

端粒和端粒酶与衰老研究

郭 曼, 欧阳芳茜, 王玉刚

(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘 要: 衰老是一种多因素的复合调控过程, 表现为染色体端粒长度的改变、DNA 损伤、DNA 的甲基化和细胞的氧化损伤等, 并已形成了许多学说, 而端粒学说成为衰老研究的热点之一。对与衰老紧密相关的因素——端粒、端粒酶的结构及其与衰老关系的研究进展进行综述, 阐明对端粒—端粒酶的作用将会在抗衰老方面有着十分重要的理论价值及实际意义。

关键词: 端粒; 端粒酶; 衰老

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S2-0030-07

Telomere, Telomerase and Researches in Senescence

GUO Man, OU-YANG Fang-qian, WANG Yu-gang

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Aging is a complex regulatory process, involving alterations of the telomere's length, DNA damage, DNA methylation and cellular oxidation. A lot of theories have been proposed to explain the aging process, and the telomere hypothesis of cellular senescence is becoming one of hot spots. The structures and functions of telomere-telomerase and the correlation between telomere-telomerase and senescence were reviewed, which will manifest important theoretic and practical significance in antiaging.

Key words: telomere; telomerase; aging

(Life Science Research, 2006, 10(4)S2: 030 ~ 036)

端粒、端粒酶和细胞衰老是近年来生命科学研究的热点之一, 随着分子生物学技术的不断发展, 它们之间的关系越来越受到重视, 成为细胞衰老研究中的热点。大量实验证实, 哺乳类动物细胞具有调节细胞寿命的复杂机制。正常细胞拥有非常有限的增殖能力, 随着年龄的增长, 体细胞有丝分裂次数增加, 在经过有限的分裂次数以后, 由

于末端复制问题的存在, 端粒重复序列将逐渐丢失, 从而导致染色体端粒长度逐渐缩短, 当缩短至临界长度时, 细胞就会停止分裂而衰老、死亡, 由此 Harley 等人提出了细胞衰老的端粒假说, 认为端粒长度的变化可以作为细胞有丝分裂能力的生物钟^[1]。然而最新的一些研究结果对端粒假说提出了挑战, 有学者对端粒 - 端粒酶在细胞衰老中

收稿日期: 2006-10-20; 修回日期: 2006-12-12

作者简介: 郭曼(1985-), 女, 山东济南人, 湖南师范大学生命科学学院学生, Tel: 13007317612 E-mail: satina1022@126.com; 欧阳芳茜(1985-), 女, 湖南长沙人, 湖南师范大学生命科学学院学生(郭曼和欧阳芳茜对本文贡献相同, 为并列第一作者), Tel: 13723895142, E-mail: halasissi@yahoo.com.cn; 王玉刚(1986-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学生命科学学院学生, Tel: 13875862941, E-mail: yanzhizi3@sina.com.

的作用地位提出了新的疑问。细胞衰老是器官衰老的基础。端粒和端粒酶调控着细胞增殖活性和细胞寿命。端粒和端粒酶系统的研究对阐明细胞衰老和恶化机制, 肿瘤的诊断、治疗以及抗衰老新药物的开发都具有重要意义。

1 端粒

1.1 端粒结构

1.1.1 端粒 DNA

1978年 Blackburn 等首先发现四膜虫 rDNA 分子末端是一连串重复的六核苷酸。人类的端粒 DNA 由 [5'-TTAGGG-3'] 反复串联而成, 重复序列可重复达上千次, 并具有一定富含 G 的 3' 末端单链突出。人体不同组织细胞端粒长度不同, 其长度主要受端粒酶、端粒结合蛋白和核糖基转移酶-核糖多聚酶等共同调控^[2], 总长度约 5~15 kb, 精子和早期胚胎细胞端粒长度可达 15~20 kb。随着每次细胞分裂的进行, 染色体末端丢失 50~200 bp。端粒 DNA 不具有编码蛋白质的功能, 重复序列的数目也不确定, 遗传上高度保守。

