

DOI: 10.13376/j.cblls/2020060

文章编号: 1004-0374(2020)05-0477-08

## 前景可观的senolytics延缓衰老的研究进展

魏君同, 李国荣\*

(山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

**摘要:** 细胞衰老呈现不可逆的永久性细胞周期停滞的状态, 它可以促进组织在发育过程中和损伤后的重塑, 但也会导致老年生物体组织再生潜力和功能的下降, 以及炎症和肿瘤的发生。研究发现, 清除衰老细胞可以延缓衰老相关疾病的发生。因此, 探究衰老细胞的分子特征与探索清除衰老细胞的新药成为衰老研究领域的热点。近年来, 人们发现一类称为 senolytics 的小分子化合物能特异性靶向衰老细胞并帮助清除衰老细胞, 从而延长哺乳动物的寿命及健康寿命。该文对衰老细胞的分子特征、作为衰老相关疾病的治疗靶点及具有 senolytics 活性的化合物作用机制和潜在应用进行了综述。

**关键词:** 衰老细胞; SASP; 衰老相关疾病; senolytics

**中图分类号:** Q255; R339.38; R917 **文献标志码:** A

## The progress of promising senolytics in delaying senescence

WEI Jun-Tong, LI Guo-Rong\*

(School of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

**Abstract:** Cellular senescence exhibits the irreversible and permanent state of cell cycle arrest, which can promote tissue remodeling during development and after injury, but can also lead to decreased tissue regenerative potential and function, inflammation and tumorigenesis in aged organisms. Studies have shown that the elimination of senescent cells can delay occurrence of aging-related diseases. Therefore, characterization and drug-based clearance of senescent cells have become the focus in the field of aging research. In recent years, small molecular compounds called senolytics have been found to specifically target senescent cells, thus prolonging the lifespan and healthspan of mammals. In this review, we discussed the molecular characteristics of senescent cells, targeting senescent cells as therapeutic strategy for aging-related diseases and the compounds with senolytics activity and their related mechanisms.

**Key words:** senescent cells; SASP; aging-related diseases; senolytics

细胞衰老是指有丝分裂期的细胞在经历内源或外源的压力损伤后永久性地退出细胞增殖周期。1961年, Hayflick 和 Moorhead 首次发现, 正常的人成纤维细胞在体外培养中经历了有限次数的传代后, 进入了一个永久性的细胞周期阻滞状态<sup>[1]</sup>。后来的研究发现, 细胞衰老可由端粒缩短或功能障碍、致癌基因诱导、DNA 损伤和突变及许多不同的细胞损伤相关刺激(蛋白质聚集、活性氧水平升高和其他代谢信号)引起<sup>[2]</sup>。细胞衰老在胚胎发育、组织修复、伤口愈合、肿瘤抑制和预防组织纤维化中发挥重要作用, 而越来越多的证据表明, 衰老细胞

可能在体内产生有害影响<sup>[3-5]</sup>。在个体衰老过程中, 衰老细胞不断积累并分泌炎症因子导致微环境发生改变, 阻碍组织再生与重塑, 促进肿瘤形成, 并造成功能受损和死亡风险增加<sup>[6-9]</sup>。衰老是一个动态过程, 衰老细胞虽然没有增殖, 但在新陈代谢和转录方面是活跃的。衰老细胞通过分泌大量的炎症因

收稿日期: 2020-01-16; 修回日期: 2020-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672377)

\*通信作者: E-mail: grli@sdnu.edu.cn; Tel: 0531-86182690

子改变组织微环境促进邻近细胞的衰老,并且招募免疫细胞以清除衰老细胞<sup>[10-11]</sup>。这些炎症因子,包括促炎细胞因子、趋化因子、蛋白酶、生长因子和其他的肽和蛋白质,被称为衰老相关分泌表型(senescence associated secretory phenotype, SASP)<sup>[12]</sup>。随着年龄的增长,免疫细胞对衰老细胞的清除效率下降,导致衰老细胞通过复制性衰老、程序性衰老和应激诱导的早衰积累<sup>[13]</sup>。衰老细胞的不断积累及SASP分泌的增加是导致衰老相关疾病(动脉粥样硬化、骨关节炎、阿尔茨海默症、2型糖尿病和癌症等)发生的主要因素<sup>[14]</sup>。因此,除了抑制衰老的发生外,另一种新方法是通过对衰老细胞,防止其积累来延缓衰老相关疾病。越来越多的证据表明,清除衰老细胞可以减少组织和器官的年龄依赖性退化,这对改善与年龄相关的疾病和减轻治疗引起的衰老细胞的副作用是有用的<sup>[15-16]</sup>。2015年,Kirkland实验室首次发现达沙替尼(Dasatinib)和槲皮素(Quercetin)联合用药可选择性诱导衰老的脂肪细胞和内皮细胞凋亡,他们把这一类能够选择性诱导衰老细胞凋亡的药物称为“senolytics”。Senolytics可以靶向多种与抗凋亡相关的通路,包括Bcl-2/Bcl-xL、PI3K/AKT、p53/p21/serpines、HIF-1 $\alpha$ 及ephrin ligand (EFN) B等,具有预防和治疗与年龄相关疾病的潜力<sup>[17]</sup>。本文就衰老细胞成为治疗与年龄相关疾病靶点的潜力,选择性诱导衰老细胞凋亡的化合物及其应用进行综述。

