

TNF- α 诱导血管内皮细胞的衰老

周建军^{①②} 高云飞^③ 王宏芳^② 陈 隼^② 吴才宏^{①*} 丰美福^{②*}

(①北京大学生命科学学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871; ②中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080; ③北京大学生命科学学院细胞生物学与遗传学系, 北京 100871. * 联系人, E-mail: wuch@pku.edu.cn, fengmf@panda.ioz.ac.cn)

摘要 TNF- α 是极为重要的促炎性细胞因子, 在调节细胞免疫反应中起着多种生理和病理作用. TNF- α 能激活血管内皮细胞, 继而表达多种细胞因子和黏附分子引发一系列的炎性白细胞浸润和炎症反应. 研究发现 TNF- α 炎性刺激除了能引起内皮细胞死亡外, 还能诱导内皮细胞的衰老. TNF- α 处理的血管内皮细胞衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色反应显示阳性, 细胞周期停滞在 G0~G1 期; 内皮细胞中线粒体膜电位早期上升, 衰老时则降低, 表征早期细胞线粒体功能亢进, 而后期功能衰退; 活性氧水平早期有上升和下降的振荡, 诱导衰老后有所降低. 结果表明线粒体的功能变化与 TNF- α 诱导的内皮细胞衰老有关.

关键词 TNF- α 内皮细胞 炎症反应 衰老

衰老是多细胞生物体机能退行性改变的过程^[1], 细胞的衰老决定了整个生物体的最终老化并造成一系列的功能丧失和疾病. 细胞衰老有其遗传基础, 如染色体端粒的缩短和线粒体 DNA 突变可能与细胞衰老有直接关系^[2]. 有很多证据表明, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)可能是细胞衰老的重要原因之一, 引起细胞衰老的分子机理和信号途径则不甚明晰^[3].

α 肿瘤坏死因子^[4](tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一个多功能细胞因子. 它能诱导多种细胞增殖或凋亡, 在体内主要由免疫系统的 T 细胞和活化的巨噬细胞产生^[5]. TNF- α 以三聚体^[6]的方式作用于细胞表面的 TNF- α 受体(TNFR 1 和 TNFR 2), 其中 TNFR 1 与 Fas 和 wsl-1/DR3 共同属于胞浆区的羧基端拥有死亡结构域的一类受体蛋白家族, 而 TNFR 2 还所知不多^[5]. TNF- α 与受体结合后, 能激活细胞内多种信号传递途径, 其中包括引发神经酰胺和 ROS 的产生, 这两者均与细胞的衰老有密切的关系^[7,8].

血管内皮细胞位于心血管壁的内衬, 在受刺激活化时也能正反馈性合成和释放 TNF- α , 参与炎症反应过程. 作为 TNF- α 重要的靶细胞, 血管内皮细胞受激后产生的形态学和生理学变化非常引人关注, 它常常通过迅速合成和释放 IL-8 与 MCP-1 等促炎性细胞因子, 表达 E-选择素等黏附分子, 募集淋巴细胞和单核细胞等免疫活性细胞群的浸润, 强化内皮细胞的功能, 介导受激部位多种炎症效应^[9~11]. 其中,

炎症过程中产生的 ROS 也是重要的对抗侵袭物的介质^[5]. 另外 TNF- α 刺激内皮细胞还会导致后者变得促进凝血^[12], 在血管生理学和医学研究上有着深刻的意义.

我们研究了 TNF- α 作为炎性刺激分子对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的慢性生物学作用, 发现 TNF- α 不仅诱导血管内皮细胞的凋亡, 还能诱导 HUVECs 衰老.