1.1.2 端粒结合和相关蛋白

人类端粒结合蛋白包括 TRBP1、Rap1、Rad、TN2、TRF1、TRF2、POT1 等, 它们可以为染色体末端加帽, 防止核酸降解及末端与末端的结合, 从而保证染色体的稳定性^[3, 4]。人类端粒相关蛋白有 Ku70、Ku80、Tankyrase1、PINX1、TIN2、hRap1 等, 如图 1。

TRF1 是一种端粒 DNA 双链重复序列结合蛋白, 它只结合在 T 环上。其包括 3 个功能域: C 末端 Myb 样 DNA 结合功能域、N 末端的酸性氨基酸残基和多肽链中部的二聚化反应功能域。两个 TRF1 利用各自的 myb 结构域与 DNA 结合形成同源二聚体, 并能使 DNA 发生轻微的弯曲。TRF1 通过负反馈机制抑制端粒增长、稳定端粒的长度, 其只抑制端粒酶在端粒末端的行为。电镜显示在体外 TRF1 形成一种蛋白丝状物, 能促使两条 DNA 链相互连接, 因此这种负反馈机制被认为是通过蛋白计数模式来实现的。TRF1 与 Tankyrase1、TIN2 和 PINX1 等组成 TRF1 复合体, 大量 TRF1 复合体沿着端粒 DNA 双链结合, 作为一个长度测量装置来测量端粒的长度。端粒越长, 结合的 TRF1 复合体就越多, 负反馈调节的信号就越强^[5]。Loayza 等^[6]发现端粒保护蛋白(POT1)是 TRF1 复合体控制端粒长度作用的最终传递体。POT1 作为长度信息

的传递体把信息传递给端粒酶, 起组织端粒酶的作用。其可能的作用方式是结合单链 DNA 末端, 使端粒酶不能识别 3' 悬挂末端引物, 从而不能启动端粒的延伸。Ye 等^[7]通过质谱测量法鉴定出一种新的端粒结合蛋白—POT1- 交互作用蛋白 1 (PIP1), 发现 PIP1 与 POT1 和 TIN2 结合, 把 POT1 拴系在 TRF1 复合体上。

TRF2 与 TRF1 同源, 也是端粒 DNA 双链重复序列结合蛋白, 它同样具有 C 末端 Myb 样 DNA 结合功能域和二聚化反应功能域, 对端粒长度起负调控作用, 可以在一定程度上抑制端粒酶的活性。过表达 TRF2 将引起端粒一定程度的缩短。与 TRF1 不同的是 TRF2 蛋白 N 末端主要包括碱性氨基酸残基, 另外, 其在进化上更保守。电镜观察发现, TRF2 能把线性的端粒 DNA 重塑成 T- 环样结构。TRF2 的丢失会引起富含 G 的 3' 末端悬挂链丢失、p53 的激活、染色体末端融合^[8]、3' 悬挂末端侵入端粒双链 DNA 形成 T- 环结构以及在侵入处置换出一段 DNA 链与互补链配对, 形成 D- 环。侵入处也即 T- 环与端粒双链 DNA 的交接处是 TRF2 的选择性结合部位。这些研究提示 TRF2 是 D 环-T 环结构形成和稳定的重要因子。TRF2 也不是孤立地起作用, 它与人抑制剂激活物蛋白 1 (human repressor-activator protein 1, hRap1) 交互作用形成复合物结合端粒双链重复序列^[9]。

Ye 等^[10]的研究发现, TRF1 交互作用核蛋白 2 (TRF1-interacting factor 2, TIN2) 能同时结合 TRF1 和 TRF2, 提示 TRF1 复合体和 TRF2 复合体相互作用参与端粒长度的调控。他们通过质谱测量法和免疫共沉淀法证实 TRF1、TIN2、PIP1 和 POT1 与 TRF2-hRap1 复合体相关联, 并发现 TRF2-hRap1 复合体的组分包括 TIN2 和 POT1, 但是没有 TRF1。另外, 他们还证实, 与 TRF2 直接发生作用的是 TIN2 而不是 POT1 或 PIP1。TIN2 似乎是这些端粒结合和相关蛋白相互联系的一个纽带, 它介导的 TRF1 和 TRF2 复合体之间的相互作用在端粒长度调节和端粒末端结构的保护作用中起重要作用。