## 1 衰老细胞的分子特征

衰老细胞的特征主要表现为细胞体积变大、形态变扁平,衰老相关的 $\beta$ -半乳糖苷酶(senescence associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal)活性升高、衰老相关分泌表型(SASP)的积累、DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)的激活、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制剂p16(CDKN2A)和p21(CDKN1A)表达的增加、端粒功能异常,以及衰老相关异染色质病灶(senescence-associated heterochromatin foci, SAHF)的形成<sup>[18-22]</sup>。永久性的细胞周期阻滞是衰老细胞的基本特征,也是体外鉴定细胞衰老不可或缺的指标<sup>[21,23]</sup>。Dimri等<sup>[24]</sup>在衰老的人成纤维细胞和老化的人类皮肤中,通过细胞化学和组织化学检测到SA- $\beta$ -gal染色程度增加,后来发现其在多种类型人衰老细胞中都有表达,可作为一种衰老细胞的生物标志。有些特征,如SAHF的形成,在一定条件下可能观察不到,或

者在某些细胞类型中不存在,因此,SAHF不是衰老细胞的共同特征<sup>[25]</sup>。因此,观察几种不同表型的组合是鉴定衰老细胞存在的必要条件。Noren等<sup>[26]</sup>开发了体外鉴定衰老细胞的方法,即检测几个衰老相关的表型,包括SA- $\beta$ -gal、 $\gamma$ H2AX(DDR的标记物)和SAHF染色,及量化细胞周期调控和SASP因子的mRNA及蛋白质水平。Zhao等<sup>[27]</sup>使用观察细胞形态、SA- $\beta$ -gal染色和检测肿瘤抑制剂在体外和体内的表达来识别衰老细胞。2019年,Gorgoulis等<sup>[28]</sup>提出了鉴定衰老细胞的三步法:第一步,评估SA- $\beta$ -gal活性和(或)脂褐素积累(SBB或GL13染色);第二步,与存在(p16<sup>Ink4a</sup>、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>)或不存在(增殖标记,lamin B1)衰老细胞中常见的其他标记共同染色;第三步,确定在特定的衰老环境中可能被改变的因素(SASP、DDR等)。这种多标记的工作流程能够以最高的精度识别衰老细胞。Yosef等<sup>[29]</sup>研究表明,衰老细胞对凋亡的抵抗作用可以促进衰老细胞自身的生存,这可能是通过增加抗凋亡的Bcl-2家族蛋白的表达介导的,称为衰老细胞抗凋亡通路(senescence cell anti-apoptotic pathways, SCAPs)。由于衰老具有异质性,单一的特征很难精确表征细胞衰老的发生,因此,目前使用上述特征的组合对衰老细胞进行鉴定。

## 2 衰老细胞作为衰老相关疾病的治疗靶点

衰老细胞在许多生理过程中发挥积极作用,包括伤口愈合、组织纤维化和癌症治疗引起的组织应激反应;当衰老细胞长期积累在组织中无法清除时,则会破坏组织微环境,导致炎症与肿瘤发生<sup>[22]</sup>。因此,靶向衰老细胞为人们研究衰老和癌症的预防与治疗提供了一种新策略。

2011年,Baker等<sup>[15]</sup>首次利用p16<sup>Ink4a</sup>启动子建立了INK-ATTAC转基因的BubR1早衰小鼠模型,在人工合成药物AP20187作用下,ATTAC融合蛋白形成二聚体激活caspase8,从而导致表达p16<sup>Ink4a</sup>的细胞发生凋亡。他们发现清除了表达p16<sup>Ink4a</sup>的细胞后,转基因小鼠的寿命延长并且与p16<sup>Ink4a</sup>表达相关的疾病,包括白内障的形成、肌肉组织及皮下脂肪的萎缩都减轻了。在后续实验中,他们继续使用AP20187清除转基因C57BL/6小鼠体内p16<sup>Ink4a</sup>阳性的细胞,发现清除p16<sup>Ink4a</sup>阳性的细胞能延缓了淋巴瘤和肉瘤的发生,减轻与年龄相关的几个器官(肾脏、心脏和脂肪)的退化,并且未发现明显的副作用<sup>[16]</sup>。Palmer等<sup>[30]</sup>研究发现,衰老细胞积

