

不同年龄人角化细胞的衰老特征评价

杨婷婷 陈冬梅 刘淑丹 马海滨 马晓娜 梁雪云

摘要 **目的** 评价年龄对衰老细胞模型的影响,以建立体外培养的衰老细胞模型。**方法** 本研究根据供者年龄分为 4 组,每组 3 例生物学重复,<10 岁、10~20 岁、20~30 岁和 >30 岁组。酶消化法体外分离培养不同年龄供体的表皮角化细胞。体外培养至 P2 代,进行以下检测:β-半乳糖苷酶染色鉴定衰老细胞数量;CCK-8 和克隆形成试验检测细胞生长和增殖能力;磷酸化 γ-H2A.X 免疫荧光染色检测细胞 DNA 损伤;Western blot 法检测分析细胞中周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白表达。**结果** 各组衰老细胞数占总细胞数百分比分别为 0.864%、0.789%、5.472%、8.765%,差异有统计学意义($P=0.000$)。随着年龄的增加,HKC 细胞倍增能力下降,倍增时间延长。<10 岁组中细胞核 Phospho-Histone H2A.X 表达细胞数量少,>30 岁组人正常角化细胞内 DNA 双链断裂大量产生。同时,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 2A(CDKN2A/p16^{INK4a})、p21、p53 的表达随年龄增加而上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 正常人角化细胞的增殖与衰老与人类年龄呈显著正相关,可以作为研究人类衰老的细胞模型。

关键词 年龄相关衰老 角化细胞 细胞模型 增殖 DNA 损伤

中图分类号 R33

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.020

Characteristics of Aging in Human Keratinocytes from Different Age Groups. Yang Tingting, Chen Dongmei, Liu Shudan, et al. Human Stem Cell Institute of General Hospital, Ningxia Medical University, Ningxia 750004, China

Abstract **Objective** Increased life spans have created a need for greater understanding of the diseases of old age including the integumentary system – the skin. In this study, The aging cell model was established by the analysis of the influence of age on the aging of normal keratinocytes. **Methods** Skin keratinocytes were isolated from different age donor by enzyme digestion method and cultured in vitro till P2 generation. Beta galactose glucoside enzyme staining detected the number of senescent cells using visible imaging. The growth and proliferation of keratinocytes was detected by CCK-8 assay and clone formation test. DNA damage was detected by immunofluorescence assay with a DNA damage marker γ-H2A.X. Cyclin-dependent kinase inhibitor protein of protein expression were analyzed by Western blot. **Results** Results showed that accumulation of senescent cells with age. The percentage of positive cells expressed SA-β-Gal was 0.864%, 0.789%, 5.472% and 8.765% within each group, respectively. The difference was statistically significant ($P=0.000$). Multiplication of the cell from aging donor gradually decreased, doubling time was gradually prolonged. Relatively small number of cell were induced to express the markers of DNA damage phospho-histone H2A in less than ten years old group. However, A large number of normal keratinocytes of DNA double strand fractures were produced in over 30 years of age group. The expression of cyclin-dependent kinase inhibitor protein p16^{INK4a}, p21 and p53 were significantly increased with age ($P<0.05$). **Conclusion** The proliferation and senescence of the normal keratinocytes are positively correlated with the age of human beings and can be used to study the aging of human beings as a cell model.

Key words Age-related aging; Keratinocytes; Cell models; Proliferation; DNA damage

随着人口老龄化,健康老龄化已成为全球共同的发展目标。衰老是人类疾病最大的危险因素,针对衰老的基础和转化医学研究正成为全人类共同关注且亟需解决的重大科学问题^[1]。然而,人类衰老的过程漫长且复杂,小鼠等模式动物的衰老过程周期长且