1.2 端粒的功能

根据现有的研究结果以及已知的端粒结构推测, 端粒功能至少包括: 1) 保护染色体末端不被降解, 防止其粘着、融合及重组, 维持其完整性; 2) 参与染色体的定位和复制, 保证细胞的正常分化与繁殖; 3) 反映细胞分裂的能力。随着细胞的不

断分裂，端粒重复序列逐渐缩短的特点决定了细胞分裂次数是有限的，因而端粒可以作为细胞的“分裂钟”来预测细胞的复制能力。另外，一些关

键的重合机制在最近的研究中被发现，提示着端粒重合动力学在基因组的稳定和去稳定中有着一些现在不被我们所知的作用^[11]。

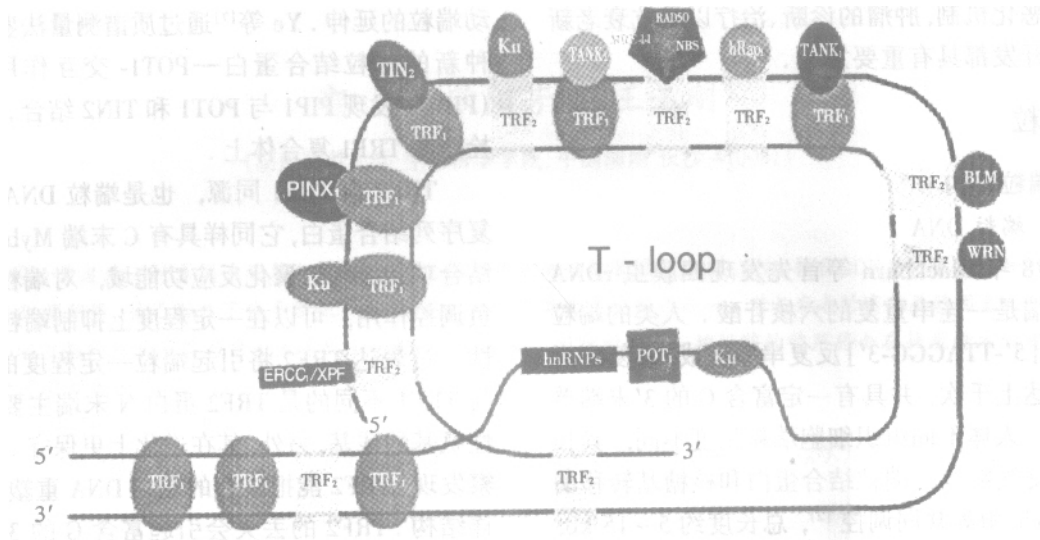


图 1 端粒结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of telomere structure

2 端粒酶

2.1 端粒酶的组成

Greider 和 Blackum 于 1985 年首先在四膜虫中发现了端粒酶。端粒酶具有逆转录酶的活性，能够以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA。目前认为人端粒酶结构主要包括三部分：1) 端粒酶 RNA (human telomerase RNA, hTR); 2) 端粒酶相关蛋白质 1 (telomerase associated-protein 1, TP1/TLP1); 3) 端粒酶催化亚单位 (human telomerase catalytic subunit, hTERT/hTRT)。另外，还有热休克蛋白、p23 和 dyskerin。

hTR 即人端粒酶 RNA，是端粒酶合成端粒 DNA 的模板，其基因定位在 3q23.3，约含 450 个核苷酸。它包含一个 5'CUAACCCUAAC3' 的模板序列，恰与 1.5 个 TTAGG 重复序列形成互补。hTR 的二级结构包括模板区、假接体区、CR4-5 区、BoxH-ACA 区和 CR7 区。有研究表明，hTR 的表达与端粒酶活性的调节是分离的：在正常体细胞中往往存在 hTR，但是没有端粒酶活性^[12]；在多种肿瘤细胞中测得的 hTR 与端粒酶活性也不平行^[13]。但是，Yeo 等^[14]采用反义寡核苷酸技术研究发现模板区是端粒酶结合端粒 DNA 和发挥活性作用的必需结构；阻断 CR4-5 区对 RNA-DNA 的结合影响不大，但对端粒酶活性的抑制达 70.4%，而假接体区的阻断则会降低端粒酶活性

