

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.05.006

# 端粒双靶点抑制对肺癌细胞 A549 衰老的影响

卢宏达<sup>1,2</sup>, 孔庆志<sup>1,2</sup>, 雷章<sup>1,2</sup>, 陈卫群<sup>2</sup>, 王纯<sup>1,2</sup>, 鲁明骞<sup>2,3</sup>, 黄婷<sup>1,2</sup>

## Senescence Induced by Combination with Two Telomere-based Oligomers in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell Lines

LU Hongda<sup>1,2</sup>, KONG Qingzhi<sup>1,2</sup>, LEI Zhang<sup>1,2</sup>, CHEN Weiqun<sup>2</sup>, WANG Chun<sup>1,2</sup>, LU Mingqian<sup>2,3</sup>, HUANG Ting<sup>1,2</sup>

1. Department of Oncology, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, China; 2. Wuhan Cancer Research Institute; 3. Medical College, Hubei University of Chinese Medicine

**Abstract: Objective** To evaluate the alteration in morphous and function for A549 cells, which induced by antisense tankyrase oligomers (asTANKS) combined with antisense human telomerase reverse transcriptase (ashTERT) oligomers and explore potential target of telomere-based molecular cancer therapeutics. **Methods** A549 cells was randomly assigned to 3 groups: ashTERT, ashTERT + asTANKS and asTANKS, while 3 groups (shTERT, sTANKS and blank) as control. With individual intervention for different hours, cells in morphous was observed by optical microscope, and proliferative activity evaluated by <sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H]-TdR) uptake assay and X-Gal transfection test as well. Moreover, apoptosis body was measured by Hoechst 33342 fluorescence staining, and besides, duration of proliferation by population double test analyzed. **Results** A549 cells was prone to senescence in morphous with asTANKS or ashTERT as passage time was delayed well and the trend combined between asTANKS and ashTERT was more significant, in which apoptosis body appeared, Uptake rate in [<sup>3</sup>H]-TdR trend to suppression and transfection efficiency in X-Gal was enhanced gradually under continuous treatment with ashTERT or asTANKS, but combined effect was more markedly. Certainly, population double times was shortened more rapidly with the combination of asTANKS and ashTERT, although the same effect was observed with single factor. **Conclusion** In coordination with two telomere-based oligomers, A549 cells prone to come to the end more quickly, and it provides insight into strategies for telomere-based molecular cancer therapeutics.

**Key words:** Senescence; Apoptosis; Human lung adenocarcinoma A549 cell lines; Telomere; Antisense oligomers

**摘要:目的** 观察两种端粒相关的反义寡核苷酸对人肺腺癌细胞 A549 形态、功能、凋亡及细胞传代的影响。**方法** 将培养的 A549 细胞随机分为空白对照组、端锚酶正义寡核苷酸对照组(sTANKS)、端粒酶催化亚单位正义寡核苷酸对照组(shTERT)、端锚酶反义寡核苷酸实验组(asTANKS)、端粒酶催化亚单位反义寡核苷酸实验组(ashTERT)、端锚酶及端粒酶催化亚单位反义寡核苷酸联合实验组(asTANKS+ ashTERT),分别与不同的正、反义寡核苷酸作用,光学显微镜下观察细胞形态,细胞氘摄取率([<sup>3</sup>H]-TdR)监测细胞利用合成 DNA 的胸腺嘧啶的能力,β-半乳糖苷酶(X-Gal)转染效率评估细胞衰老状态下的应激能量代谢,hoechst33342 荧光染色检测 A549 细胞凋亡,通过传代实验分析细胞寿命。**结果** 联合作用的两种反义寡核苷酸(ashTERT + asTANKS)能明显诱导 A549 细胞的衰老及凋亡,抑制 DNA 合成的含氘的胸腺嘧啶的摄取,增加细胞衰老状态的 β-半乳糖苷酶(X-Gal)转染效率;并使 A549 细胞平均寿命明显缩短,在经过(24.53 ± 0.40)次倍增后发生传代终止,与单独作用的 asTANKS

或 ashTERT 相比均有明显的差异。**结论** 两种针对端粒的反义寡核苷酸的联合作用,使 A549 细胞从形态及功能上倾向于衰老、“去永生”,有可能成为新的抗肿瘤药物靶点。

