

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.002

IAP 家族抑制衰老的骨髓间充质干细胞的凋亡*

王珮琳 滕松松 崔 直 马春辉 俞银贤 易诚青[△]

(上海市第一人民医院 上海交通大学骨科 上海 200000)

摘要 目的:探讨衰老的大鼠骨髓间充质干细胞凋亡抗性是否增加且是否通过凋亡抑制蛋白(IAP)家族介导。**方法:**用 DMEM/F12 中加入 10%胎牛血清(FBS)的完全培养基培养大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)至第三代,使用 D-半乳糖(D-gal)诱导成衰老的 BMSC 并用 β -半乳糖苷酶染色做衰老鉴定。用肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和环己酰亚胺(CHX)共同处理正常对照组与衰老组的 BMSC,通过贴壁细胞计数统计其生存率,并通过蛋白印迹法检测两组细胞中 Cleaved PARP、Cleaved Caspase3 蛋白、IAP 家族成员 c-IAP1、c-IAP2、XIAP 以及衰老相关标志蛋白的水平。再用 IAP 抑制剂 AT-406 处理衰老的细胞,CCK-8 检测处理组以及未处理组细胞的细胞活力。最后用凋亡抑制剂 z-VAD-fmk 和 AT-406 共同处理正常对照组与衰老组细胞,观察 z-VAD-fmk 能否减少 IAP 蛋白被抑制后所引起的细胞死亡。**结果:**与正常对照组相比,衰老的 BMSC 中由 TNF- α 和 CHX 共同诱导引起的细胞死亡数明显减少,凋亡标志物 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase3 蛋白的水平降低,而 IAP 家族成员 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 的蛋白水平升高。用 AT-406 处理衰老 BMSC 后细胞的死亡数明显高于未处理的衰老 BMSC 组,通过 z-VAD-fmk 抑制凋亡通路后,AT-406 处理的衰老细胞的死亡数减少。**结论:**衰老 BMSC 通过升高 IAP 家族蛋白水平从而提高对凋亡的抵抗能力。

关键词:衰老;抗凋亡;IAP;AT-406**中图分类号:**R-33; R331.2; Q255 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3006-07

IAP Family Inhibits the Apoptosis of Senile Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*

WANG Pei-lin, TENG Song-song, CUI Zhi, MA Chun-hui, YU Yin-xian, YI Cheng-qing[△]

(Department of Orthopaedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether the ability to resist apoptosis in senile bone marrow mesenchymal stem cells is increased, and the mechanism is via increasing apoptosis-inhibiting protein (IAP) family expression. **Methods:** Rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) were cultured in complete medium supplemented with 10% FBS in DMEM/F12 to the third passage, followed by D-galactose (D-gal) to induce BMSC senescence and use β -Galactinase staining was used for aging identification. After normal BMSC and senile BMSC were treated with tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and cycloheximide (CHX), the survival rate was analyzed by adherent cell count, and the expressions of Cleaved PARP, Cleaved Caspase3, c-IAP1, c-IAP2, XIAP and senescence-associated marker protein were detected by Western blotting. Then, the senile BMSC were treated with the IAP family genes inhibitor AT-406, and CCK-8 was used to examine the cell viability of treated and non-treated groups. Finally, the apoptosis inhibitor z-VAD-fmk and AT-406 were co-treated normal and senile BMSC to observe whether z-VAD-fmk reduce the number of dead cells caused by inhibiting apoptosis-inhibiting protein (IAP) family. **Results:** Compared with normal BMSC, the number of dead cells induced by TNF- α and CHX was significantly lower in senile BMSC, and the expressions of Cleaved PARP and Cleaved Caspase3 were also lower. Conversely, the expressions of c-IAP1, c-IAP2 and XIAP in aging BMSC were obviously higher than normal group. In addition, the number of dead senescent cells was significantly higher in AT-406-treated senile BMSC than non-treated senile BMSC. Finally, the number of dead cells in AT-406-treated senile BMSC declined after using z-VAD-fmk. **Conclusion:** Aging BMSCs can resist apoptosis via increasing the apoptosis-inhibiting protein (IAP) family expression.

Key words: Senescence; Anti-apoptosis; IAP; AT-406**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R331.2; Q255 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)16-3006-07

前言

细胞衰老是一种细胞周期停滞、增殖潜力受限的稳定状

态,通常是为了响应各种形式的细胞应激而引发^[1]。尽管细胞衰老能够有效防止肿瘤癌前病变的持续恶化,但衰老细胞的长期存在似乎对周围组织有害^[2]。这些衰老细胞通常能够分泌促炎

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371979)

作者简介:王珮琳(1989-),硕士研究生,主要研究方向:骨关节与运动医学,E-mail:palinwang@126.com

[△] 通讯作者:易诚青(1974-),硕士生导师,教授,主要研究方向:骨关节与运动医学,E-mail:chengqing.yi@shgh.cn,电话:15316954091

(收稿日期:2019-02-06 接受日期:2019-03-02)

因子、趋化因子、生长因子和基质重塑酶等一系列细胞因子,统称为衰老相关分泌表型(SASP)^[3]。SASP能够影响细胞微环境,其在应激刺激发生的早期或伤口愈合等急性状态下可能是有益的,但持续存在的SASP却能够促进局部的慢性炎症、组织老化破坏以及加速周围细胞衰老等负面作用^[4-7]。然而,与细胞凋亡不同,衰老细胞能够长期存活并随着机体年龄的增长而积累,因此这些持续存在的衰老细胞被认为是导致年龄相关性疾病发生的重要因素之一^[8-10]。