1 材料和方法

(i) 内皮细胞的分离培养和鉴定. 原代细胞分离自 24 h 内新生儿脐带, 静脉内皮细胞经由 IV 型胶原酶(Gibco, USA)消化而获得^[13]; 细胞用 M199 (Gibco, USA)培养, 并补充 20% 胎牛血清(Hyclone, USA), 60 μ g/mL ECGF (Roche, Germany), 0.03% L-Glutamine, 0.6% Hepes, 0.2% NaHCO₃, pH 7.2, 10⁻⁵ mol/L Thymidine (Sigma, USA), 肝素钠 100 μ g/mL. 每 3 d 换液. 实验用细胞均为 5 代以内. 细胞通过光学显微镜下形态学观察和细胞内特异性表达的 vWF (von willebrand factor)间接免疫荧光标记流式分析来鉴定. 培养细胞经胰酶消化, 1000 $\times g$ 离心, 用 PBS + 1%牛血清洗沉淀 1 次, 收集的细胞(弹散以防止细胞结块)用丙酮于 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min, 然后用 PBS + 1%牛血清洗 2 次, PBS 重悬细胞, 加入兔抗人 vWF 一抗 (Zymed, USA), 混匀后 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS + 1%牛血清洗 1 次后 PBS 重悬, 加入 FITC 标记的羊抗兔二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS + 1%牛血清洗涤后再重悬细胞沉淀,

调整细胞浓度到 1×10^6 个/mL, 流式细胞仪分析^[14](激发光波长 488 nm, 发射光波长 530 nm).

(ii) TNF- α 对内皮细胞的刺激和衰老细胞的鉴定. 在长成单层的 HUVECs 培养体系中加入终浓度 20 ng/mL 的 TNF- α (R&D System, USA)进行持续性刺激, 其间换液如常, 补充相应浓度的 TNF- α . 所有的处理细胞及平行对照细胞均在同一时间收获分析. 对衰老细胞的鉴定依据 Serrano 等人^[15]和 Dimri 等人^[16]提出的方法. 用 PBS (pH 7.2)洗单层细胞 1 次, 再以 PBS(pH 7.2)配置的 0.5%的戊二醛固定 5 min, 然后用 PBS (pH 7.2, 含 1 mmol/L 的 $MgCl_2$)洗 1 次; 在新鲜配置的 X-gal (Roche, Germany)染液(1 mg/mL X-gal 于 PBS 中, pH 6.0, 0.12 mmol/L $K_3Fe[CN]_6$, 0.12 mmol/L $K_4Fe[CN]_6$, 1 mmol/L $MgCl_2$)中染色, 37℃孵育过夜.

(iii) 细胞周期分析. 消化收获细胞, $1000 \times g$ 离心弃上清液, 用无钙镁的 PBS 洗 2 次, 重悬于 500 μ L 的 PBS 中, 缓慢加入 5 mL 冷乙醇, 4℃固定过夜; 取 5×10^6 细胞, $1000 \times g$ 离心弃乙醇, 用 5 mL 的 PBS + 1%牛血清洗 2 次; 加入 100 μ L 的 $10 \times$ PI 溶液(用 3.8×10^{-2} mol/L 柠檬酸钠溶液配制成 500 μ g/mL PI, pH 7.0); 加入 100 μ L RNase A (10 mg/mL 用 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 配制, 煮沸 15 min), 37℃孵育 30 min; 流式分析(激发光波长 488 nm, 发射光波长 570 nm), 细胞流速不超过 60 个/min; 数据用 BD 公司提供的 Moldifit 2.0 分析^[14].

(iv) 线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 分析. 细胞用无 EDTA 的 0.25%胰酶消化, 用无血清培养基(pH 7.2)洗 2 次; 重悬于含钙的 Hanks 液中, 调整至 4×10^5 细胞/mL; 加 2 μ L 线粒体膜电位特异染料 DiOC₆(3) (Molecular Probes, USA, 用 DMSO 配成 2 μ mol/L 的储液)到 0.4 mL 细胞悬液中至终浓度 10 nmol/L; 37℃孵育 5 min, 用流式细胞仪(激发光波长 488 nm, 发射光波长 530 nm)分析.

