

细胞衰老与抗衰老药物senolytics的研究进展

马兴杰^{1*} 欧金磊¹ 王焱²

(¹扬州大学附属医院, 重症医学科, 扬州 225000; ²扬州大学附属医院, 肾内科, 扬州 225000)

摘要 细胞衰老是一种稳定的增殖抑制并伴有衰老相关的分泌表型(SASP)。其发生主要是由于细胞在复制过程中端粒酶的消耗以及外界衰老相关刺激如癌基因激活、活性氧积聚、DNA损伤等。短期内衰老细胞的产生有助于机体胚胎发育、损伤修复和肿瘤抑制等; 而机体内长期积聚衰老的细胞会导致肿瘤的发生、机体老化和老化相关的疾病。近年来研究发现, 特异性清除体内衰老细胞有助于延缓机体老化、重塑身体机能等; 这再次将衰老相关的研究推向了一个新的高度。该文将从细胞衰老的主要特征、生理学功能、发生机制及抗衰老药物senolytics的发展等方面进行讨论, 并结合相关研究的最新进展, 为衰老及相关疾病的防治提供理论依据。

关键词 细胞衰老; p16; p53; senolytics

Current Advances in Cellular Senescence and Senolytics

MA Xingjie^{1*}, OU Jinlei¹, WANG Yao²

(¹Department of Intensive Care, the Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225000, China;

²Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract Cellular senescence is mainly described as a stable cell cycle arrest and SASP (senescence-associated secretory phenotype). Theoretically, senescence is mainly induced by diverse stimuli including telomere shortening, oncogene activation, oxidative stress and DNA damage. It has been demonstrated that time dependent short-term induction of cellular senescence plays beneficial roles in terms of embryonic development, wound healing and tumor suppression; whereas long-term accumulation of senescent cells in tissues is harmful and may contribute to cancer progression, aging or age-associated disorders. Recent studies have demonstrated that selectively killing senescent cells can extend healthy lifespan and restore physical function, which bring the senescence field to an even higher interesting grade than ever before. Here, the review will discuss the characters, functions and mechanisms of cellular senescence, together with the development of senolytics, thus aiming to provide theoretical targets for aging and age-related diseases.

Keywords cellular senescence; p16; p53; senolytics

1961年, HAYFLICK和MOORHEAD^[1]在培养人胚胎原代成纤维细胞时意外发现, 细胞在分裂约50代后进入了增殖停滞的状态; 后来研究者在培养其他原代细胞时也观察到了类似的现象, 并将其命名为复制性细胞衰老(replicative senescence)。几十年

后, HARLEY等^[2]才证实这种复制性衰老是由于细胞在复制过程中出现了失误: 即DNA聚合酶在细胞分裂过程中不能完全合成滞后链, 致使染色体末端保护其结构稳定的端粒受损。端粒的长度随着细胞的复制逐渐缩短, 直至染色体末端完全裸露, 最终导

收稿日期: 2020-05-12 接受日期: 2020-06-08

扬州大学附属医院高层次人才科研启动金(批准号: 2019MXJ)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0514-82981199, E-mail: xingjie.ma@yzu.edu.cn

Received: May 12, 2020 Accepted: June 8, 2020

This work was supported by the Research Foundation for Advanced Scholars in the Affiliated Hospital of Yangzhou University (Grant No.2019MXJ)

*Corresponding author. Tel: +86-514-82981199, E-mail: xingjie.ma@yzu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5375>

致DNA损伤及细胞衰老的发生。研究者根据这一特性,设计了在细胞内稳定表达编码端粒酶的*hTert*基因以阻止端粒在细胞复制过程中的消耗,最终成功地在体外构建了永生化的原代细胞系^[3]。尽管体内衰老的细胞维持代谢活性,但其增殖能力的丧失是机体在细胞水平上老化的表现,因此也被称为生理性衰老。

然而,除了端粒缩短导致的生理性衰老,学者们发现外界还存在其他刺激能够导致细胞衰老的发生,并将其统称为病理性细胞衰老或过早衰老(*pre-mature senescence*)。这种刺激主要分为两大类:一类是由于体外细胞培养过程中细胞生长环境(例如氧浓度和营养物质含量等)的改变导致的衰老,此类应激导致的细胞衰老可以通过改善培养条件使细胞重新进入到周期循环中^[4];另一类主要包括癌基因激活(如*ras*、*raf*、*myc*等)、活性氧(*reactive oxygen species*, ROS)积聚、热应激以及DNA损伤等,这些刺激促使细胞进入了不可逆的周期抑制状态^[5]。研究表明,这些刺激主要通过诱导DNA损伤、激活p38激酶(p38MAPK)通路、NF- κ B途径或激活细胞周期抑制因子引发周期抑制,促使细胞永久性脱离周期循环,最终诱发体内或体外的过早衰老。

