

胰岛素样生长因子结合蛋白 4 基因对内皮细胞衰老的调节作用

陈春燕¹, 郭晋村², 黄卫斌²

(1. 浙江中医药大学附属第三医院心血管科, 浙江省杭州市 310005; 2. 厦门市心脏中心心内科, 福建省厦门市 361004)

[关键词] 胰岛素样生长因子结合蛋白 4; 血管内皮细胞; 细胞衰老

[摘要] **目的** 探讨胰岛素样生长因子结合蛋白 4(IGFBP4)对血管内皮细胞衰老进程的影响。**方法** 分离培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)并构建传代性衰老模型,分别将过表达 IGFBP4、沉默 IGFBP4 表达的慢病毒及空载慢病毒转染 HUVEC,结合光镜、β-半乳糖苷酶活性测定及细胞周期测定等方法观察各组细胞传代过程中的衰老现象。**结果** 慢病毒感染细胞后,过表达组[IGFBP4(+)组]内皮细胞传代数较空载病毒组(对照组)和 IGFBP4 基因沉默组[IGFBP4(-)组]明显增加[14.33±0.67 比 9.67±0.33、10.67±0.33; $P<0.05$];实验中各代细胞 IGFBP4(+)组衰老率均低于对照组和 IGFBP4(-)组[以第 6 代为例,分别为(24.60±0.90)%比(34.92±0.92)%、(33.74±0.62)%, $P<0.05$];随传代代龄增加,高代龄细胞(第 6 代)较低代龄细胞(第 2 代)降低的细胞增殖指数 IGFBP4(+)组均低于对照组和 IGFBP4(-)组[(10.35±0.57)%比(14.90±0.85)%、(13.99±0.65)%, $P<0.05$];各组实验在对照组与 IGFBP4(-)组间比较差异无统计学意义。**结论** 提高 IGFBP4 的表达能够延缓血管内皮细胞的衰老进程。

[中图分类号] R543 [文献标识码] A

Effects of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4 on Vascular Endothelial Cell Senescence

CHEN Chun-Yan¹, GUO Jin-Cun², and HUANG Wei-Bin²
(1. Department of Cardiovascular, the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310005; 2. Department of Cardiovascular, Xiamen Heart Center, Xiamen, Fujian 361004, China)

[KEY WORDS] Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4; Vascular Endothelial Cells; Cell Senescence

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP4) on vascular endothelial cell senescence. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in vitro. A HUVEC aging model was established through cell passaging. Lentivirus expressing IGFBP4 or si-IGFBP4, and empty vector transfected HUVEC, then the effects of IGFBP4 on the aging process of these endothelial cells were studied by using light microscopy, senescence-associated (SA) β-galactosidase staining, and cell cycle analysis. **Results** After lentivirus transfection, the HUVEC passage number of the overexpressing IGFBP4(+) group (IGFBP(+) group) was higher than that of the empty vector group (control group) and IGFBP4 silenced groups (IGFBP4(-) group) (14.33±0.67 vs 9.67±0.33 and 10.67±0.33, $P<0.05$); The cell senescence rate of the IGFBP4(+) group was lower than that of the control group and IGFBP4(-) group in every passage (take the 6th passage for example, 24.60%±0.90% vs 34.92%±0.92% and 33.74%±0.62%, $P<0.05$); Along with degenerate, the decreased cell proliferation index (ΔPI) from young passage (2nd passage) to old passage (6th passage) of IGFBP4(+) was smaller than control group and IGFBP4(-) group (10.35%±0.57% vs 14.90%±0.85% and 13.99%±0.65%, $P<0.05$). **Conclusions** IGFBP4 overexpression could inhibit HUVEC senescence.

