

主要干性基因与衰老相关基因表达水平的相互拮抗关系*

谢振华** 吴耀炯**

(清华大学深圳研究生院生命与健康学部, 深圳 518055)

摘要 目前广泛地利用传统的体细胞衰老理论和方法对成体干细胞衰老进行研究, 忽视了成体干细胞特有的自我更新功能和相应的干性基因的作用. 干性基因的下调可能是导致间充质干细胞衰老的主要原因. 通过查阅相关资料发现主要干性基因与衰老相关基因表达水平的相互拮抗关系, 这体现在以下 4 个方面: a. 干细胞衰老伴随着干性基因的下调; b. 干性基因表达抑制细胞的衰老; c. 干性基因抑制衰老相关基因的表达; d. 抑制衰老相关基因促进干性基因的表达. 干性基因与衰老相关基因的表达水平存在相互拮抗关系, 这为成体干细胞衰老可能源于成体干细胞的干性降低的观点提供了坚实的分子基础.

关键词 成体干细胞, 衰老, 干性, 干性基因, 衰老相关基因
学科分类号 Q26, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00310

间充质干细胞作为理想的种子细胞用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复, 但间充质干细胞难于一次性大量获得, 需要在体外进行扩增. 体外培养的间充质干细胞随着传代次数的增加逐渐呈现衰老(aging or senescence)细胞的特征, 不仅有胞体增大、扁平 and 胞浆内空泡等细胞形态学变化, 还表现为细胞增殖和定向分化能力的降低甚至丧失^[1-2]. 间充质干细胞的衰老制约了得到临床治疗或组织工程所需的间充质干细胞或定向分化细胞的数量, 也削弱了间充质干细胞对组织器官的修复能力^[1-2]. 我们课题组发现, 衰老的间充质干细胞胞体增大, 从小鼠尾静脉注射的间充质干细胞, 更易阻塞在肺组织中并被清除, 导致到达缺血心肌部位的干细胞数量减少, 间充质干细胞对心肌梗塞的治疗效果降低. 因此, 间充质干细胞的衰老是再生医学难于回避的问题, 深入研究和延缓间充质干细胞的衰老对解决间充质干细胞的应用具有重要意义.

目前主要采用成体细胞衰老研究的理论和方法来研究成体干细胞衰老, 对成体干细胞衰老的相关分子机制研究已取得显著的成果. 这些研究主要局限于活性氧(ROS)、DNA 的损伤、端粒缩短、端粒酶活性下降, 以及衰老相关的 ARF/p53 及 p16^{INK4a}/RB

信号通路的激活^[3-7]. 2006 年, 三篇独立的文章在《自然》(*Nature*)杂志上分别报道了细胞周期依赖性激酶抑制因子 p16^{INK4a} 在干细胞衰老过程中的调控作用, 这是采用成体细胞衰老研究的理论和方法来研究成体干细胞衰老取得的重要成果^[8-10].

由于成体干细胞的衰老是受到外在和内在因素影响, 而且是受到多个基因调控的复杂生命过程, p16^{INK4a} 表达升高仅是决定成体干细胞的衰老终末表型(细胞增殖能力降低), 决不是成体干细胞衰老的初始环节, 也可能不是中间环节. 所以成体干细胞衰老的机制还有待于更深入的研究.

目前广泛地用传统的体细胞衰老理论和方法对成体干细胞衰老进行研究, 忽视成体干细胞特有的自我更新功能和相应的干性基因的作用, 确实有片面之处. 现在迫切需要从新的视角、用新的方法来研究成体干细胞的衰老. 通过对有关成体干细胞衰

* 国家自然科学基金资助项目(U1032003).

** 通讯联系人.

谢振华. Tel: 0755-26036381, E-mail: xiezh@sz.tsinghua.edu.cn

吴耀炯. Tel: 0755-26036348, E-mail: wu.yaojiong@sz.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2013-07-28, 接受日期: 2013-11-19

老的资料^[3,5-6,11]分析,我们认为:成体干细胞的衰老可能源于成体干细胞的干性(stemness)降低,然后才出现与成体细胞相似的细胞增殖能力降低。

通过查阅相关资料,我们发现:主要干性基因与衰老相关基因表达水平存在相互拮抗关系,这为成体干细胞的衰老可能源于成体干细胞干性降低的观点提供了坚实的分子基础.在此将相关资料进行归纳总结,确定了干性基因与衰老相关基因表达水平的相互拮抗关系体现在以下四个方面:

