

****包括但不限于下列格式说明及要求，仅供参考****

*表示获基金项目支持

木犀草素显著降低 hUC-MSCs 衰老相关分泌表型*

作者名字逗号分开，单位按顺序标注上标。如无基金项目，通讯作者只用标注*

熊×^{1,2}, 李××^{1,3}, 吴××^{1**}, 曹××³, 屈×³

作者单位与作者名称相对应，第一作者第一单位，写明省 市/区 邮编。两个单位中间用分号隔开。

(1. 湖北科技学院医学部药学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院医学部基础医学院)

基金项目写清楚来源及编号

***基金项目**: 国家自然科学基金重大研究计划(9204××);湖北省自然科学基金创新群体项目(2022××9)

通讯作者邮箱

****通讯作者**, E-mail: ××@163.com

摘要一般在 400 字左右，是对全文内容的概括，应清晰反应文稿的论点和创新部分，不用第一人称及“本文”、“作者”等字样；不出现评价性言语；不使用修饰词；不出现图表、公式、标题层次序号、非公知公用符号。

不常用或未被公知公用的缩略语，摘要中第一次出现时应定义全称，并在括号中给出缩写。

摘要：**目的** 探究**木犀草素 (LUT)**能否逆转或延缓人脐带间充质干细胞

(hUC-MSCs)的复制衰老进程

方法: 按照逻辑顺序叙述。

方法 分离获得原代 hUC-MSCs (P0),

分组要明确，全文要统一。

连续传代培养至 25 代 (P25), 将其分为**衰老模型组**与**LUT 组** (5 μmol/L)。通过 CCK8 法检测细胞活率;流式细胞术比较细胞增殖周期、凋亡率的变化;通过显微镜观察细胞普通形态并采用 β-半乳糖苷酶 (SA-β-gal) 染色比较细胞衰老程度;通过 ELISA 法检测细胞来源的上

清中衰老相关分泌表型 (SASP) 的分泌情况。RT-PCR 检测细胞中衰老、成骨、成脂相关基因的表达。通过茜素红 S 和油红 O 染色, 比较两组成骨、成脂分化能力的差异。**结果** 5 μ mol/L 的 LUT 未明显影响细胞存活率与凋亡率; LUT 组形态学呈“年轻化”改变, SA- β -gal 染色阳性率明显减少。LUT 可下调细胞衰老相关基因, 降低 SASP 浓度, 促进细胞增殖, 上调细胞成骨相关基因, 促进钙结节形成; 下调细胞成脂相关基因, 抑制脂滴形成。**结论** LUT 可以显著降低衰老细胞中衰老相关基因的表达与 SASP 的分泌, 发挥促进衰老细胞年轻化的作用。

结果描述的顺序与方法的顺序对应。

“摘要”结束后另起行关键词, 5~8 个, 分号隔开, 最后一个不加标点符号。

关键词: 间充质干细胞; 木犀草素; 抗衰; 复制性衰老; 衰老相关分泌表型

中图分类号: R931.71

Luteolin Significantly Reduces the Senescence Associated

Secretory Phenotype

英文只需要第一作者单位。

英文作者保留 3 名, 必须包含第一及通讯作者。

XIONG Jif, LI Qiu-bei, WU Ji-liang, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

Abstract: Objective To investigate whether Luteolin (LUT) can reverse or delay the replicative aging process of Human umbilical cord mesenchymal stem/stromal cells

