DOI:10.16016/j.2097-0927.202310032

# 不同年龄小鼠骨来源间充质干细胞衰老相关特性与成骨分化能力的比较研究

李 媛,钟海英,董世访,黄 璐,刘潇淇,廖雨滋,易 勤,赵 丽,杨 珂,李娅莎 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室

[**摘要**] **目的** 探索不同年龄组小鼠骨来源的间充质干细胞(bone derived mesenchymal stem cells, BMSCs)衰老相关的生物学特性及骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2,BMP2)诱导成骨分化能力的改变。**方法** 将8只C57BL/6J小鼠分为青年组(4周龄,体质量约为10~15 g, $n=4$)和老年组(12月龄,体质量约为20 g~25 g,$n=4$),每组雌雄各半。分别从2组小鼠的整骨中提取间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),通过流式细胞术鉴定2组BMSCs的表面标志物,通过β-半乳糖苷酶染色比较2组BMSCs的衰老程度,通过MTT和EdU掺入实验比较2组BMSCs的增殖及自我更新能力。通过Western blot分析2组BMSCs中周期蛋白CyclinD1、P21的表达情况。采用ALP染色和茜素红S染色及RT-qPCR评估2组BMSCs的体外成骨分化能力,使用RNA-seq分析比较2组BMSCs经BMP2诱导后的差异基因表达,并用流式分析验证测序结果。**结果** 流式细胞术分析结果显示,分离培养的小鼠BMSCs符合间充质干细胞判定标准。β-半乳糖苷酶染色结果显示,老年组BMSCs的衰老水平显著高于青年组($P<0.05$)。而MTT和EdU掺入实验结果表明,老年组BMSCs的细胞活力和增殖能力显著低于青年组($P<0.05$)。Western blot结果显示,与青年组比较,老年组BMSCs的细胞周期蛋白CyclinD1表达水平较低,而细胞周期阻抑因子P21蛋白表达水平显著增高($P<0.05$)。ALP染色和茜素红S染色及RT-qPCR检测结果显示,BMP2诱导后青年组BMSCs的成骨分化能力显著高于老年组($P<0.05$)。RNA-seq结果显示,BMP2诱导后,整合素αV重组蛋白(cluster of differentiation 51,CD51)在青年组和老年组中的表达趋势相反。而流式细胞术分析结果显示,青年组$CD51^+$细胞在$CD45^-$细胞中占比明显高于老年组($P<0.01$)。**结论** 老年组BMSCs中$CD51^+$细胞在$CD45^-$细胞中占比下降与$CD51^+$细胞对BMP2的成骨诱导响应性下降密切相关。

[**关键词**] 骨来源间充质干细胞;骨形态发生蛋白2;成骨分化;衰老;整合素αV重组蛋白
[**中图法分类号**] R322.71; R329.25; R339.38 [**文献标志码**] A

# Comparison on senescence-related properties and osteogenic differentiation capacity of bone-derived mesenchymal stem cells from mice in different ages

LI Yuan, ZHONG Haiying, DONG Shifang, HUANG Lu, LIU Xiaoqi, LIAO Yuzi, YI Qin, ZHAO Li, YANG Ke, LI Yasha Pediatric Research Institute, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the age-related biological properties of bone-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) from mice of different age groups and their osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic protein 2 (BMP2). **Methods** Eight C57BL/6J mice were divided into a young group (4 weeks old, weighing 10~15 g, $n=4$) and an old group (12 months old, weighing 20~25 g, $n=4$), with half male and half female. MSCs were extracted from the whole bones of the 2 groups of mice. After the

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81800786)
[**通信作者**] 李娅莎,E-mail:liyasha@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

obtained cells were identified with flow cytometry for the surface markers, β-galactosidase staining was employed to compare the senescence level of BMSCs, MTT and EdU incorporation assays were conducted to compare the proliferation and self-renewal abilities of between the 2 groups. Western blotting was employed to analyze the expression of CyclinD1 and P21 in BMSCs. Then ALP staining, Alizarin Red staining and RT-qPCR were used to evaluate the osteogenic differentiation ability of the cells. RNA sequencing was performed to compare the differential gene expression in BMP2-induced BMSCs. Lastly ,the sequencing results were re-confirmed by using flow cytometry. **Results** Flow cytometry showed that the sorted and cultured mouse BMSCs met the criteria for MSCs. The results of β-galactosidase staining indicated that the senescence level of BMSCs in the old group was significantly higher than that in the young group ($P<0.05$). MTT and EdU doping experiments revealed that the cell viability and proliferation ability of BMSCs were significantly lower in the old group than the young group ($P<0.05$). Western blotting displayed that the expression level of cell cycle protein CyclinD1 was lower, whereas that of cell cycle inhibitory factor P21 was significantly higher in the BMSCs from the old group than the cells from the young group ($P<0.05$). ALP/Alizarin Red staining and RT-qPCR demonstrated that the BMSCs from the young group had stronger osteogenic differentiation capacity after BMP2 treatment when compared the cells of the old group ($P<0.05$). RNA sequencing results displayed that the changing profile of CD51 expression was in opposite trends in the young and old BMSCs after BMP2 treatment. Finally, flow cytometry revealed that the percentage of $CD51^+$ cells within the $CD45^-$ cells was significantly higher in the young group than the old group. **Conclusion** The decrease in the percentage of $CD51^+$ cells among $CD45^-$ cells in aged BMSCs is closely associated with their decreased responsiveness to BMP2-induced osteogenic differentiation.

[**Key words**] bone derived mesenchymal stem cells; BMP2; osteogenic differentiation; aging; cluster of differentiation 51

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81800786). Corresponding author: LI Yasha, E-mail: liyasha@hospital.cqmu.edu.cn

随着我国人口老龄化的加剧,骨质疏松症的患病率持续上升,根据全国骨质疏松症流行病学调查数据显示,65 岁以上的人群中,骨质疏松症的患病率为32.0%,且大部分在骨折就诊时发现[1]。老年性骨质疏松可引发骨痛、驼背(脊椎压缩性变形)、脆性骨折等症状,是影响老年人身心健康的一种退行性病变。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类起源于中胚层的成体干细胞,广泛存在于骨、骨髓和内外骨膜中,作为成骨细胞的前体,其维持自我更新和多向分化的能力在骨形成的动态平衡中具有重要意义[2]。其中,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)是研究中最常见的类型。然而,近年来,有研究发现,与 BM-MSCs 比较,定植于整骨(包括松质骨、骨骺及骨膜)中的 MSCs 在骨骼形成、维持和修复中扮演着更为重要的角色[3]。与 BM-MSCs 比较,骨来源的间充质干细胞(bone derived mesenchymal stem cells, BMSCs)集落形成更加迅速且形态稳定,造血系和内皮系来源的细胞污染也较少[4]。近年来,随着流式细胞分选和谱系示踪技术的广泛应用,关于骨组织发育和再生修复的研究愈发聚焦于定植在松质骨、骨膜以及骨骺生长板等组织中的骨祖细胞,并提出了骨骼干细胞(skeletal stem cells,SSCs)及其定向分化产生后续祖细胞至成骨细胞的概念[5]。

骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)通过促进 MSCs 的增殖、趋化性和多向分化,诱导成骨细胞成熟、基质矿化,在骨发育、骨再生和修复中起关键作用[6]。大量临床前动物实验研究发现,将 BMP2 以重组蛋白、病毒或 MSCs 细胞荷载的不同方式治疗骨折,可显著促进骨折缺损处的骨痂形成和骨折愈合过程[7]。而比较老年性骨质疏松患者和正常对照组来源的 MSCs 对 BMP2 信号通路的响应性,骨质疏松患者的 MSCs 对外源性 BMP2 的成骨诱导的反应性明显减弱[8]。

尽管 BMSCs 在骨骼形成、维持及修复过程中的重要性得到了广泛认可,但关于这些细胞如何随年龄增长而发生改变的深入理解仍相对有限。因此,深入研究 BMSCs 与年龄因素之间的关系,对于理解骨骼老化的机制以及开发有效的治疗策略具有重要意义。本研

究以 BMP2 作为成骨诱导因子,通过对比不同年龄组 BMSCs 在衰老相关生物学特性上的改变,来揭示年龄对 BMSCs 功能的影响,为骨骼相关疾病的预防和治疗提供了新的视角和潜在策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本研究所用的 4 周龄(体质量为 10~15 g, $n$=4)、12 月龄(体质量为 20~25 g,$n$=4)SPF 级 C57BL/6J 小鼠均购自重庆医科大学实验动物中心,雌雄各半。本研究中动物操作均经过重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准(CHCMU-IACUC20200424012)。

### 1.2 实验试剂

DMEM/F12 细胞培养基、Tryple™ Express 酶以及胎牛血清(FBS)均购自美国 Gibco 公司;D-Hanks 缓冲液、RNAiso Plus RNA 提取试剂、RT-qPCR 和逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;流式细胞术检测所用抗体均购自美国 BioLegend 公司;衰老相关 β-半乳糖苷酶染色试剂盒、MTT 试剂盒茜素红 S 染色试剂盒、EdU-488 细胞增殖检测试剂盒、蛋白裂解液 RIPA、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、青-链霉素均购自上海碧云天试剂公司;胶原酶Ⅱ购自上海科雅生物科技有限公司;ALP 活性染色试剂盒、β-甘油磷酸钠、抗坏血酸购自美国 Sigma 公司;CyclinD1 抗体自杭州华安生物有限公司;P21 抗体购自武汉爱博泰克生物有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 实验设计及分组 本研究将健康的 C57BL/6J 小鼠分为 2 组:青年组(4 周龄)和老年组(12 月龄),每组 4 只,每组雌雄各半。进一步将这 2 组小鼠的 BMSCs 分别感染 Ad-BMP2 和 Ad-GFP(作为对照),得到 4 个实验组:青年+BMP2 组、青年+GFP 组、老年+BMP2 组、老年+GFP 组。通过体外实验,比较各组体外成骨能力,以揭示在 BMP2 诱导下年龄因素对 BMSCs 体外成骨能力的影响。

1.3.2 BMSCs 的分离培养 将二氧化碳窒息法处死后的小鼠浸泡在 75%酒精中 2 min,分离出完整的股骨、胫骨、肱骨,并用无菌纱布清理干净附着的肌肉和结缔组织,浸没在含有 12.5% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基中,如图 1 所示。使用无菌剪刀剪开骨髓腔末端,用 1 mL 注射器抽取完全培养基,并冲洗骨髓腔多次,将冲洗好的骨头剪成 1~2 $mm^2$ 的骨碎并置于 1 mL 含有 0.1% Ⅱ型胶原酶的完全培养基中重悬,5%$CO_2$、37 ℃ 孵育 30 min 后,加入新鲜的完全培养基,并接种到培养皿中培养,首次换液在 4 h 后进行,12 h 后再次进行换液。其间用 D-Hank's 缓冲液反复冲洗骨碎 3 次,镜下观察是否残留漂浮的杂细胞,待 6~10 d 后,骨碎周围形成明显的细胞集落,用 Tryple™ Express 酶消化中和后重新接种,每 2~4 天进行后续正常培养传代。

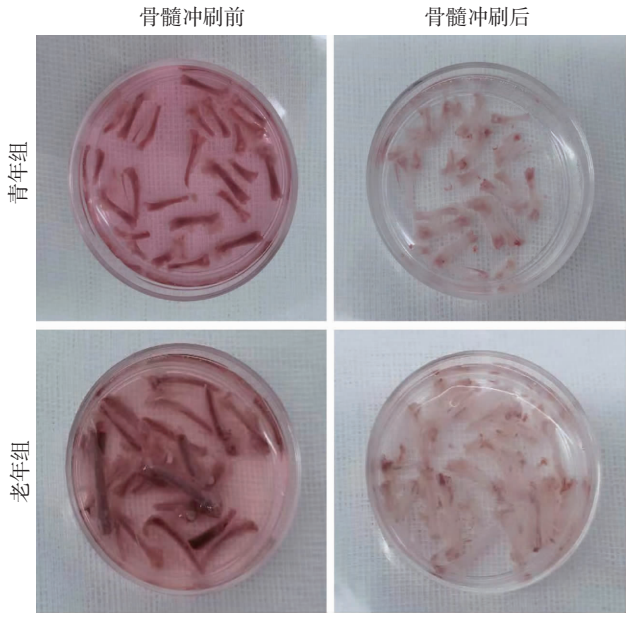



**图 1 青/老年组小鼠四肢骨骨髓冲洗前后的观察结果**

1.3.3 流式细胞术检测 $CD45^-$ BMSCs 表面特异性标志物 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞进行 Tryple™ Express 酶消化中和,将单细胞悬液加入适量的 FITC 偶联的 CD45 抗体共染,室温避光孵育 30 min,然后用 D-Hank's 缓冲液清洗细胞,400×$g$ 离心 5 min,并用流式分选仪对细胞进行分选,筛选出 $CD45^-$ 的 BMSCs 群体,将细胞按照 $5\times10^5$ 个/孔接种于 6 孔板中,后续正常培养传代。

取分选后培养的 $CD45^-$ 的 BMSCs 第 3 代细胞,Tryple™ Express 酶消化中和后,将所得的单细胞悬液分别与适量 FITC 偶联的 anti-Sca-1、CD29、CD44、CD31、CD11b 抗体在室温避光条件下孵育 30 min,清洗细胞,400×$g$ 离心 5 min,后上机做流式分析,使用 Flow j 软件分析数据。

1.3.4 β-半乳糖苷酶染色检测 BMSCs 衰老情况 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞以 $5\times10^5$ 个/孔接种于 6 孔板中,当细胞达到 60%融合时,将 β-半乳糖苷酶底物加入染色缓冲液中,按照说明书指定的比例配制染色液进行染色。