据报道,衰老细胞对外源性和内源性促凋亡刺激均有抵抗能力,且均较正常细胞有所升高^[1]。虽然目前关于驱动细胞衰老的机制研究较多,但对衰老细胞凋亡抗性升高的理解仍然十分有限。之前有研究在基因编码的INK-ATTAC小鼠体内清除衰老细胞后能够延缓年龄相关性疾病的进展^[12],并延长老年小鼠的寿命^[13]。但通过调节基因来清除衰老细胞的研究还很少。凋亡抑制蛋白(IAP)是一种广泛存在且高度保守的抗凋亡蛋白,能够通过多种机制(包括细胞凋亡与自噬)在细胞死亡的过程中发挥重要作用^[14,15]。为了检测其主要成员c-IAP1、c-IAP2和XIAP对衰老细胞凋亡抗性的影响,我们使用其抑制剂AT-406来抑制三种基因的表达,并观察衰老细胞的存活情况。由此我们研究是否能够通过抑制该基因来清除衰老细胞,为治疗年龄相关性疾病提供新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的SD大鼠由上海交通大学附属第一人民医院动物实验中心购买。DMEM/F12培养基、胎牛血清,双抗购自美国Gibco公司。TNF- α 和CHX购自美国Sigma公司。c-IAP1抗体、Cleaved PARP抗体、Cleaved Caspase3抗体、P16抗体、P21抗体、P53抗体和 β -actin抗体购自美国CST公司,c-IAP2和XIAP抗体购自英国abcam公司。AT-406和z-VAD-fmk购自中国MCE公司。

1.2 大鼠原代BMSCs的分离培养

取4周龄80-100 g的雄性SD大鼠,麻醉处死后,用75%酒精浸泡5 min,无菌条件下分离出大鼠双下肢的股骨和胫骨,剔去周围软组织,保留完整股骨和胫骨,并放入灭菌的PBS缓冲液中。用灭菌后的PBS缓冲液将股骨和胫骨冲洗三遍,转入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基的培养皿中。剪去两侧干骺端,暴露骨髓腔,使用1 mL注射器抽取培养基反复冲洗骨髓腔,直至骨髓腔内所有骨髓冲净。将混有骨髓冲洗液的培养基转移至15 mL离心管中,12000 r/min离心3 min,舍弃上清,用培养基反复吹打沉淀制成单细胞悬液,将此悬液接种于10 cm的培养皿中,置于37℃、5%二氧化碳的细胞培养箱内培养。48 h后首次换液,以后每三天换一次液,倒置显微镜下每天观察细胞形态。

1.3 细胞培养

将BMSCs接种于直径10 cm的培养皿中(89%DMEM/F12培养基,10%胎牛血清,1%双抗),放置于37℃,含体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱中培养,每隔三天换一次液。细胞密度约90%时用0.25%胰蛋白酶消化,并重悬于

直径10 cm培养皿里,传代至第三代开始实验。

1.4 CCK-8试剂盒检测细胞增殖活力

用96孔板重悬细胞,每孔100 μ L细胞悬液,约10000个细胞,用不同浓度(1,5,10,50,100 μ M)D-gal提前处理不同时间(24,48,72 h),到达预定时间后每孔加入10 μ L CCK-8溶液,于2 h后在酶标仪下测定吸光度。

1.5 β -半乳糖苷酶染色

将细胞接种于六孔板中,细胞密度达到70%后可开始实验。在药物处理后,清除细胞培养基,用PBS清洗一遍,加入1 mL固定液,室温固定15 min。之后清除固定液,再用PBS清洗三遍,每孔加入1 mL工作液,放置于37℃温箱中孵育过夜。12 h后清除工作液,再用PBS清洗三遍,将6孔板置于普通光学显微镜下,随机选取6个视野,统计衰老细胞比例。

1.6 Western blot 蛋白印迹分析

将正常组与衰老组细胞培养皿置于冰上,吸出培养基,加入蛋白裂解液后提取各组细胞总蛋白,然后使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白用10%SDS-PAGE凝胶电泳,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,然后将膜在PBST缓冲液中的5%脱脂奶中在室温下温育1小时,并在具有特异性一抗的摇床上于4℃温育过夜。12 h后用TBST洗涤膜,然后在室温下与二抗一起温育1小时。再用TBST洗涤三次后,使用化学发光试剂盒检测信号条带。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

将细胞以 5×10^5 /mL的密度接种在六孔板中,分为三组,一组为对照组,余下两组为衰老组。两个衰老组细胞通过D-gal诱导衰老,其中一组用IAP基因的小分子抑制剂AT-406(10 μ M)处理48小时,另一组在添加AT-406之前4小时将z-VAD-fmk以100 mM的浓度添加至细胞培养基中。然后收取三组细胞,用冷PBS洗涤两次,并重悬于 $1 \times$ 结合缓冲液中。使用Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences, Mountain View, CA, USA)将细胞与膜联蛋白V-FITC和PI在室温下在黑暗中孵育15分钟后上机检测。

1.8 统计学分析

采用GraphPad prism 5绘制柱状图,采用SPSS 21.0统计学软件对数据进行统计分析,数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。多组之间采用单因素方差分析,两组之间采用t检验。认为是 $P < 0.05$ 是统计显著性的标准。