(v) 细胞内 ROS 的流式测定. 同上消化收获细胞; 加 0.4 μ L 的 0.5 mmol/L 的 CM-H₂DCFDA (Molecular Probes, USA, 用甲醇配成 0.5 mmol/L 的储液)到 0.4 mL (3×10^5 细胞/mL)细胞悬液中至终浓度 0.5 nmol/L, 37℃孵育 5~10 min; 在流式检测前 3 min 加入 PI(终浓度 10 μ g/mL), 流式检测(激发光波长 488 nm, 发射光波长 535 nm); 取 PI 阴性的细胞群圈门做分析.

(vi) 流式细胞术. 鞘液用经过过滤的生理盐水. 每个样品取 10000 ~ 15000 个细胞的事件信号做分析. 操作按流式细胞仪(FACSCalibur, BD, USA)使用规程进行, 采样控制 and 数据分析用 BD 公司提供的软件 CellQuest Versions 3.0 进行.

(vii) 数据处理和统计分析. 流式分析所得的原始荧光强度值经扣除背景后, 与平行对照组比对进行归一化, 使用 Excel (Microsoft, USA)作图表; 使用统计分析软件 gpiis Version 1.12 (GraphPAD Software, USA)对样本之间的差异进行 *t* 检验.

2 结果

2.1 HUVECs 的培养和鉴定

内皮细胞的培养需要添加内皮细胞生长因子以便于体外有丝分裂, 肝素的添加有利于各种生长因子的摄取. 细胞一般培养 5~7 d, 然后以 1:3 传代. 一般情况下内皮细胞在体外培养 10 代后形态开始自行变异, 功能衰退, 因此所有实验均用 5 代以内的细胞. 内皮细胞形态呈铺路石状, 其胞浆中表达起凝血作用的 vWF, 以此指标作为鉴定内皮细胞纯度的分子标志, 以区别原代分离培养时可能混入的成纤维细胞. 流式分析表明绝大多数实验细胞(92.56%)为内皮细胞来源(图 1).

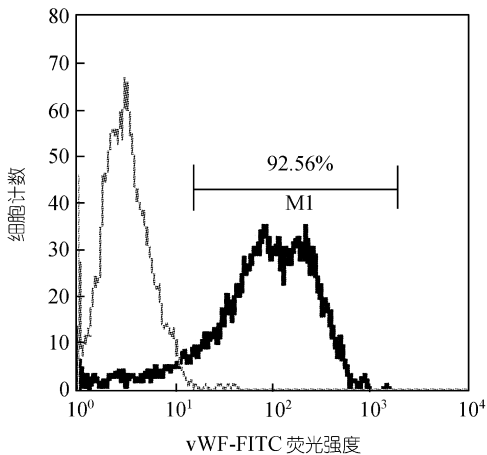


图 1 HUVECs 的培养和鉴定
FITC间接标记的抗人vWF染色的HUVECs流式鉴定荧光强度组方图, 左峰代表阴性对照, 右峰代表荧光标记的细胞, 统计表明在绝大多数细胞内(92.56%)有人vWF表达. M1示vWF-FITC阳性细胞数

2.2 TNF- α 诱导 HUVECs 细胞衰老

细胞内 β -半乳糖苷酶活性是一个简便而又非常

特征性的衰老检测指标. 我们的实验表明, TNF- α 的 15 d 以上持续刺激能够诱导光学显微镜下可观察到的 85% 的 HUVECs 出现 β -半乳糖苷酶染色阳性(图版 I, 附本刊后), 表明 HUVECs 进入衰老.