1.3.5 BMSCs 增殖及自我更新能力检测

1.3.5.1 MTT 法比较 2 组 BMSCs 的细胞活力 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞以 $5\times10^3$ 个/孔接种于 96 孔板中,每组设置为 6 个复孔,待细胞贴壁后,分别于 1、2、3、4、5、6、7 d 分别加入 20 μL MTT(5 mg/mL),37 ℃孵育 4 h 后终止培养,吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μL

DMSO,并充分振摇 10 min,用多功能酶联免疫检测仪测量每孔的光密度值[$D$(490)],绘制生长曲线。

1.3.5.2 EdU 掺入法比较 2 组 BMSCs 的增殖能力 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞以 $1\times10^5$ 个/孔的密度接种于 24 孔板中,每组设置 3 个复孔,细胞贴壁后添加 EdU(10 μmol/L),继续培养 24 h,根据说明书配制 Click Additive 染液对细胞进行染色,并在荧光显微镜下随机计数 10 个视野,比较 2 组 BMSCs 的 EdU 掺入率(掺入率=EdU 阳性细胞数/光镜下总细胞数×100%)。

1.3.5.3 比较 2 组 BMSCs 克隆形成 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞以 $1\times10^3$ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,每组设置 3 个复孔,每 2 天更换培养液 1 次,培养 14 d 后,对细胞进行结晶紫染色并镜下观察,以含细胞数目>50 的集落记为 1 个克隆,计数各实验组克隆形成的数目。

1.3.5.4 Western blot 检测 2 组 BMSCs 中 CyclinD1 和 P21 的表达水平 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞,以 $5\times10^5$ 个/孔的密度接种于 6 孔板中,每组设置 3 个复孔,待细胞生长至 90%时,用裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取等量样品进行 SDS-PAGE 电泳分离后电转到 PVDF 膜,将 CyclinD1 和 P21 抗体均按 1∶1 000 对条带进行孵育,以 β-actin 作为内参,用 Image Lab 软件进行条带灰度值分析。

1.3.6 BMSCs 成骨分化能力检测

1.3.6.1 碱性磷酸酶(ALP)染色比较 BMP2 诱导后 BMSCs 成骨早期指标 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞以 20%~30%的密度均匀铺板至 24 孔板中,2 组均进行 Ad-BMP2 和 Ad-GFP 的感染,感染后第 3、5、7 天,按照 ALP 活性染色试剂盒说明书配制并混匀 ALP 活性染色工作液,置于室温待用。吸弃培养基,加入上述染液,室温避光孵育 30~60 min,光镜下观察,出现变色即终止反应并拍照。

1.3.6.2 茜素红 S 染色比较 BMP2 诱导后 BMSCs 矿化结节的形成 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞以 20%~30%的密度接种于 24 孔板中,2 组均进行 Ad-BMP2 和 Ad-GFP 的感染,同时培养基中加入终浓度为 50 g/mL 的抗坏血酸和 10 mmol/L 的 β-磷酸甘油,每 3 天更换 1 次成骨诱导液,培养至第 21 天后用 4%多聚甲醛固定 30 min,用 pH 值为 4.5 的 D-Hank's 缓冲液清洗 3 次,进行 2%茜素红 S 染色,1 h 后用 $ddH_2O$ 清洗并在镜下观察并拍照。

1.3.6.3 RT-qPCR 检测 BMP2 诱导后 BMSCs 下游成骨相关功能基因的表达 取 2 组 BMSCs 第 3 代细胞,以 $5\times10^5$ 个/孔的密度接种于 6 孔板,贴壁过夜后,2 组均进行 Ad-BMP2 和 Ad-GFP 的感染,3 d 后每孔加入 500 μL 的 RNAiso Plus 提取细胞的总 RNA,后反转录为 cDNA,用 RT-qPCR 检测成骨相关基因 *ALP*、*RunX2*、*Osx* 在 2 组细胞中的表达差异,选择小鼠 GAPDH 基因为内参,引物序列如表 1 所示,目的基因的相对表达倍数用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 公式计算。

**表 1 成骨相关功能基因的引物序列**

| 基因 | 引物序列(5′→3′) | 产物长度/bp |
|---|---|---|
| *Gapdh* | 正向:GAAGGTCGGTGTGAACGGAT | 20 |
| | 反向:ACTGTGCCGTTGAATTTGCC | 20 |
| *Runx2* | 正向:CCGGTCTCCTTCCAGGAT | 18 |
| | 反向:GGGAACTGCTGTGGCTTC | 18 |
| *Osx* | 正向:GGGAGCAGAGTGCCAAGA | 18 |
| | 反向:GGGAGCAGAGTGCCAAGA | 18 |
| *Alp* | 正向:GACTACCACTCGGGTGAA | 18 |
| | 反向:GCTGATATGCGATGTCCTTG | 20 |

1.3.7 RNA-seq 检测 2 组 BMSCs 差异基因表达 用 RNAiso 提取 2 组细胞样品总 RNA,分别进行反转录合成 cDNA。用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对构建好的文库进行质检,应用 Illumina 测序平台的双端测序模式其进行高通量测序,根据测序数据,应用注释、可视化和综合发现数据库(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID)。对获得的重叠基因进行功能富集化分析包括基因的表达水平和差异分析。筛选出基因的表达变化倍数>2.0 的基因,通过韦恩分析 2 组 BMSCs 经 BMP2 诱导后与 GFP 对照组间的差异表达基因。

1.3.8 流式细胞术分析 2 组 mSSCs 标记物的表达 为进一步验证实验结果,使用流式细胞术检测 2 组细胞 mSSCs 相关标记物 CD51 的表达情况,将第 3 代 BMSCs 的单细胞悬液与适量 FITC-anti CD45、PE-anti CD51 抗体共染后做流式分析,后续操作同方法 1.3.3。

1.4 统计学分析

所有数据使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析和处理。计量资料的描述以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示。对于多个样本均值的比较,采用单因素方差分析进行分析。对于 2 组正态分布的定量资料间比较采用 Student's $t$ 检验 。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 BMSCs 形态学观察

初次培养 48 h 后,少量细胞开始陆续从骨碎中迁移出来,72 h 后形成了少量细胞集落。青年组通常在 $P_0$ 代培养 6~7 d 后,细胞融合达到 70%~80%。而老年组达到相同的融合程度需要 10~11 d。此外,骨碎

周围爬出的成纤维状细胞在形态上呈现出长梭形或纺锤形,达到对数生长期后会呈旋涡状生长。

2.2 流式细胞术检测 $CD45^-$ BMSCs 表面 CD 分子表达

经过流式分选,筛选出 $CD45^-$ BMSCs 细胞群体。经过 3 d 的培养后,这些细胞显示出形态稳定均一的特征且无杂细胞污染,见图 2A。

流式分析代表性结果显示,$CD45^-$ BMSCs 表面干细胞标志物 Sca-1 和间充质标记物 CD44、CD29 均呈阳性,而造血系标记物 CD11b 和内皮细胞标记物 CD31 均呈阴性,符合间充质干细胞的表型特征,见图 2B。

