

DOI: 10.13376/j.cblls/2020059

文章编号: 1004-0374(2020)05-0471-06

细胞衰老在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的作用

刘小慧, 曾俊豪, 万小雨, 刘朝奇*

(三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 宜昌 443002)

摘要: 细胞衰老是细胞在受到内外环境的损伤作用后被激活的一种细胞应答状态, 可作为一种固有的细胞保护机制用于抵抗这些损伤刺激。然而, 长时间持续的细胞衰老状态则与炎症、纤维化以及恶性肿瘤的发生有着密切的关系, 其中在非酒精性脂肪性肝病的发生发展中细胞衰老扮演着重要的角色。因此, 探讨细胞衰老在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的作用, 并发现其可能用于临床治疗的分子靶点及其作用机制具有重要意义。

关键词: 细胞衰老; 非酒精性脂肪性肝病; 脂肪型肝炎; 肝癌

中图分类号: R575.5 **文献标志码:** A

Cellular senescence in the progression of NAFLD

LIU Xiao-Hui, ZENG Jun-Hao, WAN Xiao-Yu, LIU Chao-Qi*

(Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy,
China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: Cellular senescence is a cellular response triggered by the damage of cell's internal and external environment, so it is viewed as inherent cellular protection mechanism to resist various stimuli. However, the sustained effects of cell senescence are closely related to inflammation, fibrosis and cancer. Particularly, cell senescence plays an important role in the development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Therefore, it makes sense to ascertain the mechanisms of cellular senescence in the development of NAFLD and explore the probable therapeutic targets.

Key words: cellular senescence; nonalcoholic fatty liver disease; nonalcoholic steatohepatitis; hepatocellular carcinoma

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一系列疾病的总称, 包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 和 NASH 相关性肝硬化^[1]。而相对于肝硬化, 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是 NAFLD 疾病谱进展的另一种终末状态, 代谢综合征可为 HCC 的独立危险因素。在单纯性脂肪肝向肝纤维化和肝硬化进展的过程中, NASH 作为一个中间状态, 是 NAFLD 进展的关键限速阶段。其中, 非活动性 NASH (即单纯性脂肪肝) 更是多见, NAFLD 的进展通常呈静止状态。NAFLD 的特点是游离脂肪酸增多及脂肪生成, 从而引起肝细胞中甘油三酯过度积累^[2]。NAFLD 发病的诸多危险因素已

被证实, 其中包括胰岛素抵抗、遗传易感性及代谢紊乱^[1]。

细胞衰老出现在 NAFLD 发生发展的各个阶段^[3-5]。研究发现, 在 NAFLD 患者的肝细胞中出现了细胞核增大、P21 上调和早期端粒缩短的现象^[6]; 也有研究表明, 衰老细胞的积累可促进肝细胞脂质积累和脂肪变性^[3]。因而, 细胞衰老在 NAFLD 发生发展中有着重要作用。本文从细胞衰老概念的提出、衰老特性标志物的研究出发, 简要综述了细胞

收稿日期: 2020-02-14; 修回日期: 2020-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473461)

*通信作者: E-mail: ctgulc@163.com

衰老与 NAFLD 发生发展过程中标志性阶段之间的联系及其作为治疗靶点的应用潜力,并讨论了其目前所面临的局限性和未来发展方向。

1 细胞衰老概述

细胞衰老是指在正常环境条件下发生的细胞功能减退,逐渐趋向死亡的现象,是机体衰老的表现之一^[7]。细胞一旦发生衰老,其形态就会出现明显的衰老表型,并表达衰老特性标志物,如衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase activity, SA- β -gal)、累积衰老相关的异染色质病灶 (senescence associated heterochromatin foci, SAHF) 和衰老相关的 DNA 损伤灶 (senescence associated DNA damage foci, SADF), 形成衰老相关分泌表型 (senescence associated secretory phenotype, SASP), 产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 激活自噬, 进而发展为永久性的细胞周期停止, 所有这些标志在细胞的分化和增殖中均有着至关重要的意义, 故可用于定义细胞衰老^[8-9]。

