

特约综述



周斌博士, 现任中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员、博士生导师、研究组长。该实验室以谱系示踪及遗传操作技术研究器官发育与组织再生中(干)细胞的起源、转归、功能及其命运可塑性的分子调控机制。代表性论文发表在Nature、Science、Nat Med、Nat Genet等学术期刊上。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=168>

细胞衰老研究现状

赵欢 周斌*

(细胞生物学国家重点实验室, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 细胞衰老作为生物学界研究的一大热点, 其与正常胚胎发育、机体老化、衰老相关疾病等都有着密切的联系。近些年来, 对细胞衰老的研究越来越深入, 其发挥的生物学作用也越来越受到重视。为进一步加深对细胞衰老的认识, 该文主要对细胞衰老的概念、分子机制、检测标志物及与疾病的关系作一简单综述。

关键词 细胞衰老; SA-bGal; P16^{Ink4a}; P53; P21^{Cip1}

Current Research Status of Cellular Senescence

Zhao Huan, Zhou Bin*

(The State Key Laboratory of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract As one of the hottest biological research topics, cellular senescence has a close relationship with embryonic development, normal aging process and age-related diseases. Study along with cellular senescence development continuously thorough, its essential role in biological field receives more and more attention. To provide a useful reference of this field and push the research more deeply, the concept, mechanisms, cellular markers and relationships with diseases of cellular senescence in current status are briefly introduced in this review.

Keywords cellular senescence; SA-bGal; P16^{Ink4a}; P53; P21^{Cip1}

1 细胞衰老的概念

1961年, 美国生物学家Leonard Hayflick在体外培养正常人的成纤维细胞时发现, 即使给予细胞

生长适宜的条件, 细胞分裂至一定代数时也会发生衰竭, 从而使细胞周期进入了一种“不可逆”的停滞状态(细胞衰老), 因此首次提出了细胞的寿命和增

国家自然科学基金(批准号: 91639302、31625019)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54920974, E-mail: zhoubin@sibcb.ac.cn

This work was supported by the Natural National Science Foundation of China (Grant No.91639302, 31625019)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54920974, E-mail: zhoubin@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2017-05-24 17:17:50

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170524.1717.004.html>

殖能力是有限的观点,即Hayflick界限^[1]。细胞衰老(cellular senescence)是指随着时间的推移或面临外界应激压力时,细胞的正常生理功能和增殖能力就会逐渐发生衰退,从而脱离细胞周期,该过程与肿瘤、组织再生及机体衰老等都具有重要的联系^[2]。细胞衰老主要包括细胞端粒缩短引起的复制性衰老与感受外界刺激(如DNA损伤、染色质结构的改变、*Ras*和*Raf*等癌基因过表达等)引起的应激诱导衰老这两种类型,其中,端粒缩短或端粒结构破坏是细胞衰老的主要诱因^[3-8]。

当细胞发生衰老时,细胞结构的变化主要表现为体积增大、细胞核凹陷、核膜崩解、染色质结构变化和线粒体减少等;功能上的退行性变化主要表现为细胞的复制能力丢失、细胞周期停滞、应激原敏感性降低、细胞周期基因表达下调、细胞周期抑制因子和其他衰老相关基因表达上调等^[9-10]。通常情况下,机体的衰老细胞与新生细胞不断更替,进而维持正常的生命活动,而细胞总体水平的衰老一般被认为是机体衰老的基础,因此,研究细胞衰老为阐明机体衰老奠定了重要基础。

2 细胞衰老分子机制

真核细胞的细胞周期可以分为G₁、S、G₂和M四个时期,具有两个主要的调控点, G₁-S和G₂-M, 其中G₁-S的调控作用更为重要^[11]。当发生DNA损伤时,细胞周期启动子基因下调及细胞周期抑制基因上调,通过不同的信号通路诱导细胞在G₁期发生阻滞和引发细胞衰老,从而为DNA损伤修复提供足够的时间,维持细胞基因组的稳定性。细胞衰老需要借助信号通路转导,其中最主要的两条信号途径是P16^{Ink4a}/Rb(retinoblastoma protein)途径和P19^{Arf}/P53/P21^{Cip1}途径,这两条途径相互作用但又相互独立地调控细胞周期的进程(图1)。

