

BM-MSCs 延缓 CD8⁺ 初始 T 细胞衰老

高竞溪¹, 赵晓妍¹, 朱星雨¹, 孙 昭², 韩 钦^{1*}, 赵春华^{1*}

- 中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 中国医学科学院组织工程研究中心, 北京 100005;
- 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 肿瘤内科, 北京 100730

摘要:目的 验证骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)缓解免疫衰老的作用,探究其衰老改善的主要免疫细胞群体。方法 分离获得小鼠脾淋巴细胞,刺激增殖 7d 构建复制性衰老细胞模型。利用流式细胞测量术检测年轻对照组、复制性衰老对照组和 BM-MSCs 共培养组 T 细胞亚群衰老标志物 p16ink4a(p16)和 p21cip1(p21)的表达水平。结果 T 淋巴细胞复制性衰老模型中观察到持续增殖后 CD8⁺T 细胞较 CD4⁺T 细胞衰老显著,在 CD8⁺T 细胞的初始细胞、效应细胞亚群中,效应细胞衰老最显著;BM-MSCs 共培养对衰老的效应细胞没有明显影响,主要通过延缓初始 T 细胞的衰老,达到缓解 CD8⁺T 细胞衰老的作用($P<0.01$, $P<0.001$)。结论 与 BM-MSCs 共培养可以缓解 T 细胞的复制性衰老表型,对 CD8⁺T 细胞的抗衰作用更显著,主要通过抑制初始 T 细胞的衰老实现。

关键词: 骨髓间充质干细胞(BM-MSCs); T 细胞衰老; 延缓衰老

中图分类号: Q291 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.05.0683

BM-MSCs delay the senescence of naive CD8⁺T cells

GAO Jingxi¹, ZHAO Xiaoyan¹, ZHU Xingyu¹, SUN Zhao², HAN Qin^{1*}, ZHAO Chunhua^{1*}

- Center for Excellence in Tissue Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005; 2. Department of Oncology, Peking Union Medical College Hospital, CAMS & PUMC, Beijing 100730, China

Abstract: Objective To verify the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in alleviating immune senescence, and to explore the main immune cell population improved by BM-MSCs. **Methods** Mouse spleen lymphocytes were isolated and stimulated to proliferate for 7 days for constructing a replicative aging model. Flow cytometry was used to detect the p16ink4a(p16) and p21cip1(p21) expression by T cell subpopulation in the young control group, the replicative senescence control group and the BM-MSCs co-cultured group. **Results** In the replicative senescence model of T lymphocytes, it was observed that CD8⁺T cells senescent significantly as compared with CD4⁺T cells after continuous proliferation. Among the naive cells and effector cell subsets of CD8⁺T cells, effector cell senescence was the most significant. BM-MSCs co-culture had no significant effect on senescent effector cells, and mainly alleviated the senescence of CD8⁺T cells by delaying the senescence of naive T cells($P<0.01$, $P<0.001$). **Conclusions** BM-MSCs co-culture can alleviate the replicative senescence phenotype of T cells and has a more significant anti-senescence effect on CD8⁺T cells by inhibiting the initial senescence of T cells as a major mechanism.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs); T cell senescence; anti-aging

收稿日期: 2024-02-19 修回日期: 2024-03-19

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2022-I2M-1-012)

* 通信作者 (corresponding author): hanqin@ibms.pumc.edu.cn; zhaochunhua@ibms.pumc.edu.cn

随着年龄的增长,外部与内部压力的累积导致人体的生理完整性(physiological integrity)逐渐受损,同时组织从压力中恢复的能力日渐衰弱,致使机体功能受损和死亡风险的增加。临床数据表明,老年人自身免疫疾病、感染、肿瘤等发病率的上升与免疫系统老化具有密切联系^[1-2]。免疫系统功能减弱导致衰老细胞无法即时被清除,便会利用衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)帮助衰老细胞对抗免疫系统的清除,导致衰老细胞积累,加速机体衰老^[3-4]。免疫早衰模型小鼠的各器官呈现衰老相关损伤并伴随机体早衰及寿命缩短,而补充年轻的免疫细胞可以减缓衰老进程^[5-6],证明免疫细胞的衰老及功能减退在机体衰老过程中扮演重要的角色。

