

# 衰老研究的新纪元

印大中

(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

**摘要:** 在人类历史进入 21 世纪的时刻, 生命科学关于衰老原理的研究迎来了一个划时代的新纪元。多领域、多层次、跨学科的衰老研究, 在分子水平上将遗传基因衰老学说、自由基氧化衰老学说、糖基化衰老学说和交联衰老学说汇聚到了一个新的焦点——羰基毒化衰老学说。由于现代生命科学逐步认识到了羰-氮反应是诸多生物副反应中的一个核心过程, 该反应引起了衰老机理研究的极大重视。

**关键词:** 衰老原理; 自由基; 氧化; 糖基化; 羰基毒化

**中图分类号:** R363

**文献标识码:** A

## A New Epoch of Aging Study

YIN Da-zhong

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

**Abstract:** At the dawn of the 21st century, studies of biochemical mechanisms of aging also come on to a remarkable new epoch. The multidisciplinary nature of aging studies, including molecular mechanisms of the programmed gene theory of aging, the free radical/oxidative stress theory of aging, the glycation/Maillard reaction theory of aging, the cross-linking theory of aging eventually seem to highlight a primary and central cause of aging, the carbonyl toxification cause of aging, which is attracting much attention in the field related.

**Key words:** aging; free radicals; oxidative stress; glycation; carbonyl stress

20 世纪的生命科学研究将人类对于衰老的认识从整体动物水平推进到了细胞水平和分子水平, 最终归结为两大类型: 一类为遗传衰老研究, 另一类为环境伤害衰老研究<sup>[1]</sup>。两大类型的衰老研究都各有建树, 但也各有不足。本文将对目前最有影响的衰老学说作一些重点分析比较, 进而对新世纪的分子水平的衰老研究做出瞻望。

收稿日期: 2000-03-15

基金项目: 教育部留学回国人员基金项目; 湖南省教委科研基金项目

作者简介: 印大中(1935-), 男, 江苏扬州人, 湖南师范大学特聘教授, 博士, Tel: 0731-8872795.

## 1 端区缩短、克隆羊与遗传基因衰老学说

毋庸置疑,动物种系之间极大的寿命差异是由于某些所谓衰老基因的调控在起作用,然而从汪洋大海般的遗传基因中找出与寿命相关的片段极为不易. 经过遗传生命科学家几十年的辛勤探索,现已实验确定的与衰老和长寿有关的基因已达 10 多种<sup>[2]</sup>, 它们分别是: age-1、ras 2p、lag-1、lac-1、daf-2、daf-16、daf-23、clk-1、spe-26、gro-1 等等. 这些基因或与抗氧化酶类的表达有关,或与抗紧张、抗紫外线伤害有关,有的与增加某种受体的表达有联系,也有的与哺乳动物精子的产生相关. 好些“长寿基因”到底起什么生化作用,目前还不是很清楚. 由于多种原因,如医学伦理学、实验技术和实验周期等条件的限制,长寿基因的研究目前仍以线虫、果蝇等较低等动物为主要对象,哺乳动物和人类长寿基因的探索还处于相当初级的阶段.

近年来,引起遗传衰老学说专家们极大兴趣的是细胞分裂研究中的一些重要发现:即人体成纤维细胞染色体在复制过程中的极限现象(Hayflick 细胞分裂极限,一般低于 50~60 次)和染色体端区由于复制不完全而不断地缩短的现象. 染色体 DNA 每复制一次,端区就缩短一截. 人体成纤维细胞端区每年缩短十几个碱基. 当染色体端区短到一定长度时,细胞的繁殖就不能再继续,细胞分裂次数便达到了极限进而导致细胞和整个生物体的死亡. 根据这个现象,有些学者认为这个端区就是我们千方百计企图寻找的生命时钟(Lange)<sup>[3]</sup>. 同时,其它研究也发现,有些肿瘤细胞在繁殖过程中由于端粒酶的作用而端区不缩短,因此肿瘤细胞的繁殖永无休止. 这确实是一个非常诱人的现象,似乎不仅能解释细胞繁殖终止的原因,而且甚至于连同肿瘤细胞的永生原理也随之迎刃而解了. 根据这个道理,目前在生命科学领域对于英国罗斯林研究所克隆羊“多利”的实际年龄颇有异议. 有人提出“多利”的细胞染色体端区比正常羊的短,因此认为“多利”比它的实际年龄要老许多.

