

本文引用: 肖宜超, 朱清一, 刘振国, 等. 高脂饮食对高龄小鼠骨髓间充质干细胞亚群数量的影响及机制研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(2): 93-99, 116.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-02-0093-08

· 血管损伤与血管衰老专栏 ·

高脂饮食对高龄小鼠骨髓间充质干细胞亚群数量的影响及机制研究

肖宜超, 朱清一, 刘振国, 刘启明, 周胜华

(中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[专家简介] 周胜华, 教授, 博士研究生导师, 中南大学湘雅二医院心血管内科主任, 中南大学湘雅名医, 中南大学一级主任医师。第三届“国之名医·优秀风范”奖获得者。中华医学会心血管病学专业委员会常务委员兼副秘书长、中国医师协会心血管内科医师分会副会长、常务委员。湖南省心血管病学委员会主任委员、湖南省心血管病医院(中心)主任、湖南省心血管病介入治疗中心主任、湖南省临床介入治疗质量控制中心主任、湖南省心血管疾病现代医疗技术研究中心主任。中国知名介入心脏病专家, FACC、FHRS、卫生部有突出贡献中青年专家、“卫生部优秀青年科技人才”、全国医学专业学位研究生教育指导委员会委员、高等教育出版社临床医学教材建设委员会副主任委员、国家心血管病介入诊疗质量控制专家、国家心血管病中心专家组成员、中国科学院大学兼职教授、享受国务院特殊津贴, 中国医师协会心力衰竭分会副主任委员、中国生物医学工程学会心律分会常务委员、中国心律学会常务理事。主要从事心血管疾病诊疗相关研究。2016年9月起担任 *Journal of Interventional Cardiology* 编辑, 并于2018年8月起连任, 多年来担任《中华医学杂志英文版》《中华心律失常学杂志》《中国心脏起搏与心电生理杂志》《中国介入心脏病学杂志》《中南大学学报医学版》等杂志编委。近年主持国家自然科学基金原创探索计划项目1项, 面上项目4项, 美国中华医学基金会项目1项, 卫生部重点部属医院临床学科重点项目1项, 近年以通信作者在 *NEJM*、*Lancet*、*JACC* 等杂志发表学术论文70余篇; 以第一完成人获湖南省科技进步奖8项; 2016年主编高等教育出版社出版的《内科学》本科生精品教材, 参编英文介入心脏病学专著2部。



[关键词] 高脂饮食; 骨髓间充质干细胞; N-乙酰半胱氨酸; 活性氧; 氧化应激; 高龄

[摘要] **目的** 探讨长期高脂饮食(HFD)对高龄小鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)亚群数量的影响及机制。**方法** 将40周龄雄性C57BL/6野生型(WT)小鼠随机分为3组: WT+正常饮食(ND)组、WT+HFD组及WT+HFD+N-乙酰半胱氨酸(NAC)组; 将40周龄雄性转基因(TG)小鼠(过表达超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶)随机分为2组: TG+ND组、TG+HFD组。每组干预周期3个月。采用Alere Cholestech LDX[®]血脂分析仪检测各组总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、非高密度脂蛋白(non-HDL)及TC/HDL水平; 流式细胞术分析骨髓及外周血BMSC亚群数量变化; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记法检测细胞增殖; 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染法检测细胞凋亡; 流式活性氧(ROS)检测试剂标记法检测ROS水平。**结果** HFD小鼠BMSC内ROS生成显著增加。NAC可逆转HFD小鼠血清TC、TG、LDL及non-LDL水平。HFD小鼠骨髓中BMSC亚群Lin⁻c-Kit⁺细胞数量显著减少, 但血液中的Lin⁻c-Kit⁺细胞数量未减少, 而HFD小鼠和正常饮食小鼠的骨髓和血液中的BMSC亚群Lin⁻Sca-1⁺或Lin⁻CD133⁺细胞数量相似。HFD显著抑制骨髓Lin⁻c-Kit⁺细胞的体内增殖并增加其凋亡。NAC处理或转基因小鼠模型均有效地阻止了HFD诱导的BMSC内ROS的产生和骨髓Lin⁻c-Kit⁺细胞的减少。**结论** HFD通过增加ROS的产生选择性地降低高龄小鼠骨髓BMSC亚群Lin⁻c-Kit⁺细胞数量。

[中图分类号] Q291;R5

[文献标识码] A

[收稿日期] 2021-04-30

[修回日期] 2021-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目面上项目(81870258); 湖南省自然科学基金青年基金项目(2019JJ50893)

[作者简介] 肖宜超, 博士, 主治医师, 研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 yichaoxiao@csu.edu.cn。周胜华, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 zhoushenghua@csu.edu.cn。

Effect of high-fat diet on the number of bone marrow-derived mesenchymal stem cell subsets in elderly mice and its mechanism

XIAO Yichao, ZHU Qingyi, LIU Zhenguo, LIU Qiming, ZHOU Shenghua

(Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] high-fat diet; bone marrow-derived mesenchymal stem cell; N-acetylcysteine; reactive oxygen species; oxidative stress; elderly

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of long-term high-fat diet (HFD) on the number of bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) subsets in elderly mice and its mechanism. **Methods** Forty week old male C57BL/6 wild type (WT) mice were randomly divided into three groups: WT+normal diet (ND) group, WT+HFD group and WT+HFD+N-acetylcysteine (NAC) group. Forty week old male transgene (TG) mice (overexpressing superoxide dismutase and glutathione peroxidase) were randomly divided into two groups: TG+ND group and TG+HFD group. The intervention period of each group was three months. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), non-high density lipoprotein (non-HDL) and TC/HDL in each group were determined by Alere Cholestech LDX[®] blood lipid analyzer. The quantity changes of BMSC subsets in bone marrow and peripheral blood were analyzed by flow cytometry. Cell proliferation was detected by 5-bromo-2'-deoxyuridine labeling method. Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide double staining method was used to detect cell apoptosis. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by flow cytometric ROS detection reagent labeling method.