1 细胞衰老的主要特征

细胞衰老的主要特征之一是稳定的增殖抑制,目前细胞周期抑制是体内或者体外鉴定细胞衰老的重要辅助手段^[6]。然而需要注意的是,增殖抑制并不是衰老的唯一特征;例如静止期和终末分化期的细胞均表现为增殖抑制的状态,但静止期的细胞在合适的生长条件下可以重新进入到细胞周期中,而终末分化期细胞中没有衰老相关因子(例如p16和p53)的大量表达^[7]。然而有趣的是,有研究发现,沉默*p53*衰老因子或白细胞介素因子可以在体内逆转细胞衰老,让衰老细胞重新进入细胞周期中并分裂繁殖^[8-9]。

细胞衰老的另一个重要特点是分泌大量的促炎因子,包括白细胞介素、趋化因子和生长因子等,这些衰老细胞的分泌物被统称为衰老相关分泌表型(*senescence-associated secretory phenotype*, SASP)^[10]。SASP在体内具有许多功能,例如这些分泌因子能够促使机体免疫系统快速识别并清除衰老的细胞^[11];SASP一方面通过自分泌的途径增强细胞衰老的特

征,另一方面通过旁分泌方式促使周围细胞进入衰老状态^[12];另外SASP能够在一定程度上促进细胞增殖、肿瘤发展与转移以及上皮间充质转化(*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT)等^[13]。近几年研究发现,衰老的细胞也分泌大量包含脂质和miRNA的囊泡(*small extracellular vesicles*, sEVs),这些sEVs参与组成SASP并诱导旁分泌途径的细胞衰老^[14]。

此外,衰老的细胞与正常增殖的细胞相比还具有许多其他特征。通常情况下,衰老的细胞与细胞间的接触减弱,与细胞外基质的黏附增强^[15]。从表型上看,一方面,癌基因*ras*激活或DNA损伤诱导的细胞衰老主要表现为扁平状、平铺变大、核浓缩等特点;而*raf*或*mek*癌基因激活导致的细胞衰老主要表现为细长、纺锤形等特征^[6]。另一方面,衰老的细胞或组织中积聚大量的溶酶体,其分泌的 β 半乳糖苷酶可以在pH为6的条件下将X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indoyl β -D-galactopyranoside)化合物分解,产生不溶的蓝色物质^[16]。研究发现,衰老细胞的这种特性是由于编码 β 半乳糖苷酶的*GLB1*基因的大量表达;因此,在静止期或终末分化期的细胞中,无法检测到这种衰老相关的 β 半乳糖苷酶(*senescence-associated- β -galactosidase*, SA- β -gal)活性^[17]。然而也有研究发现,在正常的巨噬细胞和破骨细胞中也存在较强的SA- β -gal活性,这在一定程度上限制了SA- β -gal作为衰老特异性标志的广泛应用^[18]。另外,NARITA等^[19]通过DAPI染色发现在衰老的人成纤维细胞的细胞核中存在大量点状的DNA灶,并可以很容易地与正常细胞区分开,因此作者将其命名为衰老相关异染色质集落(*senescence-associated heterochromatic foci*, SAHF)。后来研究发现,衰老刺激促使Wnt信号通路下调,驱使组蛋白细胞周期调节缺陷A型(*histone cell cycle regulation defective A*, HIRA)向早幼粒细胞白血病蛋白(*promyelocytic leukemia protein*, PML)核体转移,最终在染色体上形成了SAHF^[20]。除了以上主要特征外,人们还发现了许多其他的衰老特异性的因子,例如*Sprouty2*、*Smurf2*、核膜蛋白B1(*nuclear lamina protein lamin B1*, LMNB1)、衰老相关蛋白降解(*senescence-associated protein degradation*, SAPD)^[21],以及近些年鉴定的miRNAs(例如miR-24)等^[22]。

然而,目前尚没有任何一个因子能够作为衰老的唯一特异性标志物,国际公认的衰老鉴定方法是联合应用两个以上衰老标记物并结合增殖因子

Ki-67或溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine, BrdU)的检测。因此,当前鉴定新的细胞衰老特异性因子显得尤为重要,尤其是目前体内的衰老标志物日益无法满足当前衰老领域的快速发展。

2 细胞衰老的生理学功能

多种刺激因素可以导致细胞衰老,而细胞衰老也可以导致多种病理生理学特征。机体短期内细胞衰老的产生可以促进胚胎发育、损伤修复以及肿瘤抑制等;而由于衰老细胞分化停止、胞内细胞凋亡途径被抑制、促炎性因子的大量释放,机体内长期积聚衰老的细胞会导致机体老化、老化相关疾病甚至肿瘤的发生(图1)^[7]。