T 细胞老化可能是“免疫衰老”的主要表现之一,即免疫系统活力的时间依赖性丧失,损害了有害元素(如微生物或恶性细胞)的清除^[7],同时增加了导致炎症和自身免疫疾病等不必要的过度反应。探究免疫细胞,特别是 T 细胞的衰老过程及其机制,是缓解与衰老相关的免疫失衡和应激信号反应能力丧失的重要途径。T 淋巴细胞的年龄依赖性变化,主要包括初始细胞的免疫多样性下降和衰老 T 细胞数量的增加等^[8]。

前期研究表明,移植年轻来源的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)可以下调衰老小鼠的衰老标志物表达和 SASP 的分泌,缓解胸腺、脾脏、卵巢等组织的衰老,延长小鼠^[9]和大鼠^[10]的健康寿命。但是,关于 MSCs 延缓细胞、组织衰老的探索较为宏观,其中关键细胞类型变化的研究尚存在较多空缺。因此,本文拟验证 BM-MSCs 缓解免疫衰老的作用,并探究其主要改善的免疫细胞群体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:抗 CD28 抗体、抗 CD3 抗体和 IL-2(北京科昕生物科技有限公司);RPMI-1640(北京协和细胞资源中心);胎牛血清(Gibco 公司);LIVE/DEAD™可固定近红外死细胞染色剂试剂盒、eBioscience™流式胞内固定破膜缓冲液(Thermo Fisher Scientific 公司);CD3-PerCP/Cyanine5.5、

CD45-PE、CD62L-PE/Cyanine7、CD44-Brilliant Violet 510(BioLegend 公司);CD8α-APC、CD4-APC(Cell Signaling Technology 公司);p16INK4a 抗体、p21Cip1 抗体(Abcam 公司);山羊抗兔荧光二抗(金普来生物科技有限公司);40 μm 细胞过滤器(BD Falcon 公司)。

1.1.2 小鼠:6 周龄,SPF 级,野生型 C57BL/6(H-2b)小鼠(北京维通利华实验动物科技有限公司)。所有动物均饲养在特定无病原体设施的隔离笼中。所有程序和方案均经动物研究所实验动物使用与管理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离与培养:从 6 周龄 C57 小鼠的后腿分离 BM-MSCs,具体提取与培养方法参见文献[11]。

1.2.2 构建体外复制性衰老模型:从 6 周龄 C57 小鼠的脾脏分离脾淋巴细胞,以 2×10^6 个细胞每孔接种于 24 孔板中,以 anti-CD28(2.5 μg/mL)、anti-CD3(1 μg/mL)、IL-2(100 U/mL)刺激增殖 7 d。

1.2.3 小鼠脾脏细胞与 BM-MSCs 共培养:丝裂霉素(10 mg/mL)2 小时预处理 BM-MSCs 抑制其增殖,以 2×10^5 个细胞每孔接种于 24 孔板中,过夜贴壁,脾淋巴细胞以 2×10^6 个每孔接种于 BM-MSCs 预铺孔中。

1.2.4 流式细胞测量术检测细胞衰老表型:以 1 mL PBS 重悬细胞,PBS 洗涤 2 次;用 LIVE/DEAD-APC-Cy7 染色,4 ℃孵育 30 min,洗涤 2 次;用 CD45-PE、CD3-PC5.5、CD8-APC、CD44-Bv510、CD62L-PE-Cy7 抗体混合染色,4 ℃孵育 30 min,洗涤 2 次;分别用固定缓冲液和渗透缓冲液 4 ℃孵育 10 min,加入 p16/p21 抗体,4 ℃孵育 40 min,洗涤 3 次;加入荧光二抗,4 ℃孵育 40 min,洗涤 3 次。样品通过 40 μm 细胞过滤器,使用 Cytoflex 流式细胞仪分析,FlowJo 软件分析数据。

1.3 统计学分析

数据使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立分组 *t* 检验,三组间比较采用单因素方差分析,实验均重复 3 次以上,单次实验至少 3 个复孔,使用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据。