与人相差甚远,人类衰老的转化医学研究一直面临着巨大的挑战^[2]。寻找适合的自然条件下人衰老细胞模型对于揭示人类自然衰老的奥秘以及实现防治衰老相关疾病具有重要的科学意义。Lopez-Otin 等^[3]在《细胞》杂志上详细列举了不同生物衰老的九大特征,包括基因组不稳定、端粒缩短、表观遗传发生改变、蛋白稳态丧失、营养感应失调、线粒体功能异常、细胞衰老、干细胞衰竭和细胞间交流改变,说明细胞衰老与生物体衰老虽有联系但并不是同一概念,对细

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ15133)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学总医院干细胞研究所

通讯作者:陈冬梅,副研究员,电子信箱:18309679151@163.com

胞衰老的研究可以为阐明生物机体衰老的机制提供一个崭新的研究层面。人角化细胞(keratinocytes, HKCs)是位于人类皮肤表皮层基底部的不断增殖能够分化成角质细胞的一类祖细胞,其增殖能力与人类年龄呈显著正相关,且表皮组织在临床上容易获得,因此,是体外研究年龄相关衰老细胞模型的良好来源之一^[4]。本研究系统的研究了不同年龄来源角化细胞增殖、衰老和DNA损伤情况,为评价角化细胞是否呈现年龄相关衰老表型提供了理论依据和数据支持。

材料与方法

1. 材料:(1)组织标本与细胞来源:年龄 ≤ 30 岁正常人皮肤组织来源于宁夏医科大学总医院泌尿外科行包皮环切手术后废弃的皮肤,年龄 > 30 岁正常人皮肤组织来源于宁夏医科大学总医院烧伤外科行皮肤移植手术裁剪废弃皮肤,经笔者医院伦理学委员会批准且获得患者知情同意。(2)主要试剂及仪器:CELLnTEC表皮细胞培养基(瑞士CELLnTEC公司),TrypLE Express消化酶、RIPA、Protease Inhibitor Cocktail(美国Thermo Fisher公司);II型dispease酶(瑞士Roche公司);CCK-8试剂(Transgen Biotech公司);细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(中国碧云天公司);兔抗人多克隆抗体p16INK4a和Phospho-Histone H2A.X(Ser140)单克隆抗体(美国Thermo Fisher公司);兔抗人多克隆抗体p53、p21(美国Santa Cruz公司);HRP标记山羊抗兔二抗和Alexa Fluor 594标记兔抗鼠荧光二抗(美国Thermo Fisher公司);倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);CO₂培养箱(美国Thermo Fisher公司);电泳仪、蛋白印迹成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2. 方法:(1)实验设计:根据供体不同年龄将实验分为4组: < 10 岁组,10~20岁组,20~30岁组, > 30 岁组,每组3例生物学重复。(2)细胞培养:术后无菌取材皮肤组织,密封运输至实验室。双抗PBS冲洗3遍,剔除皮下结缔组织和脂肪组织,剪至1cm³左右片状,真皮层向下至于3.3mg/ml II型dispease酶中,4℃消化16h,次日将表皮和真皮层分离,将表皮层于0.25%胰酶+0.04%EDTA于37℃消化15min,10%FBS+DMEM培养基中和,涡旋振荡数次,弃去角质层,1000r/min离心10min,弃去上清,PBS清洗1遍,重悬于CELLnTEC无血清培养基中,每两天换液,37℃,5%CO₂继续培养6天,待细胞80%汇合,即可传代。(3)CCK-8法检测角化细胞增殖:以TrypLE Express消化处于对数生长期的