P16^{Ink4a}/Rb途径中的Ink4(the inhibitors of cyclin-dependent kinase 4)家族蛋白P16是一种CDK(cyclin-dependent kinases)抑制因子,随着细胞分裂次数的增加而在细胞内累积^[4]。通常独立于P19^{Arf}/P53/P21^{Cip1}途径, P16^{Ink4a}/Rb途径被认为是引起细胞发生衰老的主要途径。受到应激引起的细胞衰老,尤其是上皮细胞,主要通过P16^{Ink4a}/Rb途径,而端粒受损的衰老细胞则具有种属特异性,在 小鼠体内主要是通过P19^{Arf}/P53/P21^{Cip1}途径,而人类细胞则受到两个途径

的共同调控作用^[12-14]。细胞受到应激时可引起P16蛋白高表达,但该过程的具体机制尚有待阐明,可能是通过降低Ink4的阻抑蛋白如Bmi-1(B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1)等的表达^[15-16]。P16蛋白定位于细胞核内,其氮端具有细胞周期蛋白的同源结构,可以竞争性结合CDK4/6,抑制了CDK主要的底物视网膜母细胞瘤蛋白Rb磷酸化,而处于非磷酸化状态的Rb可以与其下游转录因子E2F结合,使E2F无法激活,从而抑制其调控位点基因的表达,细胞由G₁期进入S期的过程被阻止,抑制细胞发生增殖,最终导致细胞衰老^[17-20]。而当细胞衰老相关表型出现后,比如生长阻滞、衰老相关异染色质位点的形成等,则不再需要P16^{Ink4a}/Rb途径的维持^[21]。

P19^{Arf}/P53/P21^{Cip1}途径中的P53蛋白是一种常见的抑癌蛋白,在多数肿瘤中呈现失活状态,而在衰老细胞中表达上调,其表达主要依赖于翻译后修饰水平^[22]。在一些常见肿瘤中发生过表达的泛素蛋白连接酶MDM2(murine double minute 2, 人体中的同源蛋白为HDM2)可以促进相关蛋白酶对P53进行降解,或直接结合P53蛋白抑制其活性^[23-24]。而与Ink4a基因位