其实,这个端区缩短的衰老假说有许多不当之处:

(1) 成纤维细胞在复制过程中的极限现象只代表体外培养的细胞的老化,这与体内处于种种生物调控下的细胞老化不能相提并论.

(2) 它的适用范围最多只限于可分裂细胞,而终末不分裂细胞(postmitotic cells)的衰老与之无关. 其实,动物体内的 PM 细胞,如神经元细胞和心肌细胞在生命的早期就已经失去了分裂的功能,而这种不分裂决非动物老化死亡的原因.

(3) 还有些研究发现,啤酒酵母的端区在繁殖过程中并不缩短,人为的缩短啤酒酵母的端区不仅没有使之短命,反而起了“增寿”的作用. 另外,大鼠的最高寿限约为人类的二十五分之一,但它相对应的染色体端区却比人类的要长 5~10 倍. 根据以上事实和衰老分子生物学的基本原理,笔者认为不应该以端区长短评判克隆羊“多利”的实际年龄,“多利”身体中绝大多数器官从功能的角度来说并不比它的实际年龄老.

(4) 端区缩短只与细胞分裂次数有关,与环境伤害和生物体功能的逐渐丧失没有直接关系. 而统计学的研究表明,环境因子:如环境污染,生活方式,饮食起居甚至精神状况对于人类和动物寿命的影响大大超过了遗传因子的影响. 环境对寿命的影响为百分之六十几,而后者仅为百分之三十几.

总之,目前程序化衰老学说与环境伤害衰老学说已经逐步走进了一个合作的时代,寻找衰老基因的努力已集中在一个相对明确的范围之内,集中在与环境因子伤害造成衰老的相

关范围之内<sup>[4]</sup>。

## 2 自由基和氧化损伤衰老学说

自由基伤害衰老学说目前正处于步履艰难的境地<sup>[5~7]</sup>, 因为这个学说有着许多的牵强之处, 也遇到了许多实验结果造成的困惑和反驳。

(1) 检验自由基衰老学说的一个简便易行且行之有效的方法就是给动物喂适当种类和适当剂量的抗氧自由基物质, 如: 维生素 E、维生素 C 和胡萝卜素等等来观察其“益寿延年”的效果。早期的实验结果确实很令人兴奋, 各种抗氧化剂大大延缓了氧自由基造成的伤害现象, 有的甚至也能抗病防衰, 益寿延年。然而, 大量的实验结果显示, 支持和反对的数据皆有, 最终逐渐不相上下。抗氧化剂救急不救缓, 救病不救命。去掉伤害实验的不合理因素, 总体结果并不支持自由基衰老学说。

(2) 有关体内抗氧化物质和抗氧化酶类的研究表明: 各种抗氧化物质相互联系, 相互调节, 此消彼长。生物体内的各种抗氧化物质有重叠性、取代性、补偿性, 即一种抗氧化物质可以部分的被另一种抗氧化物质替补, 组织内的氧化还原是一个多抗氧化物质组成的平衡。抗氧化酶类有的随龄增加, 有的随龄下降, 有的不随龄变化。人体内的抗氧化酶类有的比鼠类高, 如超氧化物歧化酶 SOD; 有的又比鼠类低, 如过氧化氢酶和谷胱甘肽氧化酶。

(3) 越来越多的实验表明, 自由基反应是生命化学的一个基本组成部分 (A part of essential biology), 是诸多生化反应的必然过程, 除了氧自由基在免疫过程中重要的防御作用, 自由基过程是许多氧化酶, 脱氢酶进行氧化还原反应的一个中间环节; 又例如作为氧自由基之一的一氧化氮 NO 是一种神经传导因子, 起着重要的生理作用。另外, 自由基在前腺的合成中也必不可少。没有氧自由基, 人类一天也活不下去。

(4) 氧化伤害只是多种多样生物副反应的一种, 糖尿病患者氧化产物高于正常人, 心血管、肾脏老化提早, 老化与高血糖正相关, 而糖基化老化伤害从化学过程本身来讲并不依赖氧化过程<sup>[8,9]</sup>。

