

## 特约综述



本课题组的研究工作主要是从细胞、染色体、基因、蛋白质多个水平研究恶性肿瘤的发病机理; 研究细胞癌变的分子机理和信号传导通路, 以及细胞增殖、细胞凋亡、细胞老化与细胞恶性转化的信号传导通路。近年来, 应用细胞生物学、分子生物学以及蛋白质组学等技术方法深入探讨重要信号通路(如Wnt通路等)在癌变过程中的重要意义, 并逐步揭示其作用机理。

<http://www.cicams.ac.cn/cicams/web/detail.aspx?nodeID=162&conID=107>

## 细胞老化的基本特征和研究进展

张聚<sup>1</sup> 刘斯奇<sup>1\*</sup> 徐宁志<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院北京基因组研究所, 北京 101318; <sup>2</sup>中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 北京 100021)

**摘要** 自20世纪60年代初发现细胞老化以来, 关于细胞老化的研究有了长足的进展。“Hayflick极限(Hayflick limit)”概念的确立不仅在细胞水平揭示了细胞寿命的重要分子机制, 而且拓展了人们对于衰老(aging)的认识。近年来, 越来越多的实验结果表明, 细胞老化可以在体内有效阻止癌症的发生, 尤其在癌症早期具有明显作用。该文就半个多世纪以来, 关于人们认知的细胞老化的基本特征、判别标准以及相关研究进展予以综述。

**关键词** 细胞老化; 衰老; 癌症; 特征; Hayflick极限

## Senescence: General Features and Current Progress on the Research

Zhang Ju<sup>1</sup>, Liu Siqu<sup>1\*</sup>, Xu Ningzhi<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101318, China; <sup>2</sup>Cancer Institute and Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**Abstract** Since senescence was defined in the early 1960s, research on this topic has made substantial progress. The concept of “Hayflick limit” established from senescence research not only let us reveal important molecular mechanisms of cell life at the cellular level, but also expand our understanding of the aging. In recent years, more and more experimental results show that the senescence can effectively prevent the occurrence of cancer *in vivo*, especially has obvious effect during early stage of cancer. Based on the knowledge over past half a century, we would like to focus on the general features, criteria and current progress of senescence in this review.

**Key words** senescence; aging; cancer; features; Hayflick limit

国家自然科学基金(批准号: 81021061)和国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2011CB910700)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-80485325, Fax: 010-80485324, E-mail: siqiliu@genomics.org.cn; Tel: 010-87788487, Fax: 010-67738220, E-mail: xningzhi@public.bta.net.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81021061) and the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No.2011CB910700)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-80485325, Fax: +86-10-80485324, E-mail: siqiliu@genomics.org.cn; Tel: +86-10-87788487, Fax: +86-10-67738220, E-mail: xningzhi@public.bta.net.cn

20世纪60年代初,美国科学家Leonard Hayflick在体外培养细胞时发现了一种特殊的细胞生命活动状态,并将其命名为细胞老化(senescence)。一般而言,细胞老化是指细胞失去分裂能力而发生不可逆的细胞周期阻滞的一种现象或状态。它可由多种诱导因素触发,如染色质端粒(telomere)长度过短、外界刺激(如缺氧等)、DNA损伤和癌基因、抑癌基因的活性异常等<sup>[1]</sup>。细胞老化的发现为从细胞水平上探讨“生物寿命”展现了广阔天地。由此,人们不仅发现了控制寿命的“分子钟”——端粒和端粒酶(端粒的长度决定了细胞的分裂潜能以及物种的理论寿命)<sup>[2]</sup>;发现了拮抗肿瘤的“卫士”——细胞老化与细胞凋亡(它们共同构成了正常细胞抵抗自身发生恶性转化的两种主要屏障)<sup>[1,3]</sup>;而且,还不断挖掘和诠释了“衰老”与“肿瘤”——这两个人类宿敌——之间的分子联系<sup>[4-5]</sup>。也正是由于这些发现的不断推动,使得细胞老化在近十年来成为生命科学研究领域的热点之一。

## 1 细胞老化的发现

如何才能延年益寿、长生不老?自古以来,人们为之津津乐道、孜孜以求。“细胞老化”概念在人类探寻不同物种个体寿命规律的漫长进程中应运而生。1882年,德国生物学家Weismann曾大胆预测“在细胞水平存在老化现象”。他推测:机体的寿命限制受控于体细胞的分裂能力;在遗传进化中,不同物种的体细胞获得了不同分裂潜能,从而决定了不同物种的寿命长短<sup>[6]</sup>。然而,这一假设在半个多世纪后,才得以证实。

20世纪50年代开始,体外培养哺乳类细胞技术日趋成熟,并被广泛应用。Swim和他的同事们<sup>[7-8]</sup>利用原代细胞体外培养实验证明了来源于不同物种的成纤维细胞均不具备无限分裂的潜能。而真正突破性的进展源自Hayflick和Moorhead<sup>[9]</sup>更为系统、更为细致的观察和描述。他们在对25株人成纤维细胞进行原代培养的过程中,发现在经过约50次传代之后,所有细胞出现功能退化并丧失分裂能力的现象,并且推论这一现象是由内源性因素导致的细胞水平的老化现象。人们将这一现象称之为“Hayflick极限(Hayflick limit)”,或自发性老化(replicative senescence)。而类似的细胞老化现象也很快在人体内的其它间质细胞、上皮细胞,乃至其它物种中得以

验证<sup>[10-12]</sup>。例如,小鼠胚胎成纤维细胞的分裂潜能是14-28次,鸡是15-35次,人是40-60次,而龟则长达72-114次。所有这些实验无一例外地证明了细胞将随着体外培养代龄的增加逐渐走向老化状态。但是,人们更为关心的是这种体外观察到的现象是否在体内也真实存在?人们分离培养了人不同年龄的成纤维细胞,发现相对于胚胎,供体的年龄越大,其成纤维细胞的分裂潜能越低(20岁左右供体来源的细胞可以分裂 $30\pm 10$ 次,而70岁左右供体来源的细胞只能分裂 $20\pm 10$ 次)<sup>[13]</sup>。至此,证明了细胞老化并不是体外培养所导致,细胞在体内也会随着年龄的增长,逐步迈向老化。这一结果还在其他灵长类(如狒狒)动物体内得到了验证,即体内老化细胞随着年龄增长而增多(具有分裂潜能的皮肤成纤维细胞尤为显著)<sup>[14-15]</sup>。

## 2 细胞老化的基本特征与判别标准

### 2.1 细胞周期阻滞

长期的细胞周期阻滞是老化细胞的基本特征,也是体外鉴定细胞老化不可或缺的指标<sup>[16]</sup>。以发生细胞老化的包皮成纤维细胞为例,它们可以在体外持续培养12~14个月,而不会重新进入细胞周期<sup>[6]</sup>。为了检查细胞是否跃出了细胞周期,人们通常检测增殖指示分子Ki-67的表达丰度;或者通过将与胸腺嘧啶相似的溴脱氧尿嘧啶(bromodeoxyuridine, BrdU)掺入到细胞培养基中,观察是否有新DNA的合成。流式细胞术的开发与应用使人们能够清晰地观察到细胞群体中处于不同周期细胞的比例:细胞老化主要表现为G<sub>1</sub>期阻滞,但是在个别情况下也可以伴随G<sub>2</sub>/M期周期阻滞,或直接由G<sub>2</sub>/M期阻滞诱发形成<sup>[17-18]</sup>。

### 2.2 细胞形态改变

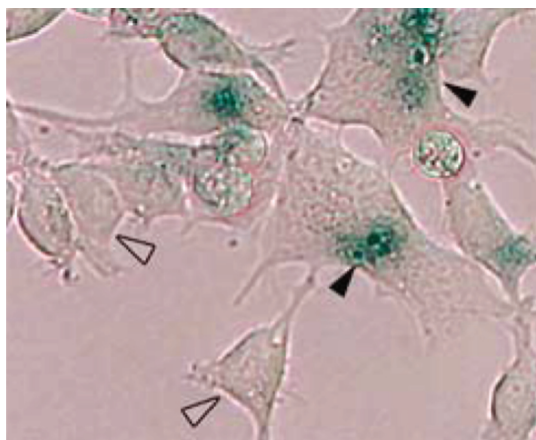
虽然由于细胞周期的中断和DNA复制的停止,老化细胞中的DNA含量与正常细胞中类似,但老化细胞中RNA与蛋白质丰度均较正常细胞明显升高<sup>[19-20]</sup>。这是因为尽管细胞进入老化阶段后蛋白质的整体合成速率降低,但是蛋白质的降解体系则受到更为明显的抑制,导致蛋白质在细胞内持续堆积<sup>[21-22]</sup>。以此类推,同样的情况应该也发生在RNA的合成和降解过程中。这种生物大分子的蓄积迫使老化细胞的形态发生改变,如细胞体积增大、细胞扁平、胞核与核仁体积增加等(图1)。除此之外,老化细胞中高尔基体和溶酶体数量的增多、体积的增大,导致胞

质内颗粒明显增多<sup>[20,23-25]</sup>。然而,并不是所有的细胞老化现象都会出现上述所有类型的细胞形态改变。例如,在一些由于基因突变或表达异常导致的早发性细胞老化(premature senescence)中,其细胞形态改变就不甚典型<sup>[16]</sup>。另外,对比不同组织来源的细胞,其正常形态本就千差万别,因此,目前尚无客观的、统一的标准从细胞形态判断并定义老化细胞。

### 2.3 老化相关 $\beta$ -半乳糖苷酶活性染色

细胞形态判别的主观性和异质性,以及检测细胞周期阻滞缺乏直观性(大多数指标都需要我们通过体外操作完成),往往很难在组织机体中直接观察到老化细胞。而老化相关 $\beta$ -半乳糖苷酶(senescence associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal)活性染色在解决这个问题时具有独特的优势<sup>[26]</sup>。 $\beta$ -半乳糖苷酶主要位于溶酶体,其酶活的最适条件为pH4.2~pH4.6,而在接近中性的条件下无法检测到它的活性<sup>[27]</sup>。当细胞发生老化时,溶酶体膨胀、增多, $\beta$ -半乳糖苷酶在溶酶体中明显蓄积,从而保证了即使在pH6的条件下依然可以检测到该酶的残余活性<sup>[25-26,28]</sup>。故而人们将在pH6时仍活性可检的 $\beta$ -半乳糖苷酶称为SA- $\beta$ -gal(图1)。如今,SA- $\beta$ -gal染色业已成为检测细胞老化最普遍的指标。

值得注意的是, $\beta$ -半乳糖苷酶并不是细胞老化过程所必需的<sup>[29]</sup>,而且,其酶活性升高也往往早于细



实心箭头指示的是发生细胞老化的HEK293细胞,而空心箭头指示的是未发生老化的细胞。由图片可以看出老化细胞体积增大、细胞扁平、SA- $\beta$ -gal染色阳性。

The hollow arrows indicate the normal HEK293 cells. And the soled arrows denote the senescent cells which are large, flat and SA- $\beta$ -gal positive.

