

衰老机理与衰老学说——国内外衰老研究综述

Mechanism and Theories of Aging

童坦君 张宗玉

(北京医科大学生化与分子生物学系 北京 100083)

衰老的分子机理

健康与长寿是生命科学永恒的主题。统计资料表明,子女的寿命常和双亲的寿命有关;各种动物的平均寿命和最高寿限都相当稳定,鼠类最高寿限约为3年,猴约为28年,犬约为34年,大象约为62年,而人类为115~120岁。生、老、病与死是生物界普遍的规律,生物为何会衰老呢?衰老机理如何?

衰老机理极其复杂,其学说不下数十种,如:免疫学说、神经内分泌学说、自由基学说、蛋白质合成差错累积学说等,以及近年从分子与基因水平上提出的基因调控学说、DNA损伤修复学说、线粒体损伤学说以及端区假说等,下面将目前国际上研究的热点结合我们自身的研究工作介绍如下。

1. 端区假说

端区亦称端粒。1938年Müller等从果蝇染色体末端研究提出端区的概念,但其化学组成一无所知,1978年Jesorph从四膜虫的研究获知端区由富含鸟嘌呤(G)的重复序列组成。1991年Harley提出衰老的端区假说,其后Wright等用实验证实端区的缩短是导致人类体细胞衰老的重要原因之一。

(1) 端区的概念

端区是指染色体末端的特殊结构,此结构可防止两条染色体末端的DNA链(又名脱氧核糖核酸,它是蕴含遗传信息的遗传物质)因互相关联而造成染色体的畸变。不同物种端区结构不同,人类细胞的端区是由胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)及鸟嘌呤(G)核苷酸组成的(TTAGGG)_n。六核苷酸按一定排列顺序构成,n代表长度(如n=2则端区长度为12个核苷酸)。人类除干细胞外,大多数体细胞端区长度随年龄增加而缩短,而体外培养的细胞端区长度随传代而缩短;端区缩短到一定程度,细胞不再分裂,即不能传代,最终衰老直至死亡。但肿瘤细胞因具端聚酶活性,端聚酶催化端区合成可使端区恢复原有长度,故肿瘤细胞的端区不因传代而缩短,细胞由此疯长乱长,引发肿瘤。

(2) 端区长度随增龄而缩短

笔者所在的研究室1992年开始研究细胞端区长度与衰老的关系。体外培养的人二倍体成纤维细胞是国际上最常用的细胞衰老模型,我们以不同代龄的中国人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)为实验对象,Hela细胞(子宫颈癌细胞)为对照,分别观察其端区长度随代龄的变化。结果显示年轻2BS细胞(24代)端区长度约9.1kb(千碱基对);衰老2BS细胞(64代)端区长度约7kb,丢失约2kb。2BS细胞端区长度随代龄的增加而缩短,结果显示细胞每传一代,端区平均丢失约50bp(碱基对),而Hela细胞100代与150代相比其端区长度未因代龄增加而缩短,皆为14.0kb。

我们还测定了我国人群外周血白细胞端区DNA长度,观察其与年龄的关系,发现白细胞端区DNA长度随增龄而缩短。青年组(25岁)端区长度平均为8.75kb,老年组(65岁)端区长度平均为7.37kb,丢失约1.38kb;平均每增一岁端区DNA长度丢失约35bp。但是不同个体随增龄端区丢失速率不尽相同,每增龄一岁端区长度缩短最多者为57bp,最少者为9bp;但总趋势是随增龄端区长度逐渐缩短。日常生活中常见有些人“老而不衰”,而另一些人则“未老先衰”,可见生物学年龄比历法年龄更能体现个体衰老程度。人类体细胞的端区长度变化随增龄而缩短是人类特异的生物学年齡标志之一。此外,从人外周血白细胞端区的变化与增龄关系的长度研究中还发现,相同年龄组的成年男性的端区长度长于女性,但随增龄端区长度缩短速率却比女性快,每年差3bp。这从分子水平解释了为何女性寿命往往比男性长这一普遍的生命现象。