(hUC-MSCs).**Methods** Primary hUC-MSCs(P0) were isolated and cultured continuously to the 25th generation (P25).Then the P25-MSCs were divided into the aging model group and the luteolin treatment group.Cell viability was detected by the CCK8 assay.Flow cytometry was used to compare changes in cell proliferation cycle and apoptosis rate of P25-MSCs.The general morphology of cells was observed through a microscope and the degree of cell senescence was compared using β -galactosidase (SA- β -gal) staining.The senescence-associated secretory phenotype (SASP) in the conditioned mediums was detected by ELISA.qRT-PCR was used to detect the expression of genes related to cell senescence,osteogenesis and adipogenesis.Alizarin Red S and Oil Red O staining were used to compare the differences in osteogenic and adipogenic differentiation abilities between the two groups.**Results** 5 μ mol/L LUT did not significantly affect the cell survival rate and apoptosis rate.The morphology of cells in the LUT-treated group tended to be early generation cells and the number of SA- β -gal positive cells significantly decreased.LUT could down-regulate cell senescence-related genes,reduce SASP concentration,promote calcium nodule formation; down-regulate cell adipogenesis-related genes,and inhibit lipid droplet formation.**Conclusion** LUT can significantly reduce the expression of senescence-related genes and the secretion of SASP in promoting the osteogenic differentiation and inhibition of aging hUC-MSCs.

每个关键词第一个单词首字母大写，分号隔开

KEY WORDS : Mesenchymal stem/stromal cells;Luteolin;Rejuvenation;Replicative senescence;SASP

引言应简短介绍论文的写作背景和目的，以及相关领域内前人所做的工作和研究的概况，说明本研究与前人工作的关系，目前研究的热点、存在的问题及作者工作的意义，引出本文的主题给读者以引导。一般在 400 字左右。

引言

至今,我国共有 54 项间充质干细胞药物临床试验获得国家药监局药审中心默示许可 (<https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/4b5255eb0a8>)

不常用或未被公知公用的缩略语，正文中第一次出现时应定义全称，并在括号中给出缩写。

4820cef4ca3e8b6bbe20c)。从获批的临床间充质干细胞类型来看，脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem/stromal cells, hUC-MSCs)是中国干细胞药物研发最主要细胞类型(占总体的 74%)。已有大量研究表明, MSCs 在长期体外扩增过程中会受多种因素作用, 最终出现干性减退的复制性衰老现象, 这极大地阻碍了 MSCs 的临床应用^[1]。

我国是植物药大国, 利用中药逆转 UC-MSCs 的衰老进程, 是基于质量源于设计理念, 实现干细胞药物良好的质量控制, 确保药品质量和安全的有效手段^[2]。木犀草素(luteolin, LUT)是一种可以从多种植物(如桂花)中提取的黄酮类化合物, 是一种有效的 Nrf2 抑制剂, 具有抗微生物、抗炎的功效^[3]。

有报道证实 LUT 对 hUC-MSCs 有氧化保护作用^[4], 还可促进间充质基质细胞成骨^[5], 抑制间充质基质细胞脂化^[6], 逆转小鼠耳蜗毛细胞衰老^[7], 但尚未有报道 LUT 能否作为关键物料属性起到逆转 hUC-MSCs 复制性衰老的效用, 因此, 本研究内容以复制性衰老的 hUC-MSCs 为研究对象, 模型组造模参照我们此前的研究成果^[8], 并在此基础上加入适宜浓度的 LUT, 检测 MSCs 衰老相关指标的变化情况, 从而证明 LUT 对 hUC-MSCs 衰老相关指标的影响。

正文中标题层次用阿拉伯数字连续编号。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

符合伦理及批号。动物需注明来源及许可证号

P0(hUC-MSCs)提取自足月产胎儿脐带,脐带获赠于武汉协和医院产科健康产妇(获得知情同意及伦理支持,批号:2016-S996)。

1.2 试剂

可能影响结果的主要试剂。

LUT(纯度 >99.59%)(M4589)购自 Abmole 公司;DMEM/F-12 培养基(C11330500BT)、0.25%胰蛋白酶(25200072)、特级胎牛血清(FBS-PA500)购自 Gibco 公司;PBS(B310KJ)购自源培公司;ELISA 试剂盒(HM10394、HM11031、HM10205、HM10737)购自贝克曼公司;FreeZol Reagent RNA 提取试剂盒(R711)购自诺唯赞公司;逆转录试剂盒(RR036A)、荧光 PCR 试剂盒(RR820A)购自 TAKARA 公司;RT-PCR 引物由 Sangon Biotech 公司合成;细胞凋亡试剂盒购自 APE X BIO 公司

