

综述

端粒DNA损伤与细胞衰老的研究进展

应乐倩¹ 余 晖¹ 王雨婷¹ 潘逸男¹ 王金涛¹ 王丽辉^{2*}⁽¹⁾杭州师范大学医学院, 杭州 310000; ⁽²⁾杭州师范大学衰老研究所, 杭州 310000

摘要 细胞衰老是生物不可避免的生命现象。研究表明, 端粒DNA的长度与细胞的衰老进程有关, 衰老细胞的端粒DNA出现不同程度的损伤, 如端粒DNA的断裂、融合、缩短和缺失等。因此, 端粒长度被称作控制寿命的“生命时钟”。目前, 端粒DNA损伤发生的机制也得到进一步阐明。端粒酶作为逆转录酶, 主要维持端粒的长度、减少染色体的损伤, 保证细胞分裂周期的持续进行。该文探讨了端粒DNA损伤发生的机制及不同类型的端粒DNA损伤与细胞衰老之间的关系, 在分子水平上寻找诱发细胞衰老的原因, 从而为基础研究转化为临床应用提供思路, 为研发相应衰老通路的阻滞剂或端粒酶的激活剂奠定理论基础。

关键词 端粒DNA损伤反应; 端粒酶; 细胞周期阻滞; 衰老

The Progress of Telomere DNA Damage and Cell Senescence

Ying Leqian¹, Yu Hui¹, Wang Yuting¹, Pan Yinan¹, Wang Jintao¹, Wang Lihui^{2*}⁽¹⁾School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310000, China;⁽²⁾Institute of Aging Research, Hangzhou Normal University Hangzhou 310000, China)

Abstract Cell senescence is the destiny of the creatures. Various studies have shown that the length of telomere DNA is associated with the ageing process of cells whose telomere DNA probably appear different degrees of damage, such as telomere DNA fragmentation, fusion, shorten and attrition. In consequence, the length of telomere may measure the lifespan, called as the “life clock”. At present, the mechanism of telomere DNA damage and the protection of telomere have been partly clarified. Telomerase, as a reverse transcriptase, maintains telomere length in cells and reduces chromosome damage to ensure the cell division cycle. In this review, we aim to summarize the related mechanism of telomere DNA damage and to clarify the relationship between different types of telomere DNA damages and cell senescence, and to find out the causes of cellular senescence, which consequently will help us to give insights into the transformation of basic research to clinic application and set the theoretical foundation for the development of inhibitors of related cellular senescence channels and the activators of telomerase.

Keywords telomere DNA damage response; telomerase; cell cycle arrest; senescence

端粒的平均长度随着细胞的分裂次数的增加及年龄的增长而缩短。端粒在个体衰老中扮演重要角色, 端粒的长度与寿命呈正相关。研究发现,

通过测量不同组织细胞端粒的长度可推测法医学年龄^[1]。细胞衰老(cellular senescence), 是细胞的一种永久性细胞周期停滞状态, 不仅是复制能力的丧

收稿日期: 2017-09-26

接受日期: 2017-12-18

国家级大学生创新创业训练计划(批准号: 201710346020)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18814875842, E-mail: wanglihui@hznu.edu.cn

Received: September 26, 2017

Accepted: December 18, 2017

This work was supported by the National College Students' Innovative Entrepreneurial Training Plan of China (Grant No.201710346020)

*Corresponding author. Tel: +86-18814875842, E-mail: wanglihui@hznu.edu.cn

网络出版时间: 2018-03-08 16:45:05

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180308.1644.004.html>

失,而且包括细胞形态、基因表达、新陈代谢和表观遗传学等的巨大变化^[2]。端粒DNA序列逐渐变短甚至消失,引起一系列DNA损伤反应(DNA damage response, DDR),使染色体稳定性下降,引起细胞周期阻滞,进而可能进入不可逆的生长停滞状态。由端粒DNA损伤而导致的细胞出现永久性的细胞周期停滞过程,称之为复制型细胞衰老(replicative senescence)或生理性衰老,主要由p53/p21/pRb信号通路介导^[3-4]。

1 端粒的结构及其功能

1.1 端粒的结构

端粒DNA序列是由富含G的短双链重复序列串联组成。其中富含G的序列在3'端单链DNA比其互补链多出数百个核苷酸,反折插入到端粒DNA的双链区,从而使染色体DNA终止于一种T-环(T-loop)结构^[5]。哺乳动物细胞中端粒DNA的结合蛋白是由六个蛋白质组成的端粒特异性复合体,称之为Shelterin,包括TRF1、TRF2、Rap1、TIN2、TPP1和POT1六个蛋白。其中,TRF1和TRF2直接与端粒双链DNA结合;POT1则与3'端突出的端粒单链DNA结合;TIN2和TPP1是介导Shelterin组装过程的主要成分,TPP1有助于稳定TRF1-TIN2-TRF2的相互作用,增强TRF1和TRF2与DNA结合的能力^[6-7]。结构如图1所示。