图1 老化细胞的SA- $\beta$ -gal染色

Fig.1 Representative image of SA- $\beta$ -gal(blue) staining for senescent cells

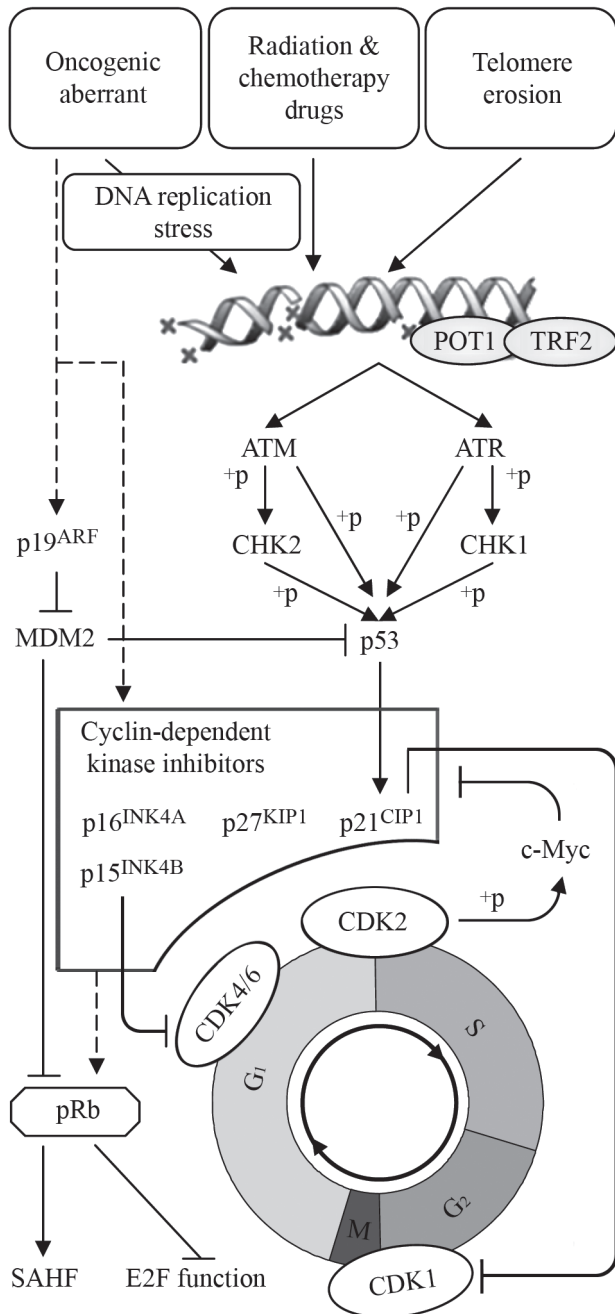
胞老化。但是,在细胞发生老化后,可在pH6的条件下检出 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性<sup>[28,30]</sup>。另外,在一些特定条件下,例如体外培养细胞时,因接触性抑制、血清饥饿引发的细胞休眠(quiescence)可出现SA- $\beta$ -gal着色<sup>[26,28]</sup>。还有,在十二指肠黏膜和发生肠化生的胃黏膜中也可检测到明显的SA- $\beta$ -gal着色,而在正常胃黏膜细胞中SA- $\beta$ -gal染色却仅为弱阳性,提示SA- $\beta$ -gal活性可能在终末分化的肠黏膜上皮细胞中升高(但目前并无充分证据证明十二指肠黏膜SA- $\beta$ -gal染色阳性的细胞是体内老化的细胞)<sup>[31]</sup>[详见“细胞老化与终末分化(terminal differentiation)、细胞休眠(cell quiescence)的区别”相关内容]。

尽管如此,因为其敏感性、特异性、简便性、易操作性等优势,SA- $\beta$ -gal染色依然是目前检测细胞老化的诸多方法中应用最为广泛的一种方法。

### 2.4 肿瘤抑制分子网络激活

由于p53/p21<sup>CIP1</sup>通路和p16<sup>INK4A</sup>/pRb(视网膜母细胞瘤蛋白, retinoblastoma)通路介导了绝大多数细胞老化<sup>[32]</sup>(图2),肿瘤抑制分子网络的激活也被广泛用作细胞老化的分子标记物,而这种信号网络的改变也恰恰对应了老化的基本特征——细胞周期阻滞。p53作为老化过程中的关键结点,能够感受到细胞内众多应激压力的改变,如原癌基因的异常活化、端粒功能异常、DNA损伤和活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的累积等<sup>[16]</sup>。在各种原因诱导的老化人成纤维细胞中经常出现p53功能活化,而这并不总是伴随着p53表达丰度的增加,p53的翻译后修饰(特别是第15位丝氨酸磷酸化和第382位赖氨酸乙酰化)为细胞老化作出了重要贡献<sup>[33-36]</sup>。在p53的众多下游基因中,p21<sup>CIP1</sup>在细胞老化中的作用最为突出<sup>[37-38]</sup>。它不但可以通过抑制周期蛋白依赖性激酶1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)诱使细胞发生G<sub>2</sub>/M周期阻滞<sup>[39-40]</sup>,还可以通过抑制CDK2和CDK4的活性来降低pRb磷酸化水平使细胞无法进入S期<sup>[41-42]</sup>。在老化细胞中,非磷酸化的pRb聚集在E2F上,阻止E2F下游促增殖靶基因的转录<sup>[43]</sup>,是细胞老化过程中另一重要的信号结点。除了p21<sup>CIP1</sup>外,pRb还广泛受到细胞周期抑制分子的调节,如p27<sup>KIP1</sup>、p16<sup>INK4A</sup>、p15<sup>INK4B</sup>等。其中,p16<sup>INK4A</sup>对pRb的阻遏作用在老化过程中发挥着重要作用。它不仅介导细胞周期阻滞,还对老化相关异染色质集落(senescence associated heterochromatin foci, SAHF)的形成至关重要<sup>[38,44-45]</sup>。此外,其它细胞周期





DNA损伤应答(DDR)机制的启动和肿瘤抑制分子网络的激活在细胞老化进程中发挥了重要作用。实线表示直接作用,虚线表示间接作用。The activation of DNA damage response(DDR) and tumor suppressor networks play important roles in the senescent processes. The solid lines represent the direct functions, and the dotted lines indicate the indirect functions.

图2 细胞老化通路模式图

Fig.2 Model of senescent pathways

抑制分子也被广泛报道参与了细胞老化的调控<sup>[46-49]</sup>。与 $p16^{INK4A}$ 、 $p15^{INK4B}$ 位于同一基因座的交替读码框蛋白(alternate open reading frame, ARF)也可以通过抑制p53和pRb的降解调控细胞老化<sup>[50-51]</sup>。

虽然在老化细胞中肿瘤抑制分子网络被广泛激活,但上述分子并不会在所有老化模型中全部上调;即使是同一种应激-老化模型,在不同类型的细胞中也可能激活不同的老化通路。例如,在小鼠骨肉瘤细胞中下调c-Myc的表达丰度可以广泛上调p53/p21<sup>CIP1</sup>、 $p16^{INK4A}$ /pRb和 $p15^{INK4B}$ 的活性;在小鼠肝癌细胞和人成纤维细胞中,相同刺激仅仅通过激活 $p16^{INK4A}$ 、 $p15^{INK4B}$ 和pRb诱发细胞老化;而在小鼠淋巴瘤细胞和人胚肾细胞中,这种老化模型则主要依赖p53/p21<sup>CIP1</sup>通路的活化<sup>[52-54]</sup>。另外,同一肿瘤抑制分子的活化在不同老化模型中的地位也不尽相同。在黑色素瘤和结肠腺瘤发展早期,原癌基因的异常活化均会导致高水平的细胞老化并伴随 $p16^{INK4A}$ 丰度的升高;但是在黑色素细胞中, $p16^{INK4A}$ 对于老化并非无可替代,而在结肠腺上皮细胞中它却与细胞老化密不可分<sup>[55-59]</sup>。随着对黑色素细胞老化机制研究的深入,人们发现活跃转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)介导的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)通路的激活在其中发挥关键作用,而该通路的活化并不依赖p53和 $p16^{INK4A}$ 的活化<sup>[60]</sup>。这提示,除了调控细胞周期的肿瘤抑制分子网络以外,还存在其它调控细胞老化的信号传导通路。然而,目前对于其他通路知之甚少。