达 25.9%^[15]。TP1 的作用现在并不是很清楚，可能协助端粒酶结合到端粒 DNA 上，但有一点可以明确，TP1 并不是端粒酶发挥活性作用所必须的，但却在端粒酶活性的调节中有重要作用^[16]。hTERT 的基因是定位于 5p15.33 的单拷贝基因，全长 37 kb，其核心启动子区长 183 bp。与前者不同，hTERT 的 mRNA 在大多数正常体细胞中是不表达的，但在原发性肿瘤、癌细胞系中却有强表达^[17]。hTERT 是包含 1132 个氨基酸残基的多肽链，作为端粒酶的催化亚基具有逆转录酶的共同结构——7 个蛋白质域以及端粒酶催化亚基独特的 T 框架保守区域。hTERT mRNA 水平和端粒酶的活性成正相关：使 hTERT 基因突变，则细胞不表现端粒酶活性；将载有 hTERT 基因的质粒转染端粒酶隐性的成纤维细胞，可重建端粒酶活性^[18]。值得一提的是，最近有研究发现 hnRNP A1 是端粒酶全酶的辅助因子，hnRNP A1 通过在端粒酶移位时解开 G 四聚体或 G-G 发夹结构来刺激端粒的延伸^[19]。目前认为，hTERT 是人类端粒酶活性的主要调控亚单位，hTERT 一旦表达就和其他亚单位一起组装成具有高活性的端粒酶全酶^[20]。

2.2 端粒酶的功能和活性调节

目前认为端粒酶具有如下功能：1) 通过自身的 RNA 模板、催化亚单位和辅助蛋白将端粒 DNA 添加到染色体的末端；2) 维持和平衡端粒序列长度；3) 修复断裂的染色体末端。在正常胚胎

发育期的体细胞中能检测到端粒酶的活性,而在人体干细胞及造血干细胞中虽然也能检测到低水平的端粒酶活性,但难以维持端粒的修复延伸,端粒仍将进行性缩短,最终导致细胞凋亡。Fu等^[21]研究发现脑源性神经生长因子和分泌型 β -淀粉样前体蛋白对早期分裂后胚胎海马神经元的神经营养和促存活作用是以有活性的端粒酶的存在为前提的,而对于成熟神经元,情况并不是这样的。Kang等^[22]电凝成年小鼠右大脑中动脉,发现持续性大脑中动脉闭塞后梗塞区域周围 TERT mRNA 被诱导表达。成年小鼠脑神经元属分裂后神经元,不再发生有丝分裂所以不存在末端复制问题,而此时 TERT 被诱导表达预示着它在脑神经元的缺血缺氧损伤过程中的其他作用。通过对 TERT 转基因鼠的实验,他们还发现 TERT 对抗 NMDA 受体介导的兴奋毒性作用似乎并不依赖于端粒酶延伸和保护端粒的功能。最近有研究表明,低细胞浓度的端粒酶对短的端粒获得最佳延伸以及维持端粒长度的动态平衡是非常关键的^[23]。有理由相信,端粒酶或其他组分可能通过多种途径对人体正常细胞的生长发育以及病理状态下细胞的存活/死亡进行严格的调控。端粒酶的表达和失控直接与人类的疾病有关。人体的生长发育是一个极其复杂的过程,因而端粒酶的表达、失活以及作用方式必然受到精密的调节。普遍认为,端粒酶活性的调节机制是一个多步骤多水平的复杂过程,涉及转录、翻译、翻译后水平,包括端粒结合蛋白、细胞周期蛋白及相关因子、磷酸化及去磷酸化蛋白的调节等方面。值得一提的是,有最新研究表明,端粒酶中 TERT 亚基的过表达能促进头发生长以及在不影响端粒的长度的情况下促进干细胞的增殖等功能,这为将来研究端粒酶的功能以及它与其他细胞组分的相互作用提供了一个新的途径^[24]。