从衰老端区学说看是否人类体细胞引入端聚酶能使细胞长生不老?抑制端聚酶活性能否抑制肿瘤?这是当前国际研究热点之一。自从发现端聚酶活性与人类肿瘤密切相关后,国际上大力开展抑制端聚酶活性的研究,试图以此抑制肿瘤,达到治疗目的,近来虽然取得了部分效果,但并不尽如人意,因为细胞内还存在非端聚酶途径延长端区的机制,

即 ALT (Alternative mechanism for lengthening telomeres) 机制。1995 年文献报道人类端聚酶组成成份 RNA (hTR) 基因已被克隆, 由此可用反义核酸技术抑制 hTR, 以抑制其酶活性, 达到基因治疗肿瘤的目的。

正常体细胞体外培养可传代数有限, 其可传代数既与该种生物的寿限有关, 又与细胞供体的年龄有关, 常用以作为衰老研究模型; 相反肿瘤细胞属于永生化细胞, 在理论上可无限传代。

Bodnar 等人 (1998 年) 报道, 将人端聚酶催化亚单位 cDNA 转导入细胞后, 人视网膜色素上皮细胞与成纤维细胞的体外培养传代数, 增加了 20 代。细胞增大, 高级糖基化终产物 (advanced glycosylation end-product, AGE) 积聚, β 半乳糖苷酶阳性等细胞衰老标志的出现减慢。所以在人类体细胞内引入端聚酶似能“延年益寿”, 但不能使细胞长生不老。Kiyone 等人 (1998 年) 报道, 要使人上皮细胞永生化, 既要有端聚酶活性, 还要使 Rb 和 p16^{INK4a} 等抑癌基因失活, 可见有端聚酶活性只是人类体细胞长生不老的条件之一。

此外, 因端聚酶活性与人类肿瘤形成密切相关, 故还应注意引入端聚酶是否有促进细胞癌变的可能性。

2. DNA 损伤修复学说

人类细胞中的 DNA (DNA 由两条脱氧核糖核酸链组成, 两条链互相缠绕如麻花状) 在内环境 (如自由基) 和外环境 (如阳光中的紫外线、化学物质等) 损伤因素作用下, DNA 受损伤而致 DNA 链断裂, 以一条链断裂为最多见。DNA 链断裂则遗传信息不能准确无误地传至下代, 但细胞具有一整套修复 DNA 链断裂的酶系, 因此遗传信息才能从亲代传至子代。持 DNA 损伤修复学说的人认为, 生物衰老时, 修复损伤 DNA 的能力下降, 致使损伤积累, 引起基因及其表达异常, 最终引起生物衰老。Bohr 等认为, 免疫系统负责对机体进行整体水平的监管; 而 DNA 损伤的修复能力则用以负责对机体进行 DNA 水平的监管。因此增强 DNA 损伤的修复能力不仅关系延缓衰老, 而且将成为许多疾病的防治手段。Hart 及 Setlow 用 7 种哺乳类动物 (如大鼠、小鼠、牛及人等) 研究动物最高寿命与修复损伤 DNA 能力的相关性, 发现皮肤成纤维细胞对紫外线诱导的 DNA 损伤修复合成率与动物最高寿命有良好的正比关系。

我室于 1989 年观察到衰老过程中大白鼠脾细胞的 DNA 单链断裂有增高现象, 重接能力 (代表修复断裂 DNA 的能力) 降低, 这一结果为我室近年进一步研究所证实。我们用新近发展的单细胞凝胶电泳试验可直观地观察单个细胞 DNA 链断裂修复能力。用此法并结合其它检测方法, 我们研究了紫外线及过氧化氢 (双氧水) 对小鼠脾细胞 DNA 的损伤, 发现老年鼠脾细胞 DNA 损伤修复能力明显低于青