基因组学分析表明,人类几乎所有癌症中均存在在p16或p53这两个衰老的主要调控因子的缺失或突变^[23-24]。事实上,癌基因激活诱导的稳定细胞周期阻滞或细胞的复制性衰老被认为是抑制肿瘤发生发展的重要机制之一。例如,癌基因诱导的衰老(oncogene induced senescence, OIS)可以抑制淋巴瘤的发展并且有助于提高患者对治疗的良性反应^[25]。在K-Ras小鼠模型中,OIS可能有助于限制肺和胰腺肿瘤的进展^[26]。正常情况下,衰老细胞分泌的SASP可通过肿瘤细胞的旁分泌途径使其他肿瘤细胞的周期受到抑制,从而促进邻近细胞衰老的发生以及最终的肿瘤抑制^[27]。然而,也有研究发现,衰老细胞分泌的SASP中所包含的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白细胞介素、趋化因子等也可以通过自分泌的形式促进肿瘤的发生发展^[28]。有人推测,SASP的这种双重作用可能取决

于细胞或组织类型以及分泌特点(急性或慢性)和剂量^[29]。

研究表明,胎盘发育过程中细胞之间的融合可以导致细胞衰老。这种细胞与细胞间紧密接触诱导的衰老(fusion-induced senescence, FIS)常常伴有p16和p53衰老通路的激活以及ROS的积聚和DNA损伤的发生;此外,小鼠模型显示,抑制胎盘中p16-Rb通路能够导致胎盘功能障碍甚至胚胎死亡^[30]。研究证实,衰老细胞扁平 and 充盈的状态有助于维持胎儿-胎盘内环境稳定;另外一些SASP因子(例如IL8)为孕期胎盘生长所必需的物质,也能够维持胎儿的免疫能力^[31]。除了胎盘外,在胚胎发育过程中,衰老细胞在胎儿的组织生长、器官形成和组织完整性等方面也起着重要作用^[32]。

另外有研究发现,在小鼠皮肤损伤的几天内,其伤口部位有大量p16蛋白的表达及衰老的成纤维细胞和内皮细胞的出现;而清除p16阳性的细胞后,小鼠的伤口愈合能力明显减弱,这表明,细胞衰老能够促进伤口愈合^[33]。后来研究证实,衰老细胞分泌的SASP中血小板源性生长因子AA(platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA)、IL6和IL8等参与了伤口部位修复的过程^[9,34]。

细胞衰老参与机体老化及相关疾病。机体老化是指随着时间的推移,组织和器官的功能逐渐丧失,而在这些老化的组织中发现有大量的衰老细胞。此外,研究证实,老化导致的p16表达增多导致干细胞的再生能力受到了明显的限制;而特异性清除p16阳性的衰老细胞能够延缓机体老化并延长小鼠寿命^[35]。衰老细胞诱导组织老化可能是由于SASP的自分泌

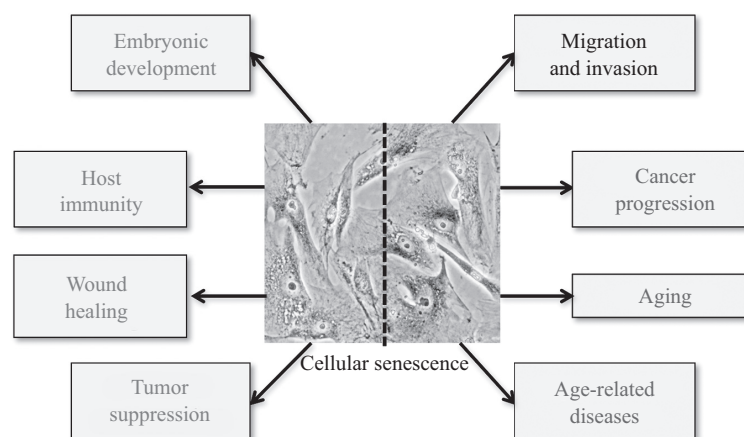


图1 细胞衰老的主要生理学功能

Fig.1 The main physiopathological functions of cellular senescence

和旁分泌过程^[36]。此外,许多老化相关的疾病,例如肺纤维化、阿尔兹海默病、慢性阻塞性肺疾病、2型糖尿病及心血管疾病等都与细胞衰老有关^[7]。研究发现,在动脉粥样硬化疾病中p16的表达明显上调;而在动脉粥样硬化的小鼠模型体内清除p16阳性的巨噬细胞后,病变组织的斑块明显变小^[37]。另外,骨关节炎部位也被证实存在衰老细胞的积聚^[38]。目前,尽管在衰老相关疾病中,许多衰老相关的因子(例如SA- β -gal、SASP因子、p16、p21等)明显上调;然而为了进一步掌握衰老在相关疾病中担任的具体角色,当前对于鉴定新的、易操作的、特异性强的体内衰老检测标志物仍然迫在眉睫。

