

## 细胞凋亡在肝脏衰老中的作用

胡绍杰<sup>1</sup>, 蒋莎莎<sup>1</sup>, 张瑾<sup>1</sup>, 于博<sup>1</sup>, 罗丹<sup>1</sup>, 杨良燕<sup>1</sup>, 袁画画<sup>1</sup>, 洪芬芳<sup>2</sup>,  
杨树龙<sup>1\*</sup>

(1. 南昌大学 基础医学院 生理教研室, 中国江西 南昌 330006; 2. 南昌大学 医学实验教学中心, 中国江西 南昌 330031)

**摘要:** 细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡过程, 存在死亡受体主导的外源性凋亡途径和细胞器触发的内源性凋亡途径。细胞凋亡主要清除异常细胞以保证机体的正常生理功能, 其作用与凋亡程度有关。肝脏衰老是一种随年龄增长的自然进程, 通常伴随着肝脏合成与分解代谢等功能的降低。肝脏的高强度代谢活动使其容易受到外源性和内源性的应激刺激, 进而激活肝脏细胞 *p53* 等基因, 通过相关的信号通路发生自噬、细胞周期阻滞和 DNA 修复等, 最终细胞可能清除应激, 也可能因 DNA 损伤导致衰老、凋亡甚至癌变。细胞凋亡和衰老在肝脏中有保护与损害双重作用。一方面, 凋亡和衰老可使细胞避免癌变; 另一方面, 凋亡可加剧因衰老造成的肝脏功能减退, 而且凋亡失衡时可能导致非酒精性脂肪肝疾病、肝纤维化、肝硬化、肝癌等肝脏衰老相关的疾病。本文就近年来有关细胞凋亡在肝脏衰老期间可能存在的保护、损害作用以及在老年性肝病发生机制中的作用进行了分析和总结。

**关键词:** 凋亡; 衰老; 肝脏; 氧化应激

中图分类号: Q255

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)05-0397-09

## Effects of Apoptosis Process on Aging of Liver

HU Shao-jie<sup>1</sup>, JIANG Sha-sha<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>, YU Bo<sup>1</sup>, LUO Dan<sup>1</sup>,  
YANG Liang-yan<sup>1</sup>, ZHONG Hua-hua<sup>1</sup>, HONG Fen-fang<sup>2</sup>, YANG Shu-long<sup>1\*</sup>

(1. Department of Physiology, College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China; 2. Department of Experimental Teaching Center, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi, China)

**Abstract:** Apoptosis is a process of programmed cell death. It includes external apoptosis pathways dominated by death receptors and internal apoptosis pathways triggered by organelles' injury. The primary function of apoptosis is to eliminate abnormal cells to secure the normal physiological functions of organisms, which is dependent on the degree of apoptosis. Liver aging is a natural process with age, usually accompanied by decreases in liver synthesis and catabolism. The high metabolic levels of liver render it vulnerable to stresses. As a result, stresses activate genes like *p53* to perform autophagy, cell cycle arrest, and DNA repairment, all of which end up with particular consequences like alleviating stress, inducing aging, apoptosis and even cancer on account of DNA damage. Among these, apoptosis and aging have protective and detrimental effects on the liver simultaneously. On one hand, they two cause the cells to avoid cancerization, and on the other hand, apoptosis may aggravate hepatic dysfunction already caused by aging. When apoptosis becomes imbalanced during liver aging, related diseases may occur, such as non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis, liver cirrhosis and cancer. Herein, the underlying protective and damaging effects of apoptosis on hepatic senescence and the influence of apoptosis on occurrence of age-related hepatic diseases are ana-

收稿日期: 2018-04-27; 修回日期: 2018-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81660151, 81660751, 81260504); 江西省重点研发计划项目(20161BBG70067); 江西省自然科学基金资助项目(20171BAB205085)

作者简介: 胡绍杰(1995-), 男, 江西赣州人, 本科生, 主要从事临床医学研究; \*通讯作者: 杨树龙(1966-), 男, 江西鄱阳人, 博士, 南昌大学医学部教授, 博士生导师, 主要从事炎症药理学研究, Tel: 0791-86360556, E-mail: slyang@ncu.edu.cn.

lyzed and summarized.

**Key words:** apoptosis; aging; liver; oxidative stress

衰老是一种以机体功能减退和外观衰老为特征的自然过程。肝脏衰老主要表现为代谢功能减退,以及外观褐色萎缩(brown atrophy)。细胞凋亡(apoptosis)系一种程序性细胞死亡。细胞凋亡的途径包括内源性和外源性两种途径,可清理异常的细胞,维持组织器官的稳定。细胞凋亡在肝脏衰老中存在有利和不利的双重作用,且与老年性肝病发生有关。本文就近年来细胞凋亡在肝脏衰老过程中的作用予以综述。

## 1 肝脏衰老

衰老作为一个普遍的自然规律,表现为衰老器官或组织形态和功能的改变。轻度的衰老损伤生理功能,而重度的衰老可以导致功能失代偿甚至最终的死亡。肝脏衰老也是如此。肝脏衰老通常伴随着肝脏形态的变化和代谢等功能的减退。

肝脏老化是指肝脏逐渐退化的漫长过程。肝脏衰老可被认为是肝脏老化的结局,是肝脏退化后的状态。在形态学上,衰老肝脏表现为褐色萎缩、体积和容积变小以及质量减轻。肝脏的褐色萎缩是在肝脏老化过程中,由于过多的脂褐质(lipofuscin)堆积而形成的<sup>[1]</sup>。老化过程中,肝脏内的血流量明显减少约 35%,从而引起肝脏相应的体积和容积变小<sup>[2]</sup>。此外,在解剖研究中发现,相比年轻的正常肝脏,衰老肝脏的质量在男性中减轻约 24%,在女性中减轻约 18%<sup>[3]</sup>。