1 干细胞衰老伴随着干性基因的下调

Asumda 等^[11]研究表明,来自老年大鼠骨髓间充质干细胞的干性基因表达谱发生了改变.4个月幼鼠的骨髓间充质干细胞表达 Oct-4、SOX-2 和 NANOG,但在15个月大鼠骨髓间充质干细胞中则无法检测到 SOX-2 和 NANOG 的表达。

Galderisi 等^[12]研究表明,在培养一段时间以后,间充质干细胞表现出倍增时间在增加,并失去了端粒酶活性,同时出现了与衰老相关的 β -半乳糖苷酶的表达.这种间充质干细胞衰老伴随着参与干细胞自我更新的干性基因的下调.有趣的是,参与 DNA 修复的基因也表现出显著下调。

Yew 等^[13]发现,多次传代的骨髓间充质干细胞显示出增殖能力下降,干性基因 Oct-4 和 Nanog 表达减少,同时成骨潜能退化.另外,多次传代的骨髓间充质干细胞中衰老相关基因 p21 基因表达增加。

Alessio 等^[14]研究(BRG1 brahma-related gene 1, SWI/SNF 染色质重塑复合物上具有 ATP 酶活性的亚基)的生物学作用,发现在间充质干细胞中沉默 BRG1 的表达,导致衰老细胞显著增加、凋亡细胞减少,并在分子水平上,发现 RB2/ P130 和 P53 相关途径的激活,而且发现间充质干细胞的衰老伴随着一些干性相关基因的表达降低。

在这些对间充质干细胞衰老过程的研究中,大部分仅测定出一些干性相关基因的表达降低,并未对衰老相关基因是否表达增加进行测定,但由于衰老相关基因是随着衰老过程必然表达增加的基因,所以在这些研究中,干性相关基因与衰老相关基因“此消彼长”的趋势确实显而易见。

2 干性基因表达抑制细胞的衰老

干性基因不但在成体干细胞中表达,而且在—

些特殊的细胞亚群中表达,这些特殊的细胞亚群通过干性基因的表达,具有延缓或逃脱细胞衰老的能力。

D'Ippolito 等^[15]从骨髓基质细胞亚群的分离到成人骨髓隔离多向诱导细胞(MIAMI),MIAMI 细胞表达干性基因 SSEA-4、Oct-4、Rex-1 和端粒酶逆转录酶. MIAMI 细胞在长期培养时,低氧张力的培养条件通过调节细胞自我更新的能力来维护自己的全能性,因为低氧分压上调 MIAMI 细胞中干性基因的表达,所以延缓 MIAMI 细胞的衰老。

如 H-ras 等癌基因的刺激导致成纤维细胞发生癌基因诱导的衰老,但 Kohsaka 等^[16]发现,某些人二倍体成纤维细胞的亚群竟能逃脱由 H-RasV12 引发的衰老,这些 OIS 逃脱细胞称为 OISEC (OIS-escaped cells),研究发现,OISEC 失去了衰老相关基因 p16 的表达,而且 OISEC 表达干性基因 OCT3/4、SOX2 和 Nanog。

3 干性基因抑制衰老相关基因的表达

Ohmine 等^[17]利用老年 2 型糖尿病患者的表皮角质细胞,转入人 OCT4、SOX2、KLF4 和 c-myc 干性基因进行去分化与重新编程,诱导内源性干性基因 Nanog、Lin28 的表达,并下调细胞骨架、MHC-I 基因和细胞凋亡相关基因的表达.值得注意的是,衍生的 iPS 克隆获得了再生状态,出现端粒延长,与衰老相关的 p15^{INK4B}/p16^{INK4A} 基因的表达受到抑制和氧化应激的信号也受到抑制。

通过在人类乳腺上皮细胞(HMEC)中过表达 Oct4 干性基因,制备得到 OCT4 转化乳腺细胞(OCT4-transduced breast cells, OTBCs). Beltran 等^[18]发现 OCT4 转化乳腺细胞能克服衰老,出现端粒酶过度表达,并下调衰老相关基因 p16^{INK4A} 的表达。

