

衰老的生命周期程序驱动学说

黄必录

原始多能干细胞被誉为生命的种子,而红骨髓则是生命种子的仓库。红骨髓会随着年龄的增长而逐渐减少,当生命种子的源泉枯竭到一定程度时,油灯自熄,我们就是这样衰老死亡的!老兄,别怕,咱有办法了……。

本文先回顾一些有利于理解衰老学说的知识,提出衰老的“生命周期程序驱动学说”,然后再讨论一些有关细胞衰老和细胞分化的问题,以便于进一步理解最后介绍的去衰老方法。衰老生物学的最终目的是征服衰老,但一般人都会认为,衰老是自然规律,是不可抗拒的!我却不以为然,因为在自然情况下,水只能往下流,人只能走向衰老,这就是所谓的自然规律!然而,人为用水泵能够使水往高处流,由此推论,让衰老逆转有什么不可能呢?

一、衰老概述

随着年龄的增长,我们的黑发会逐渐变白,皮肤皱纹逐渐增多,视力、记忆力以及对微生物的抵抗力会逐渐下降,同时,癌症、糖尿病、心脑血管病的发病率也会逐年上升,每个生命个体的这种变化称“个体衰老”;由于个体、系统、器官及组织都是由细胞组成的,因此,个体、系统、器官及组织的衰老归根结底是由“细胞衰老”所致;但是,细胞衰老并不等于个体衰老,个体衰老也并不等于细胞衰老。在年轻的个体和衰老的个体中,每时每刻都会有一些细胞正在新生,同时也有一些细胞正在发生衰老死亡。老年人与年轻人的区别是:老年人组织中衰老的非干细胞的数量比年轻人多;老年人组织中的成体干细胞比年轻组织中的成体干细胞更衰老;老年人组织中的成体干细胞的数量比年轻人少。但是,导致老年人比年轻人衰老的

决定因素是成体干细胞本身的内在变化,即老年人组织中的成体干细胞比年轻人衰老一些,而非干细胞的数量少一些。据此,导致个体衰老的原因归根结底是成体干细胞本身发生了内在的增龄性的变化。

衰老的表现就是生理生化功能发生退化和改变,并且始终贯穿整个生命周期。以肝细胞为例,在胎儿期,退化的是随着胎龄的逐渐增长,肝脏中甲胎蛋白的合成能力会逐渐下降;改变的是白蛋白的合成能力逐渐上升。在老年期,随着年龄的增长,退化的是老年人白蛋白的合成能力在逐渐下降;改变的是一些晚期基因表达能力逐渐上升。但通常所说的衰老是指个体在达到性成熟后发生的一系列的生理生化功能的退化和改变。

人们通常把“衰老原因”与“衰老机制”混为一谈,这必须加以区分。“因”是对“果”而言,一种因产生一定的果。这种导致某一特定结果的因称为原因或动因。而机制则是由因到果过程中的反应顺序和方式(郑集)。举个例子:端粒缩短的结果是导致细胞功能发生退化和改变,即“端粒缩短是导致细胞衰老的原因或动因”;而衰老机制则是要阐明端粒 DNA 是如何缩短的,端粒缩短如何引起甲胎蛋白合成能力发生下降的,以及白蛋白合成能力是如何发生上升的具体过程和原理。

由此可见,现在学术界中讨论的衰老原因可分为“衰老的真正原因”与衰老的“虚假原因”。我们常见的“衰老原因”中,有的是衰老的真正原因,而大部分只是衰老过程产生的一些伴生现象,也就是说,有的是引起衰老的动因,有的则是衰老产生的结果。某些衰老的伴生现象会加速细胞衰老,有些伴生现象虽然不会加速细胞衰老,但是会

妨碍细胞和个体的生理功能。例如,在衰老的端粒学说与自由基学说中,自由基可以加速端粒缩短速率,端粒缩短后反过来又会降低自由基清除酶的合成速率。这就要区分哪一种造成细胞衰老的真正原因,哪一种造成细胞衰老的虚假原因了。

采用“追问分析法”的思考方式,能帮助我们找到导致衰老的真正原因。如:在儿童的细胞或癌细胞中,被自由基破坏掉的生物大分子如蛋白质,会很快被分解和更新掉,但随着年龄的增长,体细胞的这种更新能力和分解能力会逐渐发生下降,以及自由基活动会逐渐发生增强,因此,细胞和个体才会逐渐地发生衰老。当然,如果能够保持这种分解和更新率不变,细胞和个体就不会发生衰老了。问:为什么细胞对蛋白质的更新能力和分解能力会随着年龄的增长而逐渐发生退化及自由基活动会逐渐发生增强?答:因为各种蛋白质和酶的合成速率发生下降了,以致使蛋白质更新和降解速率发生下降,而清除自由基的酶类合成速率的下降就会造成自由基活动加剧。问:那么蛋白质和自由基清除酶的合成速率为什么会随着年龄的增长而逐渐下降?答:染色体组蛋白与 DNA 结合的紧密度会随着年龄的增长而逐渐上升,以致使基因的转录效率发生下降,从而使蛋白质和酶合成速率发生下降。问:为什么染色体组蛋白与 DNA 结合的紧密度会随着年龄的增长而逐渐上升?答:染色体组蛋白总乙酰化水平下降是导致组蛋白与 DNA 结合的更紧密的原因。问:染色体组蛋白总乙酰化水平为什么会随着年龄的增长而逐渐下降?答:组蛋白乙酰化酶活性会随着年龄的增长而逐渐下降,从而使染色体组蛋白总乙酰化水平发生下降。问:为什么组蛋白乙酰化酶活性会随着年龄的增长而逐渐下降?答:细胞的端粒长度缩短或端粒酶的活性下降会导致组蛋白乙酰化酶的合成速率发生下降,例如,癌细胞由于可以保持较长的端粒或端粒酶的活性,因此,癌细胞染色质组蛋白乙酰化程度较高,染色质能保持疏松状态,基因的转录活性自然就高。至此,我们就找到了导致细胞衰老的真正原因——端粒缩短。剩下要解决的是机制问题了,如端粒是如何缩短的?端粒是通过什么因子的介导来影响组蛋白乙酰化酶基因表达活性的?等等。在以上的反复追问过程中的后一个问题的“果”,都是前一个问题的“因”,因此,这些“因”都不是真正

的因而是某一原因下的结果。通过反复的追根求源,才能寻找找到真正的因。

为了使细胞中的蛋白质合成的速率能够随着年龄的增长而逐渐下降,从而让细胞的活力能够逐渐发生退化,细胞中就必须有一个能够随着年龄的增长而逐渐发生量变的蛋白质合成速率的控制机构,才能使蛋白质合成速率随着年龄的增长而逐渐发生下降。目前,端粒是细胞中已知的具有逐渐量变特征的蛋白质合成速率的控制机构。

综上所述认为,端粒缩短是导致细胞衰老的真正原因或动因,而自由基活动则是衰老的虚假原因,或者说自由基所导致的细胞损伤逐渐增强是端粒缩短的结果、自由基所导致的细胞损伤随着年龄的增长而增强只是衰老的一种伴生现象。如果衰老的细胞端粒能够得到延伸,或端粒酶活性能够增强,自由基损伤等等衰老的伴生现象会一直被控制在适度范围内,而不会造成细胞或机体的衰老。

衰老学说不解决,就难以找到去衰老的科学依据,目前衰老学说众说纷纭,但大多只是指出一些衰老的现象而缺乏严密的逻辑论证,我们必须一一加以甄别,以便找到导致衰老的真正原因。只有找到导致衰老的真正原因,我们才能少走弯路,以便集中人力、物力和财力,攻破衰老王国的最后堡垒。而采用“追问分析法”,我能够把所有的所谓的衰老学说进行辨明是非、逐一排除。

二、细胞的增殖、分化及衰老的概念

一个细胞分裂成两个一模一样的细胞称为“细胞增殖”;一个细胞分裂成两个子细胞,有一个或全部的子细胞的性状与母细胞不一样,称为“细胞分化”。干细胞的自我更新、自我复制就是通过细胞增殖来完成的。

随着年龄的不断增长,个体细胞的新陈代谢率和增殖率会不断下降,称为“细胞衰老”或“细胞老化”,主要表现为“细胞活力”的下降。细胞活力包括“功能活力”和“增殖活力”。因此,细胞的增殖、分化及衰老是完全不同的概念。

那么是什么因素导致细胞活力随着年龄的增长而不断下降的呢?

三、细胞衰老是基因表达活性的下降

细胞功能活力的下降主要是奢侈基因(luxury

gene) 转录活性的下降; 细胞增殖活力的下降主要是管家基因 (house-keeping gene) 转录活性的下降。细胞衰老时, 奢侈基因和管家基因的转录活性都在下降, 因此, 随着细胞的衰老, 细胞的功能活力和增殖活力都会下降。随着细胞的不断衰老, 染色质组蛋白总的乙酰化水平也在不断下降, 使组蛋白与 DNA 结合得更紧密, 从而降低了各种基因的转录活性。组蛋白乙酰化酶与组蛋白脱乙酰化酶的比值决定了组蛋白的乙酰化程度。细胞衰老时, 组蛋白乙酰化酶和组蛋白脱乙酰化酶的活性都下降, 因此, 衰老不是组蛋白脱乙酰化酶活性上升所致, 而是组蛋白乙酰化酶活性下降所致。

四、端粒是决定细胞衰老的初始因素

在人类细胞染色体的两端各有一条 (TTAGGG)_n 的重复序列 DNA, 称为“端粒”。在生殖细胞的精子中, 端粒的长度为 15kb。从胚胎发育开始, 体细胞的端粒 DNA 会随着细胞的有丝分裂而逐渐丢失, 细胞每分裂一次, 端粒就会缩短约 50~65bp, 在衰老的体细胞中, 端粒的长度大约只剩 6~8kb, 此时, 细胞的活力已下降到无法维持正常的运转, 细胞就变得非常虚弱, 直至死亡。因此, 人们会想, 端粒与衰老是否有关? 现已有很多证据表明, 端粒与衰老关系密切。

细胞的生理状态分“功能态”和“增殖态”, 在功能态的体细胞中, 不具端粒酶的活性, 因此, 细胞的功能活力只跟端粒长度呈正相关; 在增殖态的癌细胞中, 虽然端粒长度大约只有正常体细胞的 1/3, 但端粒酶活性却很高, 因此, 细胞的增殖活力只跟端粒酶的活性呈正相关。

如果功能态的体细胞转为增殖态, 端粒酶的活性也会升高; 如果抑制增殖态的癌细胞或体细胞中的端粒酶, 细胞就会停止增殖。因此, 在通常情况下, 细胞的功能活力只与端粒长度有关, 而细胞的增殖活力只与端粒酶活性有关。

在正常的体细胞中端粒酶的活性又与端粒的长度呈正相关。因此, 成体干细胞随着细胞有丝分裂次数的增加, 端粒越来越短, 细胞的功能活力、端粒酶的活性和细胞的增殖活力都会跟着不断下降。

由于染色质组蛋白乙酰化水平与基因转录活性有关, 因此, 细胞衰老所致的基因转录活性的下降是由端粒通过影响组蛋白乙酰化水平来实现的。丛

羽生教授发现, 单是端粒酶催化亚基就可促进血管内皮生长因子基因转录。而生长因子可激活组蛋白乙酰化酶。因此, 端粒和端粒酶都可以影响组蛋白乙酰化水平。或者说, 端粒越短, 端粒酶的活性也就越低, 细胞中的组蛋白乙酰化酶的活性也跟着降低, 故基因的转录活性也越低。

由于端粒的长度或端粒酶的活性与细胞活力呈正相关, 因此, 在端粒酶活性很高的癌细胞中, 虽然端粒的长度只有正常细胞的 1/3, 但细胞活力却和胚胎细胞一样高。也就是说, 端粒酶能够代偿端粒的部分作用。但端粒酶的活性要受到端粒长度或癌基因的调控, 而不能自作主张, 再说癌基因又不会像端粒那样随着细胞的衰老而发生量变, 因此, 决定衰老的初始因素还是端粒, 而非端粒酶。

