

酵母细胞自然衰老分子作用机理的研究进展*

张家琪^{1, 2)} 谈金崱¹⁾ 左 晓¹⁾ 李 彬¹⁾ 吕兆霞¹⁾ 赵瑞璞¹⁾ 万亚坤^{1)**}

⁽¹⁾ 东南大学生命科学研究院“发育与疾病相关基因”教育部重点实验室, 南京 210000;

⁽²⁾ Department of Life Sciences, HAN University, Nijmegen NL 6503 GL, Netherlands)

摘要 衰老是任何生物都无法避免的生理现象,它由多种因素引起,其过程极其复杂。酵母细胞是目前衰老研究领域公认的模式生物,一系列影响衰老的分子作用机理及调控因素的发现均源自于对酵母细胞的研究。自然衰老是酵母细胞的衰老模式之一,由于该衰老过程与其他高等真核细胞(特别是哺乳动物细胞)极为相似,近年来受到广泛关注。全面比较酵母细胞衰老的两种模式,详细介绍自然衰老过程中分子作用机理的研究进展,重点阐述其复杂的自然寿命调控通路,包括卡路里限制以及药物添加对 Ras/PKA、Sch9、Tor 等营养依赖型调控通路的影响,并展望未来该领域需要解决的重要科学问题,为全面深入了解高等生物,特别是人类自身的衰老机理提供参考。

关键词 酵母, 自然衰老, 自然衰老调控通路, 营养依赖型调控通路

学科分类号 Q498.4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00298

衰老是分子、细胞与器官损伤不断积累的生理现象,它能够导致机体相关功能的丧失并使其更容易遭受疾病的侵袭,以至于最终走向死亡^[1]。健康与长寿是生命科学永恒的主题,人类探索衰老机理的脚步也从未停止。尽管衰老过程极为复杂,研究人员还是从较为简单的酵母细胞着手,逐步揭开了细胞衰老的神秘面纱。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)早在 1959 年就被作为衰老研究的模式生物,由于其细胞繁殖快、遗传操作简单,并存在很多与哺乳动物细胞相似的保守生化机制,其研究成果在相关生物学研究领域一直处于领先地位^[2]。相比于其他模式生物系统,酵母的寿命也可以通过更为简单、迅速且精确的方法进行测定^[3]。近年来的相关研究工作已取得许多令人鼓舞的重大科研进展,一系列分子作用机理及影响衰老因素的确定均源自于对酵母的深入研究。毫无疑问,在酵母等单细胞真核生物中确立一些衰老或者长寿的遗传标记,将有助于我们解读哺乳动物包括人类的衰老进程。

迄今为止,在酵母中已确立的衰老模式有两种,分别为复制型衰老(replicative ageing)和自然衰老(chronological ageing)。这两种衰老模式在生物定义、培养方式、检测方法、细胞衰老损伤组分以及

与之相关的作用通路上,均存在很大的不同,但同时两者又互有关联^[4]。本综述首先比较两种衰老模式,随后重点介绍其中一种衰老模式,即自然衰老,并从诸多方面,特别是新近发现并已经得到可靠证实的多条自然寿命调控通路,详细阐述酵母细胞自然衰老的分子作用机理,并展望未来该领域需要解决的重要科学问题。

1 复制型衰老与自然衰老

酵母细胞的衰老分为两类,即复制型衰老,又称作出芽型衰老(budding ageing)^[5],以及自然衰老。复制型衰老发生在有丝分裂活跃的酵母细胞中。在芽殖酵母中,处于分裂期的母细胞会产出子细胞,母细胞的寿命由衰老前(即无法再次分裂前)所产生的子细胞数量决定,子细胞数量越多,则复制型寿命(replicative life span, RLS)越长。用于复制型衰老研究的酵母细胞一般生长在固体培养基中^[6]。通过显微操作可以将长出的子细胞摘除,并

