

DOI: 10.13376/j.cblls/2017064

文章编号: 1004-0374(2017)05-0485-04

细胞衰老与老龄化疾病

陈孟毅, 孟爱民*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

摘要: 随着人口老龄化加剧, 细胞衰老的生物学基础及其相关分子机制的研究已成为一个重要的研究方向。细胞衰老是多种因素引起的细胞周期永久性阻滞, 与老化疾病如糖尿病、骨质疏松、动脉粥样硬化、神经退行性疾病等有关。现介绍细胞衰老及细胞衰老与年龄相关疾病的分子生物学机制, 重点介绍衰老领域的最新研究进展: 清除衰老细胞能改善或延缓老龄化疾病, 延长机体寿命。

关键词: 衰老细胞; 老龄化疾病; 生物标志物; 清除

中图分类号: Q255; R339.38; R592 文献标志码: A

Cellular senescence and age-related diseases

CHEN Meng-Yi MENG Ai-Min*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Science
& Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: Cellular senescence, a process that imposes permanent proliferative arrest on cells in response to various stressors, has emerged as a potentially important contributor to aging and age-related diseases, such as diabetes, osteoporosis, dyskeratosis congenita, atherosclerosis, and neurodegenerative diseases. Here we review the molecular mechanisms of cellular senescence, and the role of senescence in ageing and age-related diseases. Additionally, we highlight the recent advances in the field of senescence: clearance of senescent cells may extend healthy lifespan.

Key words: cellular senescence; age-related disease; biomarker; clearance

1 细胞衰老

细胞衰老是由多种原因如过度增殖、活性氧(ROS)水平升高、致癌基因激活或抑癌基因失活等因素引起的细胞周期阻滞。Hayflick^[1]在1965年发现, 人原代成纤维细胞在体外培养经历了有限次数的传代后, 这些细胞进入了一个永久性的细胞周期阻滞状态, 随后称之为细胞衰老。细胞衰老主要有两种类型。(1)复制型细胞衰老: 随着细胞增殖分裂, 端粒逐渐缩短, 当缩短到临界最小长度, 丧失保护作用触发DNA损伤反应(DNA damage response, DDR), 继而引起细胞衰老; (2)早老型细胞衰老: 由多种方式如应激、致癌基因激活、诱导癌基因失活导致细胞周期阻滞, 继而引起细胞衰老^[2]。这些应刺激可激活不同的信号通路, 最终通过p53/p21和(或)

RB通路引起细胞周期阻滞^[3]。人类和小鼠细胞衰老分子机制不同。人类细胞参与衰老的信号通路是p53-p21-pRb和p16-pRb, 而小鼠中的信号通路是ARF-p53-p21-pRb, 并且小鼠的端粒要比人的长, 但小鼠细胞衰老依然受端粒限制。在人类细胞中, p16发挥的作用比p53更明显; 而在小鼠细胞中, p19像一个被癌基因精确激活的传感器诱导小鼠细胞衰老, 而p16不是至关重要的调节分子^[2]。

衰老是一种正常生理机制, 在整个胚胎发育过程中广泛存在^[4]。衰老对胚胎发育、伤口愈合^[5]、

收稿日期: 2016-11-04; 修回日期: 2016-12-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81372928, 81129020, 81573094)

*通信作者: E-mail: ai_min_meng@126.com

组织修复^[6]及肿瘤抑制有一定的作用。衰老对肿瘤的抑制主要体现在以下几方面：(1) 正常细胞需要越过细胞衰老进而发生癌变，因此细胞衰老可以有效抑制癌变的发生；(2) 在 DNA 复制和有丝分裂过程增殖阻滞降低了癌变概率；(3) 衰老细胞分泌的免疫调节物质触发固有免疫系统，有助于对早期癌细胞的清除^[3]。细胞衰老在很大程度上有利于机体的发育、再生和平衡，只有当衰老细胞积累到一定程度时才会对机体产生损害^[7]。

