测试剂盒 (C10310-1，锐博，广州)；RNA-easy 分离试剂 (R711-01，诺唯赞，南京)；HiScript III RT Super Mix for qPCR(+gDNA wiper) (R323-01，诺唯赞，南京)；Flash SYBR Green Master Mix，2× (TC015-A，源启生物，苏州)；DEPC 水 (DNase、RNase free) (R0022，碧云天，上海)；BCA 蛋白定量试剂盒 (E112-02，诺唯赞，南京)；P16 抗体 (ab108349，Abcam，英国)；P21 抗体 (2947T，Cell Signaling，美国)；LMNB1 抗体 (S0B0243，STARTER，杭州)；GAPDH 抗体 (A19056，爱博泰克，武汉)；辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) (A0208，碧云天，上海)；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(A0216，碧云天，上海)；QIAamp Viral RNA Mini Kit(Cat# 52904，QIAGEN，德国)；Human HERVK_7p22.1 provirus ancestral Env polyprotein(ERVK6) ELISA Kit(CSB-EL007812HU，CUSABIO，武汉)；ddPCR Supermix for probes(64463542，BIO-RAD，美国)。

(2) 实验仪器：生物安全柜 (Thermo Scientific，美国)；二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific，美国)；高速离心机 (Thermo Scientific，美国)；电动移液器 (Thermo Scientific，美国)；匀浆机 (净信，上海)；NanoDrop 分光光度计 (Thermo Scientific，美国)；QuantStudio™ 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher，美国)；化学发光成像系统 (天能，上海)；大型离心机 (BECKMAN COULTER，美国)；荧光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8 STED，德国)；QX200 Droplet Digital PCR 系统 (BIO-RAD，美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 临床级 BMSCs 的分离和培养 样本按年龄分为 4 组，胎儿组 (7 月龄，*n*=3)、年轻组 (< 30 岁，*n*=3)、中年组 (30−40 岁，*n*=3)、老年组 (> 50 岁，*n*=3)。采用密度梯度离心法分离人骨髓单核细胞，并通过差异附着特性纯化 BMSCs，将 BMSCs 接种在含体积分数 15% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中，每 3 d 更换 1 次培养基，当细胞融合度达到 80%−90% 时，细胞传代 [46]。

1.4.2 不同年龄段 BMSCs 的生物学性状鉴定

(1) 不同年龄段 BMSCs 形态：将第 6 代不同年龄段 BMSCs 以 1×10^5 个 / 孔密度培养在 6 孔板中，待细胞融合至 70%−80% 后，倒置显微镜观察拍照。

(2) 不同年龄段 BMSCs 的表面标志物鉴定：取第 6 代不同年龄段 BMSCs，加 Tryple 消化，用 DMEM 完全培养基终止消化，1 200 r/min 离心 5 min，弃掉上清，分别收集不同年龄段 BMSCs 各 2×10^5 个，加 100 μL PBS 与细胞混匀，室温条件下加抗体 CD14、CD19、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105、HLA-DR 混合，避光处理 30 min，加 PBS 清洗 2 次，向细胞中加 100 μL 缓冲液吹打均匀，通过 C6 流式仪器上机，将所得数据用软件 Flowjo 10 处理。

(3) 不同年龄段 BMSCs 衰老 β- 半乳糖苷酶染色：将第 6 代不同年龄段 BMSCs 以 2×10^5 个 / 孔密度接种在 6 孔板中，待细胞培养 24 h 贴壁，弃去细胞培养基，每孔加入 1 mL PBS 清洗 1 次，弃掉 PBS，每孔加 1 mL 染色固定液，室温静置 15 min，弃掉固定液，每孔加入 1 mL PBS 清洗 3 次，每次 3 min，去除 PBS，每孔加入 1 mL 染色工作液 (配染色工作液的相关试剂如**表 1** 所示)，37 ℃孵育过夜，将 6 孔板用封口膜包封，避免孔板中的液体蒸发，用倒置光学显微镜对孔板中的细胞进行观察并拍照，通过 Image J 软件对 β- 半乳糖苷酶染色阳性细胞数进行统计 [47-48]。

表 1 | 衰老 β- 半乳糖苷酶染色工作液
Table 1 | **Senescent β-galactosidase staining working solution**

试剂组分	用量
染色液 A	10 μL
染色液 B	10 μL
染色液 C	930 μL
5- 溴 -4- 氯 -3- 吲哚 -β-D- 半乳糖苷溶液	50 μL

(4)qPCR 检测不同年龄段 BMSCs 衰老指标 P16、P21、LMNB1 的表达：将第 6 代不同年龄段的 BMSCs 按照 6×10^5 个密度接种在 T75 培养瓶中，用含体积分数 15% 胎牛血清的低糖 DMEM 完全培养基培养，待细胞传代到第 7 代，融合度达到 80%–90% 时，加 Tryple 消化，用倒置相差显微镜观察细胞消化情况，加入 DMEM 完全培养基终止消化，1 200 r/min 离心 5 min，弃上清，向沉淀中加入 RNA-easy 试剂提取 RNA，用 NanoDrop 分光光度计检测提取的 RNA 浓度，用 HiScript Ⅲ RT Super Mix for qPCR(+gDNA wiper) 进行反转录，将其用 Flash SYBR Green Master Mix 进行混合，反应组分如**表 2** 所示，引物序列如**表 3** 所示，将引物序列提供给南京金斯瑞生物科技股份有限公司，由公司合成引物，扩增过程如**表 4** 所示，使用 qPCR 仪扩增，以 GAPDH 基因表达作为内参，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行统计。

表 2 | qPCR 反转录的反应组分
Table 2 | **Components of reaction for qPCR reverse transcription**

组分	体积
Flash SYBR Green Master Mix，2×	10 μL
cDNA	2 μL
正向引物 (2.5 μmol/L)	1 μL
反向引物 (2.5 μmol/L)	1 μL
RNase-free ddH_2O	to 20 μL

表 3 | 衰老相关基因的引物序列
Table 3 | **Primer sequences of aging related genes**

基因	引物序列 (5′–3′)
GAPDH[6]	F：TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT
	R：TTG CCA TGG GTG GAA TCA TA
P16[49]	F：GAT CCA GGT GGG TAG AAG GTC
	R：CCC CTG CAA ACT TCG TCC T
P21[49]	F：TGT CCG TCA GAA CCC ATG C
	R：AAA GTC GAA GTT CCA TCG CTC
LMNB1[49]	F：AAG CAT GAA ACG CGC TTG G
	R：AGT TTG GCA TGG TAA GTC TGC

表 4 | qPCR 扩增程序
Table 4 | **Procedures of amplification of qPCR**

阶段	温度	时间
预变性阶段	95 ℃	2 min
扩增反应阶段 ×45 个循环	95 ℃	10 s
	60 ℃	15 s
	72 ℃	20 s
熔解曲线阶段	95 ℃	15 s
	60 ℃	1 min
	95 ℃	15 s

(5) 免疫印迹法检测不同年龄段 BMSCs 衰老指标 P16、P21、LMNB1 的表达：收集第 6 代不同年龄段的 BMSCs，弃掉完全培养基，用预冷的 PBS 清洗 2 次，弃掉 PBS 后，加入 RIPA 裂解液，同时加入 1× 蛋白酶抑制剂及 1× 磷酸酶抑制剂，置于冰上裂解 30 min，期间将样本涡旋振荡 2 次，将裂解的细胞收至 1.5 mL EP 管中，12 000×*g*/min 离心 20 min，收集上清。用移液枪吸取 4 μL 上清，通过 BCA 法测量样本的蛋白含量，向其余上清中按比例添加 5×SDS 样品缓冲液，在 100 ℃金属浴中加热处理 10 min[50]。取 20 μg 样品用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白，使用湿转的转膜方法将蛋白转移至 PVDF 膜 (用甲醇活化 10 s) 上，室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h，PVDF 膜用封闭液配制的一抗 4 ℃孵育过夜 (P16 抗体稀释比例为 1 ： 2 000，P21 抗体稀释比例为 1 ： 1 000，LMNB1 抗体稀释比例为 1 ： 1 000，GAPDH 抗体稀释比例为 1 ： 300 000)，弃掉抗体，用 PBST 洗涤 4 次，每次 5 min，加入用 1% 脱脂牛奶配制的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h，二抗稀释比例均为 1 ： 1 000，弃掉抗体，用 PBST 洗涤 4 次，每次 5 min，使用 ECL 显影液通过天能曝光机成像分析系统分析蛋白表达。