**关键词:** 衰老; 凋亡; 人肺腺癌 A549 细胞; 端粒; 反义寡核苷酸

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A

**收稿日期:** 2013-02-16; **修回日期:** 2013-04-15

**基金项目:** 湖北省卫生计生厅科研基金资助项目(2010Z-Y19); 武汉市人事局、武汉市卫生局科研基金资助项目(WX10A03)

**作者单位:** 1. 430014 武汉,武汉市中心医院肿瘤科; 2. 武汉市肿瘤研究所; 3. 湖北中医药大学临床医学院

**作者简介:** 卢宏达(1971-), 博士,副教授,主要从事肿瘤分子生物学、临床肿瘤放、化疗的研究

## 0 引言

细胞生命期(Life span of cells)是指细胞在培养中持续增殖和生长的时间,它通常要经历原代期、传代期及衰退期三个阶段,而细胞的恶变多发生在细胞衰老、衰退的阶段<sup>[1]</sup>。在某种因素的影响下,原来正常的细胞发生自发转化,从而获得持久性增殖能力,并且此增殖能力不受正常因素调控的过程称为细胞恶变。作为细胞永生性(Immortality)或恶性化(Malignancy)的标志,其理论上具有永不衰老的能力<sup>[2-3]</sup>。前面的研究<sup>[4]</sup>我们探讨了端粒酶催化亚单位和端锚酶反义寡核苷酸协同作用对人肺腺癌细胞 A549 端粒长度调节的影响,那么,作为细胞“生物钟”<sup>[5]</sup>的端粒的变化是否可以逆转肿瘤细胞恶性增殖、永不衰老的进程呢?我们仍然运用两种反义寡核苷酸,观察了端粒双靶点作用下的人肺腺癌细胞 A549 在形态、功能及传代方面的改变,现报告如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 人肺腺癌细胞 A549 细胞系,由武汉大学中国典型物种保藏中心提供。

1.1.2 端锚酶反义寡核苷酸序列,参考 NCBI/GenBank 所发表的端锚酶 1 序列(GeneID8658)<sup>[6]</sup>,选取包括翻译起始点 ATG 在内的 5'端上游的 24 个碱基,经 BlastN 软件对比与其他基因序列无同源性,无自身二级结构,交由上海生物工程公司合成,全硫代修饰。其正义序列(sTANKS)为:5'-CAGT-GCTAGGGGAGTCCGAAGATG-3';反义序列(asTANKS)为:5'-CATCTTCGGACTCCCCTAG-CACTG-3'。

1.1.3 反义端粒酶催化亚单位序列,参考 NCBI/GenBank 所发表的端粒酶催化亚单位序列(GeneID7015)<sup>[7]</sup>,选取包括翻译起始点 ATG 在内的 5'端上游的 20 个碱基,经 BlastN 软件对比确定与其他基因序列无同源性,无自身二级结构。交由上海生物工程公司合成,全硫代修饰。其正义序列(shTERT)为:5'-CCCGCGATGCCGCGCGCTCC-3';反义序列(ashTERT)为:5'-GGAGCGCGCG-GCATCGCGGG-3'。

1.1.4 细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶(X-Gal)检测试剂盒由美国 Genmed 公司提供;RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司;多聚甲醛、胸腺嘧啶核苷、Hoechst33342、三氯醋酸、脱氧胆酸为美国 Sigma 公司产品;含放射性核素氚的胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H)thymidine [<sup>3</sup>H]-TdR)由武汉市肿瘤研究所同位素室

孵育成功;其余试剂均为分子生物学专用或国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌细胞 A549 经复苏,置于含双抗的 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液,37℃、95%饱和湿度培养箱中培养、传代,取对数生长期细胞(浓度  $5 \times 10^5$ /ml)接种于 96 孔培养板,每孔 0.5 ml,5%胎牛血清 RPMI 1640 培养液贴壁培养 12 h 后弃上清液开始细胞实验。

1.2.2 实验分组及转染 根据转染正/反义寡核苷酸的不同,将在培养板上贴壁的 A549 细胞分为六组:脂质体空白对照组、端粒酶催化亚单位正义寡核苷酸对照组(shTERT)、端粒酶催化亚单位反义寡核苷酸实验组(ashTERT)、端锚酶及端粒酶催化亚单位反义寡核苷酸联合实验组(asTANKS + ashTERT)、端锚酶反义寡核苷酸实验组(asTANKS)、端锚酶正义寡核苷酸对照组(sTANKS),每组 16 孔。按照脂质体转染说明书,分别将不同组合正/反义寡核苷酸转染贴壁细胞,其转染浓度为  $2 \mu\text{mol/L}$ ,作用 48 h 后换用含 5%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养至 48 h 观察下述指标。