* 国家自然科学基金面上项目(31071146)和东南大学优秀青年教师(教学)科研计划资助项目(3231001201)。

** 通讯联系人。

Tel: 025-83272314, E-mail: wanyakun2002@hotmail.com

收稿日期: 2010-05-31, 接受日期: 2010-08-23

统计在母细胞失去产生子细胞能力前总共产生的子细胞数目^[6], 藉此测定母细胞的复制型寿命. 在复制过程中, 健康的母细胞会保留绝大部分衰老造成的损伤, 不会遗传给后代. 换言之, 这种不对称的遗传将导致母细胞内衰老损伤不断累积, 最终引起细胞老化. 而新生成的子细胞则具有全新的复制能力(full replicative capacity), 当母细胞复制型寿命接近极限时, 早期产生的子细胞的衰老损伤才开始显现^[3]. 在有关衰老损伤机理的探索中, 对母细胞所产生的特异性染色体外 rDNA 环(extrachromosomal rDNA circle, ERC)的研究是最为深入的^[6]. ERC 由临近的 rDNA 重复序列通过同源重组产生. 由于这种可以自助复制的环状 DNA 缺乏着丝粒序列, 因此在细胞分裂过程中无法附着到纺锤丝上, 只能与核孔附着结合, 残留在母细胞核内. 负责调控 rDNA 重组以及 ERC 形成的蛋白质同样影响着复制型寿命, 例如, Sir2(silence information regulator 2)作为一种组蛋白去乙酰化酶, 可以通过促进 rDNA 区域的稳定性, 阻止 rDNA 的重组, 进而抑制 ERC 的形成. 而复制叉阻遏蛋白 Fob1 (replication fork block protein)则可以促进 rDNA 的重组与 ERC 的形成. 因此, 敲除 *FOB1* 或者过表达 *SIR2* 均可延长复制型寿命^[6]. 对 ERC 导致衰老的原因目前有三种假设: 其一, 一部分发挥关键作用的复制因子及转录因子不再与 rDNA 相互反应, 纷纷转而与不断积累的 ERC 结合, 使其正常的细胞功能无法发挥; 其二, 随着细胞衰老的发生, 由 ERC 编码的 rRNA 不断增加, 导致 rRNA 与核糖体蛋白间的平衡被打破, 从而严重影响核糖体的生物形成与正常功能; 其三, ERC 的产生极有可能引起 rDNA 稳定性的下降, 导致更多的 rDNA 发生重组, 从而形成正回馈, 最终导致其寿命缩减. 有报道指出, 最后一种推断也许是造成酵母细胞复制型衰老的主要作用机理^[3]. 由于 ERC 仅在芽殖酵母的复制型衰老中被发现, 在静止期酵母细胞或其他多细胞真核生物中均没有发现衰老受到 ERC 影响, 换言之, ERC 所在的调控通路是酵母复制型衰老特有的分子机理, 故而复制型衰老的相关研究在推广到其他高等真核细胞, 特别是哺乳动物细胞时, 具有一定的局限性^[6]. 而那些在复制型衰老中不构成 ERC 调控通路的组分, 却很有可能与多细胞真核生物的衰老有关, 比如卡路里限制(calorie restriction, 又称作饮食限制, dietary restriction, DR)以及对雷帕霉

素靶通路(target of rapamycin, Tor)的调控等^[4].

自然衰老则是用于分析静止期细胞寿命的衰老模型, 停止分裂的细胞所能存活的时限被定义为自然寿命(chronological life span, CLS)^[3]. 实际上, 酵母细胞在自然环境中存在时, 其绝大部分时间都处于静止期, 仅在外界营养十分丰富并适合生长繁殖的情况下才会进入分裂状态^[6]. 研究酵母自然衰老的经典操作是在含有 2%葡萄糖的完全合成培养基(synthetic complete medium, SC)内完成的, 当葡萄糖消耗殆尽时, 酵母细胞便转入停止分裂状态, 即静止期, 或称 G0 期, 此时, 可以继续在不添加营养物质的原培养基内培养细胞, 或将细胞群洗净后移入水中生长. 当 99%的细胞无法在 YPD 平板中形成菌落时, 酵母在此之前的存活时间就是其自然寿命^[7]. 具体来说, 在养分充足的 SC 中, 酵母细胞会通过发酵过程, 将葡萄糖经丙酮酸转化为乙醇, 而乙醇会聚集于细胞外. 当葡萄糖耗尽时, 细胞改变其代谢方式, 由发酵转变为线粒体呼吸^[8]. 在 CLS 中, 卡路里限制可由上述的水中培养进行诱导, 或者从起始处即使用仅含 0.5%或 0.05%葡萄糖的培养液^[9]. 两种卡路里限制可以得到相似的自然寿命, 说明它们激活的可能是同一条抗衰老通路. 尽管两种衰老模式在诸多方面存在差异, 它们之间还是存在一些关联. 首先, 酵母细胞在静止期培养得越久, 转到新鲜培养基后其复制型寿命就越短. 其次, 卡路里限制以及某些可以导致蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)通路下降的突变能够延长两种模式的寿命, 而敲除 *SOD1*(编码胞质内超氧化物歧化酶)后, 会使得两种寿命锐减^[9]. 有一些干扰剂也可以同时增加两种模式的寿命, 甚至可以延长高等脊椎动物(包括哺乳动物)的寿命. 例如, 利用雷帕霉素可以抑制 Tor 调控通路, 这一现象首先在延长酵母自然寿命中被发现^[8], 随后又被证明可以同样延长小鼠的寿命^[10]. 同样的, 敲除 *SCH9*(编码一种丝氨酸 - 苏氨酸激酶)也先被确认可延长自然寿命^[11], 之后又证实可以延长酵母复制型寿命以及线虫、果蝇和小鼠的寿命^[12].

毫无疑问, 酵母细胞已经成为衰老研究领域的排头兵, 对其自然衰老的研究也是该领域的主流方向. 近年来在酵母自然衰老调控因子的探索中, 对胞内与胞外影响因素的研究均取得了不少重大进展与突破, 下文将从多方面介绍目前最新的研究成果.

2 卡路里限制、Ras /PKA、Sch9、Tor 与转录因子相关通路

为了更好地研究酵母细胞自然衰老的分子作用机理, 科研人员首先想到从自然生长的细胞中分离出寿命较长的突变体, 并基于此研究其长寿的真正原因. 他们将转座子诱变(transposon mutagenesis)与对天然抗压突变体的选择相结合^[1], 通过施加外部压力, 将能够耐高温(52℃, 1 h)或耐氧化胁迫(1 mm paraquat, 9~10 天)的突变体筛选出来, 再跟踪测量它们在后二阶段生长期内的存活时间, 即自然寿命, 并与正常酵母细胞进行对比. 其中, *CYR1* 基因(编码腺苷酸环化酶)受损细胞以及 *SCH9* (编码丝氨酸 - 苏氨酸激酶)基因启动子区受损细胞是存活时间最长的两种突变体. 这两种突变体也是唯一可以同时对抗上述两种外界压力的细胞^[1].