肝脏衰老与肝脏功能的减退密切相关。肝脏衰老不仅减少白蛋白、球蛋白等物质在肝脏的合成,还使细胞 ATP 生成减少。同时,衰老的肝脏清理异常细胞的能力也会发生退化,这使得异常细胞可能向恶性细胞进展并最终成为癌细胞。在肝脏老化中,肝脏细胞内线粒体的老化造成氧化物生成增多,这导致了氧化与抗氧化之间的失衡,容易引发 DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤<sup>[4]</sup>。此外,老化过程中端粒逐渐缩短,肝脏细胞的有丝分裂减少,从而降低肝脏细胞增殖能力。

## 2 细胞凋亡途径

细胞凋亡机制主要由两种途径组成:外源性凋亡途径和内源性凋亡途径。外源性途径主要由

(*Life Science Research*, 2018, 22(5): 397-405)

死亡受体(death receptor, DR)主导,包括 Fas 受体(Fas receptor)、TNF-1 受体(tumor necrosis factor receptor 1, TNF-receptor 1)和 TRAIL 受体(TNF-related apoptosis inducing ligand receptor, TRAIL-R)等。当相应的配体与这些受体结合时,DR 发生构象改变,进而聚集细胞质适配蛋白,比如 Fas 相关域蛋白(Fas-associated protein with death domain, FADD),随后聚集凋亡信号通路分子,比如 caspase-8,最终形成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),激活产生效应的 caspase-3、6 和 7<sup>[5]</sup>。

内源性凋亡途径主要由细胞内的细胞器触发。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)、细胞核内 DNA 损伤、溶酶体通透性改变和线粒体功能障碍都可诱导内源性凋亡,其中以线粒体功能障碍为主要途径。线粒体功能障碍引发多种促凋亡蛋白(比如细胞色素 c)向细胞质中释放后,促凋亡蛋白和凋亡蛋白激活因子 1 (apoptosis protease-activating factor-1, Apaf1)以及 caspase-9 共同形成活化复合体,即凋亡小体(apoptotic body)。凋亡小体激活 caspase-3、6 和 7,导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。由线粒体功能障碍调节的凋亡还受 Bcl-2 家族蛋白(B cell lymphoma 2 family protein)的调节,其中 Bcl-2 和 Bcl-xL (B cell lymphoma-extra large)属于抗凋亡蛋白, Bax (Bcl-2 associated X protein)属于促凋亡蛋白<sup>[7,8]</sup>。此外,内源性途径还与“氧化应激”理论的活性氧类(reactive oxygen species, ROS)密切相关。大量的氧化应激产生高浓度的 ROS,而 ROS 打破氧化与抗氧化的平衡,并损伤遗传物质,损害细胞,诱导凋亡<sup>[9]</sup>。

## 3 细胞凋亡与肝脏衰老

细胞在其所处的微环境中容易受到多种应激刺激,比如氧化、水解、烷化、电离辐射等。遭遇这些应激源时,细胞通过调控基因表达和细胞器作用产生一系列的应激反应,减轻或消除应激源对细胞的损伤。例如,ROS 的合成与清除不平衡时可使细胞产生氧化应激,此时, p53 基因被细胞内 ROS 激活。P53 具有减轻和增强氧化应激的双重作用:一方面, P53 可增强 PIG3、PIG6、FDXR 等

基因的表达,表达产物将增加细胞内 ROS 并使细胞对氧化应激更加敏感;而另一方面, P53 可激活多种抗氧化基因(*PIG12*、*ALDH4A1*、*GPX1*、*SOD2*等)以减轻氧化应激程度<sup>[10]</sup>。P53 的作用取决于细胞的应激程度:当细胞面对生理的应激时, P53 抵抗氧化应激;当细胞面对致命性的应激时, P53 增加 ROS 并激活 Bax 蛋白引发凋亡<sup>[11]</sup>。雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种与细胞生长相关的蛋白质,其活化可使细胞周期阻滞而导致细胞衰老。ROS 可激活 mTOR,而 P53 可抑制 mTOR。由此, P53 在抗氧化的同时还可抗衰老。P53 的激活对 mTOR 的抑制不仅有抗衰老作用,还可以诱发细胞自噬<sup>[12]</sup>。自噬是一种分解代谢的途径。在该途径中,细胞质中受损的蛋白质和细胞器等可以被传递至溶酶体,并发生融合形成自噬体,最终降解腔内的内容物<sup>[13]</sup>。ROS 的增多可引起线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)的突变,导致线粒体内 ATP 合成减少和呼吸链功能异常<sup>[14, 15]</sup>。细胞自噬则可及时清除受损伤的线粒体,保持细胞内的稳定状态。而 P53 可通过 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)影响损伤调控的自噬调节(damage-regulated autophagy modulator, DRAM),进而诱发细胞自噬<sup>[16]</sup>。被 ROS 激活的 p53 能够激活其下游的 p21 基因, P21 结合多种细胞周期蛋白(cyclin)和 Cdk 复合物比如 cyclin D1-Cdk4、cyclin E-Cdk2 和 cyclin A-Cdk2 等,阻碍细胞周期进展,导致细胞在 G1 期发生周期阻滞,限制细胞 DNA 复制<sup>[17]</sup>。P21 也能与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合,使 PCNA 失去在 DNA 复制中作为 DNA 聚合酶的作用,导致 G1 期阻滞<sup>[18]</sup>。细胞周期发生阻滞时,促生长通路比如 Erk/MAPK 和 Akt 通路仍产生生长刺激,而细胞生长的大小是有限的,当细胞生长不能由细胞分裂补充时,将导致细胞发生衰老<sup>[19]</sup>。ROS 不仅影响 mtDNA,还损害核 DNA。例如 ROS 可将鸟嘌呤氧化损伤为 8-氧-7-氢脱氧鸟嘌呤(8-oxodGTP),这一过程可被碱基切除修复机制修复。细胞内还存在核苷酸切除修复和双链断裂修复等机制<sup>[20]</sup>。当受损的 DNA 不能完全被修复而发生积累时,细胞可能发生上述 P53/P21 导致的衰老、内源性途径的凋亡甚至癌变。综上所述,细胞遭遇 ROS 时细胞内发生一系列复杂的反应,而细胞最终的结果可能是:应激消除、凋亡、衰老、癌变。

