

## 研究论文

## FOXO4通过抑制凋亡维持人脐带间充质干细胞衰老

吴平平<sup>1</sup>, 胡文龙<sup>1,\*</sup>, 殷婷婷<sup>2</sup>, 费久旺<sup>2</sup><sup>1</sup>九江学院附属医院骨科, 九江 332000; <sup>2</sup>九江学院基础医学院生物化学系, 九江 332000

**摘要:** 本文旨在探讨叉头盒O4 (forkhead box O4, FOXO4)在人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)衰老中的作用。采用自然传代法诱导hUC-MSCs衰老, 用慢病毒shRNA抑制FOXO4表达, 用β-半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老情况, 用CCK-8法检测细胞活性, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 用qPCR和Western blot检测细胞Bcl-2、Bax、FOXO4、白介素6 (interleukin 6, IL-6)和cleaved Caspase-3的表达情况, 用免疫荧光染色法检测细胞FOXO4表达情况, 用ELISA检测细胞IL-6分泌量。结果显示, 相比第一代hUC-MSCs, 衰老hUC-MSCs中FOXO4和Bax表达水平上调, Bcl-2和cleaved Caspase-3表达水平下调, IL-6 mRNA表达水平上调、分泌量增加。抑制FOXO4的表达后, 衰老hUC-MSCs凋亡增加, 细胞活力下降, IL-6 mRNA表达水平下调, 分泌量降低。上述结果提示, FOXO4能通过抑制凋亡来维持衰老hUC-MSCs活力和功能, 加速整个细胞集落衰老。

**关键词:** 人脐带间充质干细胞; 叉头盒O4; 细胞衰老; 凋亡**中图分类号:** R339.3+8; Q255

## FOXO4 maintains senescence in human umbilical cord mesenchymal stem cells by repressing apoptosis

WU Ping-Ping<sup>1</sup>, HU Wen-Long<sup>1,\*</sup>, YIN Chang-Chang<sup>2</sup>, FEI Jiu-Wang<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Orthopaedics, Jiujiang University Affiliated Hospital, Jiujiang 332000, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

**Abstract:** The purpose of the present study was to investigate the effects of forkhead box O4 (FOXO4) on the senescence of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). The hUC-MSCs were induced to senescence by natural passage, and FOXO4 expression was inhibited by lentiviral shRNA transfection. The hallmark of cell senescence was analyzed by β-galactosidase staining, and the cell viability was assayed by CCK-8 method. Flow cytometry was used to investigate the apoptosis of hUC-MSCs. The expression levels of Bcl-2, Bax, FOXO4, interleukin 6 (IL-6) and cleaved Caspase-3 were detected by qPCR and Western blot. Immunofluorescence staining was used to detect FOXO4 expression. The amount of IL-6 secreted by hUC-MSCs was detected by ELISA. The results showed that, compared with the passage 1, senescent hUC-MSCs showed up-regulated expression levels of Bax and FOXO4, down-regulated expression levels of Bcl-2 and cleaved Caspase-3, and increased IL-6 mRNA expression and secretion. FOXO4 inhibition in senescent hUC-MSCs promoted cell apoptosis, reduced cell viability, and inhibited the mRNA expression and secretion of IL-6. These results suggest that FOXO4 maintains viability and function of senescent hUC-MSCs by repressing their apoptosis response, thus accelerating senescence of the whole cell colony.

**Key words:** human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; forkhead box O4; cellular senescence; apoptosis

Received 2019-08-25 Accepted 2019-12-25

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81760166).