近年来研究发现,端粒G-四链体DNA可以稳定这种末端的T-环结构,抑制端粒酶对端粒不恰当的延伸,同时抑制核酶的降解和端粒末端融合引起的端粒DNA损伤(图2)。在细胞周期的大部分阶段,端粒末端结合蛋白- α (telomere end-binding protein- α , TEBP- α)和TEBP- β 可以稳定这种四链体结构。但当细胞进入S期时,TEBP- β 受周期蛋白依赖性激酶2(cyclin-dependent kinases 2, CDK2)磷酸化,从端粒上脱离,端粒G-四链体结构随之打开,进而端粒被端粒酶所延伸^[9]。因而,在衰老细胞中,适当提高CDK2激酶活性,打开端粒G-四链体结构,延长端粒或许可以作为延缓细胞衰老的又一个研究方向。

1.2 端粒的功能

细胞染色体端粒的主要功能有:第一,保护染色体防止被核酸酶降解;第二,防止染色体之间的相互融合;第三,为端粒酶提供底物,保证染色体的完全复制。染色体复制一次,末端DNA约丢失

50~200 bp^[11],即“染色体端粒的缩短现象”。此外,由于“极限现象”(即Hayflick细胞分裂极限),端粒的长度缩短到一定的长度便不再具有启动染色体复制的能力。当染色体复制能力大部分丧失,可能导致生物体的衰老甚至死亡^[12]。

端粒酶可以维持端粒的长度。端粒酶主要包括RNA组分(telomerase RNA component, TERC)和蛋白质组分端粒酶逆转录酶(telomeres reverse transcriptase, TERT)。在细胞分裂过程中,端粒酶对染色体末端的延长保证了细胞分裂的正确进行。有研究表明,过表达TERT可以阻止正常成纤维细胞以及上皮细胞端粒的缩短从而使得细胞永生化^[12]。大多数真核细胞利用端粒酶来重新添加丢失的端粒DNA序列,保证细胞分裂过程中染色体末端复制结构的完整性^[3]。虽然存在能够修复端粒长度的端粒酶,但在许多正常的体细胞中并不能检测到端粒酶的活性。因此,在许多正常细胞中出现不可逆的端粒DNA损伤,便可加速细胞衰老。

2 端粒DNA损伤机制及通路

2.1 端粒DNA损伤发生及修复的机制

细胞内DDR是一种细胞内信号转导的过程,由一个复杂的蛋白质网络组成,主要由转录后的修饰介导,如磷酸化、泛酰化等。当DDR发生时,外界刺激信号如DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)、紫外线辐射(ultraviolet radiation, UV)、电离辐射等激活包括DNA损伤结合蛋白,如MRN复合物(Mre11、Rad50、Nbs1)、911复合物(Rad9、Rad1、Hsu1)在内的感受器。激活的感受器进而活化下游信号转导通路,包括共济失调性毛细血管扩张变异型(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)激酶和/或Rad3相关的ATM(ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related, ATR)激酶,进一步使DNA损伤检验点蛋白磷酸化并启动乳腺癌蛋白1(breast cancer 1, BRCA1)、DNA损伤检控调节蛋白1(mediator of DNA damage checkpoint 1, MDC1)和p53结合蛋白1(p53 binding protein 1, p53BP1)等接受器^[13]。这些激酶级联增强的DNA损伤信号,通过效应器p53、细胞分裂周期蛋白激酶25(cell division cycle 25, CDC25)、染色体结构维持蛋白1(structural maintenance of chromosomes proteins 1, SMC1)等启动不同的反应系统,最后导致细胞周期停滞,DNA损伤修复通路活化,以及细胞凋

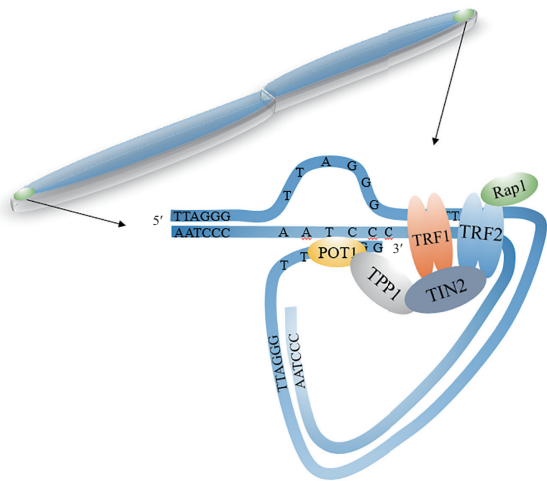
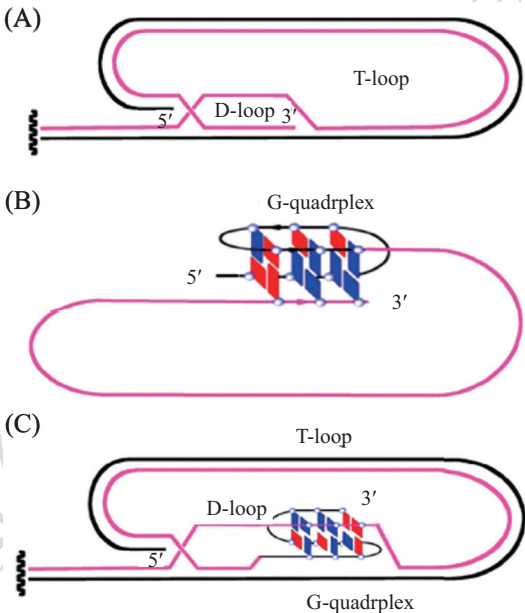


图1 端粒DNA、端粒结合蛋白和T-环结构(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 The structures of telomere DNA, telomere binding protein and T-loop (modified from reference [8])



A: T-环结构; B: 端粒末端套索样G-四链体结构; C: 形成T-环结构时可能的G-四链体结构。
A: T-loop structure; B: lasso G-quadruplex structure in the ends of telomeres; C: applicable G-quadruplex to form the T-loop structure.