## 2.5 老化相关异染色质集落(SAHF)形成

除了上述检测指标以外,SAHF形成是描述细胞老化状态的另一特异指标,它主要表现为常染色质DNA凝集,并聚结成为散在、致密、大小不一的异染色质颗粒<sup>[61-62]</sup>,而每一个异染色质颗粒大部分来自一条单独的染色体<sup>[63-64]</sup>;SAHF参与了老化过程中细胞周期调控基因的转录沉默,进而在不可逆的细胞周期阻滞中发挥重要作用<sup>[61,65]</sup>。在SAHF中,H3型组蛋白(histone H3)第9位赖氨酸(H3K9)三甲基化水平明显升高,并以此为锚定点吸引各亚型异染色质蛋白1(heterochromatin protein 1, HP1)大量富集<sup>[61]</sup>;同时会出现染色质上H1型组蛋白(histone H1)的剥离和高迁移率A族蛋白(high-mobility group A proteins, HMGA proteins)、非经典组蛋白macroH2A的附着沉积<sup>[44,62,64,66]</sup>(图3)。这些表现与细胞中常见的发生转录抑制的异染色质(如X染色体莱昂化形成的巴氏小体)以及有丝分裂和细胞凋亡过程中形成的致密染色质结构相同,然而不同的是在SAHF中并不

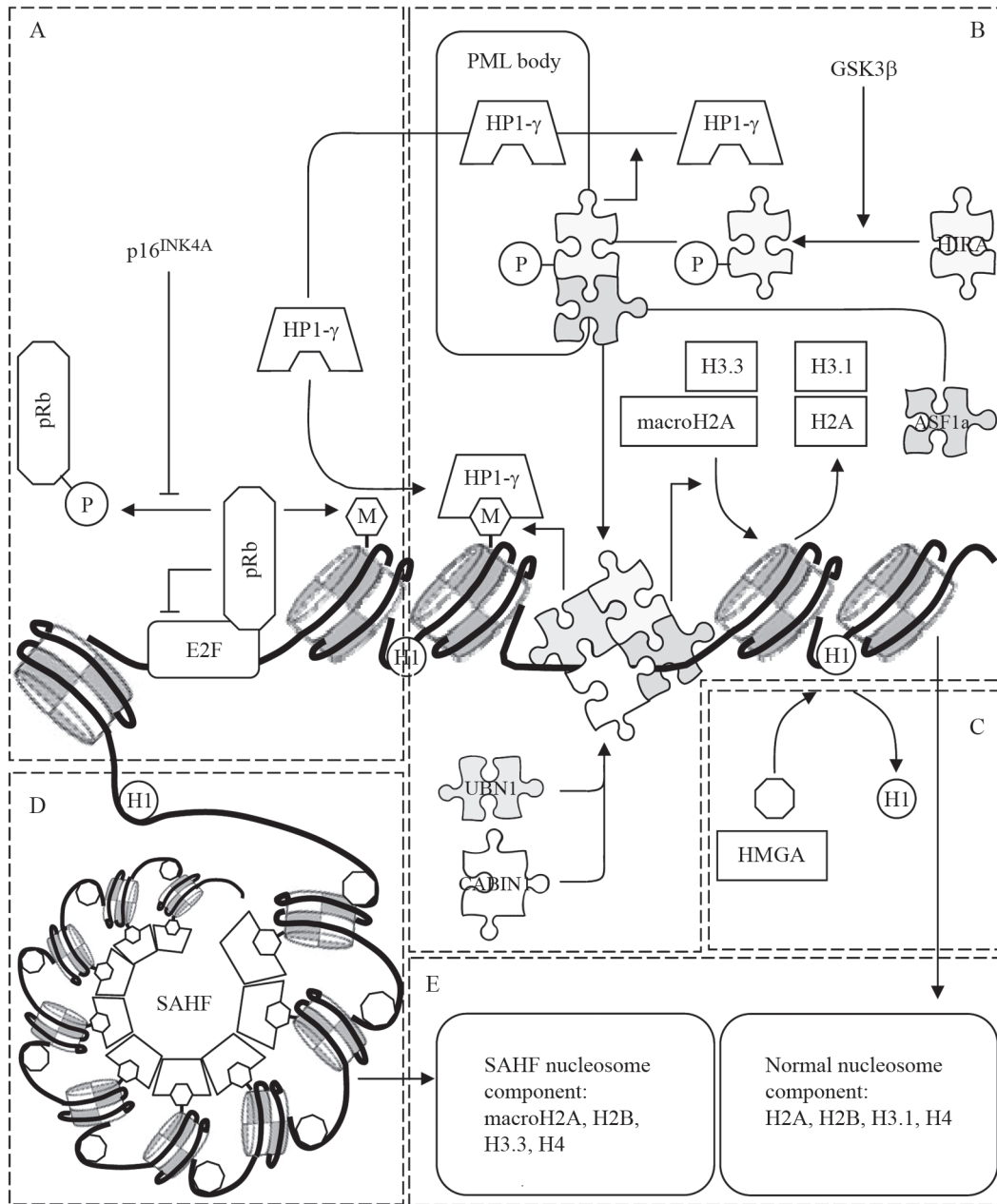
存在H3型组蛋白第10、28位丝氨酸磷酸化(H3S10P & H3S28P)以及H2B型组蛋白第14位丝氨酸磷酸化(H2BS14P)<sup>[64,67]</sup>。

现在普遍认为, SAHF是在p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路和以组蛋白抑制蛋白A(histone repressor A, HIRA)为核心的组蛋白分子伴侣(chaperone)复合物协同作用下逐步形成的<sup>[44]</sup>(图3)。当p16<sup>INK4A</sup>蛋白丰度升高时, E2F的转录因子活性受到明显抑制, 结合在E2F靶标基因上的组蛋白甲基化水平升高, 从而为HP1的结合以及SAHF的形成提供了靶点<sup>[44-45]</sup>。而在SAHF形成早期, HIRA从核浆转位至PML核内小体(PML nuclear bodies)同样至关重要——*HIRA*的失活突变致使其无法发生PML小体转位, 以及外源表达PML-RAR融合蛋白导致PML小体丧失功能, 均能阻止SAHF的形成<sup>[68]</sup>。这种转位现象发生在异染色质凝集和细胞周期阻滞之前, 并且在很大程度上不依赖于p16<sup>INK4A</sup>/pRb和p53/p21<sup>CIP1</sup>老化通路的活化<sup>[62,68]</sup>。对于HIRA而言, PML小体是其被转运至SAHF形成区染色质上的“中转站”, HIRA复合物在此进行必要的修饰和装配<sup>[44]</sup>; 而且, HIRA在PML小体的富集也极有可能促进HP1的转位和修饰<sup>[69]</sup>。HIRA作为“脚手架”, 可以结合抗沉默功能蛋白1a(anti-silencing function 1a, ASF1a)、泛核蛋白1(ubiquitin 1, UBN1)和钙调磷酸酶结合蛋白1(calcineurin binding protein 1, CABIN1), 形成组蛋白分子伴侣复合物<sup>[62,70-71]</sup>。其中, ASF1a可以通过与组蛋白H3/H4二聚体互作使核小体发生解离, 而复合物中的其它分子则用组蛋白H3.3将常染色质核小体中的组蛋白H3.1置换出来<sup>[70-74]</sup>。此外, 外源高表达HIRA或ASF1a均可以直接引起macroH2A取代H2A型组蛋白(histone H2A)进入核小体<sup>[62]</sup>(具体机制仍不清楚, 可参见Adams的综述<sup>[44]</sup>)。macroH2A利用C末端的非组蛋白区阻碍转录因子结合到染色质DNA上, 妨碍基因转录激活; 应当特别注意的是, macroH2A虽然是通过ATP依赖的染色质重塑(ATP-dependent chromatin remodeling)机制置换到核小体当中的, 但是体外实验显示该机制并不能将其从核小体中置换出来, 这为解释细胞老化的不可逆性提供了一种可能机制<sup>[44,75]</sup>。以上证据都说明该分子伴侣复合物直接促成了SAHF形成过程中核小体的重构和染色质的凝集, 而同时该复合物中的UBN1还具有组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase)的作用, 可以催化H3K9三甲基化<sup>[70]</sup>。在HIRA介导的染色质凝集

过程中, 并不需要HP1的参与, 因此人们推测, HP1并不参与SAHF的早期形成, 而是负责SAHF的加固和长期维持<sup>[44]</sup>。然而, HIRA是如何在细胞老化早期发生PML小体转位的呢? 老化早期的Wnt通路失活在该过程中扮演了重要角色, 而糖原合成酶激酶3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )的激活及其对HIRA的磷酸化更有可能为HIRA转位程序下达启动指令<sup>[76-77]</sup>。尽管HIRA的PML转位很大程度上不依赖于p16<sup>INK4A</sup>/pRb和p53/p21<sup>CIP1</sup>通路的活化<sup>[68]</sup>, 但是近年的报道显示, 在存在选择性端粒延长(alternative lengthening of telomeres, ALT)机制的Li-Fraumeni综合征细胞中, p53的异常表达可以促进HIRA的PML小体转位及后续的HP1转位<sup>[69]</sup>。

由于p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路和HIRA复合物都是SAHF形成所必需的, 它们之间的协调合作机制让人们产生了浓厚的兴趣。一种模型是二者分别控制SAHF形成的不同步骤, 例如pRb在E2F靶标基因的启动子区启动异染色质的形成, 而HIRA复合物在此基础上介导大规模的染色质凝集; 而另一种模型则是二者分别作用于共同的功能底物, 从而协同调控SAHF形成, 而DnaJ同源蛋白A2(DnaJ homolog A2, DNAJA2)便是后选底物之一<sup>[44]</sup>。DNAJA2可以与pRb和HIRA相互作用, 而抑制pRb和HIRA的活性仅能够部分削弱外源DNAJA2表达引发的SAHF形成, 这提示pRb和HIRA至少部分通过DNAJA2推动SAHF进程<sup>[68]</sup>。不过现在依然缺乏直接证据证明DNAJA2位于pRb和HIRA的下游, 且是形成SAHF所不可或缺的。简而言之, p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路和HIRA复合物之间的协同机制仍主要停留在人们的推测之上。