\*Corresponding author. E-mail: huwenlong1988@126.com

近年来, 人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs) 作为组织工程和再生医学的理想细胞来源, 已经引起了广大研究人员的极大关注<sup>[1]</sup>。实际研究和应用 (如动物体内试验和临床治疗) 均需要数量巨大的正常状态的 hUC-MSCs, 通常需进行大量体外扩增。虽然 hUC-MSCs 是一类具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞, 但其增殖也是有限的, 随着传代的进行, 其表型特征和功能也会逐渐变化, 呈现出增殖活力减弱、基因表达改变和出现衰老相关分泌表型等衰老特征<sup>[2]</sup>。近年来的研究表明, 随着细胞的不断传代, 衰老的间充质干细胞分化能力和免疫调节能力下降, 成为阻碍其临床应用的主要因素<sup>[1]</sup>。

叉头盒 O4 (forkhead box O4, FOXO4) 是哺乳动物转录因子 FOXOs 家族中的一员, 是胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路的靶点和活性氧的调节因子, 与细胞衰老和组织稳态密切相关<sup>[3]</sup>。研究表明, FOXO4 的激活可上调 p21 的转录水平, 并诱导黑色素瘤细胞衰老<sup>[4]</sup>; 相反, FOXO4 的失活则可抑制 p21<sup>cp1</sup> 介导的细胞周期阻滞和衰老, 最终造成黑色素瘤形成<sup>[5]</sup>。Baar 等<sup>[6]</sup> 研究显示, FOXO4 在衰老成纤维细胞中高表达, 并能通过抑制凋亡反应来维持衰老细胞的活性。然而, FOXO4 在 hUC-MSCs 衰老过程中发挥的作用尚不清楚。为了探讨该问题, 本研究检测了 FOXO4 在衰老 hUC-MSCs 中表达的变化及抑制 FOXO4 表达后 hUC-MSCs 衰老和凋亡情况的变化, 以期延缓 hUC-MSCs 衰老并恢复其活力提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞和试剂** 脐带标本取自九江学院附属医院, 产妇及胎儿均身体健康, 营养状况良好。研究方案经医院伦理委员会批准, 产妇及家属对本研究均知情同意。hUC-MSCs 完全培养基购自赛业生物科技有限公司; 兔抗人 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、FOXO4 和 GAPDH 抗体购自 Abcam 公司; 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; CCK-8 试剂盒和  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒购自 Solarbio 科技有限公司; Super 总 RNA 提取试剂盒、Go Script 逆转录试剂盒、Go Taq qPCR Master Mix 购自 Promega 公司; 白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 慢病毒

shRNA FOXO4 干扰载体购自上海吉凯公司; 成骨诱导培养液、成脂诱导培养液、茜素红染色液、油红 O 染色液购自广州赛业生物科技有限公司。

**1.2 hUC-MSCs 原代培养、传代及鉴定** 取脐带标本, 去除脐动、静脉及羊膜, 将剩余胶冻状物质 (华通氏胶) 剪碎成  $1\text{ mm}^3$  大小组织块, 接种于塑料培养皿内, 以 hUC-MSCs 完全培养基培养, 待细胞融合度达 90% 时接种于  $25\text{ cm}^2$  塑料培养瓶内, 每 3 天换液 1 次, 当细胞融合度达 80%, 胰蛋白酶常规消化, 按 1:3 比例传代, 直至细胞停止增殖。取第 5 代细胞重悬后进行鉴定, 细胞高表达 CD29、CD90 和 CD105, CD19 表达阴性, 表明 hUC-MSCs 原代分离培养成功<sup>[7]</sup>。取第 5 代 hUC-MSCs 按  $3 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度接种于 6 孔板内, 每孔加入 2 mL hUC-MSCs 成骨/成脂分化诱导培养基, 对照组细胞以原培养基继续培养, 连续诱导 14 d, 漂洗、固定后每孔加入 1 mL 茜素红染色液浸染 5 min 或油红 O 染色液浸染 30 min, 于倒置相差显微镜下观察细胞着色情况并拍照。

**1.3 FOXO4 shRNA 慢病毒感染** 将第一代 (P1) 和 P10 hUC-MSCs 接种到 6 孔板上, 待细胞融合度达 40% 时, 添加慢病毒稀释液 (感染复数 = 10), 12 h 后更换新鲜培养基继续培养 72 h。观察绿色荧光表达情况, 嘌呤霉素筛选稳定感染的细胞系, 把稳定感染阴性对照慢病毒和 FOXO4 shRNA 慢病毒的细胞分别记为 shNC 和 shFOXO4 组。

