



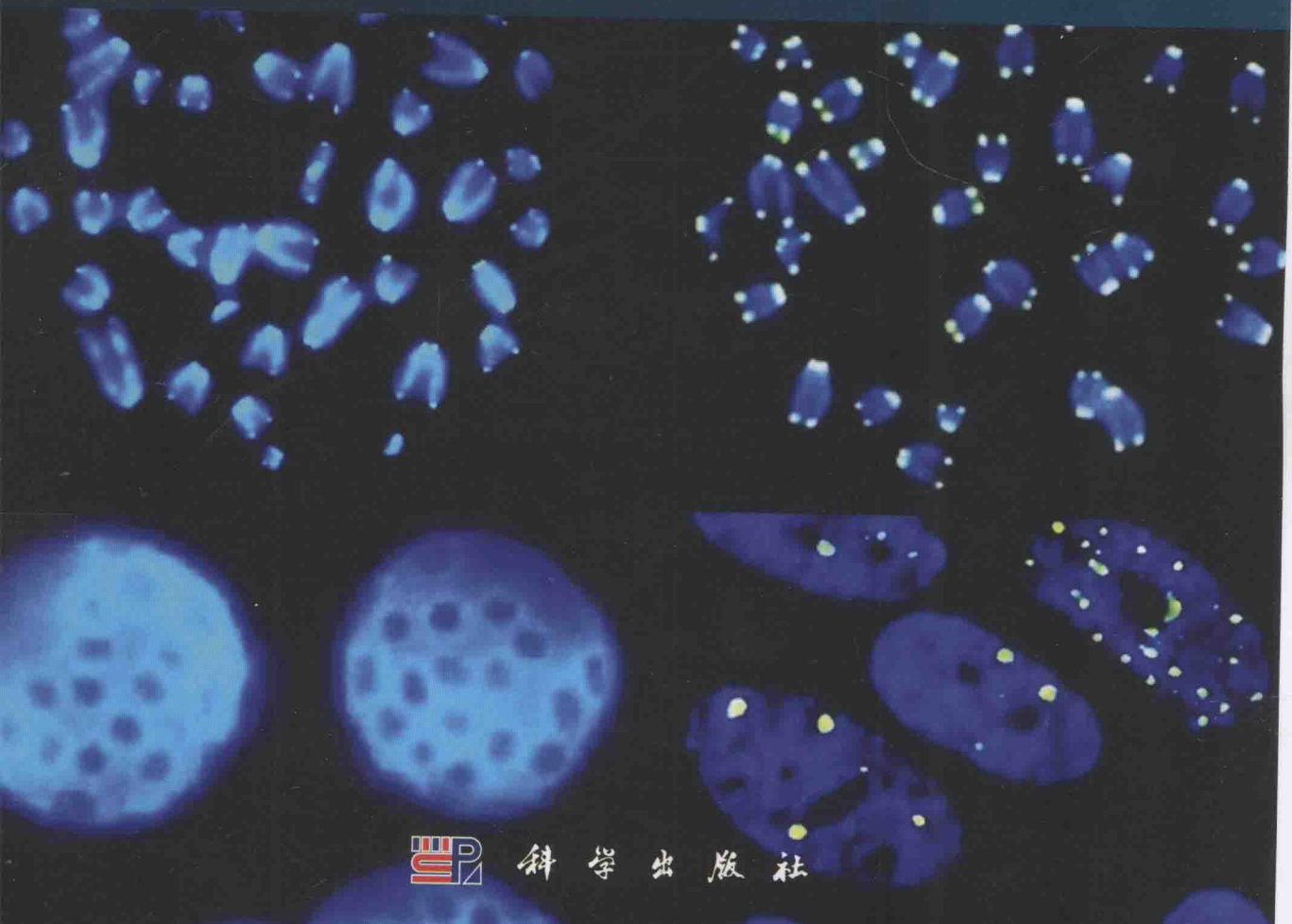
生命科学实验指南系列



Biological Aging Methods and Protocols

生物衰老：研究方法与实验方案

〔美〕托尔夫波 T.O. 等著
王钊 于皓月 王卓然 译



科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

生物衰老：研究方法 with 实验方案

Biological Aging: Methods and Protocols

[美]托尔夫波 T. O. 等 著

王 钊 于皓月 王卓然 译

科 学 出 版 社

北 京

图字：01-2012-3446 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集集成典藏版。

Translation from the English language edition: *Biological Aging* edited by Trygve O. Tollefsbol Copyright © 2007 Humana Press Inc. Humana Press is part of Springer Science + Business Media. All Rights Reserved.