2 结果

2.1 D-gal 诱导骨髓间充质干细胞衰老

为了诱导正常骨髓间充质干细胞(BMSCs)达到衰老状态,我们使用不同剂量D-gal诱导BMSCs,并在处理不同时间后用CCK-8检测细胞活力。我们发现D-gal以时间和剂量依赖性方式抑制细胞生长,根据IC₅₀数值和明显的下降趋势(见图1A),在随后的实验中我们使用10 g/L诱导BMSCs 48 h达到衰老状态。为了确认诱导细胞处于衰老状态,我们使用SA-b-gal染色,发现与正常组细胞相比,衰老组中SA-b-gal阳性细胞比例明显增加(衰老组76.2%,正常组23.6%,见图1B)。实验结果表明D-gal在10 g/L浓度下诱导48 h能够使正常BMSCs达到衰老状态。

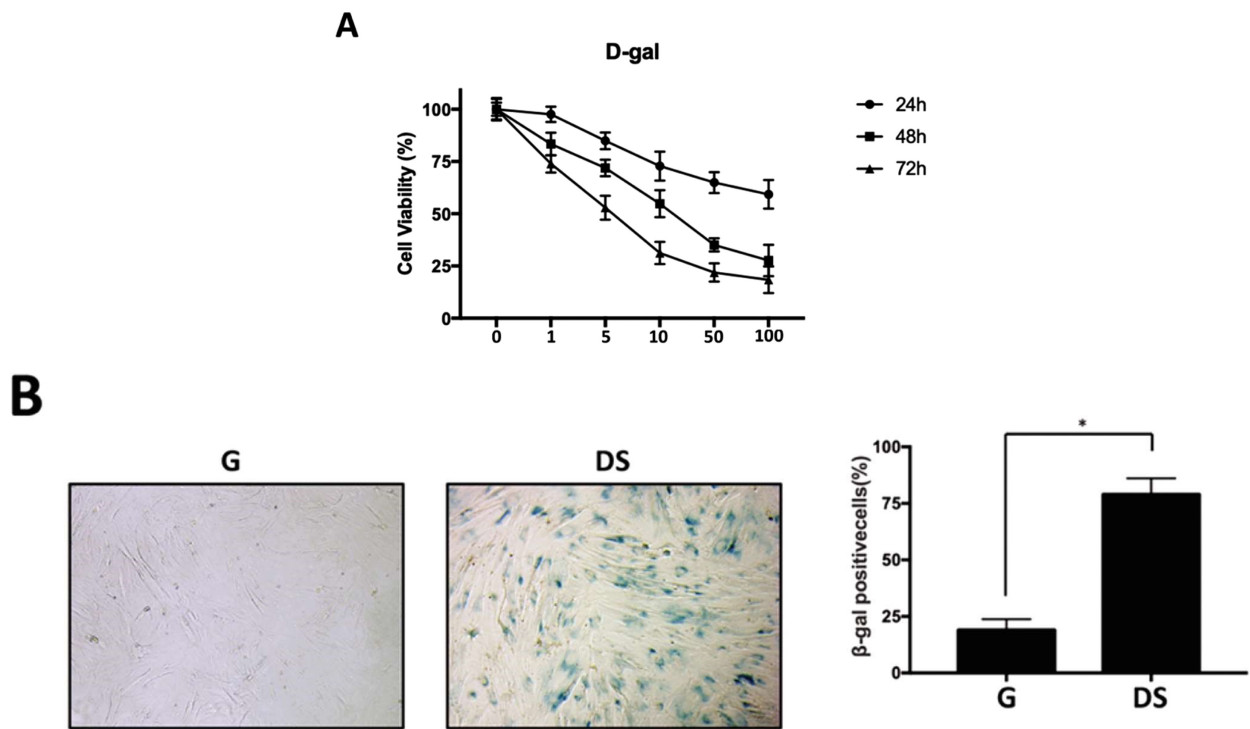


图1 D-gal 诱导骨髓间充质干细胞衰老 (A)通过 CCK8 检测 D-gal 对大鼠 BMSCs 活力的影响。

(B)对照组和 D-gal 诱导衰老组的β- 半乳糖苷酶染色及定量。

Fig.1 D-gal induces bone marrow mesenchymal stem cell senescence.

(A) Effects of D-gal on the viability of BMSCs was detected by CCK8 assays. (B) Quantification of SA-b-gal-positive cells.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=6. * $P < 0.05$, compared with Control group.

