

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001965

SPRY1 基因与角质形成细胞衰老的相关性研究

赵娟, 黎丹, 杨娥, 张恒术

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨软脂酰化磷蛋白 Sprouty1 (SPRY1) 基因在不同年龄段人体皮肤角质形成细胞和人永生化角质形成细胞 (HaCaT 细胞) 衰老中的表达及意义。**方法:**收集不同年龄段正常皮肤标本 120 例, 分为少年儿童组 (<18 岁)、青年组 (18~44 岁)、中年组 (45~59 岁)、老年组 (≥ 60 岁), 各 30 例。通过免疫组化、Real-time PCR、Western blot 技术检测 SPRY1 在各年龄段皮肤角质形成细胞中的定位及表达差异。用 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 HaCaT 细胞构建细胞老化组模型。Real-time PCR 技术和 Western blot 技术检测 SPRY1 在正常组和衰老组 HaCaT 细胞中的表达。**结果:**SPRY1 的表达主要分布在皮肤角质形成细胞的棘层及颗粒层, 呈细胞质分布; SPRY1 mRNA 及蛋白在人皮肤角质形成细胞中的表达随着年龄段的增高呈逐渐增高的趋势, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。HaCaT 细胞经 H_2O_2 处理后发生了老化。SPRY1 mRNA 及蛋白在老化后的 HaCaT 细胞中表达上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**SPRY1 基因在人体衰老的皮肤角质形成细胞及老化 HaCaT 细胞中表达增加, 提示 SPRY1 基因参与角质形成细胞衰老调控。

【关键词】SPRY1; 皮肤角质形成细胞; HaCaT 细胞; 衰老

【中图分类号】R622.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-05

Significance of SPRY1 gene in senescence of keratinocytes

Zhao Juan, Li Dan, Yang E, Zhang Hengshu

(Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and significance of SPRY1 gene in the senescence of normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and immortalized keratinocytes (HaCaT cells) from individuals of different ages. **Methods:** A total of 120 normal skin specimens were collected from individuals of different ages and divided into juvenile group (<18 years), youth group (18–44 years), middle-aged group (45–59 years old), and elderly group (≥ 60 years), with 30 specimens in each group. Immunohistochemistry, real-time PCR, and Western blot were used to compare the localization and expression of SPRY1 in keratinocytes between different age groups. HaCaT cells were treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 to establish a model of cellular senescence. Real-time PCR and Western blot were used to measure the expression of SPRY1 in the groups of normal and senescent HaCaT cells. **Results:** SPRY1 was mainly expressed in the spinous and granular layers of NHEKs and was distributed in the cytoplasm. The mRNA and protein expression of SPRY1 in keratinocytes gradually increased with the increase in age ($P < 0.05$). Senescence of HaCaT cells was observed after H_2O_2 treatment. The mRNA and protein expression of SPRY1 was significantly upregulated in senescent HaCaT cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** There is an increase in the expression of SPRY1 gene in senescent NHEKs and senescent HaCaT cells, suggesting that the SPRY1 gene is involved in the regulation of keratinocyte senescence.

【Key words】SPRY1; keratinocyte; HaCaT cell; senescence

衰老是机体复杂的生理学过程^[1]。皮肤衰老是皮肤美学研究的重要指标, 广受人们的关注。其中, 角质形成细胞衰老是皮肤衰老的重要表现^[2-4]。在皮肤衰老相关学说中, 氧化应激衰老是其重要学说之

一^[5]。 H_2O_2 可导致持续的氧化应激反应, 引起细胞损伤与凋亡, 常用于建立细胞氧化衰老模型^[6-7]。SPRY1 蛋白是拮抗受体酪氨酸激酶等信号通路的重要生物分子^[8], 在多种不同类型肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移及凋亡等过程中发挥重要作用^[9-10]。同时, SPRY1 与肌肉干细胞的增殖、老化有关^[11], 而有关 SPRY1 在人角质形成细胞和表皮中的功能研究已有报道^[12]。本文直接针对 SPRY1 在不同年龄段正常皮肤角质形成细胞和 HaCaT 细胞正常组及老化组中的表达差异展开研究, 旨在直观地探讨 SPRY1 与角质形成