经过对大量现有资料的深入探讨, 美国著名老年研究学者 Masoro<sup>[10]</sup> 得出的结论是: “老年动物的抗氧化体系没有明显损伤变化, 老年动物抗氧化酶类和抗氧化组对抗氧化紧张的能力并没有实质性的改变和缺陷。”因此, Masoro 教授提出是否尚有另一个未被揭示的系统真正发生了老化变异而加速了老年动物的衰老过程。

## 3 糖尿病、心脑血管病和糖基化衰老学说

早期的分子生物学的衰老研究从脂肪的氧化领域引进了大量的较完备的知识和信息。因此, 长期以来, 一直将其重点和注意力集中在与脂肪的氧化以及与其相关连的领域, 如蛋白质的氧化和 DNA 的氧化, 而对于其它营养成分与老化的关系置之度外。

糖基化衰老学说是作为分子水平的又一个重要的衰老学说<sup>[11]</sup>, 在 20 世纪 80 年代走进了老年医学的实验室。该学说有时又可称之为美拉德反应衰老学说。1912 年, Maillard 发现葡萄糖与多种氨基酸反应能产生黄色以至褐色产物, 这个反应就是著名的食品非酶褐变反应, 是食品储藏过程中的一个大敌。长期以来, 美拉德反应一直是食品科学家为有效地储藏食物, 防止食品和饮料的褐变而钻研的课题。但近代的临床医学发现, 糖尿病患者因为血液中的糖含量高于正常人而提早出现种种衰老现象和退化性疾病。糖尿病患者晚期往往并发

各种心脏疾病, 心脑血管疾病, 粥样动脉硬化; 关节、血管由于胶原组织交联提前发生硬化, 出现加速的肾小球基底膜增厚, 免疫功能早损, 提前出现眼球晶体白内障、骨关节炎、肺气肿和其它退行性疾病。

研究表明, 在生理条件下 (包括温度、酸度等), 葡萄糖能与多种氨基酸、多肽和蛋白质中的氨基发生反应, 生成薛夫碱 (Shiff bases), 薛夫碱则可发生分子内的重排而生成较为稳定的阿马多里 (Amadori) 重排产物。该产物的进一步降解, 如脱氨、水解则可产生 Deoxyosone 等不饱和醛酮类中间产物。这些中间产物不仅与脂肪氧化过程所产生的不饱和醛酮类中间产物结构上相似, 而且其产生毒害反应的活性和最终产物也很相似, 如它们与蛋白质和核酸中的氨基交联共轭, 聚合重叠, 结成千奇百状, 发黄褐变的生物垃圾、荧光色素等。这些产物目前被笼统地称之为糖基化终端产物 (AGE), 其中包括嘧啶、吡咯, 也有吡嗪、咪唑以及它们与生物分子的聚合物。

糖基化/美拉德反应衰老学说指出: 糖基化造成的蛋白质的交联损伤是衰老的主要原因。主要发生反应的氨基酸残基有赖氨酸、精氨酸、组氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸以及苏氨酸等。由此造成结构蛋白的硬化, 功能酶的损伤, 如抗氧化酶和 DNA 修复酶等。还会造成能量供应的减少, 代谢功能的降低, 平衡机能的失调等等老化过程。

这个衰老学说认为, 糖基化造成的蛋白质的交联硬化, 逐渐变性是造成血管、肾脏、肺叶和关节提前老化的关键因素。

因为葡萄糖是人类能量代谢的核心成分, 所以大部分有关糖基化的研究以葡萄糖造成的糖基化为主要研究对象, 最近的研究成果表明, 其它单糖, 例如果糖的糖基化反应远比葡萄糖迅速。因此有人认为利用葡萄糖作为动物能量代谢的核心成分是动物进化中获得的最佳选择。

动物和人类防御糖基化衍生物的主要机理一般认为有以下两种, 一是体内酶类对 Deoxyosone 等不饱和醛酮类中间产物的氧化还原以及消除作用。二是对糖基化终端产物 AGE 的受体辨认和清理。