**1.4 衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶活性染色** 将待染色的各代次或各组 hUC-MSCs 接种于 6 孔板内, 每组各设 3 孔。按照  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书依次进行固定、漂洗、染色、孵育等步骤, 显微镜下观察细胞染色情况, 细胞中出现蓝色沉淀即为阳性, 随机选取视野进行计数, 衰老率 (%) = 阳性细胞 / 总细胞  $\times 100\%$ 。

**1.5 CCK-8 检测细胞活力** 取对数生长期 hUC-MSCs, 按  $1 \times 10^4$  / 孔接种于 96 孔培养板, 各组均设置 4 个复孔和 1 个药物空白孔。分别于培养 24、48、72、96、120 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后酶标仪测定其 450 nm 处吸光度值 ( $A$ ), 绘制生长曲线, 计算细胞活力, 细胞活力 (%) =  $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**1.6 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测** 将待测的 hUC-MSCs 按  $5 \times 10^5$  / 孔接种于培养瓶内, 待细胞完全贴壁后,

PBS 漂洗 1 遍, 加入 3 mL 无血清培养基培养 24 h, 收集培养基, 按照 ELISA 检测试剂盒使用说明书检测 IL-6 浓度。

**1.7 流式细胞术检测细胞凋亡** 调整各组细胞密度为  $1 \times 10^9$  /L, 取 1 mL 细胞悬液用预冷 PBS 洗涤 2 遍, 先后加入 200  $\mu$ L binding buffer、10  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 10  $\mu$ L PI, 室温下避光反应 15 min 后加入 300  $\mu$ L binding buffer, 流式细胞仪定量检测细胞凋亡率。

**1.8 qPCR 检测 mRNA 表达水平** 按 Super 总 RNA 提取试剂盒、Go Script 逆转录试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 按 Go Taq qPCR Master Mix 配制反应体系 (10  $\mu$ L 2  $\times$  Master Mix、1  $\mu$ L 上游引物、1  $\mu$ L 下游引物、2  $\mu$ L cDNA)。各基因的引物序列见表 1。PCR 扩增反应条件如下: 94  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环, 根据扩增曲线, 以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对目标基因 mRNA 表达水平进行相对定量。

**1.9 Western blot 检测蛋白表达水平** 待细胞生长融合度达 90% 时提取各组细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜、封闭, 4  $^{\circ}$ C 一抗 (抗 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、FOXO4 抗体稀释比例均为 1:500, 抗 GAPDH 抗体的稀释比例为 1:5 000) 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后室温下用二抗 (HRP 羊抗兔二抗稀释比例为 1:5 000) 孵育。用化学发光成像系统 (ChemiDOC™ Touch Imaging System, 美国 BIO-RAD 公司) 分析蛋白条带, 以 GAPDH 为内参蛋白, 计算各目标蛋白的相对表达量。

**1.10 免疫荧光染色** 用 4% 多聚甲醛固定细胞,

0.2% Triton X-100 破膜, 滴加 100  $\mu$ L 稀释后的抗 FOXO4 抗体 (1:100), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 甩干后二抗 (1:1 000) 室温孵育 30 min, 用 DAPI 进行细胞核染色, 荧光显微镜观察染色细胞。

**1.11 统计学处理** 以上所有实验均至少重复 3 次, 所有数据均采用 mean  $\pm$  SD 表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理, 多组间比较采用单因素方差分析, 并通过 Scheffe 法进行两两比较,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hUC-MSCs 分离培养及诱导分化

普通光学显微镜观察结果显示, hUC-MSCs 呈长梭形或纺锤形, 排列紧密, 呈鱼群样或旋涡状分布, 未见杂细胞生长 (图 1A、C)。对第 5 代 hUC-MSCs 进行成骨、成脂诱导 14 d 后, 分别用茜素红和油红 O 染色, 成骨分化细胞可见大量红色钙化基质 (图 1B), 成脂分化细胞内有红色脂滴形成 (图 1D), 表明 hUC-MSCs 具有多向分化潜能。