2.3 2 组 BMSCs 衰老水平比较

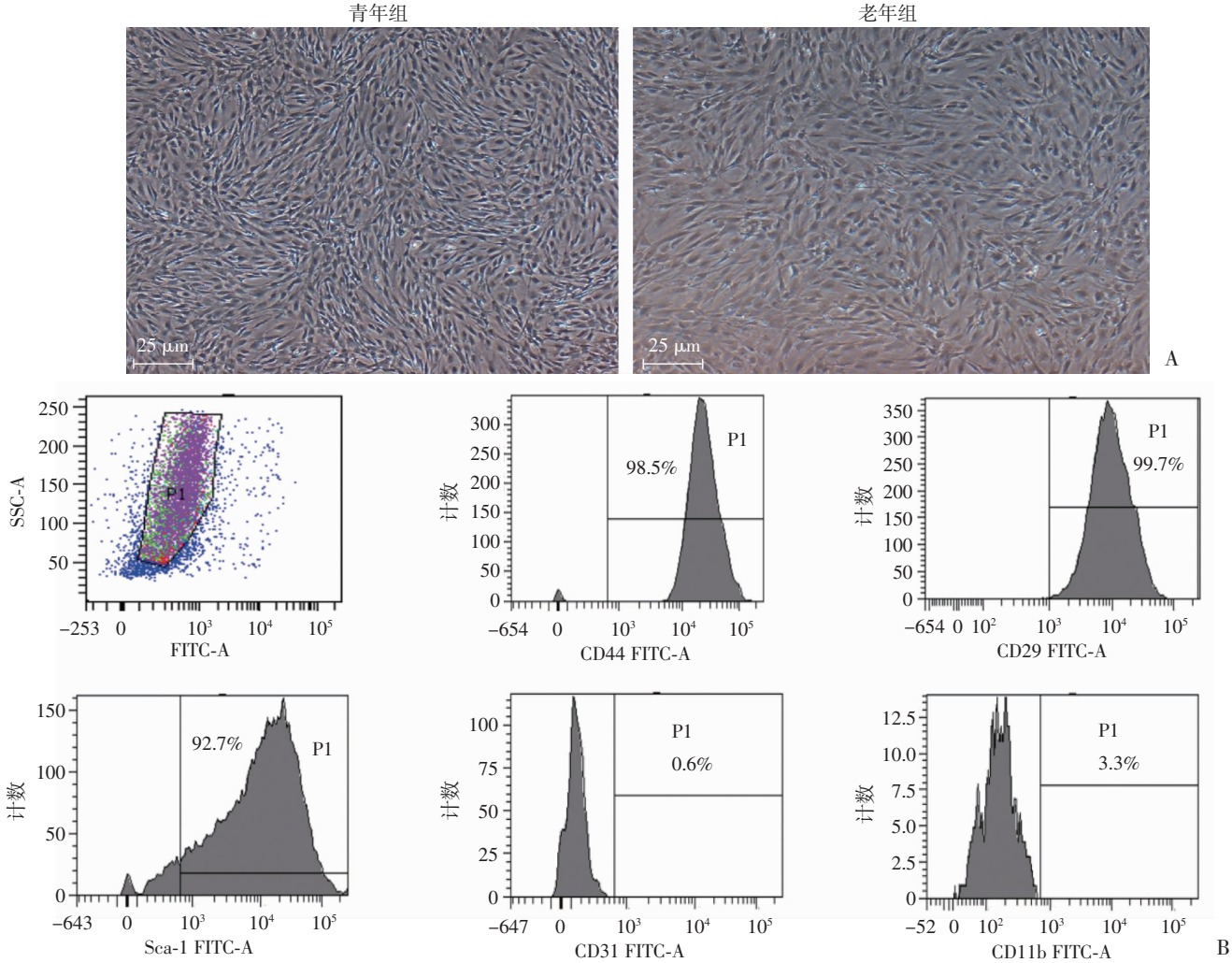
细胞发生衰老后,在 pH 值为 6.0 时会表达高酶活性的 β-半乳糖苷酶,以 X-Gal 为底物,催化生成蓝色沉淀物,通过镜下观察细胞蓝染程度来判断细胞衰老水平。结果显示,青年组仅有少量细胞呈现轻度蓝染,而老年组 BMSCs 细胞则广泛出现较深的蓝染($P<0.05$,图 3A)。老年组 BMSCs 的衰老水平显著高于青年组($P<0.05$)。

2.4 2 组 BMSCs 自我更新能力比较

2.4.1 2 组 BMSCs 生长曲线 通过连续监测 2 组细胞 7 d 的光密度值并绘制生长曲线,结果显示,第 3 天时,2 组细胞均进入了对数生长期。而老年组在第 5 天就达到了平台期,出现细胞生长停滞,整体生长曲线明显低于青年组。说明老年组 BMSCs 的细胞活力较青年组低($P<0.05$,图 3B)。

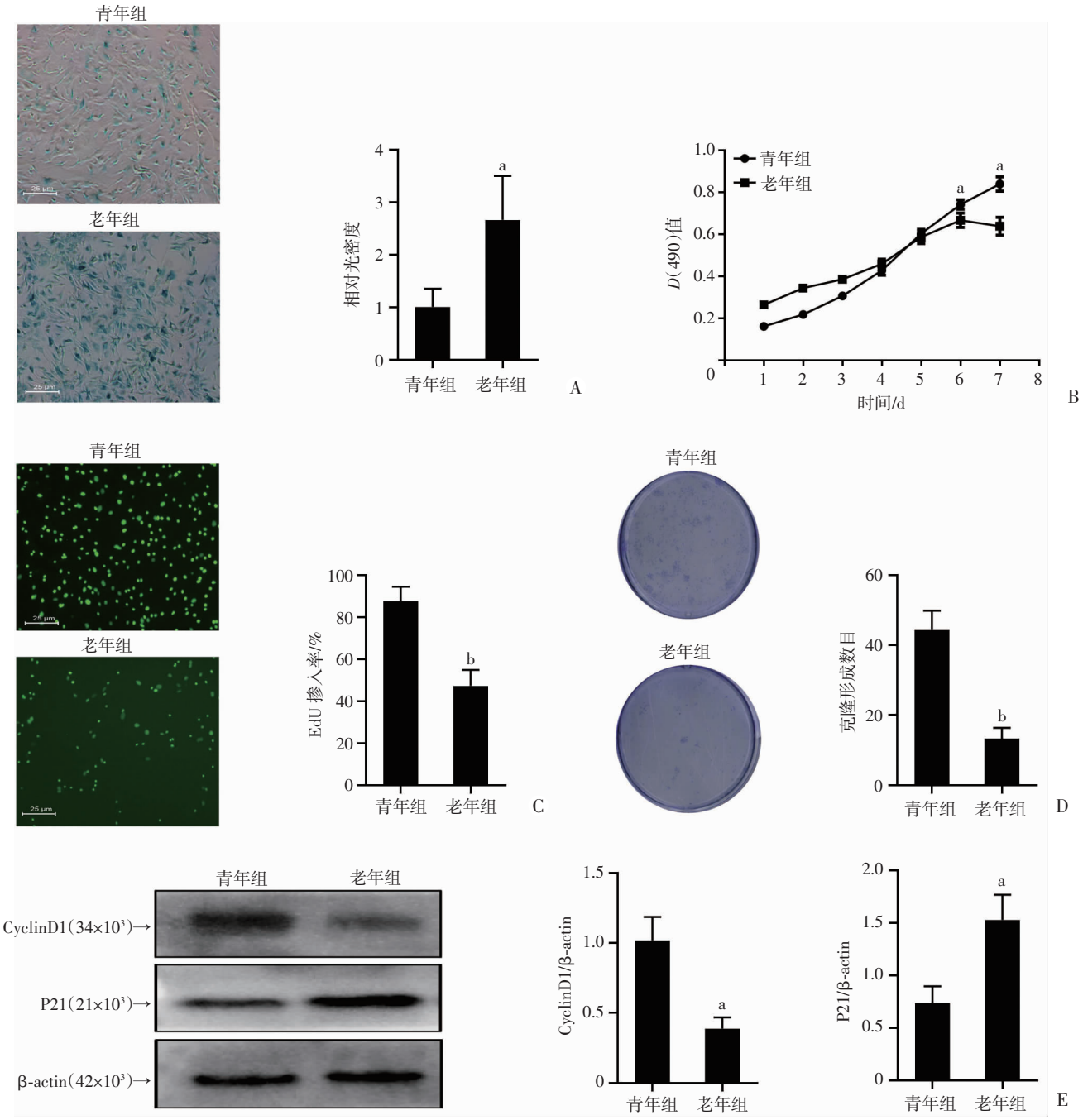
2.4.2 2 组 BMSCs EdU 掺入情况 2 组 BMSCs 固定染色后,镜下观察结果所示,青年组呈现强烈的绿色荧光信号,而老年组中绿色荧光信号较弱($P<0.01$,图 3C)。青年组 EdU 掺入率为(87.67±6.8)%,老年组 EdU 掺入率为(47.33±7.5)%。