(6)EdU 荧光成像法检测不同年龄段 BMSCs 的增殖能力：取第 6 代处于对数生长期的不同年龄段 BMSCs，以 4×10^3 个 / 孔密度接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，配制浓度为 50 μmol/L 含 EdU 的细胞培养基，取 100 μL 处理细胞 120 min 后，用 PBS 轻轻洗涤 2 次，再加 50 μL 固定液固定 30 min 左右，吸出固定液，再加等体积的 2 mg/mL 甘氨酸至孔板中，在摇床上室温放置 5 min，去除甘氨酸，加 PBS 洗 5 min，去除 PBS，再加 100 μL 渗透剂，放于摇床上 10 min，再次用 PBS 洗 5 min，加 100 μL Apollo® 溶液，在摇床上避光处理 30 min，用 100 μL 渗透剂洗 2 次，再先后用 100 μL 甲醇和 100 μL PBS 洗涤，每次 5 min，加 100 μL 1×Hoechst 33342 活细胞染色试剂，在摇床上处理 30 min，弃染色剂，用 100 μL PBS 洗 2 次，使用倒置荧光显微镜拍摄图片并用 Image J 软件统计结果 [51]。

1.4.3 不同年龄段 BMSCs 中 HERVK 含量检测 将第 6 代不同年龄段的 BMSCs 按照 6×10^5 个密度接种在 T75 培养瓶中，用含体积分数 15% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基培养，待细胞传代到第 7 代，融合度达到 80%–90% 时，加 Tryple 消化，用倒置相差显微镜观察细胞消化情况，加入 DMEM 完全培养基终止消化，1 200 r/min 离心 5 min，弃上清，向沉淀中加入 RNA-easy 试剂提取 RNA，胎儿皮肤组织和老年皮肤组织用全自动样品冷冻研磨仪匀浆后，加入 RNA-easy 试剂提取 RNA。用 NanoDrop 分光光度计检测提取的 RNA 浓度，用 HiScript Ⅲ RT Super Mix for qPCR (+gDNA wiper) 进行反转录，将其用 Flash SYBR Green Master Mix 进行混合，体系组分如表 2 所示，引物序列如**表 5** 所示，将引物序列提供给南京金斯瑞生物科技股份有限公司，由公司合成引物，扩增过程如

表 5 | 人内源性反转录病毒 K(HERVK) 的引物序列
Table 5 | Primer sequences of human endogenous retrovirus K (HERVK)

基因	序列 (5′–3′)
ACTB[6]	F：AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC
	R：AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
LTR_5Hs[6]	F：GGG CAG CAA TAC TGC TTT GT
	R：CAA TAG TGG GGA GAG GGT CA
HERVK-env[6]	F：TCG AAG CAT CAA AAG CCC
	R：GCA GAC TAA CAA CAG ACA AAA C
HERVK-gag[6]	F：AAA TAA GAC CCA ACC GCC AGT AGC
	R：GAA TTG CCA TGC CTC AGT ATC TCC
HERVK-pol[6]	F：GCC GAT GAA AAA GCC CGT AAG G
	R：TTG ACA CTC AGG ATT GGC GTT TTC
HERVK6[6]	F：GGA GAG AAG CTG TCC TGT GG
	R：TGA CTG GAC TTG CAC GTA GG

表 4 所示，使用 PCR 仪扩增，以 ACTB 基因的表达作为内参，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行统计。

1.4.4 不同年龄段 BMSCs 上清中 RVLPs 含量检测 第 6 代不同年龄段 BMSCs 融合度达到 80%–90% 时，换无血清 DMEM 培养基培养 48 h 后，收集不同年龄段 BMSCs 条件培养基各 10 mL，300×*g*/min 离心 10 min，将上清加载到 Amicon® Ultra 离心超滤管中，4 000×*g*/min 离心 20 min 浓缩上清。用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取上清中的病毒 RNA，向 560 μL AVL 缓冲液中加入 5.6 μL 载体 RNA，试管翻转 10 次，轻轻混合，制备成含有载体 RNA 的缓冲 AVL，取 560 μL 含有载体 RNA 的缓冲 AVL(AVL 是 QIAamp Viral RNA Mini Kit 病毒 RNA 试剂盒中提供的一种缓冲液) 放入 1.5 mL 离心管中，向离心管中加入 140 μL 浓缩后的上清样本，涡旋 15 s，在室温条件下静置 10 min，之后短暂离心，向样本中加入 560 μL 无水乙醇，涡旋 15 s 后，短暂离心。将溶液小心加载到 QIAamp Mini 色谱柱上 6 000×*g*/min 离心 1 min，将 QIAamp Mini 色谱柱放入干净的 2 mL 收集管中，丢弃含有滤液的管子，向 QIAamp Mini 色谱柱中加入 500 μL Buffer AW1，盖上盖子，6 000×*g*/min 离心 1 min，将 QIAamp Mini 色谱柱放入干净的 2 mL 收集管中。向 QIAamp Mini 色谱柱中加入 500 μL Buffer AW2，盖上盖子，20 000×*g*/min 离心 3 min，将 QIAamp Mini 色谱柱置于新的 2 mL 收集管中，20 000×*g*/min 离心 1 min，将 QIAamp Mini 色谱柱置于 1.5 mL RNase-free EP 管中，加入 60 μL AVE 缓冲液至室温平衡，盖上盖子，室温孵育 10 min，6 000×*g*/min 离心 1 min，用 NanoDrop 分光光度计检测提取的 RNA 浓度，用 HiScript III RT Super Mix for qPCR(+gDNA wiper) 进行反转录。用 qPCR 检测上清中 RVLPs 表达情况，引物如表 5 所示，反应程序如表 4 所示。接下来用更加灵敏的 QX200™ 微滴式数字 PCR 系统进行检测并分析，具体步骤如下：将 cDNA、引物、探针、ddPCR 预混液进行混合，体系组分如**表 6** 所示，引物和探针序列如**表 7** 所示，将引物和探针的序列提供给南京金斯瑞生物科技股份有限公司，由公司合成引物和探针，将 ddPCR 反应体系添加至微滴发生器芯片的小孔中，制备微滴。将微滴转移至 96 孔 PCR 反应板中并密封，进行微滴 PCR，ddPCR 反应程序如**表 8** 所示。PCR 反应后，将 96 孔 PCR 反应板转移至微滴分析仪上，分析每个样品的微滴的荧光信号，根据阴性微滴的比例，结合泊松分布原理，定量分析浓度 (copies/μL)。

表 6 | ddPCR 体系
Table 6 | ddPCR system

组分	体积
ddPCR Supermix for probes	10 μL
cDNA	2 μL
正向引物 (5 μmol/L)	1.8 μL
反向引物 (5 μmol/L)	1.8 μL
探针 –VIC(2.5 μmol/L)	0.6 μL
RNase-free ddH_2O	to 20 μL

表 7 | ddPCR 引物及探针序列
Table 7 | Primer and probe sequences for ddPCR

基因	引物和探针	序列 (5′–3′)
HERVK6	HERVK6-F	GGA GAG AAG CTG TCC TGT GG
	HERVK6-R	TGA CTG GAC TTG CAC GTA GG
VIC(2.5 μmol/L)	P1	AGC TAG GAG AGA AGC TGT CCT GTG GCG