(K2003); CCK-8 (BS350C)、细胞周期试剂盒 (BL114A)、多聚甲醛 (PFA) (BL593A) 购自 BIOSHARP 公司; hUC-MSCs 成骨、成脂诱导分化培养基 (HUXUC-90021、HUXUC-90031), 茜素红、油红 O 染色液 (ALIR-10001、OILR-10001) 购自赛业公司; 青霉素/链霉素混合液 (100×) (P1400-100)、SA- β -Gal 试剂盒 (G1580)、Giemsa 染色液 (G4640) 购自索莱宝公司。

1.3 仪器

Olympus CKX41 型光学显微镜 (日本, Olympus); NovoCyte 型流式细胞仪 (美国, 艾森生物); 超微量分光光度计 (美国, THERMO); BIO-RAD/CFX96 PCR 仪 (美国, Bio-Rad 公司)。

方法: 按照逻辑顺序叙述, 与摘要中相同, 但更详细。

1.4 方法

1.4.1 hUC-MSCs 的分离和培养条件

用 PBS 冲洗脐带以去除血细胞。随后将脐带切成 1cm, 并去除脐带静、动脉和羊膜。然后将脐带剪成 1~3mm 碎片。将剪碎的碎片置于 15cm 培养皿中, 采用含有 10% FBS 和 100U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM/F-12 培养基在培养箱中孵育。2 周后, 待细胞达到 90% 融合后用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 将获得的细胞以 $250 \times g$ 离心 5min, 并以 4000 个细胞/ cm^2 的密度进行传代培养, 当单层贴壁细胞达到 70%~80% 汇合时进行细胞传代。所有细胞都在 37°C , 5% CO_2 的环境中培养^[8]。

1.4.2 实验细胞培养上清

以晚代 P25 MSCs 为研究对象, 分为 2 组: 衰老模型组、LUT 组 ($5 \mu\text{mol/L}$)。其中木犀草素组药物作用 48h (MSCs 扩增时间) 后, 换成不含药物的新鲜培养基继续培养 48h, 然后收集此不含药物的培养上清 (conditioned mediums, CMs), 于 2000rpm 4°C 离心 20min, 分装后 -80°C 冻存备用。

1.4.3 细胞活率测定

hUC-MSCs 以 2000 个细胞/孔接种在 96 孔板中, 种板 24h 后, 将 LUT 以 0、1、5、10、12.5、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度种板, 与对照组对比检测化合物的细胞毒性。给药剂量参考已发表相关文献^[9-10]。

在处理第 24、48、72h, 每 100 μ L 细胞培养基中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 2h, 测定 450nm 处的光密度 (OD), 减去背景即为最终结果。每个样品一式 3 份进行分析。

1.4.4 流式细胞术分析

细胞周期分析, hUC-MSCs (1×10^5 /孔) 接种于 6 孔板中, 每孔 2mL 培养基, 24h 后, 木犀草素组加入 5 μ mol/L 浓度 LUT, 培养 48h。衰老模型组完全培养基为含 10%FBS 的 DMEM/F-12。培养 48h 后取出孔板, 收集所有组别的 hUC-MSCs, PBS 清洗后, 用含 EDTA 的胰蛋白酶消化, $1000 \times g$ 离心 5min, 并用 PBS 洗涤 1 次。然后将细胞重悬并固定在 70%乙醇中, 4 $^{\circ}$ C 过夜。将固定的细胞以 $1000 \times g$ 离心 5min, 再次用 PBS 洗涤, $1000 \times g$ 离心收集后重悬于 200 μ L 染色缓冲液, 并加入 25 μ L PI、10 μ L 无 DNase 的 RNaseA 试剂, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。孵育结束后 PBS 清洗并通过流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 分析细胞。

细胞凋亡分析, 组别设置同细胞周期, 收集所有组别的 hUC-MSCs, PBS 清洗后, 用含 EDTA 的胰蛋白酶消化, $300 \times g$ 离心 5min, 并在 PBS 中洗涤 1 次。然后将细胞重悬于 200 μ L 染色缓冲液, 加入 5 μ L 膜联蛋白 V-FITC (annexin-V-FITC)、5 μ L 碘化丙啶 (PI) 试剂, 并轻轻混匀, 室温避光孵育 15min。分析操作同上。