除了p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路和HIRA复合物之外, 细胞中一些其它蛋白也对SAHF形成有所贡献。例如: Ras<sup>V12</sup>诱导细胞老化的细胞模型中, DNA复制应力(DNA replication stress)引起的共济失调血管扩张症及Rad3相关蛋白(ataxia telangiectasia and Rad3 related, ATR)和NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)的活化(而不是p53蛋白)对SAHF的形成至关重要<sup>[78-79]</sup>。另外, 如前所述, 在SAHF形成过程中会出现染色质上H1型组蛋白的剥离和HMGA家族蛋白质的附着(这一现象的分子机制尚不清楚), 而且, HMGA与H1型组蛋白在染色质DNA上的结合区域相同, 且二者之间存在竞争<sup>[80]</sup>。人们可以推测——在细胞老化过程中正是由于HMGA的竞争才导致H1型组蛋白的剥



A:  $p16^{INK4A}/pRb$ 通路的激活使E2F靶基因启动子区的组蛋白发生甲基化, 为SAHF的形成提供锚点; B: HIRA组蛋白分子伴侣复合物的转位及其介导的核小体重构; C: HGMGA蛋白置换细胞染色质中的H1型组蛋白; D: HP1- $\gamma$ 蛋白能够识别染色质上的H3K9, 并且可以通过不同HP1- $\gamma$ 分子之间的相互作用, 令染色质DNA进一步超螺旋形成SAHF; E: 正常核小体组分与参与SAHF形成的核小体组分之间的对比。曲线反映蛋白质转位, 折线反映蛋白质作用。H: 组蛋白; M: H3K9位的三甲基化; P: 磷酸化。

A: activation of  $p16^{INK4A}/pRb$  pathway facilitates the histone methylation on promoters of E2F target genes, which anchors HP1- $\gamma$  proteins to these regions; B: the HIRA-containing chaperone complexes are translocated to the chromatin, and mediate nucleosome remodeling; C: the HGMGA proteins exchange the histone H1 binding to the chromatin; D: the HP1- $\gamma$  proteins recognize the tri-methylation of K9 histone H3, and promote the SAHF formation through interactions between themselves; E: compared with normal nucleosomes, the components of SAHF nucleosomes are exchanged by histone chaperones. The curves reflect the protein translocations, and the polylines denote the protein functions. H: histone; M: tri-methylation of K9 histone H3; P: phosphorylation.

图3 SAHF形成的分子机制模式图

Fig.3 Molecular mechanisms of SAHF formation

离<sup>[44,64]</sup>。但是, 外源表达HGMA2并不能有效降低H1型组蛋白在染色质上的结合水平<sup>[64]</sup>。因此, 究竟何种原因启动了这种染色质结合蛋白谱的改变, 尚需

进一步探讨。

由于SAHF的特征性结构, 近年来它已经作为一组全新的标志物用于鉴定细胞老化, 特别是癌基因诱



导的细胞老化(oncogene-induced senescence, OIS)。最近, 两个小组几乎同时发表了他们的独立研究报告, 结果均显示SAHF并非广泛存在于各种诱因介导的细胞老化模型当中, 而是更偏好于OIS(主要采用Ras<sup>V12</sup>诱导的细胞老化模型在不同细胞系中进行验证), 而且在不同来源的细胞中也存在明显的偏好性<sup>[78,81]</sup>。此外, 在Ras<sup>V12</sup>诱导细胞老化的过程中, SAHF的形成与细胞周期阻滞并不存在必然联系<sup>[78]</sup>。

## 2.6 端粒功能异常

端粒是染色体末端的一种特殊结构, 也是除SAHF外另一个与细胞老化息息相关的染色质结构。在染色体末端串联排列着一段DNA重复序列(在脊椎动物中均为TTAGGG), 它们与结合在上面的核蛋白复合物共同构成了端粒结构。这种结构有效地保护了染色体末端, 避免它们暴露及同相邻染色体末端发生融合<sup>[82]</sup>。然而, 由于DNA聚合酶(DNA polymerase)无法完全复制染色体的滞后链(lagging strands), 导致端粒DNA重复序列随着复制次数的增加而不断缩短; 当端粒衰减到一定程度时, 细胞便会开启自发性老化程序<sup>[83-84]</sup>。而在干细胞或恶性肿瘤细胞中, 高表达的端粒逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)使得端粒的长度不会随着DNA复制而缩短, 因此, 这些细胞可获得持续分裂的能力。有趣的是, 在发生OIS的细胞中可以观察到端粒“复制叉卡顿(replication fork stalling)”和端粒长度随机缩短, 提示端粒功能失调<sup>[85]</sup>。

人们可以通过检测端粒序列的长度和TERT的酶活性来评估端粒的功能。人们还发现, 在老化细胞中, 可出现功能异常的端粒结构。这些结构常伴有(亚)端粒区DNA损伤灶, 表现为DNA损伤监视蛋白质复合物的沉积, 称之为老化相关DNA损伤灶(senescence-associated DNA damage focus, SDF)或端粒功能失调集落(telomere dysfunction induced foci, TIF)。因而, 端粒功能异常也被认为是一种可作为评判细胞老化的潜在标记物<sup>[14,85-87]</sup>。

但是, 这些检测方法很难成为评判细胞老化的常规标准, 主要原因是无法建立统一的标准。因为不同物种之间细胞发生老化时的端粒长度不具有可比性; 即使来源于同一物种(如人细胞), OIS中出现的端粒缩短程度也无法达到自发性老化的水平<sup>[85]</sup>。另外, 检测端粒功能异常往往与检测DNA损伤密切相关。普遍认为, DNA损伤广泛存在于细胞老化过

程中。

## 2.7 DNA损伤

研究表明, 在老化细胞中经常可以检测到DNA损伤信号, 故有人提出将DNA损伤也作为鉴别老化的指征之一<sup>[16]</sup>(图2)。DNA损伤能够进入细胞老化研究者的视野是因为它与p53有密切联系。作为细胞老化通路上最为重要的结点分子之一, p53的活化机制一直是研究者热衷的话题, 而其中研究得最为透彻的莫过于p53为应对细胞DNA损伤而受到DNA损伤应答(DNA damage response, DDR)通路的激活。这一过程依赖于上游蛋白质激酶——共济失调血管扩张症突变蛋白(ataxia telangiectasia mutated, ATM)和ATR的活化, 以及它们各自下游的级联激酶——关卡激酶2(checkpoint kinase 2, CHK2)和关卡激酶1(checkpoint kinase 1, CHK1)的序贯激活<sup>[88]</sup>。这四种激酶可以使p53蛋白质上的多个氨基酸位点发生磷酸化, 继而抑制p53蛋白质的降解并增强它的转录活性; 而且除了直接作用外, ATM/ATR通路的多种下游底物[53BP1(p53 binding protein 1)、MDC1(mediator of DNA-damage checkpoint 1)、STRAP、AATF等]也可以通过不同的方式促进p53的功能, 如增加其表达水平、促进其核转位、作为共转录因子增强p53对靶基因的转录活性等<sup>[88-91]</sup>。既然如此, DNA损伤是否是p53/p21<sup>CIP1</sup>通路在老化细胞中被激活的主要原因, 并广泛存在于细胞老化进程之中呢?

早在上世纪80年代初, 人们就已经观察到细胞内DNA损伤的累积水平和修复能力与物种的平均寿命以及原代细胞自个体分离的年龄密切相关<sup>[92-93]</sup>; 而后人们又发现利用放射线和多种致DNA损伤的化学物质(如博来霉素、阿霉素等)处理细胞, 均可以有效诱导细胞老化的发生<sup>[94-96]</sup>。这些观察进一步唤起了人们探究细胞老化与DNA损伤之间关系的兴趣, 并试图在自发性老化和OIS(癌基因活化或抑癌基因失活引发的细胞老化)中寻找DNA损伤的踪迹。

迄今普遍认为, 原代培养的细胞之所以会发生自发性老化, 与端粒的逐渐缩短息息相关。据此, 人们推测端粒结构破坏后暴露染色体末端, 从而被细胞识别为DNA双链断裂(double-strand break, DSB), 进而通过DDR激活p53老化通路。这一模型随后在一定程度上得到了佐证: 人成纤维细胞在进入老化阶段后展现出DSB的特征分子标记, 包括细胞核中

出现散在的、与53BP1和MDC1等DNA损伤监视分子共定位的磷酸化H2AX型组蛋白(histone H2AX)集落,以及活化形式的CHK1/2等;而且利用基于染色质免疫共沉淀的全基因组芯片扫描(ChIP on chip)技术,发现那些磷酸化H2AX型组蛋白集落几乎全部位于(亚)端粒区<sup>[87]</sup>。研究人员将这些DNA损伤监视蛋白质复合物命名为老化相关DNA损伤灶。

随着研究的深入,另一种模型逐渐引人关注并获得越来越多的研究结果支持,即(亚)端粒区更容易出现DNA损伤,当损伤累计达到一定的阈值后就通过DDR引发细胞老化,而不是一定要端粒解构、染色体末端暴露才能激活DDR通路。这种模型的提出源于人们观察到在早代龄的正常人成纤维细胞的端粒上会自发出现个别零散DDR反应呈阳性的端粒,随着代龄增加,这类端粒的数目逐渐增多,而在大多数DDR反应呈阳性的端粒上依然结合有端粒重复序列结合因子2(telomeric repeat binding factor 2, TERF2)等DNA末端保护蛋白<sup>[97]</sup>;并且在利用放射线、双氧水和新制癌菌素等药物刺激细胞时,DNA损伤也更容易出现在染色体(亚)端粒区<sup>[98]</sup>。这一模型较之端粒末端解构而言,更具有合理性:一方面,如果端粒完全解构方能激活DDR,那么在细胞启动老化进程的同时,也可能出现相邻染色体间的末端融合,使基因组不稳定性和发生恶性转化的机率增加,因此从逻辑上讲,在染色体末端暴露之前发生细胞老化更为安全;另一方面,小鼠的端粒重复序列远多于人类,但是小鼠成纤维细胞仅能分裂14-28次(低于人类细胞的50次),这一直困扰着端粒“分子钟”学说的拥趸<sup>[99]</sup>。然而新模型很好地解释了这一问题,因为小鼠成纤维细胞的(亚)端粒区在增殖过程中同样会发生DNA损伤的累积。至于DNA损伤倾向于发生在(亚)端粒区的原因,目前存在两种假说:(1)第一种假说认为在DNA复制过程中,端粒结构不断在“闭合状态”和“开放状态”之间转换,若在DNA复制结束后端粒不能有效地从“开放状态”折叠成“闭合状态”,而停留在“中间状态”,那么就会产生轻度的DDR,随着端粒的不断缩短,越来越多的端粒无法有效闭合,使DDR水平不断增高,从而激活p53老化通路<sup>[97]</sup>;(2)第二种假说则认为,为避免相邻染色体间的末端融合,端粒区的DNA损伤修复能力远低于基因组的其它区域,从而使损伤得以在此不断累积,而TERF2可能在其中发挥重要作用<sup>[98,100]</sup>。不过这两种