图书在版编目 (CIP) 数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

I. ①生… II. ①雷… III. ①生命科学—实验—指南 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

致 谢

本书的翻译工作得到国家重点基础研究发展计划(“973”计划)
给予的基金支持
No. 2007CB507406

特此向首席科学家陈香美院士和各位专家的关心和帮助表示衷心的感谢

序

2011年进行的我国第六次人口普查数据显示,中国人口老龄化加速,65岁及以上人口的比例上升1.91个百分点,国家将面临未富先老的困境。因此,有关老龄化和衰老的研究已经是刻不容缓。随着社会发展和生活模式与健康模式的转变,世界范围的衰老研究如火如荼。作为衰老机理最重要的理论之一的端粒酶的发现者,三位美国科学家在2009年获得了诺贝尔生理学或医学奖,引起了世界医学与健康研究领域的关注。我国有世界上最为庞大的老年人群;56个民族提供了丰富的遗传基因资源;辽阔的国土促成了生活环境、生活方式和生活习惯的巨大差异。这些为从整体、细胞及基因水平研究衰老提供了得天独厚的条件。此外,我国特有的中医理论和中草药资源,也为探索天然化合物干预衰老的机制提供了宝贵经验,蕴藏着突破的潜能。从2000年开始,国家科技部先后两次启动了关于衰老研究的国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目,但中国至今尚无类似美国国立卫生研究院下设的专门研究衰老的国立衰老研究所(NIA)那样的科研机构,对衰老机制和延缓衰老等方面的研究也还处在一个探索和发展的阶段。

作为国家重点基础研究发展计划项目《衰老的机制与干预的基础研究》(2007CB507400)课题的承担者,清华大学医学院的王钊教授及其团队在项目组的指导和帮助下,在衰老和相关疾病及其药物干预的研究领域深入研究、努力探索,做出了很好的成绩和贡献。他们在研究和工作中努力汲取世界最先进的方法和技术,积累了大量的技术方案和丰富的科研经验。此次,他们在取得版权后翻译出版了该领域非常著名的实验技术指导《生物衰老:研究方法 with 实验方案》(Trygve O. Tollefsbol 著,Humana 出版社)一书,是我国衰老研究领域的一件喜事。该书不仅提供了衰老研究领域一些成熟可靠的技术方法,同时介绍了一些在该领域的最新技术突破,囊括了衰老研究领域主要的技术操作和实验方案,如衰老机制的研究、干预衰老的技术,以及衰老过程的分析方法等。这些内容将为我国衰老研究的深入发展和领域推动做出重要的贡献。

特此志序。

中国工程院院士
“973”计划衰老项目首席科学家



2012年春 于北京

前 言

生物学衰老是一个多元化的话题,一方面,机体的衰老影响许多过程,这些过程不仅体现在正常的生理和分子的变化中,还体现在癌症、糖尿病、阿尔茨海默病、骨质疏松等一系列增龄相关疾病中。另一方面,衰老这一话题包罗万象,因而出现了许多分析和研究衰老的新工具,特别是在过去的十年中。因此本书,即《生物衰老:研究方法 with 实验方案》不仅提供若干成熟的技术,还将介绍最近在这一领域最令人兴奋的技术突破,它们将衰老的研究推到了生命科学的前沿。

在一册书中涵盖应用在生物学衰老研究中的所有方法是不现实的。相反,作为《分子生物学方法》系列之一,本册重点讨论生物学衰老研究中重要的,或者是有希望给这一相对新的学科带来突破性革新的话题。本书涉及的主要领域包括大多数生物学衰老研究中的重点:①理解细胞衰老基本机制的基本方法;②干预衰老过程的技术;③分析生物学衰老中分子过程的方法。生物学衰老的基本方面、干预以及分析中的一般方法将在几个章节中专门讨论。

本书的目的是介绍当今生物学衰老研究中使用的最有前途、最重要的工具,包括衰老细胞培养等成熟的方法,以及核移植、微阵列和蛋白质组学技术、在衰老研究中使用核酶等先端的方法。总体来说,这些强大的工具与许多其他技术相结合,迅速地推进了生物学衰老这一令人兴奋并不断扩大的研究领域的发展。