Tsai 等^[19]发现,在间充质干细胞中过表达干性基因 Oct4 和 Nanog 促进间充质干细胞的增殖和分化潜能增加,并抑制自发分化.在分子水平上发现,Oct4 和 Nanog 通过与 DNA 甲基转移酶 DNMT1 的启动子直接结合上调 DNMT1 表达,从而抑制衰老相关基因 p16^{INK4A} 和 p21 的表达.这可能表明 Oct4 和 Nanog 通过诱导 DNA 甲基转移酶 DNMT1 表达,使衰老相关基因 p16^{INK4A} 和 p21 的启动子过度甲基化,从而抑制衰老相关基因 p16^{INK4A} 和 p21 的表达。

4 抑制衰老相关基因促进干性基因的表达

Yew 等^[13]通过 shRNA 抑制多次传代的骨髓间充质干细胞衰老相关基因 p21 的表达能增加干细胞增殖能力, 同时促进干细胞干性基因 Oct-4 和 Nanog 的表达. 这表明, 骨髓间充质干细胞中衰老基因的表达与干性基因的表达和成骨潜能之间, 存在着拮抗关系.

Arima 等^[20]通过 RNA 干扰技术在 ER 阴性乳腺癌细胞中抑制衰老相关基因 p16 的表达, 促进 ER 阴性乳腺癌细胞中干性基因 Nanog、OCT4 和 Sox2 的表达, 降低 ER 阴性乳腺癌细胞药物敏感性. 因此抑制衰老相关基因 p16 的表达, 可能会赋予 ER 阴性乳腺癌细胞具有癌症干细胞样特性, 降低 ER 阴性乳腺癌细胞对化疗药物的响应.

以上四个方面工作主要是采用间充质干细胞、人骨髓隔离多向诱导细胞(MIAMI)、二倍体成纤维细胞的亚群、成体细胞、ER 阴性乳腺癌细胞用以实验研究, 实验结果表明: 主要干性基因表达水平确实与衰老相关基因的表达水平相拮抗.

但也有实验结果表明, 从儿童骨髓中分离出间充质干细胞(C-MSC)与成人骨髓中分离出间充质干细胞(A-MSC)相比较, C-MSC 的端粒长度显著高于 A-MSC 的端粒长度, 但干性基因 Oct4 和 Nanog 的表达水平没有差异^[21]. 这可能是成人骨髓中分离出间充质干细胞尚未进入衰老状态的缘故.

干性基因在另一类成体干细胞——造血干细胞

(hematopoietic stem cells, HSCs)衰老过程的作用目前尚未见报道, 所以目前不能确定造血干细胞中干性基因表达水平与衰老相关的基因表达水平是否相拮抗.

综上所述, 全面确立主要干性基因表达水平与衰老相关的基因表达水平相拮抗关系还需要更多的有力的证据. 但成体干细胞的衰老可能源于成体干细胞干性降低的观点, 已被 Klepsch 等^[22]用于分离和体外扩增间充质干细胞的过程中, 他们认为维持间充质干细胞的干性是分离和体外扩增间充质干细胞过程中的关键所在.

现代生命科学主要是实验科学, 能从有限的实验结果提出更加普适的理论观点, 将开阔相关研究人员的视野, 也将极大地促进生命科学相关研究领域的发展. 基于这样的理念, 我们提出“跷跷板”假说, 即主要干性基因表达水平与衰老相关的基因表达水平相拮抗, 并决定干细胞是否处于自我更新、衰老和衰老的逆转(rejuvenation)状态. 下面用图 1 中三个图片展示这个假说, 在图 1a 中, 高水平表达的干性基因抑制衰老相关基因的表达水平, 决定了干细胞处于正常的自我更新(self-renew)状态; 在图 1b 中, 干性基因表达水平显著降低, 促使摆脱抑制的衰老相关基因表达水平显著升高, 决定了干细胞处于衰老状态; 在图 1c 中, 干性基因超高水平表达显著地抑制衰老相关基因的表达水平, 决定了体细胞处于衰老的逆转状态, 也就是生成 iPS 的过程.