肝脏衰老时,肝脏细胞可通过增加凋亡而避免癌变。肝脏在老化过程中受到多种应激刺激,而衰老肝脏细胞内 DNA 容易受损,且衰老的肝脏细胞 DNA 修复能力下降。甲磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)可直接烷基化细胞中的 DNA,导致 DNA 损伤。Suh 等<sup>[21]</sup>向衰老雄性大鼠注射 MMS,造成大鼠大脑和肝脏相同的核 DNA 损伤后,发现脑癌的发生率远大于肝癌的发生率,进一步研究发现这是由于 MMS 激活 P38 与 JNK 通路诱发肝脏细胞大量凋亡。在这一过程中, MMS 可以磷酸化 SEK1 (SAPK or extracellular signal-regulated protein kinase kinase 1)/MKK4 (MAPK kinase 4)中的 Thr223,被磷酸化的 Thr223 可激活 P38 与 JNK 通路,而后二者通过下游的 ATF-2 (activating transcription factor-2)和 c-Jun 等信号诱导凋亡。

凋亡在及时清除已经转变的异常细胞以避免癌变的同时,也可导致衰老的发生。Park 等<sup>[22]</sup>使年轻小鼠中的 *Xpd* 基因发生突变,导致小鼠的核苷酸切除修复机制发生缺陷。基于此,对小鼠的肝脏进行分析发现,肝脏中不仅 Fas 受体的基因上调,而且 *Xpd* 基因的缺陷还可激活 P53,被激活的 P53 可以调控 Bcl-2 家族蛋白中的促凋亡蛋白如 Bax、Bak 和 Bok,最终使肝脏细胞凋亡显著增加<sup>[23]</sup>。虽然肝脏通过上调信号转导与转录激活子-3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)增强肝脏细胞再生,但是仍难以补充凋亡的肝脏细胞,这导致肝脏细胞新生和消耗的失衡。由于过度凋亡,肝脏合成脂质、解毒和清除异常物质的功能下降,引发过早衰老,出现比如肝脏质量减轻、肝脏发生脂褐质沉积等现象。

#### 4 细胞凋亡在肝脏衰老中的保护作用

在正常的生理状态下,肝脏的凋亡水平随着老化的进展而升高。在许多情况下,凋亡可保护衰老的肝脏,并维持肝脏的正常功能。当肝脏遭遇来自饮食中的基因毒素和自由基的攻击时,肝细胞内 DNA 将受到损伤<sup>[24]</sup>,大部分细胞可被核 DNA 修复机制(如核苷酸切除修复)所修复,少量无法被修复的细胞一方面进入细胞周期阻滞发生 DNA 复制衰老,同时 P53 正向凋亡调控因子(P53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)可以诱导细胞凋亡,避免肝细胞发生恶变<sup>[25]</sup>。此时凋亡可清除异常的细胞,取而代之的是增殖的肝脏细胞,这一过程有效地维持了肝脏的功能和内部的稳定。

Giorgadze 等<sup>[26]</sup>研究了年龄对雄性大鼠肝脏凋亡和增生的影响,结果显示:和年轻组相比,衰老组中含有多倍染色体细胞核细胞的数量显著增加。研究者认为多倍染色体细胞的增多将消耗再生的肝实质细胞,而前者生存具有劣势;如果含有过多的多倍染色体细胞,将导致更多的再生肝细胞被消耗;当遭受损伤时,肝脏可能因肝细胞数量不足而发生肝衰竭。此时异常细胞凋亡的增多,则可认为是对肝脏的一种保护。

适度的凋亡可以清除异常细胞,但是过度的凋亡会减退正常的生理功能。“氧化应激”理论在凋亡的过程中有着重要的地位,涉及 caspase 和线粒体等多个环节。肝脏衰老伴随着氧化应激的增多,但是肝脏抗氧化能力逐渐下降,这导致氧化应激的过度产生。如前所述,ROS 的增加可激活 P53,从而增强促凋亡蛋白的表达,使凋亡程度升高,加剧衰老肝脏的功能损害。因此,在这种情况下,对抗过多的氧化应激和减少凋亡是对衰老肝脏的一种保护策略。越来越多的证据表明,长期暴露于超过机体所能代谢的限量 D-半乳糖环境下,氧化应激的产物增多,能产生类似自然衰老的结果。在 D-半乳糖诱导凋亡而发生衰老的小鼠模型中,黑籽固定油可减少促 caspase-3 基因的表达,加强 caspase-3 的裂解<sup>[27]</sup>;虎杖苷在该模型中,能够改善肝脏衰老的组织学改变,消除 caspase-3 的活性,减少 ROS 的产物和提高抗氧化酶的活性<sup>[28]</sup>;水飞蓟油在 D-半乳糖诱导衰老的小鼠肝脏中可以有效地减轻氧化损伤,改善肝脏

细胞线粒体的功能障碍<sup>[29]</sup>。可见,在肝脏衰老中,抑制过多的氧化应激和凋亡,维持凋亡水平的平衡,能够缓解因衰老导致的肝脏损伤,改善肝脏受损的功能。

饮食在肝脏衰老中起着保护作用,其中卡路里限制(caloric restriction, CR)在动物实验中不仅可减缓老化的进程,还能延长寿命。老化过程中,抗氧化能力的下降容易导致 ROS 水平的增加,造成线粒体 DNA 损伤和线粒体膜不饱和脂肪酸增多。CR 可上调 *Beclin-1* 和 *Atg-3* 等自噬基因,激活细胞内自噬活动,清理氧化损伤的蛋白质、脂质以及受损的线粒体。同时 CR 也可通过 NRF2/ARE 通路增强细胞抗氧化能力,激活质膜氧化还原系统(plasma membrane redox system, PMRS),使线粒体代谢活动稳定<sup>[30]</sup>。Ikeyama 等<sup>[31]</sup>在肝实质细胞中研究老化和 CR 对促凋亡基因 *gadd153* 表达的影响,以及老化和 CR 对氧化损伤的影响。研究结果显示,在高浓度的过氧化氢刺激下, *gadd153* 基因被激活,且表达水平随着老化的进行而增加; *gadd153* 基因使衰老的肝实质细胞对氧化性损伤敏感,导致肝实质细胞内 ROS 大量增加,引发内源性凋亡途径。而 CR 可以缓解因为老化而导致的氧化应激耐受下降,阻止由于老化而增加的 *gadd153* 表达,减轻因氧化应激导致的凋亡并且延缓衰老。由此可见,CR 在肝脏衰老中,通过诱导细胞自噬、抑制 *gadd153* 表达等方式减轻氧化损伤,并改善因为肝脏衰老本身导致的肝脏损伤。细胞凋亡在肝脏衰老中的作用见图 1。