人HKCs,细胞计数板计数,以每100 μ l接种于96孔板中(细胞密度3000个/孔),在37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养2h后,即细胞贴壁后,两组各取6孔细胞,每孔加入10 μ l CCK-8溶液,继续在37℃恒温培养箱中孵育4h后,酶标仪检测450nm波长处各孔的A值。96孔板置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中继续培养1~7天,每24h测6个复孔,并设无细胞的空白对照组。上述实验均重复3次,结果取平均值。(4)克隆形成效率检测:同时获取P3代的不同年龄分组的HKCs,以200个/皿分别接种于60mm培养皿中,轻轻晃动培养皿,使细胞均匀分散在培养皿中,将培养皿置于37℃、5%CO₂恒温饱和湿度培养箱中培养?当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去培养液,用PBS小心洗涤2次,加4%多聚甲醛,固定10min。然后吸去固定液,用PBS小心洗涤1次,0.1%结晶紫染液染5~6min,用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。拍照并在低倍显微镜下计数 > 50 个细胞的克隆数。克隆形成率(%)=(克隆数/接种的单个细胞数) $\times 100\%$ 。(5) β -半乳糖苷酶染色鉴定衰老细胞:不同年龄患者来源的HKCs,以相同代次和密度接种于6孔板中,培养至对数增长期,4%多聚甲醛固定,按SA- β -Gal(senescence-associated β -galactosidase)染色试剂盒说明书步骤染色,倒置光学显微镜下观察染色结果。染色呈蓝色为衰老细胞,每组计数统计10个视野衰老细胞个数。(6)免疫荧光染色:各处理组细胞经40g/L多聚甲醛固定30min,3ml/L Triton X-100细胞膜穿孔10min,根据二抗选择兔血清封闭,次序与单克隆抗体Phospho-Histone H2A.X(1:200)一抗以及Alexa Fluor 594标记兔抗鼠二抗(1:1000)孵育、洗涤,DAPI染核,倒置荧光显微镜下观察细胞特异性发光情况,Image pro plus 6.0图像分析软件进行阳性细胞计数。(7)Western blot法分析蛋白表达:RIPA裂解液提取样本总蛋白,BCA法测定蛋白质浓度,等量上样,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿法转膜后,5%脱脂奶粉封闭1h,次序与一抗(4℃过夜)、二抗孵育(室温30min),利用ECL法检测目的蛋白条带,灰度扫描后分析蛋白质表达水平的差异。使用Image pro plus 6.0专业图像分析软件进行图像分析,用 β -actin标准化蛋白表达量。

3. 统计学方法:所有实验重复进行了3次。数据由SPSS 17.0统计学软件对数据进行统计分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用统计学软件对实验结果

进行单因素方差分析, *LSD* 多重比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 年龄引起人正常角化细胞衰老: 本实验采用角化细胞专用无血清培养液 (Cnt - Prime) 实现稳定的角化细胞体外培养。角化细胞为多角形, 铺路石样、呈集落生长, 5 ~ 7 天连接成片可传代。分化的细胞呈体积较大的扁平细胞, 几乎不再分裂。β - 半乳糖

苷酶染色后衰老细胞为蓝绿色, 统计结果显示, < 10 岁、10 ~ 20 岁、20 ~ 30 岁和 > 30 岁各组衰老细胞数占总细胞数百分比分别为 0.864%、0.789%、5.472%、8.765%, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。> 30 岁组细胞体积变大, 衰老细胞数较其他年龄组显著增加 ($P = 0.000$, 图 1)。相关性分析显示衰老细胞数量与年龄呈正相关 ($P < 0.01$), 相关系数为 0.926。