流式细胞术数据通过 NOVAEXPRESS 软件进行分析。

1.4.5 细胞 Giemsa 染色

hUC-MSCs (2×10^4 /孔) 接种于 6 孔板中, 每孔 2mL 培养基, 组别设置同上, 48h 后取出孔板, PBS 清洗 3 遍, 此后加入 4%PFA 保持 10min, 弃固定液, PBS 洗 3 次后弃去, 每孔滴加 1mL Giemsa 染色工作液, 染色 5min, 弃液后, 用水洗 30s, 待干后, 高倍镜下采用黑白模式观察细胞形态。

1.4.6 SA- β -gal 染色

碧云天染色试剂盒测 SA- β -gal 的活性。hUC-MSCs (8×10^3 /孔) 接种于 24 孔板中, 每孔 1mL 培养基, 组别设置同上, 培养 48h 取出孔板, PBS 洗涤细胞 1 次后, 用固定液固定 20min。随后用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 3min, 并在 37 $^{\circ}$ C 下用 SA- β -Gal 染色溶液染色 20h 以上。 β -gal 阳性细胞呈蓝色, 用倒置显微镜获得图像。

1.4.7 实时荧光定量 PCR

组别设置同 FCM, 培养 48h 后取出孔板, 根据制造商的说明, 使用 FreeZol Reagent 试剂从 hUC-MSCs 中提取总 RNA。使用超微量分光光度计 (THERMO FISHER, China) 检查 RNA 质量和纯度, A260/A280 比率值 1.75~2.0。互补 DNA (cDNA) 通过逆转录试剂盒的每个 0.5 μ g 总 RNA 使用 PrimeScript RT-PCR Kit (Takara, Japan) 使用 CFX-Real-Time-PCR-Detection-System 实时 PCR 系统 (Bio-Rad, USA) 使用 Power-SYBR-Green-PCR-mastermix 扩增 cDNA, 每个测量内参基因, 使用 Delta-Ct 法。具体检测因子及其引物序列如表 1 所示。

表格要有表题, 表格为三线表, 栏头左上角不用斜线, 表身不用纵线, 表中上下行数字对齐。说明性的资料应置于表下方注释中。

表 1 qRT-PCR 引物序列表

Primer 名称	序列 (5' to 3')
Homo P53-Forward	CCTCCTCAGCATCTTATCCG
Homo P53-Reverse	GCACAAACACGCACCTCAAA
Homo P21-Forward	CCCGTGAGCGATGGAAGTT
Homo P21-Reverse	CGAGGCACAAGGGTACAAGAC
Homo P16-Forward	TTCCTGGACACGCTGGTGGTG
Homo P16-Reverse	GGCATCTATCGGGCATGGTTA
Homo ALP-Forward	AACACCACCCAGGGGAAC
Homo ALP-Reverse	TGGCATGGTTCACTCTCCT
Homo OCN-Forward	AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT
Homo OCN-Reverse	GCGCCTGGGTCTCTTCACT
Homo BMP2-Forward	CCAGCCGAGCCAACACTGTGC
Homo BMP2-Reverse	TCTCCGGGTTGTTTTCCCACTCG
Homo FAB4-Forward	GGCCAGGAATTTGACGAACT
Homo FAB4-Reverse	TTTCCATCCCATTTCTGCAC
Homo PPAR γ -Forward	TGCACTGGGGATGTCTCATA
Homo PPAR γ -Reverse	CAGCTGGTCCGATATCACTGGA
Homo β -actin-Forward	CACGATGGAGGGCCGGACTCATC
Homo β -actin-Reverse	TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT

1.4.8 酶联免疫吸附测定法 (ELISA 法)

根据制造商的说明, 使用 ELISA 法测量 CMs 中衰老相关分泌表型 (SASP) MMP-2、IGFBP4、IGFBP7 和 IL-6 浓度。通过测量 450nm 处的吸光度获得结果。每个样品一式 3 份测量。