Trygve O. Tollefsbol

原作者及其单位

- LUCY G. ANDREWS • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- SERGEY V. ANISIMOV • *Neuronal Survival Unit, Wallenberg Neuroscience Center, Lund University, Lund, Sweden*
- VLADIMIR N. ANISIMOV • *Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia*
- STEPHEN BARNES • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- JOEL B. BERLETTCH • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- MARIA A. BLASCO • *Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain*
- RITA A. BUSUTTIL • *Buck Institute for Age Research, Novato, CA*
- KERRY BYNUM • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- CARLOS CABRERA • *University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX*
- JUDITH CAMPISI • *Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA*
- ANDRES CANELA • *Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain*
- CUIYING CHEN • *Department for Molecular Biomedical Research, Ghent University and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent, Belgium*
- JIAN-HUA CHEN • *Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom*
- RONALD CONTRERAS • *Department for Molecular Biomedical Research, Ghent University and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent, Belgium*
- XIANGQIN CUI • *Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- MARIA DE LUCA • *Department of Nutrition Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- CUSTER C. DEOCARIS • *National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba Science City, Japan*

- JESSY DESHANE • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- GOBERDHAN P. DIMRI • *Division of Cancer Biology, Department of Medicine, ENH Research Institute, and Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Evanston, IL*
- MARTIJN E. T. DOLLÉ • *National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, The Netherlands*
- SHANNON ELIUK • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- PAOLA FABRIZIO • *Andrus Gerontology Center, Division of Biogerontology and Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles, CA*
- ANA MARIA GARCIA • *University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX*
- MARK D. GARFINKEL • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- SHIMON GEPSTEIN • *Faculty of Biology, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*
- C. NICHOLAS HALES • *Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom*
- HUI-CHEN HSU • *Department of Medicine, Division of Clinical Immunology and Rheumatology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- DONALD K. INGRAM • *Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD*
- KOJI ITAHANA • *Department of Radiation Oncology, School of Medicine, The University of North Carolina, Chapel Hill, NC*
- RIMA KADDURAH-DAOUK • *Duke University Medical Center, Department of Psychiatry, Durham, NC*
- MO K. KANG • *School of Dentistry, David Geffen School of Medicine, and Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California, Los Angeles, CA*
- SUNIL C. KAUL • *National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba Science City, Japan*
- DAVID L. KEEFE • *Department of Obstetrics and Gynecology, Women & Infants Hospital, Brown Medical School, Providence, RI*
- HELEN KIM • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- NAM CHUL KIM • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

- MARION KIRK • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- PETER KLATT • *Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain*
- BRUCE S. KRISTAL • *Dementia Research Service, Burke Medical Research Institute, White Plains and Department of Neuroscienc, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY*
- MARK A. LANE • *Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD*
- JEFF LEIPS • *Department of Biological Sciences, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, MD*
- LIN LIU • *Department of Obstetrics and Gynecology, Women & Infants Hospital, Brown Medical School, Providence, RI*
- VALTER D. LONGO • *Andrus Gerontology Center, Division of Biogerontology and Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles, CA*
- ANN LORRAINE • *Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- LU LU • *Center for Neuroscience and Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis, TN*
- XIANGYI LU • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- MARTHA LUNDELL • *University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX*
- WAYNE R. MATSON • *Department of Systems Biochemistry Bedford VAMC, Bedford, MA*
- OLIVER MEDVEDIK • *Pharmacology Department, Harvard Medical School, Boston, MA*
- SREELATHA MELETH • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- JOHN D. MOUNTZ • *Department of Medicine, Division of Clinical Immunology and Rheumatology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- HIROSHI NAKAGAWA • *Gastroenterology Division, Department of Medicine and Abramson Cancer Center, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA*
- OLIVER G. OPTIZ • *Department of Medicine and Institute for Molecular Medicine and Cell Research, University of Freiburg, Freiburg, Germany*
- SUSAN E. OZANNE • *Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom*