2 结果

2.1 体外复制性衰老细胞模型的构建

分离原代小鼠脾脏细胞,体外用 CD3 抗体刺激 T

细胞增殖,持续刺激 7d,构建复制性衰老细胞模型。持续刺激 7 d 进行 qPCR 定量分析,结果显示相比于年轻对照,衰老模型的典型衰老标记(p16、p21)、衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)(IL6、IL8)和炎症衰老标记(Granzyme K, GZMK)上调,T 细胞功能相关的 CD28 下调,指示 T 细胞呈现衰老表型且功能受损。进一步流式细胞测量术揭示, CD45⁺CD3⁺T 淋巴细胞(图 1A)p16、p21 高表达的衰老细胞分别占 33.22%±3.9%和 41.78%±2.3%,显著高于年轻对照组的 8.37%±1.7%和 3.04%±0.4%(图 1B,C)。因此后续实验以刺激 1d 的细胞为年轻对照(young-Ctrl),持续刺激 7 d 的细胞为衰老对照(aging-Ctrl)。

2.2 CD8⁺T 细胞衰老更显著

进一步探究 T 细胞不同群体的复制性衰老表型,在 T 细胞的基础上采用流式细胞测量术划分 CD4⁺T 细胞(CD3⁺CD4⁺)和 CD8⁺T 细胞(CD3⁺CD8⁺)(图 2A),分别检测 p16、p21 的表达情况。结果显示,对于体外复制性衰老模型来说,CD8⁺T 细胞 p16、p21 高表达的衰老群体比例分别为 64.14%±10.3%和 71.85%±3.0%,显著高于 CD4⁺T 细胞的 17.65%±0.8%和 36.23%±1.6%(图 2B)。

2.3 BM-MSCs 共培养对 CD8⁺T 细胞抗衰效果更为明显

为探究 BM-MSCs 对脾脏 T 淋巴细胞的作用,将 BM-MSCs 与复制性 T 细胞衰老模型共培养(aging-Msc),观察其对衰老 T 细胞的影响。发现与 BM-MSCs 共培养后,脾来源 T 淋巴细胞的 p16 阳性比例从 34.22%±4.4%下调至 24.15%±1.4%(图 3A)、p21 阳性比例从 41.14%±2.2%下调至 27.05%±4.3%(图 3B),均具有显著差异,其中 CD8⁺T 细胞的 p16、p21 阳性细胞比例下调的均值分别为 19.75%和 27.91%高于 CD4⁺T 细胞的 4.55%和 7.92%(图 3A, 3B)。这部分结果提示复制性衰老模型中,CD8⁺T 细胞是衰老最显著的,也是 BM-MSCs 延缓衰老表型最显著的细胞群体。