假说都缺乏足够证据对(亚)端粒区DNA损伤累积的机制进行更为翔实的描述和诠释。此外,目前尚不能完全排除端粒完全解构诱发细胞老化的可能性。这是因为:不同染色体间端粒缩减速度的不均一性使细胞在发生老化时很有可能至少有一条染色体率先发生完全解构,而由于检测技术的局限性,目前还无法准确地对这一情况进行评判<sup>[97]</sup>。

尽管如此,迄今已有大量证据表明,在自发性老化细胞的端粒区确实存在DNA损伤,并且在老化进程中扮演着重要角色。那么DNA损伤是否也存在于细胞老化的另一种主要存在形式——OIS中呢?起初人们并不这样认为。研究者更倾向于寻找(抑)癌基因与经典老化通路间的直接分子连接,然而并不是所有OIS都可以通过如此简单的信号通路加以解释。以(原)癌基因*c-Myc*为例,它作为转录因子可以增强周期蛋白D(cyclin D, *CCND*)和*TERT*等细胞老化抑制基因的转录<sup>[101-102]</sup>,而通过与其它转录因子的相互作用还可以降低p21<sup>CIP1</sup>、p16<sup>INK4A</sup>等老化通路核心分子的表达水平<sup>[103]</sup>。因此,*c-Myc*可以有效地遏制细胞老化进程,这一功能在Ras/*c-Myc*共同诱导细胞发生恶性转化的过程中发挥重要作用<sup>[104]</sup>。然而有趣的是,在细胞中大量表达*c-Myc*同样可以引发细胞老化<sup>[105]</sup>。是什么因素导致*c-Myc*对肿瘤抑制分子网络失控呢?DNA损伤很可能操控了这场“抵抗运动”:*c-Myc*可以结合到DNA上的前复制复合物(pre-replicative complex)上,增强它的复制起始活性<sup>[106]</sup>;*c-Myc*的异常活化导致这种作用急剧放大、形成复制应力,进而导致复制过程中DSB的增加以及DDR通路的激活<sup>[107]</sup>。

一般而言,复制应力引发的DNA损伤普遍存在于OIS中<sup>[108-109]</sup>,这与肿瘤细胞增殖速度加快这一基本特征相符。不仅如此,DNA损伤和DDR通路还很可能在OIS中发挥主导作用。例如,癌基因*Ras*<sup>V12</sup>触发的OIS是该基因诱导细胞恶性转化的主要屏障,也是目前研究最为深入的OIS模型。一般认为*Ras*<sup>V12</sup>通过Ras-Raf-MEK激酶级联反应活化转录因子——骨髓成红细胞增多症病毒E26同源蛋白1/2(erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1/2, *Ets1/2*),并且通过*Ets1/2*对*p16*<sup>INK4A</sup>的转录激活作用诱发细胞老化<sup>[110]</sup>。引人注目的是,Ras-Raf-MEK通路同样能够显著提高细胞的增殖水平<sup>[111]</sup>。如何理解和阐释同一通路既促进增殖又诱发老化呢?它是



如何进行抉择的? 最新研究表明, 复制应力引起的DNA损伤而非Ets1/2, 主导了Ras<sup>V12</sup>触发的OIS<sup>[108]</sup>。一方面, 通过动态监测外源表达Ras<sup>V12</sup>的人成纤维细胞的增殖水平和DSB信号, 发现在Ras<sup>V12</sup>表达之初细胞的增殖加快, 而在细胞发生DNA损伤后, 细胞增殖明显减慢, 且SA- $\beta$ -gal着色细胞明显增多; 另一方面, 在表达Ras<sup>V12</sup>的同时抑制DDR通路的激活可以有效阻止OIS的发生, 并促进Ras<sup>V12</sup>诱导的细胞恶性转化<sup>[108]</sup>。这些发现加深了人们对Ras影响细胞行为的认识, 即Ras主要促进细胞增殖, 但当细胞增殖过快而产生复制应力时, 细胞开启老化进程。而Ras-Ets1/2-p16<sup>INK4A</sup>通路可能无法单独诱发老化, 其主要在老化表型的维持过程中发挥更为重要的作用。

综上所述, DNA损伤广泛存在于自发性老化、OIS和应激细胞老化(stress-induced senescence, SIS)中, 而且是已知唯一的、各种细胞老化形式都共享的、肿瘤抑制分子网络上游信号通路。一般认为, 当细胞能够完全修复DNA损伤时, 细胞会再次进入细胞周期; 当损伤程度超出DNA修复能力时, 便会触发细胞老化或凋亡。此外, 人们发现同一种导致DNA损伤的因素可以既触发细胞老化也诱导细胞凋亡, 但是在不同剂量、不同细胞的情况下主要以一种细胞表型为主。所以, 细胞发生老化或凋亡应与导致DNA损伤因素种类无关, 而很可能是由DNA损伤程度和某些关键分子的活化与否决定的。尽管DNA损伤是启动细胞老化进程的关键分子事件之一, 但是, DNA损伤和DDR通路的激活并不是老化细胞所特有的, 故而不宜将它们作为鉴别细胞老化的特异指征。

### 3 细胞老化特性引发的若干问题

如上所述, 细胞老化具有极其鲜明的特性和特征。通过半个多世纪的研究, 人们也建立了一些用以鉴定和判别细胞老化的技术方法和标准。同时, 我们还注意到, 开展细胞老化研究经常面对的若干问题极易混淆, 有必要厘清。择要简述如下。

#### 3.1 细胞老化是否可逆

细胞老化是否可逆? 答案貌似毋庸置疑。因为“不可逆的细胞周期阻滞”是细胞老化最基本、最重要的特征。与休眠细胞不同, 老化细胞无法通过传代等方式重新进入细胞周期。这一特征也在基因转染导入热敏大T抗原的成纤维细胞模型中得到验证。

导入细胞的热敏SV40病毒大T抗原可以结合p53和pRb、阻止老化通路的激活, 使细胞跨越“Hayflick极限”, 进入所谓“永生化”状态; 而后, 如果通过调整细胞培养温度使得热敏大T抗原发生降解, 则诱导细胞发生老化; 倘若在已经发生老化的细胞中重新表达大T抗原, 却不能使细胞再次进入增殖周期<sup>[112]</sup>。

但是, 事情远非如此简单。人们发现在某些发生自发性老化的细胞中灭活p53可以逆转老化表型<sup>[112-114]</sup>, 且逆转p21<sup>CIP1</sup>也可以取得类似的效果<sup>[115]</sup>, 这说明至少在某些特定情况下, 阻断老化信号通路可以使老化细胞重新进入细胞周期。但在另外一些情况下, 阻断p53通路却无法逆转老化表型<sup>[112,116]</sup>。那么, 究竟是什么原因导致细胞出现如此巨大的应答差异呢? 答案在于: p16<sup>INK4A</sup>“是否表达、表达水平的高低”至关重要。原来, 细胞在经过长期体外培养后, 有时会出现p16<sup>INK4A</sup>基因自发抑制或沉默<sup>[117]</sup>。这种细胞的老化进程的启动仅仅依靠p53/p21<sup>CIP1</sup>通路的激活, 在这种特定状况下, 老化表型有可能被逆转。值得注意的是, p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路一经活化后, 即使再次阻断它们的功能也无法逆转细胞老化<sup>[112]</sup>。

那么, p16<sup>INK4A</sup>又如何能将细胞定格在不能逆转的老化状态呢? 据Campisi<sup>[63]</sup>推测, 这与SAHF的形成有关。如前所述(“老化相关异染色质集落形成”章节), p16<sup>INK4A</sup>通路激活与否直接决定了在细胞老化过程中能否形成SAHF<sup>[61,81]</sup>。而SAHF主要由结合在E2F转录靶基因的组蛋白甲基化水平升高所介导<sup>[44,61]</sup>, SAHF形成过程中, macroH2A置换进入染色质组蛋白复合物和/或其它未知机制, 可以使得SAHF不可逆地阻断E2F下游的促增殖基因转录<sup>[61,75]</sup>。然而, 依据SAHF理论解释p16<sup>INK4A</sup>这一独特功能并非尽善尽美。因为, 第一, 除了p16<sup>INK4A</sup>外, p21<sup>CIP1</sup>表达水平升高也足以使得pRb维持非磷酸化状态, 进而pRb发挥对E2F的抑制作用<sup>[114]</sup>。但是, 何以仅仅p16<sup>INK4A</sup>的活化可以促成SAHF介导的不可逆细胞周期阻滞? 第二, pRb杂合性缺失的成纤维细胞在进入细胞老化后, 偶尔也会因为另一染色体链上正常的pRb基因二次丢失使得细胞重新进入增殖周期。虽然, 这种偶发事件的频率低于p53和p21<sup>CIP1</sup>杂合性缺失的细胞<sup>[114]</sup>, 但是作为p16<sup>INK4A</sup>-pRb-SAHF级联反应的核心分子, 为什么会出现这种现象? 第三, 近期发现在p16<sup>INK4A</sup>未被活化的条件下, 也会有SAHF形成, 且与细胞周期阻滞无关<sup>[78]</sup>。因此, 我们认为, SAHF形成

不应该是导致细胞进入不可逆周期阻滞、发生老化的唯一机制(尽管极其重要);进而推测,很可能存在一种未知的不依赖于pRb的机制介导p16<sup>INK4A</sup>引发的不可逆细胞周期阻滞。