Results The production of ROS in BMSC of HFD mice increased significantly. NAC could reverse the levels of serum TC, TG, LDL and non-LDL in HFD mice. The number of BMSC subsets Lin⁻c-Kit⁺ cells in bone marrow of HFD mice decreased significantly, but the number of Lin⁻c-Kit⁺ cells in blood did not decrease. The numbers of BMSC subsets Lin⁻Sca-1⁺ or Lin⁻CD133⁺ cells were similar in bone marrow and blood of HFD mice and normal diet mice. HFD significantly inhibited the proliferation and increased apoptosis of bone marrow Lin⁻c-Kit⁺ cells in vivo. NAC treatment or transgenic mouse model effectively prevented the production of ROS in BMSC and the reduction of bone marrow Lin⁻c-Kit⁺ cells induced by HFD. **Conclusion** HFD selectively decreases the number of bone marrow BMSC subsets Lin⁻c-Kit⁺ cells by increasing the production of ROS in elderly mice.

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC),如骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BMSC),是组织修复和再生细胞治疗的重要来源^[1-3]。大多数需要细胞治疗的患者,尤其是缺血性心脏病患者,往往为伴有代谢异常(包括高脂血症)的高龄患者^[2]。细胞治疗的有效性最终可能与供者 BMSC 的数量和功能有关^[4],而高龄是影响细胞增殖、衰老和旁分泌功能的重要因素,故对 BMSC 的治疗效力和结果发挥重要作用^[5]。然而,高龄状态对 BMSC 数量和功能的影响目前尚不清楚。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)长期以来被认为是炎症反应的主要贡献者,在氧化应激和细胞功能(包括细胞信号传导、增殖、基因转录和表达以及细胞损伤和死亡)中发挥重要作用^[6-8]。一系列研究^[6-9]表明 ROS 和相关氧化应激参与干细胞和祖细胞(包括 BMSC)数量和/或功能的调节,但过度激活的 ROS 和相关的氧化应激反应可显著损害干细胞的数量,从而降低干细胞治疗的有效性。

ROS 是体内多种来源(包括能量代谢)的天然产物^[10-12]。西方饮食富含动物脂肪,而高脂饮食

(high-fat diet, HFD)已被证明能显著增加促炎细胞因子(如肿瘤坏死因子 α)的产生,并诱导组织氧化应激^[13-14]。本研究旨在验证 HFD 是否可通过增加 ROS 产生改变高龄小鼠 BMSC 数量,内容有两个方面:(1)评价长期 HFD 喂养对高龄小鼠 BMSC 的影响;(2)通过抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)处理或使用过表达抗氧化酶的转基因(transgene, TG)小鼠减少 ROS 的产生,确定 ROS 在介导 HFD 对 BMSC 影响中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

以 40 周龄雄性 C57BL/6 野生型(WT)小鼠为研究对象,采用 HFD 或常规饲料喂养 3 个月。使用脂质分析仪和盒式磁带(Cholestech LDX, CA, USA)定量测定小鼠血清脂质谱,以证实 HFD 喂养 3 个月后高脂血症状态的建立。为了评估 ROS 在介导 HFD 对 BMSC 亚群影响中的作用,使用 NAC 阻断 ROS^[15],或使用 40 周龄雄性 C57BL/6 转基因(TG)

小鼠,后者伴随超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、SOD3 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 的过度表达^[16]。

1.2 试剂与仪器

NAC (Sigma-Aldrich 公司, St. Louis, MO, USA; A7250); Alere Cholestech LDX[®] 血脂分析仪及配套 Alere Cassettes 血脂卡; 紫草素叶绿素 (peridinin-chlorophyll-protein, PerCP) 抗小鼠 Ly-6A/E (Sca-1) 单克隆抗体 (BioLegend 公司, USA); Alexa Fluor 700 抗小鼠 CD34 单克隆抗体 (BD Pharmingen 公司, USA); 别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 抗小鼠 CD133 单克隆抗体 (BioLegend 公司, USA); 太平洋蓝荧光蛋白 (pacific blue) 抗小鼠 Lineage Cocktail 单克隆抗体 (BioLegend 公司, USA); 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) 流式分析试剂盒; 膜联蛋白 (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 凋亡分析试剂盒 (BD Pharmingen 公司, USA); 细胞内 ROS 流式检测干粉 (Thermo Fisher Scientific 公司, USA)。

