· 基础研究 ·

C1q/TNF 相关蛋白 3 减轻氧化应激诱导的间充质干细胞衰老

张正斌[1],朱丽雯[2],谭延振[3],冯攀[3],张冰[3],吴岩[3],易蔚[3],王晓明[1],孙阳[1*]
(空军军医大学第一附属医院:[1] 老年病科,[3] 心血管外科,西安 710032;[2] 陕西中医药大学第二临床医学院,咸阳 712000)

【摘 要】 目的 建立间充质干细胞(MSCs)衰老模型,探讨 C1q/TNF 相关蛋白 3(CTRP3)对衰老 MSCs 的作用并初步探讨机制。**方法** 用过氧化氢(H_2O_2)诱导小鼠 MSCs 衰老,CCK8 实验和 β-半乳糖苷酶染色验证模型的建立。外源性给予 CTRP3 处理 MSCs 24 h,CCK8 实验检测增殖活性,β-半乳糖苷酶染色检测 MSCs 衰老,分化诱导实验检测 MSCs 分化能力,Western blotting 法检测 MSCs 凋亡。RT-PCR 检测 MSCs 中衰老相关基因 *P16*、*P21* 以及抗衰老基因 *SIRT1* 的 mRNA 表达变化。采用 GraphPad Prism 6 进行统计分析。组间比较采用方差分析或 LSD 两两比较。**结果** H_2O_2 可抑制 MSCs 的增殖活性,且呈浓度依赖性。与正常对照组相比,200 μmol/L H_2O_2 作用 4 h,细胞立体感消失,细胞形态不规则;CCK8 染色结果显示细胞增殖活性显著下降;β-半乳糖苷酶阳性细胞百分比显著升高。继续 CTRP3 处理 24 h 后,衰老 MSCs 增殖和分化能力增强。Western blotting 结果表明 CTRP3 可显著减低衰老 MSCs 的凋亡。RT-PCR 检测发现 CTRP3 上调 MSCs 抗衰老基因 *SIRT1* mRNA 表达,并且下调衰老相关基因 *P16*、*P21* mRNA 的表达。**结论** CTRP3 可抑制 MSCs 衰老,*SIRT1* 基因表达水平上调,及 *P16*、*P21* 基因表达水平下调可能是其重要机制。

【关键词】 C1q/TNF 相关蛋白 3;间充质干细胞;衰老;过氧化氢
【中图分类号】 R329.2 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.05.076

C1q/TNF-related protein 3 attenuates oxidative stress-induced senescence of mesenchymal stem cells

ZHANG Zheng-Bin[1], ZHU Li-Wen[2], TAN Yan-Zhen[3], FENG Pan[3], ZHANG Bing[3], WU Yan[3], YI Wei[3], WANG Xiao-Ming[1], SUN Yang[1*]
([1]Department of Geriatrics, [3]Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; [2]the Second Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

【Abstract】 Objective To explore the role of C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) in senescence model of mesenchymal stem cells (MSCs) and explore the mechanism. **Methods** The senescence model of mouse MSCs was induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) treatment, and then identified by CCK8 assay and β-galactosidase staining. After exogenous treatment of CTRP3 was given to the obtained MSCs for 24 h, CCK8 was used to detect cell proliferation, and β-galactosidase staining was employed to measure the senescence. The differentiation capacity of the aging MSCs were measured by differentiation induction assay, and the expression of apoptosis-related proteins were detected by Western blotting. Then, RT-PCR was applied for the expression changes of the senescence-related genes *P16*, *P21* and the anti-aging gene *SIRT1*. ANOVA or LSD analysis was used for intergroup comparison. **Results** H_2O_2 inhibited the proliferation activity of MSCs in a concentration-dependent manner. After 200 μmol/L H_2O_2 treatment for 4 h, light microscopy displayed that the 3-dimensional impression of the MSCs disappeared, and the cells presented irregular shape. CCK8 assay results showed that the cell proliferation activity was significantly decreased ($P<0.05$); while the percentage of β-galactosidase positive cells was obviously elevated. After 24 h of CTRP3 treatment, the proliferation and differentiation capacities of senescent MSCs were increased. Western blotting indicated that CTRP3 significantly reduced the apoptosis of senescent MSCs. RT-PCR analysis showed that CTRP3 up-regulated the MSCs anti-aging gene *SIRT1* and down-regulated the expression of aging-related genes *P16* and *P21* at mRNA level. **Conclusion** CTRP3 treatment inhibits the apoptosis of senescent MSCs, which might be related with the up-regulation of *SIRT1* and down-regulation of *P16* and *P21*.