3 细胞衰老的分子机制

细胞复制过程受细胞周期因子(cyclin dependent kinase, CDK)及周期抑制因子家族(cyclin dependent kinase inhibitor, CDKI)的调控。CDK家族主要由CDK1、CDK2、CDK4、CDK6及CDK7等组成;CDKI家族主要包括p15、p16、p21、p27和p57等。CDKIs可以通过与不同的cyclin-CDK复合物结合并抑制其活性,从而在不同的阶段终止细胞周期。

在细胞衰老过程中,细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CD-

KN2A)编码的p16蛋白表达上调,p16可与CDK4/6结合并阻止肿瘤抑制因子Rb(retinoblastoma)的磷酸化及下游转录因子E2F的激活,从而将细胞周期阻滞在G₁/S期^[39]。p16蛋白的大量表达能够导致ROS的积聚和蛋白激酶PKC δ (protein kinase C δ)的激活,而PKC δ 的激活又可以反过来促进ROS的产生^[40]。研究表明,Polycomb蛋白复合物(polycomb repressive complex, PRC)通过与多种转录因子的直接相互作用以及组蛋白甲基化抑制p16的转录水平,而下调EZH2、SUZ12、BMI1、CBX7等PRC复合物的成员蛋白可以导致p16水平上调和细胞衰老^[41]。另外,在机体生理性衰老、癌基因诱导的衰老和DNA损伤刺激(包括端粒功能障碍、电离辐射、氧自由基和一些化疗药物)等条件下,p16的表达水平也明显上调(图2)^[42-43]。

p53基因因为具有保护基因组稳定性的功能又被称为人类基因的守护者,另外也由于其抑癌的特点,p53基因在人类大多数的癌症中发生了突变^[44-45]。p53在正常生长细胞中的表达量极低;但是在DNA损伤、细胞周期抑制和血管增生等损伤刺激下,它可以快速大量地表达并诱导损伤的细胞进入衰老或凋亡程序^[46]。p53诱导细胞衰老主要通过其在转录水平上激活下游细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂

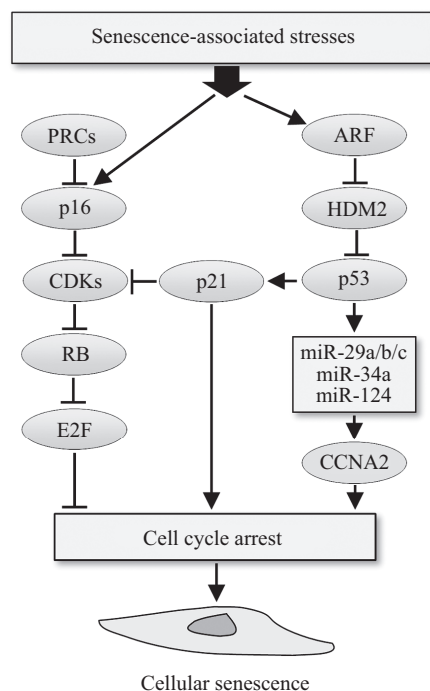


图2 细胞衰老的主要分子通路

Fig.2 The main molecular pathways triggering cell cycle arrest in cellular senescence

p21以及转录因子E2F7或最近新发现的miRNAs/CCNA2通路^[47-49]。而p21又通过抑制Rb的磷酸化参与p16调控的细胞衰老^[50],因此,p16与p53的活性密切相关,协同维持机体衰老信号网络的稳定(图2)。

近些年,细胞内钙信号通路在细胞衰老中的作用越来越受到重视,并逐渐被认为是调控衰老的重要因素。研究发现,在生理性衰老和应激诱导的衰老中,细胞内钙水平明显升高。例如WIEL等^[51]在人乳腺上皮细胞中发现,在衰老相关刺激下,细胞内的钙离子通过内质网上的钙通道IP3R2(IP3 receptor 2)释放并通过线粒体钙感应器(mitochondrial calcium uniporter, MCU)积聚到线粒体中,导致线粒体膜电位下降,ROS积聚,最终导致细胞衰老。此外,衰老相关刺激导致的细胞内钙超载一方面能够促使细胞内钙依赖蛋白酶Calpain大量表达,激活促炎因子IL1 α ,从而调控SASP的释放^[52]。另一方面,钙传感蛋白Calmodulin可与胞质中游离的钙离子结合,激活钙调蛋白Calcineurin,去磷酸化NFAT,从而触发NFAT的细胞核内转移并调节衰老相关的靶基因的表达^[53]。然而KEGG数据库中已经发现大约有180个蛋白参与钙信号通路,而目前仅发现少数几个钙信号通路分子参与调控细胞衰老^[54],因此,我们对于钙信号与细胞衰老关系的认识很可能只是冰山一角。