端粒在胚胎早期就开始缩短了, 因此, 基因转录活性的下降也是从胚胎早期开始的, 也就是说, 细胞在胚胎早期就开始衰老了。

精子干细胞的端粒只有 8~9kb 左右, 由于细胞衰老是由端粒决定的, 因此, 作为生殖细胞的精子必须要再度延伸端粒 (返老还童), 以供应将来发育成个体过程中细胞分裂对端粒的消耗。

于是, 精子干细胞在一次减数分裂的激活下, 端粒迅速延伸到了 15kb。

五、端粒缩短时会促进细胞分化和启动细胞分化

细胞的分化与增殖两者是对立统一的, 也就是说, 抑制细胞增殖, 就会促进细胞分化; 促进细胞增殖, 就会抑制细胞分化。由于端粒酶的活性与端粒长度呈正相关, 而且端粒酶具有促进细胞增殖的效应。因此, 端粒缩短时, 端粒酶的活性就会下降, 细胞增殖就会受到抑制, 细胞的分化率相对必然要升高, 也就是说, 端粒缩短有促进细胞分化的效应。

细胞分化时, 为了保证组织特异性基因能够百分之百地开启或关闭, 在每次细胞分裂前, 细胞要先积蓄一定量的调节分化的蛋白质 (或决定子), 过少不行, 过多浪费。但促进细胞增殖的因素会通过缩短细胞分裂周期, 使用于积蓄的时间缩短, 当积蓄时间缩短到一定程度时, 调节分化的蛋白质就会在还没有积蓄到足够量时细胞就分裂了, 以致使子细胞不能发生分化; 相反, 当抑制增殖的因素使

细胞分裂周期延长到能够积蓄到足够的调节分化的蛋白质时, 分裂后的细胞就会启动细胞分化程序, 使细胞向前进一步地发生分化。

此外, 促进细胞增殖的因素有可能会抑制调节分化的蛋白质的积蓄速度, 再加上调节分化的蛋白质存在着半衰期, 这也可降低调节分化的蛋白质的积蓄速度, 从而影响细胞分化的启动和细胞的分化率。

假设 A 细胞在调节分化的蛋白质 C 的作用下分化成 B 细胞:

一开始, A 细胞要先积蓄一定量的 C 蛋白, 但由于端粒较长, 端粒酶的活性因此也较高, 细胞分裂周期较短, 降低和抑制了 C 蛋白的有效积蓄, 当端粒缩短到某一阈值时, 就可以积蓄到足够量的 C 蛋白, 使 A 细胞成功地分化成 B 细胞, 即启动细胞分化; 随着端粒的逐渐缩短和端粒酶活性的逐渐下降, C 蛋白的积蓄速度也得到了加快, 因此, A 细胞分化成 B 细胞的分化率也在逐渐升高, 即促进了细胞分化。依此类推, 每一级的细胞分化情况都是这样。也就是说, 随着端粒的一步步缩短, 就会启动细胞一级一级地向前分化下去, 分化率相对会逐渐上升。同时, 细胞的增殖率也会逐渐降低。此外, 不同长度的端粒会影响某基因表达速率 (见本文十一、1), 比如影响某调节分化的蛋白质的合成速率, 以此决定细胞 A 在某一时刻某种条件下启动分化成细胞 B。

由于端粒缩短能提高细胞的分化率, 因此, 组织中的成体干细胞的基数就会随着年龄的增长而不断下降, 直至某些组织中的某些成体干细胞完全消失。细胞分化时, 细胞中的端粒酶活性会下降, 从而促进细胞衰老。而高度恶性的癌细胞由于端粒酶或端粒保持在较高的水平, 细胞就停止了衰老和分化; 胚胎发育过程细胞分化最频繁, 因此, 胚胎期细胞端粒的缩短速度高于成人期和老年期。

如果端粒过短, 细胞分化启动时间会提前, 分化率会提高, 这就会减少细胞数量, 这对于有严格细胞数和时空顺序的胚胎发育来说, 可能会影响胚胎发育的正常进行, 因此, 就要选择有一定长度端粒的受精卵。波士顿 Tufts - New England 医学中心的 David Keefe 发现可以说明这一推测, 卵子染色体端粒较短的妇女很少能产生试管婴儿。平均端粒长度短于 6300DNA 单位的妇女则不能够怀孕。

当然, 癌细胞也能分化, 如胚胎癌细胞 (EC 细胞) 可分化成多种类型的细胞, 但前提是端粒酶活性必须要下降, 即牺牲了增殖力; 全反式维甲酸会通过降低端粒酶的活性, 从而抑制细胞增殖, 促进细胞分化, 现在已用它来让癌细胞分化成正常细胞。

六、细胞分化不是导致个体衰老的原因

衰老的基因阻遏平衡论 (吕占军, 1992) 认为, 细胞通过进一步分化, 使原先表达的上级基因群受到阻遏, 转而表达下级的基因群, 由此使细胞丧失维持个体原有的正常的生理功能, 从而造成个体衰老和死亡。实际上, 人从胚胎期第 18 周到老年期, 细胞的种类基本上是恒定或有减无增, 不会再进一步地分化出其它类型的细胞, 因为胚胎发育从第 10 周开始到 18 周 T 细胞和抗原相互作用导致对抗原产生永久的无反应性 (或称耐受性)。假如从 18 周后到老年期的任何阶段都会分化出新的类型细胞, 由于新的类型的细胞都会合成出一些没有经过免疫耐受的抗原, 从而会引发不必要的免疫排斥反应。因此, 如果衰老是细胞进一步分化造成的, 分化产生的新的类型的细胞就会表达胚胎期免疫没有识别过的新抗原, 并诱发免疫排斥反应, 而事实并非如此。

七、不再分裂的终末细胞的端粒也会缩短

基本不再进行分裂的终末细胞的氧化酶等酶的活性也会逐年下降。如果基因的表达活性的下降是端粒缩短造成的, 那么, 不分裂的终末细胞的端粒应该也会缩短。

研究已发现, 细胞培养在 40% 氧气中时很快停止生长, 同时端粒缩短了, 显示不经细胞分裂端粒 DNA 也可丢失, 也许是氧化应激导致端粒单链 DNA 断裂所致 (Von Zglinicki 等人, 1995; Von Zglinicki, 1998)。体内的终末分裂细胞在新陈代谢过程中, 也会或多或少地产生各种自由基, 从而引起氧化应激使端粒单链 DNA 断裂, 虽然氧化应激没有培养在高浓度氧气下的细胞那么强烈, 但经长年累月, 不分裂的终末细胞的端粒也会慢慢地缩短。

在探讨个体衰老的原因时, 我们并不需要完全了解终末细胞等非干细胞衰老死亡的确切机制, 从

个体水平来说,无论这些细胞是怎样衰老死亡的,也不是导致个体衰老的原因,因为由端粒缩短、DNA 突变、病毒感染或细胞垃圾累积等原因而导致死亡的非干细胞可以由成体干细胞通过分化来填补,只要成体干细胞保持不变的增殖活力,成体干细胞因各种原因死亡就不是造成个体衰老的原因,因为死亡掉的成体干细胞也可以由成体干细胞通过自我复制来填补。事实上,人体每天都有大量的干细胞和非干细胞因各种原因而死亡,同时也有差不多等量的细胞填补。也就是说,个体的衰老与细胞死亡无关;或者说人体的衰老不是像机器那样是由磨损造成的。

八、细胞长生不老并不等于能使个体长生不老

由于细胞衰老与端粒酶活性的丧失有关,因此,保持细胞一定的端粒酶活性就能够使细胞返老还童和长生不老。通过向细胞导入端粒酶催化亚基基因,现在已经能够使体外培养的体细胞长生不老,无限分裂了。因此,很多人就高兴地认为,只要设法让人体内的体细胞高表达端粒酶,人就可以实现长生不老。我认为这未免高兴得太早了,因为体细胞长生不老不等于能够使个体长生不老,其结果恰恰适得其反,归其原因有:(1)个体中的成体干细胞需要通过细胞分化来填补因各种原因而损失的各种非干细胞,由于端粒酶高表达的细胞的细胞分化的功能受到了抑制,不能再分化成其它类型的细胞,这对个体是要命的;(2)端粒酶高表达的细胞会长期处于增殖态,功能活力会丧失殆尽,如果大部分体细胞处于增殖态,也会要个体的命;(3)端粒酶高表达的成体干细胞,端粒并没有获得净延伸,如许多有着高活性端粒酶的癌细胞,端粒的长度只有正常的体细胞的 $1/2$ 或 $1/3$,如果撤去激活端粒酶的措施,成体干细胞的衰老程度马上会恢复到供体水平,因此,根本上不会使个体保持年轻态;(4)个体内的成体干细胞何时增殖、何时休息(停滞在 G_0 期)等等都是受到整体调控的,而人为让成体干细胞保持高活性的端粒酶,成体干细胞就会不受约束地不停增殖,即使成体干细胞没有发生癌变,其行为和癌细胞也没有多大的区别,这同样会对个体造成致命伤害。

由于端粒酶的活性与端粒的长度呈正相关,因此,如果让个体内的成体干细胞的端粒保持恒定的

长度,产生的后果和上述是一致的。为此,保持有端粒酶活性的成体干细胞,端粒只能不断地缩短。

九、任何器官组织都有负责为它补充各种细胞的干细胞

包括大脑在内的任何器官组织,每天都有大量的细胞因 DNA 突变、病毒感染、端粒缩短及细胞垃圾堆积等原因而凋亡(死亡),人体每天都有 $1\% \sim 2\%$ 细胞死亡(不到 100 天体细胞更新一次),但同时也有等量的细胞通过增殖和分化来填补,因此,个体衰老不是由细胞死亡造成的。这一现象向我们提示:个体的任何器官组织都有负责为它补充各种细胞的干细胞。

很多低等动物都有很强的再生能力,水螅身体的碎片能再生为完整的个体;涡虫身体 $1/100$ 的切片也能再生为完整的个体;蜗牛饥饿时,可自消化内部器官及肌肉作为营养,一旦获得食物,各器官肌肉可再生复原。这是因为在这些动物的组织中含有“全能成体干细胞”。如果人体也含有这种干细胞,那么只要让一种全能成体干细胞返老还童,整个个体就会跟着发生返老还童,这样,去老化技术将变得可行并非常简易。

小鼠被用致死量的放射线照射时,包括骨髓在内的全身所有的器官组织中的成体干细胞都会被射线杀死,但只要移植红骨髓就可以让小鼠活下来,这提示红骨髓中也许有一两种干细胞可以分化成个体所有器官组织中的成体干细胞。福建师大傅文庆教授认为,骨髓干细胞是成体干细胞中心,可以支援或分化成机体其它所有器官组织的各种各样的成体干细胞,例如,骨髓间充质干细胞能够分化成胰腺干细胞、神经干细胞、内皮祖细胞(血管干细胞)。

骨髓是成体干细胞中心的理由:(1)骨髓干细胞具有远距离的迁移功能,骨髓干细胞包括造血干细胞、内皮祖细胞、间充质干细胞等,在个体发育的胚胎早期,骨髓腔还没有形成时,这些干细胞最早在卵黄囊出现,例如,卵黄囊就含有造血干细胞、内皮祖细胞、间充质干细胞,然后这些干细胞从卵黄囊迁移到肝脏,例如,胎肝就含有造血干细胞、间充质干细胞等干细胞。然后迁移到脾脏,等骨髓腔发育成时,就迁移到骨髓中永久居住下来。而器官组织中的组织干细胞就没有迁移功能,也不