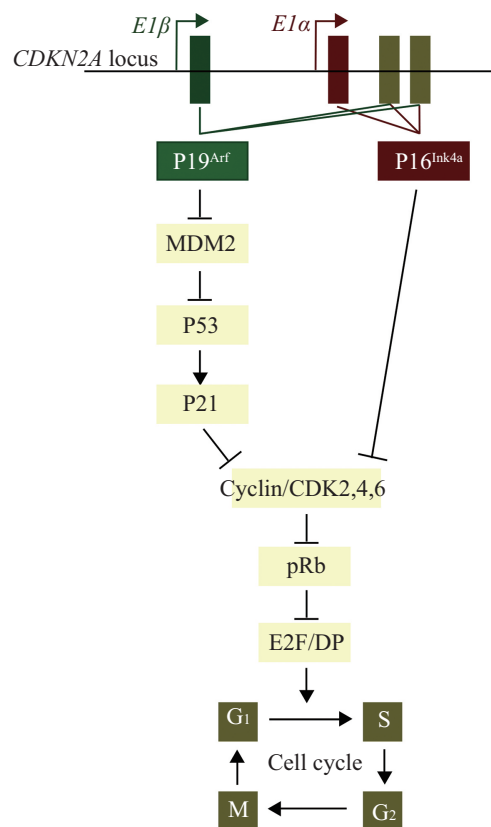


图1 细胞衰老的主要信号通路

Fig.1 The main signaling pathways of cellular senescence

点重叠的*Arf*基因位点编码的P19^{Arf}蛋白可以结合并抑制MDM2活性,从而参与到P53途径^[25-27]。当DNA受到损伤(比如电离辐射和端粒功能障碍),P19^{Arf}蛋白上调,抑制MDM2活性,激活P53,然后P53诱导其下游P21^{Cip1},P21^{Cip1}作为CDK抑制因子参与抑制RB磷酸化,从而不能与E2F结合,阻滞于G₁期,引起细胞衰老^[17,28-31]。P21^{Cip1}受到应激时,也可直接引起细胞生长停滞,并且仅受到P53/P21^{Cip1}途径调控的衰老细胞在关闭P53/P21^{Cip1}途径后,细胞仍能继续生长,而对衰老细胞选择永久还是短暂地生长停滞起决定作用的具体机制目前尚不清楚^[17]。

3 细胞衰老主要标志

3.1 SA-bGal(senescence-associated β -galactosidase)

SA-bGal是目前应用最为广泛的细胞衰老的标志物之一,可以与处于静止期及终末分化状态的细胞区分开来。当细胞处于衰老状态时,其本身的蛋白表达谱通常会发生较大变化,由*GLB1*(galactosidase β 1)基因编码的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)在正常人体细胞中主要表达在溶酶体中,最适pH为4.0~4.5,而衰老情况下则在pH6.0时表达出高酶活性,该酶的底物主要有神经节苷脂、硫酸角质和各种糖蛋白等^[32]。当检测衰老细胞时,可以人为给予底物X-gal和pH6.0的环境,衰老细胞可以在 β -半乳糖苷酶的作用下将底物转变生成深蓝色产物,使用普通光学显微镜就可以检测到^[32]。

该方法虽然操作简单,但具有一定的局限性。首先, β -半乳糖苷酶在正常生理情况下也表达于一些非衰老状态的细胞,比如破骨细胞、成熟的巨噬细胞(肝脏中的库普弗细胞及大脑中的小胶质细胞等)^[33-34]。其次,Coates等^[35]发现,正常情况下在中性pH环境几乎不表达的 β -半乳糖苷酶在接受强电离辐射1 h内就可以表达出高酶活性,会影响对*p53-LacZ*转基因小鼠表达情况的观察。因此,使用该方法鉴定细胞衰老时应谨慎,尤其是研究溶酶体活动旺盛的细胞、DNA受到损伤的细胞、与炎症和肿瘤相关的巨噬细胞等。

3.2 P16^{Ink4a}

P16^{Ink4a}蛋白又叫细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A),由*Ink4a*基因位点编码而成,分子量约为16 kDa,由3个外显子编码的156个氨基酸残基组

成。大约75%的癌细胞株中都存在该蛋白缺失或突变,并且在细胞衰老过程中参与下调CDK4和CDK6,发挥关键作用,因而可以作为细胞衰老的标志之一。其所在的*Ink4a*基因位点除了可以编码P16^{Ink4a}外,还编码一种具有不同上游启动子的P19^{Arf}(人源同系物为P14^{Arf}),作为P53的上游基因,同样参与调控细胞衰老的信号通路^[27,36-39]。人们利用转基因技术构建的*Ink4a*位点的报告小鼠(*Ink4a-Luc*)发现,通常情况下,P16^{Ink4a}蛋白在年轻动物的健康、无压力应激的组织 and 细胞中很少表达,随着小鼠年龄的增加,开始在衰老、受损、初期肿瘤等组织中高表达,其表达具有极强的动态性^[40-44]。而作为细胞衰老的标志,P16^{Ink4a}蛋白的局限性表现在以下几个方面,P16^{Ink4a}有时会表达在一些非衰老状态的细胞如部分免疫细胞和肿瘤细胞中,多次复制的T细胞累积大量P16^{Ink4a}蛋白但不表达其他衰老标志物,一些研究人员发现,分离出这些细胞并给予适宜的培养条件,这些细胞就可以重新进入细胞周期^[41,45-51],在某些类型的衰老细胞没有发现P16^{Ink4a}的表达^[17,52-53]。然而,目前还没有较好的小鼠P16蛋白抗体可以用于荧光染色,限制了该标志在小鼠体内实验研究的应用,所以使用其作为细胞衰老标志物也应谨慎。

