



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240250

网络首发日期: 2025-05-06; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20250506.1325.001>

TGF- β 2 通过增加线粒体活性氧积累和阻滞细胞周期 促进猪间充质干细胞衰老

马鑫淼, 徐德旭, 张智霞, 刘 宸, 许 慧, 王 楠

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 本研究旨在探讨转化生长因子- β 2 (TGF- β 2) 在猪骨髓间充质干细胞 (pBMMSCs) 衰老中的作用及机制。首先分析 pBMMSCs 在体外复制性衰老过程中 TGF- β 2 水平的变化, 研究 1 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 的 TGF- β 2 对细胞生长、增殖、衰老、线粒体活性氧 (mtROS) 水平、细胞周期及相关基因表达的影响。结果显示, pBMMSCs 表达干细胞标志物 CD90 和 CD44, 具备成脂和成骨分化潜能。随着传代次数的增加, TGF- β 2 的 mRNA 水平显著升高, 蛋白质的质量浓度从 (41.97 ± 9.46) pg/mL 上升到 (77.04 ± 3.44) pg/mL。TGF- β 2 处理后, 细胞增殖能力下降, 衰老细胞显著增加, mtROS 水平升高, 细胞周期阻滞在 G1 期, OCT4、Ki67、PCNA、SOD2 表达下降, P53 和 P21 表达上升。上述结果表明, TGF- β 2 通过促进线粒体活性氧积累并阻滞细胞周期 G1 期, 诱导 pBMMSCs 衰老。本研究为深入理解 TGF- β 2 在间充质干细胞衰老过程中的作用提供了参考。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 转化生长因子- β 2; 复制性衰老; 细胞增殖; 线粒体活性氧

中图分类号: Q255

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2026)03-0027-11

TGF- β 2-Induced Senescence of Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Mitochondrial Reactive Oxygen Species Accumulation and Cell Cycle Arrest

MA Xinmiao, XU Dexu, ZHANG Zhixia, LIU Chen, XU Hui, WANG Nan

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This study aimed to investigate the role and mechanism of transforming growth factor-beta 2 (TGF- β 2) in the senescence of porcine bone marrow mesenchymal stem cells (pBMMSCs). First, changes in TGF- β 2 levels during *in vitro* replicative senescence of pBMMSCs were analyzed. Then, the effects of TGF- β 2 at concentrations of 1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL on cell growth, proliferation, senescence, mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) levels, cell cycle, and related gene expression were also examined. The results showed that pBMMSCs expressed stem cell markers CD90 and CD44, and had the potential for adipogenic and osteogenic differentiation. With increasing passage numbers, the mRNA levels of TGF- β 2 significantly increased, and its protein content rose from (41.97 ± 9.46) pg/mL to (77.04 ± 3.44) pg/mL. After TGF- β 2 treatment, cell proliferation ability decreased, the number of senescent cells significantly increased, mtROS levels were elevated, and the cell cycle was arrested at G1 phase. Moreover, the expression of OCT4, Ki67, PCNA, and SOD2 was downregulated, while the expression of P53 and P21 was upregulated. These findings indicated that TGF- β 2 induced the aging of pBMMSCs by promoting mtROS accumulation and causing G1-phase cell cycle arrest. This study provides new insights into the role of TGF- β 2 in the senescence process of mesenchymal stem cells.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; transforming growth factor- β 2; replicative senescence; cell prolifera-

收稿日期: 2024-12-11; 修回日期: 2025-02-07

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2101403)

作者简介: 马鑫淼 (2000—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生; 通信作者: 王 楠, 教授, wn929@tust.edu.cn

tion; mitochondrial reactive oxygen species

引文格式:

马鑫淼,徐德旭,张智霞,等. TGF- β 2 通过增加线粒体活性氧积累和阻滞细胞周期促进猪间充质干细胞衰老[J]. 天津科技大学学报,2026,41(3):27-37.

MA X M, XU D X, ZHANG Z X, et al. TGF- β 2-induced senescence of porcine bone marrow mesenchymal stem cells via mitochondrial reactive oxygen species accumulation and cell cycle arrest[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2026, 41(3):27-37.

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有多向分化潜能的干细胞,能够在特定的条件下分化成多种细胞类型,例如成脂细胞、成骨细胞、软骨细胞等^[1-2],因其具有较弱的免疫原性以及较强的再生能力、组织修复能力,在再生医学中发挥着不可忽视的作用^[3]。除了强大的再生作用外,间充质干细胞还通过旁分泌生物活性因子和细胞间物质传递,发挥抗炎、促血管生成、抗氧化应激、抗凋亡等多种作用^[4-6]。间充质干细胞可从骨髓、脂肪、牙髓、胎盘、脐带、羊膜、羊水和其他组织中分离获得^[7-8]。然而,MSCs在体外长期扩增过程中将逐渐失去其干性,增殖分化能力显著下降,这种衰退将削弱干细胞的再生潜力,影响MSCs的大规模培养和制备^[9]。目前,相较于人类和啮齿类动物,关于畜禽类间充质干细胞的体外复制性衰老研究相对较少。因此,探讨猪骨髓间充质干细胞衰老机制对于畜禽相关领域,包括遗传发育、兽医学、细胞培养肉研发生产等具有重要理论指导意义和实际应用价值。

转化生长因子- β (TGF- β)超家族蛋白在多种类型细胞的增殖、分化、凋亡和衰老中扮演着重要角色,参与机体生理、病理的发生、发展过程^[10]。TGF- β 家族主要包括3种亚型,分别为TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3^[11]。目前已有部分关于TGF- β 在间充质干细胞增殖和衰老中作用的研究报道,然而这些研究结果并不一致。已有研究证实,TGF- β 1可以诱导人源MSCs(hMSCs)^[12]和小鼠骨髓源MSCs(mBMMSCs)衰老^[13],抑制细胞增殖,而TGF- β 受体抑制剂A83-01可以促进人子宫内膜MSCs增殖,这提示TGF- β 信号的增殖抑制作用^[14]。相反,也有研究^[15-17]支持TGF- β 1促进MSCs增殖的作用。这些研究结果的不同可能是由细胞来源、种属、个体差异导致的。TGF- β 2是具有多种生物学效应的关键细胞因子,已经证实TGF- β 2在调控细胞生长、促进细胞增殖和分化以及胚胎发育等多个生理过程中具有重要作用^[10,18]。研究^[12]表明,碱性成纤维细胞生长因子(FGF2)可以促进hMSCs增殖,抑制其衰老,其主要机制是通过下

调细胞中TGF- β 2的水平,表明TGF- β 2具有促衰老作用。然而,目前猪源间充质干细胞体外复制性衰老过程中TGF- β 2的表达变化及其对细胞衰老的调控作用及机制尚未见报道。

为探究TGF- β 2在猪骨髓间充质干细胞(pBMMSCs)体外复制性衰老中的作用及其机制,本研究通过分离获得pBMMSCs,研究体外长期培养过程中TGF- β 2水平的变化,确定TGF- β 2对pBMMSCs生长、增殖、衰老和细胞周期的影响,同时探讨了其对线粒体活性氧(mtROS)、抗氧化酶及细胞周期相关调控基因表达的作用。本研究旨在为挖掘猪间充质干细胞衰老的重要调控因子、靶点基因以及深入理解细胞衰老的诱发机制提供实验依据,为开发新的干预策略以维持干细胞的活力和体外规模化制备提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4日龄长白猪,由北京隆安实验动物养殖中心提供,许可证号为2021(京)-0014。