2.4 BM-MSCs 通过维持 CD8⁺初始 T 细胞的比例和状态延缓衰老

深入分析发现 CD8⁺T 细胞的衰老并不同步,而是存在较易衰老的细胞群体(图 4A)。为探究 CD8⁺T 细胞主要衰老和共培养后延缓衰老的亚群,本文

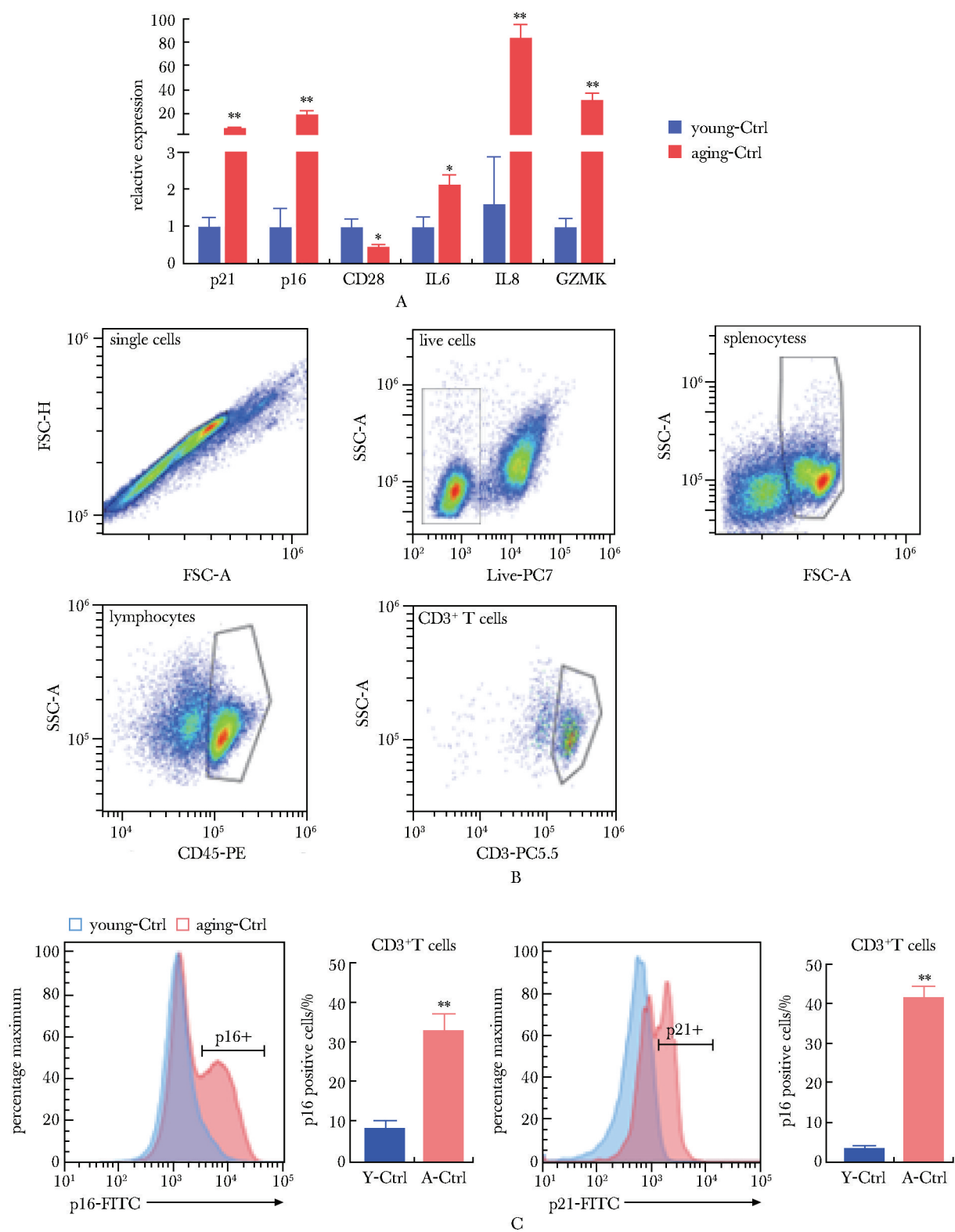
划分了初始(CD62L⁺CD44⁻)、效应(CD62L⁻CD44⁺)和记忆细胞(CD62L⁺CD44⁺)(图 4B)。分析各细胞亚群占比发现,年轻对照组初始细胞占 86.53%、效应细胞占 13.44%和记忆细胞占 0.03%,衰老对照组分别占 62.55%、37.34%和 0.11%,BM-MSCs 共培养后分别占 88.62%、10.74%和 0.64%。体外持续刺激的复制性衰老导致效应 T 细胞比例上调,对应的初始 T 细胞比例下调,共培养后初始 T 细胞亚群的比例得到恢复(图 4C)。由于记忆细胞绝对细胞数量太少,后续衰老标志比例分析只对效应细胞和初始细胞进行比较分析。

CD8⁺T 细胞各亚群的 p21 表达都随增殖时间的延长而上调,效应细胞 p21 阳性细胞比例从年轻组的 3.36%±2.5%上调至 83.65%±11.4%,初始细胞从 0.01%±0.02%上调至 2.63%±0.4%(图 4D)。BM-MSCs 共培养后效应细胞 p21 阳性比例无明显变化,而初始细胞的 p21 阳性细胞比例在共培养后从 2.63%±0.4%下调至 1.59%±0.2%,(图 4E)。结合前述细胞亚群比例的变化(图 4C),得出效应细胞衰老占比升高是 CD8⁺T 细胞 p21 上调的主要原因;共培养后初始细胞 p21 表达的下调及其比例的保持是 CD8⁺T 细胞 p21 表达回落的主要原因。

3 讨论

如何防治衰老相关疾病从而实现健康长寿是衰老研究中长期存在的问题。作为驱动机体衰老的重要因素,免疫系统的功能减退导致了机体感染率增加、癌症易感性增加以及疫苗效力的降低^[7]。有充分的证据表明,T 淋巴细胞经历了主要的年龄依赖性变化,其质与量的变化是导致衰老时体液免疫和细胞免疫应答异常的主要原因^[6]。此前,本课题组发现 MSCs 对 T 细胞的免疫功能起支持作用^[12]。那么 MSCs 是否可以起到延缓 T 细胞衰老的作用?如果可以,其主要作用于哪些靶细胞群体?基于此,本文构建了体外复制性衰老模型,借助流式细胞术划分不同细胞群体,并以 p16 和 p21 的高表达指示细胞衰老。