另外,虽然在一定条件下(如p16<sup>INK4A</sup>未激活),体外强行阻断老化信号通路可以逆转细胞老化的表型,但是,迄今尚未发现任何生理条件可以逆转细胞老化<sup>[112]</sup>。那么,在复杂的病理条件下,情况是否会有所不同呢?有研究报道,用低剂量化疗药物诱导肿瘤细胞广泛发生老化后,继续培养一段时间,可出现耐药性克隆<sup>[118-119]</sup>。即便如此,我们认为,目前仍无法判断这些耐药性克隆细胞是在进入老化状态后逃逸而出并产生耐药性,亦或是它们根本就没有发生老化,而仅仅是由于接触性抑制等原因使得它们在体外培养过程中“蛰伏”,并逐渐形成耐药性克隆。

总之,细胞一旦进入老化状态(尤其是自发性老化),通常是不可逆转的。虽然,在一些特定条件下,(如灭活p53通路等),老化细胞在体外培养可出现逃逸(即逆转)现象,但迄今尚未见体内老化细胞发生逆转的报道。因此,“老化细胞不可逆”的说法基本正确。由此推论,体内细胞进入老化状态可发挥“忠诚”的抗肿瘤卫士的作用,但是,肿瘤细胞产生耐药性后可能出现“伪老化”的现象值得密切关注。

### 3.2 细胞老化与终末分化(terminal differentiation)、细胞休眠(cell quiescence)的区别

自细胞老化发现以来,关于它是一种独立的细胞状态的表型,还是终末分化的一种表现形式的讨论或曰争论从未停止<sup>[6]</sup>。虽说细胞老化的基本特征是不可逆的细胞周期阻滞,但是,在生物体内有许多进入终末分化的细胞同样失去了分裂的能力,如红细胞、神经元细胞、心肌细胞等。那么,细胞老化是否真是细胞终末分化的一种表现形式?我们认为,为了回答这一问题,需要首先了解和明确分化的定义。一般而言,所谓分化是指体内干细胞(胚胎干细胞、组织多能干细胞等)在发育和/或维持生命活动时,发生特化、转变成为执行特定生理功能细胞的生理变化过程。分化早期阶段,细胞仍具有进入细胞周期、进行分裂繁殖的能力;随着分化的进行,细胞逐渐失去分裂能力,直至终末分化阶段,细胞完全丧失增殖能力,停止分裂,但仍可执行特定功能(最经典的例子是红细胞,进入终末分化的成熟红细胞无细胞核,不分裂,但携带氧气分子输送至机体

各个器官、组织、细胞)。因此,讨论细胞老化是否属于终末分化仅需证明老化细胞是否在生命体内发挥不可或缺的生理功能。人们发现,在正常人体组织中与老化细胞表型最为类似的是网状真皮成纤维细胞(reticular fibroblast, Fr),它们构成的网状真皮(reticular dermis)与位于表面的乳头状真皮(papillary dermis)一同发挥支撑表皮结构、保温等生理功能。Fr的形态与老化细胞类似,分裂潜力和生长速度较乳头状真皮成纤维细胞(papillary fibroblast, Fp)明显降低。另外,网状真皮与乳头状真皮的厚度比例随年龄的增长不断增加<sup>[120-122]</sup>。那么,Fr是否是老化细胞呢?答案是否定的。因为即使是来源于老年供体的Fr依然保留了一定水平的增殖能力<sup>[123]</sup>;而且体内SA- $\beta$ -gal染色显示网状真皮并没有明显着色<sup>[27]</sup>。除了网状真皮以外,另外一个体内可能存在老化细胞的组织是十二指肠黏膜上皮——可见明显的SA- $\beta$ -gal着色。虽然,十二指肠黏膜可见SA- $\beta$ -gal着色细胞,但仅限于黏膜表层,而在黏膜深层未见;另外,与之相邻的食管上皮和胃黏膜上皮的各层细胞中未见SA- $\beta$ -gal着色细胞<sup>[31]</sup>。还有,由于SA- $\beta$ -gal染色的非特异性,在缺乏其它证据的情况下,我们无法判定着色的十二指肠黏膜上皮细胞确实是老化细胞;迄今也没有足够证据表明十二指肠黏膜表层细胞具备深层细胞所没有的生理功能。因此,我们认为,由于没有发现老化细胞在生命体内能够发挥不可或缺的生理功能,所以,细胞老化应属于独立于终末分化之外的一种独特细胞表型。

区分和辨别细胞老化与细胞终末分化并不困难。首先,由于终末分化的细胞多依附于特定的组织结构,所以,从组织水平上较易识别它们;其次,在细胞水平上,由于老化细胞往往溶酶体容积增大,所以SA- $\beta$ -gal着色仍是区别二者的最好选择<sup>[26]</sup>;第三,针对不同组织来源的细胞,组织分化特异性的分子标记物还可以结合SA- $\beta$ -gal染色一起用以区分终末分化和老化。另外,老化细胞中DDR的强度要明显高于终末分化细胞<sup>[87]</sup>。但是,因为缺乏量化的标准,DDR很难成为区分这两种细胞表型的标准。

细胞休眠是另外一种需要与老化加以区分的细胞表型。细胞休眠是由不良环境引起的短暂性细胞周期阻滞。一般在改善培养环境(如传代、加入血清等)后,可以使处于休眠状态的细胞重新进入增殖周期。虽然,细胞休眠可以造成一定程度假阳性



的SA- $\beta$ -gal着色<sup>[26,28]</sup>,但是,休眠细胞不会出现DDR和SAHF<sup>[78,87]</sup>;而且不同于老化细胞中的核/浆比升高,休眠细胞中的核/浆比明显降低<sup>[124]</sup>。

综上所述,尽管细胞老化与细胞终末分化、细胞休眠具有某些相似之处,但究其根本,是完全不同的细胞状态,并可以采用一些检测方法将它们区分开来。

### 3.3 SAHF形成的分子机制及其生物学意义

自Narita等<sup>[61]</sup>发现SAHF以来的十年间,人们对其在老化细胞中发挥的功能和生物学意义进行了广泛的探讨和研究。自SAHF发现以来,主流观点多认为SAHF形成有助于维持细胞老化状态。例如,通过染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)发现,SAHF可以覆盖E2F的靶标基因细胞周期蛋白A2(cyclin A2, CCNA2)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的启动子区,同时这些基因表达丰度下降、且对外源高表达E2F的反应水平明显减弱<sup>[61]</sup>。这提示SAHF有可能帮助促增殖基因维持转录抑制状态,从而确保老化细胞不再重新进入细胞周期。支持该观点的实验证据是SAHF主要出现在p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路激活的老化细胞中<sup>[61,78,81]</sup>,而相较于这一类细胞老化模型,单纯p53/p21<sup>CIP1</sup>通路活化的老化细胞更容易再次进入细胞周期<sup>[112-114]</sup>。

然而,这一传统观点最近受到了挑战:在DDR机制缺陷的细胞中,SAHF的形成与E2F靶标基因的转录抑制、乃至细胞周期阻滞之间并不存在明显相关性<sup>[78]</sup>。这提示SAHF在E2F靶标基因启动子区的定位很可能只是两个独立事件——SAHF形成和pRb活化导致下游基因结合的组蛋白H3K9的三甲基化水平升高——恰巧偶合而已。也许E2F靶标基因并非是SAHF的必要定位。仔细回顾异染色质与细胞老化的相关研究,一些间接证据也印证了SAHF并不直接参与细胞周期阻滞:例如,在老年人和哈金森-吉尔福德早衰综合征(Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS)患者体内分离得到的成纤维细胞老化数量明显增多<sup>[113,125]</sup>,类似的情况在发生癌前病变的上皮细胞中可见,而在已经恶性转化的癌上皮组织中细胞老化则可回归到正常水平<sup>[108]</sup>。而且,在这些样本中,DNA异染色质化程度却并不总是与细胞老化水平相一致。例如,相对于正常年轻供体,老年人和HGPS患者体内成纤维细胞的异染色质化程度均明显降低<sup>[126]</sup>;很多癌症来源的组织细胞依然保持高

水平的组蛋白H3K9三甲基化和HP1蛋白表达<sup>[78,81]</sup>;而维持细胞内高丰度的异染色质可以有效延长果蝇的寿命<sup>[127]</sup>。虽然,目前尚无法确定这些模型中的异染色质的构成、修饰都和SAHF一般无异,但是这些实验结果至少表明,在一定情况下异染色质可以抑制细胞老化。究其机制,一种可能原因是沉默基因的激活<sup>[42-43]</sup>,而另一种解释则是SAHF可以抑制DDR信号通路的活化。由于致密的染色质颗粒使DDR相关蛋白无法接近,SAHF可以阻断其所在染色质区的DDR机制,而破坏SAHF则会使DDR信号明显增强<sup>[78]</sup>。由于一定水平的DDR是许多细胞老化模型的共同特征,也是诱导细胞出现早发性细胞老化的重要因素之一,所以,我们推测,在一定条件下,SAHF可通过保护DNA易断裂区、避免DDR信号通路活化来延缓细胞老化的发生。

那么,SAHF究竟是促进还是抑制细胞老化呢?这很可能取决于SAHF所覆盖的基因,特别是其形成的起始阶段所覆盖的基因:若是结合并覆盖在细胞周期推动基因上,SAHF便会加速细胞老化进程;但如果覆盖在周期阻遏基因上,SAHF则会延缓细胞老化的发生。遗憾的是,目前并不清楚SAHF如何决定它在染色质DNA上的第一个落脚点。Braig等<sup>[128]</sup>的研究显示,结合E2F的pRb可以募集组蛋白甲基化酶Suv39h1(suppressor of variegation 3-9 homolog 1),使组蛋白H3K9三甲基化,为SAHF提供靶点;但是HIRA复合物中的UBN1同样具有组蛋白甲基化酶的功能,且这种作用是不依赖于p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路的<sup>[70]</sup>。而正是由于多种机制对SAHF的形成都有贡献,所以,很难判断究竟是哪种机制决定了SAHF在染色质上的初始凝集位点。