1.3 BMSC 获取

5% 异氟醚麻醉处死小鼠, 75% 乙醇消毒皮肤, 无菌条件下迅速剪开两侧后肢皮肤及肌肉, 完整取出双侧后肢, 浸泡在磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 中; 小心分离清除肌肉, 完整分离出股骨及胫骨, 浸泡在 PBS 中; 将装有股骨及胫骨的离心管置于紫外线下消毒 30 min 后移至超净台, 倒掉 PBS 后, 再用含青霉素、链霉素的 PBS 清洗骨头 3 遍; 在股骨或胫骨的两个干骺端分别剪开一个小孔, 尽量保留干骺端, 暴露出骨髓腔, 用 1 mL 的一次性注射器吸取 1 mL PBS, 用 23 G BD 针头插到骨头的一端冲洗至 Eppendorf 管, 然后换另一端接着冲, 反复用最初的 1 mL PBS 冲洗数次直至将绝大部分骨髓冲出至 Eppendorf 管; 高速离心机 4 °C 以 300 g 离心力离心 20 min, 弃上清; 用 500 μ L PBS 混悬细胞转移至 50 mL 离心管中; 加入 10 mL 红细胞裂解液 (8.26 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 , 0.037 g 乙二胺四乙酸, 溶于 1 L 双蒸水中), 室温下裂解 5 min; 加入 20 mL PBS, 室温 300 g 离心力离心 10 min, 弃上清; 用 500 μ L PBS 混悬细胞转移至 Eppendorf 管中; 准备 10 mL 离心管, 加入 4 mL PBS; 将装有骨髓细胞的 Eppendorf 管充分震荡混匀, 取 10 μ L 细胞至装有 PBS 的离心管中; 显微镜下细胞计数, 4 大格细胞总数/2 即为最终细胞数 (单位: 百万)^[17]。

1.4 外周血细胞获取

左手拇、食指抓取小鼠双耳及颈后皮肤, 小指

固定尾部, 中指将小鼠左侧前肢轻压在胸骨心脏部位, 无名指按在腹部, 捻动拇指, 轻压取血侧眼部皮肤, 使眼球充血突出, 用弯头镊夹取眼球; 根据需要捻动拇指与食指的方向, 同时用左手中指轻按小鼠心脏部位, 以加快心脏泵血速度, 使血液从眼眶内以不同速度垂直流入抗凝离心管中; 上下轻轻摇动抗凝管, 避免剧烈晃动以产生溶血; 外周血 300 g 离心力离心 20 min 或室温下抗凝管中静置 30 min 以上; 取上层血清至 Eppendorf 管内, 保存至 -80 °C 冰箱, 或 4 °C 冰箱 (48 h 内进行血脂分析); 保留下层血细胞, 转移至 50 mL 离心管内; 加入 10 mL 红细胞裂解液, 室温下裂解 5 min; 加入 20 mL PBS, 室温 300 g 离心力离心 10 min, 弃上清; 重复裂解冲洗 1 次; 用 500 μ L PBS 混悬细胞转移至 Eppendorf 管中; 血细胞不需计数, 按照流式细胞术所需, 平均分装至各 Eppendorf 管中, 并添加 PBS 至 100 μ L。

1.5 流式细胞术

取 1×10^6 个 BMSC 至一新 Eppendorf 管中 (外周血细胞不需计数, 平均分装至各管), 并添加 PBS 至 100 μ L; 每一管细胞中加入需要进行流式细胞分析的抗体, 冰上避光孵育 30 min, 注意避光; 加入 500 μ L PBS, 震荡均匀; 高速离心机 4 °C 以 300 g 离心力离心 10 min, 弃上清; 用 500 μ L PBS 混悬细胞转移至流式管中, 冰上保存, 2 ~ 4 h 内进行流式细胞分析; 采用 Flowjo 软件对结果进行统计分析。

1.6 细胞增殖检测

小鼠处死前 12 h 经腹腔注射 BrdU 1 ~ 2 mg (50 mg/kg); 进行细胞收集及标志物染色; 采用 100 μ L BD 细胞固定液混悬细胞, 冰上孵育 15 ~ 30 min; 加入 1 mL $1 \times$ BD 洗涤缓冲液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清; 采用 100 μ L BD 细胞渗透缓冲液混悬细胞, 冰上孵育 10 min; 加入 1 mL $1 \times$ BD 洗涤缓冲液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清; 采用 100 μ L BD 细胞固定液混悬细胞, 冰上孵育 5 min; 加入 1 mL $1 \times$ BD 洗涤缓冲液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清; 采用 100 μ L 300 mg/L DNA 酶溶液混悬细胞, 室温孵育 1 h; 加入 1 mL $1 \times$ BD 洗涤缓冲液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清; 采用 50 μ L $1 \times$ BD 洗涤缓冲液混悬细胞, 室温孵育 20 min; 加入 1 mL $1 \times$ BD 洗涤缓冲液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清; 用 1 mL PBS 混悬细胞转移至流式管中, 在 BD 多色流式细胞分析仪上进行分析, 吸取细胞速度设定为 <400 个/s^[18-19]。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

进行细胞收集及标志物染色; 采用 1 mL 冷 PBS

溶液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清, 重复 2 次; 采用 $1 \times$ 染色缓冲液稀释细胞至 1×10^9 个/L, 将 100 μ L 细胞溶液加至流式管中, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L 碘化丙啶(propidium iodide, PI); 小心吹打震匀细胞, 室温避光孵育 15 min; 加入 400 μ L $1 \times$ 染色缓冲液, 1 h 内进行流式细胞分析^[20]。