作者介绍: 赵娟, Email: 525995709@qq.com,

研究方向: 皮肤年轻化。

通信作者: 张恒术, Email: 1390527030@qq.com。

基金项目: 重庆医科大学附属第一医院院内培育基金资助项目 (编号: PYJJ2018-30)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190118.1310.002.html>
(2019-01-21)

细胞的衰老相关性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 皮肤组织和 HaCaT 细胞 用液氮收集储存来源于临床收集的各年龄段除皮肤相关疾病的非肿瘤病人或求美者术后弃除的正常皮肤组织共 120 例,根据 WHO 年龄分段,分为少年儿童组(<18 岁)、青年组(18~44 岁)、中年组(45~59 岁)、老年组(≥ 60 岁),每组各 30 例。本研究经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。所有组织标本均经患者或求美者知情同意后收集。HaCaT 细胞购于上海美轩生物科技有限公司。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒 Trizol 购于大连 Takara 公司;RNA 逆转录试剂盒和 real-time PCR 试剂盒购于美国 Bimake 公司;SP 免疫组化试剂盒购于博奥森公司;CCK-8 检测试剂盒购于 Bimake 公司;总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(羟胺法)、P21 抗体、P27 抗体、CDK2 抗体、Cyclin E 抗体购于万类生物科技有限公司;SPRY1 抗体购于英国 Abcam 公司; β -actin 抗体购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 用 Trizol 提取各年龄段皮肤角质形成细胞及 HaCaT 细胞中的 RNA,测定其浓度和纯度。取等量的 RNA 逆转录为 cDNA。再取等体积的 cDNA 进行 PCR 反应。PCR 引物如下:SPRY1 上游 5'-GCAGTTCGTTAGTTGT-GAT-3';下游 5'-GCAGTAGGCTGAATCTCT-3'; β -actin 上游 5'-GATGACCCAGATCATGTTTG-3';下游 5'-CGTACAGGG-ATAGCACAG-3'。根据扩增后的 CT 值计算出各实验组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值,表示目的基因 mRNA 相对含量。

1.2.2 免疫组织化学检测 收集的皮肤组织经石蜡包埋切片,再进行脱蜡和水化、抗原修复、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、苏木精复染、脱水透明、封片。进行图像采集、表达量评分。根据细胞中 SPRY1 表达阳性细胞数及染色强弱进行评分。评分方法以 0~4 分来判定阳性细胞的百分比:0 分,0%;1 分,小于 10%;2 分,大于 10%但小于 50%;3 分,大于 50%但小于 80%;4 分,大于 80%。染色强度按阴性、弱、中、强染色分别评为 0~3 分,2 个指标的乘积即为最终的评分。

1.2.3 Western blot 检测 用 RIPA 裂解液提取各年龄段皮肤角质形成细胞及 HaCaT 细胞中的蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒测定所提蛋白浓度,取 40 μ g 蛋白样品在 10%或 12%的 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离,用湿转法将凝胶上的蛋白电转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 3 h,4 $^{\circ}$ C 条件下一抗孵育过夜,再加入相对应的二抗,通过 ECL 发光显影。使用 Image J 软件测定条带的吸光度(absorbance, A)值,以 A 目的基因/ β -actin 的比值来表示目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 HaCaT 细胞培养及老化处理 HaCaT 细胞用含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养,每隔 1~2 d 更换完全培养基。用含 H_2O_2 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的完全培养基于细胞培养箱中培养 HaCaT 细胞 1 h,构建 HaCaT 细胞老化组。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 将 HaCaT 细胞制成单细胞悬液进行细胞计数后,每孔细胞数 4×10^3 个接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞贴壁融合达约 75% 时加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 1 h,再更换完全培养基继续培养 24 h。每孔加入 1/10 体积的 CCK-8 溶液,培养箱内孵育 1 h 后用酶标仪测量反应液在 450 nm 处的 A 值。根据说明书中给出的公式计算细胞增殖率(%)。