目前，在衰老领域提出了一些新概念，如辅助细胞周期 (assisted cell cycling)、多步骤衰老、急性与慢性衰老、有丝分裂后的细胞衰老等^[8]，这些概念涉及到衰老细胞在老化疾病中如何发挥作用。

2 衰老细胞的生物标志物

如何确定衰老细胞？首先，衰老细胞在形态上发生改变：细胞变大、变平、多核而且折光度增加^[2]。其次，可以根据细胞衰老的生物标志物进行判断，每一个理想的衰老“生物标志物”应满足以下标准：(1) 在正常老化过程中出现；(2) 实验性加快该标志物的衰老进程应能加快正常老化；(3) 实验性延缓该标志物的衰老进程应能延缓正常老化，延长健康寿命。即使仅限制某一方面的老化，延缓正常老化过程也是难以实现的^[9]。常用的能代表不同组织老化共同特征的 9 个生物标志物是：基因组不稳定、端粒缩短、表观遗传学改变 / 漂移、蛋白质内稳态丧失、感受器失调、线粒体功能障碍、细胞衰老、干细胞耗竭、细胞间信息交换改变^[9]。

3 衰老细胞与年龄相关性疾病

衰老细胞有两方面的危害：(1) 细胞衰老致使干祖细胞的细胞周期阻滞，导致组织修复能力减弱；(2) 衰老细胞可以分泌衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotypes, SASP) 因子，包括炎症因子及细胞因子、组织重建蛋白酶、生长因子等^[10]。这些因子可以影响各种生物学过程，包括细胞增殖、凋亡、炎症反应、上皮间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)、伤口愈合以及其他组织修复^[11]。衰老细胞分泌的 SASP 因子至少可通过 5 个不同的途径影响衰老过程^[8]，包括引起干细胞功能障碍、细胞外基质破坏、细胞异常分化 (构建异常组织结构)、无菌组织炎症刺激、诱导邻近细胞衰老，进而耗尽机体的干细胞和祖细胞，影响组织的平衡和再生，使组织再生潜力整体

下降，发生老化，出现组织功能障碍。衰老细胞堆积与老年性组织和器官功能障碍及各种慢性疾病有关，如骨质疏松、动脉粥样硬化、糖尿病、神经退行性疾病等^[12]。

衰老是一个动态过程，体内免疫细胞能够清除衰老细胞^[13-14]。随着机体年龄增长，衰老细胞在组织和器官积聚增加，这可能与机体免疫系统功能紊乱有关^[15]。一方面，与年龄相关的免疫缺陷可降低衰老细胞的清除效率，导致衰老细胞积聚增加；另外，与年龄相关的造血干细胞功能损伤对免疫系统的影响也是衰老细胞后期积聚增加的一个重要因素。其次，SASP 因子的复杂性也需引起重视：慢性衰老和急性衰老在老化疾病中都可以发挥作用，在伤口愈合、组织修复、胚胎发育等生理过程中出现的急性衰老细胞严格受生物学调控，SASP 中某些成分可吸引不同类型的免疫细胞清除急性衰老细胞，限制急性衰老细胞的积累与老化；相反，对于经细胞应激诱导的慢性衰老细胞，由于 SASP 因子成分的复杂性，使多种途径参与维持慢性衰老细胞持久的衰老状态。SASP 因子通过抵抗免疫细胞的清除作用导致组织恶化，也可能是衰老细胞积聚增加的一个机制^[8]。