### 2.2 hUC-MSCs 的衰老表型鉴定和凋亡相关蛋白表达变化

随着自然传代的进行, 细胞及细胞核体积逐渐增大, 排列紊乱, 培养基细胞碎片及杂质增多 (图 2A), 传代周期延长, 传至第 25 代, 细胞基本停止增殖。衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶活性染色结果显示, 随着代次的增加, 细胞衰老率明显增加, 其中 P1 细胞衰老率为  $(4.43 \pm 2.19)\%$ , P10 和 P20 细胞衰老率为  $(29.85 \pm 3.10)\%$  和  $(72.28 \pm 3.83)\%$ , 各代间差异有统计学意义 ( $P < 0.0001$ ) (图 2B)。

qPCR 及 Western blot 结果显示, 随着细胞代次的增加, 抗凋亡基因 Bcl-2 表达水平显著下调, 促

表1. 引物序列和产物大小

Table 1. Sequence of primers and product length

Genes	Sequence of primers	Product length (bp)
Bcl-2	Forward: 5'-GCGGTCAAATGGGTGAATTC-3' Reverse: 5'-TGTCTTCTGTTCGCCTGGTA-3'	205
Bax	Forward: 5'-TGCTTGAGTCTGGGAGTTCA-3' Reverse: 5'-CT-CACTGTGTTGCCAGG-3'	200
FOXO4	Forward: 5'-CCAGAGAATAAGAAGTCAGCCACAGAG-3' Reverse: 5'-CTCCACCTCGGACGGTTCGG-3'	147
IL-6	Forward: 5'-AGTC-CGGAGAGGAGACTTCA-3' Reverse: 5'-ATTTT-CACGATTTCCAGAG-3'	108
GAPDH	Forward: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' Reverse: 5'-TGGTGAATACGCCAGTGGA-3'	138



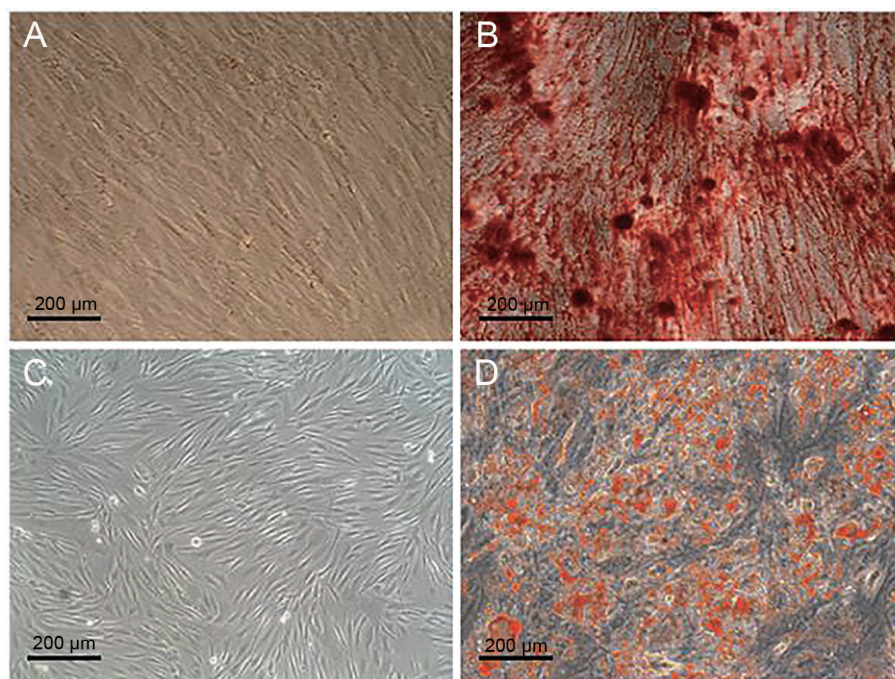


图 1. 人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)多向分化潜能

Fig. 1. Multilineage differentiation potential of hUC-MSCs. A, B: Osteogenic differentiation of the hUC-MSCs treated with complete medium (A) or osteogenic induction medium (B) identified by alizarin red staining. C, D: Adipogenic differentiation of the hUC-MSCs treated with complete medium (C) or adipogenesis induction medium (D) identified by oil red O staining. Scale bar, 200  $\mu$ m.