较早的研究认为, *Cyr1* 和 *Sch9* 分属于两个平行的信号通路, 分别为 Ras /PKA 通路(Ras- 腺苷酸环化酶 -PKA)和 Tor 通路(Tor-Sch9), 而这两条通路又均属于营养依赖型调控通路, 参与刺激糖酵解与细胞生长、调控胁迫抗性(stress resistance)、糖原积累以及葡萄糖异生作用等多种重要的细胞活动. 由于转座子嵌入 *CYR1* 和 *SCH9* 基因可能导致对应蛋白质效能的下降, 并降低相应的营养依赖型调控通路的活跃度, Fabrizio 等^[1]据此提出, 降低培养基内作为营养源的葡萄糖浓度, 即实施卡路里限制, 可能会延长酵母细胞的自然寿命, 这一假设很快得到了证实. 将起始培养基中葡萄糖浓度由 2% 下调到 0.5% 甚至更低, 或者将耗尽葡萄糖的酵母细胞直接移至水中, 均可使酵母细胞处于卡路里限制状态, 其自然寿命明显延长^[9]. 正如上文所述, 酵母细胞的自然寿命在完全合成培养基中测定, 这样的标准外部环境使其可以长期保持在静止状态并正常存活. 而卡路里限制, 即将营养物质含量减低到仅仅足够维持细胞存活但并不造成营养不良的状态, 可以延长多种生物体的寿命, 如酵母、线虫、果蝇以及啮齿类动物^[13]. 卡路里限制延长寿命的调控机制尚不完全清楚.

Cyr1 和 *Sch9* 能够调控衰老这一发现为酵母自然衰老的研究奠定了良好的基础. 随着相关探索的不断深入, 研究人员将 *Sch9* 通路从 Tor 通路中分离出来, 并与 Tor 和 Ras/PKA 通路一起, 形成 3 条被广泛认可的且较为完整的调控寿命通路(图 1)^[9, 14]. 这 3 条通路也部分调控着高等真核生物

的衰老, 因此具有一定的保守性^[9]. 当葡萄糖和其他营养物质存在时, 这些通路会被激活并促进细胞的生长与分裂. 而当养分稀缺时, *Sch9*、Tor 和 Ras/PKA 通路的效能均会下降, 导致细胞分裂暂停, 并激活细胞保护机制. 敲除编码丝氨酸 - 苏氨酸激酶 *SCH9*, 会使自然寿命延长 3 倍, 并促进细胞对压力的适应性^[11]. *Sch9* 与 Akt/PKC、SGK 以及 S6K 有极高的同源性, 而这些蛋白质的失活可以相应地促进线虫、果蝇和小鼠寿命的延长^[9]. 与 *Sch9* 相似, Tor1 的激酶活性在养分充足的情况下被激活, 而养分不足时则会遭到抑制, 并使得酵母的自然寿命延长, 其对抗压力的能力也有所提高^[11, 15]. Tor 激酶从酵母到人类高度保守, 在调控生长、新陈代谢以及对外界压力(如营养缺乏或生长因子)的抵抗等方面发挥着重要的作用, 下调 Tor 通路的活跃度可以延长多种生物的寿命, 如酵母、线虫以及果蝇^[11, 16]. Tor 激酶能够形成两种不同的多蛋白质复合体——TORC1 和 TORC2, 其中 TORC1 具有感应营养物的能力. 最近有研究证明 TORC1 可在 *Sch9p* 的多个位点将其直接磷酸化, 并促进 *Sch9* 的激活, 因此 *Sch9* 通路 Tor 通路在一定程度上互相重叠^[17]. 而作为另一种在酵母中被确认的寿命调控通路, Ras/PKA 通路最近也被发现存在于小鼠体内, 且功能相近. 在酵母中, 将

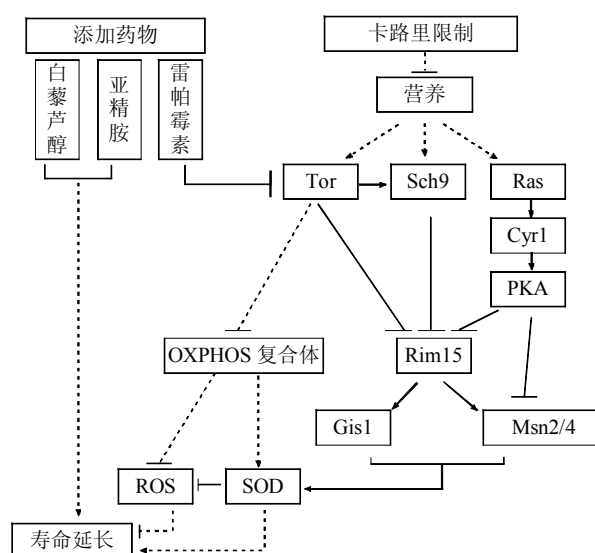


Fig. 1 The model of chronological ageing regulatory pathways in yeast

图 1 酵母细胞自然衰老调控机理模型

卡路里限制可抑制 Tor、Sch9 和 Ras/PKA 等 3 条营养依赖型调控通路, 并延长寿命; 雷帕霉素可有效抑制 Tor 通路, 它与白藜芦醇和亚精胺等药物均可延长寿命. 图中虚线表示调控机制尚未确定, 实线表示机制已得到确认.