1.1.2 试剂与仪器

DMEM/F12培养基,Gibco公司;胎牛血清(FBS),AusGeneX公司;胰蛋白酶、青霉素和链霉素混合液、油红O、茜素红、胰岛素、地塞米松,北京索莱宝生物科技有限公司;吡哆美辛,美国MCE公司;FITC-CD90抗体、APC-CD44抗体、PE-CD34抗体,BioLegend公司;PerCP-CD45抗体,美国BD公司;TGF- β 2 ELISA检测试剂盒,上海茁彩生物科技有限公司;TGF- β 2, PeproTech公司;逆转录试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;EdU细胞增殖检测试剂盒,Meilunbio公司; β -半乳糖苷酶(β -gal)染色试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

Nikon ECLIPSE TE2000-U型倒置显微镜、Nikon ECLIPSE Ti型倒置荧光显微镜,日本Nikon公

司; MANDELA 型多功能酶标仪, BD Biosciences 公司; StepOne 型实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; HERACELL VIOS 160i 型 CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 pBMMSCs 的分离培养

细胞的分离、鉴定参考文献[19]的方法。4 日龄长白猪麻醉后, 在无菌环境下取双侧胫骨和肱骨, 去除干骺端, 暴露骨髓腔, 用 1 mL 无菌注射器抽取完全培养基(含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基)反复冲洗髓腔直至骨干发白, 收集骨髓冲洗液, 充分吹悬混匀, 接种在平皿中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 36 h, 用 PBS 冲洗 2~3 次, 洗去未贴壁细胞, 每 2 天更换一次培养基, 0.25% 胰酶消化传代培养, 在倒置显微镜下观察形态变化。

1.2.2 pBMMSCs 的鉴定

取第 4(P4)代 pBMMSCs, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 多次洗涤和离心后, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 以 100 μ L 分装于流式管中, 分别加入阳性表面标记 CD44-APC、CD90-FITC 抗体以及阴性表面标记 CD34-PE、CD45-PerCP 抗体, 充分振荡, 在冰上或 4 °C 避光条件下孵育 30 min 后离心弃上清液, PBS 重悬细胞后利用流式细胞仪检测。

取 P4 代 pBMMSCs 以 5×10^4 个/mL 细胞密度接种于 6 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 当细胞融合度达到 80%~90% 时, 分别进行成脂和成骨诱导^[19]。诱导结束后, 利用油红 O 染色鉴定细胞成脂分化能力, 利用茜素红染色鉴定细胞成骨分化能力, 在倒置显微镜下观察染色结果并拍照。

1.2.3 pBMMSCs 传代培养过程中 TGF- β 2 的表达

分别收集第 5(P5)、第 10(P10)和第 15(P15)代细胞的上清液, 实验步骤参考 ELISA 试剂盒说明书, 利用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度, 计算不同代细胞上清液中的 TGF- β 2 水平。

1.2.4 细胞生长曲线的测定

将 P5 代细胞以 1×10^4 个/mL 细胞密度接种于 24 孔板中, 分别用 1、10、100 ng/mL TGF- β 2 处理细胞, 每 24 h 使用血细胞计数板计数, 连续测定 6 d。以培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.2.5 EdU 染色检测细胞增殖

EdU 染色参考试剂盒说明书进行, 将细胞以 1×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 24 孔板中, 分别用 1、10、100 ng/mL TGF- β 2 处理 24 h, 加入 $2 \times$ EdU 工作

液孵育 2 h, 多聚甲醛固定 15 min, 通透液处理 15 min, 加入反应液并置于摇床避光孵育 0.5 h, Hoechst 33342 染细胞核, 在倒置荧光显微镜下观察并拍照, 计算 EdU 阳性细胞比例。

1.2.6 β -gal 染色检测细胞衰老

β -gal 染色方法参考试剂盒说明书, 细胞经 TGF- β 2 处理(与 1.2.5 节方法相同)后, 用固定液在室温下固定 15 min, 染色工作液 37 °C 孵育 18~42 h, 在倒置显微镜下观察并采集图像, 阳性表达为蓝色, 计算阳性细胞数。

1.2.7 线粒体活性氧分析

利用 MitoSOXTMRed 线粒体超氧化物指示剂分析细胞中 mtROS 水平, 细胞经 TGF- β 2 处理(与 1.2.5 节方法相同)后, 加入 5 μ mol/L MitoSOXTM 试剂工作液, 37 °C 避光孵育 10 min, 用倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期

将细胞以 2×10^5 个/mL 细胞密度接种于直径为 60 mm 的细胞培养皿中, TGF- β 2 处理 24 h, 在胰酶消化、重悬离心后, 用 70% 乙醇固定细胞, 4 °C 过夜后离心, 重悬后将细胞悬液转入流式管中, 加入 500 μ L 碘化丙啶后进行流式细胞仪检测。

1.2.9 实时荧光定量 qPCR 检测基因 mRNA 水平

TGF- β 2 处理后的细胞样品用 Trizol 试剂裂解, 离心弃去上清液, 加入 200 μ L 氯仿抽提, 加 75% 乙醇溶液离心并弃去上清液, 干燥 RNA 沉淀 8 min, 将沉淀溶于 20 μ L DEPC 水中, 使用紫外分光光度计定量; 逆转录成 cDNA, 采用 Bestar Sybr Green qPCR Master Mix 进行扩增和检测。引物序列见表 1。逆转录定量 PCR(RT-qPCR)反应体系: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min, 循环 40 次, 以 GAPDH 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

引物名称	引物序列
GAPDH	上游: 5'-TCGGAGTGAACGGATTG-3'
	下游: 5'-ATTGTAGTGTGGCGGGAT-3'
TGF- β 2	上游: 5'-CTTTGGATGCGGCCTATTGC-3'
	下游: 5'-CTGCTGTGCTGAGTGTCTGA-3'
OCT4	上游: 5'-GTCGCCAGAAGGGCAAAC-3'
	下游: 5'-CAGGGTGGTGAAGTGAGGG-3'
PCNA	上游: 5'-TAATGCAGACACCTTGGCACT-3'
	下游: 5'-GTGCAAATTCACCAGAAGGCA-3'
Ki67	上游: 5'-CCCATGAAGAAGACGGAGGG-3'
	下游: 5'-CGGATGGCTGAGGCTGATG-3'

续表

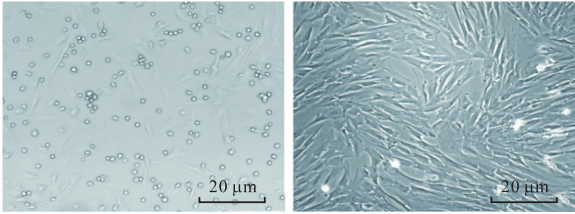
引物名称	引物序列
P53	上游:5'-TCCTCGCCAGTGCGA-3'
	下游:5'-TTCAGCTCCAAGGCGTCATT-3'
P21	上游:5'-TACTCCCTGCCCTCAACAAGA-3'
	下游:5'-CGCTATCTGAGCAGCGCTCAT-3'
SOD2	上游:5'-GGCCTACGTGAACAACCTGA-3'
	下游:5'-TGATTGATGTGGCTCCACC-3'