需要迁移,如心肌源干细胞、胰腺干细胞等器官组织的干细胞在器官中就比较固定;(2)骨髓中的干细胞几乎可以分化成个体中的所有类型的细胞,包括干细胞;(3)骨髓中的造血干细胞、间充质干细胞和内皮祖细胞在生理情况下可以进出骨髓到血液,并随着血液循环到全身所有的器官组织去巡逻,发现那些器官组织的细胞需要更新修复,就会分化出相应的细胞来更新修复;因此可以说,红骨髓是人体的干细胞中心,干细胞银行。

美国和日本科学家在鼠类、人类骨髓中,分别发现两种接近于全能的成体干细胞,称迈阿密细胞(Miami 细胞)和缪斯细胞(Muse 细胞),它们也能分化为具有内脏中胚层、神经外胚层和内胚层特征的细胞。但遗憾的是这些全能成体干细胞的数量太少,增殖缓慢,而且在老年人体内含量更低。

为何增殖和分化潜能越大的干细胞,在组织中的数量就越少?这是因为细胞经过多次几何倍增,会变成天文数字,因此,干细胞无需太多,以免造成不必要的浪费,生物最懂得节约。传说古印度有一个慷慨的酋长,问一个向他乞讨的乞丐要多少谷物,乞丐说,只要您在象棋盘的 64 个方格中的第一格放 1 粒谷物的种子,第二格放 2 粒,第三格放 4 粒……。酋长觉得这乞丐要求太低了,于是叫下去人去按照要求去放,结果发现这样放下去是天文数字,放到 64 格是 10 的后面加 19 个 0,用尽全世界所有的谷物种子都不能放满。而胚胎成体干细胞差不多能够分裂 50~60 次。

干细胞年龄越小,增殖代数和分化潜能就越大,增殖力就越旺盛,例如,胎肝中的造血干细胞和间充质干细胞的增殖代数和分化潜能,以及增殖旺盛程度就比成人骨髓中的干细胞大。因此,干细胞越幼稚,移植用量就可以越少。

人体衰老是由组织中的成体干细胞衰老造成的,而成体干细胞衰老则是由端粒缩短造成的。因此,移植成体干细胞有可能使人体中的器官组织恢复青春,现在经常看到报道干细胞移植使肝功能恢复、肾功能恢复、胰腺功能恢复的报道。但不要高兴得太早,因为用的干细胞是同种异体或自体的,效果不持久,因为同种异体的细胞会慢慢被宿主排斥掉,自体的干细胞本身和自体一样会衰老。因为衰老的成体干细胞的增殖(自我更新)和分化能力较年轻的成体干细胞低,因此,用自体的成体干

细胞治疗个体衰老,由于取自自体的成体干细胞有着和自体一样的年龄,再加上培养增殖,端粒会进一步缩短,移植这样的自体成体干细胞,不但不能逆转机体衰老,反而会使机体更加衰老。

原始多能干细胞被誉为生命的种子,而红骨髓则是生命种子的仓库。红骨髓会随着年龄的增长而逐渐减少,当生命种子的源泉枯竭到一定程度时,油尽灯灭,我们就是这样衰老死亡的!

十、个体的生长发育成熟衰老是一种程序

每种生物从孕育生长到成熟衰老都有一个相对稳定而有序的时间表,因此,衰老不可能是细胞 DNA 突变累积中毒或磨损一类带有时空偶然性的因素造成的,而应该是一种有选择性和计划性的程序,基因也是按照程序化进行时空表达的。

从受精卵到个体老化死亡的周期称为“生命周期”,由于每一种生物的生命周期都是比较有序的,因此这是一种程序,我把它称为“生命周期程序”。

细胞一级一级地向前分化下去,并顺序地表达出不同的基因,这是一种程序;同一分化类型的细胞在端粒缩短过程中,不但基因总的转录活性在下降,而且不同基因表达活性的高低也是有先后顺序的,这也是一种程序。

基因表达的程序化现象称基因的顺序表达(sequential expression)或差次表达(differential expression)。

十一、衰老的生命周期程序驱动学说

我们知道,要使记录在程序载体中的指令信息实现程序化读取或顺序读取,就必须要使程序载体不断地位移。因此,要使计算机中存储在硬盘中的程序运作起来,硬盘驱动器中就要设置一台电动机,由电动机产生的力来驱动硬盘旋转。同样道理,要使生命周期程序运作起来,即实现基因的顺序表达,也需要一种力来驱动。驱动计算机程序运作的力来自电动机,是机械力。那么,驱动生命周期程序运作的力来自哪里呢?是什么力?只有弄清这个问题才能找到彻底征服衰老的方法。

1. 不同长度的端粒决定着相同的基因具有不同的表达活性

胚胎发育到 18 周后细胞类型基本不再增加,

但基因的差次表达或者说是顺序表达仍然在不断地进行着,因此,从 18 周后到老年期,基因顺序表达的变化不是因为细胞不断的进一步分化造成的。已发现,在相同分化类型的细胞中,不同长度的端粒决定着相同的基因具有不同的表达活性,基因的表达只有量变而没有质变(已有很多证据)。假设某种分化类型的细胞,染色体上的 3 个基因 A、B、C 都有表达潜力,端粒长度在 14~13kb 时主要表达基因 A,而 B 和 C 处于接近关闭状态;端粒长度 12~9kb 时,主要表达基因 B,而 A 和 C 处于接近关闭状态;端粒长度 8~6kb 时,主要表达基因 C,而 A 和 B 处于接近关闭状态。在细胞整个生命周期里,端粒缩短有一时间历程——“端粒缩短时间轴”,当端粒沿着时间轴从起点到终点连续地逐步发生缩短时,基因表达也沿着时间轴方向连续性地发生量变,这和电动机驱动计算机程序载体连续位移相似。因此,端粒的作用相当于计算机程序驱动器中的电动机。驱动生命周期程序运作的力来自端粒沿着时间轴从起点到终点发生长度的动态量变,这种力的本质是化学信号物质沿着时间轴产生的浓度梯度差。

如果基因 B 的产物是调节细胞分化成某种类型细胞的调节分化的蛋白质,早期衰老即端粒缩短就有利于这些调节分化的蛋白质的积蓄,因此,细胞衰老不但会促进细胞分化,而且还会启动细胞分化。当一种细胞分化成另一种细胞时,就会合成新的蛋白质,因此,基因表达就会从量变转变为质变。

人的肝细胞在胎儿期主要表达甲胎蛋白,出生后到成年期就逐渐把甲胎蛋白基因关闭,转而主要表达白蛋白,到了老年期,白蛋白基因也逐渐关闭了,同时一些晚期基因的表达活性在逐渐上升。由于端粒长度不断地缩短,肝细胞中的各种基因表达量的谱也会跟着不断变化,这相当于端粒在驱动着肝细胞不同的基因进行顺序表达;衰老导致的毛发变白是因为毛囊细胞停止合成黑色素的酶。这和端粒缩短引起白蛋白基因关闭应该是同一机制,因此可以说端粒缩短是造成毛发变白的根本原因。

端粒如何驱动基因进行顺序表达是个诺贝尔奖项的课题,其具体过程有两种可能:(1)已经发现,基因中的 DNA 甲基化水平有一部分会随着细胞衰老而发生动态变化,例如,细胞衰老会使

DNA 甲基化水平下降,但用 SV40 感染及大 T 抗原(两者都会激活端粒酶)逆转细胞衰老时,甲基化水平会重新上升(Matsumura 等人,1989,见本文十二、1,2),在同一基因,因为衰老程度的不同,甲基化程度也会随着改变,由于不同的甲基化程度可以具有不同的表达活性,一般来说,启动子甲基化具有阻遏基因表达的作用,内含子甲基化具有促进基因表达的作用,因此,随着 DNA 甲基化水平的下降,有的基因表达活性会上升,有的则下降;(2)某些能够同时正调节和负调节多个基因转录的调节因子的基因,它的表达活性的变化与端粒长度(或端粒酶活性)呈正相关,这样,随着端粒的不断缩短,基因必然就会进行顺序表达。例如,myc 基因的产物具有转录子作用,它的活性与端粒长度或端粒酶活性呈正相关,而且 myc 能够同时正调节和负调节多种基因表达,如 myc 可同时正调节 α -胸腺素的转录、hsp70 启动子转录和负调节金属硫蛋白转录、前 $\alpha 2$ 胶原蛋白和 neu 基因启动子转录。这样,当 myc 表达活性上升时, α -胸腺素等基因表达活性也在上升,相反,此时金属硫蛋白等基因的表达活性却在下降。如果端粒不断延长,基因的顺序表达就会发生倒退,即程序开倒车。

同一分化类型的细胞,因为端粒长度或端粒酶活性的不同,基因表达量的谱也不同,出现了和细胞分化一样产生的新型细胞,这种现象是一种内容不实的“伪分化”,按照这一推论,人体细胞的分化类型就没有 200 多种了。再按照这一推论,在骨髓中,不同功能的间充质干细胞,它们之间的差别可能仅仅是端粒长度的不同。

同样是属于间充质干细胞的缪斯细胞(缪斯细胞的多向分化潜能几乎可以和胚胎干细胞相媲美),与其它的间充质干细胞相比,其多向分化潜能却不一样,缪斯细胞可以比其它的间充质干细胞分化更多类型的细胞,造成这种多向分化潜能差异的原因是什么?是细胞固有的分化差别?还是因为端粒长度的不同(目前一般认为是细胞固有的分化差别决定的)?

很多干细胞发生癌变时,由于端粒酶活性的大幅度升高,就会恢复表达胚性蛋白。造血干细胞可分为两个亚群,一个具有高度的长期重构潜能,另一亚群较低的长期重构潜能。具有高度的长期重构

潜能的造血干细胞已被发现具有癌细胞相当的端粒酶活性。但是,成体干细胞在自我更新和分化过程中发生反复的对称性和非对称性分裂,可以导致端粒缩短,随着干细胞的端粒越来越短,端粒酶的活性也会越来越低(Allsopp 等人,1992;1995;Vaziri 等人,1994;Hiyama 等人,1995;Hodes,1999),长期的重构潜能就会丧失;Gronthos (2003) 向人的间充质干细胞导入端粒酶催化亚基,细胞传代 80 次,多向分化潜能可以保存 40 代,而没有导入端粒酶催化亚基的对照组,多向分化潜能只能保持到第 18 代,在 18 代后就逐渐丧失。有人发现,端粒酶缺乏的间充质干细胞,不能分化成脂肪和软骨细胞。但是,这些依据只能说明保持端粒酶活性能够延长成体干细胞多向分化潜能的代数,而不能说明已经失去多向分化潜能的成体干细胞通过端粒长度的恢复就能使多向分化潜能得到恢复。但把上述“同一分化类型的细胞,因为端粒长度或端粒酶活性的不同,基因表达量的谱也不同”的论述一起考虑进去后,我认为,对于同一种干细胞来说,多向分化潜能的大小与端粒长度有关,即端粒越长,分化成的细胞类型就越多,反之,分化成的细胞类型就越少。据此,只要端粒延伸到一定长度,骨髓中的一般间充质干细胞也可以转化为缪斯细胞。如果这一猜测得到证明,比发明制造 iPS 细胞更有价值,是个诺贝尔奖级的成果。

细胞分化导致的基因顺序表达具有很高的稳定性,因此,一般是不可逆的。而由端粒介导的基因顺序表达具有高度可逆性,可随着端粒缩短或延长或端粒酶的活性高低而发生前进或倒退。例如,给成年动物的不同体细胞添加生长因子(可激活端粒酶)或端粒酶激活剂就会恢复表达胚胎期特有的蛋白质,如肝细胞恢复更多地表达甲胎蛋白。撤去生长因子或端粒酶激活剂,又会恢复表达白蛋白。