【Key words】 C1q/TNF-related protein 3; mesenchymal stem cells; senescence; hydrogen peroxide
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81870266, 81470477, 81570231) *and the Youth Science and Technology New Star Project of Shaanxi Province Innovative Talent Promotion Plan* (2017KJXX-56).
Corresponding author: *SUN Yang*, *E-mail*: *dr_yangsun@163.com*

收稿日期:2018-11-29;**接受日期**:2019-01-15
基金项目:国家自然科学基金(81870266,81470477,81570231);陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目(2017KJXX-56)
通信作者:孙阳,E-mail:dr_yangsun@163.com

间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)具有自我更新和多向分化的潜能,广泛用于组织损伤修复[1]。动物实验显示 MSCs 对心肌梗死(myocardial infarction,MI)疗效显著,但是临床实验表明自体干细胞移植治疗 MI 疗效不佳[2]。原因可能是动物实验中分离制备的是年轻供体来源的 MSCs,而临床实验中使用的干细胞多为 MI 患者自体采集的衰老 MSCs。而衰老干细胞增殖、分化、分泌等生物学功能下降[3],因此,如何延缓衰老是提高 MSCs 修复能力的关键。C1q/TNF 相关蛋白 3(C1q/TNF-related protein 3,CTRP3)是新发现的脂肪因子,参与肝脏脂质代谢、缺血心肌保护、细胞增殖分化等生理病理进程[4,5]。Hou 等[6]证实 CTRP3 通过激活磷酯酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶(phosphatidyl inositol-3-kinase/protein kinase B,PI3K/AKT)通路减轻缺血缺氧诱导的 MSCs 凋亡。本研究拟通过过氧化氢(hydrogen peroxide,H_2O_2)诱导构建 MSCs 衰老模型,探讨 CTRP3 对衰老 MSCs 抗损伤的作用并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 MSCs 的培养

小鼠来源的 P5 代骨髓 MSCs 购于广州赛业(MUBMX-01001),细胞复苏后接种于含 10%胎牛血清及 1%双抗(链霉素和青霉素)的间充质干细胞专用培养基(MUBMX-90011,广州赛业)中,置于 37℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2 CTRP3 蛋白的制备

CTRP3 蛋白的制备方法同前[4]。CTRP3 基因由 GENEWIZ(江苏,中国)产生,并克隆到原核蛋白表达载体 pET30a(Novagen,Merck)中。将表达载体转移到 BL21(DE3)细菌中。BL21(DE3)/pET30a-CTRP3 在 LB 培养基中生长并在 37℃下振荡 3 h。向培养基中加入异丙基-BD-硫代半乳糖苷(终浓度:1 mmol/L)。将溶液在 16℃下振荡 4~5 h,并以 5 000 转/min 离心。通过 HisTrap HP 纯化蛋白质,除去内毒素后将蛋白质脱盐浓缩。

1.3 MSCs 衰老模型的建立

MSCs 在完全培养基中培养,待细胞融合至 70%,换无血清培养基培养,同时加入不同浓度的 H_2O_2 处理 2~4 h,然后进行衰老指标检测(细胞活力和 β-半乳糖苷酶染色)。

1.4 CCK8 测细胞活性

用 CCK8 试剂盒(C008-3,七海生物)测定不同处理组细胞的增殖活性。将 MSCs 接种于 96 孔板,待细胞融合至 70%,换无血清培养基,不同条件处理后,向每孔中加入 10 μl CCK-8 液,避光孵育 2~4 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长测量吸光度值($A_{450\,nm}$)。

1.5 细胞 β-半乳糖苷酶染色

250 μmol/L H_2O_2 处理 MSCs,2 h 或 4 h 后,行 β-半乳糖苷酶染色,试剂购于碧云天(C0602)。吸去细胞培养液,PBS 轻洗后加入固定液固定 20 min。吸去固定液,加入染色液(配置:β-Gal 染色液 A,B,C 分别 10,930,10 μl;X-Gal 溶液 50 μl),37℃水浴过夜,避光。在光学显微镜下计数,β-半乳糖苷酶染色阳性的细胞为衰老细胞,显示蓝色。