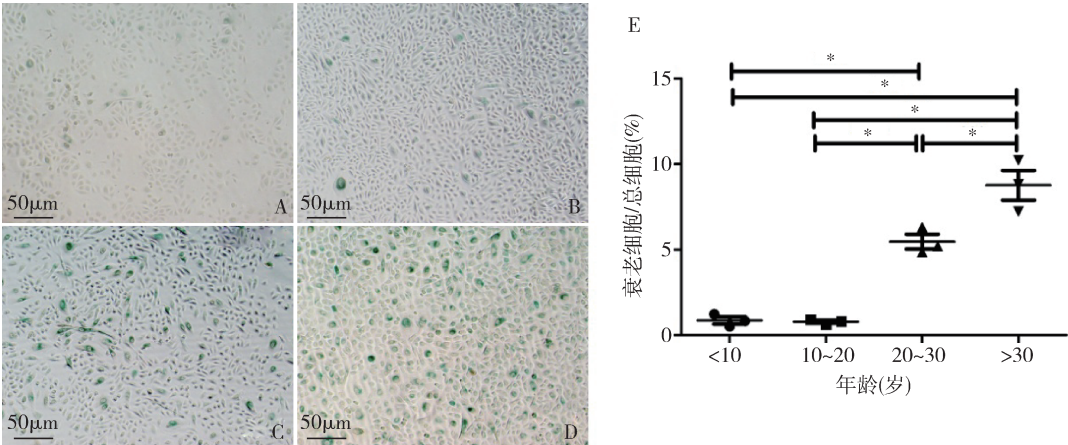


图 1 SA - β - gal 染色检测各组衰老细胞数量
A. 5 ~ 10 岁, B. 10 ~ 20 岁; C. 20 ~ 30 岁; D. > 30 岁; * $P = 0.000$

2. 衰老的人正常角化细胞增殖能力减弱: CCK8 检测显示, < 10 岁供体来源培养的角化细胞活细胞数量较其他年龄供体组的 HKC 细胞活细胞数量, 在培养的第 2 天起各培养时间点 A 值均高于其他年龄供体组的 HKC 细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。> 30 岁年龄组, 在培养的第 3 天起各培养时间点 A 值均降低, 说明 HKC 细胞活细胞数量较少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2A)。

克隆形成试验结果显示, < 10 岁供体来源的 HKC 细胞的克隆形成数量明显高于其他年龄供体组的 HKC 细胞的克隆形成数量。< 10 岁供体来源培养的 HKC 细胞的克隆形成率为 49.00%, 其他年龄供体组的 HKC 细胞克隆形成率随年龄增加降低, > 30 岁年龄组为 12.50%, 各组间比较差异有统计学意义 (图 2B)。

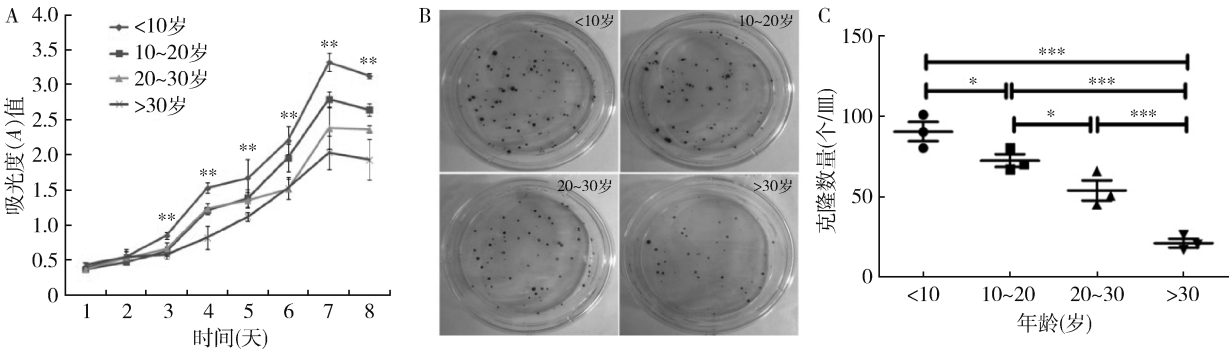


图 2 不同年龄角化细胞增殖能力检测
A. 不同年龄组角化细胞生长曲线; B. 不同年龄组角化细胞克隆形成数量; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P = 0.000$