必须提醒的是,以往总是把由端粒或端粒酶介导的基因顺序表达与细胞分化导致的基因顺序表达混为一谈,这是错误的,两者必须加以区分,而此前的教科书没有这个理论。

2. 生命周期程序驱动学说的描述

我把细胞分化、个体发育与计算机程序原理结合起来,提出了衰老的“生命周期程序驱动学说”。简要描述如下:

一般来说,DNA 甲基化与否可以决定基因的表达与否(打开/关闭),这相当于计算机程序指令的 0 或 1(开/关),因此,在受精卵重新编写个体发育程序时,必须全部删除 DNA 上所有的甲基基团,为此,有一种称去甲基化酶的酶使卵裂期基因组全面去甲基。去甲基后的基因组就像一张白纸(空盘),就可以重新刻录程序指令了,于是,大约在胚胎植入子宫的时候,有一种称构建性甲基化酶(establishment methylase)的酶使细胞内的 DNA 重新甲基化,即重新编程,直至把生命周期的程序编写完毕。

但是,细胞中已编写好的生命周期程序,如果没有一个驱动装置,就像计算机的硬盘驱动器中没有电动机一样,就无法实现程序指令的顺序读取,即细胞的状态只能停留在某一水平上。上述已说过,端粒在缩短时各种基因表达量的谱也会跟着不断变化,以此实现了基因的顺序读取,即端粒相当于电动机一样产生了驱动力,驱动着细胞分化和细胞衰老不断地向前进行下去,并顺序地表达出不同的基因。

为了使甲基化形式相同的受精卵在分化后产生差异,卵细胞质中准备了几种称为“决定子”的调节分化的蛋白质,在细胞分裂过程中不均等地分配到子细胞,选择性地将子细胞中不同的组织特异性基因的调节区高甲基化的去甲基,或低甲基化的添加甲基(我认为细胞分化过程中,导致基因选择性表达的第一因素是 DNA 的甲基化与否),于是,子细胞中相同的 DNA 各自产生了不同的甲基化形式,以此选择性地开启或关闭不同的组织特异性基因,于是,不同的子细胞合成了不同的蛋白质,由此产生出了中胚层、内胚层和外胚层的不同类型的细胞。

在细胞增殖时,为了让子细胞保持和亲代相同的克隆,不同的甲基化形式必须要一成不变地一起复制才能保持特异的分化性状的稳定不变,为此,有一种称为“维持性甲基化酶(maintenance methylase)”的酶,通过以“甲基化维持”的方式将新的甲基化形式传递到每个子细胞的 DNA 上(复印)。

端粒的不断缩短,驱动了细胞不断地向前分化,使这些早期的分化细胞又按照各自的分化路线(或分化程序)通过体细胞中的各种调节分化的蛋

白质一步一步地修改原有的甲基化形式,即启动下级基因并关闭上级基因,合成出新的蛋白质,使一种细胞不断地向前分化成 200 多种细胞,并用 200 多种细胞构成胚胎。当胚胎发育到 18 周以后,细胞类型就不再增加了,因为在胚胎发育过程中,从第 10 周开始到 18 周,T 细胞和抗原相互作用导致对抗原产生永久的无反应性(或称耐受性),如果 18 周后细胞类型会再增加,就会有新的蛋白质合成,就会引发免疫排斥反应而毁掉这个小生命。

随着端粒的不断缩短,细胞增殖率逐渐小于分化率,使分化程度越低的成体干细胞的数量越来越少,甚至使某些成体干细胞完全消失。同时细胞中基因的总表达活性在不断下降,同时有些基因表达活性在上升,有些却在下降,以肝细胞为例,在端粒最长的胚胎期,主要表达甲胎蛋白;在端粒中等长度的成年期,甲胎蛋白停止表达,转而表达白蛋白;在端粒最短的老年期,白蛋白基因逐渐停止表达,转而表达一些对细胞有害的基因。这就是基因表达的量变程序,它可以决定你什么时候长胡子、什么时候生白发、什么时候患遗传病、什么时候白蛋白不够用、什么时候心脏停止跳动。这就是生老病死的生命过程。白蛋白是我们正常生理不可缺少的,因此,当白蛋白基因停止表达达到一定程度,机体就会停止运作,生物随即死亡,衰老、死亡大体就是这么简单。

通俗地说,当细胞活力下降到一定程度,细胞就不能应付日常事务。由于个体是由细胞组成的,因此,当大多数的体细胞的活力下降到一定程度,个体就会变得老态龙钟,直至死亡。

3. 端粒驱动生命周期程序运作的证据

半乳糖苷酶的含量在衰老的细胞内是升高的。Bordner (1998) 把端粒酶的催化亚基 hTERT 基因导入人视网膜色素上皮细胞和包皮成纤维细胞发现,细胞中的半乳糖苷酶含量就会减少,同时细胞出现年轻的表形;这相当于生命周期程序开倒车了;终末分化细胞是不能发生进一步分化的,但在个体生命中的不同时期,基因表达也不相同,已经证明这种调节受到端粒长度所左右,因为不分裂的终末细胞端粒也会缩短 (Von Zglinicki 等人, 1995; Von Zglinicki, 1998); 皮肤角质细胞可被导入的病毒癌基因 (可激活端粒酶) 逆转 (Barrandon 等人, 1989)。

作为生殖细胞的精子,端粒长度是 15kb,是人体端粒最长的细胞。当体细胞端粒长度只剩下 6~7kb 时,细胞已经衰老到启动凋亡的地步。如果把人的生命周期用一天 24 小时表示,端粒长度代表指针位置,端粒长度达 15kb 的精子就相当于 0 点,端粒只剩下 6~7kb 的体细胞就相当于 24 点。端粒长度为 12kb 就相当于中午的 12 点,也就是人的青春期。因此,如果能够把老年人的多能成体干细胞的端粒全部延长到 12kb,生命周期就会拨回到中午 12 点的青春期。

十二、细胞衰老和细胞分化有关的问题

1. 细胞衰老或抑制 DNA 甲基化的药物也会使细胞 DNA 甲基化水平下降,但是,细胞必须设法保留 DNA 上与细胞分化类型有关的基因的那部分甲基,即不能完全清除 DNA 上的甲基,否则,细胞的特异分化性状会失真。例如,反复用能抑制 DNA 甲基化的 5-杂氮-脱氧胞嘧啶 (5-aza-dC) 来降低小鼠永生细胞系 C3H10T1 / 2 的 DNA 甲基化水平时,不可能降到零 (最低到 0.45%) (Flatau 等人, 1984)。

2. 由于细胞衰老或抑制 DNA 甲基化的药物也会使细胞 DNA 甲基化水平下降,因此有人就认为 DNA 甲基化水平下降是造成细胞衰老的原因,细胞衰老的分子钟有可能是 DNA 甲基化的丢失。我认为 DNA 甲基化的丢失只是细胞衰老的一种伴生现象,而不是造成细胞衰老的原因。依据是,用 SV40 感染及大 T 抗原 (两者都会激活端粒酶) 逆转细胞衰老时,甲基化水平会重新上升 (Matsumura 等人, 1989)。

3. 由于正常的体细胞每分裂一次,端粒就会缩短一小段,因此,很多研究者认为端粒的作用是相当于细胞分裂的计数器 (时钟)。然而,癌细胞分裂时,端粒已经不会再进一步地缩短了,而细胞分裂却从来没有停下来,据此,把端粒看作细胞分裂的计数器是不正确的。

4. 随着个体越来越衰老,组织中的成体干细胞的数量就会越来越少,直到某些成体干细胞完全消失 (据此,对于高龄的老人,在治疗衰老时必须补充已经消失的某种成体干细胞)。这是因为端粒缩短会导致成体干细胞的自我更新率逐渐低于分化率。但成体干细胞数量下降不是造成个体衰老的

原因, 因为通过射线杀死动物组织中的成体干细胞, 并不会加速动物衰老速度, 而只能使动物变得虚弱。如果射线剂量低于致死量, 动物的寿命反而会延长。

5. 随着人的年龄的增加, 组织中成体干细胞的各种潜能会逐渐缩小, 这是造成老年人组织的修复能力不如年轻人的原因, 同时也是造成用成体干细胞移植治疗心脏病等疾病并不能分化成完备的心肌细胞等细胞的原因。

导致成体干细胞各种潜能缩小的原因与各种基因的表达活性谱的改变有关, 而这又与端粒的缩短有关。例如, 造血干细胞的端粒越短, 端粒酶的活性就越低, 重构造血能力和增殖能力也越低。当然, 只要端粒再度延伸, 这种退化是可逆转的。

6. 清除自由基的抗氧化剂不能改变动物的最大寿命, 原因是: 虽然抗氧化剂会增加细胞分裂次数, 但同时会缩短分裂时间。因此, 衰老的自由基学说是错误的, 自由基不是导致衰老的真正原因, 而仅仅是加速衰老的一个因素而已。

细胞衰老时, 清除自由基的酶的基因会逐渐关闭, 从而导致自由基猖獗为害。如果衰老的细胞逆转年轻, 自由清除酶的基因也会重新打开, 例如, 癌细胞中清除自由基的酶的活性和胎儿细胞一样高。

已证明自由基是通过加速端粒缩短速度来降低细胞分裂次数的。

7. 在年轻人的细胞中, 突变的线粒体 DNA 是不会累积的。此外, 在复制旺盛的干细胞中, 突变的线粒体 DNA 会发生复制分离 (replicative segregation) 现象, 使突变的 DNA 逐渐减少。因此, 线粒体 DNA 突变累积不是造成衰老的真正原因, 而仅仅是加速衰老的一个继发或伴生现象而已。因此, 衰老的突变累积学说是错误的。

8. 在个体水平上, 突变的细胞核的 DNA: (1) 可以修复; (2) 一旦修复不好就会启动细胞凋亡; (3) 如果既修复不好也不发生凋亡, 最终会被免疫细胞清除。因此, 年轻的个体中不存在突变的细胞累积的问题。也就是说, 造成个体突变的细胞的累积的真正原因是免疫系统的衰老, 从而导致突变的细胞不能有效地清除。而造成免疫系统的衰老的真正原因是成体干细胞的衰老; 脂褐素向来被认为是不能降解的细胞垃圾, 但现已发现也能降

解。对已堆积脂褐素的小鼠给药 50 天, 结果脂褐素含量显著下降 (曾南等, 1997); 有人认为, 细胞外胶原蛋白的交联会束缚细胞分裂, 是导致细胞衰老的原因之一。由于年轻的细胞会旺盛地分泌胶原酶等酶来更新细胞间质, 是细胞衰老导致胶原酶合成量发生下降, 才致使胶原蛋白转换率发生下降。而且胶原蛋白的转换率不是一成不变的, 具有一定的可逆性, 胶原蛋白是无法束缚细胞分裂的。例如, 老年人如果光着脚走路一段时间, 脚底的皮肤细胞会加快增殖, 越磨越厚。因此, 细胞间质成分的堆积也不是造成衰老的原因, 而是衰老造成的结果。此外, 衰老的内分泌功能退化或紊乱、神经系统退化等等, 都不是导致衰老的真正原因, 而只能算是衰老的继发因素或衰老的伴随现象而已。生物在长期进化的过程中, 已进化出了一套完善的防御和净化系统, 只因细胞衰老才导致这套防御和净化系统的功能发生退化, 从而使一些能够加速衰老的因素猖獗为害。当然, 如果能够使人体内的多能成体干细胞的端粒长度恢复到年轻人的水平, 这些防御系统的功能也会恢复到年轻人的水平, 各种衰老的伴生、继发现象就不会发生, 或即使发生了也可以被逆转。

9. 生物进化需要基因突变, 因此, 精子不但能够突变, 而且还能够把突变株保留下来, 睾丸屏障就是为了使精子能够与免疫系统保持隔绝, 以防止突变的细胞株被免疫细胞清除 (即纯化)。然后精子通过赛跑竞争, 优胜劣汰, 只有强壮的精子才能与卵子结合。由于生殖细胞是彻底返老还童的细胞, 据此可说明, 突变不是导致衰老的原因之一, 因此, 认为生殖细胞是通过修复基因突变来实现返老还童的理论是错误的。