2 结果与分析

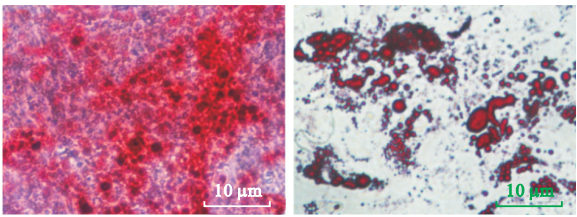
2.1 猪骨髓间充质干细胞培养及鉴定

在倒置显微镜下观察 pBMMSCs 细胞形态并拍照,如图 1 所示。在培养 1 d 时,原代(P0 代)细胞从组织团块中爬出,细胞形态呈球形或扁梭形,且体积较小〔图 1(a)〕,传代后的细胞形态呈长梭形,且细胞生长总体具有方向性〔图 1(b)〕。成骨诱导后可观察到较多的钙化结节,钙化的细胞外基质呈红色,证明其具有成骨分化能力〔图 1(c)〕;成脂诱导后细胞形成了规则的圆形红色脂滴,证明其具有成脂分化能力〔图 1(d)〕。流式细胞术证实 pBMMSCs 高

表达 CD44 和 CD90,而不表达阴性标记物 CD34、CD45(图 2)。这些结果显示,分离提取的细胞为猪骨髓间充质干细胞,具有成骨、成脂等分化潜能。



(a) P0 代 pBMMSCs 细胞形态 (b) P3 代 pBMMSCs 细胞形态



(c) 茜素红染色 (d) 油红 O 染色

图 1 猪骨髓间充质干细胞的细胞形态及分化能力

Fig.1 Cell morphology and differentiation potential of pBMMSCs

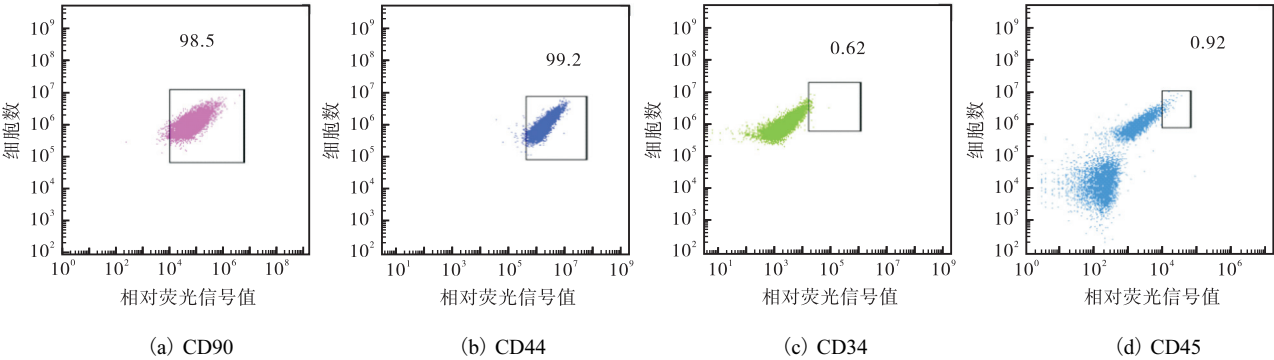


图 2 P4代猪骨髓间充质干细胞表型鉴定

Fig.2 Phenotypic identification of pBMMSCs at P4

2.2 TGF-β2 在 pBMMSCs 体外复制性衰老过程中的表达变化

P5、P10、P15 代细胞中 TGF-β2 的 mRNA 水平和蛋白水平如图 3 所示。由图 3(a)可以观察到,年轻细胞呈现成纤维形态,增殖情况良好,而随着细胞代数的增加,细胞体积开始增大,出现扁平、肥大等细胞衰老特征。由图 3(b)和图 3(c)可知,与 P5 代 pBMMSCs 相比,P10 和 P15 代 β-gal 阳性细胞比例均显著增多。这些变化表明,pBMMSCs 在体外长期培养过程中呈现复制性衰老。

进一步利用 RT-qPCR 和 ELISA 技术分别对不同代数的 pBMMSCs 中 TGF-β2 的 mRNA 和蛋白水平进行检测,结果如图 3(d)和图 3(e)所示。TGF-β2

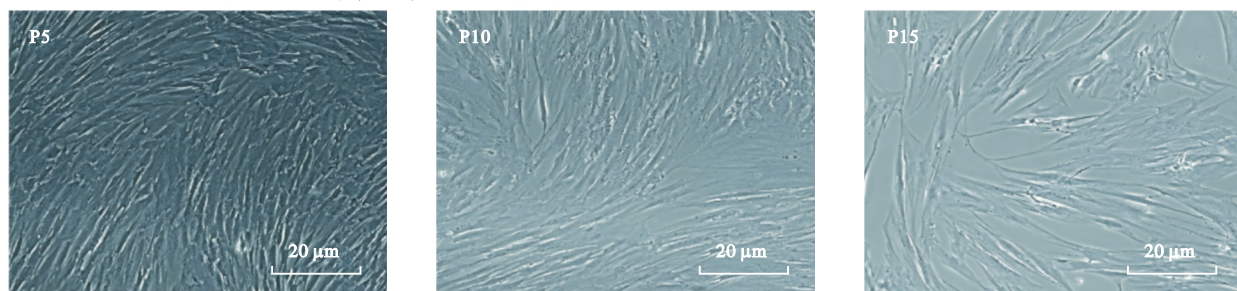
的 mRNA 水平和蛋白水平均随着细胞代数的增加而显著上升,蛋白含量从 P5 代时的(41.97 ± 9.46) pg/mL 上升至 P15 代时的(77.04 ± 3.44) pg/mL, TGF-β2 达到最高水平。这些结果说明,pBMMSCs 体外衰老过程中 TGF-β2 的逐渐增加,表明 TGF-β2 可能在 pBMMSCs 的衰老中具有重要作用。