除以上衰老调控通路外,已有的研究发现,NF- κ B及C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein β)信号通路参与调控SASP的分泌^[55];促炎因子IL1 α 也被发现可作为SASP的上游调控因子^[56];而雷帕霉素通过抑制mTOR(mammalian target of rapamycin)通路下调IL1 α 水平以及NF- κ B转录活性,从而调控绝大多数SASP的表达^[57]。转化生长因子TGF- β (transforming growth factor- β)能够通过诱导p21的表达来调控细胞衰老过程^[58]。此外,许多miRNAs(microRNAs)(例如miR-21、miR-24和miR-

34a等)已被证实通过多种信号途径参与调控细胞衰老^[59]。目前国内外还有许多的学者在致力于鉴定新的细胞衰老调节因子,试图进一步揭开细胞和机体衰老机制的面纱。

4 清除衰老细胞

近些年研究发现,特异性清除小鼠体内衰老细胞能够重塑组织稳态、延缓机体老化(图3)。例如BAKER等^[60-61]发现,p16蛋白失活可抑制骨骼肌、眼和脂肪中衰老细胞的形成,同时可以延长*BubR1*敲除小鼠的寿命^[35];随后他又在人工诱导的早衰小鼠和自然衰老的小鼠体内,发现特异性清除p16阳性的衰老细胞可以预防或延缓组织功能障碍。后来,研究者致力于寻找能够代替此类基因工具的特异性清除衰老细胞的药物(senolytics),并取得了良好的成果。下面我们将列举几种不同的抗衰老化合物,以了解当前senolytics的发展情况。

4.1 D+Q

研究已证实,遗传方法可以通过清除衰老细胞促进早衰小鼠身体机能恢复,为寻找类似的小分子药物,2015年美国梅奥诊所的KIRKLAND团队^[62]根据衰老细胞抗凋亡的特点,发现沉默细胞内抗凋亡的相关基因可以特异性杀死衰老细胞。团队人员进一步针对靶向这些抗凋亡基因的药物进行了筛选,发现组合药物达沙替尼(dasatinib)和槲皮素(querce-tin)可以特异性杀死衰老的脂肪细胞和内皮细胞,并将此类药物命名为senolytics。研究发现,D+Q联合用药可以通过清除老年小鼠体内衰老细胞改善其心血管功能;提升人工诱导早衰小鼠的运动能力、减轻与年龄相关的症状、骨质疏松以及椎间盘蛋白多糖的丢失。

4.2 ABT-263/Navitoclax

为进一步寻找此类senolytics小分子药物,研究

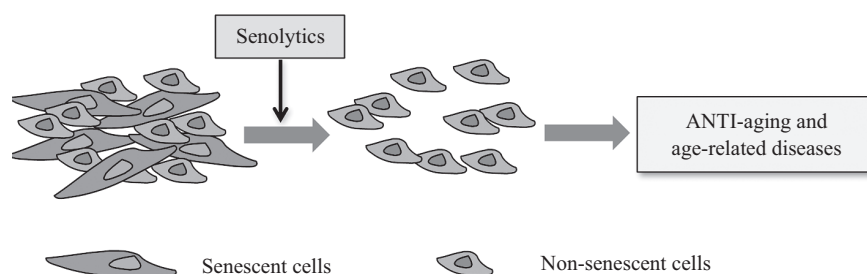


图3 清除衰老细胞有助于延缓衰老及老化相关疾病

Fig.3 Eliminating senescent cells counteracts aging and age-related diseases

者进行了药物筛选并得到一种可以经口给药的抗肿瘤药物ABT-263(navitoclax),并在人工诱导的早衰小鼠或自然老龄小鼠体内进行了验证,结果发现,ABT-263不仅能有效清除骨髓和肌肉中衰老的细胞,还能使正常老年小鼠干细胞功能复原。ABT-263的工作原理是通过抑制抗凋亡蛋白BCL-2和BCL-XL的活性,诱导凋亡蛋白的表达并促进衰老细胞死亡。这一发现有益于研究对衰老组织干细胞的功能恢复,同时对减轻辐射损伤以及在老年性疾病治疗方面具有重要意义^[63-64]。后来也有研究发现,其他的ABT药物(例如ABT-737)也是通过抑制抗凋亡蛋白家族成员的活性以激活凋亡相关蛋白表达的方式,促使衰老细胞进入凋亡过程^[65]。然而,后来越来越多的研究发现,此类药物可能对正常细胞和组织具有一定的副作用,例如可以在一定程度上诱导正常增殖细胞凋亡,导致血小板和中性粒细胞减少等^[66]。