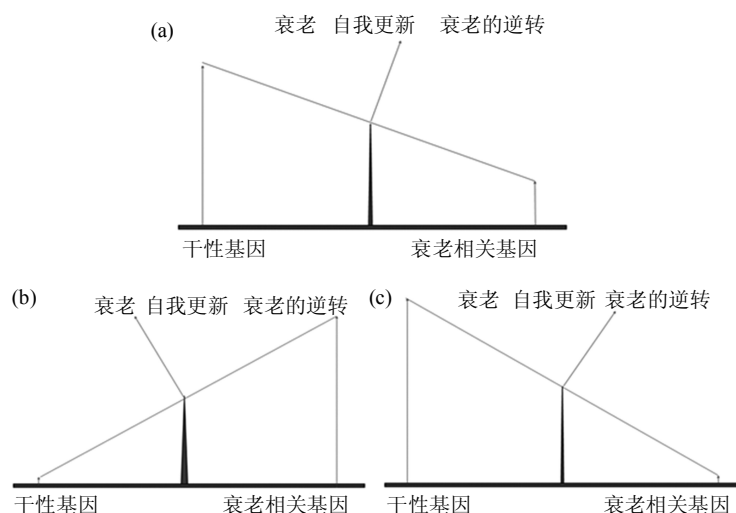


Fig. 1 The stem genes and aging-related genes are associated with mutual antagonism and determine the fate of stem cells

图 1 主要干性基因与衰老相关的基因相拮抗并决定干细胞的命运

(a), (b), (c) 分别表示主要干性基因与衰老相关基因表达水平, 决定干细胞处于自我更新、衰老或衰老的逆转状态.

应用这个“跷跷板”假说,我们认为,只有深入研究衰老过程中维持成体干细胞干性的干性基因表达情况,才能更全面地阐明成体干细胞衰老的机制;只有逆转成体干细胞的干性基因表达降低,才能有效地延缓成体干细胞的衰老,才能最终提供高品质的间充质干细胞用于再生医学。

北京大学邓宏魁博士和汤超博士合作,通过大规模筛选发现,细胞重编程中至关重要的干性因子OCT4能够被调控中内胚层(ME)发育和分化的因子(如GATA3、GATA6、PAX1)代替;SOX2能够被调控外胚层(ECT)发育和分化的因子(如GMNN)代替。根据这一发现创新性地建立了“跷跷板模型”,该模型可更好地理解中胚层基因和外胚层基因在重编程过程中相互抑制和相互平衡的关系,这种关系可能决定了细胞命运的维持和改变^[23]。在此我们提出主要干性基因表达水平与衰老相关的基因表达水平相拮抗,并决定细胞是否处于自我更新、衰老和衰老的逆转(rejuvenation)状态的“跷跷板”假说。因此,不但中胚层基因和外胚层基因在重编程过程中存在相互抑制和相互平衡的关系,而且主要干性基因表达水平与衰老相关的基因表达水平也存在相互的拮抗关系。所以“跷跷板模型”可能广泛地存在于决定细胞命运的维持和改变的许多过程中,这可能是阴阳相生相克法则在决定细胞命运方面的具体体现。

成年个体组织中,细胞损伤和细胞更新这一自我平衡的过程主要是靠组织特异的干细胞来实现的,干细胞功能障碍可能在个体组织衰老过程中发挥了关键作用,致使衰老的个体组织丧失维持自我平衡能力或损伤后无法恢复自我平衡能力,最终导致个体组织功能的全面退化^[24-25]。所以深入研究成体干细胞的衰老对研究个体衰老也有借鉴意义。

直至2014年8月,Yu等^[26]在*Gerontology*发表综述文章,对间充质干细胞衰老过程依然聚焦于p16^{INK4A}基因的表达,而对于主要干性基因在间充质干细胞衰老过程中的作用未见论述。所以本综述的发表,将促进人们对主要干性基因在间充质干细胞衰老过程中的作用给予更多关注,有利于推动干性基因的下调是导致间充质干细胞衰老主要原因观念的发展。