凋亡基因 Bax 表达水平显著上调, FOXO 表达水平明显上调 (图 2C、D)。Western blot 结果显示, 随着细胞代次的增加, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著下调 (图 2D)。

### 2.3 FOXO4调控hUC-MSCs衰老-凋亡平衡

相比 P1 细胞, 衰老细胞 (P10) FOXO4 表达水平显著上调 (图 3A、B), 使用慢病毒抑制 FOXO4 表达后, FOXO4 的 mRNA 和蛋白表达均明显受抑 (图 3A、B)。

衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶活性染色结果显示, 和 sh-NC 组 P10 细胞相比, sh-FOXO4 组 P10 细胞衰老率明显下降 ( $P < 0.05$ ) (图 3C)。流式细胞术结果显示, P1 细胞的凋亡率为  $(12.20 \pm 1.41)\%$ , 而 P10 细胞凋亡率为  $(13.50 \pm 1.11)\%$ , 两者间无显著差异, 用 shRNA 抑制 FOXO4 表达后 P10 细胞凋亡率显著提高 ( $P < 0.05$ ) (图 3D)。Western blot 结果显示, 和 sh-NC 组 P10 细胞相比, sh-FOXO4 组 P10 细胞 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著上调 (图 3E)。

CCK-8 结果显示, 相比正常细胞 (P1), 衰老细胞 (P10) 在第 48、72、96、120 h 活力分别为 20.1%、29.3%、53.8%、89.5%, 活力明显减弱 (均  $P < 0.05$ )。

抑制 FOXO4 后衰老细胞在前期 ( $< 72$  h) 细胞活力明显下降 (第 24、48、72 h 分别为 6.3%、7.0%、19.7%), 后期却明显提高, 第 120 h 细胞活力为 129.3%, 显著高于 sh-NC 组 P10 细胞 ( $P < 0.05$ ) (图 3F)。

与 P1 细胞相比, P10 细胞 IL-6 mRNA 表达水平显著上调, 分泌量明显增多 ( $P < 0.05$ ), 而用 shRNA 抑制 FOXO4 表达后 IL-6 mRNA 水平显著下调, 分泌量也显著减少 ( $P < 0.05$ ) (图 3G、H)。

## 3 讨论

体外培养的 hUC-MSCs 往往达不到扩增要求就进入衰老状态, 出现增殖能力下降和干性丢失, 而不能满足应用所需。因此, 阐明衰老相关的分子机制, 延缓 hUC-MSCs 衰老的进程具有重要意义。细胞衰老是指细胞周期的永久性停滞, 表现为持续的增殖抑制, 细胞形态和功能改变, 并出现明显的促炎症性衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP), 其特征是 IL-6 和 IL-8 等炎症因子分泌增加<sup>[8]</sup>。本研究通过组织块贴壁法获取了大量高纯度的 hUC-MSCs, 我们前期已对该细胞进行分化能力和表面标记物鉴定, 均符合 MSC