聚在脂肪组织中导致代谢相关功能障碍, 使用 AP20187 清除转基因 *db/db* 肥胖小鼠皮下脂肪组织中的衰老细胞后延缓了肥胖相关炎症, 并且增强了葡萄糖耐受。另一种转基因模型是 *p16-3MR* 小鼠, 这是一种在 *p16<sup>Ink4a</sup>* 基因启动子控制下表达单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) 的转基因模型, 给予更昔洛韦 (Ganciclovir) 后可以靶向杀死 *p16<sup>Ink4a</sup>* 阳性的细胞。Childs 等<sup>[31]</sup>发现, 具有衰老标记的泡沫状巨噬细胞, 在动脉粥样硬化开始时聚集在内皮下空间, 通过增加关键致动脉粥样硬化和炎症的细胞因子与趋化因子的表达来驱动病理。低密度脂蛋白受体缺陷型 (*Ldlr<sup>-/-</sup>*) 小鼠容易发生动脉粥样硬化, 使用更昔洛韦减少 *Ldlr<sup>-/-</sup>* 小鼠的 *p16<sup>Ink4a</sup>* 阳性衰老细胞可以治疗动脉粥样硬化。利用这种转基因小鼠模型, 其他研究小组也报道了清除 *p16<sup>Ink4a</sup>* 阳性衰老细胞可以防止创伤后骨关节炎 (osteoarthritis) 的发展, 治疗退行性关节疾病<sup>[32]</sup>和年龄相关性椎间盘退变<sup>[33]</sup>及改善肥胖诱导的代谢功能障碍<sup>[30]</sup>。这些研究结果表明, 衰老细胞可以作为一个治疗靶点延缓年龄相关疾病的发生和发展。然而, 并不是所有高表达 *p16<sup>Ink4a</sup>* 的细胞都是衰老的<sup>[34-35]</sup>, 因此, 这些转基因小鼠模型在杀死衰老细胞的特异性和敏感性方面存在一定的局限。

### 3 靶向衰老细胞的化合物

近年来, 人们发现了一些独特地消除衰老细胞的化合物, 它们以衰老细胞的抗凋亡通路为靶点, 通过不依赖于 *p16<sup>Ink4a</sup>* 转基因的方法选择性地清除衰老细胞<sup>[2,17]</sup>, 这些化合物被称为“senolytics”(图1)。研究发现的 senolytics 包括达沙替尼和槲皮素、navitoclax (N; ABT-263)、萘苄酰胺、非瑟酮、A1331852、A1155463 和 EF24<sup>[30,36-37]</sup>。同时, 越来越多新的化

合物被证明具有类似于 senolytics 的作用, 如表没食子儿茶素没食子酸酯<sup>[38]</sup>。以下介绍了几个具有 senolytics 活性的化合物及其诱导衰老细胞凋亡的可能的机制。

#### 3.1 达沙替尼(Dasatinib)和槲皮素(Quercetin)

达沙替尼是一种口服小分子酪氨酸激酶抑制剂, 旨在抑制 Abelson (Abl) 和 Sarcoma (Src) 酪氨酸激酶, 并且在 c-KIT、血小板衍生生长因子受体 PDGFR- $\alpha/\beta$  和 ephrin 受体激酶中也有活性, 不仅可用于成人和儿童 Ph 阳性慢性粒细胞白血病, 也可干预 EFNB 依赖的细胞凋亡抑制<sup>[39]</sup>。达沙替尼在实体肿瘤治疗中的作用尚未明确, 但具有温和可控的副作用, 如血球减少和胸腔积液<sup>[40]</sup>。槲皮素是一种黄酮类化合物, 存在于水果、蔬菜、绿茶, 甚至红酒中, 具有抗氧化活性并能降低脂质过氧化、血小板聚集和毛细血管通透性<sup>[41]</sup>。Zaplatic 等<sup>[42]</sup>报道, 槲皮素能提高酿酒酵母的抗氧化应激能力和寿命, 并且作为神经保护剂在神经系统中具有多种药理作用, 可以逆转老年和乙醇中毒小鼠的认知缺陷, 延缓阿尔茨海默症, 表明槲皮素在延缓衰老和延长寿命方面具有治疗潜力。

2015年, Kirkland 实验室通过分析衰老细胞及增殖细胞的转录组, 发现衰老细胞中促细胞生存的关键因子表达上调, 通过 siRNA 沉默这些关键因子可以特异性地靶向衰老细胞并将其杀死<sup>[17]</sup>。之后, 他们以这些因子为靶点通过筛选化合物数据库, 发现了达沙替尼和槲皮素具有特异性靶向衰老细胞的作用。在细胞水平上, 达沙替尼可以降低衰老前脂肪细胞 (preadipocyte) 的存活能力, 并且通过抑制 EFNB 依赖的细胞凋亡抑制作用促进衰老细胞凋亡。槲皮素降低衰老的人脐静脉细胞 (human umbilical vein cells, HUVECs) 的存活能力依赖于抑制特定抗凋亡基因 (Bcl-2 家族、p53/p21/serpine 和 PI3K/AKT),

