

细胞衰老相关基因的探索*

郭淑贞 童坦君** 张宗玉

(北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 细胞衰老与个体衰老、机体自我保护及细胞癌变等多种重要生理、病理现象密切相关, 其机制研究可望应用于癌症治疗. 简述了近年有关哺乳类动物细胞衰老相关基因的寻找过程.

关键词 细胞衰老, 衰老相关基因, 基因克隆

学科分类号 Q253, R592, Q786

从 Hayflick 根据体外二倍体成纤维细胞传代培养过程提出“Hayflick 极限”以来, 细胞衰老 (cellular senescence) 或复制性衰老 (replicative senescence) 机理的研究日益深入, 它与机体的衰老、自我保护能力密切相关^[1,2]. 了解细胞衰老的分子机制将有助于阐明老年病、细胞癌变的发生; 并可望应用于癌症的治疗, 提高全人类健康水平. 本文即从各种研究方法入手, 简述有关哺乳类动物细胞衰老相关基因的研究进展.

1 染色体定位

衰老机制的研究, 最先是细胞融合实验证明有多种衰老途径存在, 并证明细胞衰老过程对细胞永生而言是一种显性表型. 即永生细胞与正常细胞融合, 得到的杂交细胞能恢复衰老表型; 不同永生细胞间的融合也可能形成具衰老表型的杂交细胞. Pereira-Smith 等^[3]根据这些结果将已检出的人类细胞系分为四个互补组 (complementary group A/B/C/D), 组内细胞融合不能产生衰老表型, 而组间细胞融合则进入衰老过程. 因此, 至少有四种衰老基因的存在.

随后, 微细胞介导的染色体转移技术被大量使用. 即分离单一染色体或辐射断裂片段, 通过微细胞包装、融合导入宿主细胞, 研究其对宿主细胞衰老过程的影响, 将衰老基因大致定位于有功能的片段; 进一步根据已知的遗传标记作缺失定位、荧光原位杂交等实验, 使之精确定位. 由这一方法确定的衰老相关遗传位点不下十个, 分布于多条染色体. 如分别针对 A、B、C、D 四组的 6 号 (6q21)、4 号、1 号 (1q12~31, 1q42~43)、7 号染色体; 又如 Newbold^[4]将 3 号染色体上的衰老相关基因定

位于 3p21.1~21.3, 可抑制端粒酶活性; Uejima 等^[5]将 2 号染色体上的衰老相关基因定位于 2q37, 不影响端粒酶活性. 上述结果也表明了细胞衰老存在多种途径, 端粒长度的维持和端粒酶活性的调节也有多种机制, 为衰老相关基因的研究提供了广泛信息. 虽然这些位点越来越精确, 但衰老相关基因的完整序列至今尚不多见.

2 衰老相关疾病基因的克隆

现已报道了多种具有早衰特征、或与年龄相关的遗传性疾病基因的克隆, 他们多从连锁分析入手, 联合其他作图方式将衰老相关基因定位, 再通过部分 cDNA 文库筛选和外显子捕获等方法获得基因. 引人注意的有, 维氏综合征 (Werner's syndrome) 致病基因 WRN, 8p12. 其产物位于核仁, 有 ATP 依赖的 DNA 解旋酶活性和 3'-5' 核酸外切酶活性, 与酵母的 DNA 解旋酶 SGS1 同源^[6]. 还有多种衰老相关疾病的致病基因也发现与 DNA 解旋酶同源. 酵母细胞衰老的原因之一是 rDNA 不稳定形成染色体 rDNA 环 (ERC) 的聚集, 而 SGS1 参与了 rDNA 的转录和稳定性的维持^[7]. 因此推测, 核仁在哺乳类细胞衰老中有重要作用, 并由 WRN 或某一类 DNA 解旋酶进行调节. 它们的作用和致病过程还需进一步研究.

3 差异性表达筛选

分子生物学技术不断发展, 基于差异性表达的

* 国家自然科学基金重点项目资助 (39930170) 及国家重点基础研究发展规划项目 (G2000057001) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62091454, E-mail: ttjzy@public.gb.com.cn