2 型糖尿病 (T2DM) 和血管动脉粥样硬化是常见的老年病。动脉粥样硬化是动脉由于其中斑块而变狭窄的疾病，主要病变特征为动脉某些部位的内膜下脂质沉积，并伴有平滑肌细胞和纤维基质成分的增殖，逐步发展形成动脉粥样硬化性斑块。衰老细胞在动脉粥样硬化形成中有多种作用：首先，斑块起始于衰老内皮细胞，通过 SASP 及表面受体，可介导血循环中单核细胞入侵血管壁，并且衰老内皮细胞易于凋亡，从而引起内皮层的泄漏，使氧化低密度脂蛋白在血管壁外渗，使得衰老内皮细胞不能执行正常的信号传递任务，如分泌一氧化氮来抑制平滑肌细胞增殖及防止脂质过氧化，这可能是推动早期内膜增厚、动脉粥样硬化的危险因素；其次，衰老细胞分泌的 SASP 中的趋化因子包括细胞因子 MCP1 和已知功能的白细胞介素可以介导斑块生长；最后，衰老细胞可能有助于形成不稳定和容易破裂的“脆弱”斑块，导致急性并发症如脑卒中和心肌梗死^[10]。

4 清除衰老细胞

综上所述，衰老细胞对组织结构和功能稳态紊乱及衰老性疾病发生发展具有重要作用，因此，研

究者尝试了各种手段来清除衰老细胞。2011年, 美国梅奥医学中心 Baker 等^[16]利用 BubR1 早衰小鼠研究发现, 清除衰老细胞可以延缓与年龄相关的退行性疾病, 且没有明显的副作用, 表明清除衰老细胞可能是治疗老年性疾病、延长健康寿命的有效策略。

Zhu 等^[17]定义了一个新型药物“senolytics”, 它能选择性杀死衰老细胞。他们发现多酪氨酸激酶抑制剂达沙替尼 (Dasatinib, D) 可以清除衰老的人脂肪干细胞, 但对人内皮细胞效果较差; 而槲皮素 (Quercetin, Q) 在低浓度时能有效清除人内皮细胞中的衰老细胞, 对脂肪细胞无效。D + Q 联合用药可选择性杀伤衰老的脂肪细胞和内皮细胞。(1) 在体内实验中, 选用 24 月龄的老年小鼠, D 5 mg/kg 和 Q 50 mg/kg 联合用药, 发现体内 SA- β -Gal 阳性细胞减少, 肝脏中 p16 mRNA 阳性细胞减少, D + Q 治疗组在单次剂量 5 d 后其小鼠左心室的射血分数和短轴缩短率显著提高, 心血管功能得到改善。(2) 对运动能力的影响。4 个月大的雄性小鼠的一条腿 10 Gy 局部照射, 其余的身体被屏蔽, 对照组假照射。照射后 12 周, 照射腿毛发变成灰色, 运动能力降低; D + Q 单剂量给药 5 d 后, D + Q 治疗组小鼠的运动时间、距离、总的工作量优于溶剂对照组, 肌肉和腹股沟脂肪部位衰老标记的细胞减少。D + Q 治疗组可清除急性损伤衰老的细胞, 提高小鼠运动能力, 药效至少持续了 7 个月。(3) 为了证明 D + Q 的治疗可以延长健康寿命, 选用 4~6 周早老型 ERCC^{1/4} 小鼠模型, D 5 mg/kg 和 Q 50 mg/kg 联合经口给药, 给药后 10~12 周进行检测, 对与年龄相关的, 如脊柱后凸畸形、肌张力障碍、震颤、握力、损耗层条件、共济失调、大小便失禁, 以及步态受损、后肢瘫痪、身体状况不佳等症状进行综合评分, 采用定量 CT 观察小鼠腰椎骨参数改变, 并由病理学家对年龄相关的肝、肾、股和股骨组织 HE 染色进行盲评。实验结果表明, D + Q 治疗组的动物评分低于溶剂对照组, 能延缓如脊椎退化和骨质疏松症等老龄化症状。

2016 年, 美国梅奥医学中心 Baker 等^[18]利用 12 月龄和 18 月龄 *INK-ATTAC* 转基因小鼠进行了相关研究。这些转基因小鼠体内由 *Ink4a/ARF* 或 *CDKN2A* 基因调控的具有转录活性的启动子片段在衰老细胞中被激活, 从而启动 FKBP-Casp8 融合蛋白和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达, 每周两次注射 AP20187 能够使表达 p16^{Ink4a} 的细胞凋亡。在 12 月龄 *ATTAC* 小鼠的脂肪组织中,