2.3 细胞周期分析

我们进一步研究了 HUVECs 在 TNF- α 的持续刺激下细胞周期的变化. 发现 HUVECs 生长逐渐趋于停顿, 分裂相少见. 流式细胞术通过分析细胞 DNA 含量来判断细胞周期(图 2), 结果表明, TNF- α 诱导衰老的 HUVECs G0~G1 期细胞占 80.19%, G2~M 期细胞占 11.18%, S 期细胞占 8.63%(分析细胞数为 4908); 而平行对照 HUVECs G0~G1 期细胞占 59.30%, G2~M 期细胞占 15.95%, S 期细胞占 24.71%(分析细胞数为 5595). 可见 TNF- α 诱导 HUVECs 衰老时, 细胞周期向 G0~G1 停滞, S 期趋于消失.

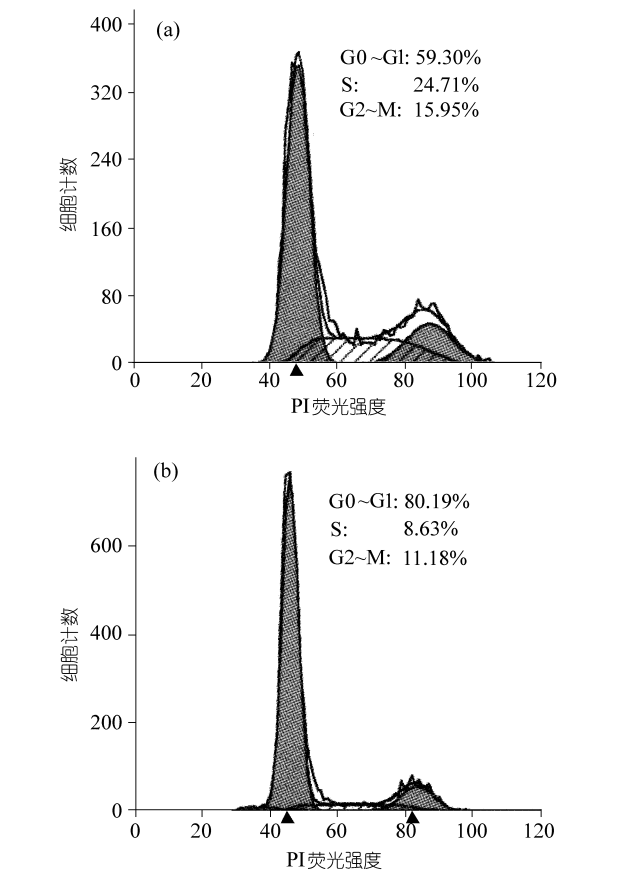


图 2 HUVECs 经 TNF- α 诱导衰老的细胞周期分析 (a) 未诱导的平行对照 HUVECs, 左侧峰为二倍体峰对应于 G0~G1 期, 右侧为四倍体峰, 对应于 G2~M 期, 中间为 S 期; (b) 衰老细胞, 显示比(a)有更多的细胞滞留在 G0~G1 期, 同时 S 期细胞近于消失

2.4 细胞内 $\Delta\Psi_m$ 分析

研究了经 TNF- α 处理的 HUVECs 细胞内 $\Delta\Psi_m$ 的变化, 我们利用 $\Delta\Psi_m$ 特异荧光染料 DIOC₆(3) 来测定 $\Delta\Psi_m$ 的变化, 荧光的平均强度可以表征 $\Delta\Psi_m$ 的大小. TNF- α 诱导衰老的 HUVECs 的 DIOC₆(3) 荧光强度相对值为 0.79, 与作为基准的平行对照 HUVECs 相比, *t* 检验有显著性差异. 可见在 TNF- α 的诱导下, 0.5 h 活化的 HUVECs 的 $\Delta\Psi_m$ 即快速升高, 诱导衰老后则有所下降(图 3).