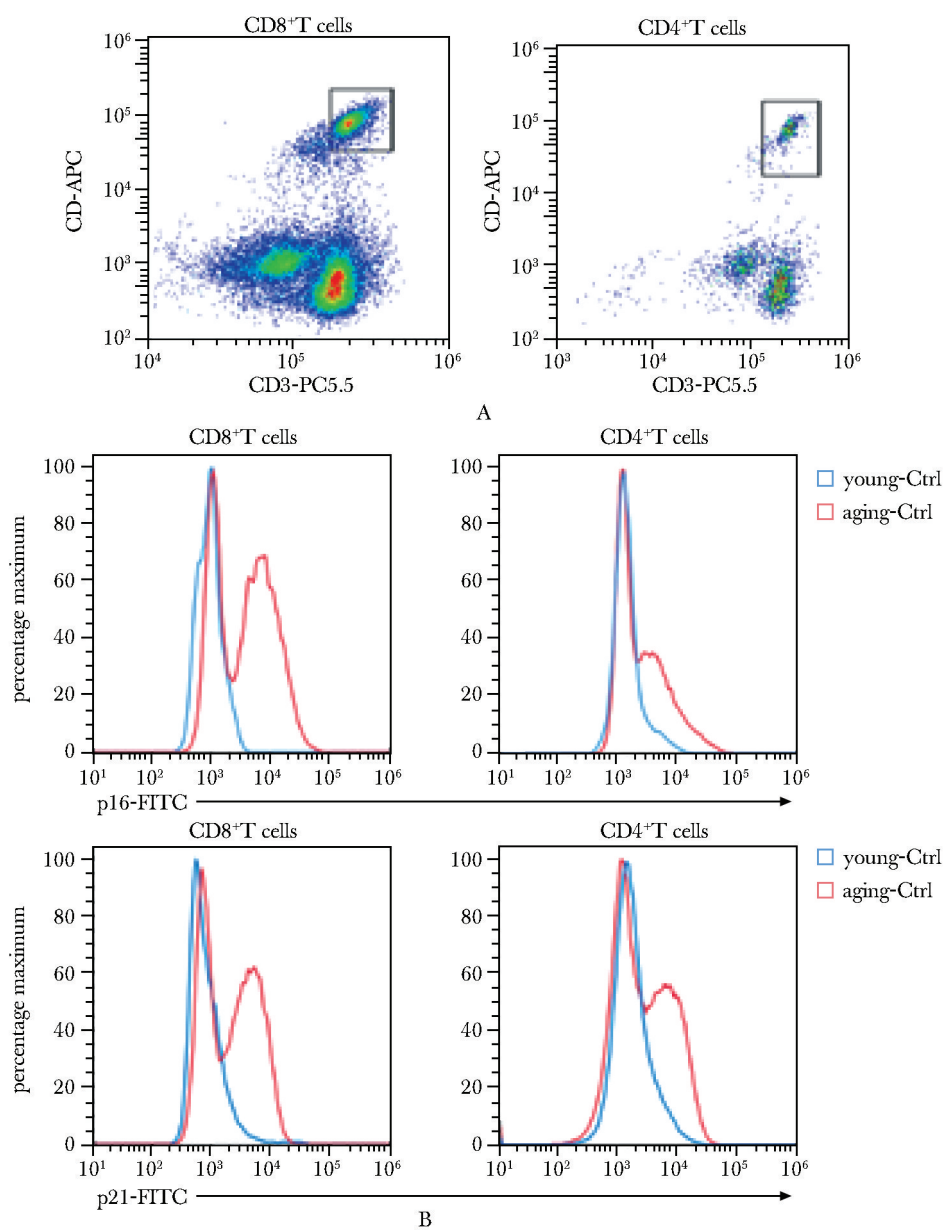
与刺激增殖 1 d 的对照组相比,持续增殖 7 d 的 T 细胞出现了 p16、p21 高表达的衰老细胞群体。进行亚群间比较发现,CD8⁺T 细胞的衰老表型更为显著。已经有研究表明,与 CD4⁺T 细胞相比,CD8⁺T 细胞在衰老过程中可能对表型和功能的变化更敏感,



A. senescence marker expression in young splenic lymphocytes and replicative senescence model constructed after 7 days of stimulated proliferation *in vitro*; B. gating strategy for mouse splenic T cells; C. flow cytometry analysis of splenic T cells (CD45⁺CD3⁺) in young-Ctrl and aging-Ctrl; **P*<0.05, ***P*<0.001 compared with young-Ctrl.