3 端粒及端粒酶与衰老

3.1 端粒-端粒酶假说的由来和发展

早在 20 世纪 70 年代, Olovnikov 的研究和理论开创了衰老的端粒-端粒酶假说的先河。他首先明确提出了末端复制问题以及这一问题的解决办法。1991 年美国抗衰老学家 Harley 提出了较为详细的端粒-端粒酶假说:随着细胞分裂,端粒若缩短至一极限长度, DNA 损伤即将发生时,细胞自身的检测系统激活,启动终止细胞分裂的信

号,抑癌基因 $p53$ 和(或) Rb 表达,细胞周期阻滞,细胞进入第一死亡期 M1 期 (mortality stage 1)。如果受到病毒的感染或抑癌基因发生突变或被封闭,则细胞顺利通过 M1 期。细胞继续增殖 20~40 代,同时端粒进一步丢失,直到发生 DNA 损伤,出现染色体融合、细胞危机,即第二死亡期 M2 (mortality stage 2)。此时大部分细胞死亡,只有极少细胞因为激活了端粒酶而发生逃逸,成为永生细胞。因端粒长度的缩短而导致细胞分裂停止的机制尚不清楚,目前有 3 种解释:1) 端粒具有异染色质的特性,其长度缩短后,端粒体染色质将会侵袭邻近的 DNA,影响与生长调控有关的基因表达;2) 端粒 DNA 的完全丢失会产生损伤的信号,此信号会激活 $p53$,导致生长的抑制。如果端粒没有被端粒酶修复,这一抑制将会持续存在;3) 认为不是损伤的信号,而是缩短了的端粒本身激活了 $p53$,导致永久性生长抑制。现在更倾向于第 3 种理论。

3.2 端粒及端粒酶与衰老关系的实验证据

自从端粒-端粒酶假说的诞生起,人们就面临着这样一个问题:端粒的耗损是衰老的原因还是衰老的伴随现象或结果。虽然直接的证据不易获得,大量的实验研究已经说明:无论途径和方式如何,端粒确实是与衰老发生有着千丝万缕的联系。

目前,有关端粒涉及衰老的有力证据是由 Allsopp 等^[25]人在培养不同年龄的人纤维细胞时发现的。他们发现细胞在培养液中分裂的次数与开始培养分裂的端粒长度成正比,即端粒限制了细胞进行分裂的次数。在 hTERT 的基因被克隆成功后,下列实验也为细胞衰老的端粒假说提供证据。Bodnar 等^[26]在两种端粒酶活性为阴性的正常人细胞(视网膜色素上皮细胞和表皮成纤维细胞)导入能编码人端粒酶催化亚基的载体后,发现其端粒酶活性呈阳性,同时有丝分裂次数增加,使其寿命延长了至少 20 代,且细胞衰老的生物学标记 β -半乳糖苷酸的表达也显著减少,这表明端粒长度缩短和体外细胞老化之间具有因果关系。

Rufer 等^[27]通过逆转录病毒载体将人类 TERT 基因转入 T 淋巴细胞后发现转入后的细胞能表达较高水平的端粒酶活性并维持或延长了其端粒的长度,增强了细胞的复制能力。此外,一些其它的实验结果也证明了端粒与衰老之间的关系:1) 有旺盛增殖能力的胚胎细胞、生殖细胞、造血干细胞等

具有较长的端粒, 而且具有较高的端粒酶活性; 而多数增殖能力有限的体细胞端粒较短, 不表达或低表达端粒酶活性; 2) 体外实验中, 在多种端粒酶阴性的细胞中重建端粒酶活性, 可以维持端粒长度, 增加细胞的寿命, 甚至使细胞永生化^[28, 29]; 而抑制端粒酶活性则可迫使永生化细胞转化为正常细胞, 出现衰老、死亡; 3) Werner 综合症和 Down 综合症的患者端粒加速缩短, 与这两种患者加速的衰老相对应. 使 Werner 综合症患者纤维母细胞表达端粒酶活性可以延长细胞寿命, 另外, Bloom's 综合症和先天性角化症也和关系到端粒酶活性的突变有关^[30]. 最近, Keefe 等^[31]指出, 端粒的缩短与女性的生殖衰老密切相关.