1.2.6 羟胺法检测细胞 T-SOD 活力 用 RIPA 裂解液提取 HaCaT 细胞内蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒检测所提蛋白浓度并将浓度调整为 1 mg/mL,根据检测使用说明书,取 50 μL 蛋白液进行加样操作处理,酶标仪测量反应液在 550 nm 处的吸光度值。再根据说明书中的公式计算 T-SOD 活力(U/mgprot)。

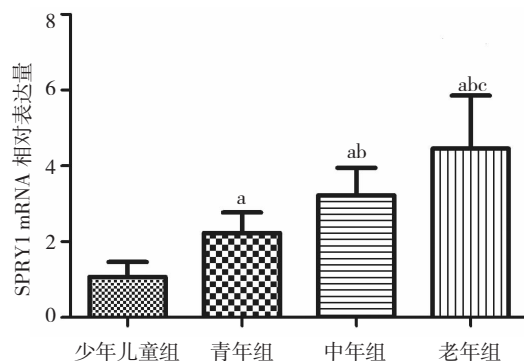
1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计分析软件,所得数据均使用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较时采用 Tukey 检验;两组间比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SPRY1 在各年龄段人体正常皮肤组织角质形成细胞中的表达

2.1.1 Real-time PCR 检测结果 少年儿童组、青年组、中年组、老年组的组织中 SPRY1 mRNA 相对表达量分别为 1.07 ± 0.39 、 2.23 ± 0.54 、 3.22 ± 0.73 、 4.45 ± 1.40 。其中少年儿童的相对表达量最低,老年组的相对表达量最高,提示随着年龄段的生长,人体皮肤角质形成细胞中 SPRY1 mRNA 表达量呈逐渐增多的趋势,方差分析 4 组 SPRY1 mRNA 表达水平的差异具有统计学意义($F=84.402$, $P=0.000$)。组间两两比较结果,组间差异亦具有统计学意义。如图 1 所示。

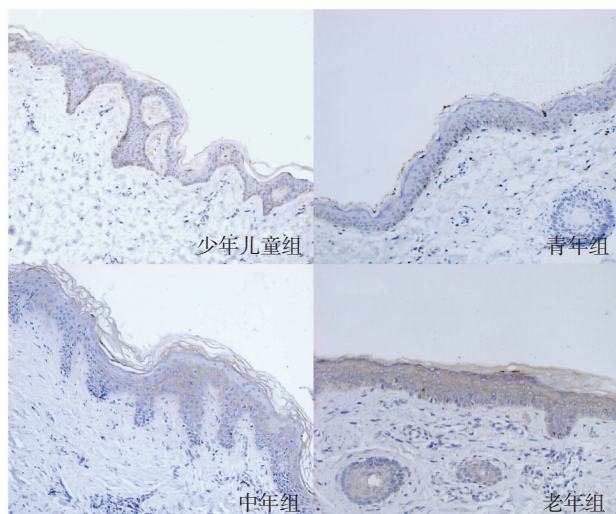


a: 表示该组与少年儿童组比较 $P < 0.001$; b: 表示该组与青年组比较 $P < 0.001$; c: 表示该组与中年组比较 $P < 0.001$

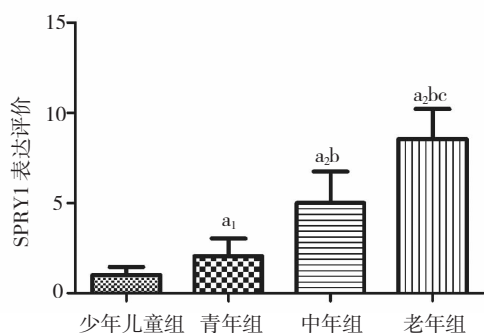
图 1 qRT-PCR 检测人体正常皮肤角质形成细胞中 SPRY1 mRNA 表达水平

2.1.2 免疫组化结果 SPRY1 在人正常皮肤角质形成细胞中的表达主要集中于棘层和颗粒层,呈细胞质分布,在其他表皮层次及真皮层中未见明显表达;从少年儿童组到老年组,阳性细胞百分比和染色强度明显增加(图 2A)。少年儿童组、青年组、中年组、老年组的评分分别为 1.00 ± 0.45 、 2.07 ± 0.98 、