图1 持续增殖7 d后T细胞出现p16、p21表达阳性的衰老细胞群

Fig 1 After 7 days of continuous proliferation, the T cells showed positive expression of p16 and p21($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



A. gating strategy for splenic CD8⁺T cells and CD4⁺T cells; B. flow cytometry analysis of splenic CD8⁺(CD45⁺CD3⁺CD8⁺) and CD4⁺(CD45⁺CD3⁺CD4⁺) T cells.

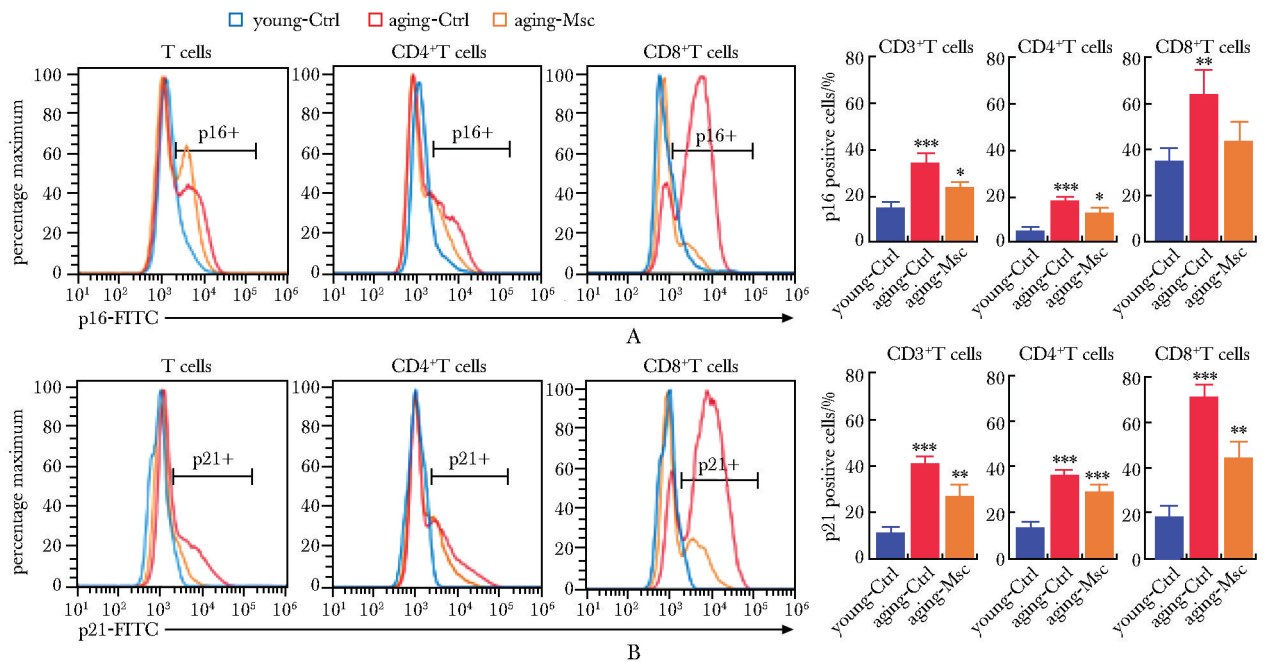
图 2 T 细胞复制性衰老模型中 CD8⁺T 细胞衰老比 CD4⁺T 细胞更显著

Fig 2 CD8⁺T cell senescence was significant more than CD4⁺T cell in replicative senescence model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

更快地表现出衰老状态^[13],这与本实验结果一致,也反应了复制性衰老模型可一定程度上模拟 T 细胞自然衰老的在体状态。BM-MSCs 共培养可以延缓衰老 T 细胞 p16、p21 的上调,对 CD8⁺T 细胞效果最佳,这可能与 CD8⁺T 细胞本身比 CD4⁺T 细胞衰老更为显著有关。继续对 CD8⁺T 细胞进行亚群细分,三个亚群中,效应细胞的衰老最为显著。但 BM-MSCs 共培养对衰老的效应细胞没有明显的影响,反而显著抑制初始细胞的衰老。结合已经报道