大量的流行病学研究表明衰老是动脉粥样硬化 疾病的独立危险因素^[1-2],内皮细胞的衰老是动脉粥

样硬化发生的重要环节。胰岛素样生长因子结合蛋白 4 (insulin-like growth factor binding protein-4, IGFBP4) 是胰岛素样生长因子结合蛋白家族(IGFBP)中最小的成员,它与胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)及其相关蛋白构成一个复杂的分子网络,对细胞的生长分化^[3-4]、胎儿的生长发育^[5]及一系列肿瘤的生长调节^[6-7]有着复杂的作用。既往研究认为,IGFBP4 仅能通过与 IGF 特异性结合,并产生生物学效应。近年来,有学者研究发现 IGFBP4 通过对 Wnt- β -Catenin 信号传导通路的调控,促进 P19CL6 细胞(起源于小鼠 P19 胚胎肿瘤细胞系)向心肌细胞分化以及非洲蟾蜍胚胎心脏的发育^[8-9];以上实验均证实 IGFBP4 通过 Wnt 信号传导通路对生长、发育等起调节作用,这种调节作用是独立于 IGF 分子网络的。另外有研究表明血 IGFBP4 水平随衰老及衰老相关疾病而发生动态变化^[10-11],基于以上分析,我们推测 IGFBP4 对细胞的衰老可能发挥调节作用,其作用机制可能与 Wnt 通路有关。本研究通过构建内皮细胞复制性衰老模型,以慢病毒为载体,观察 IGFBP4 能否延缓内皮细胞的复制性衰老进程,为 IGFBP4 在抗内皮细胞衰老、促进损伤内皮修复及抑制动脉粥样硬化进程治疗中应用做初步探讨。

1 材料和方法

1.1 主要材料

慢病毒载体 pBOBI、pBOBI-GFP、pSUPER 及包装系统(pREV、pMDL、pVSVG)由国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心惠赠。pcDNA3.1-IGFBP4 质粒由郭晋村博士构建。内切酶(HindⅢ、BamHⅠ、SalⅠ、XhoⅠ、BglⅡ)、DNA Ligation Kit、Taq 酶、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;dNTP 购自 Fermentas 公司;Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;碱性成纤维生长因子(bFGF)购自 Peprotech 公司;胰蛋白酶、碘化丙啶(PI)、RNaseA 购自 Solarbio 公司;IGFBP4 抗体、GAPDH 抗体购自 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自联科生物公司;DNA 产物纯化回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自天根公司;无内毒素质粒大量抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;兔抗人Ⅷ因子相关抗原免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉公司; β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所。引物序列由 Invitrogen 公司合成。

1.2 慢病毒构建

1.2.1 pBOBI-IGFBP4 载体质粒的构建 以 pcDNA3.1-IGFBP4 中目的基因片段为模板,设计含

BamHⅠ/SalⅠ酶切位点特异性引物:上游引物 5'-TTCGGATCCATGCTGCCCTTCGGCCTC-3',下游引物 5'-TTCGTCGACTCAATGGTGATGGTGATGATGAC-3',通过特异性 PCR 扩增目的基因片段。将目的基因片段与 pMD18-T 载体连接得到含目的基因序列的质粒 pT-target。pT-target 经 BamHⅠ/SalⅠ双酶切后回收目的片段,将目的片段与经 BamHⅠ/XhoⅠ双酶切处理的 pBOBI 载体连接,经转化、扩增、提取质粒,以 BamHⅠ/XhoⅠ小量酶切鉴定及测序确认为含目的基因序列的慢病毒载体 pBOBI-IGFBP4 质粒。

1.2.2 siRNA 慢病毒载体的构建 靶向于 IGFBP4 基因的 siRNA (si-IGFBP4) 寡核苷酸的设计:利用 RNAi Codex 数据库选用下面序列作为干扰序列,并结合 pSUPER 质粒图谱(含 BglⅡ、HindⅢ酶切位点),在 5'、3'端分别设计 BglⅡ和 HindⅢ酶切位点,合成序列为 5'-GAT CCC CAC CGC ACC CAC GAG GAC CTC TAT TCA AGA GAT AGA GGT CCT CGT GGG TGC GGC TTT TTA-3'及 5'-AGC TTA AAA AGC CGC ACC CAC GAG GAC CTC TAT CTC TTG AAT AGA GGT CCT CGT GGG TGC GGT GGG-3'。将两条寡核苷酸经退火处理后,连接到经 BglⅡ/HindⅢ双酶切的 pSUPER 载体,经转化、扩增、提取质粒、BglⅡ/HindⅢ小量酶切鉴定确认为含目的 siRNA 序列的慢病毒载体 pSUPER-si-IGFBP4。