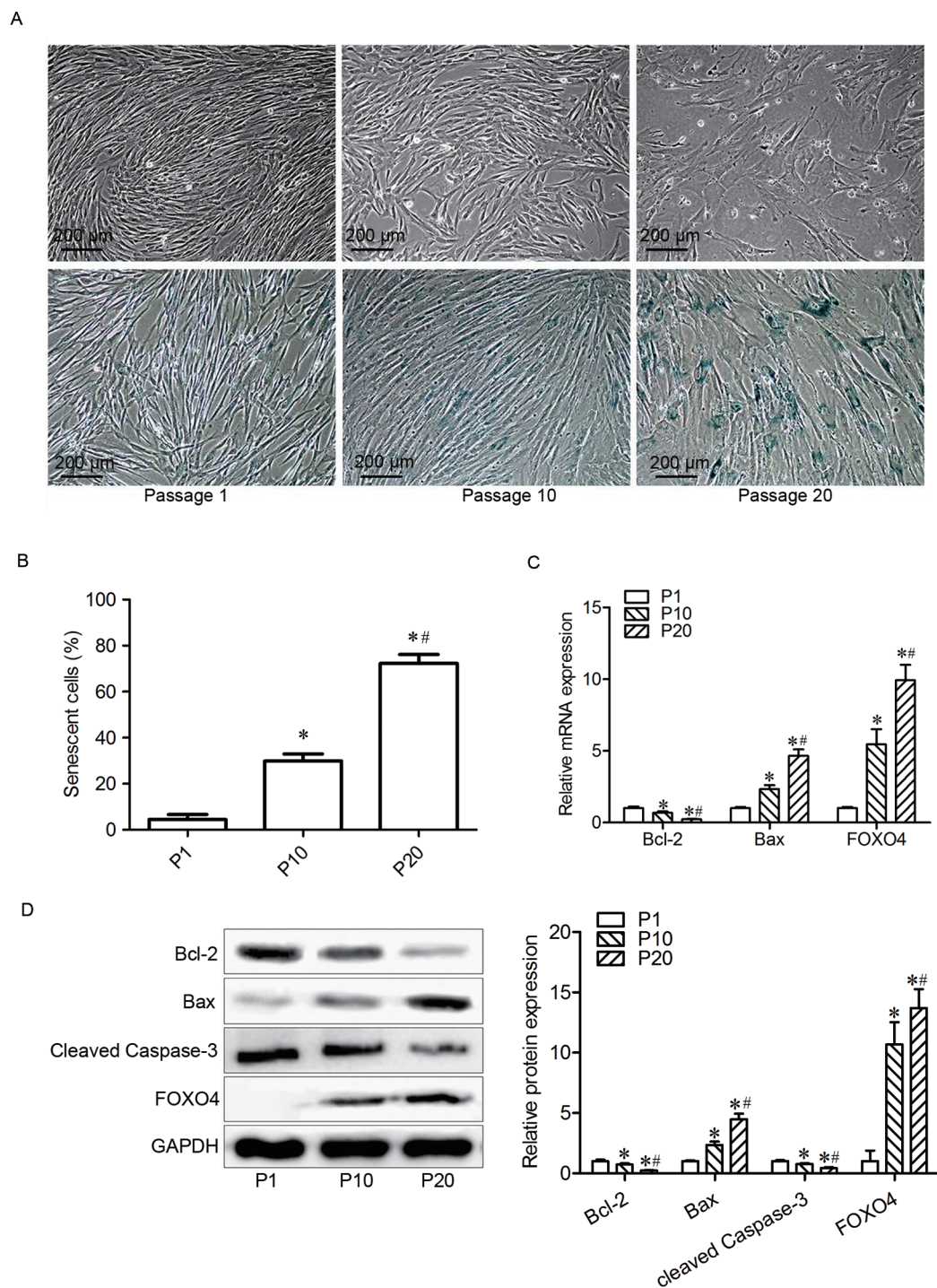


图 2. 衰老hUC-MSCs凋亡受阻

Fig. 2. Apoptosis of senescent hUC-MSCs was restrained. *A*: Morphology observation (upper) and senescence-associated  $\beta$ -galactosidase staining (below). Scale bar, 200  $\mu$ m. *B*: Senescent hUC-MSCs counting. *C*: The mRNA expression levels of Bcl-2, Bax and FOXO4 detected by qPCR. *D*: The protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3 and FOXO4 detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs P1, # $P < 0.05$  vs P10.

鉴定标准<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, 经过体外扩增后, P10 细胞即出现约 30% 的衰老率, IL-6 的分泌量也明显增加, 表明细胞进入衰老状态。

持续存在的 SASP 能够改变细胞周围环境, 加速细胞衰老<sup>[9]</sup>, 而衰老细胞是 SASP 的来源。因此, 清除衰老细胞可能是延缓 hUC-MSCs 衰老的有效手