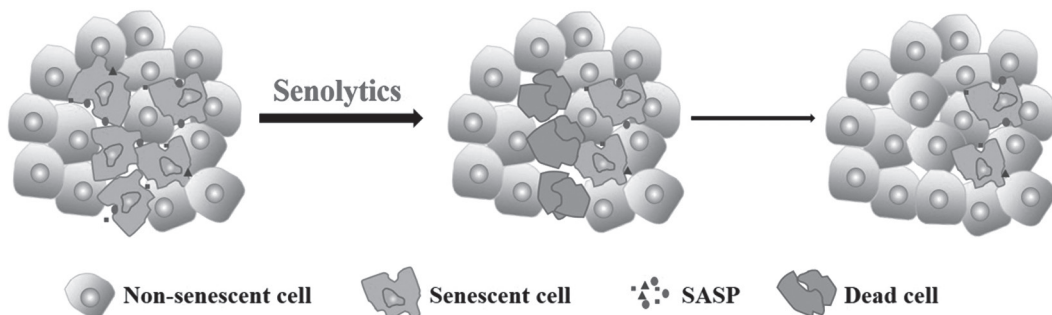


图1 Senolytics选择性杀死衰老细胞

与处于增殖的细胞相比,能更大程度地导致衰老的 HUVECs 细胞死亡。达沙替尼和槲皮素联合用药可选择性杀死衰老前脂肪细胞和内皮细胞,但是对非衰老细胞的凋亡无显著影响<sup>[17]</sup>。与单独使用这两种药物相比,联合用药显著减少了衰老的小鼠胚胎成纤维细胞和骨髓来源间充质干细胞的数量,只是不同的细胞类型存在差异性。在个体水平上,达沙替尼和槲皮素联合用药之后,减少了脂肪组织和肌肉组织中 SA- $\beta$ -gal 阳性细胞的数量,并且降低了 p16 的 mRNA 水平,改善了老年小鼠的心脏收缩功能及血管内皮功能。在老年或动脉粥样硬化小鼠中,达沙替尼和槲皮素联合治疗降低了晚期内膜斑块的成骨标志物,最终减少了内膜斑块的钙化<sup>[43]</sup>。肺泡上皮细胞衰老促进肺纤维化的发展,达沙替尼和槲皮素联合用药通过诱导纤维化小鼠衰老的肺泡上皮 II 型细胞的凋亡,减少 SASP 因子和细胞外基质标记物,并增加肺泡上皮标记物,从而减轻了特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)<sup>[44]</sup>。此外,移植相对少量的衰老前脂肪细胞至幼鼠体内被证明足以引起持续性的生理功能障碍,并使细胞衰老扩散到宿主组织,而达沙替尼和槲皮素联合治疗减轻了这些症状,提高了老年小鼠的存活率<sup>[45]</sup>。在高脂饮食诱导的肥胖小鼠中,达沙替尼和槲皮素联合治疗可以显著增强葡萄糖稳态、脂肪生成潜能并减少巨噬细胞向脂肪组织的归巢,减轻糖尿病并发症,从而改善代谢功能障碍<sup>[30]</sup>。在首次进行的人体小范围的临床试验中发现,达沙替尼和槲皮素的联合治疗可以直接清除肺衰老细胞以改善特发性肺纤维化,但试验未设置对照组,只是提供了研究的可行性而非药物的作用<sup>[46]</sup>。另一项 senolytics 治疗糖尿病慢性肾病患者功能障碍的临床试验也正在进行中,中期报告结果显示达沙替尼和槲皮素联合用药在一定程度上降低了皮肤和脂肪组织的衰老细胞负担,减少了由此产生的脂肪组织巨噬细胞的积累和循环系统中关键 SASP 因子的表达<sup>[47]</sup>,但该临床试验受试者较少,并且达沙替尼和槲皮素作为治疗药物的安全性尚不明确,其作用与副作用仍需进一步的评估。

### 3.2 ABT-263 (Navitoclax)

由于衰老细胞具有抵抗凋亡的特征,所以研究者也把 Bcl-2 抗凋亡蛋白家族作为 senolytics 药物研究的靶点。ABT-263 是一种特异性的 Bcl-2 和 Bcl-xL 的抑制剂,可以促进肿瘤细胞凋亡,在各种肿瘤类型中显示出良好的治疗潜力<sup>[48]</sup>。