细胞衰老的生理功能是清除受损细胞, 并参与修复组织的急性应激或损伤。机体通过 SASP 分泌的趋化因子和细胞因子, 如白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) 等招募免疫细胞, 进而清除衰老的细胞, 但慢性刺激可导致细胞衰老状态长期持续存在, 表现为端粒的损耗、基因组的损伤及 SASP 的过量产生, 使得衰老细胞不断积累以及组织再生存在障碍^[4]。相关研究表明, 衰老细胞能够对邻近的细胞以及微环境产生影响, 这是由于衰老细胞产生了多种 SASP 因子, 而 SASP 因子有着诱导和增强细胞的衰老、激活免疫应答、诱导纤维化和促进肿瘤等疾病的发生发展的作用^[8]。所以, 监测衰老的细胞可能有助于评估相关疾病的发展进程。然而, 目前还没有发现衰老细胞的绝对特异性的单一标记。有研究建议使用一种结合细胞

质 (如 SA- β -gal、脂褐素)、细胞核 (如 p16^{INK4A}、p21^{WAF1/Cip1}、Ki67) 和 SASP、微环境和 (或) 细胞类型特异性标记的多标记方法^[10], 并将多个标记的检测分为具体的 3 个步骤, 从而更可靠地检测原位衰老细胞, 以及检验人为干预的效果 (图 1)。

衰老细胞的消除应该能够减缓衰老相关疾病的病理进展。研究报道, 在小鼠模型中, 清除衰老细胞可以阻止与衰老相关的机体功能减退, 抑制肿瘤的发生并使小鼠的寿命延长^[8,11]。目前, 已有研究发现一类可以靶向选择衰老细胞的新型抗衰老药物, 并被命名为“senolytic drugs”^[11]。迄今为止, 该类药物仅在动物模型中得以验证, 尚未进入临床运用。另外, SASP 重编程可以通过抑制 Janus 蛋白激酶 2/ 信号转导与转录激活因子 3 (Janus kinase 2/ signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/ STAT3) 信号通路来增强免疫监视和肿瘤清除^[12]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的抑制剂雷帕霉素是一种有效的 SASP 抑制剂, 可延长机体的寿命。饮食限制 (dietary restriction, DR) 可以减少衰老细胞的数量, 同时强烈抑制肝脂肪的积累, 而在 DR 停止后很长的一段时间内抑制作用仍然存在^[13]。这些研究为细胞衰老的新药研发提供了新的思路。因此, 类似的机制可用来干预肝细胞衰老的过程以获得治疗 NAFLD 的优势。

2 细胞衰老与肝细胞脂质积累

NAFLD 的特征之一是肝细胞脂质合成增加, 衰老细胞的积累促进了肝细胞脂肪的积累和变性。其中, 高脂膳食导致的脂质合成增加或脂质分解代谢降低是肝脏脂肪积累的主要原因。Gorgoulis 等^[10]研究发现, 诱导小鼠肝细胞衰老可导致脂肪代谢能力下降, 而去除衰老细胞可减少肝脂肪变性, 因而针对衰老细胞的干预措施可为减少 NAFLD 中脂肪

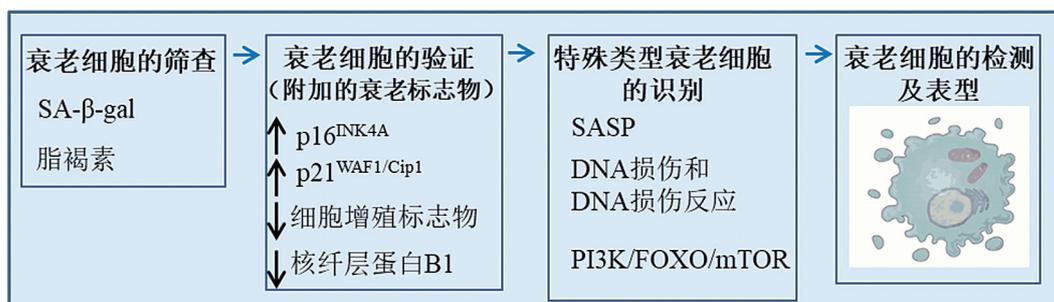


图1 精准检测衰老细胞的三步工作流程^[10]