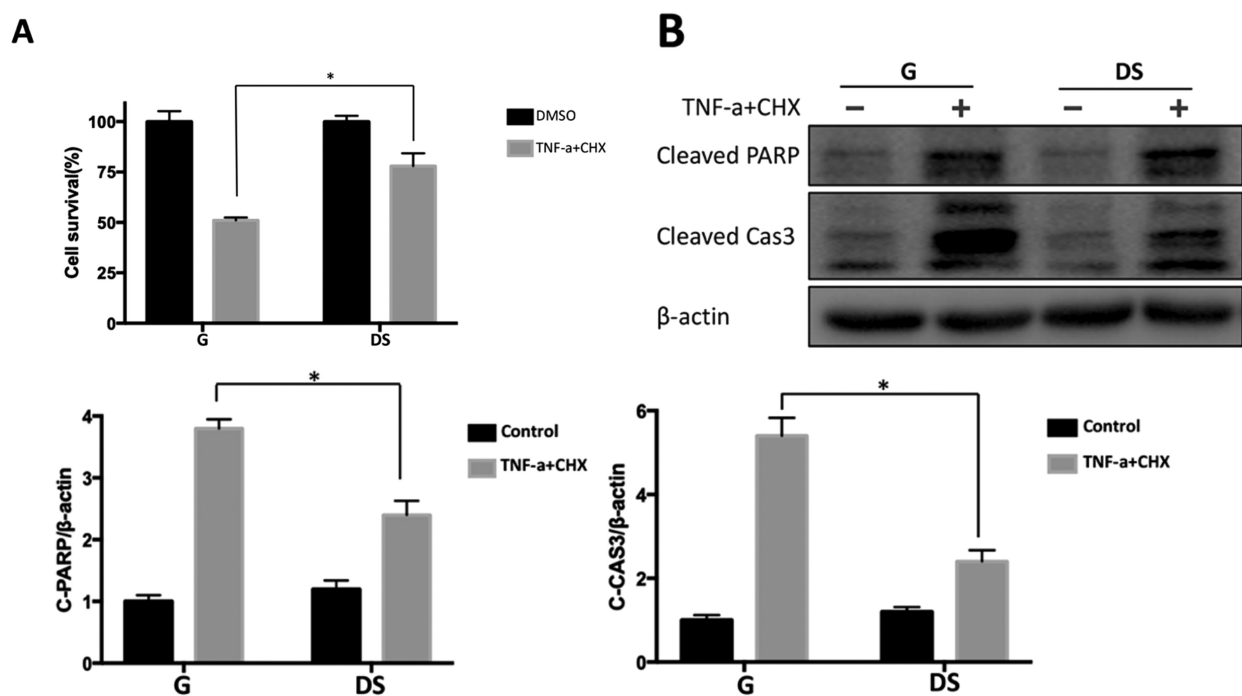


图2 D-gal 诱导的衰老细胞凋亡抗性升高。(A)用 TNF-α 和 CHX(TNF-α+ CHX)或溶液载体(DMSO)共同处理 D-gal 诱导的衰老组细胞(DS)和正常增殖的对照组细胞(G)10 小时。通过定量剩余贴壁细胞的数量来确定衰老组细胞相对于对照组细胞的存活率。(B)通过 Western 印迹分析衰老组和对照组细胞中剪切的 PARP 和剪切的 Caspase3 蛋白的表达,表明用 TNF-α 和 CHX 处理后两组细胞的凋亡水平。

Fig.2 D-gal-induced increased apoptosis resistance in senescent cells. (A) Rat BMSCs that were induced to senescence through D-gal induction (DS) and control proliferating cells (growing, G) were treated with TNF-α and CHX (TNF-α+CHX) or vehicle (DMSO) for 10h. Determination of survival relative to vehicle-treated cells by quantifying remaining adherent cells. (B) The cleavage of PARP and caspase-3 protein expression by senescent cells and control cells was analyzed by Western blot, indicating the level of apoptosis after treatment with TNF-α and CHX.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=3. * $P < 0.05$, compared with Control group.