收稿日期: 2000-09-05, 接受日期: 2000-11-03

基因克隆方法也越来越成熟^[8]。1991年 Murano 等以差减杂交技术首先鉴定了 18 个在衰老细胞和维氏综合征患者细胞中高表达的基因片段, 包括 9 个未知基因片段。随后几年都有类似的报道。1996 年 Goldstein 等通过构建筛选差减 cDNA 文库, 以正常人和维氏综合征患者二倍体成纤维细胞为材料, 获得在后者特异性高表达的 15 个 cDNA 片段, 也有 9 个未知基因片段^[9]。1998 年 Gonos 等^[10]以 SV40 T 抗原转化 REF 细胞为材料, 构建不同阶段的 cDNA 文库, 通过差异筛选和杂交获得 8 个衰老高表达基因和 1 个衰老抑制表达基因, 其中仅有一个未知新基因。

本实验室也用差异显示法和抑制性消减技术从人胚肺二倍体成纤维细胞 (2BS) 中获得衰老相关的差异表达新基因片段。

对于这些差异筛选方法, 确定对照和实验样品是关键, 而选择衰老过程的哪一阶段进行研究也同样重要。从以往的报道可以看出: 获得的基因大多是与衰老造成的表型变化相关的已知基因, 而非引发衰老或衰老过程的上游特异性基因。这些已知基因在文献中多次重复出现。1999 年 Lee 等^[11]用代表已知基因的寡核苷酸阵列检测小鼠胃部肌肉细胞随个体增龄的表达变化图, 发现 58 个基因为表达加强, 55 个基因为表达减弱; 与前人以差异显示法分析的结果一致。如此多的随衰老变化的基因, 组成复杂的衰老效应网络, 形成了各种衰老相关表型; 对衰老新基因的克隆、确定造成了很大的障碍。

另外, 文献中报道的未知基因片段, 大多无完整 cDNA 序列, 无法进行功能研究。近年发展的 cDNA 末端序列快速克隆法和大量的生物信息学数据将有利于这些序列的延伸。同时, 把这些基因片段和用染色体转移技术确定的遗传位点互比较进行研究, 可能获得更多信息。

1999 年报道了一个成功的例子^[12], 其实际工作在 1997 年全美细胞生物学年会已有介绍。Bertram 等在肺癌细胞 A9 中导入 4 号染色体, 将衰老相关基因定位于 4q33-4q34.1; 接着构建 BACs cDNA 文库, 以 PCR 筛选和序列分析获得基因全长; 最后经细胞转染实验, 确定了具有诱导衰老功能的新基因 MORF 4 (mortality factor 4), 并鉴定了相关基因家族成员 MRGs (MORF 4 related genes)。它们都含有亮氨酸拉链、HLH 结构域与核定位信号, 可能作为转录因子类似物发挥作用。

但是, Bryce 等^[13]的报道认为仅有 MORF 4 基因片段的转染, 无法诱导宿主角质形成细胞发生衰老。这可能与实验细胞系的不同有关, 以往曾多次证明有多种细胞衰老途径。MORF 4 的功能及其下游途径还需深入研究。

4 衰老动物模型

除了细胞水平的实验, 还有个体水平上衰老相关小鼠动物模型的研究。如快速衰老小鼠模型 SAM (senescence accelerated mice)。SAM 因不同亚种的衰老相关表型有所不同, 而不易于研究。

1997 年, Kuro 等^[14]通过插入突变培养多种转基因小鼠, 从中选出具有早衰特征的纯合子鼠, 并分离鉴定了新的衰老相关基因 klotho (kl)。kl 编码一种膜蛋白, 可能参与信号传导; 并且, kl 的作用具有非细胞自主性, 即: 只在特定类型的细胞中表达 kl 蛋白, 就能引起小鼠整体表型的变化, 推测有激素因子介导了 kl 的多向性功能。这一作用方式与 *C. elegans* 的主要衰老相关基因 daf-2 相同^[15,16]。他们还从人肾脏 cDNA 文库筛选到 kl 同源基因, 该基因位于 13q12, 此位点中尚未有其他衰老相关基因的报道, 这也许是个新起点。

转基因动物或衰老/长寿突变个体的应用, 为衰老相关基因的克隆和功能研究提供了有力的工具, 在低等生物中应用广泛, 但在高等生物中的应用难度较大。这可能也是低等生物衰老机理、衰老相关基因深入研究的原因之一: 如线虫的 age 和 daf 基因家族、酵母的 DNA 损伤修复系统和细胞周期调控、果蝇的过氧化酶系与物种寿命、衰老的关系。这些成果也推动了人类中相对的同源基因与衰老关系的研究。Coates 等^[17]报道了 prohibitin 蛋白家族在酵母、线虫、果蝇、小鼠和人类, 乃至植物中都存在同源基因, 并参与各自的衰老调控。尽管衰老机理在进化过程中有高度保守性, 但是, 从低等生物的衰老基因、衰老途径到揭开高等生物的衰老本质, 还有很长一段距离。