2.3 TGF-β2 对 pBMMSCs 形态和生长的影响

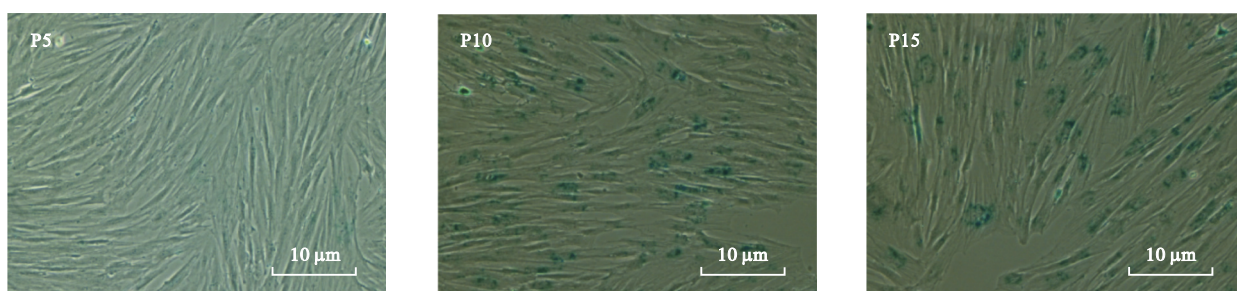
为探究 TGF-β2 对 pBMMSCs 生长的影响,分别利用 1、10、100 ng/mL TGF-β2 处理细胞,观察其形态变化并测定其生长曲线,结果如图 4 所示。在 TGF-β2 处理下,细胞形态由长梭形向不规则形状转变,部分细胞变得薄且宽大,呈现扁平状,同时细胞之间的间隔增加,呈现出片状老化的特征,上述特征随着

TGF- β 2 质量浓度的增加变得更加显著。生长曲线数据显示, 与对照组相比, 所有 TGF- β 2 处理组细胞在 24 h 后就展示出生长减慢的现象, 在第 3 天开始与对

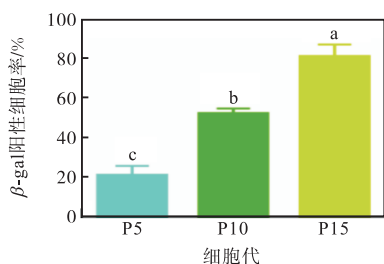
照组细胞数量表现出显著差异, 说明 TGF- β 2 以剂量依赖的方式抑制 pBMMSCs 的生长。



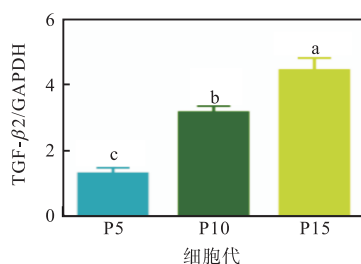
(a) P5、P10 和 P15 代猪骨髓间充质干细胞形态



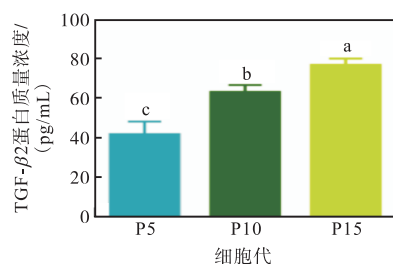
(b) P5、P10 和 P15 代猪骨髓间充质干细胞 β -gal 染色



(c) β -gal 染色结果的定量分析



(d) TGF- β 2 mRNA 水平

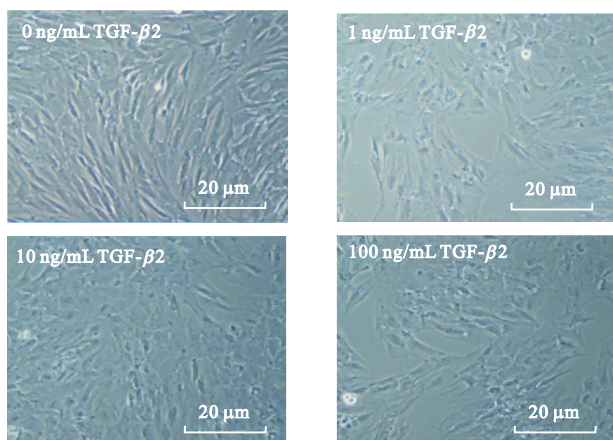


(e) TGF- β 2 蛋白质量浓度

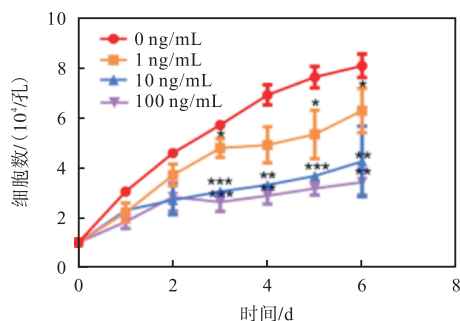
注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 P5、P10、P15 代 pBMMSCs 细胞中 TGF- β 2 的 mRNA 水平和蛋白质量浓度

Fig. 3 mRNA level and protein mass concentration of TGF- β 2 in pBMMSCs at P5, P10 and P15