2016 年,Chang 等<sup>[49]</sup>研究发现,ABT-263 可以促进经电离辐射、复制性衰老或致癌基因 Ras 处理诱导衰老的人 WI-38 肺成纤维细胞凋亡。经全身照射处理的年轻小鼠和自然衰老的老年小鼠经 ABT-263 灌胃后,不但衰老细胞的清除效果与 p16-3MR 小鼠注射更昔洛韦后的相同,而且 ABT-263 抑制了几种 SASP 因子 (IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、CCL5 和 CXCL10) 的表达<sup>[49]</sup>。这些结果首次验证了 ABT-263 具有 senolytics 活性,可以靶向衰老细胞。在 C57BL/6 小鼠中,胸部放射治疗会引起肺纤维化,与衰老细胞的显著增加有关,ABT-263 治疗后,出现了衰老细胞数量显著减少及病情逆转的现象<sup>[50]</sup>。其他实验室的补充研究证实, Bcl-2 蛋白家族是 senolytics 药物开发的一个有前途的分子靶点<sup>[51]</sup>。然而,ABT-263 以细胞类型和物种无关的方式对衰老的人胚肺成纤维细胞 (IMR-90)、人肾上皮细胞 (renal epithelial cells, RECs) 和小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryo fibroblasts, MEFs) 具有细胞毒性,并且 ABT-263 临床试验受到血小板减少症副作用的限制<sup>[49]</sup>,因此,在以后的研究中需要谨慎使用。

### 3.3 非瑟酮(Fisetin)

黄酮类化合物能够清除自由基,具有显著的抗氧化活性及生物学效应,并且可以有效增强凋亡信号通路,抑制癌细胞增殖。非瑟酮存在于各种水果和蔬菜中,属于多酚类黄酮,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗血管生成、降血脂和神经保护等多种生物活性,这些多用途的特性使非瑟酮成为一种优秀的抗癌药物<sup>[52]</sup>。非瑟酮可通过多种途径引发癌细胞凋亡:诱导 DNA 片段化,增加 caspase-3、-8 和 PARP 裂解,减少抗凋亡蛋白 (Bcl-2 和 Mcl-1) 的表达,增加促凋亡蛋白 (Bax、Bim 和 Bad) 的表达,降低 AKT 和 mTOR 的磷酸化并提高乙酰辅酶 A 羧化酶的表达,等等<sup>[53]</sup>。

2017 年,研究首次发现,非瑟酮可通过激活 PI3K/AKT 信号抑制 caspase 级联,选择性诱导衰老的 HUVECs 细胞凋亡,但对增殖的 HUVECs 无影响,但它在衰老的 IMR-90 细胞、人 WI-38 肺成纤维细胞或原代人前脂肪细胞中不具有 senolytics 活性<sup>[36]</sup>。使用非瑟酮对早衰和自然衰老小鼠进行急性或间歇性治疗,可降低多种组织中的衰老标志物。非瑟酮减轻了小鼠和人类脂肪组织中一部分细胞的衰老,显示了细胞类型的特异性。野生型小鼠在老年时口服非瑟酮能恢复组织稳态,进而减少与年龄有关的病理变化,并延长中位和最长寿命<sup>[54]</sup>。然而,非瑟

酮溶解度差、生物利用度低、具有亲脂性<sup>[52]</sup>, 且对正常细胞的潜在毒性尚未研究。因此, 为了安全用药与增强治疗效果, 还需探究非瑟酮的最佳给药方法。

### 3.4 茛菪酰胺(Piperlongumine)

茛菪酰胺是存在于胡椒科植物茛菪中的一种天然生物碱, 能够增加活性氧的水平, 并且具有抗血管生成、抗动脉粥样硬化、抗血小板聚集、抗糖尿病、抗抑郁、抗菌和抗肿瘤等多种生物学活性<sup>[55]</sup>。茛菪酰胺通过诱导氧化应激对癌细胞产生选择性的细胞毒作用, 从而抑制肿瘤生长, 且仅表现出微弱的全身毒性<sup>[56]</sup>。茛菪酰胺促进肿瘤细胞凋亡依赖于 PI3K/AKT/mTOR、JAK2/STAT3 和 ROS/JNK/ERK 等信号通路<sup>[57-58]</sup>。

2016年, Wang等<sup>[59]</sup>以衰老细胞抗凋亡通路为靶标, 从一个小分子文库中筛选出具有靶向衰老细胞的小分子。通过测定它们对正常人 WI-38 肺成纤维细胞和电离辐射诱导的衰老 WI-38 的细胞毒性, 发现了具有 senolytics 活性的茛菪酰胺。有趣的是, 与抑制某些癌症不同的是, 茛菪酰胺诱导细胞凋亡不依赖 ROS 的产生。随后, 使用基于茛菪酰胺的化学探针从活细胞中提取茛菪酰胺结合蛋白, 通过质谱分析识别在衰老细胞中潜在的茛菪酰胺分子靶点, 发现抗氧化蛋白 1 (oxidation resistance 1, OXR1) 就是其中之一, 它调节多种抗氧化酶的表达。在衰老的人 WI-38 肺成纤维细胞中 OXR1 表达上调, 茛菪酰胺直接与 OXR1 结合, 通过泛素-蛋白酶体系统以衰老细胞特异性方式诱导 OXR1 的蛋白酶体降解, 从而选择性杀死衰老细胞; 用 short hairpin RNA (shRNA) 敲低 OXR1 可下调抗氧化酶的表达和增加 ROS 产生, 诱导衰老的 WI-38 细胞凋亡, 提示 OXR1 是茛菪酰胺诱导衰老细胞凋亡的靶点<sup>[60]</sup>。这些发现为衰老细胞高度抗氧化应激的机制提供了新的见解。