1.4.9 hUC-MSCs 体外诱导成骨、成脂分化能力的鉴定

hUC-MSCs 以 2×10^4 /孔的密度接种于 12 孔板中, 每孔加入 1mL 培养基, 接种 24h 后, 木犀草素组给予 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 LUT 处理 48h, 待细胞生长至 70% 融合时, 更换为成骨诱导培养基, 待细胞生长至 100% 融合时, 更换为成脂诱导培养基, 对照组由含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养基培养。组别设置同上, 每组 3 个复孔, 按照全量换液。诱导 2~4 周后对其进行茜素红染色, 成脂诱导 2~4 周后进行油红 O 染色, 成骨诱导 2~4 周后进行茜素红 S 染色。

(1) 成骨染色。茜素红染色: 弃培养基, 用 PBS 轻轻洗涤 2 次后, 用 4%PFA 室温孵育 30min, 以 PBS 洗涤 3 次, 5min/次, 每孔进行茜素红染色 15min, 然后 PBS 洗涤 3 次后, 于倒置显微镜下观察并拍照。

(2) 成脂染色。油红 O 染色: 首先除去细胞培养板中的培养基, 用 PBS 轻轻洗涤 2 次后, 用 4%PFA 室温孵育 30min, 以 PBS 洗涤 3 次, 5min/次, 加入油红 O 染色液, 室温孵育 15min。

统计学方法不可少, 并应该有重复实验次数或例数。

1.5 统计学方法

结果表示为(平均值 \pm 标准差)。使用 GraphPad Prism 8 软件进行非配对 t 检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。所有结果均代表 3 个独立实验产生的数据。

按研究方法的顺序对应叙述相应产出的结果, 以精练文字、准确数据、客观证据、图表结合, 灵活呈现结果, 无需诠释其含义。用图或表, 则文中不需重复其数据, 只需强调或摘述其主要发现。图表紧随文后, 文字与图表呼应互补。

2 结果

2.1 LUT 对 hUC-MSCs 生存及细胞增殖的影响

$0 \sim 15 \mu\text{mol/L}$ 浓度 LUT 处理 hUC-MSCs 细胞, CCK-8 结果显示, 24h 各组细胞存活率无显著差异, 48h $10 \mu\text{mol/L}$ 及 $10 \mu\text{mol/L}$ 以上组细胞存活率显著低于模型组 ($P < 0.01$), 72h $5 \mu\text{mol/L}$ 及 $5 \mu\text{mol/L}$ 以上组细胞存活率均显著低于模型组 ($P < 0.0001$), 见图 1A。同时, FCM 分析表明, 与模型组相比, LUT 组处理 48h 后细胞凋亡率无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1B。因此, 后续实验我们选用 $5 \mu\text{mol/L}$ LUT 处理 hUC-MSCs 48h 并检测其相关变化。与模型组相比, 木犀草素组 hUC-MSCs 细胞在 G_0/G_1 期占百分率明显降低 ($P < 0.05$), S/ G_2 期占百分率显著升高 ($P < 0.01$)。见图 1C。

3 讨论

研究证实细胞衰老是一个有所重叠又不尽相同, 信号通路作用^[11]。衰老细胞细胞周期阻滞 p16 表达上升以及 SA- β -gal 活性的分泌^[12]。而 MSCs 复制性衰老与 SASP 的分泌息息相关, SASP 是调控微环境向衰老转变的重要促进信号分子, 可以通过旁分泌等方式形成衰老细胞与非衰老细胞的双向沟通架桥, 最终引起的微环境趋于“老态”^[13-14]。现有的研究公认衰老 MSCs 往往会趋向成脂分化, 减少成骨分化, 已有多个体内外实验证实细胞衰老和各种因素引起的 SASP 的增多是 MSCs 衰老的主要诱因^[15]。