1.2.3 细胞形态学(morphology)检测 每次细胞传代前,在倒置显微镜下观察细胞形态、大小、数目、颗粒等,并在 100 倍显微镜下成像分析。

1.2.4 氚-胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H)-TdR)摄取实验 取传代前的 6 孔培养板细胞,弃培养液,加 PBS 2 ml 洗涤去上清液,加入无血清培养液作用 4 h 使细胞进入静止期;加入  $1 \mu\text{Ci/ml}$  [<sup>3</sup>H]-TdR 孵化液 1 ml 作用 12 h。弃孵化液加入 4℃ PBS 2 ml 洗涤 2 次去上清液;加入 5%的 TCA 2 ml 4℃孵育 30 min 去上清液;25℃加入 0.5 M NaOH 细胞裂解液 0.5 ml。将裂解液注入闪烁计数管,上 PEImer 液体闪烁计数仪计数;设置未加药物培养的 A549 细胞为标准对照,计算细胞对 [<sup>3</sup>H]-TdR 的摄取率,摄取率 UR(Uptake rate,%) =  $(N_t / N_s) \times 100\%$  ( $N_t$  为药物培养细胞的放射计数; $N_s$  为标准对照细胞的放射计数)。

1.2.5 X-Gal 转染效率检测 取传代前的 6 孔培养板细胞,弃培养液加 PBS 2 ml 洗涤去上清液,加入 1 ml X-Gal 固定液固定(25℃,10 min);吸除固定液,PBS 2 ml 洗涤 3 次,每次 3 min;弃 PBS,加入 1 ml 染色工作液(使用聚丙烯容器配制染色工作液),37℃孵育 2 h,注意用保鲜膜封住 6 孔板防止蒸发。去除染色工作液,加入 2 ml PBS,普通光学显微镜下观察,计算转染率。转染率(Transfection efficiency,%) =  $[N(+)/N] \times 100\%$  [ $N(+)$  为染色阳性细胞数; $N$  为检测的总细胞数]。

1.2.6 Hoechst33342 荧光染色凋亡检测 取传代前的 6 孔培养板细胞,弃培养液加 PBS 2 ml 洗涤去上清液,加入 4% 的多聚甲醛 2 ml 固定(25℃, 10 min);弃固定液,加 PBS 2 ml 洗涤 5 min 去上清液,吸干洗涤液后加 1 mM Hoechst33342 染液 0.3 ml, 37℃ 避光孵育 15 min;加 PBS 2 ml 洗涤 1 次,去上清液,加 PBS 1 ml 荧光显微镜下观察细胞核形态,并在 400 倍显微镜下成像分析。

1.2.7 A549 细胞传代实验 取准备传代的 T25 细胞培养瓶,加入浓度为 0.25% 胰蛋白酶 PBS 消化 1 min,弃上清液加完全培养液 5 ml 终止消化、制备单细胞悬液,细胞计数板显微镜下计算细胞浓度,细胞倍增(population double, PD)次数按公式计算:  $PD = (\lg N_t - \lg N) / \lg 2$  (N 为初始细胞接种细胞数;  $N_t$  为传代细胞数)。

### 1.3 统计学方法

实验各组均重复实验 16 样本(实际处理时剔除培养污染细胞),并且各组数据经统计软件 SPSS 11.0 处理,通过 *t* 检验比较组间差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 反义寡核苷酸对 A549 细胞形态学的影响

从细胞形态学上看,两种反义寡核苷酸的联合作用组(ashTERT + asTANKS)的 A549 细胞在培养过程中很快出现老化现象,表现为:细胞膜逐渐皱缩、伪足减少,细胞扁平、胀大、胞内颗粒增多,细胞染色质变淡,培养液中细胞碎片增多等;而细胞的传代时间也明显延迟。单独作用的 ashTERT、asTANKS 组也有细胞衰老的现象,但不及联合作用组明显,见图 1。

### 2.2 反义寡核苷酸对 A549 细胞氘摄取 ( $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ ) 的影响

细胞氘的摄取反映了细胞利用环境中的胸腺嘧啶合成 DNA 后的增殖能力。随着传代的进行,两种反义寡核苷酸作用后 A549 细胞对氘的摄取率逐

渐降低,经 7 次传代后,ashTERT + asTANKS 联合组对氘的摄取率为:  $(6.85 \pm 1.25)\%$ ,明显低于 ashTERT、asTANKS 组  $[(37.27 \pm 4.07)\%、(34.99 \pm 3.55)\%]$ ,  $t = 25.88、27.06, P < 0.001$ ,而 shTERT、sTANKS 对照组氘的摄取率较无药组无明显变化,见图 2。