年鼠。与此同时还检测了紫外线照射后, 修复相关基因 Gadd45 和 Gadd153 的表达情况, 发现老年鼠脾细胞的可诱导性低于青年鼠。

目前国际上已证实人类核苷酸切除修复基因约 30 种, 且发现细胞对 DNA 损伤的应答, 不仅仅是去诱导修复基因的表达以进行修复, 而且还可通过阻滞细胞周期, 为修复 DNA 提供时间; 如损伤严重不易修复时则可引起细胞凋亡, 牺牲个别细胞, 保护整体。细胞对 DNA 损伤的应答究竟走哪一条路? 已确认是由关卡控制基因 (Checkpoint Control gene) 准确控制应答的时序, 协调应答过程。现已发现人类 DNA 损伤修复关卡控制基因有 ATM、p53 和 p21^{WAF}。p53 是一抑癌基因, 在细胞应答 DNA 损伤中起关键作用。它可调节 DNA 复制、阻断细胞周期以及促进细胞凋亡, 引起诸多相关基因的转录。美国科学家发现, 离子辐射或某些化合物均可诱导细胞中依赖 p53 的 Gadd45 基因 (修复 DNA 损伤的一种基因) 的转录, Gadd45 基因含一个与 p53 结合的元件。Smith 等体外试验发现 Gadd45 促进核苷酸切除修复的作用, 可能是通过与 p21 竞争结合 PCNA (增殖细胞核抗原) 而实现的。Gadd45 还能直接与 p21 结合。p53 和 p21 还可通过其它途径调控细胞对 DNA 损伤的应答。1999 年美国麻省理工学院 Guarante 等人已将 DNA 损伤列为引起生物衰老的首要因素, 这一领域的研究已成热点, 且已有人将此作为衰老的生物年龄标志之一。

3. 线粒体 DNA 损伤学说

线粒体 DNA (mtDNA) 是细胞核外遗传物质, 其含量占整个细胞 DNA 的 0.5%, 在细胞能量代谢中有十分重要的作用。我们一日三餐中的糖、脂类与蛋白质在细胞内经生物氧化产生能量 (ATP), 供机体一切生理与生化活动的能量需要。糖、脂类、蛋白质代谢物在细胞内被氧化的过程中不断消耗从空气中吸收的氧, 进入细胞内的氧 90% 被线粒体用于生物氧化, 在氧化磷酸化中消耗, 代谢物被氧化的同时生成 ATP, 所以线粒体好比人体的发电站。在线粒体氧化磷酸化生成 ATP 的过程中, 大约有 1~4% 摄入的氧转化为氧自由基。氧自由基最易损伤线粒体 DNA, 从而产生线粒体 DNA 片段缺失。临床上老年糖尿病、老年痴呆症 (阿尔采默氏病)、帕金森氏病、心脑血管病等的患者, 线粒体 DNA 均有不同程度的片段缺失。

脑血管病是我国老年人 3 大死亡原因之一。脑缺血时, 自由基大量产生, 自由基可通过多种途径损伤神经细胞, 尤其损伤神经细胞的线粒体 DNA。我室于 1994 年用双侧颈总动脉结扎法建立了小鼠脑缺血性损伤模型, 应用聚合酶链反应 (PCR) 技术, 检测其大脑线粒体 DNA 片段缺失情况。发现 12 只正常青年鼠脑线粒体 DNA 无一有片段缺失; 而 8 只

老年鼠中 4 只有 0.63kb 片段缺失, 缺失率为 50%; 17 只脑缺血青年鼠中 12 只有脑线粒体 0.63kb 片段缺失, 缺失率约为 70%; 而 11 只脑缺血老年鼠全部有脑线粒体 0.63kb 片段缺失, 缺失率为 100%。且除 0.63kb 缺失外, 还有其它类型的缺失。从上述实验结果推测脑缺血引起脑细胞线粒体 DNA 片段缺失可能是某些老年脑血管病患者恢复较慢且难以治疗的原因之一。这也将为老年性痴呆的发病机理、诊断与防治提供线索。