图2 端粒T-环与G-四链体结构(根据参考文献[10]修改)

Fig.2 The structures of T-loop and G-quadruplex in telomeres (modified from reference [10])

亡和/或细胞衰老^[14], 如图3所示。

端粒的DDR机制至少分为两个阶段^[13]。一是端粒复制阶段, 当复制叉达到染色体末端出现了单链DNA时就如同复制叉达到一个DNA断裂处, 此时ATR被激活并募集于端粒DNA断裂处; 第二, 端粒DNA复制完成以后, 基因同源重组(homologous recombination, HR)和ATM激酶的活化机制参与端粒特殊结构的形成。体内外的实验证实, DNA复制之后染色体末端形成其特有的结构需通过HR机制完成^[15]。

端粒DNA损伤是不可逆的观点被推翻, 有研究证明在端粒上可以发生DSBs修复^[16-17]。然而, 目前端粒的修复只能在增殖细胞中观察到, 如BJ纤维细胞和HeLa细胞。与分裂较慢的成纤维细胞相比, HeLa细胞能更快地修复并分裂细胞, 这表明, 细胞增殖率是端粒修复的一个重要决定因素^[17]。在不同类型的损伤中, DSBs被认为是最严重的, 由两个主要的机制修复。一是零差错的HR途径, 使用同源染色体作为修复的模板^[18]; 二是非同源染色体末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径, 不

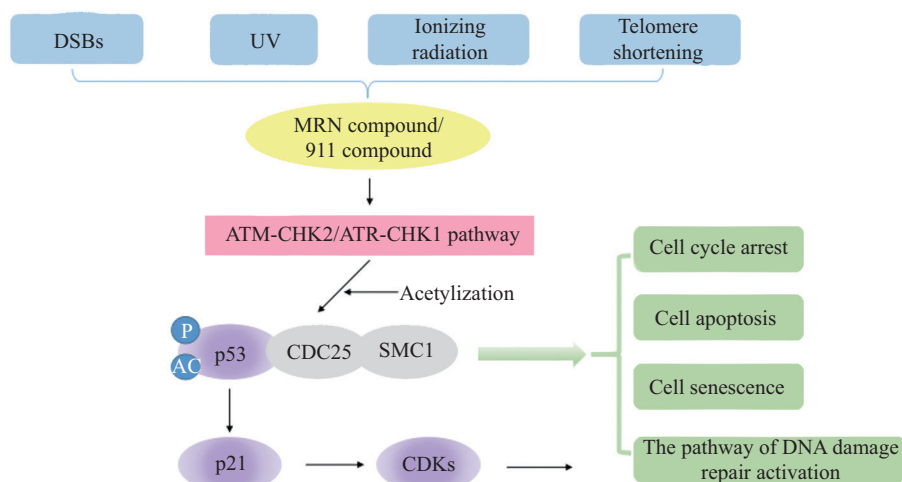


图3 端粒DNA损伤发生的信号转导过程

Fig.3 Signal transduction process caused by telomere DNA damage

需要同源序列,但易发生突变^[17,19]。如不修复,可能出现两个极端。一方面,DNA损伤会持续不断诱发DDR信号,当端粒变得极短时,被机体感知为染色体末端结构是受损的DNA,触发由DDR发起的细胞衰老^[20]。另一方面,也可能激活端粒酶TERT启动子突变(TERT promoter mutations, TPMs)引起最短端粒的增长进而延缓复制性衰老,延长细胞寿命;另外,短端粒导致基因组结构不稳定,TERT表达的进一步上调引起细胞增殖并诱导肿瘤发生^[21]。在端粒DNA复制过程中出现的DDR,必须严格地监测和控制,否则导致染色体的融合,造成基因组的不稳定。与DSBs诱导的DDR相比,正常情况下发生在端粒的DDR并不能激活p53以及DNA损伤检控蛋白质Chk1和Chk2等的磷酸化,不会出现细胞周期停滞或细胞衰老^[22]。因此,端粒成为染色体末端独特的保护性结构,细胞能顺利进入有丝分裂阶段。

DNA复制不断受到内源性和外源性复制压力的挑战。有研究确定了首个内源性复制压力来源,即SMARCA1,一个SNF2家族DNA转位酶,在DDR中有助于阻止并修复DNA复制过程中的端粒DNA损伤,但确切机制尚不清楚^[23]。解旋酶RTEL1,在体外实验中也具有维持端粒DNA的稳定性的功能^[24]。最近,Schmiester等^[25]总结hSNM1B/Apollo与端粒DNA损伤通路蛋白相互作用(如Chk1),参与DNA修复过程,且在人类疾病中扮演重要的角色,可能是衰老或肿瘤治疗的靶点。进一步研究端粒DNA损伤发生的机制、综合分析端粒相关酶在阻止端粒损伤上