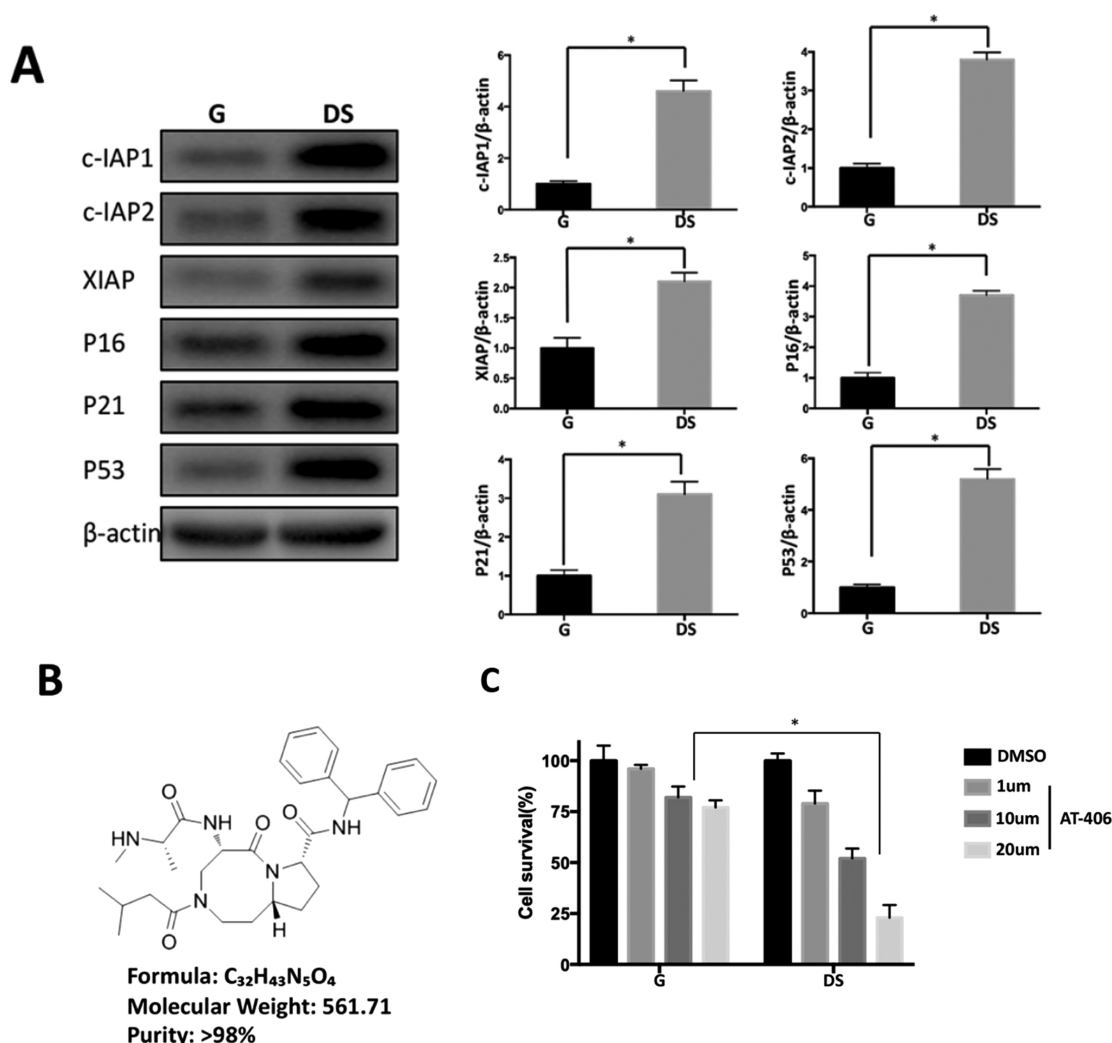


图3 D-gal 诱导的衰老细胞中 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 表达升高。(A)通过 Western 印迹分析 IAP 基因家族成员(c-IAP1,c-IAP2 和 XIAP)和衰老标志蛋白(p16,p21,p53)在衰老(DS)和对照(G)组细胞中的表达。(B)AT-406 的分子结构。(C)用指定浓度的 AT-406(c-IAP1,c-IAP2 和 XIAP 的抑制剂)处理 48 小时后衰老和对照组细胞的存活百分比。

Fig.3 Increased expression of c-IAP1, c-IAP2 and XIAP in senescent cells induced by D-gal.

(A) Western blot analysis of IAP family members (c-IAP1, c-IAP2 and XIAP) and senescence effector proteins (p16, p21, p53) expression in senescence (DS) and control (G) BMSC. (B) The molecular structure of AT-406. (C) Percent survival of senescent and control cells after 48 hours of treatment with the indicated concentrations of AT-406 (inhibitors of c-IAP1, c-IAP2 and XIAP).

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with Control group.

2.2 D-gal 诱导的衰老细胞凋亡抗性升高

为了检测衰老细胞凋亡抗性是否升高,在确定处理组细胞处于老化状态后,用肿瘤坏死因子($TNF-\alpha$)和环己酰亚胺(CHX)处理正常组和衰老组细胞以诱导细胞凋亡^[11,16]。结果显示在 $TNF-\alpha$ 和 CHX 处理后衰老细胞的存活率显著高于正常组细胞(衰老组 74.8%,正常组 50.1%,见图 2A),并且凋亡标志基因 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase3 也同样证实衰老细胞中凋亡减少,差异具有统计学意义($P<0.05$,见图 2B)。表明在衰老细胞中凋亡抗性升高。

2.3 D-gal 诱导的衰老细胞中 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 表达升高

我们假设抗凋亡蛋白水平的增加是衰老细胞对细胞凋亡抵抗的原因。凋亡抑制蛋白(IAP)是一种广泛存在于生物体内的抗凋亡蛋白,具有高度保守的特性^[7]。我们检测了衰老组和正常组细胞中抗凋亡蛋白 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 的表达水

平,结果显示在衰老组细胞中,抗凋亡蛋白 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 表达较正常组明显升高,且差异具有统计学意义($P<0.05$,见图 3A)。鉴于观察到衰老细胞中三种 IAP 家族基因表达的一致升高,我们使用 AT-406(一种有效的 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 的小分子抑制剂)来抑制这些基因,并观察抑制这些基因对细胞存活的影响(见图 3B)。结果显示在衰老组细胞中对于 AT-406 的处理更为敏感,其细胞生存率明显低于正常组细胞,且与 AT-406 有浓度依赖性降低,差异具有统计学意义(衰老组 10 μ M 浓度下 51.7%,正常组 10 μ M 浓度下 77.3%, $P<0.05$,见图 3C)。表明衰老细胞中 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 表达升高,并为衰老细胞提供凋亡抗性。

2.4 AT-406 诱导衰老细胞凋亡

为了确定 AT-406 是否通过凋亡途径诱导衰老细胞的死亡,我们使用凋亡途径抑制剂(泛半胱天冬酶抑制剂)