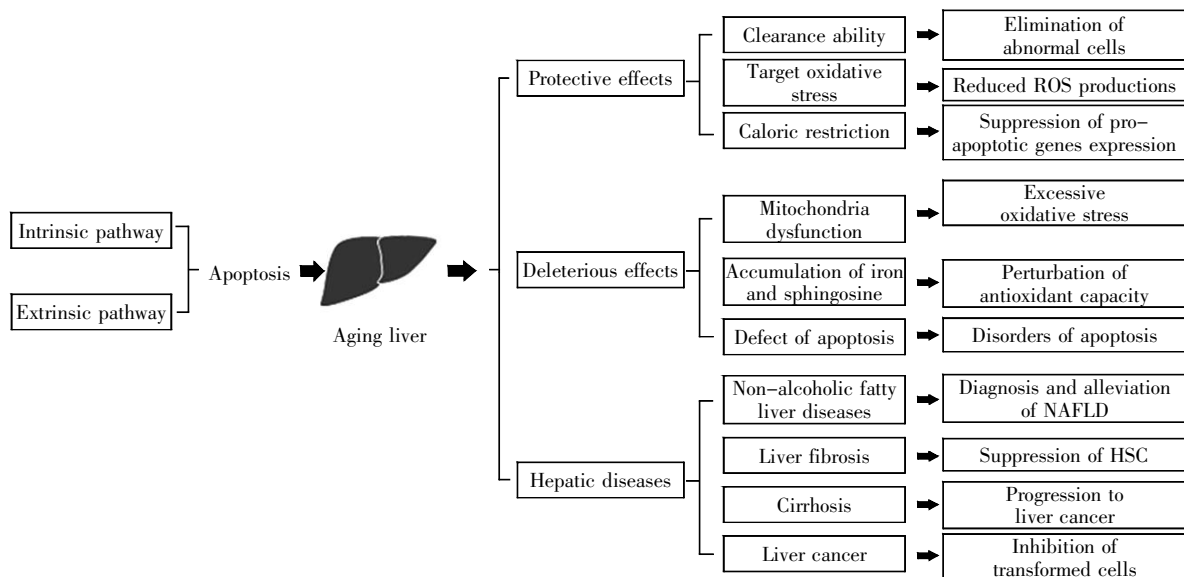


图 1 细胞凋亡在肝脏衰老中的作用

Fig.1 Effects of apoptosis process on aging of liver

## 5 细胞凋亡在肝脏衰老中的损伤作用

适度的凋亡通常被认为是对肝脏衰老的保护,如果凋亡的平衡被打破,过多或减少的凋亡水平将引起肝脏的损害。就老化过程本身而言,老化可影响内源性或外源性凋亡途径,对凋亡的平衡产生威胁,损伤肝脏。随着肝脏老化的进行,氧化应激逐渐增加,这将消耗大量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD),导致肝脏细胞内 NAD 的减少,从而引发细胞中能量的供应减少和去乙酰化酶 1 (sirtuin 1, SIRT1) 的功能减退。NAD 可作为氢的载体参与 ATP 的合成。NAD 的缺少使细胞耗尽储存的 ATP,释放凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF),比如细胞色素 c,引发内源性凋亡。由于 NAD、SIRT1 的不足使 P53 的脱去乙酰基的功能减退,从而使 P53 活性增强,使细胞对凋亡更加敏感<sup>[32]</sup>。对于线粒体,老化可增强线粒体通透转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mtPTP)的活性,引发促凋亡蛋白从线粒体膜间隙释放,提高肝脏衰老中凋亡水平<sup>[33]</sup>。Mach 等<sup>[34]</sup>发现,在衰老的 Fischer 344 大鼠的肝脏细胞线粒体中,促凋亡蛋白 Bax 未发生改变,然而抗凋亡蛋白 Bcl-2 减少。这导致 Bax 和 Bcl-2 的比值增大,提升了凋亡的水平。因此,老化本身能够引起线粒体功能障碍,破坏原有的凋亡平衡,进而对肝脏产生损伤。

随着时间的变化,细胞老化中涉及物质逐渐积累。这些积累的物质对细胞结构和功能等产生影响,并增加损伤和疾病发生的风险<sup>[35]</sup>。在肝脏老化过程中,由于肝脏的清除能力下降,许多物质可在肝脏内逐渐积累,铁元素就是其中一种。Seo 等<sup>[36]</sup>对年龄分别为 8、18、29 和 37 个月的大鼠进行研究。结果发现,肝脏细胞线粒体内的非血红素铁含量随着年龄的增加而增加,导致衰老肝脏 mtPTP 过度敏感,使 mtPTP 易开放。在异常浓度的非血红素铁的作用下,相对于年轻组的线粒体,衰老组线粒体内的 RNA 更容易受到氧化损害。然而与 DNA 损伤不同的是,mtRNA 的损伤缺乏相应的 RNA 修复机制,导致受损的 mtRNA 逐渐积累,造成 ROS 的增加和线粒体的衰老。大量的 ROS 可激活 mTOR,加剧肝脏细胞的衰老,从而增加肝脏细胞对凋亡的易感性,进而加速肝脏老化的进程。