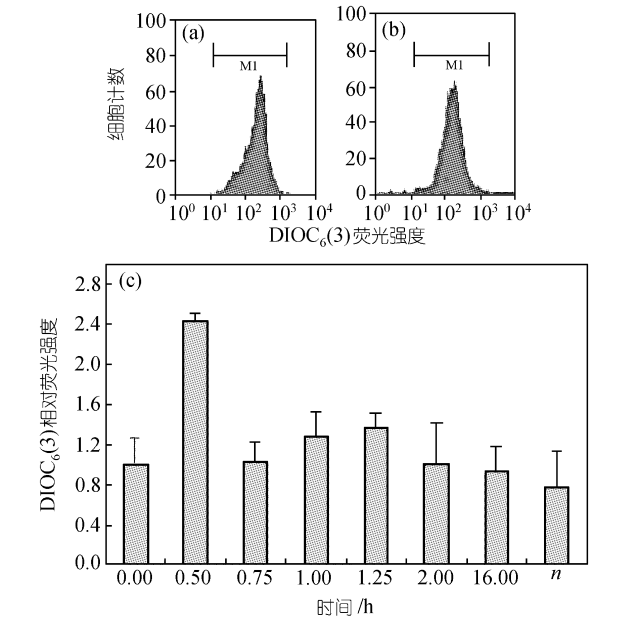


图 3 内皮细胞内 $\Delta\Psi_m$ 分析 (a)和(b)分别示平行对照和经 TNF- α 诱导衰老的 HUVECs 被 DIOC₆(3) 染色的荧光强度/细胞计数组方图; (c) TNF- α 刺激不同时间点细胞内 $\Delta\Psi_m$ 柱型图, *n* 指诱导衰老的时间点. 荧光强度数据为 3 次试验的平均, 经归一化处理. *P* < 0.0001, 有显著性差异. M1 同图 1 注

2.5 细胞内 ROS 的流式测定

我们发现经 TNF- α 诱导衰老的 HUVECs 的细胞内 ROS 水平反而比对照细胞低, 进而探讨了 TNF- α 对 HUVECs 短时间内刺激下的 ROS 水平的变化, 发现 TNF- α 在刺激 HUVECs 后, ROS 水平有上升和下降的变化(图 4). 人成纤维细胞的实验也呈现这样的趋势(数据未显示), 可能对 TNF- α 的响应有相似的特征.

3 讨论

TNF- α 与内皮细胞凋亡的关系一直受到人们广泛的关注. 值得注意的是, TNF- α 并不总是导致细胞

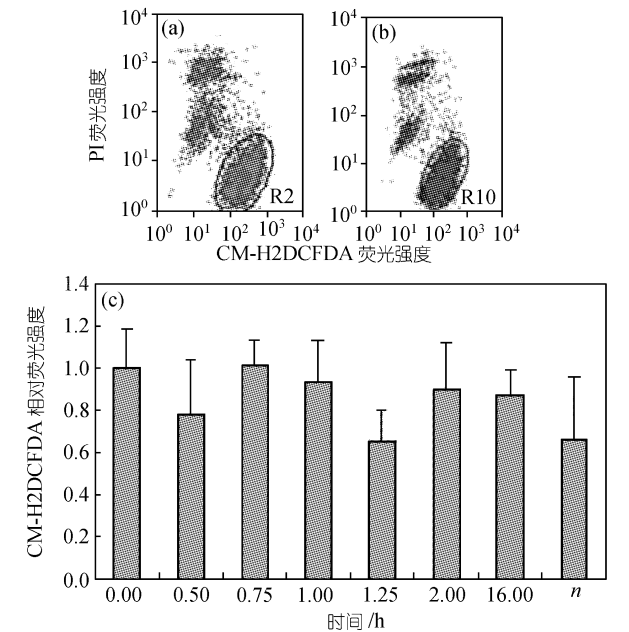


图 4 细胞内 ROS 水平变化分析
(a)和(b)分别示平行对照和经 TNF- α 诱导衰老的 HUVECs 的 PI 与 CM-H2DCFDA 双染散点图; (c) 根据流式分析的结果绘制的 TNF- α 诱导 HUVECs 不同时间细胞内 ROS 水平的时间变化柱型图, 显示在 TNF- α 加入培养体系后 ROS 在短暂的时间内有振荡反应, n 指诱导衰老的时间点. 长时间持续刺激的细胞 ROS 显示较低的荧光染色强度. 荧光强度数据为 3 次试验的平均, 经归一化处理. $P<0.0001$, 有显著性差异. R2 和 R10 示 PI 阴性的细胞群