的协同作用是近年来的研究方向。

2.2 p53-p21下游效应通路

DDR是细胞感应损伤,从而延迟或阻滞细胞周期进程的分子信号通路。p21由*Cdkn1a*编码,是细胞周期依赖激酶抑制因子,属于CIP(CDK-interacting protein)家族中的一员,位于p53基因的下游。在p21基因编码区上游2.4 Kb和大约8 Kb处有二个p53共有的结合区^[26]。DDR会激活p53并在转录水平活化p21,进而通过抑制CDK2/cyclinE使pRb转变至非磷酸化的失活状态,端粒G-四链体结构更加稳固,从而引起细胞周期停滞并进行DNA修复,使细胞重新达到稳态^[27](图3)。

研究表明,p21在复制性衰老中明显上调^[28]。在人微血管内皮细胞中敲除p21基因,可完全阻止Ras诱导的细胞衰老,改善组织再生能力^[28-29]。p21过表达则可导致细胞周期阻滞,并出现一系列衰老征象,如衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)活性增加,细胞扁平 and 胀大等^[27]。p53对衰老具有双重调节作用,既能促进衰老,又能抑制衰老,提示p53对衰老的调节取决于细胞损伤或应激的程度和类型。轻度应激可促使p53修复细胞,而严重的应激则促使p53诱导凋亡和衰老^[27]。短暂的细胞周期阻滞可以为DNA损伤修复赢得时间,但当损伤修复反应不足以完全修复受损的DNA而使细胞内累积过多损伤的DNA时,细胞就可能进入不可逆的生长停滞状态,即所谓的细胞衰老。

2.3 p16-Rb辅助通路

除了p53-p21途径外, p16-Rb也是细胞衰老的重要效应通路。然而, 端粒DNA损伤与p16激活之间的联系尚不清楚。例如, 已证明在人类纤维细胞中p16能被DDR独立激活^[20]。然而, 最近的一项研究报告指出, p16的缺失导致小鼠胚胎成纤维细胞的增殖能力增强^[30]。此外, Shelterin中TRF2的失活诱导p16活化, 但这些细胞的p16缺失只导致DDR介导的局部细胞周期阻滞。只有当p16和p53同时被抑制时, 才能观察到完全的保护效应。p16可能作为一种辅助机制介导细胞衰老。

3 端粒与细胞衰老的关系

诱导细胞衰老的因素有很多, 比如端粒损伤和染色体结构损伤等。其中, 端粒损伤是诱导细胞衰老的重要因素。端粒的末端形成一个保护结构, 被称为端粒的“保护帽”(protective cap), 端粒结构破坏最终导致端粒的“脱帽”(uncapping), 暴露出染色体末端。

3.1 端粒DNA断裂(break/fragmentation)介导的细胞衰老过程

“脱帽”的端粒可以被识别为DSBs损伤, 激活DNA损伤机制。DDR损伤招募信号转导蛋白质等激活p53通路并使细胞周期蛋白质失活, 抑制细胞周期进程——衰老细胞的细胞周期阻滞常发生于G₁/S和S期^[31]。由于端粒DNA断裂反应促使细胞周期的四个阶段停滞或延迟, 因而端粒DNA断裂可能介导细胞的衰老。端粒DNA断裂反应可因内源性或外源性的端粒损伤诱导。

3.1.1 内源性端粒损伤因素 复制引起的端粒损伤, 使DDR大量增加, 诱导DSBs反应发生, 导致衰老。最先发现, 在哺乳动物细胞中当TRF2过表达时, 端粒损伤可造成早衰。在端粒结构中, 端粒DNA与端粒特异性结合蛋白结构密不可分, 而后的研究证明, 丢失Shelterin中的任意一个蛋白质都会导致衰老提前出现, 因Shelterin可以在端粒处抑制DNA损伤信号, 包括TRF2可以在DNA双链的端粒重复序列处抑制ATM信号, POT1可以在DNA单链的端粒突出处抑制ATR信号^[32]。复制过程中端粒DNA的断裂丢失, 影响Shelterin结构完整性, 向细胞传递DSBs信号引起衰老。Klement等^[33]研究也发现, DSBs反应可介导衰老发生, 衰老细胞中DNA损伤的部位往往与端

粒区域有很强的联系。

3.1.2 外源性端粒损伤因素 外源性端粒损伤因素包括UV、电离辐射和拟辐射化合物等。当细胞暴露于化学物质或伤害性辐射等某些物质到一定程度时, 会引起DDR。近期, Kamisugi等^[34]用博来霉素等药物作用于藓类植物的突变体, 这种突变体对外界刺激具有高度敏感性, 随着博来霉素实验浓度不断增加(1.6~5.0 ng/mL, 5倍稀释比), 超敏反应导致的DNA-DSBs频率逐渐升高。持续性的DDR导致DSBs反应, 激活p53-p21通路, 诱导细胞衰老等病理反应。