的 T 淋巴细胞的衰老主要表现为初始细胞的免疫多样性下降^[14],提示 BM-MSCs 移植可能通过抑制初始 T 细胞衰老,达到缓解免疫衰老的目的。

本研究目前还存在很多问题有待进一步研究。比如目前的数据仅以体外复制性衰老模型模拟小鼠的免疫衰老,缺少体内证据,需要进一步完成体内验证,才能对 BM-MSCs 的抗免疫衰老得出可靠的结论。此外本研究仅探究了 MSCs 发挥抗衰作用的主要靶细胞,具体分子机制还有待阐述。免疫衰老是



A,B. flow cytometry analysis of splenic T cells, CD8⁺T cells and CD4⁺T cells, stained with p16(A) or p21(B); The corresponding statistics were shown on the right; **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared with young-Ctrl.

图3 BM-MSCs 共培养显著地下调 CD8⁺T 细胞衰老

Fig 3 BM-MSCs co-culture significantly down-regulated CD8⁺T cell senescence ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

多种细胞和微环境共同作用的结果,为还原在体状态,本研究与 BM-MSCs 共培养时并未分选出 CD8⁺T 细胞,因此可能存在中间细胞参与 BM-MSCs 对 CD8⁺T 细胞的抗衰作用。

综上所述,本实验构建了 T 细胞体外复制性衰老细胞模型,证明了其中 CD8⁺T 细胞衰老表现

最显著。BM-MSCs 共培养可以缓解 T 细胞衰老,对于 CD8⁺T 细胞的抗衰作用更显著,主要作用于抑制了 CD8⁺初始 T 细胞的衰老。本文为 T 细胞衰老的机制研究提供了体外模型,为理解 T 细胞的衰老过程和 MSCs 对其的延缓作用提供更细化的视角。

参考文献:

[1] Goronzy JJ, Weyand CM. Immune aging and autoimmunity [J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69: 1615-1623.

[2] Qin L, Jing X, Qiu Z, et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults [J]. Aging (Albany NY), 2016, 8: 848-859.

[3] Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, et al. Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging[J]. Nat Commun, 2018, 9: 5435-5443.

[4] Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16: 718-735.

[5] Yousefzadeh MJ, Flores RR, Zhu Y, et al. An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs [J]. Nature, 2021, 594: 100-105.