1.6 MSCs 成脂成骨诱导分化实验

成骨、成脂诱导分化试剂盒购于广州赛业(MUBMX-90021,MUBMX-90031)。成骨诱导实验时,P6 代 MSCs 接种于预包埋 0.1%明胶的 6 孔板中,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。当细胞融合度达到 70%,加入 2 ml 成骨诱导分化完全培养基。每 3 d 换液 1 次,3 周后,待细胞形态明显改变时,用茜素红染色。1%盐酸(Sigma-Aldrich)抽提茜素红后 420 nm 酶标仪读数定量($A_{420\,nm}$)。成脂诱导时,将 MSCs 置于 37℃,5% CO_2 的培养箱中培养。细胞融合度达到 100%时,加入 MSCs 诱导分化培养基 A 液。诱导 3 d 后,吸走 A 液,加入培养基 B 液。24 h 后吸走 B 液,换回 A 液。A 液和 B 液交替作用 5 次后,继续用 B 液维持培养 7 d 后用油红 O 染色分析。PBS 洗涤干燥后,200 μl 的异丙醇抽提脂肪滴,酶标仪 510 nm 波长测量吸光度值($A_{510\,nm}$)。

1.7 Western blotting 分析细胞蛋白表达水平

细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂按 8∶1∶1 混合配置细胞裂解缓冲液。裂解 20 min 后 12 000 转/min,4℃离心 20 min,吸取上清液加入 1/4 体积上样缓冲液后煮沸 10 min。蛋白样品在 12% SDS-PAGE 凝胶上电泳,然后转移到 PVDF 膜。5%脱脂牛奶孵育 2 h。BAX(CST,2772),Bcl2(CST,3498),cleaved caspase 3(CST,9661)和 GAPDH(CMCTAG,AT0002)一抗(1∶1 000)4℃过夜,TBST 洗涤后,抗兔或抗鼠二抗(1∶5 000)(中杉金桥,ZB-2301,ZB-2305)室温孵育 2 h。化学发光法显色,Image lab 软件分析条带灰度值,GAPDH 作为内参照。

1.8 RNA 提取和 RT-PCR

PBS 轻洗细胞后,按每 10 cm^2 加入 1 ml TRIzol,用 RNA 提取试剂(Invitrogen)提取总 RNA,具体操作同说明书。经 NanoDrop2000 分光光度仪测定 RNA 浓度后用反转录试剂(TAKARA)将 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板扩增 *P16*,*P21* 和 *SIRT1* 基因。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primer suquence

Primer	Sequence
SIRT1-mouse	
Forward	5′-GCATTGGGAACTTTAGCATGTCA-3′
Reverse	5′-GGAAGATGAAGTCAACCAACAGTG-3′
Cdkn2a (P16)-mouse	
Forward	5′-CGCAGGTTCTTGGTCACTGT-3′
Reverse	5′-TGTTCACGAAAGCCAGAGCG-3′
Cdkn1a (P21)-mouse	
Forward	5′-CCTGGTGATGTCCGACCTG-3′
Reverse	5′-CCATGAGCGCATCGCAATC-3′
Actb (β-actin)-mouse	
Forward	5′-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3′
Reverse	5′-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3′

1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6 进行统计分析。实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),如有显著性差别,则组间两两显著性比较采用 LSD 法。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 H_2O_2 呈浓度依赖性地抑制 MSCs 增殖活性

为探讨氧化应激对 MSCs 增殖活性的影响,分别用 200、400、600 μmol/L H_2O_2 处理 MSCs 4 h 和 2 d 后观察细胞形态和增殖活性。光镜下显示对照组 MSCs 立体感强,形态均一,呈梭形,且生长密度大;而高浓度 H_2O_2 处理组(600 μmol/L)MSCs 的形态皱缩变圆,密度明显降低,细胞活力仅为对照组的 40%($P<0.05$),且培养基中有较多漂浮细胞,表明 600 μmol/L H_2O_2 处理显著增加细胞死亡(图 1)。CCK8 实验结果证实 H_2O_2 处理呈浓度依赖性地抑制 MSCs 增殖活性,其中 200 μmol/L H_2O_2 抑制细胞增殖达约 70%,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$;图 1),可作为进一步探讨诱导 MSCs 衰老的最佳浓度。