(a) 加药处理后 pBMMSCs 的形态学变化

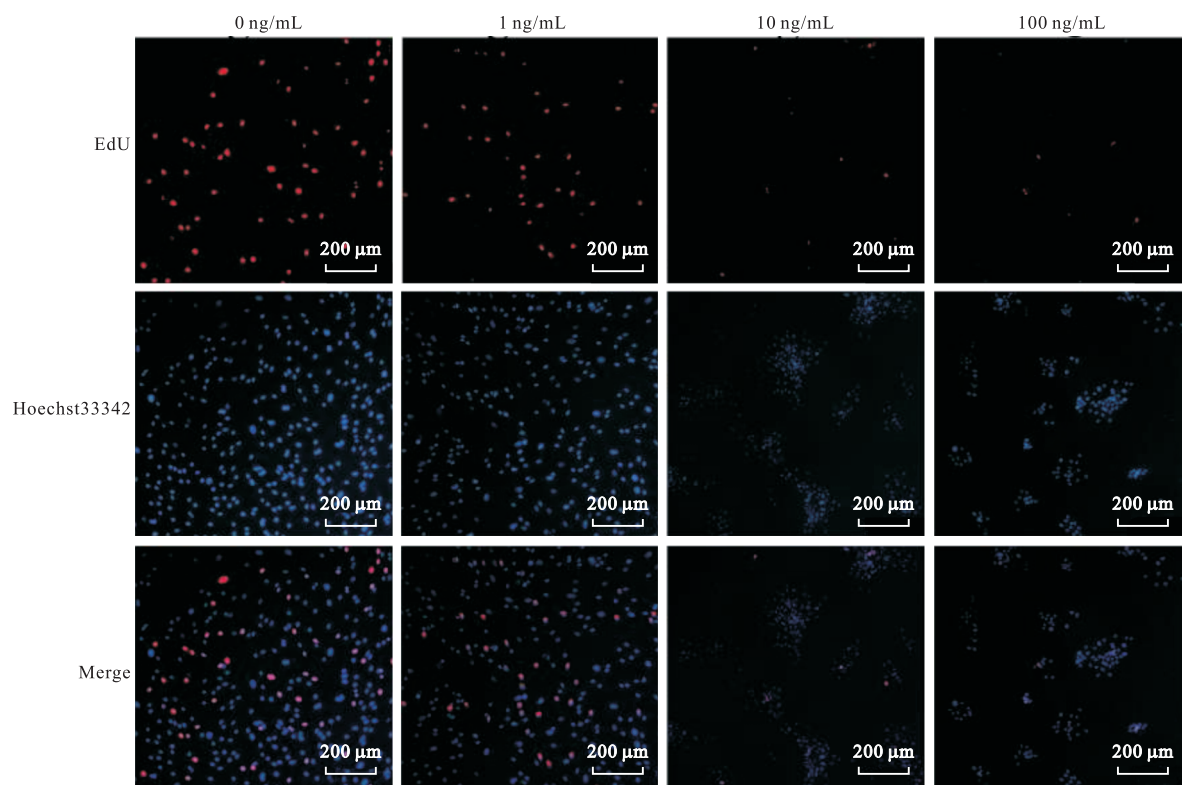


注: **和***分别表示组间差异显著 ($P < 0.01$) 和组间差异极显著 ($P < 0.001$)。

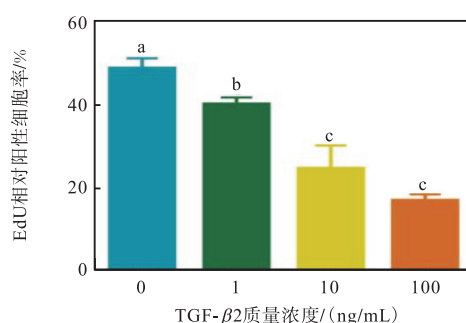
(b) 生长曲线

图 4 TGF- β 2 对 pBMMSCs 形态和生长的影响

Fig. 4 Effects of TGF- β 2 on the morphology and growth of pBMMSCs



(a) EdU 染色检测



(b) 定量分析

注:不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 TGF-β2对pBMMSCs细胞增殖能力的影响

Fig. 5 Effect of TGF-β2 on the proliferation capability of pBMMSCs

2.4 TGF-β2对pBMMSCs细胞增殖能力的影响

TGF-β2对pBMMSCs增殖的影响如图5所示,与对照组相比,1、10、100 ng/mL TGF-β2处理组EdU阳性细胞数量逐渐降低,具有显著差异,并且随着质量浓度的升高,对细胞增殖的抑制作用更为显著。这些结果说明TGF-β2可以抑制pBMMSCs增殖,并且这种抑制作用具有浓度依赖性。

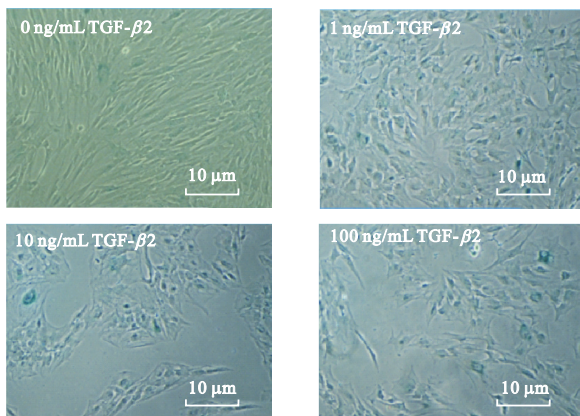
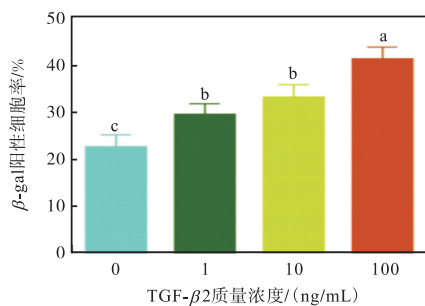
2.5 TGF-β2对pBMMSCs细胞衰老的影响

TGF-β2对pBMMSCs细胞衰老的影响如图6所示。相较于对照组,TGF-β2处理组细胞形态呈现明显老化趋势,其中10 ng/mL和100 ng/mL TGF-β2处

理组β-gal阳性细胞数显著增多。这些结果表明,TGF-β2可以促进pBMMSCs衰老且呈剂量依赖性。

2.6 TGF-β2对pBMMSCs线粒体活性氧的影响

mtROS的产生会导致线粒体功能缺陷,进一步损害MSCs中DNA修复途径,从而导致细胞衰老^[20]。因此,通过MitoSOX™Red线粒体超氧化物指示剂,探究TGF-β2引起的细胞衰老是否与线粒体活性氧相关,结果如图7所示。与对照组相比,1、10、100 ng/mL TGF-β2作用24 h后,pBMMSCs中mtROS明显增加。这些结果说明TGF-β2可能通过上调mtROS水平诱导pBMMSCs衰老。

(a) β -gal 染色

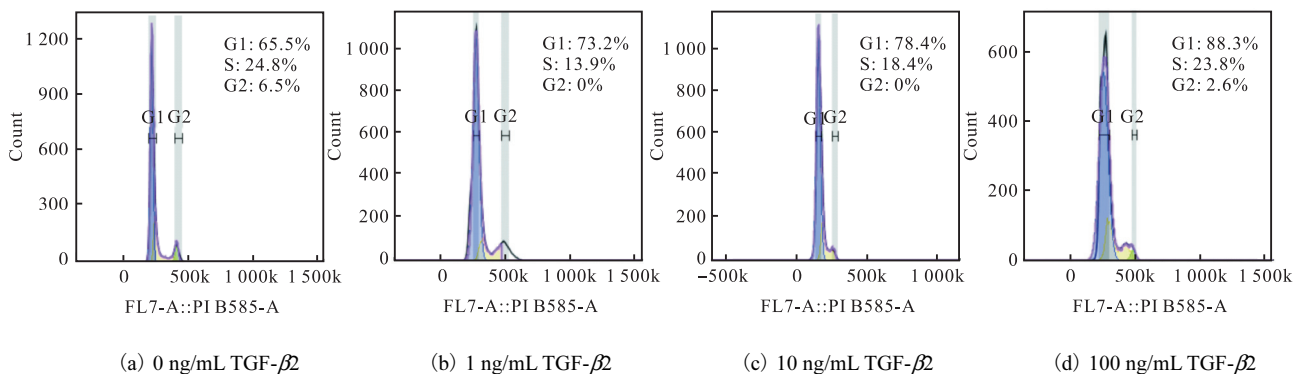
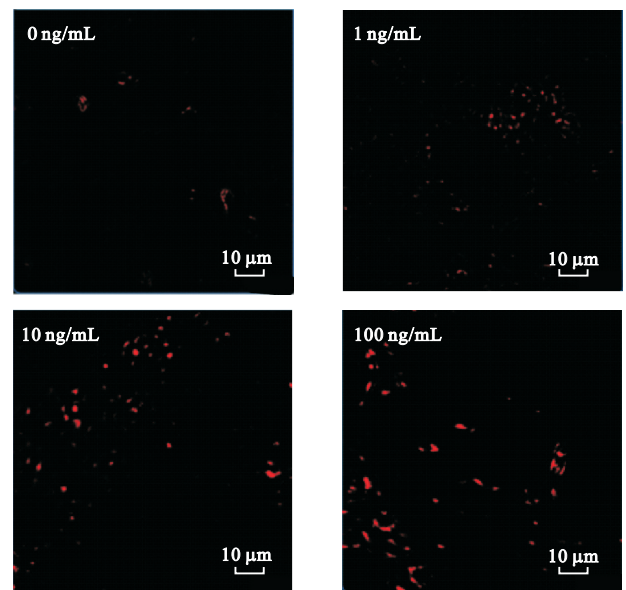
注: 不同字母代表不同 TGF- β 2 浓度处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。