1.8 ROS 水平检测

分析前现配 ROS 染色剂, 注意避光保存; 加入 0.1 μ L ROS 染色剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min; 细胞收集及标志物染色; 加入 1 mL PBS 溶液, 250 g 离心力离心 5 min, 去上清; 采用 500 μ L PBS 溶液混悬细胞转至流式管进行分析(ROS 采用 FITC 通道分析)^[17]。

1.9 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析, 主要指标均进行正态性分析, 凡不符合正态分布的变量均先经对数转换后, 再作进一步统计分析。连续性变量均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行统计分析, 然后采用 LSD-*t* 检验进行组

间两两比较, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。为确保结果可靠, 本研究中每次实验均至少进行 3 次独立重复实验。

2 结果

2.1 HFD 通过增加高龄小鼠细胞内 ROS 产生选择性减少骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞

HFD 喂养 3 个月后, 高龄野生型小鼠血脂水平显著升高(表 1), 证实动物模型成功。流式细胞术分析表明, 与正常饮食的对照组相比, HFD 喂养 3 个月的小鼠骨髓细胞内 ROS 生成显著增加(图 1)。与对照组相比, HFD 喂养 3 个月后, 骨髓中 BMSC 亚群 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞数量显著减少了 26%, 但血液中的 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞数量未减少, 而 HFD 喂养组和对照组的骨髓和血液中的 BMSC 亚群 $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ 或 $\text{Lin}^- \text{CD133}^+$ 细胞数量相似(图 2)。

表 1. 各组血脂水平($n=8$)

Table 1. Blood lipid levels in each group ($n=8$)

指标	WT+ND 组	WT+HFD 组	WT+HFD+NAC 组	TG+ND 组	TG+HFD 组
TC/(mg/L)	1 146.7 \pm 181.1	1 304.2 \pm 122.4 ^a	1 183.3 \pm 100.4 ^b	1 195.2 \pm 201.4	1 241.1 \pm 167.3
HDL/(mg/L)	100.83 \pm 14.95	91.43 \pm 7.98	93.21 \pm 11.29	101.54 \pm 19.71	98.59 \pm 18.76
TG/(mg/L)	67.67 \pm 19.51	99.03 \pm 29.46 ^a	71.02 \pm 22.19 ^b	68.42 \pm 20.01	75.68 \pm 22.89
LDL/(mg/L)	13.02 \pm 9.85	26.87 \pm 11.23 ^a	11.99 \pm 8.92 ^b	11.08 \pm 10.11 ^c	13.57 \pm 8.96
non-HDL/(mg/L)	13.83 \pm 10.60	42.39 \pm 19.21 ^a	25.73 \pm 10.43 ^b	17.98 \pm 11.20 ^c	25.52 \pm 15.91 ^d
TC/HDL	1.13 \pm 0.10	1.45 \pm 0.21 ^a	1.28 \pm 0.18	1.18 \pm 0.15	1.26 \pm 0.19 ^d

注: WT: 野生型(wild type); TG: 转基因(transgene); ND: 正常饮食(normal diet); TC: 总胆固醇(total cholesterol); HDL: 高密度脂蛋白(high density lipoprotein); TG: 甘油三酯(triglyceride); LDL: 低密度脂蛋白(low density lipoprotein)。a 为 $P < 0.05$, 与 WT+ND 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 WT+HFD 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 WT+ND 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 TG+ND 组比较。

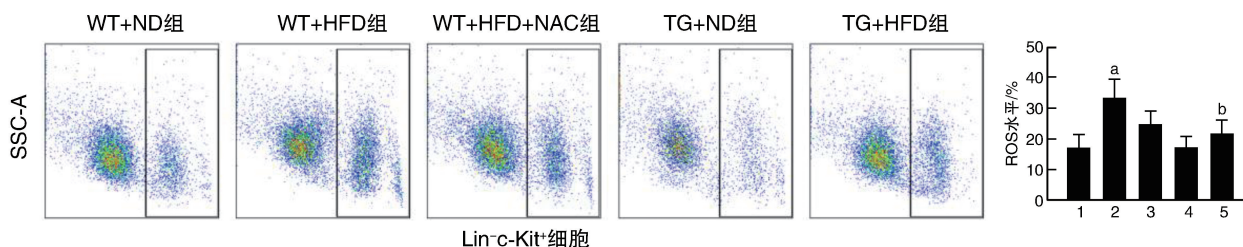


图 1. HFD 增加骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞内 ROS 的产生

SSC-A 示流式细胞侧向反射光参数。1 为 WT+ND 组, 2 为 WT+HFD 组, 3 为 WT+HFD+NAC 组, 4 为 TG+ND 组, 5 为 TG+HFD 组。

a 为 $P < 0.05$, 与 WT+ND 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 WT+HFD 组比较。

Figure 1. HFD increased the production of ROS in bone marrow $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ cells

2.2 HFD 显著抑制骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞的体内增殖

为明确 HFD 喂养小鼠骨髓中 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞数

量的减少是否是由于其体内增殖受损所致, 采用 BrdU 在体流式分析细胞增殖水平。结果显示, 与对照组相比, HFD 显著降低 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞的体内增

殖,而在 HFD 喂养的小鼠和对照组之间的骨髓或血液中的 $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ 或 $\text{Lin}^- \text{CD133}^+$ 细胞中未观察到细胞增殖有显著变化(图 3A)。