变性提供治疗思路。

衰老肝细胞的慢性进行性蓄积可干扰肝脏的脂质代谢功能。目前有证据表明, 衰老相关的细胞周期依赖性蛋白激酶 4- 转录因子 CCAAT/ 增强子结合蛋白 α -p300 (CDK4-C/EBP α -p300) 轴是一个年龄相关性疾病的关键调节器, 其中包括脂肪变性^[14]。研究者发现, NAFLD 患者 CDK4 水平升高, 而可抵抗 CDK4 调节的 C/EBP α -S193A 突变小鼠不会随着年龄的增长而发生肝脂肪变性, 其潜在的机制是 C/EBP α 的激活受阻后不能使介导 NAFLD 发生的酶激活^[14]。而通过对 CDK4 老年小鼠运用一种特殊的 CDK4 抑制剂 PD-0332991, 可使 C/EBP α -p300 复合物减少并消除肝脂肪变性, 其纠正机制包括消除细胞衰老和改变肝细胞的染色质结构^[14]。因此, 抑制 CDK4 可能被认为是改善年龄相关性肝病的一种治疗方法。本课题组的研究也发现, miR-34a 靶向 CDK6 诱导肝细胞衰老在 NAFLD 发生发展中具有重要作用 (待发表资料)。另外, 临床上应用肝活检检测肝脏组织中衰老肝细胞所占的比例, 进而对疾病的进展进行预测, 这比目前使用的临床参数更为准确有效^[15]。与此相一致的是, 当足够多的肝细胞衰老而导致代偿失调时, 就会出现不良的结果。其中, 衰老肝细胞的核面积与酒精性肝病中黄疸、腹水以及向肝性脑病的发展之间有很强的相关性^[16]。在肝细胞衰老中已经证明这一过程涉及到主要代谢途径基因的差异性表达, 如葡萄糖、脂质和蛋白质代谢相关基因的表达以及重要的信号转导通路, 如磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)、有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、酪氨酸蛋白激酶 / 信号转导子和转录激活子 (Janus activated kinase signal transducer/activator of transcription, Jak/Stat)、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF β)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors-1, IGF1) 以及胰岛素的分泌都在衰老的肝细胞中发生了变化^[17]。

脂肪酰合酶 (fatty acid synthase, FASN) 可催化脂肪酸的合成, 在脂肪积累中具有重要作用。有研究发现 FASN 与细胞衰老有关: 在诱导小鼠肝星状细胞和人原发性成纤维细胞衰老的过程中 FASN 的水平升高, 并且在小鼠肝脏组织衰老的过程中 FASN 的水平显著升高; 抑制 FASN 活性的小分子 C75 可以阻止小鼠和人类细胞的衰老诱导过程^[18]。同时, C75 抑制了 SASP 因子产生, 包括 IL-1 α 、IL-1 β 和

IL-6, 也抑制了细胞外泌体的分泌^[18]。

代谢失调可促进细胞衰老。应用高脂肪食物 (high-fat diet, HFD) 喂养大鼠, 发现其肝脂肪变性严重, 同时肝细胞衰老标志物 p16^{INK4a} 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高, 并且观察到 p16^{INK4a} 编码区组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化 (histone H3 lysine 27 trimethylation, H3K27Me3) 的降低^[19]。这是由于 p16^{INK4a} 是一种细胞周期依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 抑制基因, 高表达的 p16^{INK4a} 可通过分泌促炎性细胞因子和引起线粒体功能障碍, 导致细胞周期不可逆的停滞, 因而在细胞衰老的分子通路中发挥重要作用^[19]。在肥胖小鼠和人类的代谢组织, 如脂肪组织和胰腺中都产生过多的 ROS, 从而导致细胞因子以及 SA- β -GAL、p53、p16 和 p21 的高表达, 表现出细胞衰老表型^[20-22]。这些研究都提示, 代谢紊乱与细胞衰老的关系密切, 而通过改善代谢紊乱的状态可能可以缓解细胞的衰老。本课题组应用衰老模型研究发现, 竹节参总皂苷具有良好的降脂、抗炎等作用, 并且可通过调节 Toll 样受体 4/ 核因子 κ B (Toll like receptor 4/nuclear factor- κ B, TLR4/NF- κ B) 信号通路进而改善脂肪组织炎症, 以达到缓解细胞衰老的目的^[23]。应用游离脂肪酸建立的细胞衰老模型, 本课题组还发现原花青素 B2 可干预多个信号通路中的蛋白, 如蛋白激酶 B/ 叉头蛋白 O4 (protein kinase B/forkhead box O4, Akt/FoxO4)、GATA4/p53, 并调节它们的核浆定位, 因而在干预细胞衰老、减少肝脏中脂质合成及增加脂肪酸 β - 氧化的过程中起着重要的作用^[24-25]。