(b) 定量分析

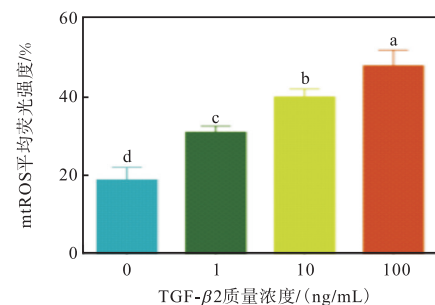
图 6 TGF- β 2 对 pBMMSCs 细胞衰老的影响Fig. 6 Effect of TGF- β 2 on the senescence of pBMMSCs

2.7 TGF- β 2 对 pBMMSCs 细胞周期的影响

衰老会导致永久性的细胞周期阻滞, 使间充质干细胞失去自我更新的能力。TGF- β 2 对 pBMMSCs 细胞周期的影响如图 8 所示。对照组及低、中、高剂量 TGF- β 2 组中分别有 65.5%、73.2%、78.4%、88.3% 的细胞分布在 G1 期, 随着 TGF- β 2 质量浓度的增加, G1 期细胞的占比逐渐上升。结果表明, TGF- β 2 可诱导 pBMMSCs 发生细胞周期阻滞, 主要阻滞在 G1 期。

图 8 TGF- β 2 对 pBMMSCs 细胞周期的影响Fig. 8 Effect of TGF- β 2 on the cell cycle of pBMMSCs

(a) 线粒体活性氧染色



(b) 定量分析

图 7 TGF- β 2 对 pBMMSCs 线粒体活性氧的影响Fig. 7 Effect of TGF- β 2 on mitochondrial reactive oxygen species in pBMMSCs

2.8 TGF- β 2 对 pBMMSCs 中相关基因表达的影响

干性基因 OCT4 是调节干细胞自我更新的重要转录因子, 干性基因 OCT4 的下调会降低间充质干细胞的干性^[21]。Ki67 和 PCNA 都是与细胞增殖相关的核蛋白。

PCNA 主要在 S 期表达并参与 DNA 合成,是细胞增殖的主要标志基因^[22]。通过 RT-qPCR 检测干性标志基因 OCT4 和增殖基因 PCNA、Ki67 mRNA 表达水平,结果如图 9 所示。与对照组相比,随着 TGF- β 2 质量浓度的增加,OCT4、PCNA 和 Ki67 的 mRNA 水平均显著降低。转录因子 p53 参与多种细胞生物学过程,包括 DNA 修复、代谢途径控制和驱动细胞衰老。p21 是 p53 的主要靶基因,p53 通过激活 p21 转录诱发细胞周期停滞和细胞凋亡。随着 TGF- β 2 质

量浓度不断升高,细胞周期抑制因子 p53、p21 的 mRNA 水平呈现显著上升趋势。超氧化物歧化酶-2(SOD2)是一种线粒体基质酶,能够清除积累的活性氧(ROS),发挥抗氧化和保护线粒体功能的作用,与细胞衰老呈负相关^[23]。结果发现,随着 TGF- β 2 质量浓度的升高,SOD2 表达逐渐降低。这些结果表明,TGF- β 2 可能通过下调干性基因 OCT4 的表达、上调细胞周期抑制基因 p53、p21 的 mRNA 水平以及降低抗氧化酶 SOD2 的 mRNA 水平促进细胞衰老。

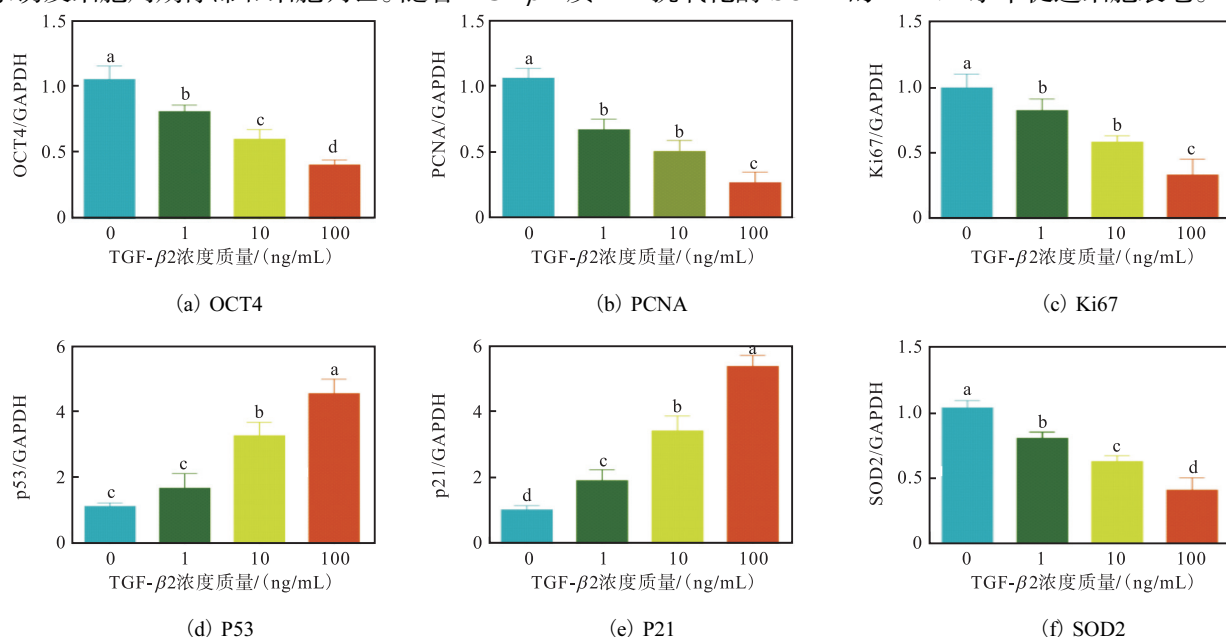


图9 TGF- β 2对猪骨髓间充质干细胞线粒体活性氧、细胞周期以及相关基因表达量的影响

Fig. 9 Effects of TGF- β 2 on mitochondrial reactive oxygen species, cell cycle and related gene expression in pBMMSCs

3 讨论

干细胞在体外长期培养过程中维持细胞的高效增殖能力是干细胞在组织工程和细胞培养肉规模化生产等领域应用的基础,因而体外大量扩增获得足够的细胞尤为重要。间充质干细胞在体外长期传代培养过程中,细胞干性逐渐下降,细胞生长缓慢且形态扁平肥大,细胞核肿大,呈现不规则状,DNA 损伤增加,细胞周期阻滞,呈现衰老状态^[24]。这一问题是体外大规模扩增间充质干细胞的主要障碍,因此明确影响此过程中的关键基因和机制具有重要意义。本研究发现体外长期传代培养 pBMMSCs 时,细胞呈现衰老表型,同时细胞中 TGF- β 2 的 mRNA 和蛋白质质量浓度显著升高。这些研究结果提示,TGF- β 2 可能是 pBMMSCs 体外复制性衰老的主要标志物。与本文研究结果相似,有文献证实^[25]在体外长期培养