不能忽视的是,凋亡自身的缺陷也可对肝脏

衰老产生影响。为了探究受损的凋亡功能对哺乳动物老化过程的影响,Zhang 等<sup>[37]</sup>利用 caspase-2 缺陷的小鼠和野生型小鼠进行实验,结果显示在 caspase-2 缺陷的小鼠肝脏中有更多的蛋白质被氧化。而作为半胱氨酸蛋白酶家族的一员,caspase-2 通过调控氧化应激来影响凋亡<sup>[38]</sup>,这表明 caspase-2 的缺乏损伤了肝脏的抗氧化功能。正是因为对抗氧化应激的能力减退,使氧化应激增多,最后在肝脏衰老的过程中导致氧化损伤<sup>[39]</sup>。

## 6 细胞凋亡在肝脏衰老相关疾病中的作用

### 6.1 非酒精性脂肪肝病

在肝脏老化过程中,肝脏不仅发生结构和功能上的改变,代谢异常的风险也增加。NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease)是一类和脂质代谢失常有关的疾病。目前认为,NAFLD 是在世界范围内分布的肝脏疾病<sup>[40]</sup>,它包含了从简单的脂肪变性到非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的一系列疾病<sup>[41]</sup>。

NAFLD 是在无酒精摄入情况下,由脂质的摄取和合成失衡、脂质的过多氧化等造成。老化可损伤肝脏对脂质代谢的调控能力,从而导致脂质在肝脏中的积累,即使是在瘦弱的个体中<sup>[42]</sup>。在 NAFLD 中,凋亡被认为是加剧其进展的因素之一。机体内游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的增多被认为是 NAFLD 发展至 NASH 的第一步,随后的凋亡加速这一过程。在 FFA 的刺激下,p53 基因被激活进而导致凋亡发生。P53 通路介导了内源性的线粒体凋亡途径与外源性的死亡受体凋亡途径。P53 可抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xL,使 Bid (BH3 interacting-domain death agonist)裂解为 tBid (truncated Bid);可增强促凋亡蛋白的表达,比如 Bak1 和 Bax,从而启动线粒体凋亡途径;也可激活 P21,抑制抗凋亡的 D 细胞周期蛋白激酶的活性以发生细胞周期阻滞;此外,还可上调 Fas、FADD 和 TRAIL 等外源性死亡受体的表达,增强外源性凋亡<sup>[43,44]</sup>。

由于凋亡在 NAFLD 中扮演着重要角色,所以凋亡可为 NAFLD 的诊断和治疗提供思路。在诊断 NAFLD 时,目前主要依靠肝脏的组织切片进行病理诊断。但是病理诊断作为一种具有侵袭性的诊断方式,对机体损伤较大。凋亡同样可以提供诊断信息,并且具有无侵袭性等特点。Wieckowska 等<sup>[45]</sup>对 44 例 NAFLD 疑似患者的血浆中肝

脏细胞凋亡水平和 caspase-3 产生的细胞角蛋白 18 (cytokeratin 18, CK18)水平进行了检测,同时也进行了组织切片检查。结果发现,和组织切片检查确诊为简单脂肪变性的患者的血浆相比,确诊为 NASH 患者的血浆中 CK18 数目显著增多,这提示测量血浆中细胞凋亡水平有望成为诊断 NAFLD 的一种非侵袭性方法。在治疗 NAFLD 方面, Xiao 等<sup>[46]</sup>利用 S-烯丙半胱氨酸(S-allylmercaptocysteine, SAMC)应对 NAFLD,发现 SAMC 可通过抑制凋亡和增加自噬改善 NAFLD。SAMC 可以激活 LKB1/AMPK 和 PI3K/Akt 通路,进而抑制处于下游的 P53 介导的凋亡。SAMC 亦可抑制 mTOR 的活性,增强肝细胞的自噬。在肝细胞中,自噬可选择性地以脂肪滴为目标,降解脂肪滴,从而减轻肝脏的脂肪变性,这也被称为脂类自噬(lipophagy)<sup>[47]</sup>。

## 6.2 肝纤维化

在肝纤维化(hepatic fibrosis)中,肝脏星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)和其他的成纤维细胞的活化产生大量细胞外基质蛋白(extracellular matrix, ECM),比如胶原蛋白。当 ECM 产生的量大于纤溶的量时,肝脏纤维化即发生。当肝脏长期受到损伤时,肝脏实质细胞发生凋亡而且再生能力被严重削弱,肝脏实质细胞凋亡刺激 HSC 激活 CBP/b-catenin 通路产生大量 ECM,导致肝脏纤维化<sup>[48]</sup>。由此可见,HSC 的活化、肝脏实质细胞的凋亡与肝纤维化密切相关<sup>[49]</sup>。

目前,应对肝纤维化的主要策略是促使 HSC 老化和凋亡。例如,白介素-22 (interleukin-22, IL-22)通过 IL-22 受体 1 (IL-22R1)和 IL-10 受体 2 (IL-10R2),激活 HSC 内的 STAT3,后者进一步激活细胞因子信号转导抑制物(suppressor of cytokine signaling, SOCS),SOCS 则上调 P53 和 P53 的靶基因如 *p21*、*GADD45a*、*PMP22*,导致 HSC 发生 G1 期阻滞,最终造成 HSC 衰老并缓解肝纤维化<sup>[50]</sup>。需要指出,HSC 的衰老并不意味着肝脏整体的老化。肝脏整体衰老对于肝纤维化的缓减不仅无帮助,甚至会加深肝纤维化的严重程度。肝脏衰老时纤维变得浓厚,赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)表达增强,使胶原不易被降解;同时,肝脏衰老伴随着纤维降解能力的减退。这些均提示肝脏衰老加剧肝纤维化程度<sup>[51]</sup>。此外,因老化而增加的氧化应激也对肝纤维化的进展有促进作用<sup>[52]</sup>。由此可见,细胞凋亡起着双刃剑作用。肝脏衰老本身作

为肝纤维化的危险因素,对肝脏纤溶能力产生损伤。随之而来的细胞凋亡,一方面使 HSC 死亡,减少肝脏纤维的产生,缓解肝纤维化的程度<sup>[53]</sup>;而另一方面,又可使肝脏实质细胞凋亡,肝脏再生能力被打击,扩大 ECM 的分布,加剧肝纤维化。所以,在保护肝脏实质细胞的基础上,增强 HSC 老化或者凋亡,将是应对肝纤维化的有效方法。