1.2.3 慢病毒的包装 按照 Qiagen 公司无内毒素质粒大量抽提试剂盒操作手册进行各质粒(pBOBI-IGFBP4、pSUPER-si-IGFBP4、pBOBI、pBOBI-GFP、pREV、pMDL、pVSVG)的抽提。实验分组:IGFBP4 过表达组即 IGFBP4(+)组(pBOBI-IGFBP4、pREV、pMDL、pVSVG)、IGFBP4 基因沉默组即 IGFBP4(-)组(pSUPER-si-IGFBP4、pREV、pMDL、pVSVG)、空载病毒组即对照组(pBOBI、pREV、pMDL、pVSVG),以及 GFP 组(pBOBI-GFP、pREV、pMDL、pVSVG),其中 GFP 组用于观察慢病毒感染内皮细胞时的感染效率。取 293FT 细胞按 $(1 \sim 2) \times 10^5$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞生长融合至 70%~80% 时,将每组中各质粒混合利用脂质体进行细胞转染,37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 48 h 后收集细胞上清(内含病毒),进行浓缩、分装, -80℃ 保存。

1.3 人脐静脉内皮细胞的分离、培养

参照沈红玲等^[12]方法完成人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)原代细胞分离、培养与鉴定。传代过程中待细胞生长融

合至 80% 左右时,以 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) 消化液消化传代。

1.3.1 复制性衰老过程中细胞周期的检测 传代过程中选取第 2、4、6、8 代细胞,待细胞培养融合至 80% 以上时,用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化收集细胞,离心弃上清,以 PBS 洗 2 次,重悬于 500 μ L PBS 中,将细胞重悬液逐滴加入 -20℃ 预冷的无水乙醇 1.5 mL 中,然后置 4℃ 固定过夜;离心弃乙醇,用 PBS 洗 2 次,加入 1 mL PBS 重悬细胞,加入 PI 和 RNaseA 至终浓度为 50 mg/L,37℃ 温浴 30 min。流式细胞术检测细胞周期,采用 Modfit 软件进行结果分析。

1.3.2 复制性衰老过程中 IGFBP4 的表达 传代过程中选取第 2、4、6、8 代细胞,待细胞培养融合至 80% 以上时,用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化收集细胞,Western Blot 验证衰老过程中 IGFBP4 表达的变化。

1.4 慢病毒感染 HUVEC

取第 2 代 HUVEC 接种于 6 孔板内,并分为对照组、IGFBP4(+) 组和 IGFBP4(-) 组及 GFP 组,待细胞生长融合至 80% 时,将构建好的慢病毒分别加入各组细胞中,轻轻摇晃混匀,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后换液,继续培养 48 h 后,收集细胞,Western Blot 验证对照组、IGFBP4(+) 组、IGFBP4(-) 组 IGFBP4 蛋白的表达,GFP 组置于荧光显微镜下观察 GFP 表达,随机取四个视野,计数荧光细胞数和内皮细胞总数,二者比值即为感染效率。

1.4.1 感染后 HUVEC 的传代培养 将病毒感染后内皮细胞记作为第 1' 代并进行传代培养,并依次记录为 2' 代、3' 代、4' 代……,分别记录三组细胞可传代数。病毒转染后细胞传代数,加上转染前传代数以校正,得到总传代数。

1.4.2 衰老相关 β -半乳糖苷酶染色 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)是鉴定衰老细胞的一个生物学标志物。取各组第 2'、4'、6' 代细胞,待细胞生长融合至 70% 左右时,按 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明进行细胞染色。每组各代细胞随机观察 4 个视野,计数蓝染细胞数和细胞总数,取平均值计算衰老率。

1.4.3 病毒感染后流式细胞术检测细胞周期 取各组第 2'、4'、6' 代细胞,待内皮细胞培养融合至 80% 以上时,用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化细胞,流式细胞术检测细胞周期,采用 Modfit 软件进行结果分析,得到不同代次各组细胞的细胞增殖指数,并计算第 6' 代较第 2' 代降低的细胞增殖指数(Δ PI)。

1.5 数据处理和统计分析

每组实验均重复 3 次。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用 SPSS 13.0 软件包处理,各组计量资料比较采用方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因片段 IGFBP4 的扩增、载体质粒及 RNAi 质粒的构建

为了使 IGFBP4 能够对内皮细胞产生稳定、持久的作用,本实验采用第 3 代慢病毒包装系统,构建 IGFBP4 慢病毒并转染内皮细胞,使 IGFBP4 在内皮细胞传代过程中稳定表达。