2.2 成功建立衰老模型

200 μmol/L H_2O_2 处理 MSCs 2 h 或 4 h 后,完全培养基继续培养 48 h,光镜下观察细胞形态,CCK8 实验检测细胞活性,β-半乳糖苷酶染色阳性细胞比例显示细胞衰老。与对照组相比,200 μmol/L H_2O_2 处理 2 h 组细胞密度变小,单个细胞形态变大,β-半乳糖苷酶染色阳性细胞比例增加($P<0.05$;图 2)。与 200 μmol/L H_2O_2 处理 2 h 组相比,200 μmol/L H_2O_2 处理 4 h,细胞活性显著下降,衰老进一步加重($P<0.05$;图 2)。

2.3 CTRP3 抑制 MSCs 的衰老

进一步明确 CTRP3 蛋白是否会抑制 MSCs 衰老进程。200 μmol/L H_2O_2 处理 4 h 诱导 MSCs 衰老的同时,在培养基中加入 CTRP3(终浓度为 5 μg/ml)。4 h 后撤去 H_2O_2,继续 5 μg/ml CTRP3 孵育 MSCs 48 h。应用 β-半乳糖苷酶染色。与 H_2O_2 处理组相比,CTRP3 明显降低衰老细胞比例($P<0.05$;图 3)。CCK8 实验显示,与对照组比较,200 μmol/L H_2O_2 处理 4 h 后细胞增殖显著受到抑制($P<0.05$)。进一步实验发现,5 μg/ml 的 CTRP3 可促进衰老 MSCs 增殖,2 组差异有统计学意义($P<0.05$;图 3)。

2.4 CTRP3 增强衰老 MSCs 的分化潜能

MSCs 经成骨诱导分化,茜素红染色,光镜下观察各组均有明显的矿盐沉积,H_2O_2 处理组矿盐沉积数量较对照组显著减少。而与 H_2O_2 处理组相比,CTRP3 处理显著增加衰老 MSCs 的矿盐沉积(图 4)。诱导为成骨细胞的 MSCs 经 1%盐酸抽提后在 420 nm 波长读数,结果显示 H_2O_2 处理显著降低 MSCs 的成骨分化能力(与对照组比较,$P<0.05$;图 4)。而 CTRP3 处理改善了衰老 MSCs 向成骨细胞分化的能力(与 H_2O_2 组比较,$P<0.05$)。MSCs 经成脂诱导分化,油红染色后光镜下观察到大量脂滴形成(图 4)。酶标仪读数结果发现,H_2O_2 组 MSCs

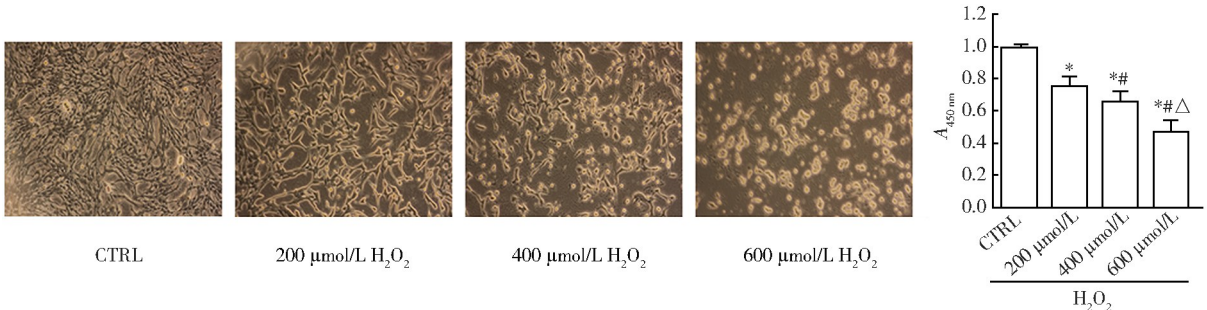


图 1 不同浓度 H_2O_2 处理对 MSCs 增殖活性的影响

Figure 1 Effect of different doses of H_2O_2 on proliferation of MSCs (×100)

MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with CTRL group, $^{*}P<0.05$; compared with 200 μmol/L H_2O_2 group, $^{\#}P<0.05$; compared with 400 μmol/L H_2O_2 group, $^{\triangle}P<0.05$.