推测“脱帽”的端粒因内外源性因素作用下断裂丢失了Shelterin中与DNA相互作用的特异性保护蛋白, 导致端粒DNA保护功能丧失, 在基因组中被识别为DSBs, 而且损伤强度越强, DSBs发生的频率越高, 激活细胞基因组自身的损伤修复机制, 通过p53-p21通路导致细胞周期阻滞, 可能引起细胞衰老。尽管信息时代辐射无处不在, 尽可能远离强电离辐射区域是避免发生早衰的预防措施之一。

3.2 端粒DNA的融合(fusion)介导的细胞衰老过程

在Shelterin复合物中, TRF1的主要作用是控制端粒的延伸, TRF2促进T-环的形成参与维持端粒形态和结构的稳定, 防止端粒3'末端丢失和染色体端-端融合。在早期的研究中发现TRF2是端粒长度的负调节因子, 且不依赖于端粒酶的活性。2005年, 在Lechel等^[35]后续的研究中发现, TRF2的活性被抑制, 端粒也会发生异常, 出现染色体末端融合的现象。在小鼠活体内表达TRF2^{ΔBAM}蛋白质, 是Myb结构域缺失的碱性蛋白质。随着该蛋白质水平的增加, 小鼠肝细胞端粒功能活性异常加剧, 出现染色体融合, 有丝分裂呈非整倍性。从人成纤维细胞的端粒上敲除TRF2或表达TRF2^{ΔBAM}, 都会导致整个Shelterin结构瓦解, 染色体末端失去保护, 使细胞滞留在G₂/M期, 在M期发生末端融合, 细胞生长停滞并伴随衰老^[32]。

ATM是DDR系统中重要的信号转导蛋白, 在DDR的早期活化。TRF2可抑制ATM激酶活性。ATM的免疫沉淀结合物中存在TRF2蛋白, 可抑制Ser¹⁹⁸¹的磷酸化, 从而阻止ATM激酶活化^[32,36]。在成年大鼠星形胶质细胞和神经母细胞瘤中, TRF2脱离端粒DNA, 激活p53、p21及SA-β-gal, 细胞出现衰老特征, 表现为细胞皱缩, 膜通透性和脆性增加, 核膜内折, 细胞器数量减少特别是线粒体, 胞内出现脂褐

素等异常物质的沉积^[37]。TRF2活性被抑制或失活时,引起端粒DNA损伤,导致DDR相关因子聚集,如53BP1、ATM、Mre11、RAD17和 γ H2AX等。因此,由于TRF2的失活或者活性被抑制导致端粒DNA融合,从而激活ATM,招募并聚集DDR相关损伤应答因子,导致细胞衰老。

3.3 端粒DNA的缩短(shorten)介导的细胞衰老过程

氧化应激反应最容易作用于胸腺嘧啶T和鸟嘌呤G,端粒末端恰好富含G。活性氧类(reactive oxygen species, ROS)诱发DDR,可使端粒长度缩短。端粒缩短的速率可能与细胞抗氧化损伤能力相关^[38]。抗氧化剂的治疗可以降低端粒缩短速率,达到减缓衰老目的。慢性炎症过程中的细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)的过度表达均能消耗端粒长度,使端粒长度缩短^[39-40]。此外,许多与年龄有关的疾病,如阿尔茨海默病和心血管疾病都与线粒体功能障碍导致的ROS增多有关,同时加速了端粒DNA的缩短。

2003年, Fagagna等^[41]从人衰老成纤维细胞中检测到DNA损伤诱发的分子标志物,证实端粒的严重缩短是DNA受损的结果。在正常人细胞中,由端粒DNA缩短引发的细胞复制性衰老实质上也是一种细胞DDR。2013年, Boon等^[41]发现,通过诱导DDR和端粒DNA的缩短来调节心梗之后老化的心肌细胞以及心肌的收缩功能,这些衰老细胞表现出与DSBs引起的DDR相似的特征,激活上游的DNA损伤检控蛋白激酶,如ATM激酶和ATR激酶介导端粒发生的DDR。免疫荧光方法检测发现,衰老相关的DNA损伤灶(senescence-associated DNA damage foci, SDFs)中含有DDR相关蛋白质成分。ATM和/或ATR一旦被激活, Chk1和/或Chk2出现磷酸化,进而作用于p53等效应器,导致细胞周期停滞,并且在一定时间内不能继续细胞周期,导致细胞衰老,甚至细胞凋亡^[32,42-43]。最重要的是,端粒DNA缩短导致的细胞衰老,诱发的DDR也表现为 γ H2AX和53BP1等DNA损伤标志物的聚积,这与其他原因导致的发生在染色体末端的DDR形成的损伤灶(telomere dysfunction induced foci, TIF)一样^[42]。进一步研究也证实,端粒DNA缩短引起细胞衰老,诱导ATM/ATR介导的DDR,同时也激活了p53-p21下游信号转导通路。

通过比较血液白细胞、骨骼肌细胞、皮肤及皮

下脂肪细胞的端粒长度发现,在87例19~77岁不同年龄的人群中,虽然端粒在白细胞中最短而在肌肉细胞最长,但端粒缩短的速率在这四种组织中没有差别^[44]。可推测,在增殖组织(如血细胞和皮肤)和非增殖组织(如肌肉和脂肪)中端粒长度不同是在胚胎发生过程中形成的。或许可以在胚胎发生时改变增殖组织中细胞内端粒的长度来延长寿命。