以质粒 pcDNA3.1-IGFBP4 为模板,应用特异性引物,进行 PCR 反应扩增出长 764 bp 的目的基因片段(图 1)。构建载体质粒,并经琼脂糖凝胶电泳及 DNA 测序验证成功构建目的质粒。慢病毒包装成功后感染内皮细胞,以 Western Blot 检测各组细胞 IGFBP4 的表达情况,发现 IGFBP4(+) 组目的蛋白大量表达,IGFBP4(-) 组未见目的蛋白表达,说明 IGFBP4 基因在 IGFBP4(+) 组和 IGFBP4(-) 组分别得到有效地表达和沉默(图 2)。GFP 组细胞置于荧光显微镜下观察 GFP 表达,得出 GFP 组感染效率为 68.4%,从而估测各组细胞感染效率约为 68%。

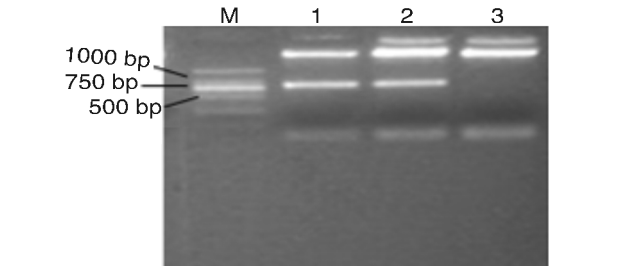


图 1. IGFBP4 PCR 产物电泳 M 为 Marker,1、2 为 PCR 产物,3 为未加引物的阴性对照。

Figure 1. Electrophoresis of PCR products for IGFBP4

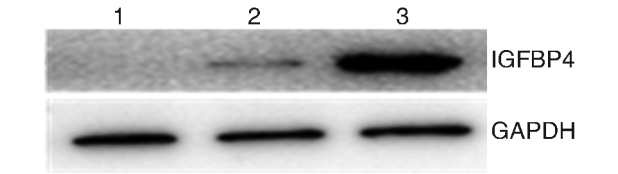


图 2. Western Blot 验证各组细胞 IGFBP4 的表达 1 为 IGFBP4(-) 组,2 为对照组,3 为 IGFBP4(+) 组。

Figure 2. IGFBP4 protein expression in each cell group by using Western Blot

2.2 HUVEC 的复制性衰老

流式细胞术分析细胞周期可发现,在传代过程中内皮细胞生长逐渐减慢,细胞从 G1 期进入 S 期的比值逐渐下降,从 G2 期进入 M 期的比值增加(表 1);细胞增殖指数 (PI) 由第 2 代的 $34.05\% \pm 0.47\%$ 降至第 8 代的 $18.13\% \pm 0.89\%$ 。第 6 代 ($27.47\% \pm 0.52\%$)、第 8 代与第 2 代、第 4 代 ($33.85\% \pm 0.67\%$) 细胞相比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明内皮细胞存在复制性衰老(正常细胞体外分裂受限制)过程,可用于细胞衰老的相关实验研究。

收集第 2、4、6、8 代细胞,Western Blot 检测衰老过程中 IGFBP4 的表达水平,发现在正常内皮细胞中其表达水平较低,各代间无明显差异(图 3)。

2.3 IGFBP4 对内皮细胞衰老进程的影响

病毒转染后记录细胞传代代数,加上转染前传代数以校正,得到总传代代数,取平均值,得到各组传代数,IGFBP4(+)组传代数(14.33 ± 0.67)较对照组(10.67 ± 0.33)和 IGFBP4(-)组(9.67 ± 0.33)传代数明显增多($P < 0.05, n = 3$),对照组与 IGFBP4(-)组间差异无统计学意义($P > 0.05, n = 3$)。

β -半乳糖苷酶染色结果显示,同代次 IGFBP4(+)组、对照组、IGFBP4(-)组蓝染细胞数依次增多(图 4)。不同代次各组间细胞平均衰老率见表 2,相同代次内细胞衰老率比较,IGFBP4(+)组明显低于对照组和 IGFBP4(-)组,差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$),对照组与 IGFBP4(-)组间差异无统计学意义 ($P > 0.05, n = 3$)。

在传代的细胞复制性衰老过程中,细胞的增殖能力逐渐下降,应用流式细胞术测定细胞周期,得到不同代次各组细胞的细胞增殖指数(表 3)。随代龄增加,高代龄细胞(第 6' 代)较低代龄细胞(第 2' 代)细