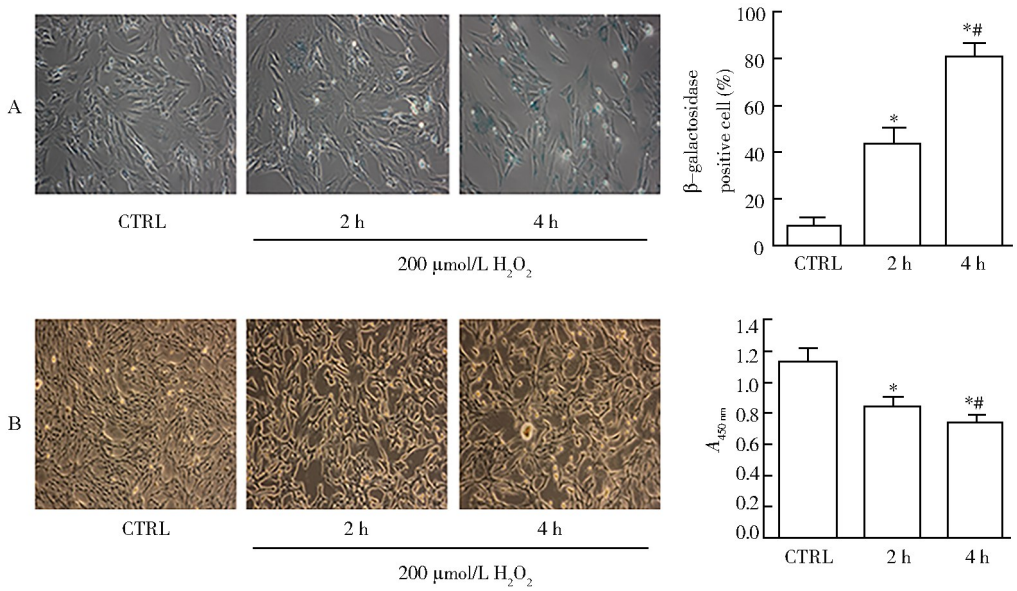


图2 H_2O_2处理诱导MSCs衰老模型的建立

Figure 2 Establishment of MSCs aging model by H_2O_2 induction

A: ×400; B: ×100. MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with CTRL group, $^*P<0.05$; compared with 2 h group, $^\#P<0.05$.

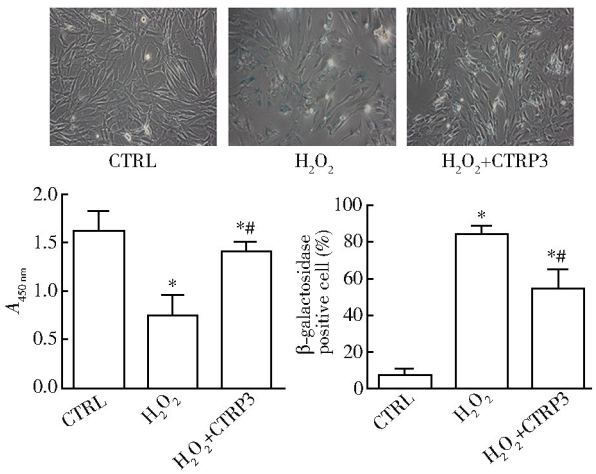


图3 CTRP3处理对MSCs的衰老及增殖活性的影响

Figure 3 Effect of CTRP3 on aging and proliferation of MSCs (×400)

CTRP3: C1q/TNF-related protein 3; MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with CTRL group, $^*P<0.05$; compared with H_2O_2 group, $^\#P<0.05$.

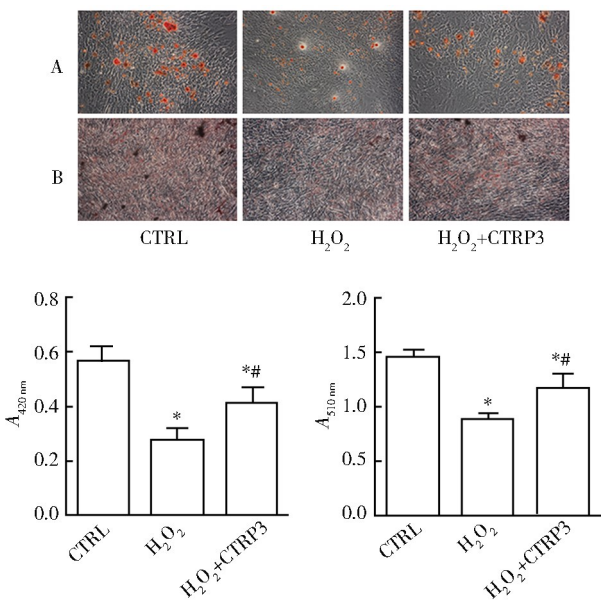


图4 CTRP3对衰老MSCs成骨成脂分化情况的影响

Figure 4 Effect of CTRP3 on osteogenesis and adipogenesis of MSCs (×100)

A: osteogenesis; B: adipogenesis. MSCs: mesenchymal stem cells; CTRP3: C1q/TNF-related protein 3. Compared with CTRL group, $^*P<0.05$; compared with H_2O_2 group, $^\#P<0.05$.