### 2.3 反义寡核苷酸对 A549 细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶(X-Gal)转染效率的影响

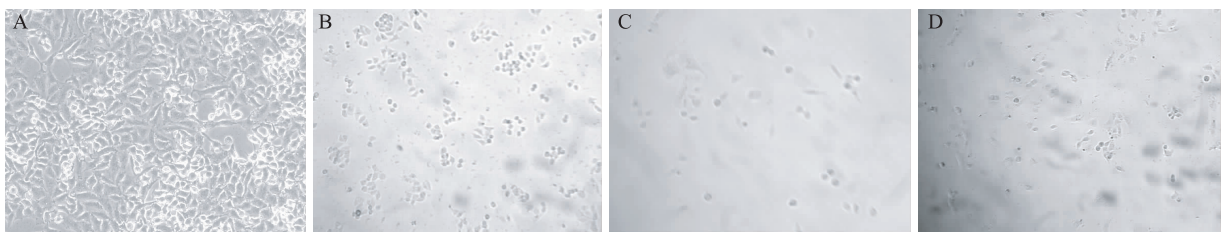
$\beta$ -半乳糖苷酶(X-Gal)转染效率体现细胞在衰老是应激能量代谢的能力。随着传代的进行,两种反义寡核苷酸作用后 A549 细胞转染 X-Gal 的效率逐渐提高,经 7 次传代后,ashTERT + asTANKS 联合组细胞 X-Gal 的转染率为:  $(87.36 \pm 5.17)\%$ ,明显高于 ashTERT、asTANKS 组  $[(33.97 \pm 4.06)\%、(36.80 \pm 3.66)\%]$ ,  $t = 31.46、28.60, P < 0.001$ ,shTERT、sTANKS 对照组无此变化,见图 2。

### 2.4 反义寡核苷酸对 A549 细胞凋亡的影响

Hoechst33342 细胞核染色能较好地反映凋亡时细胞核的变化。采取  $1 \mu\text{M}$  的药物持续作用 72 h 后 A549 细胞经 Hoechst33342 荧光染色,ashTERT + asTANKS 组出现细胞核染色质边集、核固缩、核碎裂、出芽及凋亡小体情况的细胞逐渐增多,而 ashTERT、asTANKS 组亦有凋亡细胞出现,但较联合组少。对照组细胞无凋亡现象出现,见图 3。

### 2.5 反义寡核苷酸对 A549 细胞传代的影响

采取  $1 \mu\text{M}$  的药物持续作用,ashTERT + asTANKS 联合作用组细胞的传代时间明显延迟;当细胞经过  $24.53 \pm 0.40$  代传代后传代终止。ashTERT、asTANKS 组也出现端粒长度缩短的现象,但不及联合作用组明显;两组细胞在经过  $56.92 \pm 0.46、53.33 \pm 0.57$  代传代后传代终止。空白对照组、shTERT、sTANKS 组细胞端粒长度无缩短,细胞传代无延迟,亦无终止现象。分析各组细胞的传代次数,asTANKS + ashTERT 组较 ashTERT、asTANKS 组差异有统计学意义 ( $t = 53.38、43.39, P < 0.001$ ),见表 1。

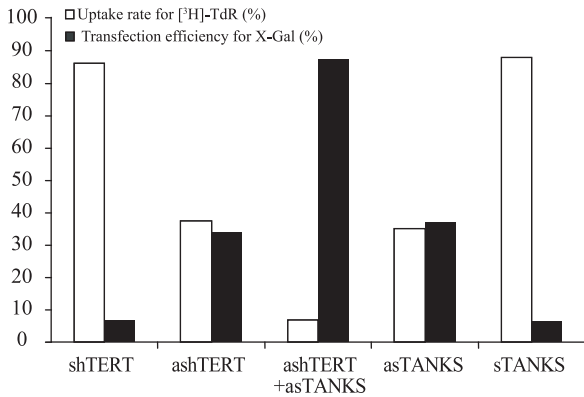


A: blank-control ; B: ashTERT; C : ashTERT + asTANKS; D: asTANKS

With anti-oligomers, cultured A549 cells were prone to shrink, diminished, pseudopodia vanished, adhesion decreased, particler increased in cytoplasm and medium

图 1 寡核苷酸作用后 A549 细胞形态学特征( $\times 100$ )