3 细胞衰老与脂肪型肝炎

端粒损伤、脂肪酸增加、线粒体功能障碍和慢性炎症已被证明与衰老、肥胖和慢性肝病有关, 且这些因素在体内和体外实验中均被证实可诱导细胞衰老。2019 年, *Cell* 报道了线粒体代谢与肝细胞衰老的关系^[26]: 线粒体蛋白 mitofusin 2 (Mfn2) 在预防肝脏疾病中有着重要的作用, 即在 NASH 患者的肝脏活检中检测到 Mfn2 表达降低; 此外, 在肝脏脂肪变性或 NASH 小鼠模型中检测到 Mfn2 水平降低, 而在 NASH 小鼠模型中 Mfn2 的重新表达改善了该疾病的症状, 其机制是 Mfn2 结合磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 并将 PS 特异性地运送至外膜上, 这有利于 PS 转运到线粒体以及线粒体磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 的合成。因此, 肝脏中 Mfn2 的缺乏将影响 PS 的转移和磷脂

合成,引起内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激,并发展成类似于 NASH 的表型和肝癌。小鼠肝脏特异性敲除 *Mfn2* 可引起炎症、甘油三酯积聚、纤维化和肝癌,这表明内质网-线粒体 PS 转运的中断是参与肝脏疾病发生发展的一种新机制^[26]。内质网应激的增加与受损的自噬通量有关,而雷帕霉素可通过恢复线粒体和溶酶体功能来恢复自噬通量,进而使自噬恢复以达到减缓细胞衰老的目的。此外,雷帕霉素可以通过上调红系衍生的核转录相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related protein, Nrf2) 的表达,下调 STAT3 通路来抑制细胞衰老^[4]。所以,雷帕霉素可以通过抑制衰老相关炎症而改善 NAFLD 进展为 NASH。

NF- κ B 信号通路在各种肝脏疾病中扮演着关键的角色,其中 I κ B 激酶/NF- κ B(I κ B kinase/NF- κ B, IKK/NF- κ B) 的激活能诱导由巨噬细胞介导的慢性炎症引起的肝纤维化,而巨噬细胞的消除可以减少 NF- κ B 诱导的肝纤维化;此外,抑制 NF- κ B 信号通路可以降低肝脏损伤后炎性细胞因子的分泌,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 IL-6^[4]。最近的一项研究涉及到肝脂肪变性中的细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、STAT3 和雌激素受体 α ^[27]。虽然目前尚不能明确这些信号通路与细胞衰老和 SASP 有关,但 SASP 和 NF- κ B 信号通路在 NAFLD 的发展过程中都发挥着重要的作用。本课题组应用高脂环境在体内外诱导肝细胞 miR-22 高表达,进而抑制沉默信息调节因子相关酶 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 的活性,导致 SASP 上调,诱导了肝细胞衰老,而 miR-22 可通过靶向调控 SIRT1/SASP 诱导 NAFLD 发生发展,为 NAFLD 治疗提供潜在分子靶点^[28]。另外,本课题组还发现 CD36-NF- κ B/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(CD36-NF- κ B/nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3, CD36-NF- κ B/NLRP3) 信号轴在高脂诱导的肝窦内皮细胞炎症反应中具有重要作用,游离脂肪酸(棕榈酸)可活化 CD36,启动下游 NF- κ B/NLRP3 信号通路,促进脂肪性肝纤维化发生发展(待发表资料)。