成脂能力较对照组显著降低($P<0.05$),CTRP3处理可增强衰老MSCs向脂肪细胞分化的能力(与H_2O_2组比较,$P<0.05$;图4)。

2.5 CTRP3抑制衰老MSCs凋亡

细胞凋亡影响MSCs生物学活性的发挥。接着,我们探讨CTRP3是否对衰老引起的MSCs凋亡有抑制作用。TUNEL染色显示,与对照组相比,H_2O_2组TUNEL阳性细胞比例显著增多($P<0.05$),CTRP3处理可显著减少MSCs凋亡(与H_2O_2组比较,$P<0.05$;图5)。Western blotting实验结果显示H_2O_2组cleaved caspase 3表达水平增高($P<0.05$),Bcl2/BAX表达水平降低($P<0.05$)。而CTRP3降低衰老细胞cleaved caspase 3水平($P<0.05$),升高Bcl2/BAX($P<0.05$;图6),证实衰老组MSCs凋亡较对照组加重,CTRP3能抑制衰老MSCs的凋亡。

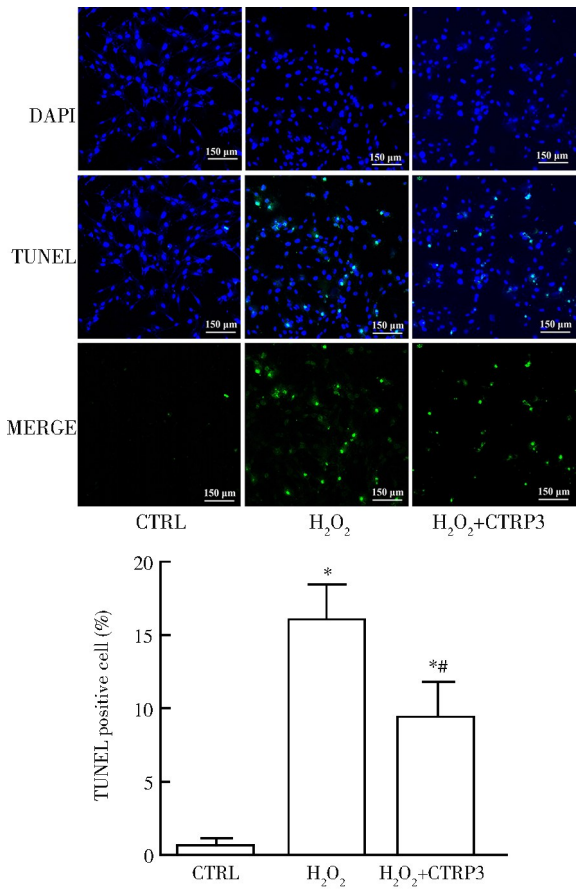


图 5 CTRP3 抑制衰老 MSCs 的凋亡

Figure 5 Inhibition of CTRP3 on apoptosis of MSCs

CTRP3: C1q/TNF-related protein 3; MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with CTRL group, $^{*}P<0.05$; compared with H_2O_2 group, $^{\#}P<0.05$.

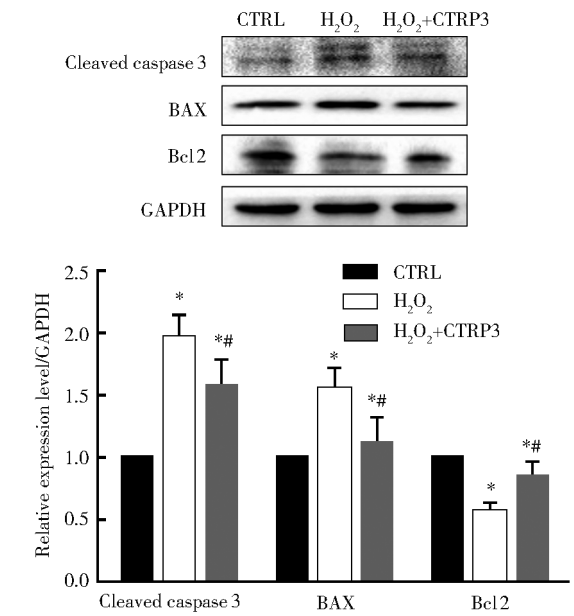


图 6 CTRP3 处理对衰老 MSCs cleaved caspase 3, BAX 和 Bcl2 等凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 6 Effect of CTRP3 on expression of cleaved caspase 3, BAX and Bcl2 of MSCs

CTRP3: C1q/TNF-related protein 3; MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with CTRL group, $^{*}P<0.05$; compared with H_2O_2 group, $^{\#}P<0.05$.