收集腹股沟白色脂肪组织 (white adipose tissue, iWAT) 流式分选 GFP⁺ 和 GFP⁻ 细胞, 发现 GFP⁺ 细胞中 p16^{Ink4a} 和 *FKBP-Casp8* 转录水平高于 GFP⁻ 细胞, SA- β -Gal 染色与之正相关; SA- β -Gal 染色和 qRT-PCR 证实 18 月龄转基因小鼠 iWAT 中 p16^{Ink4a} 阳性细胞数量多于 12 月龄; 每周两次注射 AP20187 能够有效清除衰老细胞, 有效抑制 12 月龄和 18 月龄小鼠脂肪组织和脂肪细胞的丢失。此外, 将 12 月龄和 18 月龄的雄性和雌性 *ATTAC* 小鼠分为溶剂对照组和 AP 治疗组, 治疗组 AP20187 一个星期两次, 剂量 0.2 μ g/g, 观察小鼠肾脏和心脏的变化。在肾脏中, 衰老细胞可导致肾小球硬化、肾功能不全; 与溶剂对照组相比, AP 治疗组 SA- β -Gal 阳性细胞数降低, 肾小球硬化程度减轻、血尿素氮水平下降, 且硬化肾小球数量明显降低。心脏中 p16 阳性衰老细胞能诱导心肌老化, 导致老年性心肌细胞心肌肥大和心肌应激耐受性丧失。AP 治疗组与溶剂对照组相比, SA- β -Gal 阳性细胞数量减少、心肌细胞较小、X-gal 含量降低, 因此治疗组心肌耐受力增强。生存率组小鼠每周注射两次, 直到垂死或自然死亡, 通过观察生存率发现, 治疗组不论何种遗传背景寿命延长 17%~35%, 表明清除衰老细胞可延长寿命, 且实验小鼠在消除衰老细胞后, 机体并未出现明显的副作用。

周道洪教授团队通过筛选与衰老发生相关的小分子化合物, 发现 ABT263 能有效清除衰老细胞^[19]。清除衰老细胞可以减轻辐射诱导的骨髓早老性改变, 并且能使老年小鼠干细胞功能复原, 而 ABT263 能选择性杀死衰老细胞。体内实验中 ABT263 能有效杀死正常老龄化小鼠和亚致死剂量照射过的小鼠体内的衰老细胞, 包括骨髓和肌肉中的衰老“干细胞”; 体外实验以正常 WI-38 细胞作为对照, 发现 ABT263 能选择性杀死各种因素诱导的衰老细胞, 包括电离辐射诱导 WI-38 细胞衰老、WI-38 细胞复制型衰老、诱癌基因激活 WI-38 细胞衰老。p16-3MR 转基因小鼠可用于识别、跟踪和选择性地杀死体内 p16⁺ 细胞。3mr 基因能编码由 Renilla 荧光素酶 (用于生物发光成像)、单核红色荧光蛋白 (mRFP, 用于分选和荧光显微镜) 和单纯性疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-TK, 能将 GCV 转化为有毒的 DNA 链终止剂, 选择性地杀死 HSV-TK 表达的衰老细胞) 组成的融合蛋白。利用全身发光曝光成像技术, 与未照射的 p16-3MR 小鼠相比, 2 月龄的 p16-3MR 小鼠经亚致死剂量 (TBI) 6 Gy 照射后体内衰老细胞增