凋亡. 在特定情况下, TNF- α 诱导细胞增殖^[5]. 而我们的研究发现, TNF- α 处理年轻的 HUVECs 15 d 以上时, 多数细胞出现凋亡, 细胞脱落, 但有部分细胞处在贴瓶状态, 细胞伸展不规则, 胀大, 有些细胞能观察到双核, 衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色 85%阳性, 大多数细胞周期停滞在 G0 ~ G1 期, 即 TNF- α 的持续性刺激能引起 HUVECs 的衰老.

一系列试验表明细胞衰老时表现出遗传、生化和线粒体功能退变^[17]. 线粒体是产生 ATP 提供代谢能量的细胞器, 同时作为钙库调节细胞内的钙稳态. 细胞衰老时线粒体功能的衰退, 表现为 ATP 产生不足, 氧化磷酸化的解偶联, 代谢活动的低下. 另外这时抗自由基损伤的能力也下降, 使得线粒体对于氧化损伤更加易感^[18]. 细胞内 $\Delta\Psi_m$ 来自于质子电化学梯度, 是反映细胞线粒体功能的重要指标. $\Delta\Psi_m$ 反映了两种力量的平衡, 一方面是葡萄糖、乳糖和丙酮酸等内源性底物氧化造就了质子电化学梯度, 另一方面质子的泄漏和磷酸化是其消耗性因素. 其中磷酸化伴随着 ATP 的合成^[19], 而质子的泄漏反映了质子外泵能

力的降低, 线粒体内钙离子的增加, PTP(permeability transition pore)通透性的持续增强, 线粒体内膜内氢离子的内流, 用于产热^[20]. 因此 $\Delta\Psi_m$ 的维持和平衡对于线粒体的正常功能非常重要. $\Delta\Psi_m$ 的降低是许多凋亡事件的前奏, 同时也是细胞衰老的标志, 如老年鼠的淋巴细胞 $\Delta\Psi_m$ 比年轻鼠的低^[20,21]. $\Delta\Psi_m$ 在凋亡和衰老的区别在于, $\Delta\Psi_m$ 的丧失进而细胞色素 c 的释放往往伴随着细胞死亡的不可逆发生^[22]; 而衰老的细胞线粒体尽管 $\Delta\Psi_m$ 降低, 但仍保持着一定的水平. 当然, 衰老细胞 $\Delta\Psi_m$ 的降低也可能表示细胞开始采用一种不同于正常年轻细胞的代谢模式, 这种模式消耗较少的能量, 同时也可能产生较少的自由基, 这种情况虽然不适合细胞增殖, 但可能适合衰老的细胞维持生存^[23]. 我们的结果表明 TNF- α 诱导内皮细胞衰老时引起了 $\Delta\Psi_m$ 下降, 这是和以往的研究一致的.

我们实验室以往的研究还表明, $\Delta\Psi_m$ 与 ROS 有内在的关系^[24]. $\Delta\Psi_m$ 越高, ATP 合成越多, 同时电子传递过程中倾向于生成更多的 ROS. 线粒体是多数细胞内 ROS 的最主要来源^[25]. 在炎症反应中, 炎症细胞常产生呼吸爆发, 用于抗击感染等侵害, 其中产生的 ROS 能引起多种细胞组分的损伤和特定信号传导途径的激活^[26]. 因此有着自我调节功能的完整细胞总是尽可能的将其控制在相对能容受的水平(如通过超氧化物歧化系统和线粒体解偶联蛋白表达增强^[27,28]). 我们的研究发现, TNF- α 作用 HUVECs 的早期 ROS 水平有一个幅度不大的振荡, 衰老的细胞内 ROS 水平则有所降低. 这可能反映了细胞内 ROS 产生和淬灭机制的对抗. 但长时间的炎性应激会使细胞的资源和功能提前透支而早衰, 此时线粒体功能衰变, 能量产生障碍, 细胞代谢水平低迷. 生成 ROS 的能力反而降低. 这可能是衰老细胞采用低代谢模式的一种生存适应, 尽量减低氧化损伤. 衰老过程中 ROS 控制的机制还有待进一步研究. 当然, 最终细胞衰老的内控分子机制将有可能通过基因表达谱和蛋白质组的绘制帮助阐明^[29].