## 6.3 肝硬化

肝硬化(cirrhosis)以广泛的纤维组织在肝脏堆积为特点,可由肝纤维化进一步发展而来,被认为是晚期的肝纤维化<sup>[54]</sup>。晚期肝硬化通常不可逆转,并且有向肝细胞癌发展的恶性倾向<sup>[55]</sup>,因此肝硬化常常被认为是一种癌前状态。

端粒缩短在肝硬化中表现尤为明显,并且和肝纤维化演变成肝硬化有紧密的联系<sup>[56]</sup>。肝脏在慢性有害因素刺激下,比如酒精摄入、肥胖、病毒性肝炎等,肝脏实质细胞受到损害,肝脏为弥补受损的细胞而加速肝脏实质细胞的再生。肝实质细胞 DNA 持续复制,进而导致端粒缩短,而后者在限制其再生能力的同时,也使 P53 被激活。P53 可激活 P21,抑制细胞周期素依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的磷酸化作用并阻止视网膜母细胞瘤基因(retinoblastoma gene, Rb gene)表达,导致肝实质细胞在 G1 期发生阻滞,进而使其衰老<sup>[57]</sup>。端粒缩短也可诱导肝实质细胞发生以 P53 为主导的凋亡<sup>[58]</sup>。以上都可激活 HSC 产生大量纤维,破坏肝脏结构形成假小叶并且发生肝功能紊乱<sup>[54]</sup>。

在纵向研究中,衰老被发现是肝硬化发展到肝细胞癌的危险因素<sup>[59]</sup>。然而,肝硬化导致肝细胞癌的机制目前仍不明确。现有的资料表明,肝细胞癌来源于肝脏的卵圆细胞。Xu 等<sup>[60]</sup>运用二乙基亚硝胺诱导大鼠肝硬化,并在该模型中发现大量肝脏实质细胞发生凋亡,推测肝脏实质细胞的凋亡可能刺激卵圆细胞增殖,因而显著地增加了肝硬化发展成肝细胞癌的概率。

类似于肝纤维化,应对肝硬化时,HSC 凋亡成为关键靶点。广泛的纤维组织主要由 HSC 和血管周围的成纤维细胞产生,二者统称为肌成纤维细胞(myofibroblast)。Kim 等<sup>[61]</sup>在大鼠肝硬化动物模型中研究发现,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)可结合肌成纤维细胞表面的 c-Met 受体,抑制其 DNA 合成,降低肌成纤维细胞的增殖。同时 HGF 还可增强肌成纤维细胞内 Fas 受体

的表达,使其发生由 Fas 受体介导的细胞凋亡,从而缓解肝硬化,这表明促进肝脏肌成纤维细胞凋亡是应对肝硬化的有效举措。

#### 6.4 肝癌

肿瘤的发生是一个与细胞凋亡和衰老减少密切相关的长期过程<sup>[62]</sup>,肝癌也不例外。在遗传因素、环境因子和乙肝病毒等攻击下,肝脏细胞内 DNA 将产生损伤。此时肝脏内的 ATM (ataxia telangiectasia mutated)和 ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related)可检测损伤,并分别磷酸化检查点激酶 2 (checkpoint kinase 2, Chk2)和检查点激酶 1 (checkpoint kinase 1, Chk1),二者可以激活 P53。DNA 轻度损伤时, p53 转录 *Fen1*、*XPC* 等抑癌基因修复受损的 DNA; 而 DNA 严重受损时, p53 转录 *Bax*、*Fas-R* 等促凋亡基因诱导受损细胞凋亡<sup>[63]</sup>。DNA 损伤也可激活 P53-P21-pRb 和 P16-pRb 等衰老相关通路,导致细胞周期阻滞和端粒缩短,发生 DNA 复制衰老,进而限制细胞增殖<sup>[25,64]</sup>。因此,凋亡和衰老可以使受损细胞避免癌变,维持肝脏内的稳定状态<sup>[65]</sup>。当受损的肝脏细胞逃脱衰老或凋亡时,细胞内受损的 DNA 积累则可能导致细胞癌变。

如上所述,肝癌是由受损的肝脏细胞逃脱衰老和凋亡所引起的,因此触发肝癌细胞衰老和凋亡是重要的抑癌策略。化疗药物如环磷酰胺可损伤肿瘤细胞内 DNA,同时激活依靠 P53 和 P16 的衰老通路,使肿瘤细胞发生衰老,抑制肿瘤细胞的生长和增殖<sup>[66]</sup>。转录因子 Foxa1 (Forkhead box A1)和 FoxO3a (Forkhead box O3a)可通过调节 Bcl-2 增加肝癌细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长<sup>[67,68]</sup>。阿司匹林作为一种非甾体抗炎药,在肝细胞癌中,可激活 caspase 活性、影响 Bax/Bcl-2 比值等内源性和外源性的凋亡途径,诱导癌细胞凋亡,发挥抗癌的作用<sup>[69]</sup>。当阿司匹林和阿霉素联用时,能够产生协同促凋亡作用,诱导肝细胞癌的癌细胞发生凋亡,抑制肿瘤的生长<sup>[70]</sup>。另外,一部分中药也是通过诱导肝癌细胞凋亡实现对肝癌的控制与治疗<sup>[71]</sup>。

## 7 总结和展望

肝脏作为机体中重要的代谢器官,其功能和状态对健康的影响是无可替代的。随着老龄化社会的到来,肝脏衰老已经对人类健康产生威胁,因此明确细胞凋亡对肝脏衰老的影响有重要意