2.3 HFD 显著增加骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞的体内凋亡

为进一步明确凋亡增加是否是导致 HFD 喂养

的高龄小鼠骨髓中 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞数量减少的重要原因,采用流式细胞术分析凋亡水平。结果显示, HFD 显著增加 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞的体内凋亡,其凋亡率为对照组的两倍,而在 HFD 喂养的小鼠和对照组之间的骨髓或血液中的 $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ 或 $\text{Lin}^- \text{CD133}^+$ 细胞中未观察到细胞凋亡有显著变化(图 3B)。

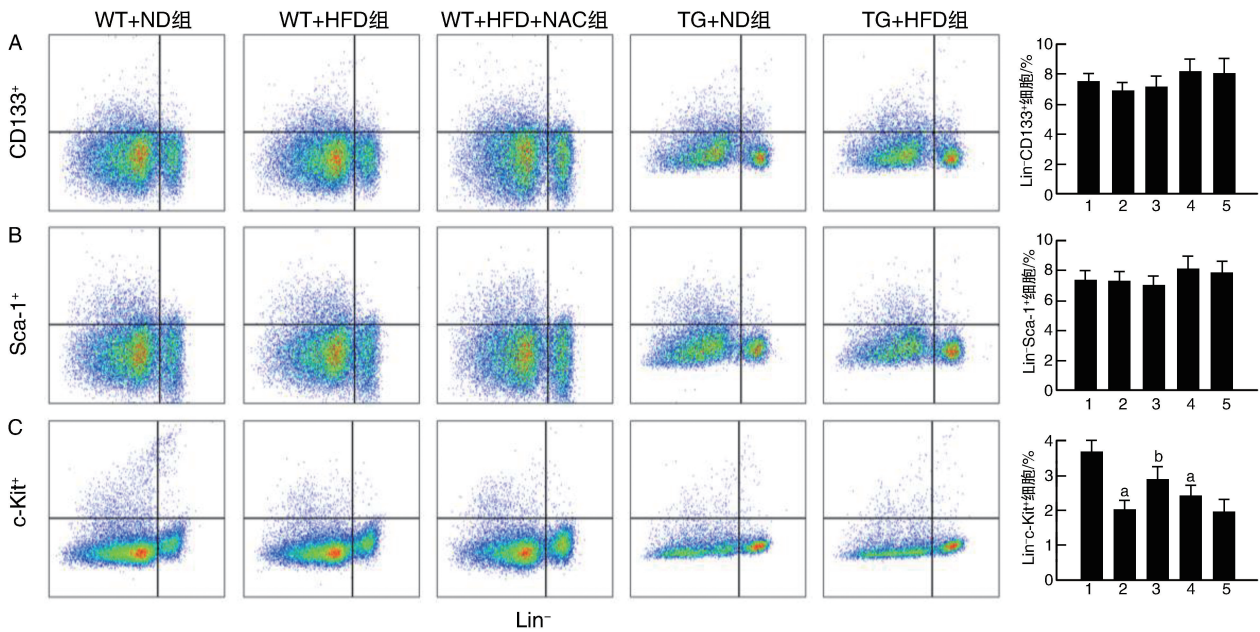


图 2. HFD 选择性降低高龄小鼠骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞数

A 为 HFD 对 $\text{Lin}^- \text{CD133}^+$ 细胞数的影响;B 为 HFD 对 $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$ 细胞数的影响;C 为 HFD 对 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞数的影响。

1 为 WT+ND 组,2 为 WT+HFD 组,3 为 WT+HFD+NAC 组,4 为 TG+ND 组,5 为 TG+HFD 组。

a 为 $P < 0.05$,与 WT+ND 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 WT+HFD 组比较。

Figure 2. HFD selectively reduced the number of bone marrow $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ cells in elderly mice

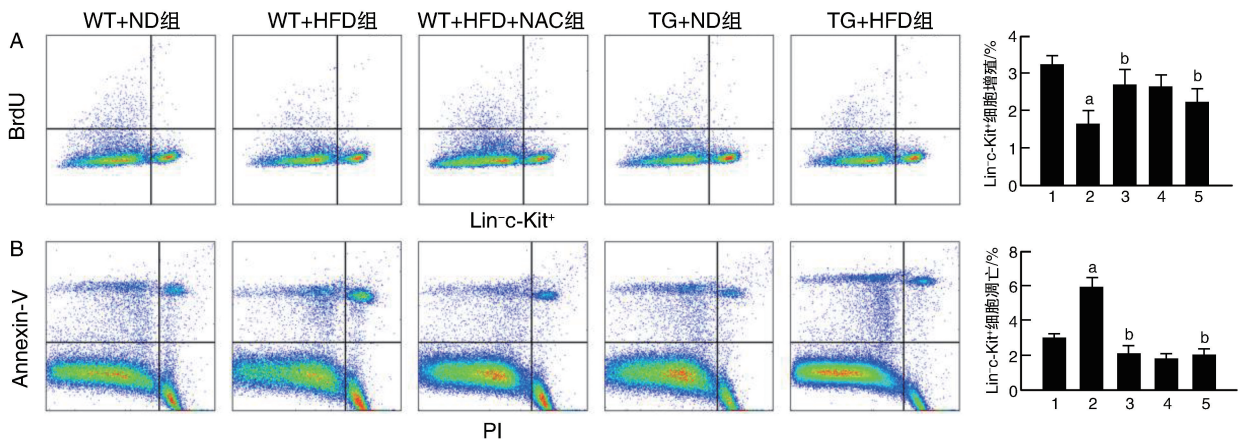


图 3. HFD 抑制骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞的体内增殖并促进细胞凋亡

A 为 HFD 对骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞增殖的影响;B 为 HFD 对骨髓 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ 细胞凋亡的影响。