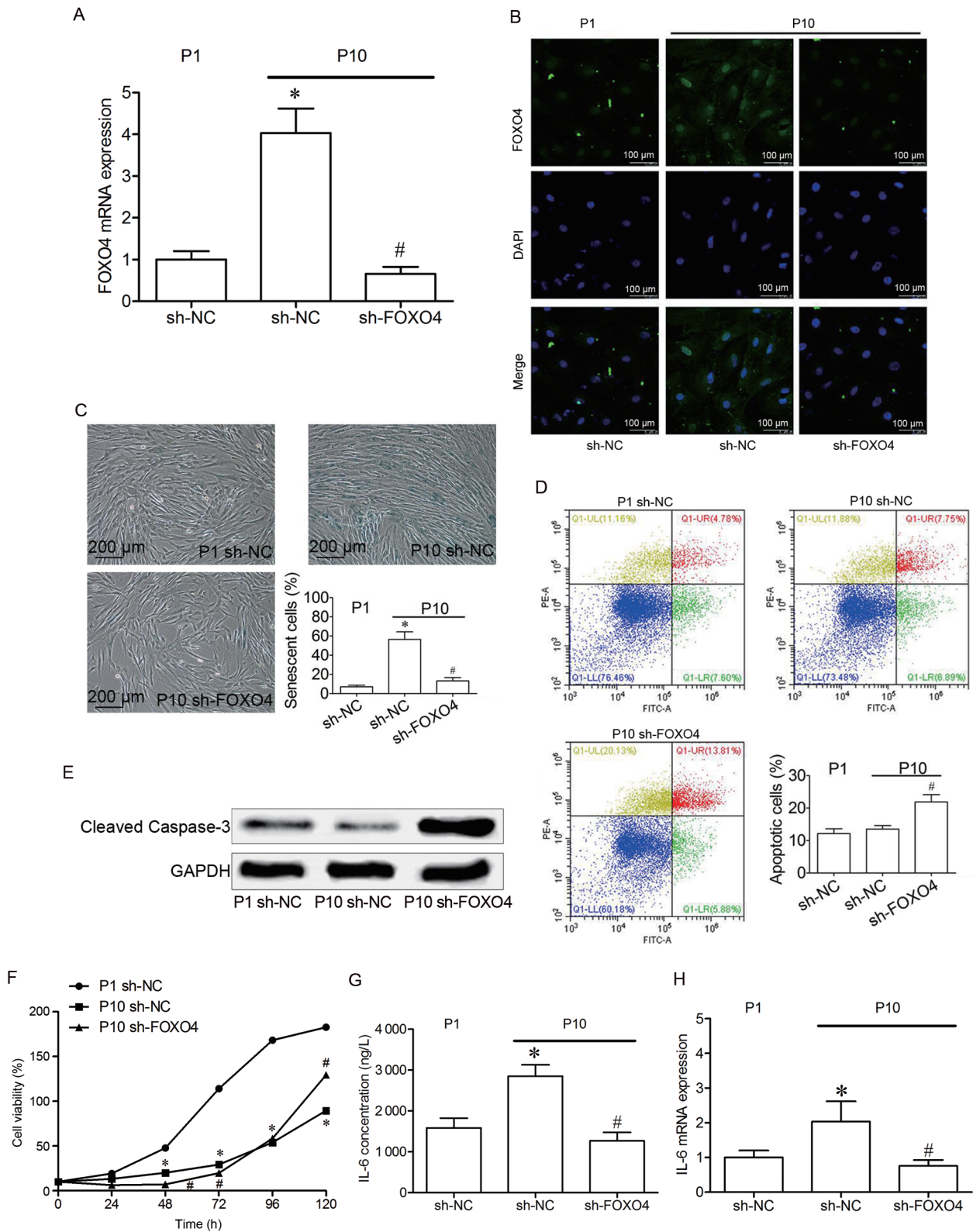


图 3. FOXO4通过抑制凋亡维持衰老hUC-MSCs活力和功能

Fig. 3. FOXO4 maintains viability and function of senescent hUC-MSCs by repressing apoptosis. *A*: FOXO4 mRNA expression level detected by qPCR. *B*: FOXO4 protein expression detected by immunofluorescence staining. Scale bar, 100 μm. *C*: Senescence of hUC-MSCs detected by β-galactosidase staining. Scale bar, 200 μm. *D*: Apoptosis of senescent hUC-MSCs detected by flow cytometry. *E*: Protein expression level of cleaved Caspase-3 detected by Western blot. *F*: Cell viability assayed by CCK-8. *G*: Secretion of IL-6 detected by ELISA. *H*: IL-6 mRNA expression detected by qPCR. Mean ± SD, *n* = 5. \**P* < 0.05 vs P1 sh-NC; #*P* < 0.05 vs P10 sh-NC.

