J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 19, No. 3, pp. 161-172 (2003)

Official Journal of
Korean Society of Toxicology
Available online at http://www.toxmut.or.kr

# 세포 노화에 있어서 복제 세네센스 현상과 산화적 스트레스의 영향

박 영 철
대구가톨릭대학교 자연과학연구소

# Replicative Senescence in Cellular Aging and Oxidative Stress

**Yeong-Chul Park**
*Natural Science Institute, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk, 712-702, Korea*

*Received August 18, 2003; Accepted August 28, 2003*

**ABSTRACTS.** Explanted mammalian cells perform a limited number of cell division *in vitro* and than are arrested in a state known as replicative senescence. Such cells are irreversibly blocked, mostly in the G1 phase of cell cycle, and are no longer sensitive to growth factor stimulation. Thus replicative senescence is defined as a permanent and irreversible loss of replicative potential of cells. For this characteristic, replicative senescence seems to evolve to protect mammalian organism from cancer. However, senescence also contributes to aging. It seems to decrease with age of the cell donor and, as a form of cell senescence, is thought to underlie the aging process. Extensive evidence supports the idea that progressive telomere loss contributes to the phenomenon of cell senescence. Telomeres are repetitive structures of the sequence $(TTAGGG)_n$ at the ends of linear chromosomes. It has been shown that the average length of telomere repeats in human somatic cells decreases by 30~200 bp with each cell division. It is generally believed that when telomeres reach a critical length, a signal is activated to initiate the senescent program. This has given rise to the hypothesis that telomeres act as mitotic clocks to regulate lifespan. One proposes that cumulative oxidative stress, mainly reactive oxygen species generated from mitochondria, may mainly cause telomere shortening, accelerating aging. Here, the biological importance and mechanism of replicative senescence were briefly reviewed. Also it was summarized that how oxidative stress affects replicative senescence and telomere shortening.

**Keywords:** Replicative senescence, Telomere, Aging, Oxidative stress.

## 서 론

인간은 하나의 수정란에서부터 분열과 분화를 거듭하여 출생과 성장이 지나면 어느 시기부터 어떤 개체도 피할 수 없는 노화가 시작된다. 노화의 진행 정도는 조로증(premature aging syndrome)의 대표적인 사례인 Werner's syndrome과 같이 선천적으로 유전자 이상에 기인도 하지만 생명체의 퇴행성 특징을 고려한다면 개체의 후천적 행동 양상이 중요하게 작용한다. 후천적 양상의 주요 원인으로는 "free radical에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)" 이론이 가장 많이 연구되어 이해되고 있다. 특히 식이제한(caloric restriction)에 의한 free radical 감소가 노화와 수명을 늦춘다는 연구 결과는 산화적 스트레스의 중요성을 잘 대변해 준다(Pamplona 등, 2002; Masoro, 2000). 그러나 개체 수준에서의 노화 진행은 극히 산술적이며 주관적 입장에서 표현될 수 밖에 없다. 이러한 연유로 수십조 개의 세포로 이루어진 개체의 노화는 세포 수준을 통해 그 기전과 양상을 명확히 이해할 수 있다고 사료된다.

세포의 노화는 어떻게 이루어지고 세포 노화의 특징적 요소는 무엇인가? Hayflick(1965)은 섬유아세포의 시험관 배양을 통해 세포 복제의 횟수(replicative life span)가 유한하다는 것을 확인하였다. 즉 세포복제 능력인 배가증식(PD : population doubling)이 세포의 종류마다 차이

Correspondence to: Yeong-Chul Park, Natural Science Institute, Catholic University of Daegu, 330, Geumnak 1-ri, Hayang-eup, Gyeongsan-si, Gyeongbuk, 712-702, Rep. of Korea
E-mail: ycpark@cu.ac.kr

가 있지만 결국 일정한 횟수를 분열한 후 상실된다는 것이다. 이러한 제한된 횟수에 도달하면 더 이상 PD를 할 수 없는 상태를 일컬어 "Replicative Senescence(세포복제 세네센스 현상; 이하 세네센스)"이라고 하며 "irreversible growth arrest(비가역적 세포복제 중지)"라 정의되고 있다. 최근 다양한 세포로 구성된 개체를 통해서도 이러한 현상이 확인되었으며 특히 복제 횟수 정도와 세포노화의 진행 정도가 비례적이라는 것이 확인되었다.

본 고찰에서는 세포 수준에서의 노화 현상에 대한 이해를 위해 세포의 복제 세네센스 현상을 살펴보며 특히 노화의 중요한 가설의 하나인 산화적 스트레스의 영향에 대해 논하는 것이 목적이다.