2.4.3 2 组 BMSCs 克隆形成情况 连续观察细胞接种后生长情况,14 d 后,2 组均可见克隆形成单位,但老年组 BMSCs 形成的克隆数量明显少于青年组($P<0.01$,图 3D)。




A:镜下观察流式分选后青/老年组小鼠 BMSCs 形态;B:流式细胞术检测 $CD45^-$ 的 BMSCs 表面 CD 分子的表达

**图 2 小鼠 BMSCs 的分离培养及鉴定**




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与青年组比较

A:2 组 BMSCs β-半乳糖苷酶染色及活性定量分析;B:2 组 BMSCs MTT 生长曲线;C:2 组 BMSCs EdU 染色及 EdU 掺入率定量;D:2 组 BMSCs 克隆形成实验及定量分析;E:Western blot 分析 2 组 BMSCs 中 CyclinD1、P21 的表达

**图 3　青年组和老年组 BMSCs 的衰老相关特性比较**

2.4.4　细胞周期蛋白 CyclinD1、P21 在 2 组 BMSCs 中的表达情况　　Western blot 检测结果显示,青年组 BMSCs 中 CyclinD1 的表达较老年组高,而老年组中 P21 的表达则较青年组高($P<0.05$,图 3E)。

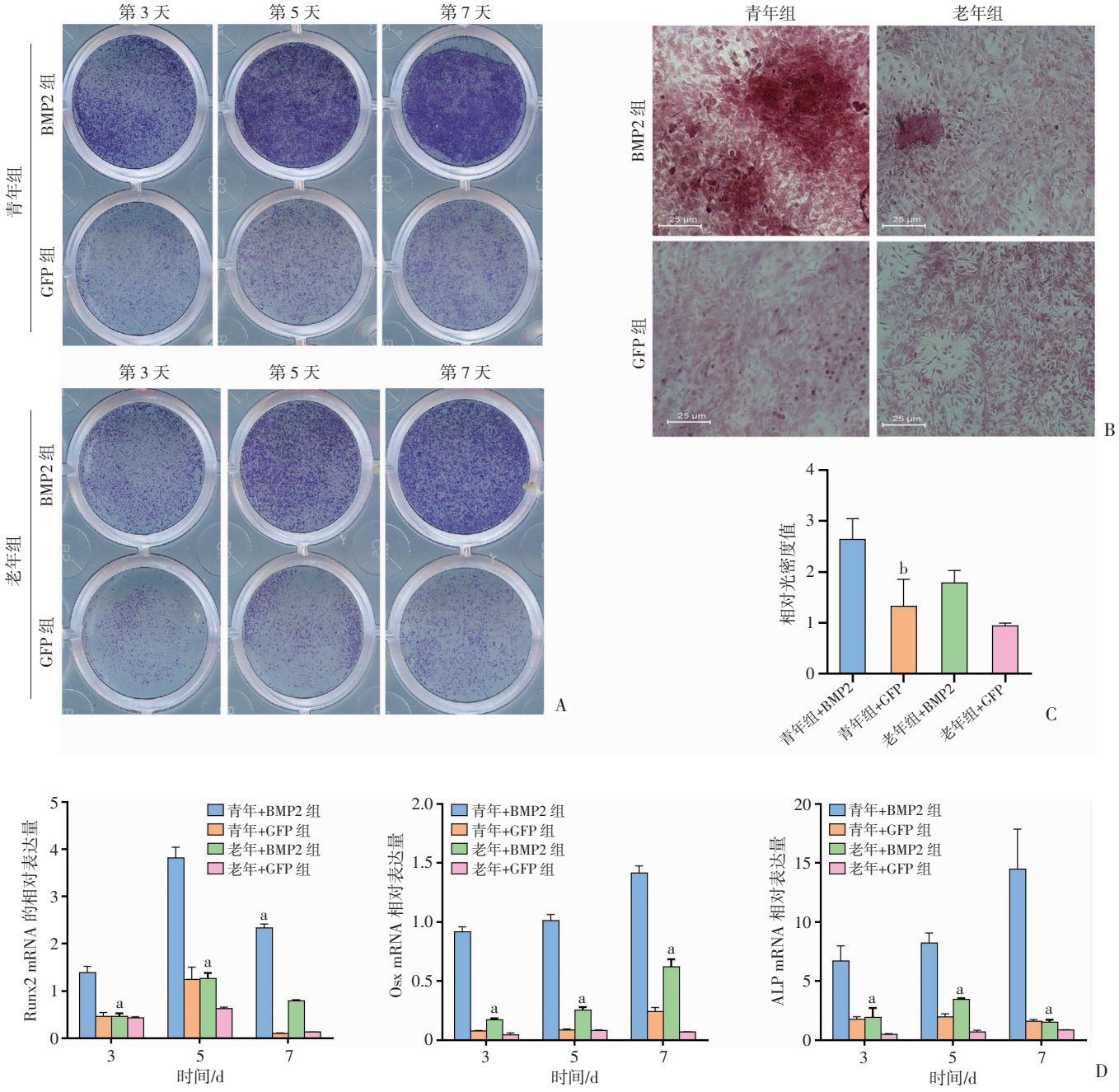
2.5　2 组 BMSCs 成骨能力比较结果

2.5.1　早期成骨指标 ALP 染色　　ALP 染色的深浅可评估 ALP 的活性水平,镜下观察 2 组均有阳性蓝染细胞,但青年组在 BMP2 诱导后 3、5、7 d 的 ALP 活性染色明显高于 GFP 对照组。而老年组在 BMP2 诱导后,与 GFP 对照组比较,ALP 活性染色差异不明显(图 4A)。