10. 许多教科书把癌细胞看作未分化、无分化、去分化或异分化的细胞都是错误的, 因为癌细胞还保留着起源组织的特有分化标志, 例如, 成人的肝癌细胞仍然会表达胎肝细胞特有的代谢谱和酶的量分布谱, 而且一旦除去致癌因素, 就会恢复成正常的成人肝细胞。据此我认为, 把癌细胞看作是逆转衰老的超年轻化或幼稚化的细胞才是正确的。

11. 许多教科书把免疫球蛋白基因和 T 细胞受体基因的重排现象视为是细胞分化中基因选择性表达的原因, 我认为是错误的, 因为免疫球蛋白基因和 T 细胞受体基因的重排只涉及到翻译成蛋白质

部分的 DNA 进行与抗原对应匹配的调整,而并没有涉及到这些基因的转录与否(开/关)的调控。

12. 有人把染色体特异部位的异染色质化、组蛋白的甲基化、乙酰化以及转录、翻译和加工等过程的特异调控因子(包括发现获得 2006 年诺贝尔奖的 RNA 干扰现象)视为细胞分化中基因选择性表达的第一因素的观点,是错误的。因为参与这些环节的特异调控因子的蛋白质、RNA 等本身是不稳定和易降解的,为此,这些特异调控因子还需要依赖基因的选择性表达才能把分化性状长期稳定地维持下去,这样问题又来了:是什么因素使这些特异调控因子的基因发生选择性表达?问题又绕回到原地,无限循环而无法找到实质性的答案。

同样的染色体,为什么有的部位会发生异染色质化?有的不会?把异染色质化部位的 DNA 与常染色质化部位的 DNA 进行比较的研究发现,异染色质化的部位的 DNA 甲基化程度比常染色质化部位的 DNA 高,也就是说, DNA 的甲基化才是导致染色质异染色质化的根本原因,而甲基化是受端粒调控的。

13. 果蝇和其它双翅目昆虫中的 DNA 不发生甲基化,它们细胞分化基因的选择性表达的机制只能与 DNA 改变有关,比如靠改变基因调节区中某些 DNA 序列的重复次数或插入转座子等元件或扩增基因,因此,被视为无用的重复序列也许可以充当基因开关的作用。但采用 DNA 甲基化与否的调节方式更具灵活性,故会被生物普遍采用,当然,不能排除 DNA 含有甲基化的生物的细胞分化还与 DNA 改变有关。

14. 采用 DNA 甲基化或改变 DNA 序列都能符合细胞分化中基因选择性表达的第一因素的 4 个要求:(1)在细胞分裂时它能复制一份,以便每个子细胞都有一份;(2)能受到调节分化的蛋白质的调节;(3)具有基因开关的作用;(4)分子的稳定性极好。只有这样才能保持细胞分化后其性状具有很好的稳定性,例如,神经细胞寿命几乎与人相当,其分化性状也能保持终身不变。

多数教科书认为细胞分化后其性状是通过蛋白质或 RNA 类正反馈机制来保持稳定的,但实验却否定了这一假说。例如,获得诺贝尔奖的研究发现, RNA 干扰现象会放大和传染。但两种不同分化的细胞融合后再分离,也会恢复原来的两种性

状,即不会传染。

15. 入选驱动生命周期程序运作的驱动物质必须要满足 6 个要求:(1)细胞分裂时它必须能复制一份,以便每个子细胞都有一份;(2)它必须在生殖细胞中预先储备,而且储量在个体的所有细胞中须最多,以便足够将来发育成个体的整个生命周期的消耗(如果端粒是单纯为了解决染色体“末端隐缩问题”,在体细胞分裂的同时,端粒丢失多少可以补充多少,而无需在生殖细胞中作一次性的补充)。例如,单细胞的生物在细胞分裂时,端粒丢失多少就可以同时补充多少。据此,在生殖细胞中大幅度延伸端粒的现象反过来可以证明端粒与衰老有关;(3)体细胞每分裂一次,它必须消耗掉一部分,而且不能同时等量地一边消耗和一边补充(这就是返老还童药至今没有出现的原因),而只能单向消耗或消耗量大于补充量。这是因为如果同时消耗量和补充量一样多,就不能沿着时间轴产生“浓度梯度差”(计算机程序是靠电动机驱动的,生命周期程序是靠化学信号沿着时间轴产生浓度梯度差来驱动的),基因也就无法进行差次表达(顺序表达),而基因不能顺序表达,个体发育也就不能进行,生物只能停滞在单细胞水平。单细胞生物不会发生分化和衰老就是因为这个原因。据此,要使衰老个体逆转变为年轻,端粒只能以单向一次性方式净延伸。即衰老不能停滞在某一水平,要么进行衰老,要么逆转衰老。例如,水母类、海鞘类等众多的低等生物利用长时间饥饿从而发生单向一次性端粒净延伸来实现返老还童;据报道,2011 年科学家发现“灯塔水母”(Turritopsis Nutricula)能够返老还童,在达到性成熟年龄完成交配之后会以单向一次性的方式实现返老还童;生殖细胞靠减数分裂启动端粒修复机制,使端粒在短时间内一次性地延伸到足够整个生命周期的消耗量;(4)各种导致细胞衰老的因素必须最终都是通过消耗它的储量起作用的,例如,自由基会加速端粒缩短速度;细胞中各种 DNA 突变、细胞垃圾中毒等等导致细胞死亡,干细胞为了补充死亡的细胞就会提高分裂频率,而细胞分裂会导致端粒缩短;限食可减缓端粒缩短速度;女性比男性长寿是因为耗能比男性少,故女性端粒缩短速度低于男性;目前已发现 60 多种基因与衰老有关,如抑癌基因 P53、P21、Rb 等等,如 P53、P21、Rb 等高表达时细胞

端粒缩短加速; (5) 整个分子的稳定性要极好, 没有半衰期, 因为个体的寿命长达百年, 它必须要能陪衬终身; (6) 它的储量的多少能够左右基因的转录速率, 例如, Daniel Gottschling (1994) 发现端粒会影响附近基因转录; 丛羽生教授发现端粒酶催化亚基就可促进血管内皮生长因子基因转录。已知端粒完全能够满足上述的 6 个要求。

有一个称重复基因利用枯竭的衰老假说认为, 编码阻遏 DNA 抑制剂基因表达的基因有许多拷贝, 细胞每分裂一次, 它就会丧失一份或数份拷贝, 随着分裂次数的增多, 拷贝越来越少, 最后阻遏物浓度下降到不足以阻遏 DNA 抑制剂产生时, DNA 抑制剂就大量表达, 最终导致细胞分裂停止。该假说与端粒学说的模式是相类似的, 可以说端粒学说是该假说的修正版。

16. 兄弟姐妹的排行, 老大寿命往往相对比较长, 性成熟相对较早, 身材比较矮小, 排行越小寿命就越短, 这种现象规律性很明显, 因此不可能是基因突变造成的。造成排行越小寿命就越短的原因可能是年龄较大的父母的生殖细胞因为衰老使构建性甲基化酶不足, 致使某些基因的 DNA 甲基化不足, 以及生殖细胞端粒长度的不足所造成的。例如, 克隆动物出生前往往体型过大、易早衰、易患病和夭折, 为此, 英国罗斯林研究所的科学家发现, 造成这种现象是一种称为 Igf2r 蛋白质的基因上缺乏甲基而导致过表达。Igf2r 过表达会引起胎儿过度生长和死胎。此外, 克隆羊多莉的端粒也比同龄羊短 20%。

17. 细胞衰老并非只发生在生命的末期, 而是贯穿整个生命周期, 因为细胞衰老可以用来启动细胞分化和个体发育, 例如, 松果体释放的激素会抑制性腺活动, 人到了 10~14 岁, 松果体因衰老而发生退化, 于是性腺就开始发育了; 胚胎中的胰岛素样生长因子因细胞衰老导致合成下降, 可使胚胎肾脏的一部分细胞凋亡, 以此使肾脏管道化。

18. 关于癌症发生的前因后果的解释比较混乱, 为此我必须梳理一下:

2008 年初, 《细胞》(CELL) 杂志有一专刊, 认为把端粒长度控制在细胞分裂 20 次左右可保持不生癌。我认为这一设想是错误的。

癌基因是正常细胞不可缺少的基因, 在细胞的正常增殖过程中起到关键作用, 据此可以说没有什

么癌基因, 而应该把癌基因改称为“细胞增殖基因”。大多数的癌基因被激活时, 端粒酶的活性都会升高。儿童患癌的几率比老年人低很多, 且儿童的癌基因和端粒酶的表达活性比老年人高得多; 已知再生过程癌基因表达会升高。把蝾螈的眼睛的晶体剔除, 把很强的致癌物质注入眼球中, 结果没有生癌, 而出现晶体再生(江口吾朗、渡边宪二, 1986)。因此, 癌基因表达活性的高低与癌症的发病率无关, 因为在癌基因和端粒酶活性高的细胞中, 细胞的抗氧化能力和 DNA 的修复能力显著高于癌基因表达活性低的细胞。同样, 就端粒长度而言, 儿童比老年人长, 癌基因表达活性、端粒酶活性也高于老年人, 细胞的抗氧化能力、DNA 修复能力及免疫力也比老年人高, 故癌症发生率儿童比老年人低。此外, 有很多可以激活癌基因和端粒酶的物质反而是很好的抗癌药, 如植物血凝素(PHA) 已被用于治疗多种癌症。

所谓的衰老基因已经发现了几十个, 大多数是抑癌基因, 这些基因是通过影响端粒长度来影响细胞寿命的, 据此可以说这些都不是决定衰老的基因, 甚至可以说并不存在什么衰老基因。

但是, 各种能够促进细胞增殖的因素确实会提高癌症的发生概率, 如激素、生长因子、蛋白激酶 C 激活剂等等, 这些因素主要是通过激活端粒酶来促进细胞增殖的, 但端粒酶仍然不是导致癌症的真凶, 其真凶是细胞在增殖过程中, 染色体和 DNA 在复制时更容易发生损伤, 而一些能损伤 DNA 的致癌物质或物理因素则是通过增加染色体和 DNA 的损伤率来增加癌症发病概率的。抑癌基因 P53 较特殊, 不能把它看成一般的抑癌基因, 它是通过修复和清除突变的细胞来降低癌症发病率, 延长个体寿命, 而非通过抑制端粒酶来降低癌症发病率的, 相反, P53 在修复细胞因放射线辐射等因素而导致的 DNA 损伤时, 端粒酶的活性反而显著升高, 这个例子可以很好地说明端粒酶不是致癌物质。

癌细胞是发育年龄逆转到胚胎发育 10 周前的细胞, 会表达 10 周后已关闭的但 10 周前曾经表达过的基因, 虽然癌细胞的遗传背景与宿主相同, 但因这些基因的产物没有经过胚胎发育期的免疫检阅和耐受, 以及基因的碱基突变, 因此还是会受到宿主免疫系统的排斥, 这就是机体抗癌的依据。但是, 胚胎天生具有逃避母体免疫攻击的功能, 因

此,一方面癌细胞能被免疫系统识别并消灭,另一方面因为癌细胞具有与胚胎细胞的共性,抗原性较弱,免疫系统不易发现它,这样,免疫功能衰弱的人就很容易患上癌症。

造成癌细胞基因顺序表达发生开倒车的现象不是细胞分化的倒退,而是端粒酶活性的上升或端粒长度的延伸造成的,因此,把癌细胞看作是逆转衰老的超年轻化或幼稚化的细胞,而非未分化、无分化、去分化或异分化的细胞才是正确的。