Figure 1 Morphologic character for cultured A549 cells with oligomers( $\times 100$ )



Uptake rate of [<sup>3</sup>H]-TdR in A549 cells with oligomers: ashTERT + asTANKS (6.85 ± 1.25)%, ashTERT (37.27 ± 4.07)%, asTANKS (34.99 ± 3.55)%. ashTERT + asTANKS vs. ashTERT/asTANKS, *t* = 25.88, 27.06, *P* = 5.56 × 10<sup>-4</sup>, 3.82 × 10<sup>-5</sup>. Transfection efficiency of X-Gal in A549 cells with oligomers: ashTERT + asTANKS (87.36 ± 5.17)%, ashTERT (33.97 ± 4.06)%, asTANKS (36.80 ± 3.66)%. ashTERT + asTANKS vs. ashTERT /asTANKS, *t* = 31.46, 28.60, *P* = 2.47 × 10<sup>-7</sup>, 4.95 × 10<sup>-6</sup>

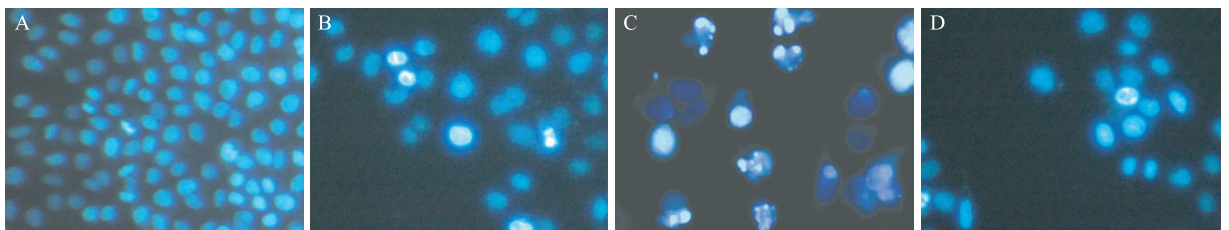
图 2 寡核苷酸作用后 A549 细胞衰老功能的检测  
Figure 2 Senescence detection for A549 cells with oligomers ([<sup>3</sup>H]-TdR and X-Gal)

表 1 寡核苷酸作用下 A549 细胞传代影响 (作用浓度: 1 μM)

Table 1 Effect of population double times with oligomers in A549 cell lines (drug level :1 μM)

Groups	Sample (n)	Telomerase Activity (x̄ ± s) (PD)
Blank	14	∞
shTERT	15	∞
ashTERT	16	56.92 ± 0.46*
ashTERT + asTANKS	14	24.53 ± 0.40
asTANKS	14	53.33 ± 0.57**
sTANKS	13	∞

Note: \* :ashTERT vs. ashTERT + asTANKS, *t* = 53.38, *P* = 0.000 (*P* < 0.001); \*\* :asTANKS vs. ashTERT + asTANKS, *t* = 43.39, *P* = 0.000 (*P* < 0.001); PD: population double



A: blank control; B: ashTERT; C: ashTERT + asTANKS; D: asTANKS

With anti-oligomers, cultured A549 cells were prone to karyopyknosis, chromatin deposition in karyolemma, in which karyorhexis and apoptosis body appeared followed budding stained by Hoechst33342 fluorescein. As a reflection of A549 cells senescence in part, apoptosis trend to later stage with the combination of 2 anti-oligomers, rather than single factor

图 3 寡核苷酸作用后 A549 细胞 Hoechst33342 荧光染色 (×400)

Figure 3 Apoptosis detection by Hoechst33342 staining for A549 cells with oligomers (×400)

### 3 讨论

衰老的细胞学定义是指机体的正常细胞通过完成自身的增殖周期而接近细胞终末分化的过程<sup>[8]</sup>。机体组织细胞的生存期与完整机体的死亡相适应,也正是因为细胞端粒的“复制性衰老”的存在才维持了自然界的正常新陈代谢循环<sup>[9-10]</sup>。然而与正常细胞的生物学特性不同,肿瘤细胞的端粒主要通过端粒酶途径得以维持,从而失去正常分化、衰老的能力,获得无限增殖、不受调控的特性<sup>[11-12]</sup>。

从实际操作的角度,肿瘤细胞无限增殖的能力是通过其无限传代来体现的。而传代(Passage)是当培养细胞增殖达到一定密度后,则需要分离出一部分细胞和更新营养液,否则将影响细胞的继续生存;与细胞世代(Generation)或倍增(Doubling)不同,在传代一次的过程中,细胞可能已经倍增数次。