2.5.2　晚期成骨茜素红 S 染色　　茜素红 S 染色的

深浅程度可以反映结节的矿化程度,经过体外成骨诱导培养 21 d 后,青年组 BMSCs 镜下可见大面积的红褐色矿化结节染色(图 4B),且 BMP2 诱导后青年组 BMSCs 的染色较 GFP 组明显较深($P<0.05$),而 BMP2 诱导后老年组 BMSCs 的染色较 GFP 组差异不明显(图 4C)。

2.5.3　BMP2 诱导后 2 组 BMSCs 的成骨相关基因表达水平　为进一步比较 2 组 BMSCs 体外成骨能力,采用 RT-qPCR 检测成骨特异性调控因子 *Runx*2、*ALP*、*Osx* 的表达,结果显示,在 3、5、7 d,2 组细胞经 BMP2 处理后,*Runx*2、*Osx*、*ALP* 的表达水平均有上调,但老年组较青年组上调幅度明显下降($P<0.05$,图 4D)。



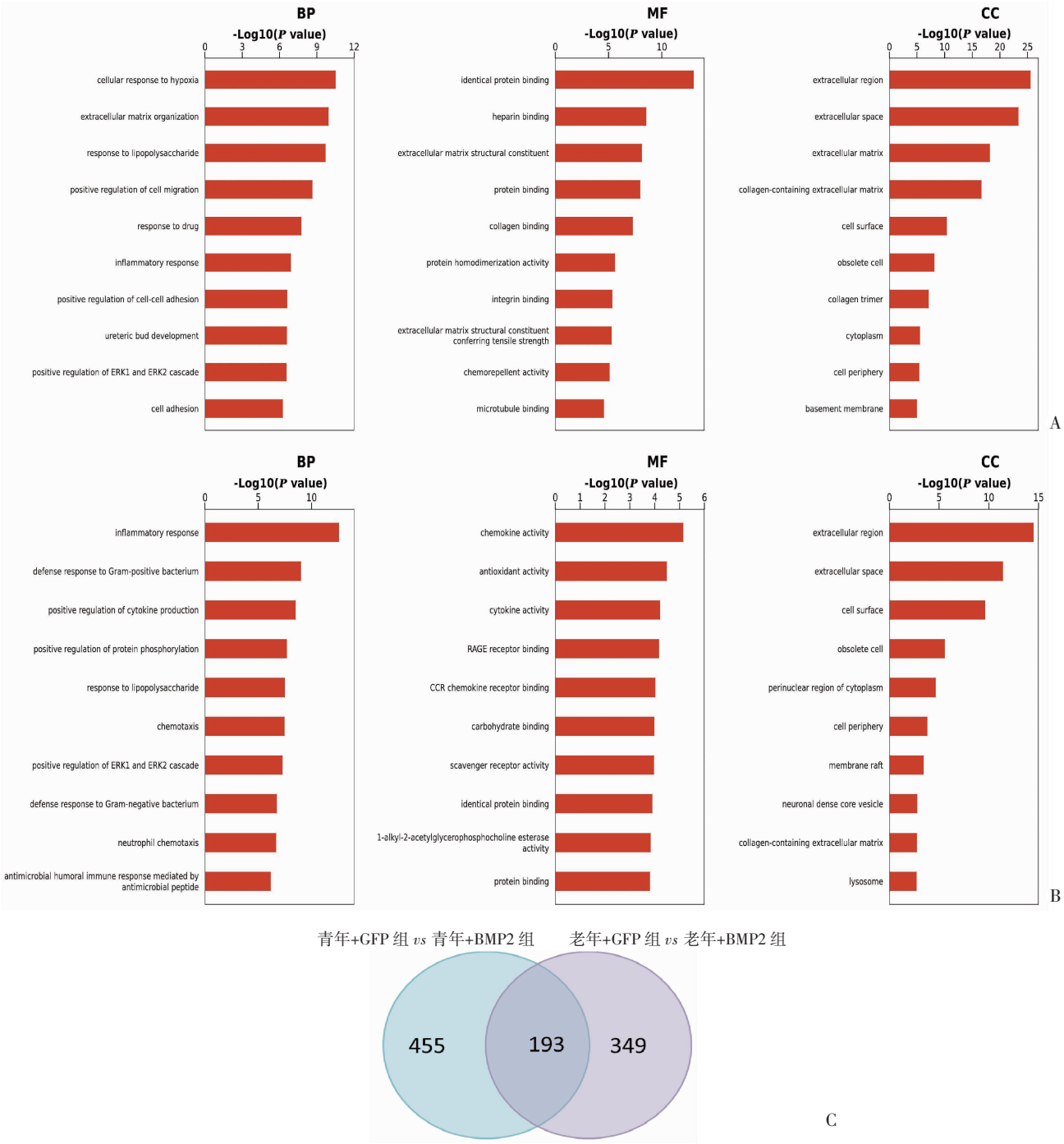

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与青年组 BMP2 组比较

A:青年组与老年组 BMSCs 感染 BMP2 及 GFP 后的 ALP 染色观察;B:青年组与老年组 BMSCs 感染 BMP2 及 GFP 后茜素红 S 染色观察;C:茜素红 S 染色活性定量分析;D:青年组与老年组 BMSCs 感染 BMP2 及 GFP 后下游成骨基因表达水平

**图 4　BMP2 诱导后青/老年组 BMSCs 的成骨分化能力比较**

### 2.6　RNA-seq 分析 BMP2 诱导后 2 组 BMSCs 差异基因的表达

青年组和老年组 BMSCs 进行 Ad-BMP2 和 Ad-GFP 的感染处理后,对比 2 组 mRNA 测序数据库筛选差异基因,结果显示,青年+BMP2 组与青年+GFP 组比较,筛选出了 455 个差异表达基因。老年+BMP2 组与老年+GFP 组比较,筛选出了 349 个差异表达基因。为进一步探索差异基因的功能,使用 DAVID 数据库对差异基因进行 GO 富集,在青年组中,BMP2 诱导后的差异基因主要涉及细胞对低氧环境的响应机制及细胞外基质的组织调控,并在正向调控细胞迁移、细胞黏附和转录过程中发挥重要作用。而在老年组中,BMP2 诱导后的差异基因主要涉及细胞的炎症反应,以及正向调控蛋白质磷酸化和细胞因子的产生,见图5A、B。




A:与 GFP 组比较,青年组 BMSCs 感染 BMP2 的 GO 富集分析柱状图;B:与 GFP 组比较,老年组 BMSCs 感染 BMP2 的 GO 富集分析柱状图;C:青年组与老年组 BMSCs 感染 BMP2 及 GFP 后的差异基因再比较的韦恩分析图