在细胞水平上,引起细胞癌变的基本原因是癌基因因各种原因而导致持续的过表达。而导致个体生癌的主要原因是免疫系统功能低下或有缺陷。在同一环境下,某些人容易患上癌症,某些人却不容易患上癌症,这是遗传易感性,即基因出了问题,使细胞容易突变,或/和免疫系统功能低下。

19. 如果说端粒只起到稳定染色体基因组的作用而与衰老无关,那么,当端粒缩短到一定程度时,染色体基因组就会变得不稳定而导致细胞死亡或癌变。据此,即使端粒与衰老无关,要想逆转细胞衰老和防止细胞癌变,也必须要先延伸端粒,否则任何措施都无法挽救衰老与癌变。

20. 不但个体中的不同器官的衰老速度不一致,而且同一器官或同一组织的不同部位的细胞衰老速度也不一致,例如,人头部的不同部位的头发变白的时间是不一致的;眉毛、毫毛和头发都是毛发,但长度与直径却各不相同,这说明同样是生长毛发的干细胞,分化性状只有相似而没有完全相同。造成这一现象的原因可能与细胞分化性状的细微差异有关,而这些差异又进一步决定相应细胞的端粒的缩短速度。这和再生区域编码理论差不多,该理论认为,个体由众多区域镶嵌而成,每一区域具有自己特定的遗传编码(Slack, 1980)。因此,来自个体同一部位的间充质干细胞,能否完全分化和替代为个体的所有的器官组织的功能还是未知数。

21. 一般认为鼠类的衰老与端粒或端粒酶无关,我认为鼠类的衰老也与端粒缩短或端粒酶活性降低有关(黄必录. 端粒衰老学说具有普适性. 中国老年病杂志, 2006, 3 (2): 101.)。2011 年中央电视台 10 套《科技之光》报道,美国斯坦福大学科学家成功用端粒酶激活剂使相当人 80 岁的小鼠返老还童,这如果是真实的,就可以证明鼠类

的衰老与端粒是有关的。鼠类端粒较人类长,而且在细胞衰老过程端粒缩短幅度较小,但寿命反而比人类短,这可能是鼠类基因的表达活性与端粒长度的剂量关系比人类高效,就像同一种治病药物,用同一剂量,有的人感到疗效显著,有的人感到疗效一般。

22. 限制能量的摄入可以延长小鼠最大寿命一倍,由于线粒体在进行能量代谢时会产生大量的氧自由基,已证明自由基可使端粒缩短,作为自由基清除剂的维生素 E 也能使培养的细胞分裂次数增加一倍,于是科学家就认为限制能量摄入导致动物寿命延长的机制是通过减少自由基对端粒的破坏。但自由基清除剂并不能延长动物的最大寿限(Harman, 1960),因此,把限制能量的摄入的延寿机制归结于是减少自由基对端粒的破坏是不完全正确的。各种能够抑制 DNA 合成的因素都会加速端粒的缩短,衰老的细胞也会产生 DNA 合成的抑制剂,用促进 DNA 合成的物质也能显著提高动物的寿命。据此我认为(黄必录. 衰老的机理意义及治疗. 燕京医学通讯, 1998; 66: 1056, 本文 2 万多字,介绍了许多衰老领域的前沿理论,是内部刊物,要索取本文请到燕京函授医学院,地址:北京市海淀区复兴路 21 号(公主坟西北侧卫国中学内))能量代谢主要是通过 4 个抑制 DNA 合成的途径来缩短动物寿命的,举例:摄入能量越多,能量代谢量也越大,产生的三磷酸腺苷(ATP)也越多,ATP 能反馈性地抑制其它核苷酸的磷酸化,从而产生阻抑 DNA 的合成效应。

造成自由基清除剂如维生素 E 能使培养的细胞分裂次数增加一倍但却不能使个体的寿命提高一倍的原因是:(1) 维生素 E 在提高细胞分裂次数的同时又提高了细胞分裂频率,以致在一定时期内提高了细胞的分裂次数;(2) 个体内的维生素 E 的浓度不能像培养液那样高。线虫中发现所谓的长寿基因,就是通过降低能量代谢率的方式,使线虫处于昏睡的状态来换取长寿的,通过降低生命过程的速度来延长生存的时间,其实也包含了延缓了端粒缩短的速率的因素,这种“延寿”方式是没有实际意义的,采用这种办法来延长人的寿命是不可取的(特殊需要除外)。

23. 在细胞水平上,缺乏端粒酶活性的细胞,端粒缩短速度比端粒酶活性高的细胞更快。但在个

体水平上, 胚胎期端粒缩短速度比成人期和老年期快一倍以上, 而且胚胎期的 (胚胎体细胞有端粒酶活性) 端粒酶活性比成人期和老年期高, 这与一般认为端粒酶活性高, 端粒缩短速度就慢相悖。

由于端粒酶活性的高低与细胞分裂频率呈正相关, 而且细胞有丝分裂是造成端粒缩短的原因, 因此, 胚胎细胞因端粒酶活性比较高, 在一定时期内细胞分裂次数就多, 这样就会造成胚胎端粒缩短速度比成人期和老年期快。此外, 端粒酶活性和端粒结合蛋白 (TRF1) 的活性是呈正相关的。因此, 端粒酶虽可延伸端粒, 但 TRF1 却会抑制端粒延伸, 两功互相抵消甚至有余, 这也是导致胚胎细胞端粒酶活性虽高, 但端粒却缩短的更快的原因。

以前我看到一篇报道, 干细胞移植到宿主的初期, 端粒会迅速缩短, 为此我感到很困惑, 后来又看到一篇报道称, 干细胞移植到宿主的初期会迅速分裂几次, 这使我明白了: 端粒并没有白白丢失, 而是用来增殖干细胞的。

上述的美国斯坦福大学用端粒酶抑制剂使小鼠早衰, 然后用端粒酶激活剂又使它恢复年轻, 其原因也是抑制端粒酶活性时, 个体在同一时间内端粒缩短速度并没有加快, 因此, 重新激活端粒酶时, 小鼠就会可逆性地恢复青春。这也是一些人根据实验误认为端粒或端粒酶与鼠类衰老无关的原因; Yegorov et al 的类似实验也表明, 在逆转录酶抑制剂 dide (AZT) 和 Carbovir 存在下, 鼠的胚胎成纤维细胞可以自发转化形成无端粒酶的克隆, 发生类似于衰老的过程。这一抑制过程也是可逆的。

既然端粒酶活性升高对延缓端粒缩短速度作用不大, 那干细胞为什么还要保持端粒酶的活性? 我认为端粒酶的主要作用是: 因不同类型的细胞需要不同的分裂活性和不同的端粒长度, 而保持不同类型细胞端粒酶的不同活性就可以调制出不同的细胞分裂活性和不同的端粒长度。

24. 大脑具有全息性, 大脑皮层切除一部分甚至一半 (半脑人) 记忆和技巧同样能够保留。脑细胞每天都有大量死亡和新生, 记忆和技巧也同样能够保留。这对于干细胞移植治疗大脑的一些疾病或使大脑返老还童是非常有利的, 因为不会使已经学习到的记忆和技巧被删除掉。那么新产生的神经细胞是如何复制 (继承) 已有的记忆和网络的连接构造的? 这是一个诺贝尔奖级的课题。

25. 人的胚胎发育过程, 从第 10 周到 18 周, T 细胞和抗原相互作用导致对抗原产生永久的无反应性 (或称耐受性), 这些 T 细胞能够把产生自身抗体的 B 细胞删除掉, 以防止免疫系统攻击自身的组织细胞, 这些 T 细胞具有记忆性, 而且细胞的寿命和人一样长。如果这些 T 细胞因为衰老而导致数量减少或活性降低, 都会引发自身免疫反应。一般认为, 自身免疫的发病机制是自身细胞的抗原组份发生改变所致, 这种解释在一些情况下是错误的, 老年人发生的一些自身免疫病, 如风湿性关节炎等, 可能是这些 T 细胞因衰老导致本身的数量和活性下降所致。因此, 使个体返老还童, 这些 T 细胞必须也要一同返老还童, 否则, 我们会因为自身免疫的大发作而毙命。但是, 如何使这些 T 细胞返老还童是一个非常具有挑战性的课题, 也是个诺贝尔奖级的课题。

十三、去衰老的途径

去衰老 (De-aging) 就是返老还童的同义词, 是福建师大傅文庆教授于 1999 年创立的, 不使用返老还童一词, 是为了避免公众由此而联想到封建迷信、神话及历代帝王梦想返老还童的诸多可悲历史事件。

精子的端粒长度是 15kb, 由受精卵经过数次分裂而来的多能成体干细胞, 端粒会缩短一些, 因此, iPS 的端粒必须要设法延伸到 14kb; 儿童成体多能干细胞的端粒长度为 13kb, 经过增殖后会缩短, 因此, 治疗用的多能成体干细胞的端粒长度至少要达到 14kb。然后把自体的多能成体干细胞的悬浮液注回老年人体内, 成体干细胞会通过血液循环并自动迁移和定植到相应的器官组织中。在器官组织中的少量幼稚的多能成体干细胞, 一方面通过细胞自我复制以增加组织中年轻的多能成体干细胞的基数, 另一方面通过细胞分化以替代组织中衰老的非干细胞。

1. 制造年轻的干细胞的途径

(1) 把 Oct3 / 4 等四个基因转入体细胞, 体细胞会经去分化和再分化, 变成诱导多能干细胞 (induction of pluripotent stem cells, iPS) (山中伸弥等人, 2006), 再把 iPS 培养分化成具有多向分化潜能的造血干细胞、间充质干细胞等。

iPS 的端粒可能得到了延伸, 但长度必须达到

14kb。

(2) 原生殖细胞瘤(畸胎瘤)可多方向分化,例如在瘤内可以见到各种不同的组织细胞。原生殖细胞瘤中能够诱导细胞重编程的 Oct3 / 4 基因有表达,而体细胞中该基因处于关闭状态。原生殖细胞瘤细胞中的 DNA 也是非甲基化的。因此,用原生殖细胞瘤的胞质体(Cytoplast)与体细胞的核体(Karyoplast)融合也有可能诱导细胞重编程。

ES 和 iPS 都会表达 Oct3/4 基因, Oct3/4 基因的表达能够保持端粒长度的恒定,使细胞永生。而成体干细胞 Oct3/4 基因没有表达,因此,成体干细胞的端粒会越来越短,寿命有限。但是,人工生产的 ES 和 iPS 或取自自然的经过培养后多次分裂的 ES,虽然端粒长度保持了恒定,但是端粒长度还是不如自然的受精卵,例如,经过培养和多次分裂的 ES,端粒长度只有 8 ~ 12kb (Amit 等人),只相当于成人干细胞端粒的长度。因此,用体细胞核克隆的 ES 或诱导的 iPS 的年轻程度不如自然的受精卵,即生命周期无法拨回到 0 点,去衰老效果可能不理想。而精子的端粒长度可达 15kb,而且卵子在受精后,卵子的端粒又会延长。例如, Lin 等人发现,卵母细胞端粒较体细胞短,但在受精后的早期卵裂期,端粒长度会显著增加。而且在端粒酶缺乏的小鼠的早期卵裂胚胎中,端粒也有所延长。

ES 和 iPS 都是经过重编程的细胞,其本质应该是同一种细胞,制造 iPS 比制造 ES 容易得多,而且有不产生异种线粒体混杂的优点, iPS 必将取代 ES。

(3) 用自己体细胞核克隆的胚胎干细胞(ES),缺点是很难同时生产许多个 ES,因此,存在着使用的 ES 可能是突变株,也可能不是突变株,无法辨别。如果移植用的是突变株,最终会被宿主免疫排斥,如果不被排斥,宿主会产生各种无法预知的病变。

虽然 ES 或 iPS 在体内外都可以分化成各种成体干细胞,而且细胞的年龄和胎儿一样幼稚,但是,直接把 ES 或 iPS 植入人体遭遇下述的几种情况。

①由于 ES 或 iPS 是胚胎产生免疫耐受期之前的细胞,有一些抗原没有经过免疫识别耐受,因此,即使遗传背景与患者相同,患者体内的免疫系统也会把它当做异物排斥掉,《参考消息》报