1 为 WT+ND 组,2 为 WT+HFD 组,3 为 WT+HFD+NAC 组,4 为 TG+ND 组,5 为 TG+HFD 组。

a 为 $P < 0.05$,与 WT+ND 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 WT+HFD 组比较。

Figure 3. HFD inhibited the proliferation of bone marrow $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$ cells and promoted apoptosis in vivo

2.4 抑制 ROS 产生可保持 HFD 小鼠骨髓 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞增殖水平

为了确定 ROS 产生在长期 HFD 喂养对骨髓 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的影响中的作用,用抗氧化剂 NAC 处理小鼠或使用伴随 SOD1、SOD3 和 GPx 抗氧化酶 (antioxidant enzyme network, AON) 过度表达的 3 种转基因小鼠抑制 ROS 产生。正如预期的那样, NAC 处理或 AON 过度表达有效地阻止了 HFD 诱导的高龄小鼠体内 ROS 的产生 (图 1), 并保持了骨髓中 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的增殖, 逆转了 HFD 喂养的高龄小鼠体内细胞增殖和凋亡的变化 (图 2 和图 3)。值得注意的是, 在 HFD 喂养小鼠中, NAC 处理还显著降低了血清 LDL 和 TG 水平, 而 HDL 和 TC 没有显著变化 (表 1)。

3 讨论

本研究证明长期 HFD 可选择性地减少骨髓中而不是血液中 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的数量, 可能与高龄小鼠 ROS 生成增加有关。HFD 显著降低骨髓 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞体内增殖并促进其凋亡, 从而导致骨髓 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞数量减少。NAC 处理或 AON 过度表达阻断 ROS 产生时, HFD 诱导 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞增殖减少和细胞凋亡增加可被有效阻止, 小鼠骨髓 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞得以恢复。表明 HFD 通过减少增殖和增加凋亡选择性减少骨髓中 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的数量, 其机制与高龄小鼠中 ROS 产生的增加有关。

骨髓是 MSC 的主要来源, MSC 可以发育成骨、脂肪、软骨、内皮细胞或肌肉细胞。骨髓衍生的 MSC 和祖细胞是具有不同表型特征的亚群细胞, 其再生能力和潜能各不相同。BMSC 能够分化成多种细胞, 具有强大的旁分泌功能, 因制备简单, 免疫原性低, 无需伦理考虑, 是再生医学中细胞治疗的理想来源。然而, 由于未知原因, BMSC 临床研究的结果不一致且无定论^[21-22]。年龄可以降低所有 MSC 群体的总细胞数量, 且供体年龄是影响 BMSC 功能和治疗效力的重要因素^[2, 5, 23]。据报道, BMSC 在衰老过程中受到不同程度的损伤, 增殖和软骨再生能力降低, 而来自肌肉和脂肪组织的干细胞并未受到衰老影响^[3, 24-26]。BMSC 在表型、生物学行为和功能方面也非常异质, 并非所有的 BMSC 在分化能力上都是多能的^[3, 27-28]。临床研究中并没有指定特定细胞标志物来定义 MSC 和祖细胞, 包括 Sca-1、CD133 和 c-Kit^[29-31]。供体身体状况、生活方式 (吸烟与否、饮酒与否、饮食偏好) 以及疾病状况 (临床和亚临床

疾病) 也可能导致 BMSC 临床研究结果的不一致性^[31-33]。

本研究结果显示, 3 个月的 HFD 饮食选择性减少了高龄小鼠骨髓中 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的数量。c-Kit 在造血干细胞和祖细胞上表达, 但在淋巴系分化细胞上不表达。Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺ 细胞占骨髓有核细胞的 0.08%。研究表明, 骨髓衍生的 c-Kit⁺ 细胞是基于细胞的组织修复和再生治疗的潜在来源^[34-36]。因此, HFD 可能是影响 BMSC 治疗结果的另一个重要因素。心血管疾病的发病率、进展和结局存在性别差异, 但本研究只进行了雄性小鼠实验, 未来的研究需要明确 HFD 对骨髓来源的 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的影响是否存在性别差异。

众所周知, ROS 和相关氧化应激在调节干细胞 (包括 BMSC) 的数量和功能方面起着重要作用^[6-7, 37-39]。HFD 喂养可诱导 gp91 (一种 NADPH 氧化酶亚单位) 的表达, 并促进结肠上皮细胞和固有层细胞中 ROS 的产生^[40-42]。LDL 可在体内转化为氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL), ox-LDL 是一种有效的氧化剂, 能自发促进 ROS 释放。NAC 处理可阻断天然 LDL 向 ox-LDL 的生物转化, 并减弱 ox-LDL 释放 ROS, 从而导致 HFD 喂养的高龄小鼠体内 ROS 水平降低。此外, NAC 处理可降低血清同型半胱氨酸水平, 这被认为是 ROS 形成、炎症和氧化应激的重要来源。本研究结果显示, HFD 增加了高龄小鼠骨髓中 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的 ROS 生成, 并导致骨髓中 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞的数量减少, 而 NAC 处理有效地阻止了 HFD 诱导的 ROS 形成, 使 HFD 喂养小鼠骨髓 Lin⁻c-Kit 细胞的数量得以恢复。值得注意的是, 在本研究中, NAC 处理显著降低了 HFD 喂养小鼠的血清 LDL 和 TG 水平, 而其他研究表明, NAC 处理对 HFD 高脂血症小鼠的血脂谱没有显著影响。NAC 对脂质水平影响的差异很可能是由于所用动物模型的不同。