最近的研究结果表明,端粒的缩短增加了染色体对辐射灵敏度,增加染色体畸变的可能性^[45]。而在2014年, Bauch等^[46]在研究长寿海燕的基因组时发现,染色体中长端粒比较短的端粒更能准确地预测寿命,认为是一种信息更丰富的生物标志物。这一发现与细胞衰老是由最短的端粒所诱发的事实形成了鲜明的对比。这个悖论的出现,猜测与较长的端粒在单位时间失去更多的碱基对,对外界各种形式压力的敏感度更好,加速端粒缩短。值得思考的是,端粒的主要功能是生物标志物,因它们的缩短可反映各种压力源的累积效应,而不是反映因端粒缩短而诱导细胞衰老。

3.4 端粒DNA的缺失/丢失(lose/attrition)介导的细胞衰老过程

端粒研究的不断深入,在证明端粒学说的同时,也对端粒酶学说提出挑战。根据经典理论,细胞绕过复制性衰老,需同时使DDR的检查点失活及端粒酶激活^[47]。端粒酶抑制剂可作用于癌细胞,但一些绕过复制性衰老的癌细胞中仍然存在相关的检查点活性。此外,端粒酶和长的端粒并不是细胞增殖的关键。

Artandi等^[48]和Bojovic等^[49]先后在2000年和2013年发现,检查点基因敲除小鼠可能患上恶性肿瘤,甚至向远处转移。Xue等^[50]发表的文章中采用了能说明这个机制的最好的模型——PAL系统(Palindromes system),出芽酵母细胞不能通过上述两个主要机制——端粒酶或HR维持端粒DNA长度,导致整个端粒的缺失。值得研究的是,实验中仍有一部分缺失端粒的细胞能逃脱复制性衰老,继续增殖数代。在缺乏端粒的状态下继续细胞分裂,相当于基因缺失的同时却能不断扩增,且两者不断交错进行,逐渐累积,比如回文序列的重复。在人类的癌症中也发现了很短的端粒结构^[51],这些数据都说明细胞能适应端粒DNA的缺失和相关基因组的不稳定却不死亡,向恶性转化和远处转移。同时,细胞也

能逃出DDR检查点的监控,但具体机制尚未明确。利用端粒预测细胞寿命是否适用于所有生物,还有待进一步研究。

4 总结与展望

每一个生命体的主要目标是将遗传物质完好无损地传给下一代,然而在生命进程中总会用各种内源性或环境因素不断攻击DNA,应对这一威胁,端粒是染色体末端一个特殊的结构,提高DNA复制时的准确性。在端粒DNA发生损伤时,生命进化出了DNA损伤信号的检测系统,主要由p53/p21/pRb信号通路介导,调节其修复。这样的DNA损伤应答机制是维护基因组稳定的保障,当DNA损伤以及基因组不稳定时激活损伤途径,触发细胞周期阻滞以及凋亡,进而加速生物个体衰老进程。在不同类型的人类肿瘤中,DDR介导的细胞衰老是抑制肿瘤形成的天然屏障^[26]。p53通过紧密联系的网路发挥对细胞衰老的调控作用,而p53如何调节这一网路系统及各通路间的联系仍有待研究证实。

到目前为止,大多数研究都证明了细胞衰老是端粒缩短的结果。然而,端粒DNA的丢失仍能介导细胞衰老,说明还存在着一些不依赖于端粒长度而诱发细胞衰老的机制,细胞衰老可能与端粒的长度无关^[52-53],从Davis等^[54]发现,鼠的端粒比人类长5~10倍,寿命却比人类短得多,到有人提出受损和未受损的端粒长度之间的不存在显著差异,受损的端粒DNA并不比未受损的短^[55],再到有人认为,DNA损伤更可能发生在长端粒上,因其可以传递更丰富的病变信息,就此解释了长度独立的DDR(length-independent DDR)的发生^[56]。随后的研究发现,长端粒的细胞对电离辐射更敏感,这表明高于临界长度的端粒更有可能积累DSBs^[57]。此外,最近的一项Mendelian随机研究显示,由生殖细胞遗传变异产生的长端粒和某些癌症风险的增加密切相关^[58]。然而,迄今为止的证据并没有明确指出,相比短的端粒DNA,长的端粒是优先被攻击的目标。一种可能性是,端粒的缩短反映的仅是压力源的累积效应,不同物种之间或者同一物种不同细胞之间的端粒空间结构不同则抗压力源打击的耐受程度不同,同物种之间更有可比性。也有可能是,现有技术中用来测量组织内端粒长度的灵敏度,不足以检测出细胞中或许还存在着极短端粒,从而掩盖了功能失调和