Cyr1 的上游基因 *RAS2* 敲除之后, 细胞抵御压力的能力有显著加强, 并通过下调 cAMP 依赖型蛋白激酶, 将其自然寿命延长了一倍^[7]. 通过以上叙述, 我们不难发现, 酵母细胞自然寿命延长的同时也往往赋予了细胞对外界胁迫能力的提升, 且这种相关性在线虫、果蝇和小鼠身上均有体现, 说明提升细胞的自我保护能力以对抗损伤或提高其修复能力, 可能是各种生物体中保守存在的延缓衰老的重要机制.

以上 3 条通路中的主要调节分子也已经逐一确认, 它们各自生物功能的正常发挥保证了通路活动的顺利进行. 首先是 Msn2/Msn4, 作为胁迫抗性转录因子, 其在核内的定位受到 PKA 的抑制. 其次是蛋白激酶 Rim15^[10], PKA 依赖型磷酸化以及降低 Sch9 含量均可以有效地促使其在细胞质中的积累, 其含量明显升高, 并抑制 Msn2/Msn4 的激活, 缺乏 Rim15 会导致敲除 *SCH9*、*TOR* 或 *RAS* 的突变体的寿命不再延长, 说明 3 条通路汇聚于 Rim15^[15]. 另一种胁迫抗性转录因子 Gis1, 其活性受 Rim15 的抑制^[7]. 值得注意的是, 尽管 Msn2/Msn4 在 *Ras*/PKA 通路受损时是延长寿命不可或缺的成分, 但在 *SCH9* 突变体中并没有明显的调控作用^[7]. 而将 *RAS* 与 *SCH9* 双双敲除后, 突变体寿命的延长幅度比单独敲除任意一个都更为明显, 这一现象说明 Sch9 与 *Ras*/PKA 通路在激活 Rim15 的方式上存在差异, 且任何一条通路都可通过激活 Rim15 和 Msn2/Msn4 等非通路特异性调节子达到延长寿命的目的^[15].

3 活性氧簇(ROS)与超氧化物歧化酶(SOD)

卡路里限制会改变营养供给, 其主要结果之一便是使得细胞的新陈代谢与线粒体呼吸发生变化. 有证据显示, 卡路里限制导致的寿命延长往往伴随着线粒体活跃度的上升^[18]. 线粒体既是以氧化磷酸化(OXPHOS)过程与提供 ATP 作为主要功能的细胞器, 同时也是众多同化与异化作用发生的场所, 其中包括许多重要的细胞功能, 例如程序性死亡、信号传导以及离子平衡. 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)作为电子传递过程的副产品, 由线粒体产出, 并被普遍认为是导致细胞衰老的主要原因. Harman 的自由基理论就是假设由线粒体产生的 ROS 会损伤包括线粒体 DNA 在内的细胞组分, 并随时间的推移导致细胞、组织甚至器官功能的衰竭^[14]. ROS 同时也是一种信号分子, 由于线粒体功

能失调而导致信号传递的改变, 如 ROS 含量的变化, 也可能是造成衰老的机理之一^[19]. 导致细胞内 ROS 含量发生变化的原因很多, 例如 *Ras*/PKA 信号通路损伤、药物抑制以及线粒体 DNA 编码的 OXPHOS 亚基的翻译失调等^[19], 这些变化可以造成细胞呼吸异常, 进而提高 ROS 的含量, 严重缩减酵母细胞的自然寿命.

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是细胞对抗 ROS 损伤的主要手段之一, 它能够有效清除超氧化物, 以保证细胞健康生长. 酿酒酵母可以产生多种酶体, 包括胞质内铜 - 锌超氧化物歧化酶 SOD1 (Cu-Zn superoxide dismutase)、线粒体锰超氧化物歧化酶 SOD2 (Mn superoxide dismutase) 以及过氧化氢酶 Ctt1. 基因敲除实验表明, SOD1 及 SOD2 都是延长自然寿命所必需的. 有报道指出, 增加抗氧化酶(如 SOD)并降低氧化应激(oxidative stress), 可以有效调节多条与寿命延长相关的路径^[20]. Bonawitz 及其研究小组最近的报告更为上述推断提供了有力的佐证, 他们发现下调 Tor 通路的活跃度可以促使呼吸作用加强, 线粒体基因的表达(包括 SOD)明显增加, 促进自然寿命的延长^[21]. 如果同时过表达 SOD1 与 SOD2, 酵母细胞的自然寿命会延长约 30%, 而单独过表达任意一个, 其寿命延长幅度则不那么明显^[7]. 有趣的是, 尽管同时过表达可以明显增加自然寿命, 酵母细胞的代谢速率却没有任何改变, 相关研究也显示, 细胞中糖原水平在衰老过程中(第 3 天和第 7 天)并没有显著差异^[9], 对于这一现象, 目前暂时没有令人信服的解释.