2.6 CTRP3 下调 *P16* 和 *P21* 表达,上调 *SIRT1* 的表达

P16 和 *P21* 通过上调衰老相关蛋白调控衰老进程,而 *SIRT1* 抑制衰老。P16、P21 和 SIRT1 通路已被证实参与 H_2O_2 诱导 MSCs 衰老进程中[7],为进一步明确 CTRP3 对衰老 MSCs 的保护机制,我们通过 RT-PCR 检测 P16、P21 通路和 SIRT1 表达激活情况。结果发现,与衰老组相比,CTRP3 处理组 MSCs *P16* 和 *P21* mRNA 水平显著下降($P<0.05$),而 *SIRT1* mRNA 表达水平显著上调($P<0.05$;图 7)。表明 CTRP3 可能通过抑制 P16 和 P21 通路,激活 SIRT1 信号通路延缓 MSCs 衰老进程。

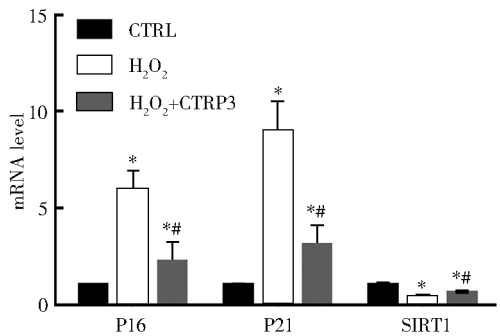


图 7 CTRP3 对 MSCs 衰老相关基因 *SIRT1*, *P16* 和 *P21* mRNA 表达的影响

Figure 7 Effect of CTRP3 on expression of *SIRT1*, *P16* and P21 mRNA of MSCs

MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with CTRL group, $^{*}P<0.05$; compared with H_2O_2 group, $^{\#}P<0.05$.

3 讨 论

本研究通过建立氧化应激诱导的细胞早衰模型,研究 CTRP3 对衰老 MSCs 增殖、凋亡和分化等表型的影响。结果证实 CTRP3 能延缓 MSCs 衰老,P16、P21 通路和 SIRT1 通路可能是其发挥作用的关键信号通路。

近年来,MSCs 移植对心肌梗死的疗效一直受到争议。缺血、炎症、氧化应激等病理条件常常诱导 MSCs 衰老凋亡,严重影响了 MSCs 的疗效[7,8]。有研究证实移植 MSCs 在损伤部位仅仅存活数周到数月,细胞有限的存活期通常与不良的局部微环境诱导细胞早衰和凋亡有关[9]。体外 H_2O_2 诱导 MSCs 早衰模型常用于模仿体内氧化应激因素诱导移植 MSCs 衰老过程[10,11]。本实验发现 H_2O_2 以浓度依赖的方式抑制 MSCs 增殖。高浓度 H_2O_2 直接引起细胞死亡,而低浓度 H_2O_2 处理的 MSCs 表现为细胞变大且扁平、细胞增殖能力下降及 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞比例增加,表明低浓度 H_2O_2 可成功诱导