另外,关于SAHF的功能可能还有更为合理的解释,即SAHF的形成本身是独立于细胞老化之外的一种细胞自我保护机制,它与细胞老化、凋亡等多种途径共同决定细胞的命运。现有研究表明:首先,当来自于细胞内外的应激压力促进细胞内ROS增加进而导致不可修复的DNA损伤时,细胞可在DNA损伤区域形成SAHF;而ROS的持续增加超过SAHF的自我保护能力时,细胞内出现低水平的DDR并诱发细胞老化。这可以解释为什么HIRA的PML转位和染色质凝集发生在老化周期阻滞之前<sup>[44,62]</sup>。其次,当细胞无法有效地激活SAHF形成时,持续高水平ROS可以直接诱发细胞凋亡,而这一推论在外源Ras<sup>V12</sup>表达



的细胞模型中得到了验证<sup>[78]</sup>。最后,若细胞中像端粒那样的正常异染色质出现缺失或常染色质化时,往往导致染色质DNA易断裂区暴露,从而促使细胞内出现低水平DDR和细胞老化<sup>[87,129]</sup>。

因而,SAHF研究方兴未艾,已经并必将继续是细胞老化分子机制研究的重要内容之一。随着细胞老化和SAHF研究的不断深入,SAHF形成在细胞老化过程中,乃至在整个细胞生命活动中发挥的功能和生物学意义定会逐渐得以揭示。

#### 4 小结与展望

半个多世纪以来,细胞老化研究自单纯的自发性老化模型拓展至多种应激诱发细胞老化模型(其中以OIS最为经典)<sup>[5,16]</sup>,同时,细胞老化与衰老之间的关系日益引起人们关注<sup>[4,130]</sup>。

目前广泛应用判定细胞老化基本特征的方法有细胞周期阻滞、细胞形态学改变、SA- $\beta$ -gal染色、SAHF形成和老化通路激活等。近年来,DNA损伤、老化相关分泌蛋白质特征谱(senescence-associated secretory phenotype, SASP)、ROS和细胞自噬等也相继被提出作为鉴定细胞老化的指标<sup>[16]</sup>。值得注意的是,DNA损伤和ROS并不是细胞老化所特有的,同时也缺乏量化的标准将细胞老化与其它细胞表型(如细胞凋亡)进行区分;细胞老化与自噬的关系尚未得到业界的广泛认同,而且,它们之间的关系与分子联系仍需更多的实验证据;至于SASP,虽然有充分的证据表明老化细胞分泌的诸多炎性因子水平升高,但是,不同的老化模型中,分泌炎性因子的种类和水平差异较大。因此,这些新指标目前尚不足以单独成为细胞老化的判别标准。

总之,我们认为,既然目前尚无任何一种可以在体内外单独、可靠地鉴定细胞老化的“完美标记”,那么,应在确定细胞周期阻滞的基础上,至少检测出其它两项指标为阳性,方能判定所检测细胞进入老化状态<sup>[16]</sup>。

迄今,虽然细胞老化领域研究已取得长足进展,但是诸多问题亟待解决。例如,为什么在老化细胞中出现溶酶体体积增大和数量的增多,以及SA- $\beta$ -gal活性升高? SAHF在细胞老化进程中的作用是什么? p53/p21<sup>CIP1</sup>通路和p16<sup>INK4A</sup>/pRb通路是否分别扮演启动和维持的角色?当然,还需要寻求更为特异、更为简便的检测和判定细胞老化的技术方法和标准。

毋庸置疑,细胞老化领域的另一重要研究方向是:继续在细胞老化与恶性肿瘤发生的相互关系方面探幽解密。长久以来,普遍认为恶性肿瘤是一种典型的老年性疾病。然而,直至发现细胞老化,人们才真正开始从细胞和分子水平近距离审视肿瘤与衰老之间的关系。细胞老化犹如一柄双刃剑,它既可以监视细胞内的DNA损伤和癌基因激活、有效阻遏正常细胞恶变从而阻止癌症发生;同时,又可以加速机体的衰老。例如,在p53活化的小鼠模型中,肿瘤发生比例明显下降,但是,它们出现衰老加速和整体寿命缩短<sup>[131-132]</sup>现象。更有趣的是,老化细胞虽然可以防止自身恶变,但是,对它们的细胞邻居却未必如此。如发生老化的成纤维细胞可以通过分泌多种细胞因子诱导相邻的上皮细胞发生癌变<sup>[133-134]</sup>。令人振奋不已的还有,最近有报道,应用雷帕霉素(Rapamycin)饲养小鼠,既可以延长寿命,又可以减少自发肿瘤的发生<sup>[135]</sup>。

“革命尚未成功,同志仍需努力”。细胞老化、衰老和肿瘤三者之间的奥秘正等待着我们继续深入的探索。

#### 参考文献 (References)

- 1 Prieur A, Peeper DS. Cellular senescence *in vivo*: A barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(2): 150-5.
- 2 Verdun RE, Karlseder J. Replication and protection of telomeres. *Nature* 2007; 447(7147): 924-31.
- 3 Vergel M, Marin JJ, Estevez P, Carnero A. Cellular senescence as a target in cancer control. *J Aging Res* 2010; 2011: 725365.
- 4 Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007; 448(7155): 767-74.
- 5 Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H. Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res* 2011; 2011: 963172.
- 6 Gavrilov LA, Gavrilova NS. *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach*. New York: Harwood Academic Publishers, 1991.
- 7 Haff RF, Swim HE. Serial propagation of 3 strains of rabbit fibroblasts, their susceptibility to infection with vaccinia virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 93(2): 200-4.
- 8 Swim HE, Parker RF. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially. *Am J Hygiene* 1957; 66(2): 235-43.
- 9 Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- 10 Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative life-span of cultivated human cells: Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 1970; 23(1): 86-92.
- 11 Röhme D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(8): 5009-13.
- 12 Hayflick L. *Biomedical gerontology: Current theories of biologi-*

- cal aging. *Gerontologist* 1974; 14(5 pt 1): 454, 458.
- 13 Schneider EL, Mitsui Y. The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(10): 3584-8.
- 14 Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006; 311(5765): 1257.
- 15 Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 2007; 128(1): 36-44.
- 16 Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24(22): 2463-79.
- 17 Wada T, Joza N, Cheng HY, Sasaki T, Kozieradzki I, Bachmaier K, *et al.* MKK7 couples stress signalling to G<sub>2</sub>/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2004; 6(3): 215-26.
- 18 Abdallah P, Luciano P, Runge KW, Lisby M, Géli V, Gilson E, *et al.* A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat Cell Biol* 2009; 11(8): 988-93.
- 19 Schneider EL, Shorr SS. Alteration in cellular RNAs during the *in vitro* lifespan of cultured human diploid fibroblasts. *Cell* 1975; 6(2): 179-84.
- 20 de Cecco M, Jeyapalan J, Zhao X, Tamamori-Adachi M, Sedivy JM. Nuclear protein accumulation in cellular senescence and organismal aging revealed with a novel single-cell resolution fluorescence microscopy assay. *Aging* 2011; 3(10): 955-67.
- 21 Kaftory A, Hershko A, Fry M. Protein turnover in senescent cultured chick embryo fibroblasts. *J Cell Physiol* 1978; 94(2): 147-60.
- 22 Dice JF. Altered intracellular protein degradation in aging: A possible cause of proliferative arrest. *Exp Gerontol* 1989; 24(5/6): 451-9.
- 23 Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 1990; 249(497): 1129-33.
- 24 Mitsui Y, Schneider EL. Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp Cell Res* 1976; 100(1): 147-52.
- 25 Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt 20): 3613-22.
- 26 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.
- 27 Coelho JC, Sopelsa AM, Tobo PR, Severini MH, Silva CD, Giugliani R. Biochemical studies on leukocyte and fibroblast human betagalactosidase. *Clin Biochem* 1999; 32(3): 167-70.
- 28 Yang NC, Hu ML. The limitations and validities of senescence associated-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol* 2005; 40(10): 813-9.
- 29 Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 2006; 5(2): 187-95.
- 30 Shlush LI, Itzkovitz S, Cohen A, Rutenberg A, Berkovitz R, Yehzekel S, *et al.* Quantitative digital *in situ* senescence associated β-galactosidase assay. *BMC Cell Biol* 2011; 12: 16.
- 31 Going JJ, Stuart RC, Downie M, Fletcher-Monaghan AJ, Keith WN. "Senescence-associated" beta-galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *J Pathol* 2002; 196(4): 394-400.
- 32 Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432(7015): 307-15.
- 33 Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(18): 8348-52.
- 34 Calabrese V, Mallette FA, Deschênes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, *et al.* SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell*, 2009, 36:754-67.
- 35 Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, *et al.* PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000; 406(6792): 207-10.
- 36 Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, *et al.* ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 2005; 25(15): 6639-48.
- 37 Tsao YP, Kuo SW, Li SF, Liu JC, Lin SZ, Chen KY, *et al.* Differential regulation of cyclin A, cyclin B and p21 concentrations in a growth-restricted human fibroblast cell line. *Biochem J* 1995; 312(Pt 3): 693-8.
- 38 Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić 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.
- 39 Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, *et al.* Requirement for p53 and p21 to sustain G<sub>2</sub> arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282(5393): 1497-501.
- 40 Smits VA, Klompaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkela TP, Medema RH. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G<sub>2</sub> DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 2000; 275(39): 30638-43.
- 41 Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 1995; 6(4): 387-400.
- 42 Ball KL, Lain S, Fähræus R, Smythe C, Lane DP. Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1. *Curr Biol* 1997; 7(1): 71-80.
- 43 Stein GH, Beeson M, Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; 249(4969): 666-9.
- 44 Adams PD. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* 2007; 397(1/2): 84-93.
- 45 Gonzalo S, Garcia-Cao M, Fraga MF, Schotta G, Peters AH, Cotter SE, *et al.* Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol* 2005; 7(4): 420-8.
- 46 Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, *et al.* Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27<sup>Kip1</sup>. *J Biol Chem* 2000; 275(29): 21960-8.
- 47 Cao X, Xue L, Han L, Ma L, Chen T, Tong T. WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) delays cellular senescence by promoting p27(Kip1) degradation in human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 2011; 286(38): 33447-56.