表 8 | ddPCR 程序
Table 8 | Procedures for ddPCR

阶段	温度	时间
预变性阶段	95 ℃	10 min
扩增反应阶段 ×40 个循环	94 ℃	30 s
	60 ℃	1 min
后处理	98 ℃	10 min

1.4.5 不同年龄段 BMSCs 微环境中 HERVK 含量检测 取不同年龄段人骨髓血浆样本，300×*g*/min 离心 10 min，取上清液浓缩 10 倍，用 Human HERVK_7p22.1 provirus ancestral Env polyprotein(ERVK6) ELISA Kit 检测不同年龄段骨髓血浆中 HERVK6 蛋白水平，将不同年龄段骨髓血浆样本在 4 ℃条件下，3 000×*g*/min 离心 30 min，取上清，每孔加入 100 μL 标准品和样品，用胶条覆盖，在 37 ℃下孵育 2 h，弃去液体，每孔加入 100 μL 1× 生物素抗体，使用胶条封板，在 37 ℃恒温培养箱中孵育 1 h，吸出每孔中的液体，用 1× 洗涤液洗涤 3 次，每次洗涤后完全去除孔内液体，每孔加入 100 μL 1×HRP 亲和素，用干净的胶条封板，继续在 37 ℃的培养箱中孵育 1 h，弃去液体，向每孔加 1× 洗涤液清洗 5 次，之后每孔加入 90 μL TMB 底物，用胶条封板，避光处理，在 37 ℃培养箱里孵育 15 min，立即加入终止试剂，每孔 50 μL。使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

1.5 主要观察指标 ①不同年龄段 BMSCs 形态；②不同年龄段 BMSCs 表面标志物的表达；③不同年龄段 BMSCs 的衰老指标；④不同年龄段 BMSCs 中内源性反转录病毒含量；⑤不同年龄段 BMSCs 上清中 RVLPs 含量；⑥不同年龄段骨髓血浆样本中 RVLPs 含量。

1.6 统计学分析 所有数据均用 Graphpad Prism 9.0 统计，结果以 $\bar{x}\pm s$ 描述。通过单因素 ANOVA，将任意两组进行两两比较，并进行 Tukey 多重比较检验，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章中的统计学方法已经通过南京中医药大学鼓楼临床医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 不同年龄段 BMSCs 的形态 细胞接种在 6 孔板中，用完全培养基培养 24 h 后细胞贴壁生长，细胞呈梭形、平行或漩涡状排列。随着年龄的增长，细胞形态发生改变，衰老 BMSCs 的大小和粒度显著增加，细胞变得更加扁平，见**图 1**。

2.2 不同年龄段 BMSCs 的表面标志物 不同年龄段 BMSCs 表面标志物 CD73、CD90 和 CD105 呈阳性 (> 95%)，CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 呈阴性 (< 2%)，符合国际干细胞研究学会和国际细胞治疗协会定义的间充质干细胞的通用标准 [52-55]，且不同年龄段 BMSCs 具有相似的表面标志物，表明 BMSCs 增龄衰老不会影响其典型表面标志物的表达，见**图 2**。

2.3 老年供者来源 BMSCs 呈现显著的衰老表型 β− 半乳糖苷酶染色结果显示，不同年龄段 BMSCs 的 β− 半乳糖苷酶阳性率不同，随着供者年龄的增长，衰老 BMSCs 中 β− 半乳糖苷酶阳性率更高，表现出细胞衰老程度增加。此外，用 qPCR 检测不同年龄段 BMSCs 中典型衰老标志物 P16、P21[56]、LMNB1 mRNA 表达，结果显示，老年 BMSCs 中 P16、P21 mRNA 表达升高，核形态标志物 LMNB1 mRNA 表达下降，与衰老细胞的表型一致。为了进一步准确表征不同年龄段 BMSCs 的衰老程度，用免疫印迹法检测了不同年龄段 BMSCs 中 P16、P21、LMNB1 蛋白表达，结果显示，老年 BMSCs 中 P16、P21 蛋白表达升高，LMNB1 蛋白表达下降，与 qPCR 结果相一致。细胞增殖也是细胞衰老的一个重要指标，细胞以分裂的形式进行增殖，在细胞增殖过程中会发生 DNA 复制，EdU 与 DNA 结合，并传到复制的 DNA 中，可以通过检测 DNA 的合成情况，来判定细胞增殖情况 [57]。随着 BMSCs 的衰老，EdU 标记阳性细胞率显著降低，表明细胞增殖能力减弱。

以上结果表明，不同年龄段供者来源 BMSCs 的衰老表型有显著差异，来源于老年供者的 BMSCs 表现出更明显的衰老表型，见**图 3**。

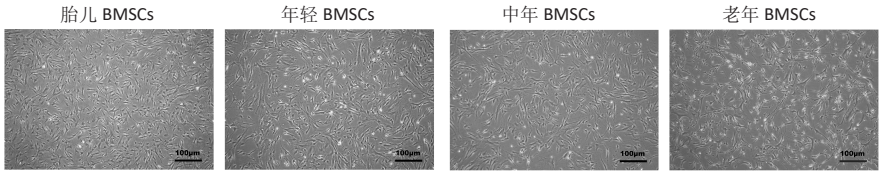
2.4 不同年龄段 BMSCs 中均存在 HERVK HERVK 是由编码基因 gag、pro、pol、env 和两端的重复序列 LTR 构成，能够被转录、翻译、包装为 RVLPs。为研究 BMSCs 的衰老是否与 HERVK 有关，使用 qPCR 检测不同年龄段 BMSCs 中 HERVK 含量，见**图 4**。结果显示，不同年龄段 BMSCs 中均检测到 HERVK，且 HERVK 编码基因 gag、pol、env 和末端重复序列 LTR 基因均无显著性差异。HERVK6 是一种内源性反转录病毒包膜蛋白，在感染早期介导受体识别和膜融合，用以检测 RVLPs 的形成。HERVK6 的 qPCR 结果显示，不同年龄段 BMSCs 中的 RVLPs 也没有显著差异。表明在不同年龄段 BMSCs 中存在 HERVK，随着细胞衰老，BMSCs 中的 HERVK 表达并未增加。

2.5 衰老 BMSCs 中 HERVK 未被激活 为了进一步研究 BMSCs 衰老表型是否由 HERVK 激活引起，首先通过 qPCR 法检测细胞培养上清样本 HERVK6 表达，以老年皮肤组织样本作为阳性对照，结果显示在老年皮肤组织样本中检测到 HERVK6，然而在细胞培养上清中未检测到此病毒颗粒，这可能是上清中的病毒颗粒含量低于普通 qPCR 仪的检测限，也可能是 BMSCs 中的 HERVK 未被激活释放。为了能更准确地研究上清样本中的病毒含量，使用了灵敏度更高的液滴式数字 PCR (ddPCR)，相较于 qPCR 能实现绝对定量、精准定量和高度重复，且不易受扩增效率的影响。ddPCR 结果显示不同年龄段供者来源 BMSCs 培养上清中 HERVK6 含量极低，几乎没有，并且随着 BMSCs 的衰老，上清中 HERVK6 含量未明显升高，不与衰老呈相关性，见**图 5**。结果表明，在年轻和老年 BMSCs 中 HERVK 均未被异常激活。ddPCR 系统检测到的微量拷贝数的病毒颗粒可能是由于细胞破裂或者细胞凋亡后释放到上清中，而并不是 HERVK 被激活的信号。