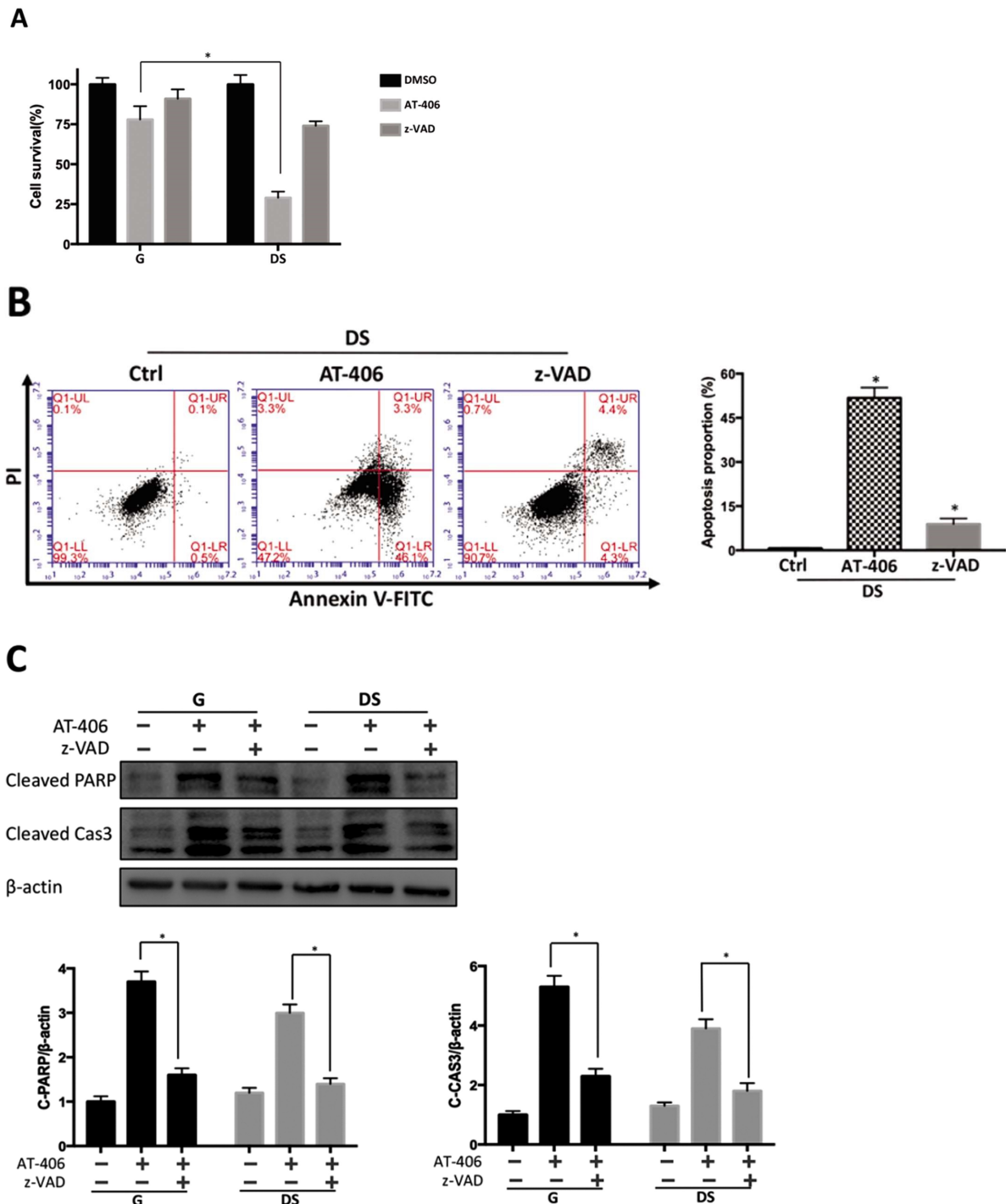


图4 AT-406 诱导衰老细胞凋亡。(A)在用或不用泛半胱天冬酶抑制剂 z-VAD-fmk 预处理 6 小时的情况下,使用 AT-406(10 μ M)处理衰老组和对照组细胞 48 小时。通过定量剩余贴壁细胞的数量来确定衰老组细胞相对于对照组细胞的存活率。(B)用 AT-406 联合 z-VAD-fmk 或 AT-406 单独处理衰老组细胞,并使用膜联蛋白 V-FITC / PI 流式细胞术分析。(C)通过 Western 蛋白印迹分析 A 中所描述的各处理组中剪切的 PARP 和剪切的 Caspase3 蛋白的表达。

Fig.4 AT-406 induces apoptosis in senescent cells. (A) Percentage survival of senescent (DS) and control (G) cells treated with AT-406 (10 μ M) for 48 h with or without pretreatment for 6 h with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk. (B) The senescent cells were treated with AT-406 in the presence or absence of z-VAD-fmk and analyzed using Annexin V-FITC/PI flow cytometry. (C) Western blot analysis of cleaved PARP and caspase-3 in the samples described in A.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=3. * $P < 0.05$, compared with Control group.

z-VAD-fmk 与 AT-406 联合处理正常组和衰老组细胞。结果显示经过 z-VAD-fmk 和 AT-406 联合处理的衰老细胞存活率明显高于 AT-406 处理的衰老细胞,差异具有统计学意义(联合处理后 73.8 %,单独 AT-406 处理后 27.5 %, $P < 0.05$, 见图 4A)。同

时,我们使用流式细胞仪检测两组细胞凋亡水平得到了相同的结果(见图 4B)。说明 z-VAD-fmk 几乎完全阻止 AT-406 对衰老细胞的清除作用。接下来我们检测了凋亡标志基因 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase3 的表达水平,发现联合处理的衰老

细胞组中的凋亡标志基因比 AT-406 处理的衰老细胞组表达水平明显降低,且差异具有统计学意义($P<0.05$,见图 4C)。这些实验结果验证了 AT-406 诱导衰老细胞的死亡的确是通过诱导凋亡途径来实现。

3 讨论

随着社会人口老龄化的加剧,衰老的生物学基础及其相关分子机制的研究已为一个重要的研究方向^[18]。在健康个体中,身体能够利用各种系统来帮助预防外界损伤和修复受损细胞。然而,这些预防和修复系统在老化期间逐渐变弱,导致生物体变得更容易受到外界各种有害刺激的影响从而产生各种疾病^[19]。细胞衰老是一种细胞周期停滞的稳定状态,其增殖潜力受各种应激反应的限制^[20]。随着年龄的增长衰老细胞在许多脊椎动物组织中积累,这些组织可能导致衰老相关分泌表型(SASP)的分泌^[21,22],而我们的实验结果表明,IAP 基因的激活为衰老细胞提供了凋亡抗性,并且为衰老细胞在组织中的积累提供支持,这可能会诱发许多衰老相关的疾病,如糖尿病、骨质疏松、骨关节炎以及阿尔茨海默症等等。在最近的一项研究中发现,在骨关节炎病变附近存在衰老细胞^[22],而移植后的衰老细胞也同样能够在正常小鼠体内诱导出骨关节炎样病变^[24]。另外,已经证实,在老龄小鼠体内清除衰老细胞有助于恢复老龄小鼠的各项生理功能,延缓小鼠年龄相关性疾病的进展以及延长老年小鼠的生存期^[12,13]。