4 Tor 信号通路与氧化磷酸化(OXPHOS)

Shadel 等^[22]研究发现, Tor 信号通路可以调控线粒体影响酵母细胞的自然寿命. 他们证明了通过敲除 *TOR1* 基因可以使得 TORC1 信号通路活跃度降低, 并会导致 OXPHOS 复合物总数目及各线粒体可利用的复合物数量增加. OXPHOS 复合物密度增加后, 线粒体耗氧量随即提升. 有趣的是, 耗氧量增多使得电子转移活动更加活跃, 却没有提高 ATP 的产量, 反而降低了线粒体膜势能(membrane potential), 这与低能量时的线粒体活动相似. 对这一现象的解释是, Tor 信号通路活动的减弱导致非偶联呼吸作用上升, 这使得在耗氧量上升的情况下膜电位保持不变, 因而不能产生 ATP. 由于温和的非偶联呼吸可以延长自然寿命, 这很有可能是 Tor 通路影响酵母衰老的机理之一. 而被削弱的 Tor 通

路是如何在不增加线粒体数目的情况下提高 OXPHOS 密度的, 目前为止还没有令人信服的解释。但是, Shadel 等^[20]证实, OXPHOS 复合物密度的上调主要通过翻译调控得以完成。实验过程中他们观察到, *TOR1* 敲除后, 突变株内含有的线粒体编码与核内编码 OXPHOS 复合体亚基数量明显多于正常细胞, 但其他线粒体标记物(如膜孔蛋白 porin)则没有显著变化。两类亚基的增多不仅在翻译层面, 在 mRNA 水平上也有体现, 但并不十分明显。

除了影响 OXPHOS 复合体数量, Tor 信号通路还控制线粒体蛋白质组动态变化的其他方面, 而在功能上与核小体 S6 激酶相近的 Sch9, 也被发现可以调节线粒体呼吸^[17]。事实上, 和敲除 *TOR1* 一样, *SCH9* 的敲除也可以通过呼吸依赖方式延长寿命, 说明 Sch9p 可能是 Tor 依赖型线粒体氧化磷酸化调节的下游调控者。

由此, Shadel 等设计出与 OXPHOS 相关的酵母细胞自然寿命调控模型, 通过下调 Tor 通路活跃度, 线粒体与细胞核内编码的氧化磷酸化亚基(OXPHOS)的翻译会上调, 增加线粒体内氧气消耗量, 降低活性氧簇(ROS)的数量, 限制自然衰老中的氧化损伤, 并延长寿命(图 1)。但是因为酵母线粒体 DNA 仅编码极少量 OXPHOS 复合体亚基(约 80 个亚基中的 7 个), 而线粒体含有超过 1000 个蛋白, 大部分由核内基因编码并输送进线粒体, 因此 Tor 信号通路可能是从全局角度调控线粒体^[21]。尽管有充足证据表明 OXPHOS 复合体密度上升与耗氧量增加正向相关, Shadel 及其实验小组并不排除 Tor 通路也可能激活其他消耗氧气复合体的可能性。

5 乙酸影响自然寿命

另有一些观点认为, 乙酸才是标准条件下限制酵母细胞自然寿命的主要因素^[23]。在含有高浓度葡萄糖的标准培养基中, 酵母主要通过发酵产生 ATP, 并产生乙醇。但是在葡萄糖含量很低的情况下, 如卡路里限制, 酵母的代谢方式则以呼吸为主^[3]。当酵母将乙醇作为碳源加以利用时, 产生的乙酸及其他有机酸会分泌到细胞外, 使得生长环境酸化。Kaeberlein 等^[4]通过实验发现, 用缓冲液提升培养基的 pH 值, 或者移除乙酸, 均可延长细胞的自然寿命, 说明乙酸作为胞外因子, 可以限制自然寿命。而将静止期细胞转入仅含有同浓度乙酸的

溶液, 其寿命延长受到抑制, 说明乙酸是酵母细胞自然衰老的充分且必要因素^[3]。这一发现与“衰老的酵母细胞要经历乙酸诱导的类程序性死亡过程”以及“加入乙醇可引起寿命缩短”等推断相一致^[13]。研究发现, 尽管有很多其他有机酸也在培养基中积累, 但仅有乙酸可以导致自然衰老^[3]。酵母细胞无法从周围环境中轻易吸收乙酸阴离子, 但质子化的乙酸却可以渗透过细胞膜, 使得胞内溶液酸化。除了降低葡萄糖浓度之外, 通过其他一些途径也可以达到延长自然寿命的目的, 例如将细胞置于含有山梨醇(sorbitol)或氯化钠等高渗透压的培养基中培养。Kaeberlein 及其研究小组认为, 一系列延长寿命的方法, 包括饮食限制(卡路里限制)、将细胞转入水中或丙三醇中培养、在高渗透压培养基中生长、敲除 *SCH9* 或 *RAS2*, 均是通过减少乙酸的积累, 或增加细胞对抗乙酸引导的细胞死亡以达到延长自然寿命的目的^[4]。