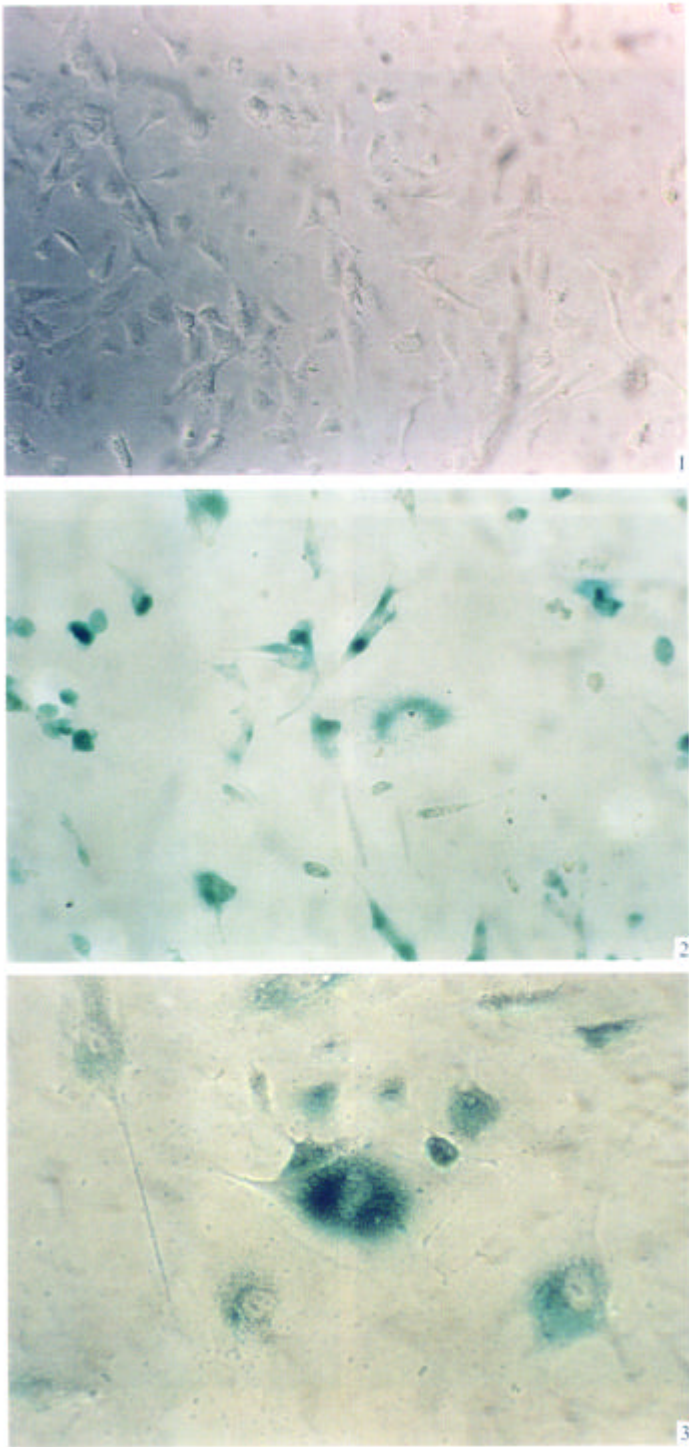
总之, 我们的结果表明, 长期用 TNF- α 处理能诱导血管内皮细胞的衰老, 线粒体功能的变化与这一过程有一定关系. 同时我们认为, 这种体外细胞模型除了对于研究炎症调节、免疫应答与衰老之间的关系有着直接意义外, 对于衰老共性机理的基础研究也有明显的帮助.