- NO-HEE PARK • *School of Dentistry, David Geffen School of Medicine, and Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California, Los Angeles, CA*
- JOAO F. PASSOS • *Henry Wellcome Laboratory for Biogerontology Research, Newcastle University, Newcastle, UK*
- SHARLA M. O. PHIPPS • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- ANITA PINNER • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- IRINA G. POPOVICH • *Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia*
- GLORIA ROBINSON • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- ARMANDO RODRIGUEZ • *University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX*
- GEORGE S. ROTH • *Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD*
- DOUGLAS M. RUDEN • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- TODD SANDERSON • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- YEVGENIYA I. SHURUBOR • *Dementia Research Service, Burke Medical Research Institute, White Plains, NY*
- DAVID A. SINCLAIR • *Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA*
- MICHAL B. STERNBERG • *Faculty of Biology, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*
- TRYGVE O. TOLLEFSBOL • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
- GARY VAN ZANT • *Department of Internal Medicine, Markey Cancer Center, University of Kentucky, Lexington, KY*
- JAN VIJG • *Buck Institute for Age Research, Novato, CA*
- THOMAS VON ZGLINICKI • *Henry Wellcome Laboratory for Biogerontology Research, Newcastle University, Newcastle, UK*
- RENU WADHWA • *National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba Science City, Japan*
- SABRINA L. WALTHALL • *Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

GREGORY WHITE • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

ROBERT W. WILLIAMS • *Center for Neuroscience and Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis, TN*

LONDON WILSON • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

JIATAO YE • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

NENGJUN YI • *Section of Statistical Genetics, Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

MARK A. ZABEZHINSKI • *Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia*

目 录

致谢

序

前言

原作者及其单位

第 1 章 生物学衰老的研究技术

Techniques for Analysis of Biological Aging

Trygve O. Tollefsbol 1

第 2 章 衰老细胞培养:方法与观察

Aging Cell Culture: Methods and Observations

Sharla M. O. Phipps, Joel B. Berletch, Lucy G. Andrews, Trygve O. Tollefsbol 6

第 3 章 检测细胞衰老的生物标志物的方法:衰老相关 β -半乳糖苷酶检测

Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence: The Senescence-Associated β -Galactosidase

Koji Itahana, Judith Campisi, Goberdhan P. Dimri 14

第 4 章 分选年轻与衰老细胞的方法

Methods for Cell Sorting of Young and Senescent Cells

João F. Passos, Thomas von Zglinicki 24

第 5 章 端粒长度分析

Telomere Length Analysis

Andrés Canela, Peter Klatt, Mzríia A. Blasco 34

第 6 章 体外老化体系中检测 DNA 甲基转移酶 1 基因转录的方法

A Method to Detect DNA Methyltransferase I Gene Transcription *In Vitro* in Aging Systems

Joel B. Berletch, Lucy G. Andrews, Trygve O. Tollefsbol 57

第 7 章 在体外老化系统中研究 DNA 甲基转移酶表达的方法

A Method to Study the Expression of DNA Methyltransferases in Aging Systems *In Vitro*

Joel B. Berletch, Sharla M. O. Phipps, Sabrina L. Walthall, Lucy G. Andrews, Trygve O. Tollefsbol 64