“衰老基因”与“长寿基因”

如前所述, 许多统计学资料表明, 子女寿命与双亲的寿命有关, 各种动物的平均寿命和最高寿限(maximum life-span)相当稳定。由此看来, 物种寿命主要取决于遗传, 那么细胞中是否存在“长寿基因”、“衰老基因”? 这是近年国际上研究的又一热点。除遗传因素外, 环境因素对寿命的影响也至关重要。

1. “衰老基因”

(1) 衰老相关基因 近年来由于遗传学与分子生物学的结合, 使这一研究进入了“基因”时代。“长寿基因”与“衰老基因”是一对矛盾的两个方面, 例如杰汉逊用一种叫 *C-elegans* 的线虫进行的研究表明, 基因确可影响衰老以及寿限。该种线虫的平均寿命仅 20 天, 野生型 *C-elegans* 没有基因突变在 25 °C 环境中的寿命仅为 9 天; 而该虫 age-1 单基因突变后, 则可提高平均寿命 65%, 最高寿命提高 110%。age-1 突变型的抗氧化酶类如 Cu、Zn-SOD(超氧化物歧化酶)与过氧化氢酶活性较高, 应变能力强, 耐受过氧化氢(H_2O_2)、紫外线及高湿的能力都高于野生型。近年研究还发现其寿限与 daf-2 基因(1995 年)及 CIK 基因(1996 年)相关。daf-2 基因是 daf 基因家族的一员, daf 基因是编码与蠕虫发育相关信号传递途径中某些蛋白质分子的基因, 目前已知有 daf-2、daf-23、daf-18、daf-12 及 daf-16, 这类基因为 *C-elegans* 形成休眠状态(dauer)的幼虫所必需。daf-2 单基因突变的突变株, 其寿命可延长 2 倍以上, 而 daf-2 和 daf-12 双基因突变的突变株, 其寿命可提高 4 倍。CIK 基因(Biological clock 生物钟基因)是 1996 年发现的基因家族, 目前至少有 CIK-1、CIK-2 与 CIK-3。CIK-1 单基因突变的突变株其寿命可延长 50%, 任何两个 CIK 基因双突变的突变株, 其寿命为野生型的 3~4 倍, 可见“衰老基因”的突变可使物种寿命延长。此外, 90 年代以来, 国外纷纷报道人染色体 1、4、7 号与 X 染色体各自存在着与衰老相关的基因。

(2) 老年病相关基因 衰老时人体机能下降, 包括对疾病的易感性增强, 有人认为从这一角度

看, 某些与疾病有关的基因, 亦可看作“衰老基因”。例如载脂蛋白 E_a 水平升高时发生冠状动脉粥样硬化性心脏病与老年性痴呆(阿尔茨海默型)的可能性增高, 由此影响寿命。

另外, 1996 年 G. shellenberg 小组发现 Werner syndrome(维氏综合症)病因是编码一种解旋酶的基因突变引起, 该基因位于人第 8 号染色体, 其表达产物由 1432 个氨基酸组成。1998 年又发现该解旋酶还具有外切核酸酶活性, 所以它是一种多功能酶。维氏综合症是成年早老症, 40 岁后 50 岁前死于动脉粥样硬化心脏病, 病人常患 II 型糖尿病(老年糖尿病)、骨质疏松病等老年退行性疾病。其病因发现的意义在于是首次鉴定的人类与衰老有关的基因, 但维氏综合症是疾病, 并非正常人衰老。

2. “长寿基因”