端粒的生物学改变在衰老以及衰老相关疾病的发生发展中起着重要的作用。就肝脏疾病而言,端粒长度的缩短被认为与隐源性肝硬化有关^[29]。在此背景下,有研究报道了 NAFLD 中肝脏炎症和纤维化的进展与白细胞端粒缩短有关^[30]。而生活方式和饮食模式可影响端粒长度,其中肥胖与端粒长度呈

负相关^[31]。因而,饮食限制可通过影响端粒的生物学表现进而阻止肝纤维化的进展。此外,端粒酶能延长缩短的端粒,而端粒逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 和端粒酶 RNA (telomerase RNA, TR) 是端粒酶的两个主要组成部分,编码 TERT 和 TR 的基因的突变是端粒相关疾病发生发展的分子机制。由于端粒缩短既可作为诊断标记,又可作为治疗干预的潜在靶点,所以,以端粒酶基因作为切入点可为 NAFLD 相关的肝脏炎症和纤维化诊断及新药研发提供新的思路^[32]。

DNA 甲基化是 NAFLD 进展为 NASH 的过程中另一种可能的重要因素。在 Hardy 等^[33]的研究中,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 被认为与 NAFLD 发展到 NASH 有关,在 NAFLD 患者的肝组织和循环 DNA 中其启动子被发现高甲基化。Hotta 等^[34]研究证实了差异性甲基化区域 (differentially methylated region, DMR) 网络与 NAFLD 的进展以及衰老有关,包括与转录调控和细胞增殖相关的基因下调有关的 DMR,以及与脂质代谢相关的基因上调有关的 DMR。他们的研究表明,DMR 网络中的 CpG 甲基化在 NAFLD 进展过程中发生的肝代谢功能障碍、炎症反应、纤维化和潜在的肿瘤发生中发挥重要作用,同时衰老和高血糖可协同调控 DMR 网络中的 CpG 甲基化。通过控制体重和血糖水平,可以降低 DMRs 的甲基化,从而促进肝脏纤维化的恢复^[34]。

4 细胞衰老与肝细胞癌

肝细胞脂肪变性以及由此导致的肝脏微环境变化在 NAFLD 向 HCC 的发生发展中起着关键作用。在该转化过程中所涉及的一些对肝脏微环境产生影响的因素,包括微生物群、胰岛素抵抗、炎症、脂质和胆汁酸代谢^[35]。细胞衰老的生理功能是阻止肿瘤发生,但持续慢性细胞衰老也参与肿瘤的发生。利用小鼠模型发现在衰老细胞的免疫防御缺陷的情况下,衰老肝细胞将向着 HCC 的方向发展。该模型与人类晚期 NAFLD 中的 HCC 的发展高度一致,其中衰老肝细胞的蓄积和其免疫防御受损所导致的衰老共存^[8]。这也可以解释肝硬化背景下肝细胞癌的发生^[8]。

肝细胞绕过衰老而达到无限增殖的状态 (senescence bypass) 被认为是参与 HCC 发展的主要机制。在 NAFLD 中,未癌变的肝细胞会表现出 DNA 损伤、

更短的端粒和细胞周期抑制等细胞衰老的征象。相反, 来自同一肝脏的肝癌细胞仅表现出 DNA 损伤和更短的端粒, 而没有细胞周期抑制, 表明细胞绕过衰老状态。肝硬化和 HCC 的基因表达研究也表明, 肝细胞绕过衰老状态与 HCC 的发生有关^[36]。大多数患有肝细胞癌的患者具有潜在的慢性肝脏炎症, 其造成的持续损伤可引起肝硬化并最终导致 HCC, 然而只有少数肝硬化患者发展为 HCC。对 33 名肝癌患者的肝组织进行的纵向研究结果显示, 发生 HCC 的肝组织 γ -H2AX 阳性, p^{16INK4} 和 p^{21WAF1/Cip1} 在肿瘤发生前后的表达增加明显^[5]。此外, 核大小和端粒长度的变化揭示了 HCC 患者的细胞衰老程度比无肿瘤的患者更显著, 即 HCC 患者的肝细胞经历了更明显的细胞损伤和衰老的病理特征^[5]。