第 8 章 酿酒酵母的寿命研究

The Chronological Life Span of *Saccharomyces cerevisiae*

Paola Fabrizio, Valter D. Longo 70

第 9 章 酵母细胞的热量限制与寿命检测	
Caloric Restriction and Life Span Determination of Yeast Cells	
Oliver Medvedik, David A. Sinclair	76
第 10 章 使用果蝇进行营养基因组学和寿命研究的方法:高蔗糖/棕榈酸/大豆/牛肉饮食的作用	
Methods for Nutrigenomics and Longevity Studies in Drosophila Effects of Diets High in Sucrose, Palmitic Acid, Soy, or Beef	
Jiatao Ye, Xiangqin Cui, Ann Loraine, Kerry Bynum, Nam Chul Kim, Gregory White, Maria De Luca, Mark D. Garfinkel, Xiangyi Lu, Douglas M. Ruden	87
第 11 章 热量限制模拟:一种生物老年学研究中的新方法	
Caloric Restriction Mimetics: A Novel Approach for Biogerontology	
Mark A. Lane, George S. Roth, Donald K. Ingram	110
第 12 章 使用外源性端粒酶延长细胞寿命	
Extension of Cell Life Span Using Exogenous Telomerase	
Mo K. Kang, No-Hee Park	116
第 13 章 使用确定的遗传因素诱导细胞衰老	
Inducing Cellular Senescence Using Defined Genetic Elements	
Hiroshi Nakagawa, Oliver G. Opitz	128
第 14 章 氧化应激诱导细胞衰老的方法	
Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress	
Jian-Hua Chen, Susan E. Ozanne, C. Nicholas Hales	138
第 15 章 衰老研究中的核移植方法	
Nuclear Transfer Methods to Study Aging	
Lin Liu, David L. Keefe	148
第 16 章 细胞衰老研究中核酶的利用	
Use of Ribozymes in Cellular Aging Research	
Custer C. Deocaris, Sunil C. Kaul, Renu Wadhwa	161
第 17 章 评估药物对小鼠衰老和寿命的影响	
Methods of Evaluating the Effect of Pharmacological Drugs On Aging and Life Span in Mice	
Vladimir N. Anisimov, Irina G. Popovich, Mark A. Zabezhinski	176
第 18 章 使用高通量筛选系统确定延长寿命的基因	
Identifying Genes that Extend Life Span Using a High-Throughput Screening System	
Cuiying Chen, Roland Contreras	184
第 19 章 老年学研究中 DNA 微阵列技术的应用	
Application of DNA Microarray Technology to Gerontological Studies	
Sergey V. Anisimov	193

第 20 章	在高等生物中检测和分析 <i>lacZ</i> 报告位点——在小鼠和果蝇中的应用	
	Detection and Analysis of Somatic Mutations at a <i>lacZ</i> Reporter Locus in Higher Organisms Application to <i>Mus musculus</i> and <i>Drosophila melanogaster</i>	
	Ana Maria Garcia, Rita A. Busuttill, Armando Rodriguez, Carlos Cabrera, Martha Lundell, Martijn E. T. Dolle, Jan Vilg	207
第 21 章	细胞衰老研究中的消减杂交技术	
	Subtractive Hybridization Techniques to Study Cellular Senescence	
	Michal Bassani Sternberg, Shimon Gepstein	224
第 22 章	定位影响果蝇寿命自然差异的遗传多态性	
	Mapping Genetic Polymorphisms Affecting Natural Variation in <i>Drosophila</i> Longevity	
	Maria De Luca, Jeff Leips	238
第 23 章	在老化系统中定位数量性状位点 (QTL)	
	Quantitative Trait Locus (QTL) Mapping in Aging Systems	
	Hui-chen Hsu, Lu Lu, Nengjun Yi, Grary Van Zant, Robert W. Williams, John D. Mountz	249
第 24 章	二维凝胶蛋白质组学:一种研究生物样本中衰老相关的蛋白质丰度或异构体复杂度差异的方法	
	2D Gel Proteomics: An Approach to Study Age-Related Differences in Protein Abundance or Isoform Complexity in Biological Samples	
	Helen Kim, Shannon Eliuk, Jessy Deshane, Sreelatha Meleth, Todd Sanderson, Anita Pinner, Gloria Robinson, Landon Wilson, Marion Kirk, Stephen Barnes	269
第 25 章	衰老与热量限制研究中的代谢组学	
	Metabolomics in the Study of Aging and Caloric Restriction	
	Bruce S. Kristal, Yevgeniya I. Shurubor, Rima Kaddurah-Daouk, Wayne R. Matson	302
索引	315

第1章 生物学衰老的研究技术

Techniques for Analysis of Biological Aging

Trygve O. Tollefsbol

摘要 衰老过程包括在分子、细胞及机体水平的变化，可用多种方法分析。数十年来，研究生物学衰老的一种普遍模式是分析呈现细胞衰老的离体培养细胞。最近，人们也将兴趣集中在了包括机体在内的衰老模型上，如酵母和果蝇的衰老。研究生物学衰老的技术在过去的十年间呈几何级数增长。研究生物学衰老的手段种类繁多，但可以大致归类为：①基本技术；②干预方法；③分析衰老细胞中呈现的分子及细胞水平变化的方法。因此，本书讨论的话题归类在这三个范畴中。