义。当遭遇来自内源性或外源性的应激刺激时,肝脏细胞内蛋白质、脂质和 DNA 等受到损害并激活 P53, P53 可介导细胞自噬清理受损的蛋白质和线粒体等;对于受损的 DNA,一方面细胞内核苷酸切除修复等机制可对其进行修复,另一方面亦可通过 P53/P21 等通路使细胞进入 G1 期阻滞而发生 DNA 复制衰老,或由 P53 增强促凋亡蛋白如 Bax 诱导细胞凋亡。对于逃脱衰老和凋亡的细胞而言,肝脏细胞内受损 DNA 的逐渐积累可导致细胞癌变。因此,衰老和凋亡可被认为是细胞两种重要的抑癌途径。在老年性肝病中,如非酒精性脂肪肝病、肝纤维化、肝硬化和肝癌等,细胞凋亡不但和这些疾病的发生与演变密切相关,而且可为这些疾病提供治疗思路和策略。例如,肝脏实质细胞凋亡是肝纤维化的成因之一,而诱导 HSC 凋亡则是解决肝纤维化的关键。此外,细胞凋亡自身又是一个复杂的过程,是否发生凋亡可能和应激程度及细胞种类等有关。因此,现阶段仍需要更多细胞凋亡和肝脏衰老相关性的研究,以进一步阐明这二者的关系,从而为将来更好治疗临床肝脏衰老相关问题和相关疾病提供依据。

#### 参考文献(References):

- [1] Höhn A, Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy[J]. Redox Biology, 2013, 1: 140-144.
- [2] Fernández-García C, Rancan L, Paredes S D, et al. Xanthohumol exerts protective effects in liver alterations associated with aging[J]. European Journal of Nutrition, 2018, 8(30): 1-11.
- [3] Zeeh J, Platt D. The aging liver[J]. Gerontology, 2002, 48(3): 121-127.
- [4] Egnatchik R A, Leamy A K, Noguchi Y, et al. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes[J]. Metabolism Clinical & Experimental, 2014, 63(2): 283-295.
- [5] Cao L, Quan X B, Zeng W J, et al. Mechanism of hepatocyte apoptosis[J]. Journal of Cell Death, 2016, 9: 19-29.
- [6] Feldstein A E, Gores G J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Frontiers in Bioscience, 2005, 10: 3093-3099.
- [7] Hikita H, Takehara T. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins in liver injury[M]//Ding W X, Yin X M. Molecules, Systems and Signaling in Liver Injury. Cell Death in Biology and Diseases. New York: Springer, 2017: 75-85.
- [8] Ashkenazi A, Fairbrother W J, Levenson J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective Bcl-2 family inhibitors[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16(4): 273-284.
- [9] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. Current Biology, 2014, 24(10): R453-R462.

- [10] Olovnikov I A, Kravchenko J E, Chumakov P M. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2009, 19(1): 32–41.
- [11] Adams J M, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19(5): 488–496.
- [12] Vigneron A, Vousden K H. p53, ROS and senescence in the control of aging[J]. *Aging*, 2010, 2(8): 471–474.
- [13] Kewei W. Autophagy and apoptosis in liver injury[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(11): 1631–1642.
- [14] Kujoth G C, Hiona A, Pugh T D, *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging[J]. *Science*, 2005, 309(5733): 481–484.
- [15] Pinto M, Pickrell A M, Wang X, *et al.* Transient mitochondrial DNA double strand breaks in mice cause accelerated aging phenotypes in a ROS-dependent but p53/p21-independent manner[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2017, 24(2): 288–299.
- [16] Maiuri M C, Galluzzi L, Morselli E, *et al.* Autophagy regulation by p53[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(2): 181–185.
- [17] Ou H L, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process[J]. *Blood*, 2018, 131(5): 488–495.
- [18] Galanos P, Vougas K, Walter D, *et al.* Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing[J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(7): 777–789.
- [19] Demidenko Z N, Blagosklonny M V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(21): 3355–3361.
- [20] Carell T. DNA repair[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(51): 15330–15333.
- [21] Suh Y, Kang U G, Kim Y S, *et al.* Differential activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinases by methyl methanesulfonate in the liver and brain of rats: implication for organ-specific carcinogenesis[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(18): 5067–5073.
- [22] Park J Y, Cho M O, Leonard S, *et al.* Homeostatic imbalance between apoptosis and cell renewal in the liver of premature aging Xpd<sup>tm1</sup> mice[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2346.
- [23] Kim E M, Jung C H, Kim J, *et al.* The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(11): 3092–3100.
- [24] Debacq-Chainiaux F, Ben Ameur R, Bauwens E, *et al.* Stress-induced (premature) senescence[C]/Rattan S, Hayflick L. *Cellular Ageing and Replicative Senescence. Healthy Ageing and Longevity*. Switzerland: Springer, Cham, 2016: 243–262.
- [25] Wang Y, Wang X, Flores E R, *et al.* Dysfunctional telomeres induce p53-dependent and independent apoptosis to compromise cellular proliferation and inhibit tumor formation[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(4): 646–660.
- [26] Giorgadze S, Gujabidze N, Tevzadze N, *et al.* Apoptosis and proliferative activity of hepatocytes of white rats during aging[J]. *Georgian Medical News*, 2009, (174): 88–91.
- [27] Shahroudi M J, Mehri S, Hosseinzadeh H. Anti-aging effect of nigella sativa fixed oil on D-galactose-induced aging in mice[J]. *Journal of Pharmacopuncture*, 2017, 20(1): 29–35.
- [28] Xu L Q, Xie Y L, Gui S H, *et al.* Polydatin attenuates D-galactose-induced liver and brain damage through its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in mice[J]. *Food & Function*, 2016, 7(11): 4545–4555.
- [29] Zhu S Y, Dong Y, Tu J, *et al.* Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2014, 10(suppl. 1): S92–S99.
- [30] López-Lluch G, Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing[J]. *The Journal of Physiology*, 2016, 594(8): 2043–2060.
- [31] Ikeyama S, Wang X T, Li J, *et al.* Expression of the pro-apoptotic gene *gadd153/chop* is elevated in liver with aging and sensitizes cells to oxidant injury[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(19): 16726–16731.
- [32] Braidy N, Guillemin G J, Mansour H, *et al.* Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19194.
- [33] Mather M, Rottenberg H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 273(2): 603–608.
- [34] Mach J, Huizer-pajkos A, Kane A, *et al.* The effect of aging on mitochondrial and cytosolic hepatic intrinsic death pathway and apoptosis associated proteins in Fischer 344 rats[J]. *Experimental Gerontology*, 2015, 67: 54–61.
- [35] Harman D. Aging: overview[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, 928: 1–21.
- [36] Seo A Y, Xu J, Servais S, *et al.* Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences[J]. *Aging Cell*, 2008, 7(5): 706–716.
- [37] Zhang Y, Padalecki S S, Chaudhuri A R, *et al.* Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2007, 128(2): 213–221.
- [38] Prasad V, Chandele A, Jagtap J C, *et al.* ROS-triggered caspase 2 activation and feedback amplification loop in  $\beta$ -carotene-induced apoptosis[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41(3): 431–442.
- [39] Colantoni A, Idilman R, De Maria N, *et al.* Evidence of oxidative injury during aging of the liver in a mouse model[J]. *Journal of the American Aging Association*, 2001, 24(2): 51–57.
- [40] Farrell G C, George J, Hall P D L M, *et al.* *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders[M]*. Hoboken: Blackwell Publishing, 2007: 91–108.
- [41] Falckytter Y, Younossi Z M, Marchesini G, *et al.* Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2001, 21(1): 17–26.
- [42] Petersen K F, Befroy D, Dufour S, *et al.* Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance[J]. *Science*, 2003, 300(5622): 1140–1142.