胞增殖指数降低的程度记为 ΔPI ,IGFBP4(+)组 ΔPI ($10.35\% \pm 0.57\%$) 比对照组 ($13.99\% \pm 0.65\%$) 和 IGFBP4(-)组 ($14.90\% \pm 0.85\%$) 降低的程度小,差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$)。

以上结果说明 IGFBP4 在体外培养的内皮细胞的复制性衰老过程中发挥作用,可能引起内皮细胞衰老的延缓。

表 1. 不同代次内皮细胞的周期分析($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table1. Cell cycle analysis of different cell passage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

代次	G0/G1	S	G2/M
第 2 代	62.86% \pm 0.38%	27.91% \pm 0.64%	6.23% \pm 0.25%
第 4 代	66.51% \pm 0.67%	26.91% \pm 1.20%	6.94% \pm 0.53%
第 6 代	72.20% \pm 0.65%	19.86% \pm 0.56%	7.95% \pm 0.45%
第 8 代	81.90% \pm 0.87%	10.24% \pm 0.88%	7.86% \pm 0.49%

表 2. 不同代次各组间细胞平均衰老率($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2. The mean cell senescence rates of different passage in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

代次	对照组	IGFBP4(+)组	IGFBP4(-)组
第 2' 代	16.35% \pm 0.56%	11.33% \pm 0.76% ^{ab}	16.68% \pm 0.31%
第 4' 代	22.33% \pm 0.72%	16.83% \pm 0.53% ^{ab}	22.43% \pm 0.32%
第 6' 代	33.74% \pm 0.62%	24.60% \pm 0.90% ^{ab}	34.92% \pm 0.92%

a 为 $P < 0.05$, 与同代次对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与同代次 IGFBP4(-)组比较。

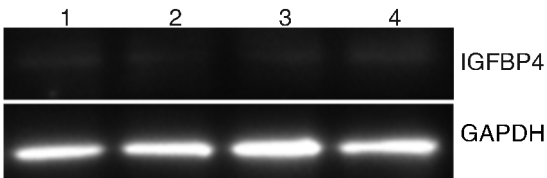


图 3. Western Blot 检测各代细胞 IGFBP4 表达 1 为第 2 代,2 为第 4 代,3 为第 6 代,4 为第 8 代。

Figure 3. IGFBP4 protein expression in each passage by using Western Blot

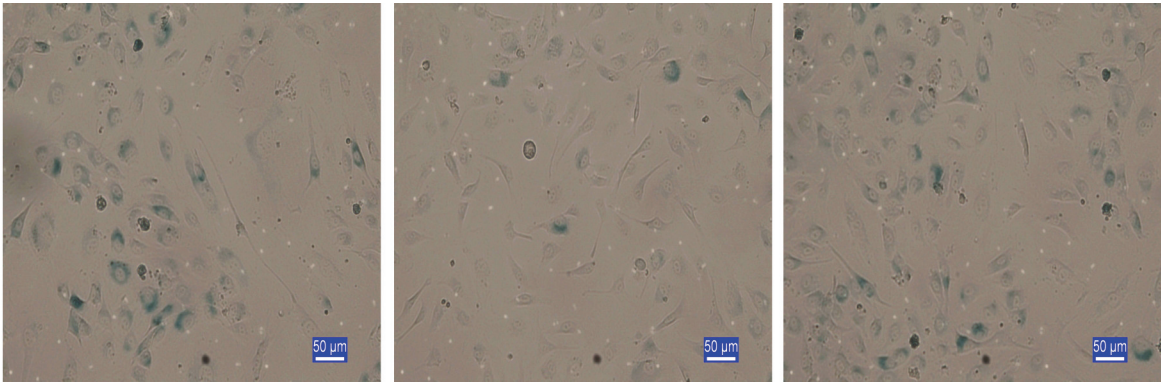


图 4. 第 6' 代各组细胞 β -半乳糖苷酶染色 从左到右依次为对照组、IGFBP4(+)组和 IGFBP4(-)组。

Figure 4. β -galactosidase staining of 6' th passage in each group

表 3. 不同代次各组细胞的平均细胞增殖指数($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3. The mean cell proliferation index of different passage in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