糖基化/美拉德反应衰老学说对糖尿病患者的提前老化作出了出色的解释, 将动物体能量过程的另外一个重要成分——碳水化合物, 与衰老过程连接了起来。

然而, 细察糖基化衰老学说, 也可以发现不少问题和一些难以解释的现象:

(1) 实验表明, 许多哺乳动物, 例如鼠类和人类的血浆葡萄糖含量差别并不是很大, 但是寿命相差却有几倍, 甚至几十倍。

(2) 有些鸟类糖血症 (Glycemia) 高于人类两倍以上, 却竟然也能活几十年, 如猫头鹰和鸮鹗分别能活 30 年和 60 年。

(3) 糖基化反应本身的速度相当慢。事实上, 糖基化的许多实验是在有氧气条件下完成的。实验证明, 与氧自由基相关的氧化过程确实起了加速和促进糖基化反应的作用, 所以英国伦敦大学 Wolff 博士根据他的专门领域的研究结果提出了“糖基氧化” (Glycoxidation) “自氧化-糖基化” (Autooxidative glycation) 等跨学科专业研究<sup>[12]</sup>。

为了慎重起见, 我们再深入地查一查衰老过程中生化反应的各种可能性。根据分子生物学的知识, 生物细胞在分裂繁殖以后衰老过程中的生化反应 (Post-translational modifications during aging) 包括: (1) 磷酸化 (Phosphorylation); (2) 二磷酸腺苷核糖化 (ADP-Ribosylation); (3) 氧化 (Oxidation); (4) 糖基化 (Glycation); (5) 甲基化

(Methylation); (6) 蛋白质降解过程 (Proteolytic processing); (7) 消旋化和异构化 (Racimization and isomerization).

这里(1)磷酸化是正常的生化过程,不造成老化。(2)二磷酸腺苷核糖化是表达后,蛋白的进一步能量化酶促制备,也与衰老无关。(3),(4)氧化和糖基化这两个非酶促反应,如前所述,是生物副反应中最主要的伤害反应。(5)随着年龄增加,动物细胞内 DNA 的甲基化程度下降,细胞分裂减慢。因此,也有的学者提出过“酶促甲基化衰老学说”。但是,由于 DNA 的甲基化过程是一个酶促反应,所以 DNA 的甲基化随龄下降则更应该是环境伤害造成的甲基化酶的损伤造成的结果,不是老化的原因。(6)蛋白质降解是一个多种蛋白酶的综合作用,与脂褐素形成有关。但这个过程不可能是造成衰老的起因。(7)因为发现牙齿和眼球晶体蛋白有缓慢的消旋化现象,因此曾经有人怀疑缓慢的消旋化和异构化是造成衰老的原因之一。但是与消旋化和异构化相关的疾病,如消旋化和异构化造成酶功能的降低等现象至今尚未见报导。

由此可见,氧化和糖基化是生物在储藏加工的过程中,生物细胞在分裂繁殖以后的生物反应中的两大最严重的灾难性副反应,也是目前能够观测到的仅有的能造成生物老化的两大反应。我们甚至可以写下这样一个简单的式子来表示:

$$\text{氧化} + \text{糖基化} \xrightarrow{\text{遗传调控}} \text{生物老化}$$

由于氧化和糖基化衰老学说既互相独立,又互相联系、互相补充,所以, Kristal 和 Yu 在 1992 年提出了自由基氧化/糖基化衰老学说<sup>[13]</sup>。这个结合使得某些氧化和糖基化衰老学说单独无法解释的现象得到了很好的解答;例如氧化衰老理论没有解释清楚的肾脏老化损伤,椎间盘等处氧浓度极低部位的老化损伤现象和高糖血症引起的老化现象等等。

#### 4 羰基毒化衰老学说——展望 21 世纪

尽管人类关于衰老原理的探索几乎涉及到生命科学的所有层次,但是衰老的本质过程不但没有变得越来越明白,反而似乎变得越来越复杂,越来越糊涂。就在这时,在 20 世纪 90 年代,留学瑞典的中国学者 Yin 和 Brunk 教授根据老年色素逐步形成的生物化学过程的研究,提出了羰基毒化衰老学说<sup>[9, 14]</sup>。