肿瘤也可从邻近的非衰老肝细胞发展而来^[37], 它们通常发生在衰老的肝细胞附近。衰老细胞通过 SASP 参与新生细胞的血管生成和增殖以补充受损细胞, 由此可见衰老细胞对保持组织完整性具有重要的作用。然而, 在晚期 NAFLD 中, 衰老肝细胞的大量积累会造成 SASP 富集的微环境, 长时间暴露于 SASP 可刺激细胞维持衰老的状态, 影响肝组织的再生, 这又可以促进邻近细胞的 DNA 损伤, 进而导致未衰老的肝细胞转变为肿瘤细胞^[11,37-38]。

此外, 微生物群是影响肝微环境的一个重要因素, 进而促进 NAFLD 进展为 HCC。Yoshimoto 等^[39]研究发现, 肠道微生物群的改变增加了肠道代谢产物脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA) 的水平, 而 DCA 是一种可导致 DNA 损伤的肠道细菌代谢物, 肠肝循环中的 DCA 诱导肝星状细胞中 SASP 的表达, 后者在肝脏中分泌炎症因子和肿瘤促进因子, 从而促进小鼠 HCC 的发生^[39]。此外, 衰老的特点之一就是肠道失调, 其改变包括变形杆菌与蓝藻菌 (cyanobacteria) 的增加和疣微菌 (verrucomicrobia) 的减少, 这在小鼠模型以及人类早衰症患者中都得到了证实^[40]。该研究将野生型小鼠的粪便菌群移植到两种早衰型小鼠模型中, 结果显示早衰型小鼠的健康寿命和预期寿命均延长, 而对回肠内容物的代谢组学分析指出, 次生胆汁酸分泌的恢复可能是重建健康微生物群的有益作用机制。这些研究提示, 基于肠道微生物干预肝脏细胞的 SASP 可以阻止 NAFLD 向 HCC 进展。

5 展望

细胞衰老在 NAFLD 发生发展中有着关键的作

用, 可能有助于开发疾病分级和预后的潜在生物标志物。事实上, 很多研究已经证明了肝细胞衰老的特异性标记在预测 NAFLD 预后中具有重要作用^[15-16]。然而, 这种对肝细胞衰老的分析有一个明显的缺点, 即需要以肝组织活检的形式进行。鉴定和验证肝细胞衰老的血清标记物将有希望用于评估 NAFLD 的现状, 在一些情况下还具有预测纤维化的附加作用, 因而可作为在血清或肝脏中测量纤维化的替代方法。尽管正在尝试干预细胞衰老的疗法, 但目前还未用于临床研究, 希望能够通过后续的实验研究为 NAFLD 的防治提供新的思路 and 手段。

[参 考 文 献]

- [1] Zhou J, Zhou F, Wang W, et al. Epidemiological feature of NAFLD from 1999 to 2018 in China. *Hepatology*, 2020, [Epub ahead of print]
- [2] Boland ML, Oró D, Tølbøl KS, et al. Towards a standard diet-induced and biopsy-confirmed mouse model of non-alcoholic steatohepatitis: impact of dietary fat source. *World J Gastroenterol*, 2019, 25: 4904-20
- [3] Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*, 2017, 8: 15691
- [4] Wei W, Ji S. Cellular senescence: molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 9121-35
- [5] Rey S, Quintavalle C, Burmeister K, et al. Liver damage and senescence increases in patients developing hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32: 1480-6
- [6] Nakajima T, Nakashima T, Okada Y, et al. Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathol Int*, 2010, 60: 175-83
- [7] Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates. *EMBO Rep*, 2014, 15: 1139-53
- [8] Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of *in vivo* senescence. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 397-408
- [9] Sikora E, Arendt T, Bennett M, et al. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev*, 2011, 10: 146-52
- [10] Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 2019, 179: 813-27
- [11] Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Ageing Cell*, 2015, 14: 644-58
- [12] Herranz N, Gallage S, Mellone M, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 1205-17
- [13] Ogrodnik M, Jurk D. Senescence explains age- and obesity-related liver steatosis. *Cell Stress*, 2017, 1: 70-2