然而, 以端粒的长度作为决定细胞分裂能力的指标, 似乎难以对某些试验结果作出合理解释, 因此细胞衰老的端粒假说也遇到挑战. 例如, 在体外培养的 T 淋巴细胞中表达端粒酶的活性虽然可以使缩短的端粒恢复至原来长度, 但仍会与对照组细胞同时停止分裂. 而且, 在某些细胞中表达端粒酶的活性而促使细胞生长和存活未必必要依赖端粒的延长^[32]. 还有研究报道, 不同年龄供体角膜内皮细胞 TRF 长度基本保持不变, 且仍长期维持在较高水平, 但端粒酶活性为阴性, 这可能与角膜内皮细胞有限的分裂能力有关而不是因为短的端粒片段引起^[33]. 尽管在人体众多衰老的组织中可见端粒的缩短, 但尚未有确切的证据证实是因为端粒缩短造成了细胞衰老, 这就需要有更新的实验方法来证实^[34].

虽然如此, 端粒作为一面有丝分裂钟调控着细胞的复制寿命已经被多数的研究者接受. 然而这面有丝分裂钟何时何种情况才启动细胞衰老的信号呢? Blackburn^[35] 在前人的基础上提出了全新的端粒与细胞衰老关系假说: 端粒是一个动态的由端粒 DNA 和端粒结合蛋白构成的核蛋白结构, 在正常的细胞分裂时, 端粒可以在戴帽状态和非戴帽状态两种状态间变换, 戴帽状态是端粒的功能状态, 细胞可以继续分裂, 非戴帽状态则会引发细胞周期阻滞. 随着细胞分裂的继续, 越来越多细胞的端粒处于非戴帽状态, 继而出现衰老、死亡. 端粒如进行性缩短或缺乏端粒酶活性, 则难以恢复戴帽状态而转变为非戴帽状态; 但非戴帽状态的端粒可以通过激活端粒酶以同源重组的途径返回到戴帽状态, 继续进行细胞分裂.

这一假说和 Griffith 等提出的端粒的 D 环-T

环帽子结构相互呼应, 并且和经典的端粒长度与衰老关系的理论并不相悖, 因为端粒缩短到一定长度并不能形成 T 环结构. Karlseder 等^[36]通过表达 TRF2 增加了端粒缩短的比率却没有加速细胞的衰老. TRF2 使端粒引发衰老的极限长度从 7 kb 下降到 4 kb, 提示 TRF2 有延缓衰老的作用. 根据上文所述, TRF2 可能就是通过促进帽子结构形成, 稳定端粒的戴帽状态发挥其延缓衰老的作用. 该研究也从一个侧面证明了是缩短端粒的保护状态的改变而不是完全的端粒 DNA 的丢失引发复制衰老. Stewart 等^[37]首次揭示与衰老相关的端粒结构改变分子学机制. 基于先前的研究他们提出, 3' 悬挂末端的丢失才是触发复制衰老的信号, 因为 3' 悬挂末端的丢失会引起 T- 环结构的破坏, 导致端粒末端的非戴帽状态^[38].

4 展望

有关细胞走向衰老过程中一系列事件发生的理论顺序在早期已经被描述. 但是, 这些事件的发生是否能够解释器官水平的衰老, 提示生命是一条最终走向衰落的道路呢? 换句话说, 端粒损失能够解释人类衰老吗? 也许, 细胞衰老的确是端粒损失的结果, 一些证据也证明细胞衰老也能被其他的一些因素诱导, 比如说氧化损伤, 致癌基因的激活. 然而有学者提出, 这些证据也许仅仅只能反映细胞培养的条件对细胞的影响, 而不是细胞衰老本身. 同时, 如果能通过控制端粒酶活性来保持细胞端粒的长度, 难道就能够阻止细胞衰老吗? 最近有研究结果证明端粒酶有除延长端粒以外的功能, 提示端粒酶也许仅能延缓细胞衰老, 且它的活性与端粒无关^[39]. 无论细胞来源如何, 衰老的细胞都会随着年龄的增长而积累^[40]. 尽管存在多种分歧, 端粒的长短与细胞年龄相关已在多种人类组织中被证实^[41]. 也许, 有关端粒长短与年龄的相关性的数据只是一种假象, 仅仅反映人们对最常用来测量端粒长度的 TRF 的分析不够^[42]. 或者说激发细胞衰老的最关键的机制不是端粒的缩短, 而是其他一些未知的、更精确的调控机制^[43, 44]. 不管怎样, 早期的将端粒快速缩短能加速细胞衰老的证据^[45] 提示了端粒长度与衰老之间明显的非线性关系. 也许一些主动的试验能够平息这些争论.