4.3 FOXO4-DRI

研究发现,衰老的细胞具有抗凋亡的能力主要是因为衰老细胞中FOXO4(forkhead box O4)大量表达并聚集到细胞核中,通过与p53结合并抑制其磷酸化,最终抑制了p53介导的细胞凋亡过程。据此有研究设计了一种能够在蛋白结构上干扰FOXO4功能的FOXO4右旋异构体FOXO4-DRI(FOXO4-D-retro inverso)肽,它可以竞争性抑制FOXO4与p53的结合,从而使衰老细胞中的p53重获自由,行使其促凋亡功能。研究者发现,FOXO4-DRI肽能够特异性诱导衰老细胞凋亡,并且与其他senolytics药物例如ABT-737相比,FOXO4-DRI肽对非衰老细胞的毒性较小。作者们将此药物应用到人工诱导的早衰小鼠及正常老龄化的小鼠模型中发现,FOXO-DRI肽能够促使衰老小鼠的毛发增多、体温恢复正常、活跃度变强以及在一定程度上恢复肾功能等^[67]。

4.4 SSK1

目前绝大多数senolytics药物都是通过抑制特定的抗凋亡通路实现特异性杀死衰老细胞的功能;然而由于不同类型的衰老细胞激活不同的抗凋亡途径,因此这些靶向特定抗凋亡通路的化合物无法清除不同种类的衰老细胞,因而具有明显的局限性。另外它们在杀死衰老细胞的同时会对周围健康细胞也有一定的损害。因此,研究者们另辟蹊径,根据衰老细胞普遍具有SA- β -gal活性的特点,设计并合成了一个新的靶向 β 半乳糖苷酶的抗衰老化合物

SSK1(senescence-specific killing compound 1)。SSK1本身不具有细胞毒性,当其进入到细胞后,SSK1的 β 半乳糖苷键则迅速被衰老细胞所特有的SA- β -gal切割分解,释放有毒性的吉西他滨(gemcitabine)分子并杀死衰老细胞;而在非衰老细胞中,由于低浓度的SA- β -gal切割SSK1的半乳糖苷键效率较低,因此SSK1对此类细胞没有杀伤作用。研究者发现,SSK1能够广泛性地杀死不同刺激诱导的衰老细胞且对正常增殖细胞无影响。此外,动物实验发现,SSK1不仅能够减少老龄小鼠体内的衰老细胞数量,而且可以延缓老龄小鼠的肝肾衰老、减少血液中炎症因子的释放、改善小鼠的身体机能(运动能力、肌肉力量、平衡和探索能力等)并且(即使在高浓度下)对小鼠机体的多项指标均无明显副作用^[68]。这为抗衰老药物的研发提供了新的思路。

5 结语和展望

经过半个多世纪的发展,细胞衰老相关领域的研究已取得了傲人的成绩,人们对于衰老的认知也越来越清晰。然而由于目前尚缺乏体内衰老的特异性标志物,导致衰老相关的研究受到一定的限制。好在近几年衰老小鼠模型的构建在一定程度上填补了这个空缺,例如在编码p16的CDKN2A基因的启动子上插入带有荧光的RLUC(renilla luciferase)的p16:3MR转基因小鼠^[33],实现了对衰老的可视化研究。

近几年,关于特异性清除衰老细胞有助于延缓机体老化、重塑组织稳态的发现,再次将衰老领域的研究推向了一个新的高潮。Senolytics药物也应势而生,我们对于治疗衰老相关的疾病似乎看到了新的希望。然而,作为新生事物,senolytics也还存在许多问题。首先,大多数senolytics仅针对单一的抗凋亡蛋白家族,不仅广谱性不强,而且特异性也不高,目前需要研究能够广泛地靶向其他凋亡因子或衰老特异性靶点的新药物,值得欣慰是,当前已有许多研究在尝试新的senolytics靶点并已取得良好的结果。其次,在实际临床应用之前,有关senolytics对健康细胞的潜在毒性和可能的脱靶效应导致的对健康细胞或组织的损伤需要仔细并慎重研究。第三,由于衰老具有多种对机体有益的生理学功能,所以在有选择地清除组织中的衰老细胞后,跟进研究这一行为对整个机体的长期负面影响十分必要。最后,由于目前体内衰老的标记物和检测方