**图 5　RNA seq 分析 BMP2 诱导后青/老年组 BMSCs 的差异基因**

对比 2 组细胞各自的差异基因进行了韦恩分析,进一步筛选 2 组细胞经 BMP2 诱导后调控不同步的差异基因,包括 *Itgav*、*Ankrd*1、*Atr*、*Calcrl*、*Cxcl*5、*Prrg*1、*Zbtb*26(图 5C)。Itgav 又称为整合素 αV 重组织蛋白( cluster of differentiation 51,CD51),该细胞表面标记分子与成骨发育密切相关,研究结果发现,该基因表达水平在青年+BMP2 组中较青年+GFP 组下调了 0.41 倍,在老年+BMP2 组中较老年+GFP 组相比上调了 2.15 倍。

### 2.7 流式细胞术检测 CD45⁻BMSCs 中 mSSCs 特异标记物的表达

进一步通过流式细胞术分析 2 组 CD45⁻BMSCs 中 CD51 的占比,在青年组中,CD51⁺细胞亚群在 CD45⁻细胞中占比为(97.6±0.40)%;而老年组中 CD51⁺细胞亚群在 CD45⁻细胞中占比为(86.5±2.15)%,表明青年组 CD51⁺细胞亚群在 CD45⁻细胞中占比明显高于老年组($P$<0.01,图 6)。

## 3 讨论

### 3.1 老年性骨质疏松的研究现状

第 7 次全国人口普查显示,我国 60 岁及以上老年人口超过 2.6 亿。随着老龄化加剧,老年性骨质疏松问题日益严重[9]。朱洁云等[10]研究表明,预计到 2035 年,我国将面临近 500 万例骨质疏松性骨折,而干细胞工程展现出了在老年骨质疏松诊疗方面的广阔的应用前景[11]。作为最适合移植治疗的干细胞类型,MSCs 不受免疫排斥、易于分离和扩增,并且具备自我更新和多向分化的潜能,能够有效促进骨形成、提高骨密度,并通过分泌生长因子和细胞因子来修复受损组织,成为治疗骨质疏松症等疾病的理想选择[12-13]。

### 3.2 BMSCs 衰老的影响:细胞特性变化与功能下降

随年龄增长而出现的自然衰老和由疾病损伤等原因造成的复制性与应激性衰老导致 MSCs 的形态学、染色质结构、迁移归巢、再生分化、代谢平衡和旁分泌等细胞特性发生显著改变,这些变化导致 MSCs 的分化能力和自我更新能力大幅下降,进而影响其整体功能和活力[14-15]。有研究表明,长期体外培养的人脐带间充质干细胞和人体造血干细胞均表现出增殖能力减弱和衰老特征,增加了老年人患肿瘤等疾病的风险[16-17]。同样,老年小鼠的肌源性干细胞也表现出增殖再生功能减弱[18]。本研究也发现,青年组的 BMSCs 在自我更新和体外成骨分化能力方面均优于老年组,因此,衰老 BMSCs 功能失调机制的清晰阐明在解决老年性骨退行性病变的预防保健和治疗康复等问题方面凸现出重要价值。

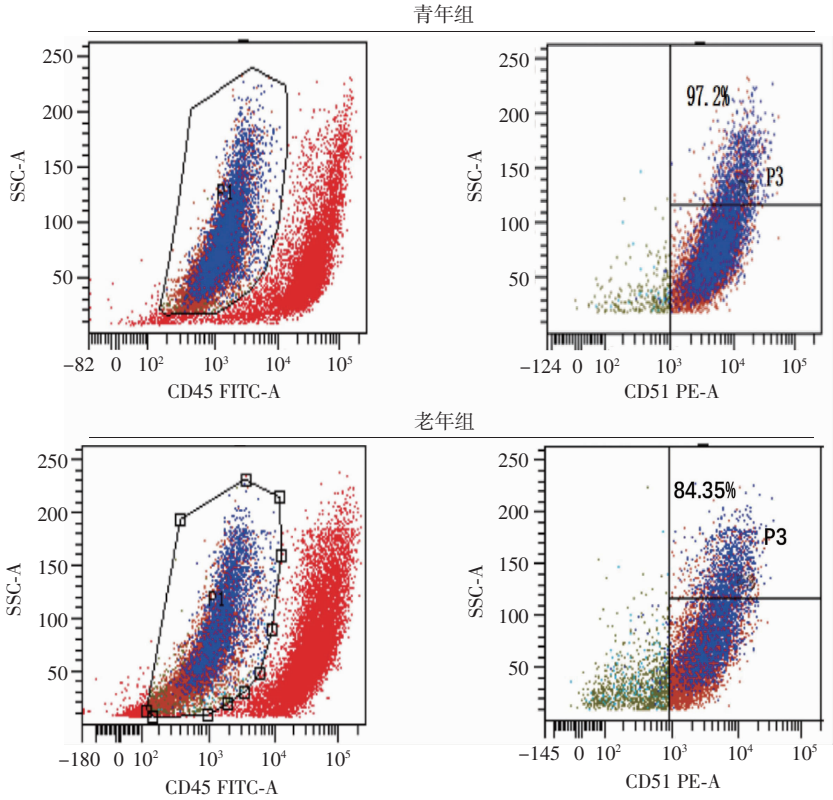



**图 6 流式细胞术分析青/老年组细胞中 mSSCs 表面分子标记**

### 3.3 CD51 与 SSCs:成骨过程中的关键角色及其随年龄变化的影响

2015 年,CHAN 等[19]从新生鼠的四肢骨中成功分离出一类特定的细胞群体——SSCs(CD51$^+$ CD45$^-$ Ter119$^-$Tie2$^-$),这类细胞与多向分化潜能的 MSCs 不同,具有分化为软骨细胞、成骨细胞和基质细胞的能力,但缺乏分化成脂肪细胞的能力。其中,CD51 是一种在成骨细胞谱系中广泛表达的纤连蛋白受体膜蛋白,尤其在生长板克隆形成区呈现高度富集[20]。随后的研究揭示了 CD51 在成骨过程中的重要性。在成骨不全症小鼠模型中,经过体外培养并移植的骨髓间充质干细胞在长达 3 个月的成骨干预治疗后,表达了 Sca-1$^+$ CD51$^+$标记物[21]。同样,ALVAREZ 等[22]通过 CD51 标记从牙周膜细胞中分离出牙间充质干细胞,并观察到其表达随着细胞复制性衰老而减少。进一步在 BMP2 修复下颌骨缺损的实验中,发现新骨形成区富含 CD51$^+$ CD200$^+$的 SSCs 及其后代(CD51$^+$ CD105$^+$),且 BMP2 的诱导促进了 SSCs 子代细胞(CD51$^+$ CD105$^+$)的比例[23]。本研究还发现,与老年组比较,青年组 BMSCs 中 CD45$^-$CD51$^+$ SSCs 亚群的细胞数量显著较高,这表明整骨定植细胞中 CD51$^+$ SSCs 的数量随着年龄增长而减少,这可能是导致老年小鼠成骨能力下降的关键因素。