### 3.5 EF24 (一种姜黄素类似物)

姜黄素是从姜黄根茎中提取的一种疏水多酚, 具有延缓衰老与衰老相关疾病的作用, 还能延长果蝇和线虫的寿命, 然而, 2018年, Yousefzadeh等<sup>[54]</sup>研究显示姜黄素本身只具有较弱的 senolytics 活性。EF24 是一种很有前途的姜黄素类似物, 与姜黄素相比, 它显示出更高的生物利用度和多种有效的生物活性, 包括抗炎、抗菌、抗血管生成及神经保护<sup>[61]</sup>; EF24 还可以治疗各种实体肿瘤和白血病<sup>[62-63]</sup>。EF24 抑制癌细胞增殖或者诱导癌细胞凋亡是通过多种途

径完成的, 如抑制 NF- $\kappa$ B、HIF-1 $\alpha$  活性和调节 ROS<sup>[64]</sup>。2019年, Li等<sup>[37]</sup>研究发现, EF24 具有 senolytics 活性, 不仅降低了电离辐射诱导的衰老细胞的存活率, 也通过一种不依赖于 ROS 产生的方式降低了复制性衰老或致癌基因 Ras 异位转染诱导的衰老细胞的存活率。更重要的是, EF24 对不同类型的衰老细胞具有广谱的 senolytics 活性, 包括 IMR-90 细胞、HUVECs 和 RECs。EF24 与 ABT-263 协同作用抑制 Bcl-xL 和 Mcl-1 的表达, 从而诱导衰老细胞而非增殖细胞凋亡, 但 EF24 靶向衰老细胞的作用机制、靶点及对衰老相关疾病的作用尚未明确。

### 3.6 表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)

流行病学调查表明, 饮用绿茶具有许多健康益处, 如降低心血管疾病、糖尿病和各种癌症等许多慢性病的风险, 这主要归功于绿茶中主要的生物活性化合物 EGCG, 它是一种黄酮-3-醇多酚<sup>[65]</sup>。EGCG 主要被肠道吸收, 肠道菌群在其吸收前的代谢中起着至关重要的作用。EGCG 具有多种生物活性, 包括抑制氧化应激和炎症反应, 降低血脂和血糖及抑癌作用<sup>[66]</sup>。研究表明, EGCG 可以通过抑制 p53 乙酰化来抑制人皮肤成纤维细胞的复制衰老。2019年, Kumar等<sup>[38]</sup>研究发现, EGCG 不仅能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路延迟衰老表型的获得, 还可以通过调控 Bax/Bcl-2 促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导衰老的前脂肪细胞凋亡, 表明其具有潜在的、温和的 senolytics 活性。然而, 对于 EGCG 作为 senolytics 的证据还不充分, 还需要进一步的研究来补充证明。

此外, 一些药物通过靶向 p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase)、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\alpha$  和 mTOR 等通路抑制衰老细胞分泌的 SASP 因子, 从而延缓衰老<sup>[67-68]</sup>。在致癌基因 Ras 诱导衰老的 IMR-90 细胞中, 二甲双胍 (Metformin) 阻止 NF- $\kappa$ B 易位到细胞核, 并且抑制了 I $\kappa$ B 和 IKK $\alpha/\beta$  的磷酸化, 从而下调了 SASP 因子的表达<sup>[69]</sup>。小鼠缺血性视网膜细胞过早衰老并分泌 SASP 因子会加剧病理性血管生成, 喂食二甲双胍则降低了视网膜中 SASP 相关因子 IL-6、IL-8 和 VEGF 的表达, 从而抑制高浓度氧诱导的小鼠缺血性视网膜早衰<sup>[70]</sup>。雷帕霉素 (Rapamycin) 通过抑制 mTOR 降低 IL-6 mRNA 水平, 从而抑制衰老的成纤维细胞引发的小鼠前列腺肿瘤生长<sup>[71]</sup>。天然黄酮类化合物芹菜素 (Apigenin) 和山柰酚 (Kaempferol) 通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性有效降低了博来霉素 (Bleomycin) 诱导衰老的 BJ 成纤维细胞中

SASP 因子的增加, 且芹菜素喂食老年大鼠后有效抑制了肾脏中 SASP 因子的表达, 缓解了慢性炎症<sup>[72]</sup>。另外, 特异性中和单克隆抗体 (Mab-IL-6.8) 通过 JAK/STAT 信号通路抑制 IL-6 的表达<sup>[73]</sup>, 并在灵长类动物模型中缓解骨关节炎症状<sup>[74-75]</sup>。本实验室之前的研究表明, 白藜芦醇 (Resveratrol) 通过 SIRT1/NF- $\kappa$ B 通路抑制肠道中的 SASP, 从而延缓贡氏假鳃鳞的衰老<sup>[76]</sup>。