致谢 感谢刘树森教授、苗振川和夏天博士在该研究过程中许多观点上的有益讨论.

参 考 文 献

- 1 Thomas B L K, Steven N A. Why do we age? *Nature*, 2000, 408(9): 233~238
- 2 Leonard G, Cynthia K. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, 2000, 408(9): 255~262
- 3 Toren F, Nikki J H. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408(9): 239~247
- 4 Carswell E A, Old L J, Kassel R L, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72(9): 3666~3670
- 5 Karsan A. Tumor necrosis factor and endothelial cell death. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1998, 8(1): 19~24
- 6 Baker S J, Reddy P. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 1996, 12(1): 121~129
- 7 Venable M E, Lee J Y, Smyth M J, et al. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem*, 1995, 270(51): 30701~30708
- 8 Hannun Y A, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(2): 73~80
- 9 Pober J S, Cotran R S. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiological Reviews*, 1990, 70(4): 704~705
- 10 Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999, 10(1): 27~39
- 11 Sedgwick J D, Riminton D S, Cyster J G, et al. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today*, 2000, 21(3): 110~113
- 12 Bombeli T, Karsan A, Tait J F, et al. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood*, 1997, 89(7): 2429~2442
- 13 Pfau S, Leitenberg D, Rinder H, et al. Lymphocyte adhesion-dependent calcium signaling in human endothelial cells. *J Cell Biol*, 1995, 128(5): 969~978
- 14 David L S, Robert D G, Leinwand L A. *Cells: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- 15 Serrano M, Lin A W, McCurrach M E, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997, 88(5): 593~602
- 16 Dimri G P, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9363~9367
- 17 Cortopassi G A, Wong A. Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1410(2): 183~193
- 18 Hagen T M, Ingersoll R T, Wehr C M, et al. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(16): 9562~9566
- 19 Harper M E, Monemdjou S, Ramsey J J, et al. Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes. *Am J Physiol*, 1998, 275(2 Pt 1): E197~E206
- 20 Sugrue M M, Wang Y, Rideout H J, et al. Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261(1): 123~130
- 21 Rottenberg H, Wu S. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 240(1): 68~74
- 22 Cook S A, Sugden P H, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res*, 1999, 85(10): 940~949
- 23 Koll F, Sidoti C, Rincheval V, et al. Mitochondrial membrane potential and ageing in *Podospora anserina*. *Mech Ageing Dev*, 2001, 122(2): 205~217
- 24 Liu S S. Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain——superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 1999, 31(4): 367~376
- 25 Raha S, Robinson B H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(10): 502~508
- 26 Takahashi Y, Kuro O, Ishikawa F. Aging mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(23): 12407~12408
- 27 Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 435~439
- 28 Jaburek M, Varecha M, Gimeno R E, et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem*, 1999, 274(37): 26003~26007
- 29 Toda T. Current status and perspectives of proteomics in aging research. *Exp Gerontol*, 2000, 35(6-7): 803~810

(2001-04-30 收稿, 2001-07-31 收修改稿)



TNF- α 诱导 HUVECs 细胞衰老鉴定

1 示未经处理的平行对照 HUVECs($\times 140$, 与实验组来源一致, 培养时间平行); 2 示 20 ng/mL TNF- α 持续刺激 15 d 的 HUVECs($\times 140$), 细胞由于 β -半乳糖苷酶的作用分解底物 X-gal 而被染成蓝色; 3 示经 TNF- α 诱导衰老的 HUVECs($\times 224$), 显示细胞浆中特异性着蓝色, 细胞核不被着色