此前有研究证明 LUT 可以促进早代骨髓 MSCs 的成骨分化, 抑制其脂化, 但尚未有研究探索 LUT 对成骨相关因子 BMP2 及晚代 hUC-MSCs 的影响^[16-17]。此次的结果反映, LUT 通过下调衰老相关基因与降低 SA- β -gal 活性来促使细胞年轻化, 并下调 SASP, 上调成骨相关因子, 塑造动态年轻化微环境来促进细胞成骨, 与此前低表达 IGFBP7 的抑制成骨这一结论不一致^[18]。另, 本次结果显示, LUT 能抑制衰老 hUC-MSCs 的脂化。成骨成脂结果显示, 含有 LUT 的全化学培养体系可维持 MSCs 的固有生物学特征。

本研究再度证实了 LUT 含有“年轻”信号分子, 经 LUT 处理的 hUC-MSCs 表现出年轻化细胞特征, LUT 可以下调衰老细胞中 SA- β -gal 表达, 降低衰老细胞中 p53、p21、p16 的表达水平, 而且能够降低 MSCs 培养体系中多个 SASP 的浓度, 重启细胞周期, 这些结果均提示 LUT 能够抑制 hUC-MSCs 的复制性衰老进程。细胞凋亡率的结果提示, LUT 并不通过特异性识别杀灭衰老细胞来发挥抗衰作用, 而是直接作用于衰老 hUC-MSCs 与其生态微环境, 促使细胞向年轻状态转化, 激活细胞有效功能。需要强调的是, 本次结果恰恰印证了“MSCs 分化与衰老不是孤立的, 而是在细胞动态变化过程中相互制约的平衡关系”这一观点^[19]。

但本研究也存在不足之处, 我们做的仅仅是细胞层面的实验, 尚未达到干细胞关键质量属性临床级全面评估标准, 且 LUT 逆转衰老的作用机制有待深入研究。此外, 复制性衰老仅为体外细胞衰老的一种诱导模型, LUT 能否逆转其他原因导致的细胞衰老(如放化疗、高脂、高氧等), 及其调控衰老的具体途径、衰老 hUC-MSCs 的异质性变化尚待后续实验深入探究。

讨论应以正文中的实验或考察得到的现象、数据的阐述分析为依据, 完整、准确、简洁地指出以下内容: a. 由对研究对象进行考察或实验得到的结果, 所揭示的原理及其普遍性; b. 研究中有无发现例外或本论文尚难以解释和解决的问题; c. 与先前已发表过的(包括他人和作者自己)研究工作的异同; d. 本论文在理论上和实用上的意义及价值; e. 进一步深入研究本课题的建议。

参考文献

参考文献请控制在 15 条左右，可适当引用本刊近三年发表的论文。参考文献著格式录请参考本刊，作者英文字母用大写。

- [1]LEI Q,GAO F,LIU T,et al.Extracellular vesicles deposit PCNA to rejuvenate aged bone marrow-derived mesenchymal stem cells and slow age-related degeneration[J].Sci Transl Med,2021,13(578): eaaz8697
- [2]GUO X H,WEI W J,GUAN X,et al.Progress in replicative senescence of mesenchymal stem cells regulated by microenvironment[J].Sheng Li Xue Bao,2022,74(3): 469
- [3]LIANG G H,ZHAO J L,DOU Y X,et al.Mechanism and experimental verification of luteolin for the treatment of osteoporosis based on network pharmacology[J].Front Endocrinol(Lausanne),2022,13: 866641
- [4].....

[10]项云,梁潇,鲍翠玉,等.木犀草素调控内质网应激-线粒体凋亡通路在脂毒性心肌损伤中的作用[J].湖北科技学院学报(医学版),2023,37(3): 185

.....

具体范例请到官网参考:

<http://www.xnyb.cbpt.cnki.net/WKD/WebPublication/wkTextContent.aspx?navigationContentID=f769b86c-e89e-4658-983a-a84a7439203d>

例:

- [3]王慕逖.儿科学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001:285
- [5]陈准金.多机电力系统分散是优励磁控制器的研究[D].北京:清华大学电机工程系,1988
- [7]姜锡洲.一种温热外敷药制备方法[Z].中国专利,881056073.1989-07-26
- [8]张泰昌.泰胃美治疗十二指肠球部溃疡并出血的体会[N].医药信息论坛,1992-12-03(11)