综上所述, 本研究证明长期 HFD 可通过增加 ROS 的产生而选择性地降低高龄小鼠骨髓 Lin⁻c-Kit⁺ 细胞。

[参考文献]

- [1] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 726-736.
- [2] CHARIF N, LI Y Y, TARGA L, et al. Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: implications on autologous regenerative medicine[J]. *Biomed Mater Eng*, 2017, 28(s1): S57-S63.
- [3] MO M, WANG S, ZHOU Y, et al. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3311-3321.

- [4] MEZEY E. The therapeutic potential of bone marrow-derived stromal cells[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2683-2687.
- [5] BEANE O S, FONSECA V C, COOPER L L, et al. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115963.
- [6] VASCONCELOS E M, DEGASPERI G R, Oliveira H C, et al. Reactive oxygen species generation in peripheral blood monocytes and oxidized LDL are increased in hyperlipidemic patients[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(12): 1222-1227.
- [7] LEE S, BIRUKOV K G, ROMANOSKI C E, et al. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2012, 111(6): 778-799.
- [8] CUI Y, JIA F, HE J, et al. Ambient fine particulate matter suppresses in vivo proliferation of bone marrow stem cells through reactive oxygen species formation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127309.
- [9] SHI Y, HU Y, LV C, et al. Effects of reactive oxygen species on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Ann Transplant*, 2016, 21: 695-700.
- [10] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing[J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 239-247.
- [11] DYMKOWSKA D, DRABAREK B, PODSZYWALOW P, et al. Hyperglycaemia modifies energy metabolism and reactive oxygen species formation in endothelial cells in vitro[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 542: 7-13.
- [12] LYU L, BI Y, LI S, et al. Sodium silicate prime defense responses in harvested muskmelon by regulating mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species production[J]. *Food Chem*, 2019, 289: 369-376.
- [13] HERIEKA M, ERRIDGE C. High-fat meal induced postprandial inflammation[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(1): 136-146.
- [14] WEINBERG E, MAYMON T, WEINREB M. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNF alpha production and oxidative stress[J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52(1): 67-76.
- [15] CUI Y, NARASIMHULU C A, LIU L, et al. N-acetylcysteine inhibits in vivo oxidation of native low-density lipoprotein[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16339.
- [16] CUI Y, XIE X, JIA F, et al. Ambient fine particulate matter induces apoptosis of endothelial progenitor cells through reactive oxygen species formation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 353-363.
- [17] ROSENKRANZ A R, SCHMALDIENST S, STUHLMEIER K M, et al. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate[J]. *J Immunol Methods*, 1992, 156(1): 39-45.
- [18] BALDRIGGE M T, KING K Y, BOLES N C, et al. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection[J]. *Nature*, 2010, 465(7299): 793-797.
- [19] TRAVERSE J H, HENRY T D, PEPINE C J, et al. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction; the TIME randomized trial[J]. *JAMA*, 2012, 308(22): 2380-2389.
- [20] JINDAL N, MINHAS G, PRABHAKAR S, et al. Characterization of Lin-ve CD34 and CD117 cell population reveals an increased expression in bone marrow derived stem cells[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11(1): 68-74.
- [21] MAIKA M, SULKOWSKI M, BADYRA B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells in cardiovascular regeneration; emerging research directions and clinical applications[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(10): 1859-1867.
- [22] YAU T M, PAGANI F D, MANCINI D M, et al. Intramyocardial injection of mesenchymal precursor cells and successful temporary weaning from left ventricular assist device support in patients with advanced heart failure; a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2019, 321(12): 1176-1186.
- [23] LI C, WEI G, GU Q, et al. Donor age and cell passage affect osteogenic ability of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(2): 543-549.
- [24] GARCÍA-PRAT L, MUÑOZ-CÁNOVES P. Aging, metabolism and stem cells: spotlight on muscle stem cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 445: 109-117.
- [25] HWANG A B, BRACK A S. Muscle stem cells and aging[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2018, 126: 299-322.
- [26] DU W J, CHI Y, YANG Z X, et al. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 163.
- [27] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [28] BAKSH D, SONG L, TUAN R S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301-316.
- [29] OKADA S, NAKAUCHI H, NAGAYOSHI K, et al. In vivo and in vitro stem cell function of c-Kit⁻ and Sca-1⁻ positive murine hematopoietic cells[J]. *Blood*, 1992, 80(12): 3044-3050.
- [30] JURCZYSHYN A, ZEBZDA A, CZEPIEL J, et al. Geldanamycin and its derivatives inhibit the growth of myeloma cells and reduce the expression of the MET receptor[J]. *J Cancer*, 2014, 5(6): 480-490.
- [31] DEANS R J, MOSELEY A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(8): 875-884.
- [32] SCHULER G, ADAMS V, GOTO Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease; results, mechanisms, and new perspectives[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(24): 1790-1799.
- [33] ALTANER C, ALTANEROVA V, CIHOVA M, et al. Characterization of mesenchymal stem cells of "no-options" patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73722.
- [34] BANK A, PRABHAKAR S, KALRA J, et al. An enriched population of CD45, CD34 and CD117 stem cells in human umbilical cord blood for potential therapeutic regenerative strategies[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11(4): 312-320.