乙酸由乙醇经过逐步氧化形成乙醛, 并最终氧化成酸排出细胞。有报道称类似的代谢途径的转化伴随着 Tor 信号通路的削弱, 或者 Hap4 转录因子的过表达, 而两者均可以使自然寿命得以延长^[24]。早期的研究表明, 乙醇的生成与自然寿命逆相关, 过表达乙醇去氢酶 *ADH1*(可以将醛还原为醇)可以延长自然寿命^[25]; 敲除另一种乙醇去氢酶 *ADH2*(负责将醇转化为醛)也可增加自然寿命。上述现象均支持 Kaeberlein 等的结论, 即外界因素与基因干扰均是引导代谢通路不再生成乙酸, 从而延长自然寿命。有证据显示, 乙酸会促进 ROS 的生成, 并引起酵母细胞内线粒体功能失调, 这表明尽管乙酸诱导的细胞衰老可能仅限于酵母细胞, 它所造成的损伤以及细胞反应却极有可能与其他促进衰老因素引起的结果相类似^[3]。

6 裂殖酵母蛋白酶和自体吞噬

与芽殖酵母稍有不同, 外界氮含量下降导致裂殖酵母从无性繁殖期(vegetative proliferation phase, VEG)进入静止期(G0)。在静止期, 裂殖酵母可存活一个月之久。当外界氮含量恢复, 酵母细胞亦会重新进入细胞周期^[26]。泛素/蛋白酶体系统是细胞中主要的蛋白水解机制, 存在于多种重要的细胞通路中, 如细胞周期调控和蛋白质质量控制(protein quality control)。作为 M 期进程中不可或缺的组分, 蛋白酶体主要负责降解细胞周期蛋白 B(cyclin B)以及安全因子(securin)。在裂殖酵母中, 蛋白酶定位

于细胞核内, 以保证其能够迅速降解 Cdc13/cyclin B 和 Cut2/securin^[21]. 然而其在 G0 期自然衰老过程的作用并不为人所知.

最近, Yanagida 等^[21]通过大量实验, 首先确认了处于静止期的裂殖酵母细胞需要蛋白酶存在于细胞质中, 以保持 G0 期的稳定. 蛋白酶从核中转移至细胞质内, 可能是因为在不同时期蛋白酶的标靶出现变化, 例如 G0 期中标靶大多出现在细胞质中, 但这些标靶的分子组成仍需进一步确认. 而无性繁殖阶段的绝大部分生命活动, 如复制、转录及有丝分裂等, 均发生在细胞核内. 另外, G0 阶段可能需要回收大量蛋白质, 故而对蛋白酶有很大的需求. 值得注意的是, 无性繁殖所需基因中, 仅有 25% 是 G0 期稳定所需要的, 许多在细胞分裂与 DNA 复制期间发挥关键作用的基因在酵母自然衰老过程中并未表现出生物功能.

另外, G0 阶段蛋白酶功能的失调会引起多种防御性反应, 主要包括抗氧化组分的生成以及线粒体自噬现象的发生. 研究发现, 处于 G0 期的蛋白酶突变体在经历自然衰老时, 其 ROS 含量明显增高, 线粒体数量则大幅下降, 而在无性繁殖期则没有类似现象, 说明蛋白酶在细胞自然衰老时期的主要功能之一是将 ROS 含量降到最低. 由于 ROS 的累积可以严重损伤 G0 期细胞的活性, 所以自噬介导的线粒体降解实质上保护了 G0 期的蛋白酶突变体, 换言之, 蛋白酶与自噬作用相互配合, 延长了细胞的自然寿命.

7 外源药物对细胞自然寿命的影响

胞外影响衰老的因素除卡路里限制外, 通过添加白藜芦醇(resveratrol)、雷帕霉素(rapamycin)或亚精胺(spermidine)等药物, 也可以有效抑制细胞衰老, 达到延长自然寿命的目的(图 1)^[3].

白藜芦醇是一种在红酒中发现的多酚类化合物, 由于可以激活沉默信息调节蛋白 Sir2, 近年来被作为一种热门的抗衰老药物靶点加以研究. 白藜芦醇首先被发现可以延长酵母细胞的复制型寿命, 随后在线虫、果蝇以及一种短寿鱼类的研究中也发现它具有延长寿命的功能^[3]. 但其后的研究过程并未重现酵母及果蝇寿命延长的现象, 这表明这种药物仅仅具有底物特异性激活 Sir2 的能力. 小鼠在喂食白藜芦醇后能够有效降低与高脂饮食相关病症出现的几率, 提高新陈代谢功能, 使其产生与卡路里限制相似的基因表达变化, 但迄今为止尚未发现

小鼠寿命有所增加.

雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素, 能够特异性抑制雷帕霉素标靶(Tor)的活动. 雷帕霉素于 2006 年首次被发现可以提高酵母的自然寿命^[8], 随后其通过抑制 Tor 通路活动使得线虫、果蝇以及小鼠寿命延长的机制亦被证实^[26], 其中存活 600 天左右的小鼠(相当于人类 60 岁)在喂食雷帕霉素后, 依然可以延长寿命^[10], 相关的分子调节机理尚不清楚. Shadel 及其实验小组发现, 向酵母细胞培养基加入雷帕霉素的时间不同, 会引起耗氧量上的差异, 在生长期(growth phase)加入抑制 Tor 通路的雷帕霉素, 可在较长时间范围内影响耗氧量, 但与在实验初期添加相比, 其影响程度要小得多, 这一研究成果是否可以推广至其他真核生物, 尚待更多实验数据的验证.