关键词 衰老；生物学；方法；技术；分析；生物老年学

1.1 引言

影响衰老的过程多种多样，这使得对生物学衰老研究方法的整理汇编成为一项令人望而生畏的工作。20世纪60年代早期，Leonard Hayflick 揭示了离体培养细胞的寿命有限，这一过程通常称作细胞衰老(1)，这是衰老研究中的一个重大突破。很多改变，如端粒缩短、氧化应激、DNA 损伤以及原癌基因的激活，都可以导致细胞衰老。细胞在这些过程中经历了一系列形态和代谢上的改变并最终停止分裂(2)。尽管无数分子过程与生物学衰老相关联，但最主要的分子水平的异常与基因组的不稳定性、遗传程序以及活性氧这三者相关。其中，引起与年龄相关的基因组不稳定的一个主要因素是端粒的缩短。端粒缩短的原因是维持端粒长度的端粒酶在绝大多数体细胞内表达水平非常低(3)。细胞在接受外源端粒酶后可以保持年轻状态并无限增殖，这一发现为端粒酶在细胞衰老过程中所扮演的重要角色提供了强有力的支持和证明(4)。遗传程序对生物学衰老的作用已被诸多研究所证实。例如，以 *daf* 和 *age-1* 基因为代表的一些基因突变后可以延缓生物学衰老(5)。活性氧是代谢过程中所产生的自由基，它们会引发多种分子的积累性损伤从而促进衰老(6)。衰老过程中，无疑也会发生许多其他方面的改变，而新的生物学衰老分析技术的不断发展和完善将大幅推动我们对这些促进衰老和决定寿命的过程的认识。

1.2 本书的主要内容

1.2.1 研究衰老过程的基本方法

随着连续培养细胞直至其衰老的技术的发展,生物老年学获得了重大进展。这项技术在 20 世纪 60 年代首次使用,为生物学衰老的研究带来了深刻的变革。本书第 2 章将详细介绍正常人二倍体成纤维细胞培养和传代的实验方案。当然,这种方法体系仅仅是一种模拟衰老过程的近似手段,因为细胞衰老与生物学衰老之间是否有直接关联仍是备受争议的话题。尽管如此,通过这些方法我们可以清楚地了解大量导致衰老的分子机制与过程。细胞衰老研究中的重要进步是可靠的生物标记技术,即衰老相关的 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)检测。这种方法包括应用底物半乳糖苷(X-gal)对细胞进行组织化学染色,以区分衰老细胞和休眠细胞,这是评价生物学衰老的一个重要的决定性指标(见第 3 章)。SA- β -gal 技术能准确可靠地区分衰老和未衰老的细胞。这项技术现正被广泛应用于生物学衰老研究当中,部分原因在于其易于检测。另一项鉴别衰老细胞的方法将在第 4 章详细介绍,该方法通过流式细胞技术分选细胞,其原理是从物理特征上区分年轻和年老细胞。在衰老相关的转录调控区域构建表达绿色荧光蛋白(GFP)的报告基因,能够定量获得衰老与未衰老细胞的出现频率。尽管插入逆转录的报告基因会出现不均一性,但这种方法被证明能够有效区分年轻与年老细胞,在细胞衰老研究中具有诸多明显的优势。

端粒缩短被指出是衰老相关的主要过程,第 5 章将叙述 3 种常用的分析端粒长度的方法:①端粒限制性片段(TRF)分析;②定量荧光原位杂交(Q-FISH);③流式荧光原位杂交(flow-FISH)。虽然应用 TRF 分析端粒长度多年来已成为衰老研究中的支柱技术,但这项技术的一系列缺点也促使 Q-FISH、Flow-FISH 以及其他更多在衰老体系中测定端粒长度的新型方法迅速发展起来。表观遗传学过程某种程度上由 DNA 甲基转移酶介导,在衰老过程中该酶也扮演了很重要的角色。这一过程已被在衰老细胞和衰老组织中发生的显著的基因组低甲基化现象所证实(7)。DNA 甲基转移酶-1(DNMT-1)是哺乳动物细胞中主要的 DNA 甲基转移酶,我们将在第 6 章中介绍一种检测和评估其在衰老细胞中转录水平的综合方法。第 7 章将讨论一项相关技术,从而详细说明 DNA 甲基转移酶在处于衰老进程当中的细胞内的蛋白质表达特点。