5 结 语

综上所述, 哺乳类动物细胞衰老基因还未确定。需要有效的基因克隆方法、相关动物模型, 结合细胞和个体水平的实验进行深入研究; 同时, 应确定灵敏、方便的衰老生物学指标, 使衰老程度的判断更具说服力, 也有利于实验数据间的比较。最后, 我们可从与细胞衰老密切相关的生理过程, 如

细胞周期调控、肿瘤抑制基因、基因转录调节因子等方面入手, 甚至从某些重要的与衰老相关的已知基因开始, 研究衰老作用方式, 再追溯到上游的特异衰老相关基因。总之, 哺乳类动物及人类衰老相关基因的探索任重而道远。

参 考 文 献

- 1 Faragher R G A, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human ageing. *BioEssay*, 1998, **20** (12): 985~ 991
- 2 童坦君, 张宗玉. 衰老分子生物学在新世纪面临的机遇与挑战. *中华老年医学杂志*, 2000, **19** (3): 167~ 169
Tong T J, Zhang Z Y. *Chin J Geriatrics*, 2000, **19** (3): 167~ 169
- 3 Pereira-Smith O M, Smith J R. Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (16): 6042~ 6046
- 4 Newbold R F. Genetic control of telomerase and replicative senescence in human and rodent cells. *Ciba Found Symp*, 1997, **211**: 177~ 197
- 5 Uejima H, Shinohara T, Nakayama Y, *et al.* Mapping a novel cellular senescence gene to human chromosome 2q37 by irradiation microcell mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog*, 1998, **22** (1): 34~ 45
- 6 Yu C, Oshima J, Fu Y, *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, 1996, **272** (5259): 258~ 262
- 7 Shore D. Cellular senescence: lessons from yeast to human aging. *Curr Biol*, 1998, **8** (6): R192~ 195
- 8 杨东丽, 张宗玉, 童坦君. 基因差异性表达与衰老. *生理科学进展*, 1997, **28** (2): 142~ 144
- 9 Yang D L, Zhang Z Y, Tong T J. *Prog Physio Sci*, 1997, **28** (2): 142~ 144
- 9 Lecká-Czernik B, Moerman E J, Jones R A, *et al.* Identification of gene sequences overexpressed in senescent and Werner syndrome human fibroblasts. *Exp Gerontol*, 1996, **31** (1~ 2): 159~ 174
- 10 Gonos E S, Derventzi A, Kveiborg M, *et al.* Cloning and identification of genes that associated with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, 1998, **240** (1): 66~ 74
- 11 Lee C-K, Klopp R G, Weindruch R, *et al.* Gene expression profile of ageing and its retardation by caloric restriction. *Science*, 1999, **285** (5432): 1390~ 1393
- 12 Betram M J, Berube N G, Hang S, *et al.* Identification of a gene that reverse the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor like genes. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (2): 1479~ 1485
- 13 Bryce S D, Forsyth N R, Fitzsimmons S A, *et al.* Genetic and functional analysis excludes mortality factor 4 (MORF 4) as a keratinocyte senescence gene. *Cancer Res*, 1999, **59** (9): 2038 ~ 2040
- 14 Kuro-O M, Matsumura Y, Aizawa H, *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 1997, **390** (6655): 45~ 51
- 15 Apfeld J, Kenyon C. Cell nonautonomy of *C. elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and life span. *Cell*, 1998, **95** (2): 199~ 210
- 16 童坦君, 张宗玉. “衰老基因”和“长寿基因”研究进展. *中华老年医学杂志*, 1997, **16** (1): 58~ 60
Tong T J, Zhang Z Y. *Chin Geriatrics*, 1997, **16** (1): 58~ 60
- 17 Coates P J, Jamieson D J, Smart K, *et al.* The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative life span. *Curr Biol*, 1997, **7** (8): 607~ 610

Seeking for Cellular Senescence Associated Genes*

GUO Shu-Zhen, TONG Tai-Jun**, ZHANG Zong-Yu

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Cellular senescence contributes greatly to organism aging, organism self-protection, cell carcinogenesis and many significant physiological or pathological processes. The mechanism of cellular senescence could be applied to cancer therapy. The way in these years to seek for the mammalian cellular senescence associated genes is described.

Key words cellular senescence, senescence associated gene (s), gene cloning

* This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China for Key Program (39930170) and the Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000057001).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62091454, E-mail: ttjzy@public.gb.com.cn

Received: September 5, 2000 Accepted: November 3, 2000