3.3 P21^{Cip1}

P21^{Cip1}又叫细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A),位于人染色体6p21.2,分子量为21 kDa,由3个外显子编码的164个氨基酸残基组成。作为*p53*基因下游的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族的重要成员,其可以对细胞周期进行负调控。缺失*CDKN1A*的小鼠表现出G₁-S和G₂-M调控点的失控,在晚年相比野生型小鼠产生更多的肿瘤^[54-55]。最近有研究提出,细胞衰老也是一种参与胚胎正常发育过程的关键的组织重塑机制。在小鼠胚胎发育中的四肢、肾、内淋巴囊、神经管和顶外胚层嵴的非分裂细胞中发现有发育编程衰老,也有P21^{Cip1}和SA-bGal的高表达^[56-57]。

3.4 端粒缩短

端粒是位于生物染色体末端的一段特殊的DNA片段,由许多简单短重复序列构成。在正常情况下,人类体细胞中可以合成端粒的端粒酶的活性受到抑制,使得端粒长度随着细胞分裂次数的增加而缩短(每分裂一次缩短一个冈崎片段的长度为30~200 bp),细胞复制能力受到限制^[3,58-59]。检测端

粒长度经典方法Southern限制性内切酶酶切产生末端片段, 但该方法所需样品量多, 操作费时费力, 而且在某些表达P16^{Ink4a}的非衰老细胞中, 也可以检测到端粒缩短和功能缺失, 并且有些应激引起的细胞衰老是独立于端粒缩短途径的, 所以这不是一个很好的细胞衰老的标志^[60-62]。

3.5 其他

3.5.1 基因组不稳定与衰老相关异染色质位点 基因组的完整性对细胞的活性具有重要意义。过氧化物刺激、紫外照射、化疗药物等外源性应激和端粒缩短以及一些内源性因子刺激常常可以通过各种信号通路增加细胞内ROS(reactive oxygen species)水平, 从而引起细胞DNA损伤, 比如DNA片段缺失、DNA链断裂、染色体移位等, 产生衰老相关异染色质位点(senescence-associated heterochromatic foci, SAHFs)。SAHFs是大部分体外细胞和部分体内细胞衰老的主要诱因, 因此, 我们可以在衰老细胞中利用 γ H2AX或者53BP1(p53-binding protein 1)染色检测到DNA损伤位点, 它是细胞衰老重要的标志之一^[63-64]。细胞内DNA修复主要通过错配修复途径、碱基切除修复途径、核苷酸切除修复途径、直接修复途径等, 但随着年龄的增长, 细胞DNA损伤修复功能逐渐降低, 基因组不稳定性得到累积, 所以老年人具有较高的癌发病率^[65]。但也存在部分具有DNA损伤的细胞并非衰老细胞, 其只能作为细胞衰老过程某个侧面的标志物。

3.5.2 衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP) 研究发现, 衰老的细胞可以分泌多种细胞因子, 比如炎症因子、生长因子、免疫调节因子等, 促进自身衰老及改变其周围环境, 甚至可以促进癌前细胞发生癌变^[66-67]。比如, 白介素-6(interleukin-6, IL-6)是非常重要的SASP之一, 直接由DNA损伤信号通路调控, 被认为与细胞衰老有关^[68-69]。SASP通常具有双重作用, 一方面可以促进机体启动免疫系统清除衰老细胞, 加快衰老细胞的生长停滞, 参与肿瘤抑制途径; 另一方面, 衰老细胞分泌的SASP参与破坏组织正常结构, 诱导上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transitions, EMT), 可能促进恶性肿瘤的增殖^[70-71]。但在一些长期细菌病毒感染、伤口愈合及肿瘤发生过程中, 也可能产生与SASP相同或类似的细胞因子, 干扰对SASP的判断, 所以并不是细胞衰老可靠的标志。