5.00 ± 1.76 、 8.57 ± 1.65 。提示随着年龄增长,SPRY1 蛋白在人体正常皮肤角质形成细胞中的表达呈逐渐增加的趋势,差异具有统计学意义($F=196.871$, $P=0.000$)。详见图 2B。



A. 人体正常皮肤角质形成细胞中 SPRY1 蛋白表达的免疫组化图片 (400 ×)



a₁: 表示该组与少年儿童组比较 $P < 0.5$; a₂: 表示该组与少年儿童组比较 $P < 0.001$; b: 表示该组与青年组比较 $P < 0.001$; c: 表示该组与中年组比较 $P < 0.001$

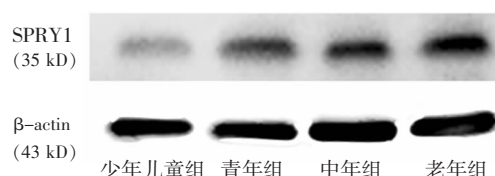
B. 人体正常皮肤角质形成细胞免疫组化图片中 SPRY1 表达评分

图 2 免疫组化检测人体正常皮肤角质形成细胞中 SPRY1 蛋白的表达

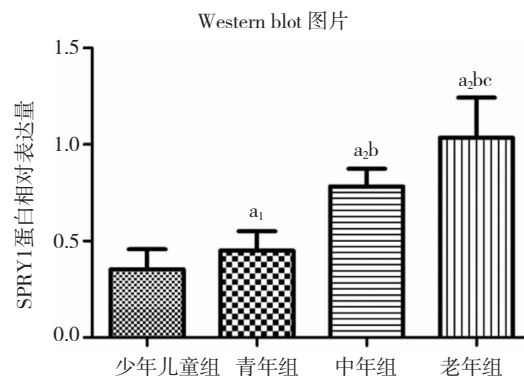
2.1.3 Western blot 检测结果 根据图 3A 所示,少年儿童组、青年组、中年组、老年组各组均有 SPRY1 蛋白的表达, β -actin 作为内参。图 3B 所示,各组 SPRY1/ β -actin 蛋白的相对表达量分别为 0.35 ± 0.10 、 0.45 ± 0.10 、 0.78 ± 0.09 、 1.04 ± 0.21 。提示随着年龄段的增加,SPRY1 蛋白表达呈增加的趋势,方差分析 4 组间差异具有统计学意义($F=163.228$, $P=0.000$)。

2.2 HaCaT 细胞衰老相关检测结果

2.2.1 CCK-8 法检测结果及 T-SOD 活力检测结果 通过 CCK-8 法测定 HaCaT 细胞增殖情况发现,200 μ mol/L 的 H_2O_2 处理 1 h 后的老化组 HaCaT 细胞较未做特殊处理的正常组相比,其增殖能力降低,差异具有统计学意义($t=26.023$, $P=0.000$)。通过 T-SOD 活力检测发现,正常组与老化组细胞的 T-SOD 活力分别为(17.27 ± 0.35)、(25.38 ± 2.14) U/mgprot,差异具有统计学意义($t=-12.983$, $P=0.000$)。见表 1。



A. 人体正常皮肤角质形成细胞中 SPRY1 蛋白表达的



a₁: 表示该组与少年儿童组比较 $P < 0.5$; a₂: 表示该组与少年儿童组比较 $P < 0.001$; b: 表示该组与青年组比较 $P < 0.001$; c: 表示该组与中年组比较 $P < 0.001$

B. 人体正常皮肤角质形成细胞中 SPRY1 蛋白相对表达量

图 3 Western blot 检测人体正常皮肤角质形成细胞中 SPRY1 蛋白的表达

表 1 HaCaT 细胞增殖率和 T-SOD 活力

组别	增殖率 (%)	T-SOD活力 (U/mgprot)
正常组	100.00 $\pm$ 0.00	17.27 $\pm$ 0.35
老化组	32.03 $\pm$ 7.84	25.38 $\pm$ 2.14
t 值	26.023	-12.983
P 值	0.000	0.000