段。细胞凋亡是为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主、有序的细胞清除方式。然而，通常情况下衰老细胞具有抗凋亡能力<sup>[10]</sup>，本研究结果也显示，衰老 hUC-MSCs 的凋亡执行蛋白 cleaved Caspase-3 表达水平下调。值得注意的是，衰老 hUC-MSCs 抗凋亡基因 Bcl-2 表达却下调，同时促凋亡基因 Bax 表达上调。这表明衰老 hUC-MSCs 的凋亡程序已经启动，但执行受阻，而这种阻碍可能与某种凋亡转录调控因子有关。Baar 等<sup>[6]</sup> 研究表明 FOXO4 能通过结合 P53 抑制其介导的凋亡来维持衰老细胞活力，在细胞衰老和凋亡过程中发挥关键作用。本研究结果显示，FOXO4 在正常细胞极低表达，而在衰老细胞中却明显上调，表明 FOXO4 可能是促使并维持 hUC-MSCs 衰老、阻碍其凋亡的关键转录因子。

为了阐明 FOXO4 能否影响细胞衰老和凋亡的平衡，本研究采用慢病毒抑制了 FOXO4 的表达，结果显示，FOXO4 受到抑制后，P10 hUC-MSCs 的衰老率明显降低，这可能是衰老细胞发生凋亡而被清除所致。进一步的研究也证实抑制 FOXO4 后衰老细胞的凋亡率明显增加，cleaved Caspase-3 表达水平也同步上调。这表明 FOXO4 能够抑制衰老 hUC-MSCs 凋亡。细胞活力检测结果显示，抑制 FOXO4 后 P10 细胞活力呈现先下降再升高的趋势，可能与前期衰老细胞凋亡数量减少，后期剩余正常细胞活力恢复有关；抑制 FOXO4 的表达可明显减少衰老 hUC-MSCs 分泌 IL-6 的量，表明 FOXO4 能维持衰老 hUC-MSCs 的活力和功能。

综上，本研究表明 FOXO4 能通过抑制凋亡来维持衰老 hUC-MSCs 活力和功能，加速整个细胞集落衰老。靶向抑制 FOXO4 的表达可有效延缓 hUC-MSCs 的衰老，为 hUC-MSCs 的体外抗衰老提供了理论依据，将大大助力组织工程和再生医学的发展。

### 参考文献

1 Turinetti V, Vitale E, Giachino C. Senescence in human

- mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int J Mol Sci* 2016; 17(7): 1164.
- 2 Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H, Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med* 2017; 39(4): 775–782.
- 3 Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* 2016; 15(2): 196–207.
- 4 de Keizer PL, Packer LM, Szybowska AA, Riedl-Polderman PE, van den Broek NJ, de Bruin A, Dansen TB, Marais R, Brenkman AB, Burgering BM. Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res* 2010; 70(21): 8526–8536.
- 5 Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. *BRAF<sup>V600E</sup>* cooperates with *Pten* loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009; 41(5): 544–552.
- 6 Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I, Essers J, van Cappellen WA, van IJcken WF, Houtsmuller AB, Pothof J, de Bruin RWF, Madl T, Hoeijmakers JHJ, Campisi J, de Keizer PLJ. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell* 2017; 169(1): 132–147.
- 7 Hu WL (胡文龙), Wu PP, Geng SG, Wang JY, Yin M. hUC-MSCs promote proliferation and migration of osteosarcoma cells by secreting IL-6. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2016; 32(2): 201–207 (in Chinese with English abstract).
- 8 Byun HO, Lee YK, Kim JM, Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep* 2015; 48(10): 549–558.
- 9 de Keizer PL. The fountain of youth by targeting senescent cells? *Trends Mol Med* 2017; 23(1): 6–17.
- 10 Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 2014; 15(11): 1139–1153.