人源 MSCs(hMSCs)时,hMSCs 的增殖率逐渐下降,TGF- β 1 和 TGF- β 2 的 mRNA 表达量随细胞培养时间的延长而显著增加。Kawamura 等^[26]分别从年轻和老年人类供体的骨髓中分离获得了 CD271⁺SSEA-4⁺双阳性间充质干细胞(hDPMSCs),对比发现相对于年轻人,从老年供体中分离得到的 hDPMSCs 中 TGF- β 2 的水平更高。

TGF- β 是一类多效性细胞因子,在调节细胞生长、维持细胞稳态中发挥重要作用^[11]。在影响间充质干细胞衰老过程中,TGF- β 对不同来源细胞的作用有显著差异。在骨髓来源的 MSCs 中^[13],TGF- β 1 以剂量依赖的方式增加衰老标志物 p16^{Ink4a} 和 4-羟基壬烯醛(4-HNE)亚基的表达水平和 β -gal 活性。已有研究证实 5 ng/mL TGF- β 1 可以诱导 hMSCs 衰老,这种变化与 G1 期细胞阻滞和 p16INK4a、p21Cip1、p53 mRNA 表达升高有关^[12]。然而,其他研究表明 TGF- β 1 可能并不诱导 MSCs 衰老,反而促进其增

殖。Jian 等^[15]和 Kim 等^[27]成功分离提取获得 hMSCs,证实加入 TGF- β 1 能够促进 hMSCs 的增殖。Salkin 等^[16]发现 TGF- β 1 过表达对人牙髓来源的间充质基质细胞(DPSCs)具有促增殖作用。这些相互矛盾的研究结果可能与细胞种属来源不同、组织类型不同、个体化差异及具体实验条件等多种因素有关。本研究发现 TGF- β 2 处理的 pBMMSCs 形态呈片状老化,增殖能力下降,衰老的阳性细胞增多,这些结果说明 TGF- β 2 可以促进猪骨髓来源的 MSCs 衰老。

线粒体被称为细胞的“能量工厂”,通过氧化磷酸化产生腺苷三磷酸(ATP),也是细胞中活性氧的主要来源场所,对维持细胞内稳态非常重要。细胞内 ROS 积累或在 H₂O₂ 诱导的氧化损伤中对间充质干细胞造成氧化应激损伤,会进一步引发细胞衰老^[28]。Jung 等^[29]发现激活 EphB2 信号通路可以降低人脐带间充质干细胞(hUCB-MSCs)mtROS 水平,抑制 MSCs 衰老。此外,Oh 等^[30]证实高葡萄糖可以增加 hUCB-MSCs 中 mtROS 的产生,导致细胞复制性衰老。已有研究证实 TGF- β 1 诱导肝细胞和肺上皮细胞衰老与其上调 mtROS 的产生相关^[31-32]。Wu 等^[13]研究 TGF- β 1 通过诱导 mtROS 的增加,损害小鼠骨髓间充质干细胞的功能,进而促进细胞衰老。SOD2 是一种线粒体基质酶,其主要功能是保护线粒体免受氧化自由基的侵害^[33]。研究^[34]表明,SOD2 的缺失和下调均可以增加 mtROS 的产生而导致细胞衰老。本文研究结果显示,暴露于 1、10、100 ng/mL TGF- β 2 24 h 后,pBMMSCs 中 mtROS 明显增加,而 SOD2 的表达显著降低。这些结果说明 TGF- β 2 可能通过抑制 SOD2 的表达提高 mtROS 水平,进而诱发细胞衰老。

细胞衰老与细胞周期阻滞密切相关,p53 和 p21 为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,p53 激活后直接结合 p21/CDKN1A 启动子中的位点,p21/CDKN1A 转录上调,通过抑制 Cyclin A、Cyclin E 等细胞周期基因表达进而促进细胞周期在 G0/G1 期阻滞^[35]。P53/P21 信号通路的激活在 DNA 损伤级联反应诱导 MSCs 衰老过程中发挥重要作用,通常在衰老细胞中表现出表达水平升高的现象^[36]。Ito 等^[12]研究发现,体外长期培养会导致 hMSCs 衰老,引起 G1 期细胞生长停滞,而 FGF-2 可以通过降低 p53、p21、p16 mRNA 的水平抑制细胞周期阻滞。同时,在长期培养过程中 TGF- β 2 表达升高,而 FGF-2 的加入可以抑制 TGF- β 2 的升高,这可能是其抑制细胞周期阻滞的主要原因。本文研究结果显示,TGF- β 2 处理上调了细

胞周期抑制因子 p53、p21 的 mRNA 水平且引起细胞周期阻滞在 G1 期,同时转录因子 OCT4 和增殖标志基因 Ki67、PCNA 的 mRNA 水平显著降低。研究表明,转录因子 OCT4 可以促进 DNA 甲基化转移酶(DNMT)的转录激活,引起 P21 启动子区域甲基化水平升高而抑制其转录,最终促进 MSCs 的增殖而抑制衰老^[37]。Jin 等^[38]发现人参皂苷 Rh-1 可以诱导乳腺癌细胞凋亡和 G0/G1 期细胞周期阻滞,主要原因可能与其增加 mtROS 产生、诱发内质网应激相关。因此,TGF- β 2 引起 pBMMSCs 细胞周期阻滞可能与抑制转录因子 OCT4、上调周期抑制因子 p53 和 p21 以及提高 mtROS 水平有关。

DNA 损伤积累、端粒缩短、蛋白质稳态失衡、氧化应激等均可以诱发细胞衰老,而细胞衰老会导致各种促炎因子分泌增加,包括趋化因子、生长因子等,这些促炎因子又可以影响邻近细胞,形成一种新的衰老表型,称为衰老相关分泌表型(senescent associated secretory phenotype, SASP)。本研究和其他研究^[12,26]均证实 TGF- β 2 分泌可能是间充质干细胞衰老的诱因之一,在间充质干细胞衰老过程中伴随着 TGF- β 2 分泌的增加,而 TGF- β 2 分泌的增加将进一步加速衰老进程。衰老的 MSCs 成骨分化能力下降,将促进骨质疏松症的发生和发展。因此,TGF- β 2 在衰老中的作用研究揭示了衰老过程中干细胞微环境变化的机制,而进一步对衰老个体或者骨代谢相关疾病临床样本的研究将具有重要意义。这些研究结果有望应用于细胞培养肉、组织工程等领域。因此,后期可以通过筛选抑制 TGF- β 2 或其下游信号分子的小分子药物,抑制 TGF- β 2 信号通路的过度激活,进而维持 MSCs 干性,促进细胞增殖。在体内特异性靶向 TGF- β 2 也可能有望应用于骨质疏松症和其他骨代谢疾病的治疗。

综上所述,本研究发现 TGF- β 2 可能是猪骨髓间充质干细胞体外复制性衰老的重要标志基因,TGF- β 2 可能通过增加 mtROS 积累和诱导细胞周期阻滞促进猪骨髓间充质干细胞衰老,这些研究为开发新的干预策略以维持干细胞的活力和大规模培养细胞提供了实验基础。

参考文献:

- [1] 张苏尧,蒋炳浩,蒋涛,等. 骨髓间充质干细胞成骨分化相关信号通路[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2024,17(5):513-523.