2.2.2 Western blot 检测细胞周期相关蛋白 P21、P27、CDK2、cyclin 的结果 Western blot 结果显示,在正常组和老化组中 P21(21 kD)、P27(27 kD)、CDK2(34 kD)、Cyclin E(47 kD) 的蛋白相对表达量分别为(0.39 ± 0.04)、(0.82 ± 0.04)、(0.70 ± 0.16)、(1.20 ± 0.07)、(1.04 ± 0.05)、(0.77 ± 0.12)、(1.02 ± 0.13)、(0.62 ± 0.14)。在 HaCaT 细胞经老化处理后,P21、P27 表达上调,CDK2、Cyclin E 表达降低。统计分析其结果,P21($t=-14.458$, $P=0.000$)、P27($t=-4.848$, $P=0.008$)、CDK2($t=3.513$, $P=0.025$)、Cyclin E($t=3.594$, $P=0.023$),差异均具有统计学意义。如图 4 所示。

2.3 SPRY1 在 HaCaT 细胞中的表达

2.3.1 正常组和老化组 HaCaT 细胞之间 SPRY1 mRNA 的表达 通过 real-time PCR 检测发现,正常组与老化组 HaCaT 细胞中 SPRY1 mRNA 的相对表达量分别为 1.03 ± 0.27 、 4.11 ± 1.13 。提示老化组中 SPRY1 mRNA 的表达上调,差异具有统计学意义($t=-7.917$, $P=0.000$)。如图 5 所示。

2.3.2 正常组和老化组 HaCaT 细胞之间 SPRY1 蛋白表达量 通过 Western blot 检测结果发现,正常组和老化组 HaCaT 细胞中 SPRY1 蛋白的相对表达量分别为 0.49 ± 0.05 、 0.77 ± 0.07 。提示老化细胞中 SPRY1 蛋白表达增高,差异具有统计