法存在不足,使得在不同的衰老相关疾病中,衰老细胞的具体影响及其实际功能尚不完全清楚,因此,寻找新的简便的方法来检测以及量化衰老显得十分迫切^[69]。然而至少目前来看, senolytics对于延缓衰老、治疗老化相关疾病以及癌症等具有巨大的优势和潜力。

参考文献 (References)

- [1] HAYFLICK L, MOORHEAD P S. The serial cultivation of human diploid cell strains [J]. *Exp Cell Res*, 1961, 25(3): 585-621.
- [2] HARLEY C B, FUTCHER A B, GREIDER C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts [J]. *Nature*, 1990, 345(6274): 458-60.
- [3] BODNAR A G, OUELLETTE M M, FROLKIS M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 349-52.
- [4] PARRINELLO S, SAMPER E, KRTOLICA A, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(8): 741-7.
- [5] SALAMA R, SADAIE M, HOARE M, et al. Cellular senescence and its effector programs [J]. *Gene Dev*, 2014, 28(2): 99-114.
- [6] KUILMAN T, MICHALOGLOU C, MOOI W J, et al. The essence of senescence [J]. *Gene Dev*, 2010, 24(22): 2463-79.
- [7] HE S, SHARPLESS N E. Senescence in health and disease [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 1000-11.
- [8] BEAUSEJOUR C, KRTOLICA A, GALIMI F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways [J]. *EMBO J*, 2003, 22(16): 4212-22.
- [9] COPPE J P, PATIL C K, RODIER F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(12): 2853-68.
- [10] RODIER F, COPPE J P, PATIL C K, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(8): 973-9.
- [11] RAO S G, JACKSON J G. SASP: tumor suppressor or promoter? Yes [J]! *Trends Cancer*, 2016, 2(11): 676-87.
- [12] RODIER F. Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 965: 165-73.
- [13] COPPE J P, DESPREZ P Y, KRTOLICA A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression [J]. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5: 99-118.
- [14] MENSA E, GUESCINI M, GIULIANI A, et al. Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1725285.
- [15] BEN-PORATH I, WEINBERG R A. The signals and pathways activating cellular senescence [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2005, 37(5): 961-76.
- [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* [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9363-7.
- [17] LEE B Y, HAN J A, IM J S, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase [J]. *Aging Cell*, 2006, 5(2): 187-95.
- [18] KOPP H G, HOOPER A T, SHMELKOV S V, et al. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall [J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22(9): 971-6.
- [19] NARITA M, NU EZ S, HEARD E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence [J]. *Cell*, 2003, 113(6): 703-16.
- [20] SADAIE M, SALAMA R, CARROLL T, et al. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence [J]. *Gene Dev*, 2013, 27(16): 1800-8.
- [21] SHARPLESS N E, SHERR C J. Forging a signature of *in vivo* senescence [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(7): 397-408.
- [22] GORGOULIS V, ADAMS P D, ALIMONTI A, et al. Cellular senescence: defining a path forward [J]. *Cell*, 2019, 179(4): 813-27.
- [23] PRIESTLEY P, BABER J, LOKKEMA M P, et al. Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours [J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 210-6.
- [24] BEROUKHIM R, MERMEL C H, PORTER D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers [J]. *Nature*, 2010, 463(7283): 899-905.
- [25] MORGNER A, SCHMELZ R, THIEDE C, et al. Therapy of gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma [J]. *World J Gastroentero*, 2007, 13(26): 3554-66.
- [26] SINGH M, LIMA A, MOLINA R, et al. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models [J]. *Nature Biotechnol*, 2010, 28(6): 585-93.
- [27] HOARE M, ITO Y, KANG T W, et al. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(9): 979-92.
- [28] LIU X L, DING J, MENG L H. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(10): 1553-8.
- [29] RUHLAND M K, COUSSENS L M, STEWART S A. Senescence and cancer: an evolving inflammatory paradox [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1865(1): 14-22.
- [30] BURTON D G A, KRIZHANOVSKY V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(22): 4373-86.
- [31] BOWEN J M, CHAMLEY L W, KEELAN J A, et al. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition [J]. *Placenta*, 2002, 23(4): 257-73.
- [32] JOVANOVIĆ M, STEFANOSKA I, RADOJČIĆ L, et al. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$ [J]. *Reproduction*, 2010, 139(4): 789-98.
- [33] DEMARIA M, OHTANI N, YOUSSEF S A, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA [J]. *Dev Cell*, 2014, 31(6): 722-33.
- [34] ACOSTA J C, O'LOGHLEN A, BANITO A, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence [J]. *Cell*, 2008, 133(6): 1006-18.
- [35] BAKER D J, CARMEN P T, FANG J, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(7): 825-36.