近年研究表明, 长寿常与代谢能力及应激能力增强有关。对真菌、昆虫、蠕虫等生物的研究表明, 抗氧化酶类的缺乏可能是短寿的分子基础, 氧化还原酶类活性随增龄而降低的现象亦较为常见, 长寿种群常伴有丰富的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶。加州大学的学者若斯培养出了一种寿命几乎 2 倍于野生型的果蝇, 此种果蝇体脂与糖原储存较多, 含有活性很高的 SOD。从上述研究综合来看, 氧自由基似确有加速衰老的作用。目前已有因抗氧化酶类基因转移而使此种转基因动物寿命延长的初步报道。

Sohal 等学者将铜(Cu)、锌(Zn)、SOD(超氧化物歧化酶)与过氧化氢酶基因导入果蝇, 所得转基因株中 SOD 活性比野生型(未经转基因的果蝇)高 26%, 过氧化氢酶活性高 73%。转基因株不仅平均寿命延长 1/3, 最高寿限亦有所延长, 与增龄相关的脱氧核糖核酸(DNA)与蛋白质的氧化损伤现象减轻, 对 X 线照射的抵抗力增强, 代谢潜力增强了 30%。但在哺乳类动物如鼠类中, 转入 SOD 基因后, 不仅未见延长寿命, 相反有降低免疫力等副作用。可见哺乳类动物的衰老控制远较果蝇等生物复杂得多。

3. 环境因素对寿命的影响

内、外环境对衰老进程与寿限都有重要影响。环境可通过损伤、负荷、疾病等方式影响衰老进程。氧负荷对细胞衰老有深刻影响, 氧分子具有两重性, 既为生存必不可少, 又具潜在毒性, 对细胞的长期存活带来不利影响。线粒体中约有 1~4% 的氧分子转变为氧自由基。氧自由基可引起生物大分子广泛的氧化损伤, 导致蛋白质分子(如酶)的失活和降解; 氧自由基还会影响 DNA, 引起 DNA 碱基交换、单链断裂、姐妹染色体交换与蛋白质交联等现象。氧自由基引起 DNA 损伤是影响衰老进程的重要因素。

蛋白质和 DNA 等生物大分子可与葡萄糖缓慢非酶促结合而糖基化。这些糖基可逐渐氧化,进而使蛋白质、脂类与核酸广泛交联,形成脂褐质(老年斑);胶原与弹力蛋白等交联,使结缔组织与心肌僵硬,含水量下降,皮肤、肌腱、血管失去弹性。

多年来已知适度节食可延长多种动物的寿命,限食动物的体重可比普通动物轻 1/4。限食动物显得较为年轻,表现为组织对激素敏感性较高,胶原交联的现象较少,肝与肌肉的蛋白酶活性较高。热量限制使哺乳类动物的氧负荷降低,减少氧自由基的产生,使氧损伤减轻,衰老相关变化延缓,寿命延长。摄入热量超过最适量,会使动物寿命缩短,低于此适量则会发生营养不良、免疫功能低下,诱发疾病,威胁生命。限食的延寿作用在啮齿类动物中几经证实(可使小鼠延寿 1 倍),它不仅延寿,且使很多生理、生化与行为的衰老变化延缓。文献记载,啮齿类动物近 300 种与衰老相联系的变化,约 80~90%在限食后延缓,血糖与胰岛素浓度降低,胰岛素敏感性增高,体温降低,这些现象不仅见于啮齿类,在猿猴中也可见到。

脑、心、骨骼肌是氧负荷大、易发生与年龄相关退行性病变的组织,多数细胞呈不分裂状态,氧的累积损伤率较高。适度节食可延缓此种损伤,使代谢潜力增强。例如鸽的最高寿命为 30 年,而大鼠为 3~4 年,两者体重与代谢速率相似,但寿命却相差很大。原来鸽脑与心肌线粒体超氧阴离子与 H_2O_2 产

生较大鼠少,而 SOD 与谷胱甘肽过氧化物酶的活性较大鼠高。所以延寿的要点也许是具有较强的应激能力,特别是应付氧负荷的能力。因而抗氧化酶类基因似与衰老或长寿有关。