综上所述,本研究通过 β-半乳糖苷酶染色、细胞增殖实验(MTT 和 EdU 掺入)揭示青年组 BMSCs 具有更强的自我更新能力和较低的衰老程度,Western blot 分析显示,老年组细胞周期蛋白 CyclinD1 表达减少,而细胞周期抑制因子 P21 表达增加。此外,在 BMP2 诱导后,通过 ALP 染色、茜素红染色及 RT-qPCR 检测发现青年组 BMSCs 的成骨分化能力显著高于老年组。RNA-seq 和韦恩分析进一步揭示,包括 *Itgav*(CD51)在内的 7 个基因在 2 组细胞中差异表达,且 CD45-CD51$^+$ 细胞亚群在老年组 BMSCs 中的比例显著降低。尽管 BMP2 诱导能部分提高衰老细胞 CD51 表达,但未能逆转其干性和成骨能力的下降趋势。因此,MSCs 衰老过程中 SSCs 数量减少的机制仍需深入研究。

**参考文献:**


[1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4):317-318. DOI:10.3969/j.issn.1674-2591.2019.04.001.
Osteoporosis and Bone Mineral Disease Branch of Chinese Medical Association. Epidemiological investigation of osteoporosis in China and release of the results of the special action of “healthy bones”[J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res, 2019, 12(4): 317-318. DOI:10.3969/j.issn.1674-2591.2019.04.001.

[2] HADJIDAKIS D J, ANDROULAKIS I I. Bone Remodeling[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1092(1): 385-396. DOI: 10.1196/annals.1365.035.

[3] ZHU H, GUO Z K, JIANG X X, *et al*. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone[J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 550-560. DOI: 10.1038/nprot.2009.238.

[4] CAI Y T, LIU T S, FANG F, *et al*. Comparisons of mouse mesenchymal stem cells in primary adherent culture of compact bone fragments and whole bone marrow[J]. Stem Cells Int, 2015, 2015: 708906. DOI: 10.1155/2015/708906.

[5] SEROWOKY M A, ARATA C E, CRUMP J G, *et al*. Skeletal stem cells: insights into maintaining and regenerating the skeleton[J]. Development, 2020, 147(5): dev179325. DOI: 10.1242/dev.179325.

[6] HALLORAN D, DURBANO H W, NOHE A. Bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis[J]. J Dev Biol, 2020, 8(3): 19. DOI: 10.3390/jdb8030019.

[7] BALL A N, DONAHUE S W, WOJDA S J, *et al*. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis[J]. J Orthop Res, 2018, 36(6): 1559-1572. DOI: 10.1002/jor.23845.

[8] DONOSO O, PINO A M, SEITZ G, *et al*. Osteoporosis-associated alteration in the signalling status of BMP-2 in human MSCs under adipogenic conditions[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(7): 1267-1277. DOI: 10.1002/jcb.25082.

[9] Office of the Leading Group of the Seventh National Population Census of the State Council, National Bureau of Statistics: Communiqué of the Seventh National Population Census (No. 8): Hong Kong, Macao and Taiwan Residents and Foreigners Registered in the Census [N] China Information News, 2021-05-12(4).

[10] 朱洁云, 高敏, 宋秋韵, 等. 中国老年人骨质疏松症患病率的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2022, 25(3): 346-353. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.02.083.
ZHU J Y, GAO M, SONG Q Y, *et al*. Prevalence of osteoporosis in Chinese elderly people: a meta-analysis[J]. Chin Gen Pract, 2022, 25(3): 346-353. DOI: 10.12114/

j. issn. 1007-9572. 2021. 02. 083.

[11] XIA B, DENG Y X, LV Y G, *et al*. Stem cell recruitment based on scaffold features for bone tissue engineering[J]. Biomater Sci, 2021, 9(4): 1189-1203. DOI: 10. 1039/D0BM01591A.

[12] MERIMI M, EL-MAJZOUB R, LAGNEAUX L, *et al*. The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: current knowledge and future understandings[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 661532. DOI: 10. 3389/fcell. 2021. 661532.

[13] 于淼瑛, 宋晓东, 王艳辉, 等. 骨髓间充质干细胞衰老研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(12): 1844-1850. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-7108. 2023. 12. 021.
YU M Y, SONG X D, WANG Y H, *et al*. Research progress in the senescence of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(12): 1844-1850. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-7108. 2023. 12. 021.

[14] KAPETANOS K, ASIMAKOPOULOS D, CHRISTODOULOU N, *et al*. Chronological age affects MSC senescence in vitro-a systematic review[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7945. DOI: 10. 3390/ijms22157945.

[15] AUNG K T, AKIYAMA K, KUNITOMO M, *et al*. Aging-affected MSC functions and severity of periodontal tissue destruction in a ligature-induced mouse periodontitis model [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8103. DOI: 10. 3390/ijms21218103.

[16] WANG Y, ZHANG Z, CHI Y, *et al*. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(12): e950. DOI: 10. 1038/cddis. 2013. 480.

[17] 韩净净, 段爽爽, 辛春雷. 造血干细胞衰老分子机制研究进展[J]. 社区医学杂志, 2024, 22(3): 101-106. DOI: 10. 19790/j. cnki. JCM. 2024. 03. 07.
HAN J J, DUAN S S, XIN C L. Research progress on molecular mechanism of hematopoietic stem cellular aging [J]. J Community Med, 2024, 22(3): 101-106. DOI: 10. 19790/j. cnki. JCM. 2024. 03. 07.

[18] LAVASANI M, ROBINSON A R, LU A P, *et al*. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model[J]. Nat Commun, 2012, 3: 608. DOI: 10. 1038/ncomms1611.

[19] CHAN C K, SEO E Y, CHEN J Y, *et al*. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell [J]. Cell, 2015, 160(1/2): 285-298. DOI: 10. 1016/j. cell. 2014. 12. 002.

[20] CAO Y, BUCKELS E J, MATTHEWS B G. Markers for identification of postnatal skeletal stem cells in vivo[J]. Curr Osteoporos Rep, 2020, 18(6): 655-665. DOI: 10. 1007/s11914-020-00622-2.

[21] SINDER B P, NOVAK S, WEE N K Y, *et al*. Engraftment of skeletal progenitor cells by bone-directed transplantation improves osteogenesis imperfecta murine bone phenotype [J]. Stem Cells, 2020, 38(4): 530-541. DOI: 10. 1002/stem. 3133.

[22] ALVAREZ R, LEE H L, WANG C Y, *et al*. Characterization of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from human periodontal ligament based on cell surface markers[J]. Int J Oral Sci, 2015, 7(4): 213-219. DOI: 10. 1038/ijos. 2015. 42.

[23] YAO H, GUO J X, ZHU W Y, *et al*. Controlled release of bone morphogenetic protein-2 augments the coupling of angiogenesis and osteogenesis for accelerating mandibular defect repair[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(11): 2397. DOI: 10. 3390/pharmaceutics14112397.

(**收稿**:2023-10-10;**修回**:2023-12-06)

(编辑 张 维)