亚精胺是一种天然存在的多胺, 可调控多种不同的细胞生命活动, 包括 DNA 稳定性、细胞转录与翻译以及细胞凋亡. 亚精胺在细胞中的含量随年龄的递增而不断减少^[27]. 2009 年, 相关报告称亚精胺可以显著增加酵母、线虫以及果蝇的自然寿命, 其部分作用机理与自噬作用相关. 2010 年, 研究人员发现, 亚精胺可以抑制组蛋白乙酰基转移酶的活性, 导致组蛋白去乙酰化, 抑制氧化胁迫与细胞坏死作用, 进而延长其寿命.

8 展 望

深入开展对酵母细胞自然衰老机理的探索, 能够更有效地帮助我们理解高等生物特别是人类自身的衰老过程, 能够更全面深刻地揭示人类衰老的本质, 更好地阐明细胞衰老的发生及发展机制, 并能够为开发对抗由衰老所引起的疾病及体力衰退的相关药物提供重要的理论支持.

Shadel 等的实验证明, 下调 Tor 信号通路可以提高 OXPHOS 复合物的密度并延长细胞寿命, 尽管不少实验数据支持这一机理, 依然有很多细节问题需要解决. 正如上文提到的, 有证据显示, 温和的非偶联呼吸可以延长自然寿命, 这是否就是 Tor 通路影响酵母衰老的真正原因, 尚无定论. 当 Tor 通路被削弱时, 细胞如何在不增加线粒体数目的情况下提高 OXPHOS 密度, 也是颇为值得研究的问题. 另外, 核内 OXPHOS 基因表达是否受到转录或转录后修饰的调节, 也需要进一步确定并证实.

毋庸置疑, 白藜芦醇、雷帕霉素以及亚精胺等药物可以不同程度地延长生物体寿命, 但这一功效

是否存在有生物种群的局限性已经引起学界的质疑, 它们在提高人类寿命方面是否有同样神奇的效用依然值得研究. 另外, 对添加药物时机的掌握已经纳入相关研究, 例如在生长期内向酵母细胞培养基添加雷帕霉素, 与初期添加相比, 其对耗氧量的影响程度要小得多, 这一研究成果是否可以推广至其他真核生物, 尚待更多实验数据的验证.

除了卡路里限制、清除乙酸以及添加药物以外, 其他培养条件是否会对酵母细胞的自然衰老产生明显影响也是值得深入研究的问题. 相关探索可能发现并确定其他调控细胞衰老的分子要素. 在研究乙酸影响衰老的实验中, 研究人员发现, 生长在缓冲培养基里的酵母依然会失去活性并不断衰老, 这说明简单地改变培养基的 pH 值尚不能最大限度地延长细胞寿命, 所以进一步调整细胞的生长环境以利于其更长久地存活, 或者寻找出一种既可以在标准状况下又能在缓冲情况下引起自然寿命延长的干扰剂, 会是非常有意义的探索.

尽管对裂殖酵母自然寿命的研究起步较晚, 依然有不少令人振奋的结果问世. 裂殖酵母所含有的蛋白酶可以在稳定线粒体与自然衰老寿命中与自体吞噬协同作用, 其基本机理已被揭示, 但 G0 期蛋白酶的靶标依然是未解之谜. 而且, 除了将 ROS 含量减至最低, 蛋白酶在 G0 期是否有其他功能也亟待研究. 另外, 芽殖酵母细胞中也有参与线粒体自噬作用的蛋白, 如 Atg32^[28]. 对其所在通路及相关功能的深入研究, 也许可以完善对线粒体在自然衰老中作用的认识, 甚至有可能找到另一调控通路.

笔者在长期真核生物基因表达调控方面的研究, 主要以酿酒酵母为模式生物, 探讨在衰老过程中另一个不可忽视的调控机制——表观遗传调控. 研究领域主要涉及在细胞衰老进程中核小体重排和染色质重塑等关系到细胞衰老作用机理的关键性生物问题. 如今人们对外界营养和药物等因素对衰老相关信号通路的影响, 以及对信号通路中关键蛋白质的探索已经趋于饱和, 为了更全面地揭示细胞衰老的分子机制, 需要整合更新的研究方向和手段. 利用相关技术研究表观遗传修饰对细胞衰老的调控机理, 为研究细胞衰老这一领域开拓新的视角. 笔者正通过全基因组芯片技术、染色体免疫共沉淀芯片技术以及高通量测序等系统生物学手段, 研究亚精胺等药物如何影响表观遗传修饰进而延长细胞寿命, 并采用高通量测序技术绘制酿酒酵母衰老进程

中全基因组核小体的精密图谱, 以求更加全面完整地探究表观遗传学对其自然寿命的调控及影响.

更多的实验数据及相关的分子调节通路, 需要在其他高等生物上得到验证. 我们有理由相信, 酵母细胞的自然衰老模型将为多细胞真核生物衰老的研究提供宝贵而丰富的资料, 而从经典遗传学与表观遗传学等多个角度深入剖析自然衰老的成因, 必将为全面了解生物的衰老机制带来突破与进步.