鉴于衰老细胞对机体的多种负面作用,清除衰老细胞逐渐成为治疗年龄相关性疾病新的方向^[25]。因此,研究衰老细胞在体内长期存在的机制是我们这次实验的目的。在这项研究中,我们发现在 D-gal 诱导的衰老细胞中,其对凋亡的抵抗能力有所升高,这之前实验中观察到的衰老细胞中凋亡抗性增加相一致^[26,27]。凋亡抑制蛋白(IAP)是一类与细胞死亡密切相关的抗凋亡蛋白,主要通过阻断半胱天冬酶激活或减弱其活性来抑制细胞凋亡。最近的研究表明,c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 能够泛素化它们的底物来调节先天免疫系统受体的信号传导^[28]。因此,这些 IAP 基因能够作用于细胞死亡和炎症的途径的交叉点^[29]。在这里我们研究 IAP 基因与衰老细胞凋亡抗性之间的关系,我们发现 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 是维持衰老细胞存活关键蛋白,但是这些蛋白是通过增加转录而上调还是通过翻译方面来调节仍未可知^[30]。之前有实验证明 IAP 基因的升高与 NF- κ B 信号通路的激活有直接关系^[31,32],而衰老细胞中 NF- κ B 信号通路受各种刺激因素的影响而激活,如 ROS、DNA 损伤以及紫外线照射等,因此衰老细胞中 IAP 基因的升高可能与 NF- κ B 通路的激活密切相关^[33]。我们研究发现,当我们抑制这些基因时,衰老细胞死亡率明显高于正常细胞,并且在抑制凋亡途径后,衰老细胞的死亡情况有部分缓解,因此我们的实验数据说明 IAP 作为凋亡抑制基因在衰老细胞中能够为其提供对细胞凋亡的抵抗能力。然而 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 三者对于衰老细胞凋亡抗性的个体作用仍未可知,虽然先前有试验说明 c-IAP1、c-IAP2 和 XIAP 在细胞凋亡方面有相辅相成的互相作用^[34],但在衰老细胞中是某一基因起主要作用、还是两两相互作用、或是三者联合作用,仍需要进一步试验来证明。但在我们的实验中,当使用凋亡途径抑制剂 z-VAD-fmk 与 AT-406 共同作用时,仅

能部分恢复衰老细胞的死亡,说明抑制 IAP 诱导衰老细胞的死亡并非完全通过凋亡途径,因此可能还存在其他途径导致衰老细胞的死亡。由于近期有研究证明 IAP 家族基因能够调控自噬过程中的自噬溶酶体的产生过程,我们猜想是否抑制 IAP 家族基因后导致自噬溶酶体生成障碍,从而引起自噬过程的下流阻滞,使衰老细胞无法通过自噬途径进行修复,并联合凋亡途径导致衰老细胞的死亡,但该猜想仍需进一步相关实验来证明^[35,15]。

衰老细胞能够分泌多种蛋白质,统称为衰老相关的分泌表型(SASP),包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 以及基质金属蛋白酶(MMPs)等等,这些蛋白质可以旁分泌方式诱导周围组织及细胞衰老^[36,37],并刺激机体产生慢性炎症进而诱导年龄相关性疾病的发生^[38,39]。故而通过清除衰老细胞来治疗年龄相关疾病成为目前新的研究方向,Jeon, O. H. 等人利用 INK-ATTAC 编码基因小鼠清除衰老细胞有效延缓了骨关节炎的进展并为细胞修复提供了微环境^[40],并且 Ogrodnik, M.等人利用同样的方法清除衰老细胞延缓了基因编码小鼠体内肝脏的脂肪变性^[41]。同样,Bussian, T. J.等人也在 INK-ATTAC 编码小鼠中清除衰老细胞成功延缓了老年小鼠认知能力的下降,并有望成为治疗阿尔茨海默症的有效方法^[42]。而在非编码小鼠体内,目前仅有研究证实 Bcl-2 家族基因因其能够为衰老细胞提供凋亡抗性的能力而成为相关治疗靶点^[11,43]。因此,我们进一步研究了造成衰老细胞凋亡抗性升高的原因,并确定了 IAP 家族基因同样也能够为衰老细胞提供凋亡抵抗的能力,而利用该家族基因来清除衰老细胞的相关机制以及能否使之成为治疗衰老相关性疾病的靶点仍需进一步试验来探讨。

综上所述,我们研究发现衰老细胞中对细胞凋亡的抵抗能力有所增加,而 IAP 家族基因是为衰老细胞提供抗凋亡能力的关键基因之一,并且在抑制 IAP 家族基因后能够使衰老细胞死亡。而衰老细胞的死亡能够为机体修复创造新的微环境并能够有效延缓年龄相关疾病的进展。因此,抑制该基因来清除衰老细胞有望为治疗年龄相关疾病提供新的策略与方法。