## 본 론

### 복제 세네센스 현상의 세포학적 특성

"Hayflick 한계(Hayflick limit)"라고도 일컫는 세네센스 현상에 있어서 분열정지는 일시적으로 분열 중단된 세포(quiescent cell), 최종 분화(terminal differentiations)에 의한 분열 정지된 세포 등과 세포학적 측면에서 유사점도 많으나 다음과 같은 세 가지 다른 특성을 갖는다.

첫째, 세네센스 세포는 유사분열 촉진제(mitogen)에 의한 세포주기에 반응이 없으며 특히 $G_1$의 DNA 상태로 분열 정지되는 것이 확인되었다(Stein 등, 1991). 또한 세네센스 세포에서 분열중지는 $G_1$ 시기뿐만 아니라 DNA 합성 후 시기인 $G_2$ 시기에서도 비가역적으로 발생하는 것이 확인되었다(Gonos 등, 1996; Dubrez 등, 2001). 세포주기의 신호전달체계와 관련하여 epidermal growth factor(EGF), insulin-like growth factor(IGF) 그리고 platelet-derived growth factor(PDGF) 등 성장촉진인자에 대한 반응이 세네센스 세포에서 현저히 저하되었다(Goldstein 등, 1991; Reenstra 등; 1996). 특히, $G_1$ 시기의 조절과 관련하는 전사인자(transcription factor)인 AP1이나 E2F의 활성이 억제되며 동시에 cyclin-dependent kinase(cdk) 저해제인 p21이나 p16의 활성이 증가된다(Riabowol 등, 1992; Yang 등, 1995; Reznikoff 등, 1996; Weinberg 등, 2002). 따라서 세네센스 세포는 일반 세포의 세포주기와 관련된 신호전달체계에 있어서 상당히 차이가 있다.

두 번째, 세포주기뿐만 아니라 대사 및 기능적인 측면에서 세네센스 세포는 단백질 발현에 있어서 차이가 있다. 세포외 간질(extracellular matrix)인 콜라겐분해효소 (collagenase), 스트로메리신(Stromelysin) 그리고 피브로넥틴(fibronectin) 등의 활성이 정상세포 보다 세네센스 세포에서 상당히 증가되었다(West 등, 1989; Kumazaki 등, 1991; Millis 등, 1992; Zeng 등, 1996; Mawal-Dewan 등, 2002). 대사적 측면에서 다른 세포들과 비교하여 다소 낮은 대사율을 보이지만 세네센스 세포는 여전히 활성적이며 오랜 기간동안 수명이 지속된다(Bayreuther 등, 1988). 특히 세네센스 세포에서 β-galactosidase의 발현이 높은 것으로 확인되었는데 이는 일시적으로 분열 중지된 세포 또는 최종 분화에 의해 분열 정지된 세포 등과 구별하는 생물학적 지표 효소 또는 물질로 이용되고 있다(Dimri 등, 1995).

세 번째, 세네센스 세포는 apoptosis에 대해 높은 저항성을 갖는다(Wang 등, 1994). 세네센스 현상이 비가역적으로 분열 정지되지만 죽음으로 즉시 유도되지 않는 다는 것이다. Apoptosis에 대한 높은 저항성에 대한 기전으로서는 anti-apoptosis 유전자인 Bcl-2의 발현이 증가하는 것으로 일부 설명되고 있지만 여전히 많은 연구가 이루어져야 할 부분이다(Wang 등, 1995; Crescenzi 등, 2003).

이상과 같이 세네센스 상태의 세포는 일시 중지된 젊은 세포를 비롯하여 최종 분화에 의한 세포 중지된 세포들과 달리 여러 측면에서 명확한 차이를 보인다. 이는 세포주기에서 DNA 합성 및 세포 복제와 관련된 여러 조절 단백질의 발현 조절과 밀접한 관계가 있으며 복제 세네센스 현상의 세포학적 그리고 생물학적 의의를 구명하는데 중요한 특성이다.

### 복제 세네센스 현상의 생물학적 중요성

세네센스 현상의 생물학적 중요성은 세포복제 횟수의 유한성이라는 특성에서 알 수 있듯이 노화과 암과의 관련성에 집중되어 많은 연구가 이루어졌다.