- [2] 朱彩玉,王壮壮,李胜,等. 基于 PI3K/AKT/mTORC 信号通路探讨骨髓通颗粒对人骨髓间充质干细胞成脂分化负性调节的机制研究[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(21): 1634–1643.
- [3] LU G D, CHENG P, LIU T, et al. BMSC-Derived exosomal miR-29a promotes angiogenesis and osteogenesis[J]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020, 8: 608521.
- [4] 张晓宇,李佩霖,汤杰,等. 具有抗氧化能力的人脐带间充质干细胞制备及评价策略研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2024, 32(6): 1888–1895.
- [5] 林美玉,赵玺龙,高景,等. 干细胞抗卵巢颗粒细胞衰老的作用机制及进展[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(25): 5414–5421.
- [6] 袁潇,梁松林,谢亚楠,等. 不同来源间充质干细胞治疗炎症性肠病[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(31): 6811–6820.
- [7] 马永杰,赵鹏鹏,龚素华,等. 秦岭大熊猫骨髓、牙髓和脂肪组织来源间充质干细胞的分离与鉴定[J]. 动物医学进展, 2023, 44(10): 24–30.
- [8] 杨紫恩,欧阳明玥,王丽丽,等. 脐带间充质干细胞来源外泌体对大鼠放射性肺损伤作用及机制研究[J]. 创伤与急危重病医学, 2024, 12(4): 216–221.
- [9] FITZSIMMONS R E B, MAZUREK M S, SOOS A, et al. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering[J]. *Stem cells international*, 2018, 2018: 8031718.
- [10] WANG M Y, LIU W J, WU L Y, et al. The research progress in transforming growth factor- β 2[J]. *Cells*, 2023, 12(23): 2739.
- [11] PENG D D, FU M Y, WANG M N, et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. *Molecular cancer*, 2022, 21(1): 104.
- [12] ITO T, SAWADA R, FUJIWARA Y, et al. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 359(1): 108–114.
- [13] WU J F, NIU J, LI X P, et al. TGF- β 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production[J]. *BMC Developmental biology*, 2014, 14: 21.
- [14] GURUNG S, WERKMEISTER J A, GARGETT C E, et al. Inhibition of transforming growth factor- β receptor signaling promotes culture expansion of undifferentiated human endometrial mesenchymal stem/stromal cells[J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 15042.
- [15] JIAN H Y, SHEN X, LIU I, et al. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF- β 1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells[J]. *Genes and development*, 2006, 20(6): 666–674.
- [16] SALKIN H, GÖNEN Z B, ERGEN E, et al. Effects of TGF- β 1 overexpression on biological characteristics of human dental pulp-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Stem cells international*, 2019, 12(1): 170–182.
- [17] WALENDA G, ABNAOF K, JOUSSEN S, et al. TGF-beta1 does not induce senescence of multipotent mesenchymal stromal cells and has similar effects in early and late passages[J]. *Public library of science one*, 2013, 8(10): e77656.
- [18] KIM H, CHOI N, KIM D Y, et al. TGF- β 2 and collagen play pivotal roles in the spheroid formation and anti-aging of human dermal papilla cells[J]. *Aging*, 2021, 13(16): 19978–19995.
- [19] 刘少斐,许冰冰. 骨髓间充质干细胞的分离、培养、鉴定及其在关节软骨损伤修复中的相关应用[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 149–154.
- [20] ZHAO M, LIU S Y, WANG Y Z, et al. The mitochondria-paraspeckle axis regulates the survival of transplanted stem cells under oxidative stress conditions[J]. *Theranostics*, 2024, 14(4): 1517–1533.
- [21] 徐天. OCT4 调控猪胚胎干细胞多能性维持的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [22] BEN-IZHAK O, BAR-CHANA M, SUSSMAN L, et al. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma[J]. *Histopathology*, 2002, 41(6): 519–525.
- [23] 于吴鲸,钟云青. 衰老标记物沉默信息调节因子 1、超氧化物歧化酶 2、p21 和 Ku70 在支气管扩张中的作用机制研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2024, 8(23): 115–118.
- [24] DEBACQ-CHAINIAUX F, BORLON C, PASCAL T, et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β 1 signaling pathway[J]. *Journal of cell science*, 2005, 118(4): 743–758.
- [25] SAWADA R, ITO T, TSUCHIYA T, et al. Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in com-

- parison with cancer cells[J]. Journal of artificial organs, 2006, 9(3): 179–184.
- [26] KAWAMURA H, NAKATSUKA R, MATSUOKA Y, et al. TGF- β signaling accelerates senescence of human bone-derived CD271 and SSEA-4 double-positive mesenchymal stromal cells[J]. Stem cell reports, 2018, 10(3): 920–932.
- [27] KIM Y I, RYU J S, YEO J E, et al. Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 450(4): 1593–1599.
- [28] 陈宣凝, 陈旻希, 李欣佳, 等. 线粒体在骨髓间充质干细胞衰老中的作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2024, 17(4): 403–408.
- [29] JUNG Y H, LEE H J, KIM J S, et al. EphB2 signaling-mediated Sirt3 expression reduces MSC senescence by maintaining mitochondrial ROS homeostasis[J]. Free radical biology and medicine, 2017, 110: 368–380.
- [30] OH J Y, CHOI G E, LEE H J, et al. 17 β -Estradiol protects mesenchymal stem cells against high glucose-induced mitochondrial oxidants production via Nrf2/Sirt3/MnSOD signaling[J]. Free radical biology and medicine, 2019, 130: 328–342.
- [31] ALBRIGHT C D, SALGANIK R I, CRACIUNESCU C N, et al. Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes[J]. Journal of cellular biochemistry, 2003, 89(2): 254–261.
- [32] YOON Y S, LEE J H, HWANG S C, et al. TGF- β 1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells[J]. Oncogene, 2005, 24(11): 1895–1903.
- [33] VELARDE M C, FLYNN J M, DAY N U, et al. Mitochondrial oxidative stress caused by SOD2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin[J]. Aging, 2012, 4(1): 3–12.
- [34] MARCHI S, GIORGI C, SUSKI J M, et al. Mitochondria-ROS crosstalk in the control of cell death and aging[J]. Journal of receptors and signal transduction, 2012, 2012: 329635.
- [35] ENGELAND K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM[J]. Cell death and differentiation, 2018, 25(1): 114–132.
- [36] GU Z F, JIANG J X, TAN W, et al. p53/p21 Pathway involved in mediating cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients[J]. Clinical & developmental immunology, 2013, 2013: 134243.
- [37] LU Y, QU H N, QI D, et al. OCT4 maintains self-renewal and reverses senescence in human hair follicle mesenchymal stem cells through the downregulation of p21 by DNA methyltransferases[J]. Stem cell research and therapy, 2019, 10(1): 28.
- [38] JIN Y J, HUYNH D T N, HEO K S, et al. Ginsenoside Rh1 inhibits tumor growth in MDA-MB-231 breast cancer cells via mitochondrial ROS and ER stress-mediated signaling pathway[J]. Archives of pharmacal research, 2022, 45(3): 174–184.

责任编辑: 郎婧