学意义($t=-5.527, P=0.005$)。如图 6 所示。

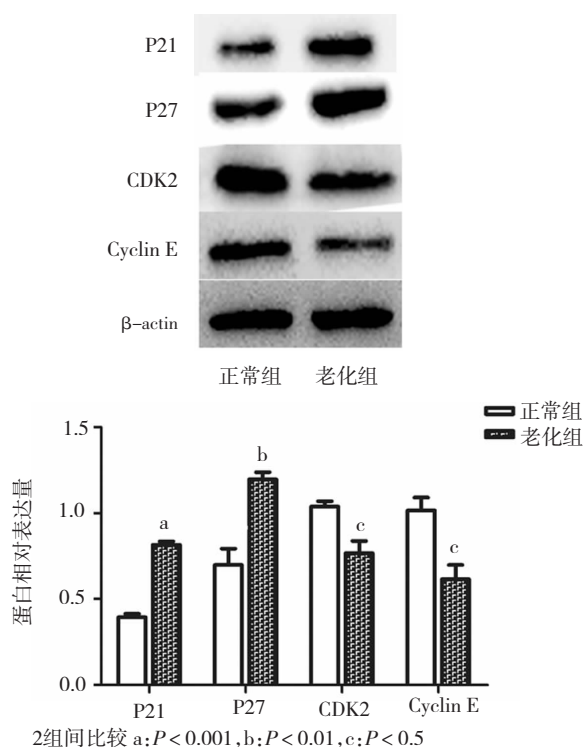


图 4 Western blot 检测 HaCaT 细胞中 P21、P27、CDK2、Cyclin E 蛋白的表达

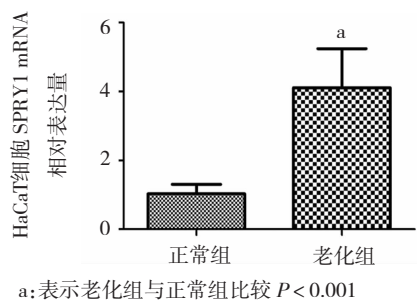


图 5 Real-time PCR 检测 HaCaT 细胞中 SPRY1 mRNA 表达水平

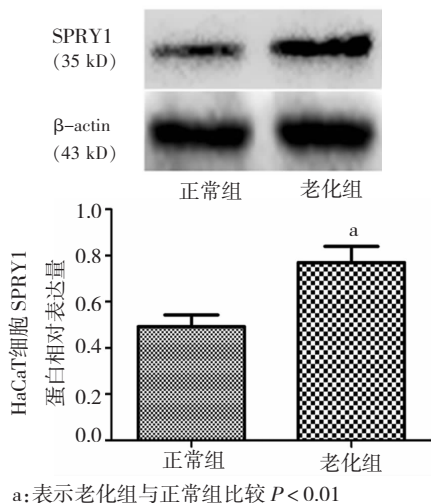


图 6 Western blot 检测 HaCaT 细胞中 SPRY1 蛋白的表达

3 讨论

皮肤衰老是内源性因素和外源性因素共同作用的结果,严重影响皮肤的美,是备受人们关注的话题。在研究机体皮肤衰老时,既往多侧重于皮肤成纤维细胞衰老的研究,之后逐步认识到角质形成细胞在皮肤衰老中也十分重要。它在皮肤保水、保湿、屏障以及皮肤病形成等多方面具有非常重要的调节作用^[13]。在有关衰老的研究中发现,氧化应激的增加是衰老细胞的特征之一^[14]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是具有较强氧化活性的产物,其生成增多或抗氧化系统受损都会导致细胞的氧化应激反应^[15]。H₂O₂ 是 ROS 中的一种非极性分子,可产生持续的氧化作用,导致氧化系统和抗氧化系统失衡,使组织损伤^[16-17]。而损伤的组织又释放出大量炎症介质刺激 ROS 的产生,从而加剧氧化应激,并最终导致衰老、凋亡的发生^[18]。H₂O₂ 与细胞衰老有关^[19],常用于诱导细胞衰老^[7,20]。本实验研究结果显示,用含 H₂O₂ 浓度为 200 μmol/L 的完全培养基培养 HaCaT 细胞 1 h 后,HaCaT 细胞增殖能力降低, T-SOD 活力增高,细胞周期相关蛋白 P21、P27 表达上调,CDK2、Cyclin E 表达下调,抑制细胞周期,符合细胞衰老的改变,可见 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞老化成功。

SPRY1 蛋白是一种富含半胱氨酸的蛋白,是介导 RTK 信号通路的拮抗剂^[8,21]。SPRY1 蛋白受一些生长因子的调节^[22],如成纤维细胞生长因子、表皮细胞生长因子等。同时,SPRY1 也对上述一些细胞因子的作用起到负性反馈调节的作用。SPRY1 可以减弱 RTK 信号,诱导细胞衰老反应,避免细胞不受控制的增殖^[23]。SPRY1 蛋白是一种抑制多种生长因子通路信号传递的蛋白,在多种恶性肿瘤中也被称为肿瘤抑制因子^[24]。已有报道显示,SPRY1 在肌肉干细胞中介导了其增殖、衰老^[11]。同时,在关于 SPRY1 与角质形成细胞的研究中发现 SPRY1 可能是角质形成细胞的负反馈调节因子。SPRY1 过表达后,P21、P27 表达上调,Cyclin B1、GOS2 表达下调发挥细胞周期抑制作用,HaCaT 细胞的增殖活力降低,促进细胞的凋亡,降低细胞的迁移和增殖能力^[12]。本实验中直接检测各年龄段正常人体皮肤角质形成细胞中 SPRY1 基因的表达,发现随着年龄段的生长,正常人

体皮肤角质形成细胞中 SPRY1 mRNA 和蛋白的表达增高,提示 SPRY1 参与了皮肤角质形成细胞衰老的调控。同时,研究中通过人工构建老化的单一 HaCaT 细胞,检测正常 HaCaT 细胞及老化组 HaCaT 细胞中 SPRY1 mRNA 和蛋白的表达,发现在老化处理后的 HaCaT 细胞中,SPRY1 mRNA 和蛋白的表达量亦上调,进一步说明 SPRY1 可能参与调控角质形成细胞的衰老。人体是一个复杂的整体,皮肤亦非由单一角质形成细胞组成,其中皮肤成纤维细胞、皮下脂肪细胞等均有可能通过旁分泌作用调控皮肤角质形成细胞中 SPRY1 的表达,同时 SPRY1 可能通过表观调节作用而调节自身表达,再通过拮抗 RTK 信号通路或参与其他衰老相关通路的调控而介导皮肤角质形成细胞的衰老。