基于对氧化和糖基化的深刻理解和研究,1992 年, Yin 博士在《衰老原理和进展》杂志的一篇文章中首次明确地指出羰-氨反应是氧化和糖基化两大生化副反应的共同点和兼有反应。以后 Yin 进一步阐明羰-氨反应是氧化和糖基化造成缓慢生物老化过程的不可避免,并且是大部分不可修复的核心过程(Central process)。这个缓慢生物老化的本质就是羰-氨交联反应。

氧自由基引起的脂肪过氧化和糖基化反应均会引起体内不饱和醛酮的中间产物的增高。以硫代巴比妥酸反应物(TBARS)为例,疾病(如炎症、发烧、中风、手术)能导致人们体液的 TBARS 含量增加。即使是正常的紧张也会加速这个制造不饱和醛酮的老化过程。例如,老年人血清的 TBARS 含量约为年轻人的两倍;糖尿病患者血清的 TBARS 含量约为正常人的 1.5 倍;极剧烈长时间运动者尿液 TBARS 含量为正常人的 5~6 倍;通宵不眠者尿液 TBARS 含量为正常人的 8~10 倍。不饱和醛酮含量的升高必然加速体内伤害型的羰-氨交联反应,这个交联反应的一个明显特征就是体内老年色素前体物腊黄素(ceroid)的增高。

另外一类重要的实验结果是美国国立医学科学院 Stadtman 教授对于动物和人体内蛋白质的老化研究<sup>[15]</sup>。这些实验结果与脂质氧化的结果不谋而合。Stadtman 教授发现老年动物体内蛋白质的羰基含量大大高于年轻动物, 据估计, 老龄动物体内 40% ~ 50% 的蛋白质已被氧化而以含羰基的醛酮形式存在。

根据大量的科学实验结果, 羰基毒化衰老学说关于衰老的分子生化原理主要之点可归结如下:

(1) 老年色素的形成过程, 羰-氨反应, 是生物体内典型的和最重要的老化过程。这个过程在溶酶体中进行的结果为脂褐素的逐渐聚积。这个过程在体内的其它组织内也时刻在进行, 经年累月, 造成结构蛋白的交联, 功能蛋白的损伤。最典型的为胶原蛋白的老化造成血管硬化和组织交联老化, 这是一个健康老人无法逃避的老化现象。

(2) 老年色素的形成过程包括氧化和糖基化两大生化副反应的主要内容, 自由基和氧化造成的早期伤害大部分容易被生物体辨认、吞噬、降解、去弃或修复, 而羰-氨反应产生的后果, 尤其是组织结构的老化往往难于修复, 不易逆转, 随年聚积, 终生为患。

(3) 动物体对羰-氨毒化的老化伤害有多种防御方法。如: 抗氧自由基和抗氧化体系防止不饱和羰基化合物产生; 对羰基化合物以硫醇化合物还原共轭清理和游离氨基酸直接清除排泄; 羰基降解酶类(如醛氧化酶、谷胱甘肽转移酶等)对羰基化合物的清理; 对羰基化合物的受体识别、吞噬清理、可逆还原和部分剪切修复。因此, 动物和人类体内不饱和羰基化合物含量是一个制造和清理之间的动态平衡。

(4) 这些防御体系的生态和运作, 因物而异, 因人而异, 因遗传性状而异, 也可因环境变化而异。影响这些系统的基因往往影响动物的寿命, 即所谓的“寿命基因”。

如果说研究衰老最大的困惑在于因果难分, 那么研究老化最容易犯的错误就在于混淆急性和慢性的机体变化! 急性的变化致病, 慢性的机体变化致命。羰基毒化衰老学说最核心的内容在于透过现象看本质, 着眼于动物体缓慢发展的生物化学衍变, 着眼于含有共性的生物副反应过程, 着眼于司空见惯的日常生物垃圾的制造及其清理工作的重要。

羰基毒化衰老学说里有氧化紧张衰老学说的精髓, 也有糖基化衰老学说的要义; 有老年色素形成的核心过程, 也有交联衰老学说的主要内容; 涉及了遗传因子造成的程序化老化控制, 也暗示了膳食习惯与营养对老化的影响; 可以解释疾病对老化的加速, 也着意解释老化与疾病的不同。