- [43] Farrell G C, Larter C Z, Hou J Y, *et al.* Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2010, 24(3): 443–452.
- [44] Liu K, Lou J, Wen T, *et al.* Depending on the stage of hepatosteatosis, p53 causes apoptosis primarily through either DRAM-induced autophagy or BAX[J]. *Liver International*, 2013, 33(10): 1566–1574.
- [45] Wieckowska A, Zein N N, Yerian L M, *et al.* *In vivo* assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 27–33.
- [46] Xiao J, Guo R, Fung M L, *et al.* Garlic-derived S-allylmercaptocysteine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in a rat model through inhibition of apoptosis and enhancing autophagy[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013: 642920.
- [47] Pang L, Liu K, Liu D, *et al.* Differential effects of reticulophagy and mitophagy on nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 90.
- [48] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(2): 209–218.
- [49] Zhang Y, Zhang Q Q, Guo X H, *et al.* IGFBRP1 induces liver fibrosis by inducing hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis via Smad2/3 signaling[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(21): 6523–6533.
- [50] Kong X, Feng D, Wang H, *et al.* Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 1150–1159.
- [51] Delire B, Lebrun V, Selvais C, *et al.* Aging enhances liver fibrotic response in mice through hampering extracellular matrix remodeling[J]. *Aging*, 2016, 9(1): 98–113.
- [52] Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis[J]. *Journal of Hepatology*, 2001, 35(2): 297–306.
- [53] Bu F T, Chen Y, Yu H X, *et al.* SENP2 alleviates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by promoting activated hepatic stellate cell apoptosis and reversion[J]. *Toxicology Letters*, 2018, 289: 86–98.
- [54] Schuppan D, Afdhal N H. Liver cirrhosis[J]. *Lancet*, 2008, 371(9615): 838–851.
- [55] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907–1917.
- [56] Wiemann S U, Satyanarayana A, Tsahuridu M, *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis[J]. *FASEB Journal*, 2002, 36(9): 935–942.
- [57] Satyanarayana A, Rudolph K L. Telomeres and telomerase: distinctive roles in liver regeneration, cirrhosis and carcinogenesis [M]//Dufour J F, Clavien P A, Trautwein C, *et al.* *Signaling Pathways in Liver Diseases*. Heidelberg: Springer, 2005: 333–339.
- [58] Hoare M, Das T, Alexander G. Ageing, telomeres, senescence, and liver injury[J]. *Journal of Hepatology*, 2010, 53(5): 950–961.
- [59] Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, *et al.* Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 suppl. 1): S35–S50.
- [60] Xu X M, Yuan G J, Deng J J, *et al.* Hepatic oval cells activated by hepatocyte apoptosis in diethylnitrosamine-induced rat liver cirrhosis[J]. *Saudi Medical Journal*, 2010, 31(5): 490–494.
- [61] Kim W H, Matsumoto K, Bessho K, *et al.* Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis[J]. *The American Journal of Pathology*, 2005, 166(4): 1017–1028.
- [62] Cerella C, Grandjettette C, Dicato M, *et al.* Roles of apoptosis and cellular senescence in cancer and aging[J]. *Current Drug Targets*, 2016, 17(4): 405–415.
- [63] Roos W P, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis[J]. *Cancer Letters*, 2013, 332(2): 237–248.
- [64] Kong Y, Cui H, Ramkumar C, *et al.* Regulation of senescence in cancer and aging[J]. *Journal of Aging Research*, 2011, 2011: 963172.
- [65] Lu B, Chen H D, Hongguang H G. The relationship between apoptosis and aging[J]. *Advances in Bioscience & Biotechnology*, 2012, 3(6): 705–711.
- [66] Feng L L, Liu B X, Zhong J Y, *et al.* Effect of grape procyanidins on tumor angiogenesis in liver cancer xenograft models[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(2): 737–741.
- [67] Gan H Y, Li N, Zhang Q, *et al.* Silencing FOXA1 gene regulates liver cancer cell apoptosis and cell proliferation[J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2018, 22(2): 397–404.
- [68] Liao W W, Zhang C, Liu F R, *et al.* Effects of miR-155 on proliferation and apoptosis by regulating FoxO3a/BIM in liver cancer cell line HCCLM3[J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2018, 22(5): 1277–1285.
- [69] Hossain M A, Kim D H, Jang J Y, *et al.* Aspirin induces apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells in a nude mouse xenograft model[J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40(4): 1298–1304.
- [70] Hossain M A, Kim D H, Jang J Y, *et al.* Aspirin enhances doxorubicin-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40(5): 1636–1642.
- [71] Hu B, An H M, Wang S S, *et al.* Preventive and therapeutic effects of Chinese herbal compounds against hepatocellular carcinoma[J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 142