2.6 不同年龄段骨髓微环境中 HERVK6 的检测 为了进一步验证 ddPCR 结果的可信度，对不同年龄段骨髓微环境中的 HERVK6 含量进行检测，收集了不同年龄段人骨髓血浆样本，通过 ELISA 试剂盒检测不同年龄段人骨髓血浆样本中 HERVK6 的表达，血浆样本信息如**表 9** 所示。不同年龄段骨髓血浆样本中 HERVK6 未明显增加，见**图 6**。在不同年龄段骨髓微环境中 HERVK 的表达与年龄没有呈现出显著的相关性，进一步验证了随着 BMSCs 的衰老，HERVK 未被异常激活释放 RVLPs 到细胞外，表明在正常生理衰老条件下，BMSCs 的衰老并非由 HERVK 的激活引起。

3 讨论 Discussion

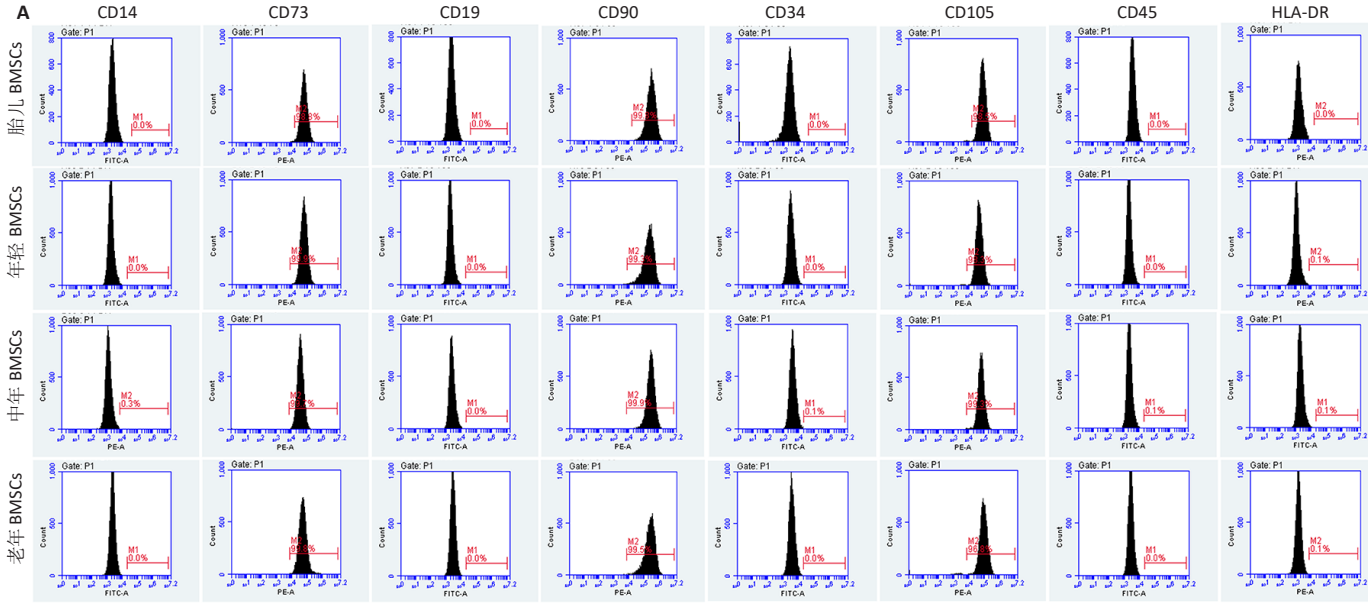
干细胞的衰老与耗竭不仅会导致机体衰老，而且还限制了其临床应用 [58-59]，如何能有效缓解干细胞衰老问题是现阶段的一大热点。该研究主要探讨了人 BMSCs 的增龄衰老

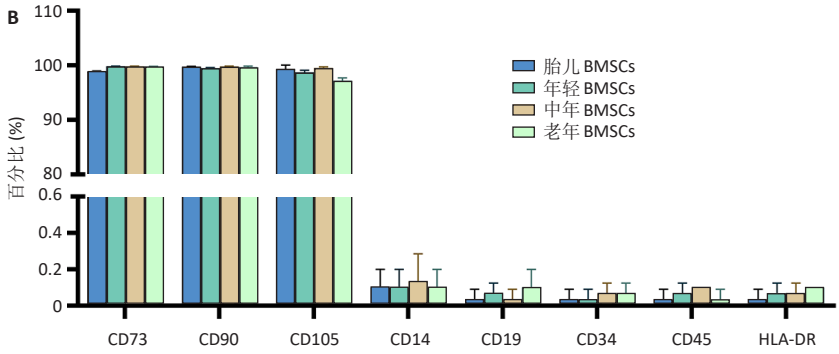


图注：不同年龄段 BMSCs 均呈纤维形态，衰老 BMSCs 形态更大更扁平且增殖减慢（标尺为 100 μm）。BMSCs：骨髓间充质干细胞。

图 1 | 不同年龄段人 BMSCs 的形态

Figure 1 | Morphology of human bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages





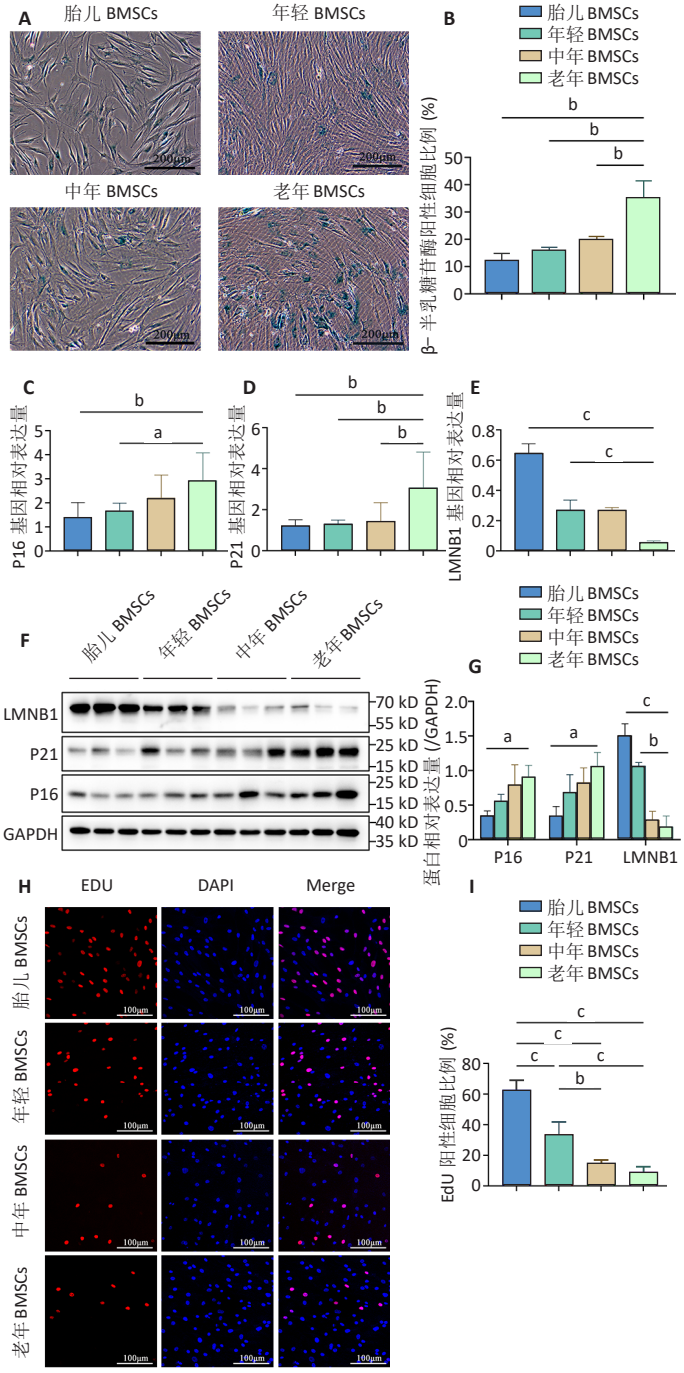
图注：图 A 为 Flowjo10 软件分析不同年龄段 BMSCs 表面标志物的流式图；B 为流式检测不同年龄段人 BMSCs 的表面标志物表达水平，CD73、CD90 和 CD105 表达较高；而 CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 表达极低。BMSCs：骨髓间充质干细胞。