- ol, 2020, 40(10): 2408-2424.
- [35] DHAHRI W, DUSSAULT S, LÉGARÉ É, et al. Reduced expression of microRNA-130a promotes endothelial cell senescence and age-dependent impairment of neovascularization[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(11): 10180-10193.
- [36] CHEN Y L, SHEU J J, SUN C K, et al. MicroRNA-214 modulates the senescence of vascular smooth muscle cells in carotid artery stenosis[J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 46.
- [37] DONG F, DONG S, LIANG Y, et al. miR-20b inhibits the senescence of human umbilical vein endothelial cells through regulating the Wnt/ β -catenin pathway via the TXNIP/NLRP3 axis[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(3): 847-857.
- [38] ZHANG Y, LIANG Q, ZHANG YAD-DEPARTMENT OF CARDIOLOGY T F, et al. Olmesartan alleviates bleomycin-mediated vascular smooth muscle cell senescence via the miR-665/SDC1 axis [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5205-5220.
- [39] KHOR E S, WONG P F. Endothelial replicative senescence delayed by the inhibition of MTORC1 signaling involves microRNA-107[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 101: 64-73.
- [40] LIU H, WU H Y, WANG W Y, et al. Regulation of miR-92a on vascular endothelial aging via mediating Nrf2-KEAP1-ARE signal pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(11): 2734-2742.
- [41] CHAICHIAN S, SHAFABAKHSH R, MIRHASHEMI S M, et al. Circular RNAs: a novel biomarker for cervical cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 718-724.
- [42] LI R, JIANG J, SHI H, et al. CircRNA: a rising star in gastric cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(9): 1661-1680.
- [43] PREUBER C, HUNG L H, SCHNEIDER T, et al. Selective release of circRNAs in platelet-derived extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1424473.
- [44] CONN V M, HUGOUVIEUX V, NAYAK A, et al. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation [J]. *Nat Plants*, 2017, 3: 17053.
- [45] LIU Z, YU Y, HUANG Z, et al. CircRNA-5692 inhibits the progression of hepatocellular carcinoma by sponging miR-328-5p to enhance DAB2IP expression [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 900.
- [46] WANG Z, LEI X. Matrix factorization with neural network for predicting circRNA-RBP interactions [J]. *BMC Bioinformatics*, 2020, 21(1): 229.
- [47] SHI Y, JIA X, XU J. The new function of circRNA: translation [J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(12): 2162-2169.
- [48] DU W W, YANG W, CHEN Y, et al. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(18): 1402-1412.
- [49] WANG S, ZHAN J, LIN X, et al. CircRNA-0077930 from hyperglycaemia-stimulated vascular endothelial cell exosomes regulates senescence in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(8): 1056-1068.
- [50] WEI H, CAO C, WEI X, et al. Circular RNA circVEGFC accelerates high glucose-induced vascular endothelial cells apoptosis through miR-338-3p/HIF-1 α /VEGFA axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 14365-14375.
- [51] GAO W Q, HU X M, ZHANG Q, et al. Downregulation of circ-FASTKD1 ameliorates myocardial infarction by promoting angiogenesis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(3): 3588-3604.
- (此文编辑 秦旭平)

~~~~~

(上接第 99 页)

- [35] JIA X, XIE X, FENG G, et al. Bone marrow-derived cells can acquire renal stem cells properties and ameliorate ischemia-reperfusion induced acute renal injury [J]. *BMC Nephrol*, 2012, 13: 105.
- [36] DU M, SCHMULL S, ZHANG W, et al. c-Kit<sup>+</sup>AT2R<sup>+</sup> bone marrow mononuclear cell subset is a superior subset for cardiac protection after myocardial infarction [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 4913515.
- [37] 龙仙萍, 郑小宇, 邓文文, 等. 降钙素基因相关肽对 c-Kit<sup>+</sup>心脏干细胞生存活力的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(7): 657-662.
- [38] 张蕴, 韩新生, 张洪阳, 等. N-乙酰半胱氨酸通过 AMPK/SIRT1 途径抑制缺氧诱导的大鼠脑血管内皮细胞损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(2): 107-112.
- [39] 章舒蕾, 梁亚敏, 罗涔方, 等. 琥珀酸通过活性氧途径诱导人脐静脉内皮细胞焦亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 42-47.
- [40] LI X, WEI X, SUN Y, et al. High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317(4): G453-G462.
- [41] KIKUCHI H, HIKAGE M, MUYASHITA H, et al. NADPH oxidase subunit, gp91 (phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells [J]. *Gene*, 2000, 254(1-2): 237-243.
- [42] ALIMCHANDANI M, LAI J P, AUNG P P, et al. Gastrointestinal histopathology in chronic granulomatous disease: a study of 87 patients [J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(9): 1365-1372.
- (此文编辑 曾学清)