很多有关衰老的基础层面的研究依靠酵母模型,第 8 章介绍的酵母寿命研究已成功地与若干调控衰老过程的关键途径相配合。其中运用正常组和热量限制组,介绍了确定单细胞酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)寿命的一些方法。尽管生物学衰老研究中也运用另外的一些基本方法,但第 2~8 章叙述的内容足以为检测细胞衰老提供基本的工具和方法,并促进我们更加深入地在细胞生物学、遗传学及分子生物学层面研究生物学衰老。

1.2.2 干预衰老过程的技术

除了分析生物学衰老的基本方法以外,许多新近发展起来的干预衰老过程的技术能

够确定调控和介导生物学衰老的主要因素。热量限制大概是被广泛接受的调节寿命的方法,第9章将讲述它在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)上的应用。其中将详细介绍确定单细胞酵母复制寿命的方法,以及测量 rDNA 基因座的重组频率和染色体外 rDNA 环的产生方法,而 rDNA 环是酵母模型衰老的首要原因。果蝇属(*Drosophila*)是另一个研究年龄相关变化的常用模型,第10章叙述了营养遗传学技术,可用于分析被控制饮食的果蝇幼虫和果蝇成虫[给予高水平棕榈酸(一种饱和脂肪)、大豆或95%瘦牛肉]。这种方法与微阵列分析相结合,可以确定衰老果蝇体内饮食相关 mRNA 表达的改变情况。第11章是对衰老研究中热量模拟方法应用的综述。热量限制在正常饮食摄入量的60%~70%时,对延迟动物模型年龄相关效应有一定作用,应用于人类并不现实,因此需要替代的方法。热量限制模拟的目标是改变产能相关的代谢途径,以期在不显著减少食物摄入的情况下获得热量限制的效果。其中分析了糖酵解抑制剂、抗氧化剂和特异性基因调控子作为热量限制模拟的应用。

第12章叙述了一种完全不同的干预衰老过程的方法,它建立在端粒酶对生物学衰老的重要作用的基础上。端粒在端粒酶的催化亚基 hTERT 过度表达时可被重新构建,经常导致细胞的无限增殖或复制寿命的延长。在过去的十年中,这些方法广泛用于阐明无限增殖的分子基础,从而揭示可能限制衰老细胞复制的相关机理。hTERT 在组织工程领域中可能也有重要应用。既然我们可以通过致癌物质探究肿瘤的发生,那么我们也能够通过加速细胞衰老来了解细胞的衰老过程。例如,第13章描述了如何引入确定的遗传因素,如端粒酶的显性负版,重现细胞衰老过程。其中也描述了通过过表达癌基因 *ras* 和 *p16* 诱导细胞过早衰老的技术。此外,其他多种技术也可以诱导细胞过早衰老,如使用过氧化氢引发氧化应激,这将在第14章讲述。

由于细胞核包含衰老过程的基本“蓝图”,核移植技术在干预衰老过程的研究中具有广泛的潜力。第15章描述了处于生发泡阶段和原核阶段受精卵的核移植方法。核酶的应用代表了干预衰老过程的另一种途径,这将在第16章介绍。正常和杂交锤头状核酶的结构也会在这一章叙述,因为这种基因敲除实验会影响衰老过程,并且揭示出调控细胞衰老的关键基因(8)。该部分描述的一种随机方法有很高的灵活性,且没有酶依赖性,不需要预先知道靶序列并具有高度特异性。抗衰老药物的开发也对干预衰老有重要意义,第17章将从药理学角度出发,评价药物对小鼠衰老和寿命的影响。归根结底,在一定程度上控制生物学衰老是诸多生物老年学研究的目標,而本书第9~17章提供了很多目前最为可靠且有效的调控细胞衰老和寿命的方法。

1.2.3 分析生物学衰老的实验方案

除了调节衰老过程的基本生物学工具和方法外,分析在衰老过程中发生的很多分子和细胞变化的技术也相当重要。一种用于酿酒酵母的高通量功能基因组筛选系统(详见第18章)可以鉴别很多能够延长寿命的基因。在这种衰老的模式系统中,母细胞随着年龄增长会在细胞表面积累芽痕,芽痕中含有高水平的甲壳素。甲壳素可以被小麦胚芽凝集素染色,从而能够应用基于芽痕的流式细胞分选系统测定酵母寿命的变化。微阵列技术的重大进步促进了其在生物老年学中的应用。第19章将介绍两种不同的方案,分