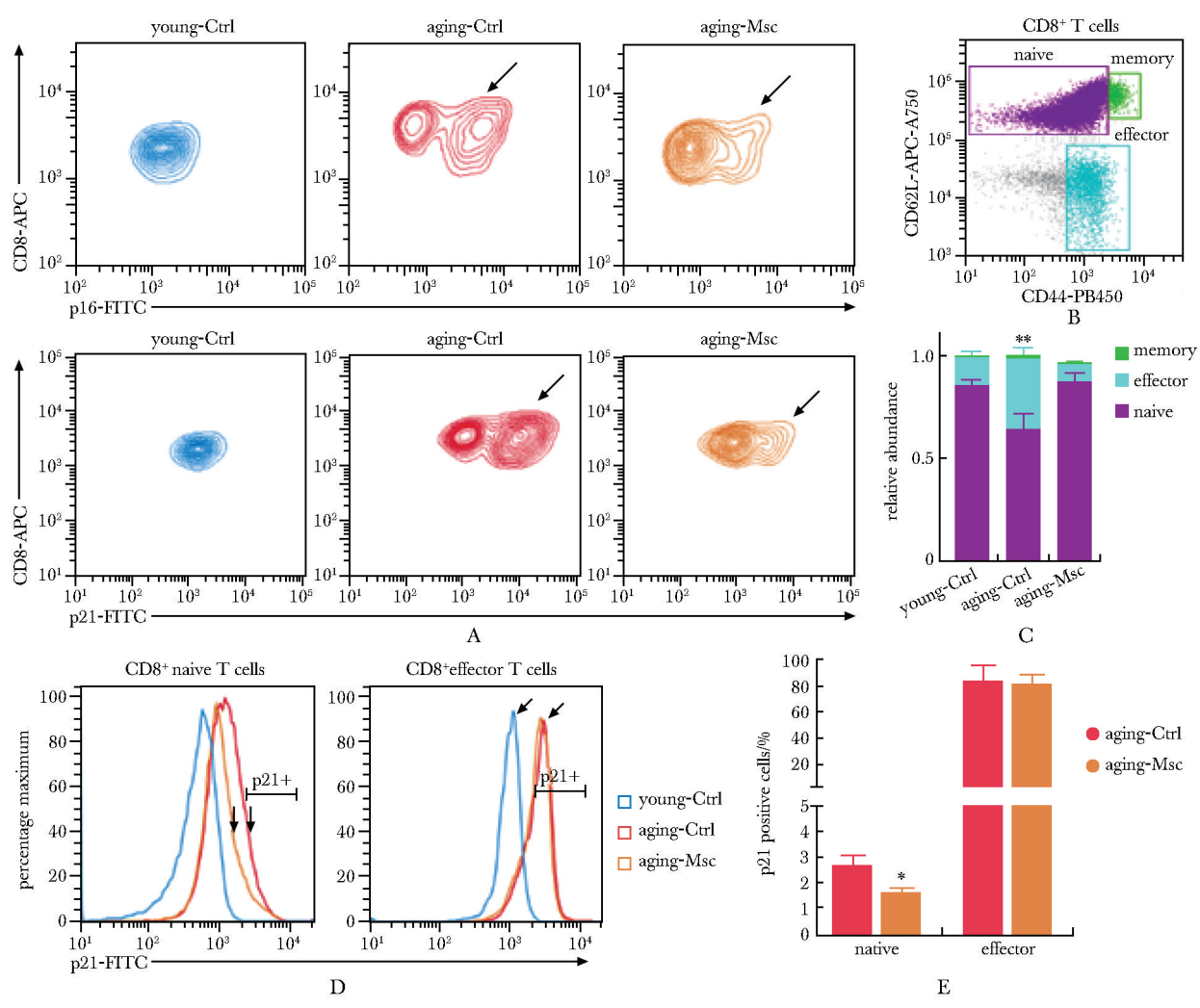
[6] Goronzy JJ, Weyand CM. Mechanisms underlying T cell ageing[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19: 573-583.

[7] Mittelbrunn M, Kroemer G. Hallmarks of T cell aging[J]. Nat Immunol, 2021, 22: 687-698.

[8] Kasakovski D, Xu L, Li Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11: 91. doi.org:10.1186/s13045-018-0629-x.

[9] Dorronsoro A, Santiago F E, Grassi D, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles reduce senescence and extend health span in mouse models of aging[J]. Aging Cell, 2021, 20. doi.org:10.1016/j.coi.2012.12.003.

[10] 王志红. 间充质干细胞逆转大鼠衰老的作用[D].广州:南方医科大学, 2011,68-86.



A. representative flow plots of CD8⁺ T cells from primary splenocytes (young-Ctrl), replicative senescence model (aging-Ctrl) and senescence model cells cocultured with BM-MSCs (aging-Msc), arrowheads indicate p16/p21-positive cells; B. gating strategy for naive (CD62L⁺ CD44⁻), effector (CD62L⁻ CD44⁺) and memory (CD62L⁺ CD44⁺) CD8⁺ T cells; C. histogram of naive, effector and memory cells proportion in CD8⁺ T cells from young-Ctrl, aging-Ctrl and aging-Msc; D. representative flow cytometry analysis of naive and effector CD8⁺ T cells; E. statistical histogram of the proportion of p21 positive cells in aging-Ctrl and aging-Msc; **P*<0.05, ***P*<0.001 compared with aging-Ctrl.

图 4 BM-MSCs 共培养显著下调初始 T 细胞 p21 表达并维持其比例

Fig 4 BM-MSCs co-culture significantly down-regulated the expression of p21 in naive T cells and maintained their proportion ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

[11] Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, *et al.* Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α [J]. Nat Protoc, 2012, 7: 2103-2111.

[12] Zhu R, Yan T, Feng Y, *et al.* Mesenchymal stem cell treatment improves outcome of COVID-19 patients via multiple immunomodulatory mechanisms [J]. Cell Res, 2021, 31: 1244-1262.

[13] Czesnikiewicz GM, Lee WW, Cui D, *et al.* T cell subset-specific susceptibility to aging[J]. Clin Immunol, 2008, 127: 107-118.

[14] Crespo J, Sun H, Welling TH, *et al.* T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment[J]. Curr Opin Immunol, 2013, 25: 214-221.