图 2 | 不同年龄段人 BMSCs 表面标志物的检测

Figure 2 | Surface markers detection of human bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages

和内源性反转录病毒之间的联系，旨在发现一种新的有效延缓 BMSCs 衰老的方法。采用流式细胞术、β- 半乳糖苷酶染色、qPCR、免疫印迹法及 EdU 荧光成像法检测结果显示，随着供者年龄的增加，BMSCs 展现出增龄衰老表型，主要表现在衰老 BMSCs 的细胞形态变大变扁平、衰老阳性细胞增多、衰老标志物 P16 和 P21 表达增加、核形态标志物 LMNB1 表达减少以及细胞增殖能力随之下降。此外，研究了胎儿、年轻、中年和老年供者来源 BMSCs 中 HERVK 含量，并通过灵敏度较高的 ddPCR 技术检测了细胞培养上清中 HERVK6 含量，来研究 HERVK 是否在 BMSCs 衰老过程中被异常激活，探讨 HERVK 激活是否为 BMSCs 衰老的驱动因素，结果显示，不同年龄段 BMSCs 中均存在 HERVK，且随着供者年龄的增加，BMSCs 中的 HERVK 含量无显著差异；此外，在不同年龄段 BMSCs 培养上清中并未检测出 HERVK6，表明 HERVK 在不同年龄段 BMSCs 中均未被异常激活。之后，为了再次验证不同年龄段 BMSCs 中 HERVK 不被异常激活，收集了来自不同年龄段人骨髓血浆样本，通过 ELISA 检测血浆样本中 HERVK6 含量无显著性差异。以上结果表明，在正常生理条件下，BMSCs 具有增龄衰老特征，且随着供者年龄的增加，BMSCs 的增龄衰老不是通过内源性反转录病毒来介导。

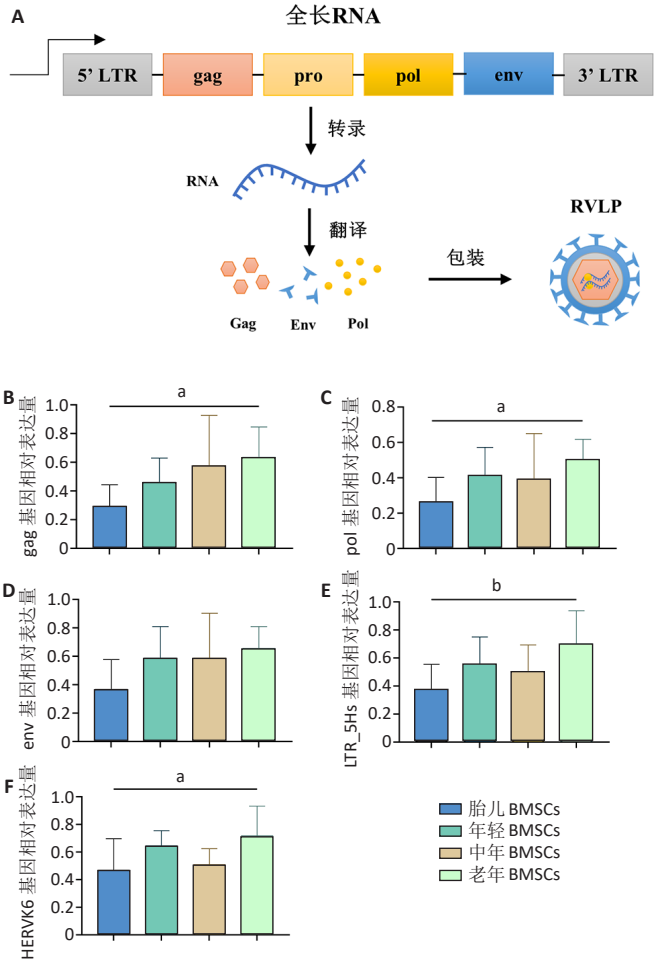
干细胞与机体的衰老密不可分，干细胞老化与耗尽不仅会造成衰老迹象，还会引发一系列的衰老并发症[23]。此外，衰老的干细胞对疾病的疗效也大幅下降[37-38]。已有研究证明相较于年轻供者的 BMSCs，来自老年供者的 BMSCs 呈现出更明显的衰老表型，如增殖分化能力减弱、细胞活力降低、衰老相关 β- 半乳糖苷酶阳性率升高等[60-62]。如何应对 BMSCs 衰老是现阶段迫切需要解决的一大问题。内源性反转录病毒是存在于人类基因中的一种古早的病毒，并在人类进



图注：图 A 为 β- 半乳糖苷酶染色结果，衰老的细胞被染成蓝色 (标尺为 200 μm)；B 为 β- 半乳糖苷酶染色结果统计图；C–E 为 qPCR 检测不同年龄段 BMSCs 中衰老标志物 P16、P21 mRNA 表达和核形态标志物 LMNB1 mRNA 表达；F 为免疫印迹法检测不同年龄段 BMSCs 中衰老标志物 P16、P21、LMNB1 蛋白表达；G 为免疫印迹结果统计图；H 为 EdU 荧光成像法检测不同年龄段 BMSCs 增殖情况 (标尺为 100 μm)；I 为 EdU 染色结果统计图。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$。BMSCs：骨髓间充质干细胞。

图 3 | 不同年龄段人 BMSCs 的衰老表征

Figure 3 | Aging characterization of human bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages

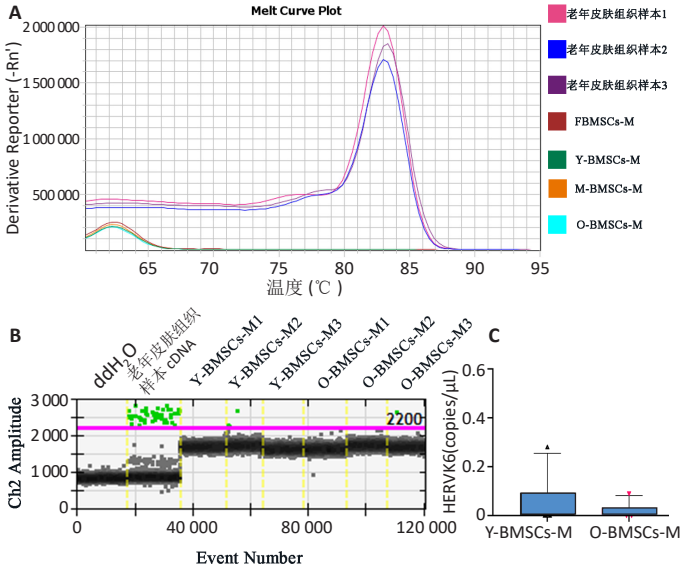


图注：图 A 为 HERVK 的结构及激活后形成 RVLPs 示意图，HERVK 维持开放的阅读框，编码病毒颗粒形成所需的蛋白质，包括 gag、pro、pol、env，两端是相同的 LTRs，gag 编码参与病毒 RNA 封装和颗粒形成的核心结构蛋白，pol 编码病毒酶，env 编码病毒包膜糖蛋白，HERVK 被异常激活后能够解锁转录病毒基因并产生 RVLPs；B–D 为不同年龄段 BMSCs 中 gag、pol、env mRNA 表达；E，F 为不同年龄段 BMSCs 中 LTR_5Hs、HERVK6 mRNA 表达。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$。HERVK：人内源性反转录病毒 K；RVLPs：反转录病毒样颗粒；BMSCs：骨髓间充质干细胞。

图 4 | 不同年龄段人 BMSCs 中 HERVK 含量

Figure 4 | Content of HERVK in human bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages

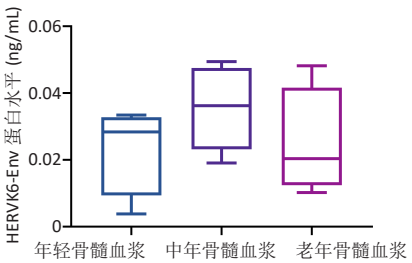
化过程中发生突变或缺失，潜伏在基因组中 [63]。已有很多研究证明了一些衰老相关疾病与内源性反转录病毒在体内被异常激活相关联，如肌萎缩侧索硬化症 [64]、阿尔茨海默病 [65]、衰老引起的骨关节炎等 [66]。最近有研究发现内源性反转录病毒在衰老中的作用机制，并阐述了内源性反转录病毒在人类健康中的作用 [67]。研究报道，在病理性衰老模型 Hutchinson-Gilford 综合征和 Werner 综合征以及生理性衰老食蟹猴中检测到内源性反转录病毒的高表达，主要体现在肝、肺及皮肤组织中 [6]。此外，随着人间充质前体细胞发生衰老，一些内源性反转录病毒的亚家族被激活，研究表明这些被激活的病毒会导致衰老，并且衰老的细胞会传染年轻的细胞发生衰老；另外，他们还提出干预病毒复活和传染年轻细胞衰老的措施，以实现延缓衰老 [6]。然而 BMSCs 的衰老是否与 HERVK 的激活相关，尚未有报道指出。因此，课题组针对于这一科学问题进行了一系列的研究，发现 HERVK 在 BMSCs 正常生理性衰老



图注：图 A 为使用 qPCR 法检测 3 例老年皮肤组织样本及不同年龄段 BMSCs 上清中 HERVK6 含量所得到的熔解曲线，结果显示在老年皮肤组织样本中检测到 HERVK6，但在细胞上清中检测不到，说明上清中的 HERVK6 极少；B 为 ddPCR 法检测不同年龄段 BMSCs 上清中 HERVK6 含量，从左到右依次为阴性对照 (ddH$_2$O)、阳性对照 (老年皮肤组织样本 cDNA)、Y-BMSCs-M(*n*=3)、O-BMSCs-M(*n*=3)，基线上方表示检测出的阳性点，年轻和老年 BMSCs 上清中的阳性点极少；C 为 ddPCR 检测结果的统计分析图，年轻和衰老 BMSCs 上清中的 HERVK6 含量极低，几乎没有，且与细胞衰老不呈现明显相关性。HERVK：人内源性反转录病毒 K；ddPCR：微滴式数字 PCR；FBMSCs-M：胎儿骨髓间充质干细胞上清；Y-BMSCs-M：年轻骨髓间充质干细胞上清；M-BMSCs-M：中年骨髓间充质干细胞上清；O-BMSCs-M：老年骨髓间充质干细胞上清。

图 5 | 不同年龄段人骨髓间充质干细胞培养上清中 HERVK6 含量

Figure 5 | Content of HERVK6 in the supernatant of human bone marrow mesenchymal stromal cells at different ages



图注：收集年轻、中年、老年 3 个不同年龄段的骨髓血浆样本，用 ELISA 检测不同年龄段骨髓血浆样本中 HERVK6 含量。HERVK：人内源性反转录病毒 K。

图 6 | 不同年龄段骨髓血浆中 HERVK6 含量

Figure 6 | HERVK6 content in bone marrow plasma at different ages

过程中并未被异常激活，证明了人 BMSCs 的增龄衰老不依赖于内源性反转录病毒来介导。

机体的衰老是一个复杂的过程，引起机体衰老的机制包括基因组不稳定、端粒缩短、表观遗传的改变、蛋白质的稳定失衡、失去巨噬功能、营养感应平衡打破、线粒体的功能失调、细胞发生衰老、干细胞耗竭、细胞通讯与信号传导改变、慢性炎症和生态失衡等 [5, 8, 68]。其中，干细胞对机体的组织稳态有着至关重要的作用，干细胞的衰老与耗竭可能是组织衰老的“罪魁祸首”之一。未来或许可能通过延缓或逆转干细胞的衰老表型，使“返老还童”成为一种可能。已有一些文献报道干细胞衰老机制包括端粒缩短 [69]、DNA 损伤 [70]、线粒体功能障碍 [71-72]、表观遗传学改变 [7, 73]、蛋白质稳态失衡等 [74]。目前，一些药物如姜黄素 [75]、白藜芦醇 [76]、人参皂苷 [77]、左归丸等被报道可以延缓 BMSCs 衰老 [78]。此外，一些生长因子 [79]、自噬 [40, 75]、基因修饰等手段也已被证实对抵抗 BMSCs 衰老发挥作用 [41]。尽管这些方法能不同程度地改善 BMSCs 衰老表型，但是距离大幅延缓增龄的时间及攻克衰老相关疾病还有很长的路要走，仍需进一步破解干细胞衰老的机制、开发出更加可行且优效的对抗干细胞衰老的策略。该研究主要探究了与机体衰老相关的 HERVK 是否在人 BMSCs 增龄衰老中发挥驱动作用，致力于为延缓甚至逆转 BMSCs 增龄衰老提供新思路。该研究表明，人 BMSCs 的增龄衰老可能并非由沉默的 HERVK 的异常激活引起，或许在人 BMSCs 中存在着更加复杂的促进衰老机制，仍有待进一步解析。

该研究结果表明，人 BMSCs 增龄衰老过程中内源性反转录病毒未被异常激活，这与已报道的病理性早衰模型 Hutchinson-Gilford 综合征和 Werner 综合征中分离的人间充质前体细胞衰老是由内源性反转录病毒复活介导的结果不一致 [6]，可能与多种因素有关，如供者来源、细胞类型等。文献中检测的衰老人间充质前体细胞是从病理性的早衰模型中分离获得，而该研究的衰老 BMSCs 是从正常生理性衰老供者中分离获得，两者来源不同，从病理性早衰模型中分离获得的人间充质前体细胞中内源性反转录病毒高度表达可能与早衰疾病有很大关联，在早衰模型中可能会导致细胞中内源性反转录病毒被异常激活，而在正常生理性衰老人群中细胞内的内源性反转录病毒可能仍保持沉默状态。此外，内源性反转录病毒在不同细胞类型中的活跃程度也不同，如内源性反转录病毒在人类胚胎干细胞的染色质中比在体细胞中更为活跃 [80]，内源性反转录病毒在人 BMSCs 中可能活跃程度较低，

表 9 | 骨髓血浆样本信息

Table 9 | Information of bone marrow plasma samples

样本编号	骨髓血浆样本	性别	年龄 (岁)
1	年轻组	女	23
2	年轻组	女	28
3	年轻组	女	20
4	年轻组	女	21
5	年轻组	男	30
6	中年组	女	39
7	中年组	女	39
8	中年组	女	45
9	中年组	男	40
10	中年组	男	37
11	中年组	男	41
12	中年组	男	44
13	中年组	男	41
14	中年组	男	41
15	老年组	男	50
16	老年组	男	57
17	老年组	女	51
18	老年组	女	81

不易被激活。

该研究证明了人 BMSCs 具有增龄衰老表型，并初步证明老年供者来源 BMSCs 的衰老不依赖于内源性反转录病毒的异常激活。该研究还存在一定的局限性：在研究过程中没有找到导致人 BMSCs 增龄衰老的原因，未阐明其衰老机制。在今后的实验中还应对 BMSCs 的增龄衰老机制进行进一步探索和研究。此外，由于人 BMSCs 样本获得比较困难，文中检测的细胞样本量有限，不同供者来源 BMSCs 具有异质性，该研究结果证明了不同年龄段 BMSCs 具有显著的衰老表型，但在检测细胞中内源性反转录病毒含量时，如果有更多样本可能会使结论更加有说服力。因此，在之后的研究中还应继续扩大样本量，来进一步验证实验结论。