虽然端粒及端粒酶与细胞衰老关系在某些地方仍存在争议, 但有关端粒与衰老的关系的探索

还是有意义的。端粒酶通过保护端粒末端结构,起到增加复制寿命的作用。况且端粒酶不是原癌基因,在增加端粒长度的同时并不引起与癌变相关的其它改变^[46-48]。另有研究表明,端粒酶能维持或恢复细胞的许多生理功能,增强细胞对水和DNA损伤剂等凋亡诱导剂的抵抗,提示端粒酶作为抗衰老药物研发以及在干细胞治疗方面的广阔的应用前景。然而就一些问题,如端粒结合蛋白和相关蛋白对端粒长度和状态的详细调控机制以及与端粒酶的复杂协同作用;端粒酶表达和活性的调控机制以及抗凋亡和促存活作用的机制等尚待进一步的研究和阐明。

参考文献(References):

- [1] HARLEY C B. Telomere loss, mitotic clock or genetic time bomb[J]. *Mutat Res*, 1991, 256(2-6): 271-282.
- [2] CALLEN E, SURRALLES J. Telomere dysfunction in genome instability syndromes[J]. *Mutat Res*, 2004, 567(1): 85-104.
- [3] KUIMOV A N. Polypeptide components of telomere nucleoprotein complex[J]. *Biochemistry*, 2004, 69(2): 117-129.
- [4] HOUGHTALING B R, CUTTONARO L, CHANG W, *et al.* A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(18): 1621-1631.
- [5] SMOGORZEWSKA A, van STEENSEL B, BIANCHI A, *et al.* Control of human telomere length by TRF1 and TRF2[J]. *Mol Cell*, 2000, 20(5): 1659-1668.
- [6] LOAYZA D, DE LANGE T. Interaction between p53 and TRF1, TRF2 and analysis of binding domain of p53 *in vitro*[J]. *Nature*, 2003, 424(6943): 1013-1018.
- [7] YE J Z, HOCKEMEYER D, KRUTCHINSKY A N, *et al.* POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(14): 1649-1654.
- [8] STANSEL R M, DE LANG T, GRIFFITH J D. T-loop assembly *in vitro* involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang[J]. *EMBO J*, 2001, 20(19): 5532-5540.
- [9] LI B, OESTREICH S, de LANG T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution[J]. *Cell*, 2000, 101(5): 471-483.
- [10] YE J Z, DONIGIAN J R, VAN OVERBEEK M, *et al.* TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 47264-47271.
- [11] BHATTACHARYYA M K, LUSTIG A J. Telomere dynamics in genome stability[J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(2): 114-122.
- [12] FENG J, FUNK W D, WANG S S, *et al.* Advances in telomerase and its inhibitors[J]. *Science*, 1995, 269: 1236-1241.
- [13] AVILION A A. Telomeres, telomerase and cancer[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 645-650.
- [14] YEO M, RHA S Y, JEUNG H C, *et al.* Inducible double-stranded RNA expression activates reversible transcript turnover and stable translational suppression of a target gene in transgenic tobacco[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(1): 127-132.
- [15] FENG R H, ZHU Z G, LI J F, *et al.* Inhibition of human telomerase in MKN-45 cell line by antisense hTR expression vector induces cell apoptosis and growth arrest[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 436-440.
- [16] LIU Y, SNOW B E, HANDE M P, *et al.* Telomerase-associated protein tep1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance *in vivo*[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(21): 8178-8184.
- [17] MEYERSON M. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression hTERT(hEST2), the catalytic subunit gene, up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. *Cell*, 1997, 90: 785-795.
- [18] YUDOH K, MATSUNO H, NAKAZAWA F, *et al.* Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(14): 3442-3450.
- [19] CHANG J T, CHEN Y L, YANG H T, *et al.* Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(14): 3442-3450.
- [20] ZHANG Q S, MANCHE L, XU R M, *et al.* hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity[J]. *RNA*, 2006, 12: 1116-1128.
- [21] FU W, LU C, MATTSON M P. Telomerase mediates the cell survival-promoting actions of brain-derived neurotrophic factor and secreted amyloid precursor protein in developing hippocampal neurons[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(24): 10710-10719.
- [22] KANG H J, CHOI Y S, HONG S B, *et al.* Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(6): 1280-1287.
- [23] CRISTOFARI G, LINGNER J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting[J]. *EMBO J*, 2006, 25(3): 565-574.
- [24] CALADO R T, CHEN J. Telomerase: not just for the elongation of telomeres[J]. *Bioessays*, 2006, 28(2): 109-112.
- [25] ALLSOPP R C, VAZIRI H, PATTERSON C, *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10114-10118.
- [26] BODNAR A G, QUELLETE M, FROLKIS M, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. *Science*, 1998, 279(5349): 349-352.
- [27] RUFER N, MIGLIACCIO M, ANTONCHUK J, *et al.* Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential[J]. *Blood*, 2001, 98(3): 597-603.
- [28] BODNAR A G, QUELLETTE M, FROLKIS M, *et al.* Extension