4 细胞衰老与疾病

4.1 肿瘤

肿瘤是机体受各种致癌因素的影响而在局部特异性增生的新生物, 多发生于老年人, 可分为良性和恶性肿瘤, 恶性肿瘤即癌症。细胞衰老作为机体抑癌过程中重要的一环, 与肿瘤具体的关系尚无定论。大多数观点认为, 在癌前时期, 癌基因可以诱导细胞发生衰老, 衰老的细胞阻止细胞分裂, 可以阻碍肿瘤发展, 保护机体; 而在肿瘤发展后期, 随着衰老细胞的积累, 可以产生大量的炎症因子、生长因子、免疫调节因子等, 改变组织微环境, 刺激相邻细胞增殖, 促进肿瘤发生恶化及迁移^[70-74]。Collado等^[75]发现, 在多发性肺腺瘤和腺癌的模式大鼠(K-rasV12)体内, 可在腺瘤中检测到细胞衰老标志物(SA-bGal、P16、P15、Dec1、DcR2、HP1-r), 而在腺癌中则没有表达。Chen等^[76]研究也发现, 在Pten敲除的前列腺癌模型小鼠中, 衰老标志物在癌前病变组织中高表达, 而在恶化癌组织中不表达, 体外培养Pten缺陷的细胞进入衰老状态后, 可被P53失活逆转, 提示P53参与了细胞衰老抑癌的过程中。Burd等^[41]利用P16^{Ink4a}-Luciferase小鼠, 可以实时显示细胞衰老活化过程, 发现在小鼠移植瘤形成位置显著聚集衰老细胞, 这是第一次活体实时地观察到衰老细胞在癌症早期聚集的阶段。在临床应用中, 细胞衰老标志物可以作为早期肿瘤的标志物之一, 但在肿瘤癌前病变过程中, 细胞衰老发挥的具体作用及机理亟待阐明, 所以深入细胞衰老将对癌症的防治具有重大意义。

4.2 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是引起人体冠心病和脑卒中等疾病的最主要因素, 该病的主要特征为脂质代谢障碍, 动脉部分内膜下脂质和复合糖类沉积, 伴有平滑肌细胞的大量增殖和纤维组织的累积, 最终发展成粥样硬化斑块。近期研究发现, 该病程与内皮细胞和平滑肌细胞衰老相关。衰老的内皮细胞主要表现为体积增大, 形态扁平, 通透性增加, NO生物活性降低, 细胞黏附因子增加等^[77-79]。在正常情况下, 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)主要位于血管中膜, 在动脉粥样硬化过程中, 从中膜迁移至内膜, 可以产生胶原纤维、弹性纤维等物质聚集形成纤维帽。VSMCs的数量对维持纤维帽的稳定性起着非常重要的作用, 在AS斑块

中可以分离到具有衰老形态的VSMCs, 伴随P16^{Ink4a}、P53、P21^{Cip1}等的高表达, 使VSMCs进入生长停滞状态, 纤维帽稳定性受到破坏, 促进动脉粥样硬化的发生^[77,80-81]。近期, Childs等^[82]的研究发现, 衰老的细胞, 主要是泡沫细胞(foam cells), 在动脉粥样硬化发生的整个时期都起了负面的推动作用。在粥样硬化初期, 衰老的泡沫细胞可能通过促进炎症反应募集巨噬细胞加快病程, 而后期则会释放降解斑块的酶和基质, 最终导致纤维帽不稳定而发生破裂。