MSCs衰老模型的建立,这与先前的研究报道一致[11]。

CTRP3是CTRP家族中重要的成员,具有显著的调节糖脂代谢、抗炎和促血管生成等生物学作用[5]。最近的几篇研究陆续报道CTRP3可通过抗氧化应激途径,减轻氧化应激对心脑等重要靶器官的损害,体外实验表明CTRP3通过激活AMPK通路减轻氧化应激诱导的细胞损伤和凋亡[12,13]。另外,外源性给予CTRP3能激活PI3K/Akt通路,抑制缺血缺氧诱导的MSCs凋亡[6]。我们的实验进一步研究了CTRP3对氧化应激诱导的MSCs衰老进程的影响。通过β-半乳糖苷酶染色实验发现CTRP3显著降低氧化应激条件下衰老细胞的比例。进一步检测衰老细胞生物学功能和凋亡情况,发现CTRP3促进衰老MSCs增殖,增强衰老MSCs分化能力,抑制衰老MSCs凋亡,提示CTRP3可能是新的抗衰老和凋亡分子。*P16*可通过抑制CDK4/CDK6与cyclin D结合,*P21*则通过与多种cyclin-CDK复合物结合,使细胞增殖停止于G1期,从而导致细胞衰老[14]。SIRT1信号通路的失活亦可促进细胞衰老,损害细胞功能[11,15]。我们用RT-PCR的方法初筛了几个衰老相关通路,发现CTRP3上调*SIRT1* mRNA表达水平,下调*P16* mRNA和*P21* mRNA表达水平。因此,我们推测,CTRP3发挥抗MSCs衰老的作用可能依赖于P16、P21和SIRT1通路。

【参考文献】

[1] Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE, *et al*. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue[J]. Physiol Rev, 2016, 96(3): 1127-1168. DOI: 10.1152/physrev.00019.2015.

[2] Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease: where are we with cardiac cell-based therapy? [J]. Circ Res, 2015, 117(3): 229-233. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306306.

[3] Fan M, Chen W, Liu W, *et al*. The effect of age on the efficacy of human mesenchymal stem cell transplantation after a myocardial infarction[J]. Rejuvenation Res, 2010, 13(4): 429-438. DOI: 10.1089/rej.2009.0986.

[4] Yi W, Sun Y, Yuan Y, *et al*. C1q/tumor necrosis factor-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel antiapoptotic, proangiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart[J]. Circulation, 2012, 125(25): 3159-3169. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.099937.

[5] Li Y, Wright GL, Peterson JM. C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) function and regulation[J]. Compr Physiol, 2017, 7(3): 863-878. DOI: 10.1002/cphy.c160044.

[6] Hou M, Liu J, Liu F, *et al*. C1q tumor necrosis factor-related protein-3 protects mesenchymal stem cells against hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(1): 97-104. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1550.

[7] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells[J]. Ageing Res Rev, 2006, 5(1): 91-116.

[8] 倪清蓉, 洪环宇, 孔静, 等. 间充质干细胞与缺血性心脏病[J]. 中国体外循环杂志, 2016(2): 125-128.
Ni QR, Hong HY, Kong J, *et al*. Mesenchymal stem cells and ischemic heart diseases[J]. Chin J Extracorpor Circ, 2016(2): 125-128.

[9] Yan W, Guo Y, Tao L, *et al*. C1q/tumor necrosis factor-related protein-9 regulates the fate of implanted mesenchymal stem cells and mobilizes their protective effects against ischemic heart injury *via* multiple novel signaling pathways[J]. Circulation, 2017, 136(22): 2162-2177. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029557.

[10] Nopparat C, Sinjanakhom P, Govitrapong P. Melatonin reverses H_2O_2-induced senescence in SH-SY5Y cells by enhancing autophagy *via* sirtuin 1 deacetylation of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB[J]. J Pineal Res, 2017, 63(1). DOI: 10.1111/jpi.12407.

[11] Zhou L, Chen X, Liu T, *et al*. Melatonin reverses H_2O_2-induced premature senescence in mesenchymal stem cells *via* the SIRT1-dependent pathway[J]. J Pineal Res, 2015, 59(2): 190-205. DOI: 10.1111/jpi.12250.

[12] Yang B, Wang S, Yu S, *et al*. C1q/tumor necrosis factor-related protein 3 inhibits oxidative stress during intracerebral hemorrhage *via* PKA signaling[J]. Brain Res, 2017, 1657: 176-184. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.11.016.

[13] Ma ZG, Yuan YP, Xu SC, *et al*. CTRP3 attenuates cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress and cell death in diabetic cardiomyopathy in rats[J]. Diabetologia, 2017, 60(6): 1126-1137. DOI: 10.1007/s00125-017-4232-4.

[14] 赵朝晖, 陈晓春. 细胞周期调控与细胞衰老[J]. 老年医学与保健, 2003, 9(1): 55-57.
Zhao ZH, Chen XC. Cell cycle regulation and cell senescence[J]. Geriatr Health Care, 2003, 9(1): 55-57.

[15] Vassallo PF, Simoncini S, Ligi I, *et al*. Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression[J]. Blood, 2014, 123(13): 2116-2126. DOI: 10.1182/blood-2013-02-484956.

(编辑: 门可)