适度节食引起长寿的另一原因,可能因其使葡萄糖水平降低,延缓糖基化。过多葡萄糖可引起生物大分子的非酶促葡萄糖糖基化。近年报道给予褪黑素(melatonin)可使小鼠寿命延长 20%。褪黑素由松果体分泌,似与昼夜节律的调节有关,可抑制垂体分泌促性腺激素,并使黑色素细胞褪色;但它对人的寿命似无影响。节食还可能提高癌细胞凋亡,清除癌前细胞,降低癌发病率。

目前要确定人类的“长寿基因”或“衰老基因”还为时尚早,但不妨认为清除自由基的某些酶类基因及与细胞生长调控有关的某些基因与此有关。总之,遗传与环境因素都影响着衰老进程。

看来,衰老并非由单一基因决定,而是一连串基因激活和阻抑及各自产物相互作用的结果。DNA(特别是线粒体 DNA)并不像原先设想的那样稳定,包括基因在内的遗传控制体系可受内、外环境,特别是氧自由基等损伤因素的影响,加速衰老进程。因此,我们只要建立起健康的生活方式,如多食含维生素 E、C 等有助于清除自由基的食物,积极参加体育锻炼,维护心理健康,就能有助于延缓衰老、延长寿命,从这一意义看健康与长寿掌握在我们自己手里。(责任编辑 王宏章)

(上接第 23 页)

基础上,针对需要成果企业的具体情况进行判断、咨询服务,以帮助企业做出正确的决策,并不断地向企业提供市场、法规、金融等相关的最新信息,实现成果的彻底转化。只有这样,才能使中介机构成为企业与研究单位都信赖的伙伴,中介服务才能发展壮大。

5. 建立科技成果评估模式,确定合理的利益分配机制

成果转化过程中,供需双方都要面对如何确定科技成果价值大小的问题。目前的技术交易中的价格的确定,大都采取双方协商定价的方式,但事实上,由于双方对市场前景、合作条件、未来产生效果等理解不一样,往往造成价格与价值相偏离,使得日后出现、加深矛盾,影响成果的成功转化,甚至产生纠纷。因此,亟待建立一套规范的科技成果价格评估体系,保证双方的合理利益,促进成果顺利转化。笔者认为,科技成果是一种无形资产,可以根据现行的《国有资产评估管理办法》中的“收益现值法”为基本方法来评估,该方法的数学模型为:

$$X = \sum_{t=1}^n \frac{P_t}{(1+r_1)(1+r_2)\cdots(1+r_t)}$$

其中 X 为技术成果价值; n 为载体(如产品)因

技术成果增加收益的年限; P_t 为第 t 年载体因技术成果增加的收益; r 为折现率; t 为年序号。在求得 X 值的基础上,再根据双方的具体合作条件,做相应的调整后较为合理。

另外,还需强调一点,科技成果拥有者必须转变观念,明确科技成果只有通过转化,才能实现其价值;不要一味强调自身的利益,忽视了科技成果的时效性,丧失了成果转化的最佳时机,造成人力、物力的浪费。同时企业也应该明白,只有依靠科技转化应用新技术、新成果,才能增强自身在市场中的竞争能力,才能立于不败之地。

参考文献

- [1] 彭佩云. 在九届全国人大第六次会议上的讲话 1998. 12. 25
- [2] 于维栋. 转化是振兴经济的结合点. 科技日报, 1998. 5. 23
- [3] 王选. 中国人为什么做不了 Win95. 中国青年报, 1999. 1. 4
- [4] 肖汉平. 建立风险投资机制. 科技日报, 1998. 5. 23
- [5] 施祖麟, 韩岱峰. 美国风险投资业发展及促进高技术产业化的启示. 《科技导报》, 1998(11)
- [6] 成思危. “风险投资进入中国 98 高层研讨会”讲话 (责任编辑 肖庆山)