- [14] Nguyen P, Valanejad L, Cast A, et al. Elimination of age-associated hepatic steatosis and correction of aging phenotype by inhibition of CDK4-C/EBPa-p300 axis. *Cell Rep*, 2018, 24: 1597-609
- [15] Aravinthan A, Pietrosi G, Hoare M, et al. Hepatocyte expression of the senescence marker p21 is linked to fibrosis and an adverse liver-related outcome in alcohol-related liver disease. *PLoS One*, 2013, 8: e72904
- [16] Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, et al. Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr Physiol*, 2013, 3: 977-1010
- [17] Aravinthan A, Shannon N, Heaney J, et al. The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease. *Exp Gerontol*, 2014, 60: 37-45
- [18] Fafián-Labora J, Carpintero-Fernández P, Jordan SJD, et al. FASN activity is important for the initial stages of the induction of senescence. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 318
- [19] Zhang X, Xu GB, Zhou D, et al. High-fat diet modifies expression of hepatic cellular senescence gene p16^{INK4a} through chromatin modifications in adult male rats. *Genes Nutr*, 2018, 13: 6
- [20] Schafer MJ, White TA, Evans G, et al. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue. *Diabetes*, 2016, 65: 1606-15
- [21] Minamino T, Orimo M, Shimizu I, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*, 2009, 15: 1082-7
- [22] Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*, 2010, 9: 667-84
- [23] 刘正泰, 刘朝奇, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷对自然衰老大鼠脂肪组织炎症的改善作用. *中成药*, 2019, 41: 436-40
- [24] 熊海容, 段丽, 李聪, 等. 原花青素B2通过Akt/FoxO4通路拮抗内皮细胞衰老的实验研究. *天然产物研究与开发*, 2018, 30: 1884-9
- [25] 段丽, 李聪, 罗悦, 等. 原花青素B2通过GATA4/p53通路改善肝细胞衰老的研究. *现代食品科技*, 2019, 35: 1-5
- [26] Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Vives S, et al. Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease. *Cell*, 2019, 177: 881-95
- [27] Choi E, Kim W, Joo SK, et al. Expression patterns of STAT3, ERK and estrogen-receptor α are associated with development and histologic severity of hepatic steatosis: a retrospective study. *Diagn Pathol*, 2018, 13: 23.
- [28] 段丽. 高脂诱导肝细胞衰老中microRNA-22的作用及其分子机制[D]. 宜昌: 三峡大学, 2018
- [29] Barnard A, Moch A, Saab S. Relationship between telomere maintenance and liver disease. *Gut Liver*, 2019, 13: 11-5
- [30] Kim D, Li AA, Ahmed A. Leucocyte telomere shortening is associated with nonalcoholic fatty liver disease-related advanced fibrosis. *Liver Int*, 2018, 38: 1839-48
- [31] Kirchner H, Shaheen F, Kalscheuer H, et al. The telomeric complex and metabolic disease. *Genes*, 2017, 8: E176
- [32] Lonardo A, Lugari S, Nascimbeni F. Telomere shortening: an innocent bystander at the crossroad of NASH with ageing and cardiometabolic risk? *Liver Int*, 2018, 38: 1730-2
- [33] Hardy T, Zeybel M, Day CP, et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 2017, 66: 1321-8
- [34] Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, et al. Identification of differentially methylated region (DMR) networks associated with progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*, 2018, 8: 13567
- [35] Agosti P, Sabba C, Mazzocca A. Emerging metabolic risk factors in hepatocellular carcinoma and their influence on the liver microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 607-17
- [36] Yildiz G, Arslan-Ergul A, Bagislar S, et al. Genome-wide transcriptional reorganization associated with senescence-to-immortality switch during human hepatocellular carcinogenesis. *PLoS One*, 2013, 8: e64016
- [37] Eggert T, Wolter K, Ji J, et al. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression. *Cancer Cell*, 2016, 30: 533-47
- [38] Ritschka B, Storer M, Mas A, et al. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev*, 2017, 31: 172-83
- [39] Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 2013, 499: 97-101
- [40] Bárcena C, Valdés-Mas R, Mayoral P, et al. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat Med*, 2019, 25: 1234-42