#### 4 展望与研究前景

衰老细胞存在于衰老过程中的各种组织中, 特别是在与年龄相关疾病 (老年痴呆症或骨关节炎等) 患者的受影响组织中<sup>[77]</sup>。衰老细胞的积累已被证明是一个推动衰老过程的关键原因, 因此, 清除衰老细胞可以作为延缓衰老相关疾病的一个新策略。

本文综述了几种具有 senolytics 活性的化合物, 这些化合物经过实验研究都可以靶向清除衰老细胞, senolytics 联合使用产生更佳效果。为更好地探究 senolytics 的作用, 还需对以下问题进行深入研究: (1) 靶向衰老细胞首先就需要从衰老细胞的特征入手, 因此, 需要精确的标记来鉴定衰老细胞; (2) 大多 senolytics 化合物发挥清除作用的确切机制尚不清楚, 它们的分子靶点没有被明确地阐述, 也无法对其进行修饰以提高杀伤活性; (3) Senolytics 多数为天然产物, 具有多种生物活性; 探索这些药物的靶点将有助于深入了解天然产物的作用机制; (4) 大多数化合物的作用是通过体外实验证明的, 在动物模型及临床研究中还未涉及, 迫切需要在体内研究中进行更加深入的验证; (5) 除了已被验证的抗凋亡通路靶点, 其他的衰老细胞清除方法及干扰措施还有待研究。利用动物模型深入探究延缓衰老相关疾病的药物及其机制, 将为预防和治疗人类年龄依赖的疾病提供重要的参考价值。

#### [参 考 文 献]

- [1] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961, 25: 585-621
- [2] Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine*, 2017, 21: 21-8
- [3] 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
- [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] Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*, 2014, 15: 1139-53
- [6] Faragher RGA, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays*, 1998, 20: 985-91
- [7] Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 2004, 114: 1299-307
- [8] Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, et al. Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc. *Spine*, 2007, 32: 321-7
- [9] Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 978-90
- [10] Biran A, Krizhanovsky V. Senescent cells talk frankly with their neighbors. *Cell Cycle*, 2015, 14: 2181-2
- [11] Contrepois K, Coudereau C, Benayoun BA, et al. Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat Commun*, 2017, 8: 14995
- [12] Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 2008, 6: e301
- [13] Burton DGA, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 4373-86
- [14] Wei W, Ji S. Cellular senescence: molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 9121-35
- [15] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, et al. Clearance of p16<sup>Ink4a</sup>-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 2011, 479: 232-6
- [16] Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. Naturally occurring p16<sup>Ink4a</sup>-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 2016, 530: 184-9
- [17] Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 2015, 14: 644-58
- [18] Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, 1990, 249: 1129-33
- [19] Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G<sub>2</sub> arrest after DNA damage. *Science*, 1998, 282: 1497-501
- [20] Sedivy JM. Can ends justify the means?: telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9078-81
- [21] Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes Dev*, 2010, 24: 2463-79
- [22] Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol*, 2018, 28: 436-53
- [23] Gavrilov LA, Gavrilova NS. The biology of lifespan: a quantitative approach[M]. New York: Harwood Academic Publisher, 1991
- [24] Dimri GP, 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: 9363-7
- [25] Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, et al. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16<sup>ink4a</sup>. Cell Cycle, 2011, 10: 457-68
- [26] Noren Hooten N, Evans MK. Techniques to induce and quantify cellular senescence. J Vis Exp, 2017: 55533
- [27] Zhao J, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, et al. Quantitative analysis of cellular senescence in culture and *in vivo*. Curr Protoc Cytom, 2017, 79: 9.51.1-9.51.25
- [28] Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular senescence: defining a path forward. Cell, 2019, 179: 813-27
- [29] Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. Nat Commun, 2016, 7: 11190
- [30] Palmer AK, Xu M, Zhu Y, et al. Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. Aging Cell, 2019, 18: e12950
- [31] Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, et al. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. Science, 2016, 354: 472-7
- [32] Jeon OH, Kim C, Laberge RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nat Med, 2017, 23: 775-81
- [33] Patil P, Dong Q, Wang D, et al. Systemic clearance of p16<sup>INK4a</sup>-positive senescent cells mitigates age-associated intervertebral disc degeneration. Aging Cell, 2019, 18: e12927
- [34] Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, et al. p16<sup>INK4a</sup> and senescence-associated  $\beta$ -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli. Aging (Albany NY), 2017, 9: 1867-84
- [35] Okuma A, Hanyu A, Watanabe S, et al. p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Cip1/Waf1</sup> promote tumour growth by enhancing myeloid-derived suppressor cells chemotaxis. Nat Commun, 2017, 8: 2050
- [36] Zhu Y, Dornnebal EJ, Pirtskhalava T, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X<sub>L</sub> inhibitors, A1331852 and A1155463. Aging (Albany NY), 2017, 9: 955-63
- [37] Li W, He Y, Zhang R, et al. The curcumin analog EF24 is a novel senolytic agent. Aging (Albany NY), 2019, 11: 771-82
- [38] Kumar R, Sharma A, Kumari A, et al. Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax/Bcl-2 pathway. Biogerontology, 2019, 20: 171-89
- [39] McCafferty EH, Dhillon S, Deeks ED. Dasatinib: A review in pediatric chronic myeloid leukemia. Paediatr Drugs, 2018, 20: 593-600
- [40] Lindauer M, Hochhaus A. Dasatinib. Recent Results Cancer Res, 2014, 201: 27-65
- [41] Li Y, Yao J, Han C, et al. Quercetin, inflammation and immunity. Nutrients, 2016, 8: 167
- [42] Zaplatic E, Bule M, Shah SZA, et al. Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer's disease. Life Sci, 2019, 224: 109-19
- [43] Roos CM, Zhang B, Palmer AK, et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. Aging Cell, 2016, 15: 973-7
- [44] Lehmann M, Korfei M, Mutze K, et al. Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis *ex vivo*. Eur Respir J, 2017, 50: 1602367
- [45] Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. Nat Med, 2018, 24: 1246-56
- [46] Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. EBioMedicine, 2019, 40: 554-63
- [47] Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. EBioMedicine, 2019, 47: 446-56
- [48] Li X, Li B, Ni Z, et al. Metformin synergizes with BCL-XL/BCL-2 inhibitor ABT-263 to induce apoptosis specifically in p53-defective cancer cells. Mol Cancer Ther, 2017, 16: 1806-18
- [49] 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
- [50] Pan J, Li D, Xu Y, et al. Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses persistent pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2017, 99: 353-61
- [51] Zhu Y, Tchkonja T, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. Aging Cell, 2016, 15: 428-35
- [52] Mehta P, Pawar A, Mahadik K, et al. Emerging novel drug delivery strategies for bioactive flavonol fisetin in biomedicine. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1282-91
- [53] Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, et al. Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. Nutr Cancer, 2004, 50: 90-100
- [54] Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. EBioMedicine, 2018, 36: 18-28
- [55] Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, et al. Overview of the therapeutic potential of pipartine (piperlongumine). Eur J Pharm Sci, 2013, 48: 453-63
- [56] Piska K, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, et al. Piperlongumine (pipartine) as a lead compound for anticancer agents - Synthesis and properties of analogues: a mini-review. Eur J Med Chem, 2018, 156: 13-20
- [57] Thongsom S, Suginta W, Lee KJ, et al. Piperlongumine