参考文献(References)

- [1] Salama R, Sadaie M, Hoare M, et al. Cellular senescence and its effector programs[J]. *Genes & development*, 2014, 28(2): 99-114
- [2] Sagiv A, Krizhanovsky V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program [J]. *Biogerontology*, 2013, 14 (6): 617-628
- [3] Coppe JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor[J]. *PLoS biology*, 2008, 6(12): 2853- 2868
- [4] Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer[J]. *Annual review of physiology*, 2013, 75: 685-705
- [5] Ovadya Y, Krizhanovsky V. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies[J]. *Biogerontology*, 2014, 15 (6): 627-642
- [6] Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(21): 12072-12077
- [7] Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of

- PDGF-AA[J]. Developmental cell, 2014, 31(6): 722-733
- [8] Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging[J]. The Journal of clinical investigation, 2004, 114(9): 1299-1307
- [9] de Keizer PL. The Fountain of Youth by Targeting Senescent Cells [J]. Trends in molecular medicine, 2017, 23(1): 6-17
- [10] van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing [J]. Nature, 2014, 509(7501): 439-446
- [11] Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL [J]. Nature communications, 2016, 7: 11190
- [12] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders[J]. Nature, 2011, 479(7372): 232-236
- [13] Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age [J]. Nature medicine, 2018, 24 (8): 1246-1256
- [14] Vince JE, Wong WW, Khan N, et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis[J]. Cell, 2007, 131(4): 682-693
- [15] Ebner P, Poetsch I, Deszcz L, et al. The IAP family member BRUCE regulates autophagosome-lysosome fusion [J]. Nature communications, 2018, 9(1): 599
- [16] Nolop KB, Ryan US. Enhancement of tumor necrosis factor-induced endothelial cell injury by cycloheximide [J]. The American journal of physiology, 1990, 259(2 Pt 1): L123-129
- [17] Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins[J]. Cell cycle, 2008, 7(8): 1036-1046
- [18] He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease[J]. Cell, 2017, 169(6): 1000-1011
- [19] von Kobbe C. Cellular senescence: a view throughout organismal life [J]. Cellular and molecular life sciences, 2018, 75(19): 3553-3567
- [20] Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How [J]. Wounds: a compendium of clinical research and practice, 2017, 29 (6): 168-174
- [21] Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities [J]. The Journal of clinical investigation, 2013, 123(3): 966-972
- [22] Childs BG, Durik M, Baker DJ, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy [J]. Nature medicine, 2015, 21(12): 1424-1435
- [23] Hou A, Chen P, Tang H, et al. Cellular senescence in osteoarthritis and anti-aging strategies[J]. Mechanisms of ageing and development, 2018, 175: 83-87
- [24] Xu M, Bradley EW, Weivoda MM, et al. Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice [J]. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences, 2017, 72(6): 780-785
- [25] Kirkland JL, Tchkonia T. Cellular Senescence: A Translational Perspective[J]. EBioMedicine, 2017, 21: 21-28
- [26] Salminen A, Ojala J, Kaamiranta K. Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process [J]. Cellular and molecular life sciences, 2011, 68(6): 1021-1031
- [27] Tower J. Programmed cell death in aging [J]. Ageing research reviews, 2015, 23(Pt A): 90-100
- [28] Sharma S, Kaufmann T, Biswas S. Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation [J]. Immunology and cell biology, 2017, 95(3): 236-243
- [29] Lalaoui N, Vaux DL. Recent advances in understanding inhibitor of apoptosis proteins[J]. F1000Research, 2018, 7
- [30] Silke J, Vince J. IAPs and Cell Death [J]. Current topics in microbiology and immunology, 2017, 403: 95-117
- [31] Rada M, Nallanthighal S, Cha J, et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) mediate collagen type XI alpha 1-driven cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(35): 4809-4820
- [32] Yang C, Wang H, Zhang B, et al. LCL161 increases paclitaxel-induced apoptosis by degrading cIAP1 and cIAP2 in NSCLC [J]. Journal of experimental & clinical cancer research, 2016, CR 35(1): 158
- [33] Osorio FG, Lopez-Otin C, Freije JM. NF- κ B in premature aging[J]. Aging, 2012, 4(11): 726-727
- [34] Chirieleison SM, Rathkey JK, Abbott DW. Unique BIR domain sets determine inhibitor of apoptosis protein-driven cell death and NOD2 complex signal specificity[J]. Science signaling, 2018, 11(539)
- [35] Gradzka S, Thomas OS, Kretz O, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are required for effective fusion of autophagosomes with lysosomes [J]. Cell death & disease, 2018, 9(5): 529
- [36] Wei W, Ji S. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity[J]. Journal of cellular physiology, 2018, 233(12): 9121-9135
- [37] Ogrodnik M, Salmonowicz H, Gladyshev VN. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells[J]. Aging cell, 2018, e12841
- [38] McCulloch K, Litherland GJ, Rai TS. Cellular senescence in osteoarthritis pathology[J]. Aging cell, 2017, 16(2): 210-218
- [39] Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing [J]. Nature reviews Drug discovery, 2017, 16(10): 718-735
- [40] Jeon OH, Kim C, Laberge RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment[J]. Nature medicine, 2017, 23 (6): 775-781
- [41] Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonia T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis [J]. Nature communications, 2017, 8: 15691
- [42] Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, et al. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline [J]. Nature, 2018, 562(7728): 578-582
- [43] Chang J, Wang Y, Shao L, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice[J]. Nature medicine, 2016, 22(1): 78-83