2011.5.16 日第七版题为“人工干细胞动物实验失败”的文章报道,英国科学家把 iPS 移植到小鼠体内遭到排斥。造成这种后果我曾经(燕京医学通讯,1998;66:1058、1060)说过,转化(年轻化)的干细胞可能会表达胎儿免疫没有识别耐受的胚性抗原,会引发免疫排斥,如 iPS 或 ES 会表达 Oct3/4 基因,而该基因在成人则没有表达。因此,该基因的产物是胚胎干细胞独有的,没有经过胎儿免疫识别耐受。我认为刚诱导转化的 iPS 需要经过培养分化成成体干细胞,使 Oct3/4 等胚胎早期基因停止表达后再移植到个体内才可避免免疫排斥;

②直接植入体内,如果能够成活,也会产生畸胎瘤;

③虽然在体外培养的条件下的 ES 或 iPS 也可以分化成成体干细胞,但是,在体外培养的条件下每 3 个细胞分裂一次就有 1 次突变发生,并且其突变具有累积效应,因此,经过若干代增殖后,一群细胞中的大部分细胞都是突变的,没有应用价值。

畸胎瘤是胚胎发育过程中遗留下来的能够表达 Oct3/4 基因的干细胞,这些干细胞经过了免疫检测和耐受,不会被宿主免疫排斥掉,能在宿主体内生存。据此,有畸胎瘤患病史的人不宜注射胚胎干细胞或 iPS 细胞。

(4) 抽提老年人衰老的多能成体干细胞和免疫耐受性 T 细胞,在体外培养的条件下设法让它的端粒长度延伸到 14kb 左右,这种方法非常理想。

(5) 设法直接把人体组织中的多能成体干细胞和免疫耐受性 T 细胞的端粒延伸到我们想要的长度(即设定逆转的目标年龄),这种方法是最理想的,难度也最大。

2. 延伸端粒的生化途径

细胞分化是个体正常生理所必须的,而端粒缩短是驱动细胞不断向前分化的推力。因此,体细胞必须要想出一套防止端粒净延伸的办法,以防止体细胞端粒因各种问题而发生净延伸所造成的细胞分化的停滞或开倒车(即癌变)。由于成体干细胞含有能够延伸端粒的端粒酶,因此,就必定有相应的抑制端粒延伸的负调控因子。

我认为只要设法打破与端粒长度有关的的正调节因子与负调节因子的平衡,使正调节水平大于负调节水平,人类就能像水母类、海鞘类等低等动物

一样,在一定条件下实现实质性的返老还童。

瑞士科学家(2011)发现,端粒会以自身的 DNA 作为模板合成 RNA,细胞处于这种状态时会影响端粒的延伸,因此,这也算是端粒长度的负调控因子。前苏联曾经有人用能抑制 RNA 合成而不抑制 DNA 合成的橄榄霉素喂养果蝇,使果蝇寿命延长 20%~30%,这可能与抑制端粒合成 RNA 有关。蒋松柏用自己研发的能适当抑制 RNA 合成但不会抑制 DNA 合成的药物“长寿露”在复旦大学做喂养果蝇实验,使果蝇的平均寿命延长 65.2%。

细胞中的端粒酶的活性越高,细胞增殖活性越大,而且端粒酶在细胞增殖过程起到决定性的作用,因此,可以向培养的 Muse 细胞中添加端粒酶催化亚基试剂,促使 Muse 细胞大量扩增,当扩增到一定数量时停止供应端粒酶催化亚基,细胞马上会停止分裂。导致正常细胞癌变的机制是因为基因突变、癌基因插入、以及病毒的寄生等造成端粒酶不可控地持续高表达,使细胞不停地分裂。因此,用端粒酶催化亚基试剂既能扩增干细胞,又不会引起细胞癌变。

由于细胞分裂次数与端粒长度呈正相关,因此,端粒越长,干细胞的用量就越少。据此,我们可以把自体衰老的 Muse 细胞和 Miami 细胞分离出来,在离体培养的条件下设法把端粒延伸到 14kb,然后只要把含有少量 Muse 细胞和 Miami 细胞的悬浮液从血管注入到自体, Muse 细胞和 Miami 细胞就会随着血液循环移居回骨髓等组织中并自我复制,以增加骨髓等组织中的 Muso 细胞和 Miami 细胞的基数,同时年轻的 Muso 细胞再分化成造血干细胞、间充质干细胞等干细胞,再由造血干细胞等干细胞通过迁移和分化来更新个体所有的器官组织的细胞,使整个个体逐渐返老还童。

体细胞包含有很多 DNA 正常株和突变株,由于突变株是无法鉴定和分离出来的,因此必须同时向患者体内注射许多个自体细胞转化成的 iPS 所分化的多能成体干细胞或许多个端粒长度达 14kb 的自体多能成体干细胞,其中的突变株会被人体的免疫系统清除而得到纯化。

激活癌基因可以通过激活端粒酶来延伸端粒,也可以通过同源重组来延伸端粒。例如,发现抑制抑癌基因 P16 表达可使端粒缩短减缓,但并没有出现端粒酶活性升高,黄芪碱(HDTIC)可使 P16

基因表达下降(童坦君)。已知无端粒酶的肺癌也有 P16 基因突变。抑制 P16 基因延伸端粒的机制与抑癌基因 Rb 有关。由于 P16 和 Rb 之间有代偿作用,据此我认为 P16 和 Rb 要同时抑制。

同样是空心菜(蕹菜),不同的品种对能激活逆转衰老的措施时的反应灵敏度不一样,如大叶空心菜扦插株不会逆转衰老,而小叶空心菜(又称藤蕹)扦插株会完全逆转衰老。大叶空心菜是小叶空心菜突变种,因为基因突变而失去返老还童的能力;某些低等动物靠分身繁殖或长时间饥饿会逆转衰老,而高等动物却不能。这可能是小叶空心菜或低等动物响应返老还童的信号通路比高等生物更灵敏。据此,可用药物抑制抑癌基因的方法来激活人体细胞内的癌基因,并使激活强度超过能够使端粒发生净延伸的阈值。但不要去抑制抑癌基因 P53,以免让突变的细胞保留下来发展为癌细胞。

(1)用癌细胞的胞质延伸干细胞的端粒,把端粒较长的癌细胞的胞质体和衰老的多能成体干细胞的核体融合,利用癌细胞中高效的端粒修复系统使干细胞的端粒延伸。

将失去分裂能力的鸡红细胞核与 HeLa 细胞(宫颈癌细胞)融合,可以看到癌细胞中有的蛋白质向红细胞核中转移,使红细胞核重新开始 DNA 复制和 RNA 合成(Harris 等 1965, 1974)。因此,癌细胞有使衰老的细胞恢复青春的能力。

多数癌细胞端粒的长度比正常细胞短,但有少数的癌细胞的端粒比正常细胞长,如有端粒酶活性的 HeLa 细胞和少数无端粒酶活性的肺癌细胞。据此,可以选用端粒较长(如果有长达 15kb 以上的癌细胞则最好)的癌细胞的胞质体和衰老的多能成体干细胞的核体融合,培养一段时间后就能使多能成体干细胞的端粒发生净延伸。

由于胞质因子存在半衰期,因此,融合后的多能成体干细胞的核体,即癌细胞质-干细胞核的杂种细胞的核体要多次再与癌细胞的胞质体再融合,重复数次,才能把干细胞的端粒延伸到目标长度。每次再融合的间隔大约是 150 小时,这是因为 150 小时后癌细胞的胞质成分的活性开始降低。

Muse 细胞、造血干细胞在体外培养的条件下目前尚难于增殖,用癌细胞的胞质体与 Muse 细胞、造血干细胞的核体融合就可以启动 DNA 合成,使 Muse 细胞、造血干细胞增殖。

如果癌细胞的线粒体 DNA 与患者差异较大,为了使多能成体干细胞的线粒体 DNA 不混有癌细胞的线粒体 DNA,融合所用的癌细胞要换上融合所用的核体的线粒体。方法可用线粒体毒素若丹明(rhodamine 6G, R-6G)除去癌细胞的线粒体,然后再与融合所用的干细胞的核体融合,就可以使癌细胞的线粒体 DNA 换为融合所用的核体的线粒体 DNA。

细胞性状是由细胞核上的染色体的基因决定的,因此,待癌细胞的胞质成分被细胞核表达的成分更新后,癌细胞质-干细胞核的杂种细胞的性状会回复为干细胞。造血干细胞在体内可以分化成多种组织的细胞,从而使衰老的器官组织发生返老还童。

由于干细胞比较稀缺,为了提高融合率,融合用的 HeLa 细胞的胞质体与干细胞的核体的比例为 2 比 1。

(2) 抑制 TRF1 活性

已发现人类端粒有 2 种结合蛋白质,TRF1 和 TRF2,以及几种具有调节端粒结合蛋白作用的端粒相关蛋白。

TRF1 会与端粒 DNA 结合在一起,使端粒酶或 DNA 重组酶无法接近端粒末端发挥作用,因此,TRF1 是端粒延伸的负调控因子。早期卵裂胚胎中可见一种称为 Rad50 的 DNA 结合蛋白与 TRF1 共区域化,此时端粒酶活性虽然丧失,但端粒却通过同源重组而得到快速延伸。在囊胚期,Rad50 减少,而端粒酶活性增加,但端粒却缓慢延长。我国黄河教授等发现,TRF1 表达量与肿瘤端粒酶活性呈正相关。因此,多数癌细胞的端粒比正常细胞还短的原因与 TRF1 高表达有关。而合成 TRF1 突变体的细胞株端粒则较长。精母细胞的端粒 DNA 是裸露的 DNA,没有端粒结合蛋白,因此,端粒酶可以充分地接近端粒末端并高效地延伸端粒,因此,精子的端粒最长。

Susan Smith 等人报道,在人细胞中发现了一种称之为 tankyrase 的酶,该酶可以修改 TRF1,使 TRF1 不能与端粒 DNA 结合,从而使端粒延伸。tankyrase 在胞浆和胞核都有分布。

据此,可用 TRF1 的反义寡核苷酸、抗体、或 tankyrase 及 tankyrase 的基因质粒来抑制或修改体内或体外培养的多能成体干细胞的 TRF1,并同时

激活端粒酶(起增效作用),使端粒发生净延伸。本法具有专一性,只针对具有端粒酶活性的各种干细胞起作用,因此副作用较少。

TRF1 的反义寡核苷酸和 TRF1 的抗体一起使用效果更好,由反义寡核苷酸抑制 TRF1 基因表达,抗体与已有的 TRF1 结合,以达到彻底消除 TRF1 的效果。

向培养的多能成体干细胞注入 tankyrase 的基因和端粒酶的催化亚基 hTERT 基因构建的一个质粒表达载体、或人工合成的 tankyrase 与 hTERT 的 mRNA、或 tankyrase 与 hTERT 的蛋白也许是延伸端粒最好的办法。

注意,由于 TRF1 是端粒延伸的负调控因子,据此,很多人很容易想到用 TRF1 的抑制物质来延伸成体干细胞端粒,但是,如果没有同时激活端粒酶,端粒延伸的效果就微乎其微。

(3) 向细胞转染预合成的端粒 DNA 片断

大约有 2% 的癌细胞不含端粒酶(Rhysu, 1999)。因此,生殖细胞有可能是靠同源重组来快速延伸端粒的,否则,体细胞中不会存在这种延伸端粒机制的基因,以致不会突变出这种癌细胞。一篇发表在《Nature Cell Biology》杂志上的报道称:“卵母细胞和精原细胞的端粒比体细胞短,但通过减数分裂端粒长度会大幅度增加,在端粒酶缺失的小鼠的早期分裂胚胎中发现端粒竟然也会延伸,在成熟卵母细胞和卵裂期胚胎中,端粒酶活性降低或消失,端粒长度却大幅度增加,之后胚胎中又重新恢复端粒酶活性,同时伴随着端粒酶活性的增加,端粒延伸却减慢。为此科学家们得出结论,认为在早期卵裂时,端粒延长可能是由于同源重组机制,而从囊胚期开始,端粒酶仅是维持已经确定的端粒的长度”。