- [36] CHILDS B G, DURIK M, BAKER D J, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy [J]. *Nat Med*, 2015, 21(12): 1424-35.
- [37] CHILDS B G, BAKER D J, WIJSHAKE T, et al. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis [J]. *Science*, 2016, 354(6311): 472-7.
- [38] JEON O H, KIM C, LABERGE R M, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment [J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 775-81.
- [39] LUKAS J, PARRY D, AAGAARD L, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16 [J]. *Nature*, 1995, 375(6531): 503-6.
- [40] AKIKO T, NAOKO O, KIMI Y, et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(11): 1291-7.
- [41] BRACKEN A P, KLEINE-KOHLBRECHER D, DIETRICH N, et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells [J]. *Gene Dev*, 2007, 21(5): 525-30.
- [42] JIAN-HUA C, KAI S, SARAH K, et al. Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49439-46.
- [43] JACOBS J J L, LANGE T D. Significant role for p16INK4a in p53-Independent telomere-directed senescence [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(24): 2302-8.
- [44] MATLASHEWSKI G, LAMB P, PIM D, et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene [J]. *EMBO J*, 1984, 3(13): 3257-62.
- [45] HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, et al. p53 mutations in human cancers [J]. *Science*, 1991, 253(5015): 49-53.
- [46] LIU J, ZHANG C, FENG Z H. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants incancer [J]. *ABBS*, 2014, 46(3): 170-9.
- [47] HERBIG U, WEI W, DUTRIAUX A, et al. Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence [J]. *Aging Cell*, 2015, 2(6): 295-304.
- [48] OZLEM A, AGUSTIN C, TIANYING Z, et al. The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence [J]. *Gene Dev*, 2012, 26(14): 1546-57.
- [49] XU S, WU W, HUANG H, et al. The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: complement of the canonical p53/p21 pathway [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12918.
- [50] RAYESS H, WANG M B, SRIVATSAN E S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16 [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(8): 1715-25.
- [51] WIEL C, LALLET-DAHER H, GITENAY D, et al. Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3792.
- [52] MCCARTHY D A, CLARK R R, BARTLING T R, et al. Redox control of the senescence regulator interleukin-1 α and the secretory phenotype [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(45): 32149-59.
- [53] MANDA K R, TRIPATHI P, HSI A C, et al. NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence [J]. *Oncogene*, 2016, 35(25): 3282-92.
- [54] MARTIN N, BERNARD D. Calcium signaling and cellular senescence [J]. *Cell calcium*, 2018, 70: 16-23.
- [55] CHIEN Y, SCUOPPO C, WANG X, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity [J]. *Gene Dev*, 2011, 25(20): 2125-36.
- [56] SONA H, KATERINA K, JIRI B, et al. IL1- and TGF β -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence' [J]. *Aging (Albany NY)*, 2012, 4(12): 932-51.
- [57] HERRANZ N, GALLAGE S, MELLONE M, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(9): 1205-17.
- [58] SENTURK S, MUMCUOGLU M, GURSOY-YUZUGULLU O, et al. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth [J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 966-74.
- [59] BISCHOF O, MART NEZ-ZAMUDIO R I. MicroRNAs and lncRNAs in senescence: a re-view [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(4): 255-67.
- [60] BAKER D J, WIJSHAKE T, TCHKONIA T, et al. Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders [J]. *Nature*, 2011, 479(7372): 232-6.
- [61] BAKER D J, CHILDS B G, DURIK M, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan [J]. *Nature*, 2016, 530(7589): 184-9.
- [62] ZHU Y, TCHKONIA T, PIRTSKHALAVA T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs [J]. *Aging Cell*, 2015, 14(4): 644-58.
- [63] CHANG J, WANG Y, SHAO L, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice [J]. *Nat Med*, 2016, 22(1): 78-83.
- [64] ZHU Y, TCHKONIA T, FUHRMANN-STROISSNIGG H, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors [J]. *Aging Cell*, 2016, 15(3): 428-35.
- [65] YOSEF R, PILPEL N, TOKARSKYAMIEL R, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 11190.
- [66] VAN DEURSEN J M. Senolytic therapies for healthy longevity [J]. *Science*, 2019, 364(6441): 636-7.
- [67] BAAR M P, BRANDT R M C, PUTAVET D A, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging [J]. *Cell*, 2017, 169(1): 132-47.e16.
- [68] CAI Y S, ZHOU H H, ZHU Y H, et al. Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice [J]. *Cell Res*, 2020, 30(7): 574-89.
- [69] ZHANG B, LAM E W, SUN Y. Senescent cells: a new achilles' heel to exploit for cancer medicine [J]? *Aging Cell*, 2019, 18(1): e12875.