3. 衰老的人正常角化细胞 DNA 双链断裂产生: 磷酸化组蛋白 γ - H2A. X 免疫荧光染色分析不同年

龄组人正常角化细胞 DNA 双链断裂损伤情况。
<10 岁组中细胞核 Phospho - Histone H2A.X 表达细

胞数量少,几乎没有 DNA 双链损伤; >30 岁组人正
常角化细胞内 DNA 双链断裂大量产生(图 3)。

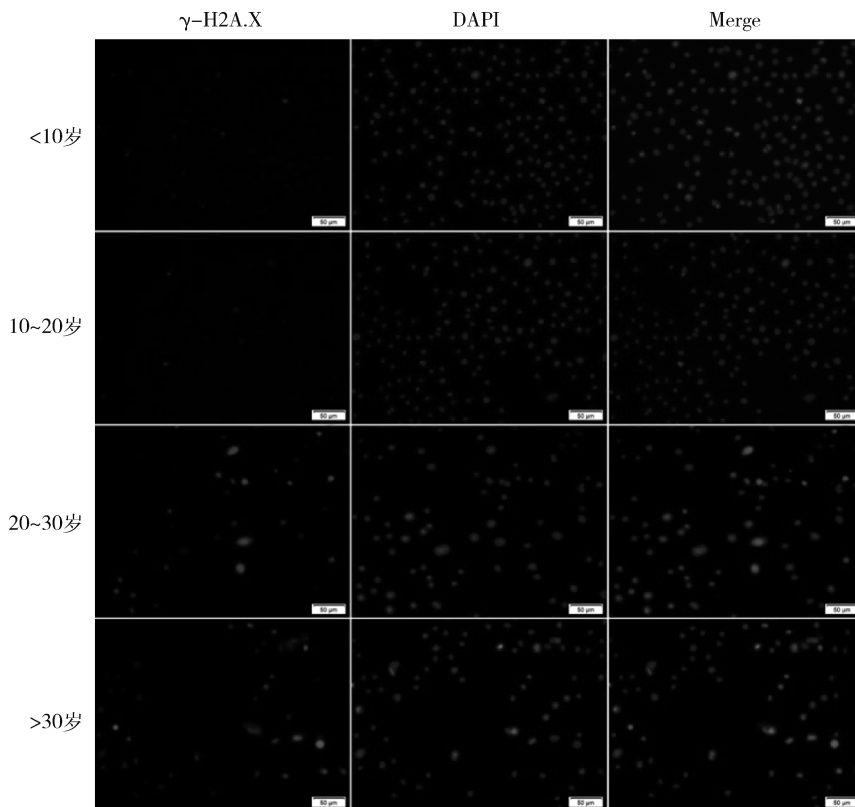


图 3 不同年龄角化细胞 DNA 双链断裂情况(免疫荧光染色)

4. 衰老的人正常角化细胞中周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白表达升高:细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 2A(CDKN2A/p16^{INK4a})、p21、p53 是细胞周期蛋白的抑制因子,当细胞老化时,会抑制细胞分裂、并启动导致细胞自然死亡和衰老的过程。本研究检测

p16^{INK4a}、p21、p53 蛋白表达情况,结果显示,p16^{INK4a}、p21、p53 3 种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白的表达均随年龄的增加而上调,尤其在 >30 岁组 p16^{INK4a}和 p21 蛋白表达显著增高($P=0.000$)。