4.3 肝脏纤维化

各种导致肝脏实质细胞炎症损伤的过程都伴随着肝脏纤维增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的大量沉积, 这是机体应对急剧伤害作出的自然保护反应, 但长期的肝纤维化会逐渐发展成为肝硬化甚至肝癌, 严重危害身体健康^[83]。研究发现, 肝内各种类型细胞的衰老可能在该过程中发挥了重要作用^[84]。Kuilman等^[68]及Lechel等^[85]发现, 在肝脏的纤维化区域, 肝细胞的端粒明显缩短, 进入衰老阶段, 这样的肝细胞可以激活周围的星状细胞, 导致纤维化加剧, 可能使衰老相关分泌功能增强, 分泌大量IL-6等炎症因子, 改变肝内微环境。而Krizhanovsky等^[86]的研究发现, 在纤维化模型小鼠中, 最先发生衰老的细胞是激活的星状细胞, 通过分泌一些细胞因子促进自然杀伤细胞识别并降解纤维组织, 细胞外基质分泌减少, 有效限制肝脏纤维化。而在p53^{-/-}肝脏纤维化小鼠中, 星状细胞的持续激活和增殖, 加剧了纤维化进程。近期有研究发现, 在特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)患者肺组织中同样高表达细胞衰老的相关标记物, 使用遗传手段或特殊药物在IPF模型小鼠体内选择性地杀死这些衰老细胞, 可以明显改善病症^[87]。

4.4 胚胎发育程序性细胞衰老

《细胞》杂志的两篇研究发现, 小鼠正常胚胎发育过程中的肾小管、内淋巴囊、神经管和四肢顶外胚层嵴等处的非分裂细胞有P21^{Cip1}和衰老标志物SA- β Gal的高表达, 提示细胞衰老可能类似于细胞程序性坏死与细胞凋亡, 也是参与胚胎正常发育的重要角色, 研究人员称其为发育编程性衰老(图2)。当程序性衰老发生, 细胞首先停止增殖, 然后会分泌一些细胞因子至细胞所处微环境, 影响细胞迁移、细胞凋亡和血管生成等过程, 促进免疫细胞清除衰老细胞, 引导组织结构发生重塑, 最终形成器官^[56-57]。

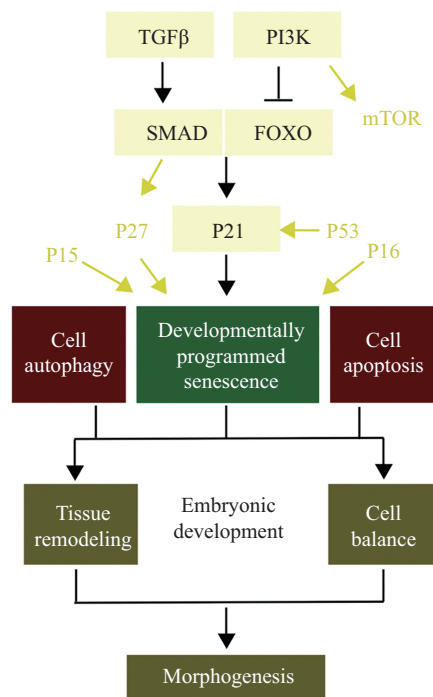


图2 胚胎发育程序性细胞衰老

Fig.2 The programmed cell senescence during mammalian embryonic development

5 结语与展望

综上所述, 细胞衰老在肿瘤、动脉粥样硬化、纤维化等疾病及正常情况下的胚胎发育、老化过程中都扮演了重要角色。在应对端粒缩短、DNA损伤、外界应激、癌基因活化等刺激时, 机体将启动细胞衰老程序进行自我保护。衰老细胞可以通过各种信号通路抑制自身增殖, 还可以分泌相关因子吸引免疫细胞到所处环境附近进行清除并促进组织发生再生。而在肿瘤恶化过程中, 稳态一旦打破, 衰老细胞分泌的SASP将发挥其负性调节作用。所以, 细胞衰老在每种具体情况下发挥的作用及详细机制仍有待进一步研究。Lopez-Otin等^[9]在《细胞》杂志上详细列举了不同生物衰老的九大特征, 包括: 基因组不稳定、端粒缩短、表观遗传发生改变、蛋白稳态丧失、营养感应失调、线粒体功能异常、细胞衰老、干细胞衰竭和细胞间交流改变, 说明细胞衰老与生物体衰老虽有联系但并不是同一概念, 对细胞衰老的研究可以为阐明生物机体衰老的机制提供一个崭新的研究层面。细胞总体水平的衰老通常被认为是机体衰老的基础, 研究细胞衰老有助于进一步揭示衰老相关疾病发病机制, 但细胞衰老的检测方法亟待探索与完善, 目前尚无一种方法可以单独明确细胞衰