综上所述，在正常生理条件下，BMSCs 的增龄衰老不是由 HERVK 被异常激活驱动的，在以后的研究工作中还应进一步探索引起 BMSCs 增龄衰老剧增的新机制，有针对性地寻找延缓甚至逆转 BMSCs 衰老的方法，为研究干细胞衰老机制提供新思路，也为干细胞的基础研究和转化打下坚实的基础。

致谢：感谢南京鼓楼医院干细胞研究室提供科研场所。

作者贡献：实验设计和论文撰写为第一作者，实验实施为全部作者，评估及审批为通讯作者。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] BLACKBURN EH, EPEL ES, LIN J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. Science (New York, NY). 2015;350(6265):1193-1198.
[2] BARTEK J, FALCK J, LUKAS J. CHK2 kinase--a busy messenger. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(12):877-886.
[3] HERNANDEZ-SEGURA A, NEHME J, DEMARIA M. Hallmarks of Cellular Senescence. Trends Cell Biol. 2018;28(6):436-453.
[4] VASILEIOU PVS, EVANGELOU K, VLASIS K, et al. Mitochondrial Homeostasis and Cellular Senescence. Cells. 2019;8(7):686.
[5] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging. Cell. 2013;153(6):1194-1217.
[6] LIU X, LIU Z, WU Z, et al. Resurrection of endogenous retroviruses during aging reinforces senescence. Cell. 2023;186(2):287-304.e26.
[7] YANG JH, HAYANO M, GRIFFIN PT, et al. Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. Cell. 2023;186(2):305-326.e27.
[8] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO MA, PARTRIDGE L, et al. Hallmarks of aging: An expanding universe. Cell. 2023;186(2):243-278.
[9] ÁLVAREZ-SATTA M, BERNA-ERRO A, CARRASCO-GARCIA E, et al. Relevance of oxidative stress and inflammation in frailty based on human studies and mouse models. Aging (Albany NY). 2020;12(10):9982-9999.
[10] MOUSTOGIANNIS A, PHILIPPOU A, TASO O, et al. The Effects of Muscle Cell Aging on Myogenesis. Int J Mol Sci. 2021;22(7):3721.
[11] LI CJ, XIAO Y, SUN YC, et al. Senescent immune cells release grancalcin to promote skeletal aging. Cell Metab. 2021;33(10):1957-1973.e6.
[12] PALMER AK, GUSTAFSON B, KIRKLAND JL, et al. Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. Diabetologia. 2019;62(10):1835-1841.
[13] ACHA B, CORROZA J, SÁNCHEZ-RUIZ DE GORDOA J, et al. Association of Blood-Based DNA Methylation Markers With Late-Onset Alzheimer Disease: A Potential Diagnostic Approach. Neurology. 2023;101(23):e2434-e2447.
[14] KIP E, PARR-BROWNLIE LC. Reducing neuroinflammation via therapeutic compounds and lifestyle to prevent or delay progression of Parkinson's disease. Ageing Res Rev. 2022;78:101618.
[15] KRITSILIS M, V RIZOU S, KOUTSOUDAKI PN, et al. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. Int J Mol Sci. 2018;19(10):2937.
[16] CHEN MS, LEE RT, GARBERN JC. Senescence mechanisms and targets in the heart. Cardiovasc Res. 2022;118(5):1173-1187.
[17] PILLERON S, SOTO-PEREZ-DE-CELIS E, VIGNAT J, et al. Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050. Int J Cancer. 2021;148(3):601-608.
[18] GUO J, HUANG X, DOU L, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):391.
[19] REVUELTA M, MATHEU A. Autophagy in stem cell aging. Aging Cell. 2017;16(5):912-915.
[20] REN R, OCAMPO A, LIU GH, et al. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. Cell Metab. 2017;26(3):460-474.
[21] DENG P, YUAN Q, CHENG Y, et al. Loss of KDM4B exacerbates bone-fat imbalance and mesenchymal stromal cell exhaustion in skeletal aging. Cell Stem Cell. 2021;28(6):1057-1073.e7.
[22] LI X, LUO X, HE Y, et al. Micronano Titanium Accelerates Mesenchymal Stem Cells Aging through the Activation of Senescence-Associated Secretory Phenotype. ACS Nano. 2023;17(22):22885-22900.
[23] GOODELL MA, RANDO TA. Stem cells and healthy aging. Science. 2015;350(6265):1199-1204.
[24] WANG Y, GAO T, WANG B. Application of mesenchymal stem cells for anti-senescence and clinical challenges. Stem Cell Res Ther. 2023;14(1):260.
[25] LI H, DAI H, LI J. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal/stem cells: The link with metabolism. J Adv Res. 2023;45:15-29.
[26] 张宇宁 .HK1 通过与 TERT 结合抑制端粒酶活性调控肺腺癌细胞细胞衰老 [D]. 长春 : 吉林大学 ,2023.
[27] VOLKOVA MV, SHEN N, POLYANSKAYA A, et al. Tissue-Oxygen-Adaptation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhances Their Immunomodulatory and Pro-Angiogenic Capacity, Resulting in Accelerated Healing of Chemical Burns. Int J Mol Sci. 2023;24(4):4102.
[28] WANG Y, LI W, GUO Y, et al. Mitochondria Transplantation to Bone Marrow Stromal Cells Promotes Angiogenesis During Bone Repair. Adv Sci (Weinh). 2024;11(39):e2403201.
[29] POUREBRAHIM R, HEINZ MONTOYA R, ALANIZ Z, et al. Mdm2/p53 levels in bone marrow mesenchymal stromal cells are essential for maintaining the hematopoietic niche in response to DNA damage. Cell Death Dis. 2023;14(6):371.
[30] WEI FL, ZHAI Y, WANG TF, et al. Stem cell-homing biomimetic hydrogel promotes the repair of osteoporotic bone defects through osteogenic and angiogenic coupling. Sci Adv. 2024;10(44):eadq6700.
[31] BAI B, LIU Y, HUANG J, et al. Tolerant and Rapid Endochondral Bone Regeneration Using Framework-Enhanced 3D Biomineralized Matrix Hydrogels. Adv Sci (Weinh). 2024;11(9):e2305580.
[32] LI DX, MA Z, SZOJKA AR, et al. Non-hypertrophic chondrogenesis of mesenchymal stem cells through mechano-hypoxia programing. J Tissue Eng. 2023;14:20417314231172574.