综上所述,SPRY1 基因与角质形成细胞衰老有关,而角质形成细胞衰老与皮肤衰老有密切联系。这为 SPRY1 在皮肤衰老过程中的研究提供了理论基点,对于 SPRY1 具体调控角质形成细胞衰老机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ding QY, Yang D, Zhang WN, et al. Antioxidant and antiaging activities of the polysaccharide TLH-3 from *Tricholoma lobayense*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 85: 133-140.
- [2] Garmyn M, Yaar M, Boileau N, et al. Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human keratinocytes to solar-simulated irradiation[J]. *J Invest Dermatol*, 1992, 99(6): 743-748.
- [3] Gilchrist BA, Garmyn M, Yaar M. Aging and photoaging affect gene expression in cultured human keratinocytes[J]. *Arch Dermatol*, 1994, 130(1): 82-86.
- [4] Jobeili L, Rousselle P, Béal D, et al. Selenium preserves keratinocyte stemness and delays senescence by maintaining epidermal adhesion[J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(11): 2302-2315.
- [5] Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 757-772.
- [6] Tian LM, Xie HF, Xiao X, et al. Study on the roles of β -catenin in hydrogen peroxide-induced senescence in human skin fibroblasts[J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(10): 836-838.
- [7] Xie HF, Liu LS, Shi W, et al. Down regulation of CD147 boosts the premature senescence in human skin fibroblasts by destroying the redox balance and inhibiting klotho[J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 64(3): 243-5.
- [8] Cabrita MA, Christofori G. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling[J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(1): 53-62.
- [9] Edwin F, Patel TB. A novel role of sprouty2 in regulating cellular apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(6): 3181-3190.
- [10] Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Wei AQ, et al. Sprouty1 predicts prognosis in human epithelial ovarian cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(4): 1531-1541.
- [11] Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, et al. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence[J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 355-360.
- [12] Wang P, Zhou Y, Yang JQ, et al. The role of sprouty1 in the proliferation, differentiation and apoptosis of epidermal keratinocytes[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(5): e12477.
- [13] Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier[J]. *Exp Mol Med*, 1999, 31(1): 5-19.
- [14] Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1067: 10-21.
- [15] Nur E, Biemond BJ, Otten HM, et al. Oxidative stress in sickle cell disease: pathophysiology and potential implications for disease management[J]. *Am J Hematol*, 2011, 86(6): 484-489.
- [16] Umeno A, Biju V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes[J]. *Free Radic Res*, 2017, 51(4): 413-427.
- [17] Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, et al. Effects of antioxidant supplementation on the aging process[J]. *Clin Interv Aging*, 2007, 2(3): 377-387.
- [18] Cao YJ, Zhang YM, Qi JP, et al. Ferulic acid inhibits H_2O_2 -induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(2): 1018-1025.
- [19] Cochemé HM, Quin C, McQuaker SJ, et al. Measurement of H_2O_2 within living drosophila during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(3): 340-350.
- [20] 刘洋, 吴晓冰, 荆永光, 等. 过氧化氢诱导间充质干细胞衰老模型的建立[J]. *军事医学*, 2015, 39(5): 329-333.
- [21] Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, et al. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(1): 45-54.
- [22] Faedo A, Borello U, Rubenstein J. Repression of Fgf signaling by sprouty1-2 regulates cortical patterning in two distinct regions and times[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(11): 4015-4023.
- [23] Macià A, Vaquero M, Gou-Fàbregas M, et al. Sprouty 1 induces a senescence-associated secretory phenotype by regulating NF- κ B activity: implications for tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(2): 333-343.
- [24] Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Morris DL. The developing story of sprouty and cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33(2-3): 695-720.

(责任编辑: 张辉洁)