老, 通常采用多种方法相结合进而综合确定, 可以利用基因克隆技术等手段继续深入研究细胞衰老相关基因, 为揭示衰老及衰老相关疾病发生机制提供更加可靠的依据。期待在未来的研究中, 能够发现更多针对细胞衰老的治疗靶点, 进一步促进对调节细胞衰老过程的相关药物的研发与筛选, 为衰老相关疾病的防治提供新思路和新方法。

参考文献 (References)

- Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 685-705.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345(6274): 458-60.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5): 593-602.
- Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001; 265(2): 294-303.
- Young JI, Smith JR. DNA methyltransferase inhibition in normal human fibroblasts induces a p21-dependent cell cycle withdrawal. *J Biol Chem* 2001; 276(22): 19610-6.
- Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000; 408(6808): 53-6.
- Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192(4): 547-56.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153(6): 1194-217.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24(22): 2463-79.
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246(4930): 629-34.
- Jacobs JJ, de Lange T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 2004; 14(24): 2302-8.
- Stein GH, Drullinger LF, Soular A, Dulic V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999; 19(3): 2109-17.
- Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 2002; 21(16): 4338-48.
- Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, *et al.* The polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* 2007; 21(5): 525-30.
- Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, Jacobs JJ, *et al.* Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003; 23(1): 389-401.
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, *et al.* Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22(16): 4212-22.
- Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006; 127(2): 265-75.
- Kareta MS, Gorges LL, Hafeez S, Benayoun BA, Marro S, Zmoos AF, *et al.* Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 2015; 16(1): 39-50.
- Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2(2): 103-12.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113(6): 703-16.
- Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268(10): 2784-91.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; 387(6630): 299-303.
- Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10(1): 94-9.
- Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH. p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3): 148-55.
- Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, Kristel P, Lingbeek M, Nederlof PM, *et al.* Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* 2000; 26(3): 291-9.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; 91(5): 649-59.
- Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196(1): 33-9.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366(6456): 701-4.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75(4): 805-16.
- Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* 2004; 23(13): 2554-63.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, *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): 9363-7.
- Bursuker I, Rhodes JM, Goldman R. Beta-galactosidase—an indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. *J Cell Physiol* 1982; 112(3): 385-90.
- Kopp HG, Hooper AT, Shmelkov SV, Rafii S. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol Histopathol* 2007; 22(9): 971-6.
- Coates PJ, Lorimore SA, Rigat BA, Lane DP, Wright EG. Induction of endogenous beta-galactosidase by ionizing radiation complicates the analysis of p53-LacZ transgenic mice. *Oncogene* 2001; 20(48): 7096-7.