功能正常端粒之间可能存在的显著差异。

最近, Galbiati等^[59]开发一种新的定位方法,通过DNA损伤原位结扎(*situ ligation*)可以精确地检测到DNA断裂位点,再对邻近位点进行分析。使用这种方法,可定位体内外持续DSBs发生位点以及DDR相关蛋白。该方法或许可以为检测细胞中可能存在的极短端粒提供思路。总之,大量的证据表明,端粒不是作为一种效应器简单地决定一个细胞可以进行多少次分裂。取而代之的是,端粒作为内在和外在压力的分子传感器,通过限制细胞不断复制过程中积累的重大基因组损伤效应来维持基因组的稳定性。

由于细胞衰老是一个由多种因素引起的极其复杂的生理变化过程,目前的研究只限于一种或几种因素的分析上,且大多停留在假说的阶段,没有充分的实验数据支持,现有结果也只能反映衰老过程中的某个环节、某个侧面的机制。本文不涉及表观遗传部分,因此,阐明衰老的机制可以通过在分子层面将端粒DNA损伤进行分类,研究相关衰老通路的阻滞剂或者端粒酶激活剂,如TA-65等^[60]。端粒DDR通路和不同损伤类型介导的细胞衰老或许可为未来的医药研究指明方向。

参考文献 (References)

- 1 杨吉庆, 黄兆祥, 梁杰, 夏志远, 翟仙敦, 莫耀南. 测定端粒长度推断法医学年龄的研究进展. 河南科技大学学报(医学版) (Yang Jiqing, Huang Zhaoyang, Liang Jie, Xia Zhiyuan, Zhai Xiandun, Mo Yaonan. Review of telomere length for forensic age estimation. J Henan Univ Sci Tech, Med Sci) 2016; 34(2): 156-60.
- 2 van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. Nature 2014; 509(7501): 439-46.
- 3 de Lange T. Telomeres and senescence: ending the debate. Science 1998; 279(5349): 334-5.
- 4 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 2009; 461(7267): 1071-8.
- 5 Doksan Y, Wu JY, de Lange T, Zhuang X. Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. Cell 2013; 155(2): 345-56.
- 6 de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev 2005; 19(18): 2100-10.
- 7 O'Connor MS, Safari A, Xin H, Liu D, Songyang Z. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(32): 11874-9.
- 8 Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. Exp Cell Res 2013; 319(2): 133-41.

- 9 Paeschke K, Simonsson T, Postberg J, Rhodes D, Lipps HJ. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(10): 847-54.
- 10 陈勇, 赵传奇, 曲晓刚. 人类端粒DNA的分子识别及其作用机制探讨. *中国科学: 化学*(Chen Yong, Zhao Chuanqi, Qu Xiaogang. Recognition and mechanism of action in human telomere DNA molecular. *SCI Chin SER B*) 2012; 42(12): 1717-31.
- 11 Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 2000; 18(13): 2626-34.
- 12 Hartwig FP, Bertoldi D, Larangeira M, Wagner MS. Up-regulating telomerase and tumor suppressors: focusing on anti-aging interventions at the population level. *Aging Dis* 2013; 5(1): 17-26.
- 13 Niida H, Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 2006; 21(1): 3-9.
- 14 d'Adda di Fagnana 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.
- 15 Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007; 3(10): 640-9.
- 16 Doksan Y, de Lange T. Telomere-internal double-strand breaks are repaired by homologous recombination and PARP1/Lig3-dependent end-joining. *Cell Rep* 2016; 17(6): 1646-56.
- 17 Mao P, Liu J, Zhang Z, Zhang H, Liu H, Gao S, *et al.* Homologous recombination-dependent repair of telomeric DSBs in proliferating human cells. *Nat Commun* 2016; 7: 12154.
- 18 Karpenshif Y, Bernstein KA. From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2012; 11(10): 781-8.
- 19 Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 2012; 47(4): 497-510.
- 20 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.
- 21 Chiba K, Lorbeer FK, Shain AH, McSwiggen DT, Schruf E, Oh A, *et al.* Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science* 2017; 357(6358): 1416-20.
- 22 Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003; 13(17): 1549-56.
- 23 Poole LA, Zhao R, Glick GG, Lovejoy CA, Eischen CM, Cortez D. SMARCA1 maintains telomere integrity during DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(48): 14864-9.
- 24 Vannier JB, Pavicic-Kaltenbrunner V, Petalcorin MI, Ding H, Boulton SJ. RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. *Cell* 2012; 149(4): 795-806.
- 25 Schmiester M, Demuth I. SNM1B/Apollo in the DNA damage response and telomere maintenance. *Oncotarget* 2017; 8(29): 48398-409.
- 26 Van Nguyen T, Puebla-Orsorio N, Pang H, Dujka ME, Zhu C. DNA damage-induced cellular senescence is sufficient to suppress tumorigenesis: a mouse model. *J Exp Med* 2007; 204(6): 1453-61.
- 27 赵思达, 常春康. p53与细胞衰老关系的研究进展. *诊断学理论与实践*(Zhao Sida, Chang Chunkang. The research progress of p53 and cell aging relations. *Journal of Diagnostics Concepts & Practice*) 2014; 13(6): 636-9.
- 28 Borgdorff V, Leonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, *et al.* Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene* 2010; 29(15): 2262-71.
- 29 Choudhury AR, Ju Z, Djojotubroto MW, Schienke A, Lechel A, Schaetzlein S, *et al.* Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet* 2007; 39(1): 99-105.
- 30 Zhang X, Wu X, Tang W, Luo Y. Loss of p16(Ink4a) function rescues cellular senescence induced by telomere dysfunction. *Int J Mol Sci* 2012; 13(5): 5866-77.
- 31 Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C, *et al.* Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 2006; 444(7115): 61-6.
- 32 Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 2007; 448(7157): 1068-71.
- 33 Klement K, Goodarzi AA. DNA double strand break responses and chromatin alterations within the aging cell. *Exp Cell Res* 2014; 329(1): 42-52.
- 34 Kamisugi Y, Whitaker JW, Cuming AC. The transcriptional response to DNA-double-strand breaks in *Physcomitrella patens*. *PLoS One* 2016; 11(8): e0161204.
- 35 Lechel A, Satyanarayana A, Ju Z, Plentz RR, Schaetzlein S, Rudolph C, *et al.* The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis *in vivo*. *EMBO Rep* 2005; 6(3): 275-81.
- 36 Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, *et al.* The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2004; 2(8): E240.
- 37 Zhang P, Furukawa K, Opresko PL, Xu X, Bohr VA, Mattson MP. TRF2 dysfunction elicits DNA damage responses associated with senescence in proliferating neural cells and differentiation of neurons. *J Neurochem* 2006; 97(2): 567-81.
- 38 Ludlow AT, Spangenburg EE, Chin ER, Cheng WH, Roth SM. Telomeres shorten in response to oxidative stress in mouse skeletal muscle fibers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69(7): 821-30.
- 39 Zhang J, Rane G, Dai X, Shanmugam MK, Arfuso F, Samy RP, *et al.* Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res Rev* 2016; 25: 55-69.
- 40 刘惠芬, 李峰, 彭东旭, 谭林华, 赵本华. 端粒、端粒酶及靶向抗衰老研究. *现代预防医学*(Liu Huifen, Li Feng, Peng Dongxu, Tan Linhua, Zhao Benhua. Research on telomere/telomerase and targeting anti-aging therapeutics. *Modern Preventive Medicine*) 2017; 44(3): 557-60.
- 41 Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, *et al.* MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 2013; 495(7439): 107-10.
- 42 Guo X, Deng Y, Lin Y, Cosme-Blanco W, Chan S, He H, *et al.* Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA

- damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J* 2007; 26(22): 4709-19.
- 43 Churikov D, Price CM. Pot1 and cell cycle progression cooperate in telomere length regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(1): 79-84.
- 44 Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, *et al.* Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* 2013; 4: 1597.
- 45 Hernandez L, Terradas M, Camps J, Martin M, Tusell L, Genesca A. Aging and radiation: bad companions. *Aging Cell* 2015; 14(2): 153-61.
- 46 Bauch C, Becker PH, Verhulst S. Within the genome, long telomeres are more informative than short telomeres with respect to fitness components in a long-lived seabird. *Mol Ecol* 2014; 23(2): 300-10.
- 47 Wright WE, Shay JW. Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol* 1995; 5(8): 293-7.
- 48 Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, *et al.* Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; 406(6796): 641-5.
- 49 Bojovic B, Crowe DL. Dysfunctional telomeres promote genomic instability and metastasis in the absence of telomerase activity in oncogene induced mammary cancer. *Mol Carcinog* 2013; 52(2): 103-17.
- 50 Xue Y, Marvin ME, Ivanova IG, Lydall D, Louis EJ, Maringele L. Rif1 and Exo1 regulate the genomic instability following telomere losses. *Aging Cell* 2016; 15(3): 553-62.
- 51 Heaphy CM, Gaonkar G, Peskoe SB, Joshu CE, De Marzo AM, Lucia MS, *et al.* Prostate stromal cell telomere shortening is associated with risk of prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Prostate* 2015; 75(11): 1160-6.
- 52 Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, *et al.* Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* 2012; 3: 708.
- 53 Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, *et al.* Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun* 2014; 2: 4172.
- 54 Davis T, Kipling D. Telomeres and telomerase biology in vertebrates: progress towards a non-human model for replicative senescence and ageing. *Biogerontology* 2005; 6(6): 371-85.
- 55 Suram A, Kaplunov J, Patel PL, Ruan H, Cerutti A, Boccardi V, *et al.* Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *EMBO J* 2012; 31(13): 2839-51.
- 56 Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 2012; 14(4): 355-65.
- 57 Fairlie J, Harrington L. Enforced telomere elongation increases the sensitivity of human tumour cells to ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* 2015; 25: 54-9.
- 58 Haycock PC, Burgess S, Nounu A, Zheng J, Okoli GN, Bowden J, *et al.* Association between telomere length and risk of cancer and non-neoplastic diseases: a mendelian randomization study. *JAMA Oncol* 2017; 3(5): 636-51.
- 59 Galbiati A, Beausejour C, d'Adda di Fagagna F. A novel single-cell method provides direct evidence of persistent DNA damage in senescent cells and aged mammalian tissues. *Aging Cell* 2017; 16(2): 422-7.
- 60 Bernardes de Jesus B, Schneeberger K, Vera E, Tejera A, Harley CB, Blasco MA. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell* 2011; 10(4): 604-21.