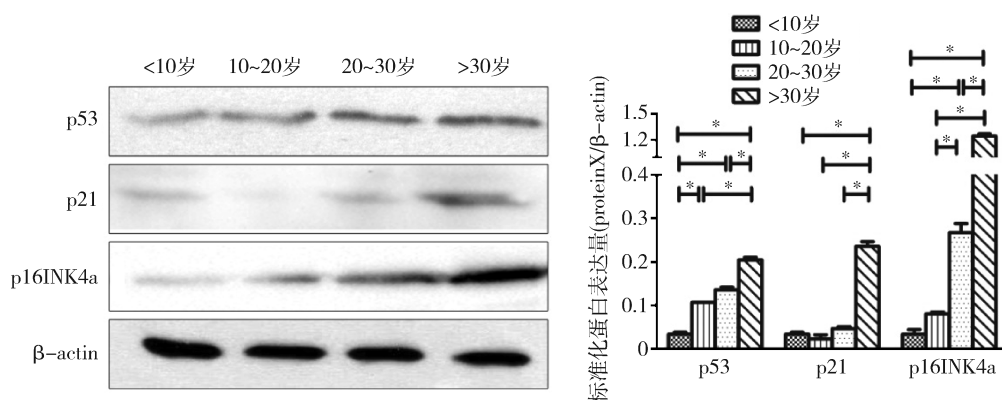


图 4 不同年龄角化细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白表达差异

* $P=0.000$

讨 论

老龄化是包括神经退行性疾病、癌症、心血管疾

病和代谢疾病等多种普遍疾病的一个风险因素。虽然通过生物模型的使用已经对导致衰老的分子途径

和与年龄相关的疾病进展有一定理解,但如何应用这些知识进行临床干预还尚不明确^[5,6]。因此深入研究衰老过程以及年龄相关疾病的预防与干预有重要意义。细胞模型对药物的干预反应最直接且迅速,是研究药物对线粒体损伤累积,端粒酶活性降低,DNA 损伤修复能力下降,活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多和炎症因子分泌增加等衰老表型改善效果的有效工具,一定程度上反应出药物对衰老的作用及机制^[7-9]。本研究检测了不同年龄供者来源角化细胞衰老相关细胞功能性改变指标,评估细胞衰老状态,系统分析了正常人角化细胞衰老与年龄的相关性,发现角化细胞能够在体外稳定培养,能够模拟年龄相关衰老的细胞表型。

目前常用的细胞衰老模型分为应激诱导早熟性衰老(stress-induced premature senescence, SIPS)和复制性衰老(replicative senescence, RS)模型^[10]。应激性衰老指通过化学损伤、氧化应激损伤或激活相关信号通路等细胞内外的应激因素引起细胞短时间内出现不依赖于端粒缩短的衰老表现,与年龄相关衰老发生机制截然不同,不能完全反映在正常无外界刺激的条件下的衰老模式^[11,12]。另一种细胞衰老模型是通过体外连续培养构建复制性细胞衰老模型,但长期的体外培养本生就会导致细胞应激性衰老和遗传突变,增加了衰老研究的干扰因素。笔者通过体外分离不同年龄细胞短暂传代培养构建衰老模型,更好的反应个体从年轻到衰老过程中细胞所发生的生物学变化,模拟细胞正常衰老的连续性过程。

正常人角化细胞取材相对较容易,增殖能力强,且实验中发现随着年龄增长,角化细胞的增殖和分化能力具有明显下降,可能成为研究人类年龄相关衰老的有效模型^[13]。本研究采用 Dispease 酶消化法进行 HKCs 原代培养并以低代次传代细胞构建衰老模型。体外培养 HKCs 在角化细胞选择培养基中增殖快、不易分化、细胞纯度高,为进一步的衰老模型构建提供了实验基础。

机体的衰老是伴随一生的复杂的动态变化。本研究设置了 4 个时间段的供者来源的角化细胞,这种人为的时间节点划分,可能违背衰老的时间连续性特点,但从整体来看,<10 岁和>30 岁供者细胞还是反应出了随年龄增长导致的增殖能力下降,DNA 损伤增加等衰老表型上差异有统计学意义。细胞体外增殖能力下降是细胞衰老的生物学标志^[14]。本研究通过检测细胞生长曲线,克隆形成能力和细胞周期蛋白