- 36 Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83(6): 993-1000.
- 37 Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92(6): 713-23.
- 38 Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(14): 8292-7.
- 39 Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; 92(6): 725-34.
- 40 Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; 114(9): 1299-307.
- 41 Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, Darr DB, Krishnamurthy J, Deal AM, *et al.* Monitoring tumorigenesis and senescence *in vivo* with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell* 2013; 152(1/2): 340-51.
- 42 Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 1997; 15(2): 203-11.
- 43 Sorrentino JA, Krishnamurthy J, Tilley S, Alb JG Jr, Burd CE, Sharpless NE. p16INK4a reporter mice reveal age-promoting effects of environmental toxicants. *J Clin Invest* 2014; 124(1): 169-73.
- 44 Jun JI, Lau LF. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging (Albany NY)* 2010; 2(9): 627-31.
- 45 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366(6456): 704-7.
- 46 Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, *et al.* Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 1995; 55(3): 505-9.
- 47 Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, *et al.* Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer* 1997; 75(10): 1410-6.
- 48 Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: Functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 2011; 10(15): 2497-503.
- 49 Migliaccio M, Raj K, Menzel O, Rufer N. Mechanisms that limit the *in vitro* proliferative potential of human CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2005; 174(6): 3335-43.
- 50 Jaruga E, Skierski J, Radziszewska E, Sikora E. Proliferation and apoptosis of human T cells during replicative senescence—a critical approach. *Acta Biochim Pol* 2000; 47(2): 293-300.
- 51 Di Mitri D, Azevedo RI, Henson SM, Libri V, Riddell NE, Macaulay R, *et al.* Reversible senescence in human CD4⁺ CD45RA⁺CD27⁺ memory T cells. *J Immunol* 2011; 187(5): 2093-100.
- 52 Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, *et al.* A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 2002; 22(14): 5157-72.
- 53 Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, *et al.* Real-time *in vivo* imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol* 2009; 186(3): 393-407.
- 54 Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G₁ checkpoint control. *Cell* 1995; 82(4): 675-84.
- 55 Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* 2001; 61(16): 6234-8.
- 56 Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 2013; 155(5): 1119-30.
- 57 Munoz-Espin D, Canamero M, Maraver A, Gomez-Lopez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 2013; 155(5): 1104-18.
- 58 Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350(6319): 569-73.
- 59 Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91(1): 25-34.
- 60 Lansdorp PM. Telomeres and disease. *EMBO J* 2009; 28(17): 2532-40.
- 61 Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement—caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res* 2012; 730(1/2): 59-67.
- 62 Armanios M. Telomeres and age-related disease: How telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest* 2013; 123(3): 996-1002.
- 63 Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004; 14(4): 501-13.
- 64 d'Adda di Fagnola F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426(6963): 194-8.
- 65 Papaefthymiou MA, Giaginis CT, Theocharis SE. DNA repair alterations in common pediatric malignancies. *Med Sci Monit* 2008; 14(1): RA8-15.
- 66 Young AR, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep* 2009; 10(3): 228-30.
- 67 Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 99-118.
- 68 Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008; 133(6): 1019-31.
- 69 Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009;

- 11(8): 973-9.
- 70 Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6(12): 2853-68.
- 71 Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 2007; 67(7): 3117-26.
- 72 Campisi J. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* 2005; 309(5736): 886-7.
- 73 Campisi J. Aging, tumor suppression and cancer: High wire-act! *Mech Ageing Dev* 2005; 126(1): 51-8.
- 74 Laberge RM, Awad P, Campisi J, Desprez PY. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 2012; 5(1): 39-44.
- 75 Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, *et al.* Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436(7051): 642.
- 76 Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005; 436(7051): 725-30.
- 77 Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: Contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 2007; 100(1): 15-26.
- 78 Khaidakov M, Wang X, Mehta JL. Potential involvement of LOX-1 in functional consequences of endothelial senescence. *PLoS One* 2011; 6(6): e20964.
- 79 Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, *et al.* Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev* 2007; 128(11/12): 662-71.
- 80 Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, *et al.* Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 2006; 99(2): 156-64.
- 81 Gorenne I, Kavurma M, Scott S, Bennett M. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006; 72(1): 9-17.
- 82 Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 2016; 354(6311): 472-7.
- 83 Pinzani M. Foreword to liver fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25(2): 193-4.
- 84 Hoare M, Das T, Alexander G. Ageing, telomeres, senescence, and liver injury. *J Hepatol* 2010; 53(5): 950-61.
- 85 Lechel A, Holstege H, Begus Y, Schienke A, Kamino K, Lehmann U, *et al.* Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. *Gastroenterology* 2007; 132(4): 1465-75.
- 86 Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134(4): 657-67.
- 87 Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 2017; 8: 14532.