当然,肿瘤细胞的增殖能力还可以通过分析其代谢底物和合成产物的含量来判断<sup>[13]</sup>。细胞的代谢底物如胸腺嘧啶核苷是细胞合成 DNA 的必须原料,当细胞发生衰老时,核酸合成不足,胸腺嘧啶核苷等代谢底物摄取量必然下降。在真核细胞正常的糖代谢途径中往往不涉及乳糖、半乳糖,其代谢酶—β-半乳糖苷酶亦无活性。只有当细胞衰老时,胞内酸性产物的聚集才促进 β-半乳糖苷酶的稳定表达,作为酶底物的 X-Gal 则发生显色(蓝色)反应。因此,光学显微镜下观察到蓝色表达的细胞亦可作为细胞复制性衰老(replicative senescence)的分子特征来识别和检测。

虽然,细胞衰老的最终结局包括细胞坏死、自噬、凋亡等多种形式,但同等作用时间下 A549 细胞凋亡的程度仍然可以从一个方面反映其细胞的衰老,即同等作用时间单独的反义寡核苷酸作用(ashTERT 或 asTANKS)仅能出现如染色质边集、核固缩等早期凋亡的表现,而在联合作用时则表现为核碎裂、出芽和凋亡小体形成等晚期凋亡的特征。

我们的研究显示:具有永生化倾向的腺癌细胞 A549 在经反义寡核苷酸作用后,形态学上表现出衰老的特征,细胞倍增次数达到 $(24.53 \pm 0.40)$ 时出现传代终止;并且随培养时间的延长逐渐出现凋亡。同时与前述 A549 细胞基因表达的结果相对应<sup>[4]</sup>,两种反义寡核苷酸作用后的 A549 细胞摄取率明显下降,X-Gal 转染率明显上升。端粒酶催化亚单位反义寡核苷酸、端锚酶反义寡核苷酸的单独作用使细胞分别在 $(56.92 \pm 0.46)$ 、 $(53.33 \pm 0.57)$  PD 时发生传代终止,其细胞生命期与正常的人胚二倍体相当<sup>[14]</sup>。也就是说,两种反义寡核苷酸的作用消除了 A549 细胞原有的无限恶性增殖的能力;而且两种反义寡核苷酸的联合作用使 A549 细胞终止传代的时间提前约 30 个倍增时间到来,其细胞形态及功能的效应均极为明显。这既可避免细胞在抑制之前产生巨大的肿瘤负荷,又减少了端粒酶反义寡核苷酸作用过程中发生潜在耐药的可能性,值得作为新的抗肿瘤药物靶点进行更深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing[J]. *Nature*, 2007, 448(7155): 767-74.
- [2] Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(17): 4960-3.
- [3] Tallen G, Soliman MA, Riabowol K. The cancer-aging interface and the significance of telomere dynamics in cancer therapy[J]. *Rejuvenation Res*, 2007, 10(3): 387-95.
- [4] Lu HD, Huang T, Shen WZ, *et al.* Effect of tankyrase anti-sense oligonucleotide combined human telomerase reverse

transcriptase antisense oligonucleotide on telomere dynamics in human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *Ai Zheng*, 2007, 26(11): 1164-9. [卢宏达,黄涛,申雯竹,等.端锚酶反义寡核苷酸联合反义端粒酶催化亚单位对人肺腺癌 A549 细胞端粒动力学的影响[J]. *癌症*, 2007, 26(11): 1164-9.]

- [5] Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(5): 867-74.
- [6] Zhu L, Smith S, de Lange T, *et al.* Chromosomal mapping of the tankyrase gene in human and mouse[J]. *Genomics*, 1999, 57(2): 320-1.
- [7] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, *et al.* Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase[J]. *Science*, 1997, 276(5312): 561-7.
- [8] Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells[J]. *Biogerontology*, 2004, 5(1): 1-10.
- [9] Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11(12): 1623-37.
- [10] Chang S. The telomere protein tankyrase 1 regulates DNA damage responses at telomeres[J]. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(10): 639-42.
- [11] Dimri GP. What has senescence got to do with cancer[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(6): 505-12.
- [12] Parkinson EK, Minty F. Anticancer therapy targeting telomeres and telomerase : current status[J]. *BioDrugs*, 2007, 21(6): 375-85.
- [13] Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(20): 9363-7.
- [14] Dregalla RC, Zhou J, Idate RR, *et al.* Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs[J]. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(10): 691-708.

[编辑校对:安 凤]