依赖性激酶抑制蛋白的表达,多方面反应细胞增殖能力的变化。衰老细胞的细胞周期阻滞,参与调控细胞周期的蛋白 p16^{INK4a}、p21 和 P53 的表达增加,是常用的衰老相关标志物^[15,16]。多项研究表明,p16^{INK4a} 阳性的衰老细胞在多个组织中积累,他们的清除成功地延迟了衰老和与年龄相关的疾病^[17,18]。同时在衰老细胞中,p53 的磷酸化和 p21 的水平大大提高,由于 p53 的激活,p21 水平的增加是细胞周期 G₁ 期阻滞和衰老的关键调控因子。本研究通过对不同年龄细胞衰老相关标志物 p16^{INK4a}、p21 和 P53 蛋白水平进行检测,随着供者年龄的增加,HKCs 中 p16^{INK4a}、p21 和 P53 的表达呈递增趋势。SA-β-gal 染色实验被认为是识别衰老细胞的黄金标准。H2A.X 磷酸化产生的 γ-H2A.X 对 DNA 双链断裂快速敏感的反应,使 γ-H2A.X 作为一种生物标志物用于检测早期 DNA 双链损伤^[19]。这两个指标结合能够较系统全面的反应出细胞的衰老状态。笔者的研究结果显示,随着年龄的增长,高表达 SA-β-gal 的角化细胞数量增加,γ-H2A.X 阳性位点增多,说明衰老累积的 DNA 损伤增加。

综上所述,通过多方面分析显示不同年龄供者来源角化细胞短暂体外培养模型能够反应出年龄相关衰老的表型。尽管细胞模型在衰老研究中应用有一定局限性,但充分利用每种衰老模型的优势对于衰老相关研究以及抗衰老药物的筛选都很有帮助。本研究为进一步探讨抗衰老与年龄相关衰老疾病防治提供了可参考的模型。

参考文献

- 1 陈孟毅,孟爱民.细胞衰老与老龄化疾病[J]. 生命科学, 2017,29(5): 484-488
- 2 Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, *et al.* Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2015,3: 283-303
- 3 Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, *et al.* The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013,153(6): 1194-1217
- 4 Boraldi F, Bartolomeo A, Di Bari C, *et al.* Donor's age and replicative senescence favour the in-vitro mineralization potential of human fibroblasts[J]. *Exp Gerontol*, 2015,72: 218-226
- 5 Srivastava S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders[J]. *Genes*, 2017,8(12):389
- 6 Zinger A, Cho WC, Ben-Yehuda A. Cancer and aging - the inflammatory connection[J]. *Aging Dis*, 2017,8(5): 611-627
- 7 Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, *et al.* Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype[J]. *Cell Metab*, 2016,23(2): 303-314

(下转第 95 页)

流速度达到预防脑萎缩的目的,则需要进一步研究。

本研究采用的是病例对照研究的设计,虽然在选择研究对象时为了避免选择性偏移而尽量选择年龄、性别、发病年限等近似的患者,但仍存在无法避免的不足。如患者回忆的偏差、无法了解脑萎缩患者在脑卒中患者中的比例等。所以建议临床进一步开展大样本、多中心的队列研究,对于诊断为脑卒中的患者进行长期的随访观察,以脑萎缩为随访终点,比较不同结局患者的差异,从而为脑卒中后脑萎缩的危险因素研究提供更有力的证据。

综上所述,本研究表明大脑中动脉和颈内动脉颅内段狭窄对脑萎缩发生有较大影响,心房颤动、糖尿病和心肌梗死或心绞痛是脑卒中患者脑萎缩发生的独立危险因素,对于有相关病史的脑卒中患者及早进行脑萎缩预防有重要临床意义。

参考文献

- 1 Wisse LEM, de Bresser J, Geerlings M I, *et al.* Global brain atrophy but not hippocampal atrophy is related to type 2 diabetes[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 344(1): 32 – 36
- 2 王崇,王建明,董瑞国,等. 缺血性脑卒中患者血管性认知功能障碍的影响因素[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(15): 4165 – 4167
- 3 曲明磊. 老年性脑萎缩并发脑出血 38 例的临床研究[J]. *中西医结合心血管病杂志:电子版*, 2014,15: 9 – 10
- 4 Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(2): 128 – 142
- 5 杨洁,区腾飞,蒲蜀湘,等. 卒中及短暂性脑缺血发作患者不同部