在受精卵中,端粒的延伸是靠端粒 DNA 的同源重组;在无端粒酶活性的永生癌细胞中,其端粒长度的维持也是靠一种特殊的染色体外端粒重复序列 DNA。在这类癌细胞中,已发现一种核小体的特殊形式(包括端粒 DNA,端粒特异结合蛋白,参与重组的蛋白)通过同源重组来延伸端粒。据此,可向干细胞内输入外来的端粒重复序列 DNA,如人工合成的长度达到 1kb 的端粒 DNA 片段,在一些能连接端粒 DNA 片段的酶的作用下把端粒 DNA 片段连接到染色体端粒 DNA 的末端,使多能

成体干细胞的端粒跳跃式地净延伸。

(4) 向干细胞内输入端粒酶 RNA 组分 (TR)

端粒酶是以 TR 为模板利用逆转录酶活性来延伸端粒的。人类细胞永生生化后, 端粒酶活性可上升 100 ~ 2000 倍, 但 hTR mRNA 最多仅提高 2 倍。在 HeLa 细胞中表达 hTR 的反义分子, 将导致细胞衰老。屈艺等人设计并合成了针对端粒酶 RNA 组分的锤头状核酶基因, 导入 HeLa 细胞后使端粒酶活性降至原来的 1/8 ~ 1/10, 传至 19 ~ 20 代时出现 95% 凋亡。这说明 TR 是端粒延伸的主要限制因子。据此, 可向干细胞内输入外来的 TR, 并激活端粒酶 (起增效作用), 使端粒净延伸。

(5) 同时激活端粒酶和阻滞细胞周期

激活端粒酶时, TRF1 的活性也会上升, 因此, 虽然端粒酶会延伸端粒, 但因 TRF1 会抑制端粒酶延伸端粒, 因此, 端粒延伸非常困难, 再加上激活端粒酶会启动细胞分裂, 而细胞分裂可使端粒 DNA 丢失, 因此, 癌细胞虽含高活性的端粒酶, 但多数的癌细胞的端粒长度只有正常细胞的 1/3, 同样, 含有端粒酶的成体干细胞, 端粒照样会不断地缩短。

染色体末端的 DNA 序列比其它序列有更高的辐射敏感性 (Alvarez L, Evans JW, Wilks R 等人, 1993); 致死量以下的 X 射线等辐射可激活细胞内端粒酶和同时抑制细胞分裂, 使老鼠、果蝇寿命延长。日本的广岛和长崎两市的居民平均寿命高于全国的原因也许与原子弹爆炸余留下来的核辐射有关, 由此提示, 辐射激活端粒酶可修复端粒。

辐射延长寿命的机制是射线使 DNA 损伤, 损伤的 DNA 会激活 “DNA 损伤感应蛋白”, 然后再由 DNA 损伤感应蛋白使蛋白激酶 ART 和 ATM 磷酸化并激活下游的 Chk2 激酶, 再由 Chk2 激酶告诉抑癌基因 P53, 再由 P53 激活抑癌基因 P21 而抑制细胞分裂, 使细胞周期阻滞在 G1/S 或 G2/M 期。以便细胞赢得时间去修复受损的 DNA。因此, 被认为是衰老基因的 P53 和 P21 在有些条件下表面上看似乎会使细胞变老, 实际是在逆转衰老。

据此我们可设法使成体干细胞内的蛋白激酶 ART 和 ATM 磷酸化或直接导入磷酸化的蛋白激酶 ART 和 ATM 来蒙骗 DNA 修复系统, 在不损伤 DNA 的情况下, 使成体干细胞以为是 DNA 发生了损伤, 以此来激活多能成体干细胞的端粒酶和 P53

基因, 使多能成体干细胞的周期停滞, 端粒发生净延伸。

精母细胞 (含有高活性的端粒酶) 转化成精子的过程也是长期停在 G1 期的, 这可能是使精子端粒长达 15kb 的原因。

从上知道, 在激活端粒酶的同时, 让细胞周期处于阻滞状态, 就可以使端粒发生净延伸。据此, 可向离体培养的多能成体干细胞里加入非细胞毒性的细胞周期阻滞剂 (1992 年, Holt 发现, 有毒的细胞周期阻滞剂会使端粒酶活性丧失, 而无毒的周期阻滞剂则不会) 和端粒酶激活剂, 使端粒发生净延伸。

在细胞周期中, G₁ 和 G₂ 期端粒酶活性升高, S 期最高, 而在 G₀ 期, 其活性受到抑制, G₂ / M 期完全丧失, 据此, 可将细胞周期阻滞在 G₁ 期、S 期或 G₂ 期。

以上的各种方案也可以组合使用, 以增强效果, 争取实现端粒延伸速度超过缩短速度, 使端粒达到净延伸程度。

(6) 用端粒酶激活剂激活个体中的成体干细胞的端粒酶, 并同时绝食, 使细胞中的端粒酶活性升高, 细胞又不能分裂, 使成体干细胞的端粒净延伸。

植物血凝素 (PHA) 或肌醇等激活端粒酶的物质, 同时添加一些抗氧化剂如维生素 C 和 E, 可作为延伸成体干细胞端粒的配方。

在 4 ~ 39 岁时端粒长度每年平均减少 84bp, 40 岁以后, 每年只平均减少 41bp (Iwana 等 1998)。因此, 只要把老年人体内的成体干细胞的端粒长度从 8 ~ 9kb 延伸到 10kb, 就可以使衰老的器官、组织甚至个体大约年轻 20 年, 进而使各种与增龄有关的疾病不治而愈。

培养的细胞在缺乏能量物质葡萄糖时, 细胞周期会被阻滞。因此, 使用延伸成体干细胞端粒的配方期间不要运动, 并绝食 (只喝点含有多种维生素和矿物质, 但不含能量的饮料, 即饥饿疗法), 每次治疗时间根据各人的体质不同而异, 一般 30 天左右, 因为人只要有水, 可以挨饿 50 ~ 60 天。

植物血凝素是蛋白激酶 C (PKC) 的激活剂。激活蛋白激酶 C 能促生长因子分泌, 生长因子能激活 myc 表达, 而 myc 可激活端粒酶 (Wang 等, 1998)。肌醇是肌醇磷脂第二信使系统中的一个成

员, 它可使该系统代谢增强, 生成更多的二酰基甘油 (DG), 而 DG 也是蛋白激酶 C 的激活剂。

植物血凝素可增强免疫, 用来治疗急性白血病、多种癌症、再生障碍性贫血, 也能使老年神经细胞逆转年轻 (Zs—Nagy, 1979)。在体外, 植物血凝素可使人 T 细胞端粒酶活性增高 500 ~ 1000 倍 (Bodnar, 1998)。

干细胞比非干细胞幼稚, 更容易被端粒酶激活剂如 PHA 激活。这是我们所期望的, 因为我们要的是干细胞端粒延伸, 而非干细胞端粒不要延伸, 因为非干细胞端粒延伸会导致细胞功能丧失, 这会对个体带来致命的副作用。

在一些抑制细胞周期的因素存在时, 细胞周期完全受阻, 此时 myc 会促使细胞凋亡。因此, 在同时激活端粒酶和使细胞周期阻滞时, 有些情况下必须要阻止细胞发生凋亡。已发现自由基可加速端粒缩短速度, 而维生素 E (Ve) 和维生素 C (Vc) 作为抗氧化剂不但能够显著降低端粒的缩短速度, 而且能够抑制细胞凋亡。细胞凋亡的第一步是各种病理或生理刺激对线粒体渗透性转换 (permeability transition PT) 的作用, 使 PT 孔开启, 这是凋亡发生的初始和限速事件, 而抗氧化剂能抑制线粒体 PT 孔开启, 从而抑制细胞凋亡发生。

Ve 与 Vc 合用, 抗氧化效果则更好, 因为 Vc 对 Ve 受自由基破坏后有再生复活作用。如果再添加些维生素 B₁₂、叶酸、氧化锌、硫酸镁则有利于 DNA 合成, 添加硫酸亚铁则有利于提高红细胞功能, 缓解因细胞分化受到抑制所引起的红细胞生成的不足。

体细胞有两种生理状态: 功能态和增殖态。为了维持个体的正常生理, 绝大多数的体细胞都必须处于功能态。与端粒延伸有关的基因被激活时, 体细胞会由功能态切换为增殖态。如果大部分细胞处于增殖态, 不但器官组织的功能会严重下降 (这对个体是有害的, 是长生不老药至今没有出现的原因之一), 而且细胞在增殖态时, 细胞分裂会使端粒 DNA 丢失。此外, 处于增殖态的细胞, 细胞分化会发生停滞, 再说终末细胞如红细胞等有一定寿命, 细胞停滞分化时它照样死去, 而人体又不能缺少红细胞。

肝切除再生或肝中毒导致肝细胞生长因子升高 (可升高到正常水平的 13 ~ 17 倍) 时, 肝细胞会

处于增殖态, 此时肝细胞超微结构改变, 白蛋白合成下降, 原来很少或不合成的甲胎蛋白上升。同时胆汁分泌及清除能力也下降。因此可以说, 大量的体细胞在大幅度地激活端粒酶时, 虽然可以让细胞长生不老, 却会要个体的命, 或者说, 虽然我们能够使细胞长生不老, 但是却不能使个体长生不老。据此, 在激活端粒酶的同时, 必须要降低个体的代谢强度, 如少运动, 绝食。由于代谢率下降, 产生废物就会减少, 就可以缓解肝脏的工作压力。

据说气功大师在修炼某些气功达到高级阶段时, 会自发产生绝食, 称“辟谷”, 他们认为辟谷可以延寿。据报道, 台湾有人让不再产蛋的鸡进行辟谷, 结果恢复了产蛋。我认为饥饿不但可通过降低动物的代谢强度, 从而降低了个体对正常生理的要求, 如产生代谢废物减少, 以缓和肝脏处理废物能力下降的矛盾, 而且会使细胞周期停滞, 例如, 培养基在适当缺乏能量物质 (葡萄糖) 或某些必须的营养成份的情况下, 细胞就会停在 G₁ 期, 而此时处于其它周期的或突变和过度衰老的细胞却会死亡 (已发现饥饿会清除体内突变的细胞, 由此会降低癌症发生率), 因此, 在用药期间必须要绝食。绝食的主要目的是让细胞周期停滞。

衰老并不是不可逾越的自然规律, 很多低等动物如水母类、海鞘类、扁形动物腔肠类等长时间饥饿时会发生反向发育, 发生实质性的返老还童。可能是这些低等动物在长时间饥饿时, 会使附着在组织细胞外的细胞间质成分和细胞内的垃圾成分降解, 以及使衰老和病变的细胞发生凋亡和降解, 这些降解物又作为干细胞的营养物质使细胞恢复分裂 (蒋松柏, 1994)。我认为饥饿引起细胞周期停滞的同时, 会启动与端粒延伸有关的基因大量表达 (细胞间质成分的降解会降低细胞的接触抑制, 而接触抑制会使端粒酶活性下降, 因此, 细胞间质成分的降解会激活端粒酶), 从而使多能或全能的成体干细胞的端粒延伸量大于缩短量, 随着端粒的不断净延伸, 衰老的细胞和个体自然会逆转年轻, 从而使个体发生了反向发育和返老还童。

如果在治疗时能够抑制 TRF1, 端粒延伸效果则会更好。

(本文编辑: 刘永烈)

(收稿日期: 2011-9-2)