参 考 文 献

- [1] Fontana L, Partridge L, Longo V D, *et al.* Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*, 2010, **328**(5976): 321–326
- [2] Norris A, Boeke J D. Silent information regulator 3: the Goldilocks of the silencing complex. *Genes Dev*, 2010, **24**(2): 115–122
- [3] Matt K. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, 2010, **464**(7288): 513–519
- [4] Burtner C R, Murakami C J, Kennedy B K, Kaeblerlein M. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 2009, **8**(8): 1256–1270
- [5] Fabrizio P, Longo V D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, 2007, **371**: 89–95
- [6] Steinkraus K A, Kaeblerlein M, Kennedy B K, *et al.* Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008, **24**: 29–54
- [7] Fabrizio P, Longo V D. Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1783**(7): 1280–1285
- [8] Powers R W III, Kaeblerlein M, Caldwell S D, *et al.* Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*, 2006, **20**(2): 174–184
- [9] Murakami C J, Burtner C R, Kennedy B K, *et al.* A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008, **63**(2): 113–121
- [10] Harrison D E, Strong R, Sharp Z D, *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 2009, **460**(7253): 392–395
- [11] Fabrizio P, Pozza F, Pletcher S D, *et al.* Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 2001, **292**(5515): 288–290
- [12] Kaeblerlein M, Kapahi P. Aging is RSKy business. *Science*, 2009, **326**(5949): 55–56
- [13] Masoro E J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing*, 2005, **126**(9): 913–922
- [14] Bonawitz N D, Shadel G S. Rethinking the mitochondrial theory of aging: the role of mitochondrial gene expression in lifespan determination. *Cell Cycle*, 2007, **6**(13): 1574–1578
- [15] Wei M, Fabrizio P, Hu J, *et al.* Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet*, 2008, **4**(1): e13
- [16] Kaeblerlein M, Powers R W III, Steffen K K, *et al.* Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 2005, **310**(5751): 1193–1196

- [17] Lavoie H, Whiteway M. Increased respiration in the *sch9Δ* mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryot Cell*, 2008, **7**(7): 1127–1135
- [18] Guarente L. Mitochondria—a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?. *Cell*, 2008, **132**(2): 171–176
- [19] Bonawitz N D, Rodeheffer M S, Shadel G S, *et al.* Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(13): 4818–4829
- [20] Bandhakavi S, Xie H, O' Callaghan B, *et al.* Hsf1 activation inhibits rapamycin resistance and TOR signaling in yeast revealed by combined proteomic and genetic analysis. *PLoS ONE*, 2008, **3**(2): e1598
- [21] Sajiki K, Hatanaka M, Nakamura T, *et al.* Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *J Cell Sci*, 2009, **122**(Pt9): 1418–1429
- [22] Pan Y, Shadel G S. Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density. *Aging (Albany NY)*, 2009, **1**: 131–145
- [23] Cohen E, Bieschke J, Perciavalle R M, *et al.* Opposing activities protect against ageonset proteotoxicity. *Science*, 2006, **313**(5793): 1604–1610
- [24] Piper P W, Harris N L, Maclean M, *et al.* Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mech Ageing Dev*, 2006, **127**(9): 733–740
- [25] Reverter-Branchat G, Cabisco E, Tamarit J, *et al.* Chronological and replicative life-span extension in *Saccharomyces cerevisiae* by increased dosage of alcohol dehydrogenase 1. *Microbiology*, 2007, **153**(Pt II): 3667–3676
- [26] Stanfel M N, Shamieh L S, Kaeberlein M, *et al.* The TOR pathway comes of age. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1790**(10): 1067–1074
- [27] Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, *et al.* Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell*, 2009, **11**(11): 1305–1314
- [28] Kanki T, Wang K, Cao Y, *et al.* Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell*, 2009, **17**(1): 98–109

Progress on Molecular Mechanisms of Chronological Ageing in Model Organism *Saccharomyces cerevisiae**

ZHANG Jia-Zhen^{1,2}, TAN Jin-Yin¹, ZUO Xiao¹, LI Bin¹, LÜ Zhao-Xia¹, ZHAO Rui-Pu¹, WAN Ya-Kun^{1**}

⁽¹⁾ Institute of Life Science, Southeast University, The Laboratory of Development Genes and Human Diseases Ministry of Education, Nanjing 210000, China;

⁽²⁾ Department of Life Sciences, HAN University, Nijmegen NL 6503 GL, Netherlands)

Abstract Ageing, as an ineluctable physiological process for all organisms, is a complex life activity induced by several factors. Currently yeast cell becomes an ideal model organism which is generally acknowledged, and many mechanisms and regulatory factors have been discovered by the insightful research of yeast. One of its well-established ageing models, called chronological ageing, is conserved with other higher eukaryotic cells, especially mammalian cells, thus attracted much attention on such a study. Two ageing models in yeast were compared, the research progress in the studies on the molecular mechanisms of yeast chronological ageing was introduced, and several complicated regulatory pathways were expounded including the effects given by calorie restriction and medicine addition on Ras/PKA, Sch9 and Tor regulatory pathways which are nutrient-dependent. Meanwhile, some significant future issues in this field are mentioned and anticipated as reference to dig much further in the comprehensive understanding of the ageing mechanisms in higher living organisms, especially human beings.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, chronological ageing, chronological ageing regulatory pathway, nutrient-dependent regulatory pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00298

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31071146), and Excellent Young Teachers Program of Southeast University(3231001201).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-83272314, E-mail: wanyakun2002@hotmail.com

Received: May 31, 2010 Accepted: August 23, 2010