近来, 美国 Tufts 大学营养和衰老研究所所长 Blumberg 教授在《自由基生物医学》杂志书评栏目中专门推荐了 Yin 和 Brunk 发表在《衰老的分子基础 (Molecular Basis of Aging)》一书中的羰基毒化衰老学说。目前, 羰基毒化过程到底是衰老的部分原因, 还是衰老的核心过程正在引起深入的探讨。羰基毒化与衰老已成为 21 世纪衰老理论和应用研究的一个重要的突破点<sup>[7, 16]</sup>。衰老机理研究正走进一个灿烂的新纪元。

#### 参考文献:

[1] MEDVEDEV Z A. An attempt at a rational classification of theories of aging[J]. Biol Rev, 1990, 65: 375-398.

[2] FINCH C E, TANZI R E. Genetics of aging[J]. Science, 1997, 278: 407-411.

[3] de LANGE T. Telomeres and senescence: ending the debate[J]. Science, 1998, 279: 334-335. <http://>

- [4] CUTLER R G. Longevity determinant genes, cellular dysdifferentiation and oxidative stress [A]. CUTLER R G, PACKER L, BERTRAM J, *et al.* Oxidative Stress and Aging [C]. Switzerland: Birkhauser Verlag, 1995. 15-19.
- [5] HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. J Gerontol, 1956, 11: 289-300.
- [6] YU B P. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction [J]. Free Rad Biol Med, 1996, 21: 651-668.
- [7] BAYNES J W, THORPE S R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm [J]. Diabetes, 1999, 48: 1-9.
- [8] LITCHFIELD J E, THORPE S R, BAYNES J W. Oxygen is not required for the browning and crosslinking of protein by pentoses: relevance to Maillard reactions *in vivo* [J]. Int J Biocem Cell Biol, 1999, 31: 1297-305.
- [9] YIN D, BRUNK U F. Carbonyl toxification hypothesis of biological aging [A]. MACIEIRA-COELHO A. Molecular Basis of Aging [C]. New York: CRC Press Inc, 1995. 421-436.
- [10] MASORO E J. Handbook of Physiology, Section 11: Aging [M]. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- [11] CERAMI A. Hypothesis: glucose as a mediator of aging [J]. J Am Geriatr Soc, 1985, 33: 626-634.
- [12] WOLFF S P. Free radicals in glycation [A]. YU B P. Free Radicals in Aging [C]. London: CRC Press, 1993. 123-142.
- [13] KRISTAL B S, YU B P. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions [J]. J Gerontol, 1992, 47: B107-B114.
- [14] YIN D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid and age pigment-like fluorophores [J]. Free Rad Biol Med, 1996, 21: 871-888.
- [15] STADTMAN E R. Protein oxidation and aging [J]. Science, 1992, 257: 1220-1224.
- [16] SHAPIRO H K. Carbonyl-trapping therapeutic strategies [J]. Am J Ther, 1998, 5: 323-353.

· 本刊新任编委简介 ·

## 湖南师范大学特聘教授——陈 则

文献标识码: E

陈 则, 特聘教授, 男, 1964 年 6 月出生, 于 1988 年毕业于上海第二医科大学, 获医学学士学位, 1988 年 7 月 ~ 1989 年 5 月在上海市第四人民医院任外科医师. 1989 年 12 月 ~ 1992 年 3 月在澳大利亚进修、学习. 1992 年 3 月 ~ 1997 年 3 月在日本东京大学医学系攻读博士学位, 并于 1997 年 3 月获得医学博士学位. 1997 年 3 月 ~ 2000 年 3 月在日本国立感染症研究所任协力研究员, 兼日本科学技术厅特别研究员. 陈则博士从事人类巨细胞病毒复制机理的解析和流感病毒核酸疫苗以及粘膜疫苗的研究开发达 8 年之久, 在《Virology》、《Arch. Virology》、《J. of General Virology》、《Vaccine》等杂志上发表论文 10 余篇. 1999 年被聘为湖南师范大学生物化学与分子生物学特聘教授, 并于 2000 年 3 月携全家回国到湖南师范大学工作.