加。将转基因小鼠分为溶剂组 (Veh)、GCV 组和 ABT263 组 (ABT), 通过分析溶剂组和治疗组肺组织中 *Cdkn2a*、*Il1a*、*Tnfa*、*Ccl5* 和 *Cxcl10* mRNA 的表达, 证明 GCV 或 ABT263 能有效清除衰老细胞, 并且能抑制一些衰老相关的分泌型表达 (SASP)。因此, ABT263 治疗与 GCV 一样可有效清除 p16-3MR 小鼠经 IR 诱导产生的衰老细胞。在正常老化的小鼠体内, ABT263 同样可清除衰老细胞, 显著减弱肺组织中 *Cdkn2a*、*TNF- α* 、*Ccl5* mRNA 含量。

以上实验结果提示, 人类或许有可能开发出针对衰老细胞的药物, 清除衰老细胞或抑制其负面影响, 从而治疗老龄化相关的疾病, 延长人类健康寿命。

5 展望与讨论

目前普遍认为, 细胞衰老可以保护机体抑制癌变, 但研究证明细胞衰老又可以促进癌变, 如衰老的成纤维细胞可以促进上皮肿瘤细胞的发生^[20], 说明细胞衰老具有双重作用。

通过清除衰老细胞来治疗老化疾病是非常引人注目, 但是还有很多未知的问题需要解决。(1) 衰老细胞生物学标志物: 细胞衰老需要根据衰老生物学标志物判断, 那么衰老细胞生物学标志物之间的联系特点是什么, 它们对老化的相对贡献如何; (2) 衰老细胞清除的特异性: 如何靶向识别衰老细胞而不损害其他正常细胞, 如何让药物以最小的副作用改善老化过程中的人体健康; (3) 研究成果转化问题: 小鼠和人类的衰老机制是有差异的, 在小鼠模型体内衰老细胞的积累和清除转化到临床是否可靠。

在衰老领域, 除了利用小分子化合物清除衰老细胞, 通过激活或增强免疫反应对抗衰老细胞的细胞生物治疗是另一种具有潜在应用前景的策略。利用人体的免疫系统清除衰老细胞具有一定的可行性, 但这种方式需要更深入了解免疫系统在衰老细胞以及正常细胞中的分子生物学机制、免疫缺陷是否是与年龄有关的衰老细胞增加的主要原因、衰老细胞分泌的 SASP 是否能够抵抗免疫反应。由于衰老细胞缺乏特异性的抗原, 利用免疫系统清除衰老细胞或许具有一定的局限性。

毫无疑问, 人们将对体内细胞衰老的机制、特点和功能进行更深入的研究, 从而有效改善人类老龄化疾病, 延长人类健康寿命。

[参 考 文 献]

[1] Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid

- cell strains. *Exp Cell Re*, 1965, 37: 614-36
- [2] Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes Dev*, 2010, 24: 2463-79
- [3] Adams PD. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*, 2009, 36: 2-14
- [4] Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 2013, 155: 1119-30
- [5] Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* 2010, 12: 676-85
- [6] Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 2008, 134: 657-67
- [7] Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?. *EMBO Rep*, 2014, 15: 1139-53
- [8] VanDeursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 2014, 509: 439-46
- [9] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging. *Cell*, 2013, 153: 1194-217
- [10] Childs BG, Durik M, Baker DJ, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*, 2015, 21: 1424-35
- [11] Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 2008, 134: 657-67
- [12] Dolivo D, Hernandez S, Dominko T. Cellular lifespan and senescence: a complex balance between multiple cellular pathways. *Inside Cell*, 2016, 1: 36-47
- [13] Cecco MD, Criscione SW, Peckham EJ, et al. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*, 2013, 12: 247-56
- [14] Andre I, Jeff P, Indrani M, et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol*, 2013, 202: 129-43
- [15] Wang J, Geiger H, Rudolph KL. Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23: 532-6
- [16] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, et al. Clearance of p16^{Ink4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 2011, 479: 232-6
- [17] Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 2015, 14: 644-58
- [18] Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. Naturally occurring p16^{Ink4a}-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 2016, 530: 184-9
- [19] Chang J, Wang Y, Shao L, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*, 2016, 22: 78-83
- [20] Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 12072-7