- of life-span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. *Science*, 1998, 279(5349): 349-352.
- [29] YANG J, CHANG E, CHERRY A M, *et al.* Human endothelial cell life extension by telomerase expression[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 26141-26148.
- [30] JOO-SHIK S, ANGELA H, MICHAEL J, *et al.* The roles of telomeres and telomerase in cellular aging[J]. *Pathology*, 2006, 38(2): 103-113.
- [31] KEEFE D L, MARQUARD K, LIU L. The telomere theory of reproductive senescence in women[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2006, 18(3): 280-285.
- [32] BLASCO M A. Telomerase beyond telomeres[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 627-633.
- [33] EGAN C A, SAVRE T I, SHAY J W, *et al.* Analysis of lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(3): 648-653.
- [34] HOMSBY P J. Cellular senescence and tissue aging *in vivo*[J]. *Gerontol A Biol SciMed Sci*, 2002, 57(7): B251-256.
- [35] BLACKBURN E H. Telomere states and cell fates[J]. *Nature*, 2000, 408: 53-56.
- [36] KARLSEDER J, SMOGORZEWSKA A, de LANGE T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss[J]. *Science*, 2002, 295 (5564): 2446-2449.
- [37] STEWART S A, BEN-PORATH I, GAREY V J, *et al.* Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence[J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 492-496.
- [38] ELIZABETH H B. Switching and signaling at the telomere[J]. *Cell*, 2001, 106: 661-673.
- [39] CHRISTOPH G, MARIA A B. Novel roles for telomerase in aging[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2006, 127(6): 579-583.
- [40] KRTOLICA A, CAMPISI J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002 (34): 1401-1414.
- [41] TAKUBO K, IZUMIYAMA-SHIMOMURA N, HONMA N, *et al.* Telomere lengths are characteristic in each human individual[J]. *Exp Gerontol*, 2002, (37): 523-531.
- [42] BAIRD D M, KIPLING D. The extent and significance of telomere loss with age[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, (1019): 265-268.
- [43] KARLSEDER J, BROCCOLI D, DAI Y, *et al.* p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2 [J]. *Science*, 1999, (283): 1321-1325.
- [44] KARLSEDER J, SMOGORZEWSKA A, de LANGE T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss[J]. *Science*, 2002, (295): 2446-2449.
- [45] FRENCH R W J, BLACKBURN E H, SHANNON K M. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, (95): 5607-5610.
- [46] HARLEY C B. Telomerase is not an oncogene[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 494-502.
- [47] JIANG X R, JIMENEZ G, CHANG E, *et al.* Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype[J]. *Nat Genet*, 1999, 21: 111-114.
- [48] ALVERO A B, FISHMAN D A, QUMSIYEH M B, *et al.* Telomerase prolongs the lifespan of normal human ovarian surface epithelial cells without inducing neoplastic phenotype [J]. *J Soc Gynecol Invest*, 2004, 11(8): 553-561.