代次	对照组	IGFBP4(+)组	IGFBP4(-)组
第2'代	30.84% \pm 0.46%	34.42% \pm 0.76% ^{ab}	31.12% \pm 0.89%
第4'代	23.63% \pm 0.56%	29.72% \pm 0.53% ^{ab}	24.00% \pm 1.30%
第6'代	16.88% \pm 0.43%	24.08% \pm 1.08% ^{ab}	16.22% \pm 0.34%

a 为 $P < 0.05$, 与同代次对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与同代次 IGFBP4 (-) 组比较。

3 讨 论

血管内皮系统是人体的重要组成部分,能产生和分泌多种生物活性物质,对维持血压和体液平衡起到重要作用。老化被认为是动脉粥样硬化的主要危险因素,老化发生的机制可能与端粒的缩短及 DNA 修复缺陷的增加有关^[13]。随着年龄增加,血管内皮细胞的复制再生能力下降、凋亡增加,同时内皮细胞功能发生紊乱,表现为内皮依赖性血管舒张功能下降、氧化应激增强、内皮源性炎症因子的合成分泌增加等是血管性疾病发生、发展的病因^[13-15]。

本实验通过衰老特异性 β -半乳糖苷酶活性染色及细胞周期测定等方法验证了 IGFBP4 对体外培养内皮细胞衰老进程的影响。研究中发现 IGFBP4 可增加内皮细胞传代代数,减少同代次细胞衰老率,延缓传代过程中细胞增殖指数的下降。以上结果均证实,在体外培养的内皮细胞过程中,IGFBP4 高表达时能够延缓内皮细胞的衰老进程;而正常内皮细胞 IGFBP4 表达水平较低,与 IGFBP4 基因沉默后的阴性对照组比较无统计学差异。这一结果为抗内皮细胞衰老,促进损伤内皮修复及抑制动脉粥样硬化治疗等研究提供了一个新的切入点,并具有一定的临床运用前景。但其具体的分子生物学机制尚待进一步的深入研究揭示。

[参考文献]

[1] Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, et al. Prevalence of hypertension in the US adult population; results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. Hypertension, 1995, 25(3): 305-13.

[2] Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, et al. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general consideration, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization[J]. Circulation, 2001, 104(22): 2 746-753.

[3] 李有朝, 来茂德. 胰岛素样生长因子结合蛋白的结构与功能研究概况 [J]. 生物物理学报, 2010, 26(5): 347-357.

[4] Ning Y, Schuller AG, Conover CA, et al. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 is both a positive and negative regulator of igf activity in vivo[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(5): 1 213-225.

[5] Qiu Q, Bell M, Lu X, et al. Significance of IGFBP-4 in the development of fetal growth restriction[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(8): 1 429-439.

[6] Moreno MJ, Ball M, Rukhlova M, et al. IGFBP-4 anti-angiogenic and anti-tumorigenic effects are associated with anti-cathepsin B activity[J]. Neoplasia, 2013, 15(5): 554-567.

[7] Isozaki Y, Hoshino I, Akutsu Y, et al. Role of IGFBP4 and IGF-I expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Esophagus, 2013, 10(2): 79-85.

[8] Zhu W, Shiojima I, Ito Y, et al. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signaling required for cardiogenesis[J]. Nature, 2008, 454: 345-349.

[9] Minato A, Ise H, Goto M, et al. Cardiac differentiation of embryonic stem cells by substrate immobilization of insulin-like growth factor binding protein 4 with elastin-like polypeptides[J]. Biomaterials, 2012, 33(2): 515-523.

[10] Honda Y, Landale EC, Strong DD, et al. Recombinant synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4): development, validation, and application of aradioimmunoassay for IGFBP-4 in human serum and other biological fluids[J]. Clin Endocrinol Metab, 1996, 81: 1 389-396.

[11] Karasik D, Rosen C, Hannan MT, et al. Insulin-like growth factor-binding proteins 4 and 5 and bone mineral density in elderly men and women[J]. Calcified Tissue Intern, 2002, 71: 323-328.

[12] 沈红玲, 陈汉平. 胎盘生长因子-1 对原代培养人脐静脉内皮细胞增殖及一氧化氮释放的影响[J]. 中华围产医学杂志, 2008, 11(1): 5-9.

[13] Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence[J]. Circ Res, 2012, 111: 245-259.

[14] 李东霞, 陈书艳. 增龄对大鼠内皮功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3): 243.

[15] Chung HY, Sung B, Jung KJ, et al. The molecular inflammatory process in aging[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(3-4): 572-581.

(此文编辑 许雪梅)