- 位脑萎缩的危险因素[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2016, 42(10): 609 – 615
- 6 李萍,赵树明,胡亚男,等. 脑出血发病机制研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015,2: 214 – 215
- 7 周莉,房辉,徐刚,等. 血清 β – 淀粉样蛋白及可溶性糖基化终末产物受体与新诊断 2 型糖尿病患者认知功能损害的关系[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(2): 150 – 153
- 8 Laurent S, Boutouyrie P. The structural factor of hypertension[J]. *Circ Res*, 2015, 116(6): 1007 – 1021
- 9 Choudhury A, Lip GYH. Atrial fibrillation and the hypercoagulable state: from basic science to clinical practice[J]. *Pathophysiol Haemostas Thromb*, 2003, 33(5 – 6): 282 – 289
- 10 Azoulay L, Dell’Aniello S, Simon T A, *et al.* Initiation of warfarin in patients with atrial fibrillation: early effects on ischaemic strokes[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(28):1881
- 11 刘小英,侯玉立. 大脑中动脉经颅多普勒脉动指数与缺血性脑卒中及其危险因素的分析[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2014, 21(5): 375 – 376
- 12 杨洁,区腾飞,解龙昌,等. 卒中前痴呆的危险因素分析[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2015, 41(12): 724 – 727
- 13 Mapstone M, Cheema A K, Fiandaca M S, *et al.* Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4): 415 – 418
- 14 石向群,张志强,张亮,等. 无症状性颈内动脉中重度狭窄及支架置入对患者认知功能的影响[J]. *中国脑血管病杂志*, 2014, 12:4

(收稿日期:2018 – 01 – 02)

(修回日期:2018 – 03 – 18)

(上接第 87 页)

- 8 Zhao Y, Tyshkovskiy A, Munoz – Espin D, *et al.* Naked mole rats can undergo developmental, oncogene – induced and DNA damage – induced cellular senescence[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018,115(8): 1801 – 1806
- 9 Tassone B, Saoncella S, Neri F, *et al.* Rictor/mTORC2 deficiency enhances keratinocyte stress tolerance via mitohormesis [J]. *Cell Death Differ*, 2017,24(4): 731 – 746
- 10 Childs BG, Durik M, Baker DJ, *et al.* Cellular senescence in aging and age – related disease: from mechanisms to therapy[J]. *Nat Med*, 2015,21(12): 1424 – 1435
- 11 Marazita MC, Dugour A, Marquioni – Ramella MD, *et al.* Oxidative stress – induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: implications for age – related macular degeneration[J]. *Redox Biol*, 2016,7: 78 – 87
- 12 Gurjula AN, Liu WR, Mogford JE, *et al.* Age – dependent response of primary human dermal fibroblasts to oxidative stress: cell survival, pro – survival kinases, and entrance into cellular senescence [J]. *Wound Repair Regen*, 2005 13(6): 565 – 575
- 13 Lecardonnel J, Deshayes N, Genty G, *et al.* Ageing and colony – forming efficiency of human hair follicle keratinocytes[J]. *Exp Der-*

matol, 2013,22(9): 604 – 606

- 14 Berkenkamp B, Susnik N, Baisanry A, *et al.* In vivo and in vitro analysis of age – associated changes and somatic cellular senescence in renal epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2014,9(2): e88071
- 15 Pan H, Finkel T. Key proteins and pathways that regulate lifespan [J]. *J Biol Chem*, 2017,292(16): 6452 – 6460
- 16 Yosef R, Pilpel N, Papisrnadov N, *et al.* p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling[J]. *EMBO J*, 2017,36(15): 2280 – 2295
- 17 Martins MJ, Constancia M, Neves D, *et al.* Biomarkers of aging: from cellular senescence to age – associated diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017,2017:7280690
- 18 Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, *et al.* Cellular senescence drives age – dependent hepatic steatosis[J]. *Nat Commun*, 2017,8: 15691
- 19 Kim HN, Chang J, Shao L, *et al.* DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing *Osx1* may cause their decrease with age [J]. *Aging Cell*, 2017,16(4): 693 – 703

(收稿日期:2018 – 02 – 08)

(修回日期:2018 – 03 – 20)