参 考 文 献

- [1] Wagner W, Ho A D, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, **16**(4): 445-453
- [2] Lepperding G. Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Curr Opin Immunol*, 2011, **23**(4): 518-524
- [3] Peng Y, Huang S, Cheng B, *et al.* Mesenchymal stem cells: a revolution in therapeutic strategies of age-related diseases. *Ageing Res Rev*, 2013, **12**(1): 103-115
- [4] Yu J M, Wu X, Gimble J M, *et al.* Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell*, 2011, **10**(1): 66-79
- [5] Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(6): 656-670
- [6] Blagosklonny M V, Campisi J, Sinclair D A, *et al.* Impact papers on aging in 2009. *Aging (Albany NY)*, 2010, **2**(3): 111-121
- [7] Wilson A, Shehadeh L A, Yu H, *et al.* Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 229
- [8] Molofsky A V, Slutsky S G, Joseph N M, *et al.* Increasing p16^{INK4a} expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 2006, **443**(7110): 448-452
- [9] Krishnamurthy J, Ramsey M R, Ligon K L, *et al.* p16^{INK4a} induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 2006, **443**(7110): 453-457
- [10] Janzen V, Forkert R, Fleming H E, *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a}. *Nature*, 2006, **443**(7110): 421-426
- [11] Asumda F Z, Chase P B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biol*, 2011, **12**: 44
- [12] Galderisi U, Helmbold H, Squillaro T, *et al.* *In vitro* senescence of rat mesenchymal stem cells is accompanied by downregulation of stemness-related and DNA damage repair genes. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(7): 1033-1042
- [13] Yew T L, Chiu F Y, Tsai C C, *et al.* Knockdown of p21(Cip1/Waf1) enhances proliferation, the expression of stemness markers, and osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Aging Cell*, 2011, **10**(2): 349-361
- [14] Alessio N, Squillaro T, Cipollaro M, *et al.* The BRG1 ATPase of chromatin remodeling complexes is involved in modulation of mesenchymal stem cell senescence through RB-P53 pathways. *Oncogene*, 2010, **29**(40): 5452-5463
- [15] D'Ippolito G, Howard G A, Roos B A, *et al.* Sustained stromal stem cell self-renewal and osteoblastic differentiation during aging. *Rejuvenation Res*, 2006, **9**(1): 10-19
- [16] Kohsaka S, Sasai K, Takahashi K, *et al.* A population of BJ fibroblasts escaped from Ras-induced senescence susceptible to transformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **410**(4): 878-884
- [17] Ohmine S, Squillace K A, Hartjes K A, *et al.* Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. *Aging (Albany NY)*, 2012, **4**(1): 60-73
- [18] Beltran A S, Rivenbark A G, Richardson B T, *et al.* Generation of tumor-initiating cells by exogenous delivery of OCT4 transcription

- factor. *Breast Cancer Res*, 2011, **13**(5): R94
- [19] Tsai C C, Su P F, Huang Y F, *et al.* Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell*, 2012, **47**(2): 169–182
- [20] Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, *et al.* Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer*, 2012, **130**(11): 2568–2579
- [21] Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, *et al.* Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy*, 2010, **12**(7): 881–887
- [22] Klepsch S, Jamnig A, Trimmel D, *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human bone and long-term cultivation under physiologic oxygen conditions. *Methods Mol Biol*, 2013, **976**: 99–109
- [23] Shu J, Wu C, Wu Y, *et al.* Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell*, 2013, **153**(5): 963–975
- [24] Nakada D, Levi B P, Morrison S J. Integrating physiological regulation with stem cell and tissue homeostasis. *Neuron*, 2011, **70**(4): 703–718
- [25] Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(6): 656–670
- [26] Yu K R, Kang K S. Aging-related genes in mesenchymal stem cells: a mini-review. *Gerontology*, 2013, **59**(6): 557–563

The Expression Levels of The Stem Genes and Aging-related Genes Are Associated With Mutual Antagonism*

XIE Zhen-Hua**, WU Yao-Jiong**

(The Shenzhen Key Laboratory of Health Sciences and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

Abstract The aging of adult stem cells has been researched by the traditional theories and methods of the aging of somatic cells and the unique role of the self-renew and the stem genes of adult stem cells has been ignored by now in the aging of adult stem cells. The down-regulation of stem genes may be the major cause of the aging of stem cells. By analysis of the relevant information, we found that the expression levels of the stem genes and aging-related genes are associated with mutual antagonism which can be reflected in the following four aspects: The aging of stem cells is accompanied by down-regulation of the stem genes; The aging of cells is inhibited by the expression of the stem genes; The stem genes inhibits the expression of aging-related genes; The knockdown of an aging-related gene enhances the expression of the stem genes. The conclusion in this review that the expression levels of the stem genes and aging-related genes are associated with mutual antagonism provides a solid molecular basis of the viewpoint that the aging of adult stem cells may originate from the decline of stemness.

Key words adult stem cells, aging, stemness, stem gene, aging-related gene

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00310

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (U1032003).

**Corresponding author.

XIE Zhen-Hua. Tel: 86-755-26036381, E-mail: xiezh@sz.tsinghua.edu.cn

WU Yao-Jiong. Tel: 86-755-26036348, E-mail: wu.yaojiong@sz.tsinghua.edu.cn

Received: July 28, 2013 Accepted: November 19, 2013