- 48 He J, Kallin EM, Tsukada Y, Zhang Y. The H3K36 demethylase Jhdmlb/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(11): 1169-75.
- 49 Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, Watanabe T, Saitoh N, Nakamoto M, *et al.* Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. *Aging Cell* 2012; 11(3): 553-6.
- 50 Mason SL, Loughran O, La Thangue NB. p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* 2002; 21(27): 4220-30.
- 51 Chang DL, Qiu W, Ying H, Zhang Y, Chen CY, Xiao ZX. ARF promotes accumulation of retinoblastoma protein through inhibition of MDM2. *Oncogene* 2007; 26(32): 4627-34.
- 52 Wu CH, van Riggelen J, Yetil A, Fan AC, Bachireddy P, Felsher DW. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(32): 13028-33.
- 53 Guney I, Wu S, Sedivy JM. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(10): 3645-50.
- 54 Zhang J, Lou X, Yang S, He S, Yang L, Liu M, *et al.* BAG2 is a target of the c-Myc gene and is involved in cellular senescence via the p21(CIP1) pathway. *Cancer Lett* 2012; 318(1): 34-41.
- 55 Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, *et al.* Homozygotes for CDKN2(p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 1995; 10(3): 351-3.
- 56 Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436(7051): 720-4.
- 57 Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, *et al.* Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009; 15(4): 294-303.
- 58 Dai CY, Furth EE, Mick R, Koh J, Takayama T, Niitsu Y, Enders GH. p16(INK4a) expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation. *Gastroenterology* 2000; 119(4): 929-42.
- 59 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.
- 60 Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, *et al.* Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2006; 8(10): 1053-63.
- 61 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.
- 62 Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, *et al.* Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005; 8(1): 19-30.
- 63 Zhang R, Chen W, Adams PD. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 2007; 27(6): 2343-58.
- 64 Funayama R, Saito M, Tanobe H, Ishikawa F. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 2006; 175(6): 869-80.
- 65 Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120(4): 513-22.
- 66 Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, Nunez S, Chicas A, Hearn SA, *et al.* A novel role for high-mobility group A proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 2006; 126(3): 503-14.
- 67 Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; 14(14): R546-51.
- 68 Ye X, Zerlanko B, Zhang R, Somaiah N, Lipinski M, Salomoni P, *et al.* Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 2007; 27(7): 2452-65.
- 69 Jiang WQ, Nguyen A, Cao Y, Chang AC, Reddel RR. HP1-mediated formation of alternative lengthening of telomeres-associated PML bodies requires HIRA but not ASF1a. *PLoS One* 2011; 6(2): e17036.
- 70 Banumathy G, Somaiah N, Zhang R, Tang Y, Hoffmann J, Andrade M, *et al.* Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol Cell Biol* 2009; 29(3): 758-70.
- 71 Rai TS, Puri A, McBryan T, Hoffman J, Tang Y, Pchelintsev NA, *et al.* Human CABIN1 is a functional member of the human HIRA/UBN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex. *Mol Cell Biol* 2011; 31(19): 4107-18.
- 72 English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill ME, Tyler JK. Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* 2006; 127(3): 495-508.
- 73 Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 2004; 116(1): 51-61.
- 74 Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, Laurençon A, Karr TL, Couple P. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* 2005; 437(7063): 1386-90.
- 75 Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Côté J, Khochbin S, *et al.* The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* 2003; 11(4): 1033-41.
- 76 Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams PD. Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* 2007; 27(2): 183-96.
- 77 Kennedy AL, McBryan T, Enders GH, Johnson FB, Zhang R, Adams PD. Senescent mouse cells fail to overtly regulate the HIRA histone chaperone and do not form robust senescence-associated heterochromatin foci. *Cell Div* 2010; 5: 16.
- 78 Di Micco R, Sulli G, Dobrova M, Liontos M, Botrugno OA, Gargiulo G, *et al.* Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 292-302.
- 79 Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraquech M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, *et al.* ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* 2012; 31(6): 1117-29.



- 80 Catez F, Yang H, Tracey KJ, Reeves R, Misteli T, Bustin M. Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol* 2004; 24(10): 4321-8.
- 81 Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, Hodny Z, Lukas J, Bartek J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* 2011; 10(3): 457-68.
- 82 Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16<sup>INK4a</sup> enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998; 16(9): 1113-23.
- 83 Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, *et al.* A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59(15): 3761-7.
- 84 Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366(1561): 76-84.
- 85 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.
- 86 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.
- 87 Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345(6274): 458-60.
- 88 Sengupta S, Harris CC. p53: Traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(1): 44-55.
- 89 Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND. Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *EMBO J* 2005; 24(6): 1157-69.
- 90 Lo KW, Kan HM, Chan LN, Xu WG, Wang KP, Wu Z, *et al.* The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J Biol Chem* 2005; 280(9): 8172-9.
- 91 Adams CJ, Graham AL, Jansson M, Coutts AS, Edelman M, Smith L, *et al.* ATM and Chk2 kinase target the p53 cofactor Strap. *EMBO Rep* 2008; 9(12): 1222-9.
- 92 Gensler HL, Bernstein H. DNA damage as the primary cause of aging. *Q Rev Biol* 1981; 56(3): 279-303.
- 93 Hall KY, Hart RW, Benirschke AK, Walford RL. Correlation between ultraviolet-induced DNA repair in primate lymphocytes and fibroblasts and species maximum achievable life span. *Mech Ageing Dev* 1984; 24(2): 163-73.
- 94 Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38540-9.
- 95 Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(21): 10114-8.
- 96 d'Adda di Fagagna 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.
- 97 Kaul Z, Cesare AJ, Huschtscha LI, Neumann AA, Reddel RR. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep* 2011; 13(1): 52-9.
- 98 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.
- 99 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(16): 9078-81.
- 100 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.
- 101 Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansoorge W, *et al.* Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 1999; 18(19): 5321-33.
- 102 Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, *et al.* Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Gene* 1999; 21(2): 220-4.
- 103 Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 2003; 283(1): 17-21.
- 104 Hydring P, Larsson LG. Tipping the balance: Cdk2 enables Myc to suppress senescence. *Cancer Res* 2010; 70(17): 6687-91.
- 105 Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, *et al.* Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 2009; 23(18): 2134-9.
- 106 Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, *et al.* Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 2007; 448(7152): 445-51.
- 107 Ray S, Atkuri KR, Deb-Basu D, Adler AS, Chang HY, Herzenberg LA, *et al.* MYC can induce DNA breaks *in vivo* and *in vitro* independent of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2006; 66(13): 6598-605.
- 108 Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Isaeva N, *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; 444(7119): 633-7.
- 109 Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; 444(7119): 638-42.
- 110 Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16<sup>INK4a</sup> expression during cellular senescence. *Nature* 2001; 409(6823): 1067-70.
- 111 Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, *et al.* Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 2004; 5(4): 375-87.

- 112 Beauséjour 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.
- 113 Gire V, Wynford-Thomas D. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol* 1998; 18(3): 1611-21.
- 114 Wei W, Herbig U, Wei S, Dutriaux A, Sedivy JM. Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. *EMBO Rep* 2003; 4(11): 1061-6.
- 115 Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997; 277(5327): 831-4.
- 116 Sakamoto K, Howard T, Ogryzko V, Xu NZ, Corsico CC, Jones DH, *et al.* Relative mitogenic activities of wild-type and retinoblastoma binding-defective SV40 T antigens in serum-deprived and senescent human diploid fibroblasts. *Oncogene* 1993; 8(7): 1887-93.
- 117 Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, Chew K, Baylin SB, Herman JG, *et al.* Methylation of p16(INK4a) promoters occurs *in vivo* in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res* 2003; 63(7): 1596-601.
- 118 Elmore LW, Di X, Dumur C, Holt SE, Gewirtz DA. Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: Implications for treatment response. *Clin Cancer Res* 2005; 11(7): 2637-43.
- 119 Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen SY, Wu DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 2005; 65(7): 2795-803.
- 120 Harper RA, Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: Differences in growth potential *in vitro*. *Science* 1979; 204(4392): 526-7.
- 121 Schafer IA, Pandy M, Ferguson R, Davis BR. Comparative observation of fibroblasts derived from the papillary and reticular dermis of infants and adults: Growth kinetics, packing density at confluence and surface morphology. *Mech Ageing Dev* 1985; 31(3): 275-93.
- 122 Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Franz PI. Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(14): 5112-6.
- 123 Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: A new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One* 2008; 3(12): e4066.
- 124 Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: A flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(23): 9086-90.
- 125 Benson EK, Lee SW, Aaronson SA. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 12): 2605-12.
- 126 Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 2006; 312(5776): 1059-63.
- 127 Larson K, Yan SJ, Tsurumi A, Liu J, Zhou J, Gaur K, *et al.* Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet* 2012; 8(1): e1002473.
- 128 Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005; 436(7051): 660-5.
- 129 Sinclair DA, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell* 1997; 91(7): 1033-42.
- 130 王福龙, 王甄真, 陈雁. 衰老的分子机制与干预研究的最新进展. *中国细胞生物学报*(Wang Fulong, Wang Zhenzhen, Chen Yan. Advances in the research of the mechanism and intervention of aging. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 8(34): 739-48.
- 131 Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, *et al.* p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 2002; 415(6867): 45-53.
- 132 Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, *et al.* Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 2004; 18(3): 306-19.
- 133 Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(21): 12072-7.
- 134 Pazolli E, Luo X, Brehm S, Carbery K, Chung JJ, Prior JL, *et al.* Senescent stromal-derived osteopontin promotes preneoplastic cell growth. *Cancer Res* 2009; 69(3): 1230-9.
- 135 Anisimov VN, Zabezhinski MA, Popovich IG, Piskunova TS, Semenchenko AV, Tyndyk ML, *et al.* Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. *Cell Cycle* 2011; 10(24): 4230-6.