[33] PACKHAM DK, FRASER IR, KERR PG, et al. Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells (MPC) in Diabetic Nephropathy: A Randomized, Placebo-controlled, Dose Escalation Study. EBioMedicine. 2016;12:263-269.
[34] VENKATARAMANA NK, KUMAR SK, BALARAJU S, et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. Transl Res. 2010;155(2):62-70.
[35] GRAJEK S, POPIEL M, GIL L, et al. Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: Impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. Eur Heart J. 2010;31(6):691-702.
[36] SYKOVÁ E, RYCHMACH P, DRAHORÁDOVÁ I, et al. Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. Cell Transplant. 2017;26(4):647-658.
[37] SHEN J, TSAI YT, DIMARCO NM, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice. Sci Rep. 2011;1:67.
[38] FREIJE JM, LÓPEZ-OTÍN C. Reprogramming aging and progeria. Curr Opin Cell Biol. 2012;24(6):757-764.
[39] MANI C, REDDY PH, PALLE K. DNA repair fidelity in stem cell maintenance, health, and disease. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020;1866(4):165444.
[40] BAI L, LIU Y, ZHANG X, et al. Osteoporosis remission via an anti-inflammaging effect by icariin activated autophagy. Biomaterials. 2023;297:122125.
[41] SU X, ZHANG H, LEI F, et al. Epigenetic therapy attenuates oxidative stress in BMSCs during ageing. J Cell Mol Med. 2022;26(2):375-384.
[42] MATTEUCCI C, BALESTRIERI E, ARGAW-DENBOBA A, et al. Human endogenous retroviruses role in cancer cell stemness. Semin Cancer Biol. 2018;53:17-30.
[43] KONG X, LI R, CHEN M, et al. Endogenous retrovirus HERVH-derived lncRNA UCA1 controls human trophoblast development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2024;121(12):e2318176121.
[44] KREBS AS, LIU HF, ZHOU Y, et al. Molecular architecture and conservation of an immature human endogenous retrovirus. Nat Commun. 2023;14(1):5149.
[45] DOPKINS N, NIXON DF. Activation of human endogenous retroviruses and its physiological consequences. Nat Rev Mol Cell Biol. 2024;25(3):212-222.
[46] HU M, XING L, ZHANG L, et al. NAP1L2 drives mesenchymal stem cell senescence and suppresses osteogenic differentiation. Aging Cell. 2022;21(2):e13551.
[47] 袁雅红 , 赵珊珊 , 王小莉 , 等 .HIV P55-gag 蛋白促进骨髓间充质干细胞的老化 [J]. 生物医学工程研究 ,2017,36(1):52-56+61.
[48] 王龙 , 蒋航 , 陈图南 , 等 .TAS102 选择性抑制 ATRX 缺失胶质瘤细胞的实验研究 [J]. 第三军医大学学报 ,2019,41(24):2393-2400.
[49] XIAO X, XU M, YU H, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):354.
[50] 张晓雯 , 徐康彦 , 王帮华 , 等 . 蝙蝠葛碱对恶性胶质瘤 U87 细胞的抑制及分子机制研究 [J]. 湖北科技学院学报 (医学版),2022,36(6):476-480.
[51] 吴美燕 .FOXK1 与 FHL2 在大肠癌的增殖、EMT、侵袭和转移中的相互作用 [D]. 广州 : 南方医科大学 ,2017.
[52] IVANOVSKI S, HAN P, PETERS OA, et al. The Therapeutic Use of Dental Mesenchymal Stem Cells in Human Clinical Trials. J Dent Res. 2024;103(12):1173-1184.
[53] 冯乙芮 , 高天芸 , 王亚萍 , 等 . 白细胞介素 10 工程化修饰人脐带间充质干细胞优效治疗炎症性肠病 [J]. 中国组织工程研究 ,2025,29(23):4878-4887.
[54] 王慧慧 , 吴情 , 赵玉梅 . 基于 RNA 测序的 SHED 体外连续扩增后差异表达基因的研究 [J]. 口腔颌面外科杂志 ,2023,33(4):211-218.
[55] 王留娣 , 刘威 , 谢园园 , 等 . 三种人胎盘组织来源间充质干细胞的生物学特性 [J]. 中国组织工程研究 ,2019,23(9):1377-1383.
[56] STOLZING A, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. Mech Ageing Dev. 2008;129(3):163-173.
[57] 纪佳男 . 抑制抗氧化通路与 ATR 抑制剂在癌细胞中的协同致死作用及其机理研究 [D]. 长春 : 吉林大学 ,2022.
[58] LIU F, YUAN Y, BAI L, et al. LRRc17 controls BMSC senescence via mitophagy and inhibits the therapeutic effect of BMSCs on ovariectomy-induced bone loss. Redox Biol. 2021;43:101963.
[59] YANG Q, ZOU Y, WEI X, et al. PTP1B knockdown alleviates BMSCs senescence via activating AMPK-mediated mitophagy and promotes osteogenesis in senile osteoporosis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2023;1869(7):166795.
[60] LI G, ZHU Q, WANG B, et al. Rejuvenation of Senescent Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells by Pulsed Triboelectric Stimulation. Adv Sci (Weinh). 2021;8(18):e2100964.
[61] ZHOU S, GREENBERGER JS, EPPERLY MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. Aging Cell. 2008;7(3):335-343.
[62] MADSEN SD, RUSSELL KC, TUCKER HA, et al. Decoy TRAIL receptor CD264: a cell surface marker of cellular aging for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):201.
[63] 武泽明 , 刘晓倩 , 刘光慧 . 内源性逆转录病毒复活作为衰老的新型生物标志物和驱动力 [J]. 科学通报 ,2024,69(Z2):4163-4165.
[64] GARCIA-MONTOJO M, FATHI S, NORATO G, et al. Inhibition of HERV-K (HML-2) in amyotrophic lateral sclerosis patients on antiretroviral therapy. J Neurol Sci. 2021;423:117358.
[65] DEMBNY P, NEWMAN AG, SINGH M, et al. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) RNA causes neurodegeneration through Toll-like receptors. JCI Insight. 2020;5(7):e131093.
[66] EHLHARDT S, SEIFERT M, SCHNEIDER J, et al. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) Rec expression and transcriptional activities in normal and rheumatoid arthritis synovia. J Rheumatol. 2006;33(1):16-23.
[67] 张保虎 , 刘晓倩 , 武泽明 , 等 . 内源性逆转录病毒在人类健康及衰老中的作用和机制研究 [J]. 中国基础科学 ,2024,26(1):14-21.
[68] 曾晨叶 , 花瑞 , 王钊 . 衰老细胞清除策略与 CAR 细胞疗法在抗衰老治疗中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 ,2024,40(9):1197-1204.
[69] LI C, WEI GJ, XU L, et al. The involvement of senescence induced by the telomere shortness in the decline of osteogenic differentiation in BMSCs. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017;21(5):1117-1124.
[70] BANIMOHAMAD-SHOTORBANI B, KAHROBA H, SADEGHZADEH H, et al. DNA damage repair response in mesenchymal stromal cells: From cellular senescence and aging to apoptosis and differentiation ability. Ageing Res Rev. 2020;62:101125.
[71] XU Y, CHANG L, CHEN Y, et al. USP26 Combats Age-Related Declines in Self-Renewal and Multipotent Differentiation of BMSC by Maintaining Mitochondrial Homeostasis. Adv Sci (Weinh). 2024;11(44):e2406428.
[72] ZHANG H, XU R, LI B, et al. LncRNA NEAT1 controls the lineage fates of BMSCs during skeletal aging by impairing mitochondrial function and pluripotency maintenance. Cell Death Differ. 2022;29(2):351-365.
[73] ZHAO Y, HE J, QIU T, et al. Epigenetic therapy targeting bone marrow mesenchymal stem cells for age-related bone diseases. Stem Cell Res Ther. 2022;13(1):201.
[74] BRUNET A, GOODELL MA, RANDO TA. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches. Nat Rev Mol Cell Biol. 2023;24(1):45-62.
[75] DENG J, OUYANG P, LI W, et al. Curcumin Alleviates the Senescence of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during In Vitro Expansion by Activating the Autophagy Pathway. Int J Mol Sci. 2021;22(21):11356.
[76] ZHANG D, LIN J, WANG Y, et al. Effects of resveratrol on aging of mesenchymal stem cells and its mechanism. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2019;48(6):617-624.
[77] 汪子铃 . 人参皂苷 Rg1 调控 Keap1-NRF2-ARE 通路延缓骨髓间充质干细胞衰老的机制研究 [D]. 重庆 : 重庆医科大学 ,2021.
[78] KANG X, CHEN L, YANG S, et al. Zuogui Wan slowed senescence of bone marrow mesenchymal stem cells by suppressing Wnt/β-catenin signaling. J Ethnopharmacol. 2022;294:115323.
[79] 施伟丽 , 刘珊珊 , 常红波 , 等 . 血管内皮生长因子联合碱性成纤维细胞生长因子改善骨髓间充质干细胞复制性衰老 [J]. 中国组织工程研究 , 2024,28(31):4958-4963.
[80] 张天喆 . 人多能性干细胞中内源性逆转录病毒元件调控宿主基因表达的研究 [D]. 武汉 : 武汉大学 ,2023.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)