- induces G<sub>2</sub>/M phase arrest and apoptosis in cholangiocarcinoma cells through the ROS-JNK-ERK signaling pathway. *Apoptosis*, 2017, 22: 1473-84
- [58] Farooqi AA, Attar R, Yaylim I, et al. Piperlongumine as anticancer agent: the story so far about killing many birds with one stone. *Cell Mol Biol*, 2018, 64: 102-7
- [59] Wang Y, Chang J, Liu X, et al. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8: 2915-26
- [60] Zhang X, Zhang S, Liu X, et al. Oxidation resistance 1 is a novel senolytic target. *Aging Cell*, 2018, 17: e12780
- [61] Adams BK, Cai J, Armstrong J, et al. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer Drugs*, 2005, 16: 263-75
- [62] Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, et al. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12: 3871-83
- [63] Skoupa N, Dolezel P, Ruzickova E, et al. Apoptosis induced by the curcumin analogue EF-24 is neither mediated by oxidative stress-related mechanisms nor affected by expression of main drug transporters ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 2289
- [64] He Y, Li W, Hu G, et al. Bioactivities of EF24, a novel nuncumin analog: a review. *Front Oncol*, 2018, 8: 614
- [65] Gan R, Li H, Sui Z, et al. Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): an updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58: 924-41
- [66] Sharma R, Sharma A, Kumari A, et al. Consumption of green tea epigallocatechin-3-gallate enhances systemic immune response, antioxidative capacity and HPA axis functions in aged male swiss albino mice. *Biogerontology*, 2017, 18: 367-82
- [67] Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 2013, 123: 966-72
- [68] Sun Y, Coppé JP, Lam EW. Cellular senescence: the sought or the unwanted? *Trends Mol Med*, 2018, 24: 871-85
- [69] Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-κB activation. *Aging Cell*, 2013, 12: 489-98
- [70] Oubaha M, Miloudi K, Dejda A, et al. Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 362ra144
- [71] Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 1049-61
- [72] Lim H, Park H, Kim HP. Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96: 337-48
- [73] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 2008, 133: 1019-31
- [74] Shaw S, Bourne T, Meier C, et al. Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling. *MAbs*, 2014, 6: 774-82
- [75] Jeon OH, Kim C, Laberge RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med*, 2017, 23: 775-81
- [76] Liu S, Zheng Z, Ji S, et al. Resveratrol reduces senescence-associated secretory phenotype by SIRT1/NF-κB pathway in gut of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 80: 473-9
- [77] Lasry A, Ben-Neriah Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol*, 2015, 36: 217-28