**복제 세네센스 현상과 개체 노화:** 세포 세네센스 현상이 노화와의 관련성을 설명하는데 중요한 증거로 가장 먼저 Hayflick에 의해 제시된 후 다음과 같은 연구 결과를 통해 입증되고 있다(Hayflick, 1965; Hayflick, 1976). 첫째, 사람의 각각 다른 연령군에서 분리된 세포를 배양한 결과, 세포의 복제 잠재력(replicative potential)에 있어서 각 세포군은 차이를 보였다(Bierman, 1978; Rohme 등, 1981; Stanulis-Praeger 등, 1989, Campisi 등 1996). 즉 태아의 섬유아세포인 경우 60~80 PD, 중년층은 20~40 PD, 노년층은 10~20 PD 후 세네센스 상태로 진입하였다. 이는 세포가 PD를 거듭하면 세네센스 또는 Hayflick 한계에 접근한다는 것을 의미한다.

두 번째, 다양한 종들로부터 분리된 각각의 세포는 세네센스 전까지 서로 다른 PD 횟수를 보였으며 특히 이들 횟수는 종들의 최대 수명과 비례적인 관계에 있다(Rohme, 1981). 예를 들면, 최대수명이 3년인 마우스의 섬유아세

포는 10~15 PD 반면에 최대수명이 약 100년으로 알려진 거북이는 100 PD 이상의 평균 복제 잠재력이 확인되었다. 즉 수명이 긴 종의 세포는 짧은 종보다 더 많은 횟수의 PD 후 세네센스 상태로 진입한다는 것을 의미한다.

세 번째, 세네센스 현상과의 노화 관련성은 유전적 문제 기인하여 발생하는 조로증인 Werner's syndrome(WS)을 통해서도 잘 설명되고 있다. WS 환자의 경우, 어릴 때는 조로 증상을 보이지 않지만 점차적으로 연령이 증가함에 따라 정상인보다 상당히 빨리 조로 현상을 보인다. 이와 더불어 WS 환자에게 분리된 섬유아세포는 동일한 연령의 정상인 세포보다 훨씬 빨리 세네센스 상태에 도달하였다(Murano 등, 1991). 이는 선천적으로 유전적 결함 즉 WS환자는 8번 염색체 p12 단일 전좌의 돌연변이가 원인으로 확인되었다(Oshima 등, 1994). 그러나 최근에는 WS의 원인 유전자(gene responsible for WS; WRN)가 1432개의 아미노산으로 구성되어 있는 DNA 나선효소(helicase)와 유사한 것으로 밝혀졌다(Yu, 1996; Gray 등, 1997; Mohaghegh 등, 2001). DNA 나선효소는 세포의 복제를 위해 DNA 이중 가닥을 풀어 줌으로써 세포 분열이 가능하도록 세포주기에 있어서 중요한 조절 효소이다. WS 환자에게서 DNA 나선효소의 유전자 염기서열에 있어서 점돌연변이(point mutation)가 확인되었다(Gray 등, 1997). 이는 WS 환자에 있어서 DNA 수선(repair) 결함은 특정 유전자의 돌연변이 증가와 누적으로 인하여 암을 비롯한 질병에 대한 높은 감수성을 높이는 요인이 될 것으로 추정된다. WS 원인 유전자의 발견은 세네센스 현상을 비롯하여 여러 노화와 관련된 질병을 구명하는데 중요한 진전을 가져올 것으로 사료된다.

**복제 세네센스 현상과 암:** 암세포의 가장 큰 특성중의 하나가 무한한 증식이다. 이러한 특성에는 우선적으로 세포의 불멸성(immortality)이 선행되며(Newbold 등, 1982), 그 불멸성은 세포주기 조절에 관여하는 특정 유전자 상실이나 기능의 변화에 기인한다(Pereira-Smith 등, 1988; Sager, 1991). 섬유아세포에서 유래된 세네센스 세포와 SV40 T 항원에 의해 불멸화된 세포와의 융합(fusion) 결과, 이들의 하이브리드 세포에서는 DNA 합성이 저해될 뿐만 아니라 불멸성이 상실되는 것으로 확인되었다(Gonos 등, 1996; Goletz 등, 1994; Lumpkin 등, 1986). 특히 세포의 PD를 제한한다는 사실은 불멸성과 관련하여 세네센스가 우성적임을 보여주고 있다. 이에 대한 정확한 기전은 밝혀져 있지 않지만 세포주기를 조절하는 단백질 발현이 이들 세포 간에 차이가 있는 것으로 추정된다. p53과 pRb는 세포주기를 조절하는 중요한 조절인자이다. 세네센스 세포에서 Rb 단백질의 인산화 정도가 감소되는 것이 확인되었다(Stein 등, 1990; Thomas 등, 2003).

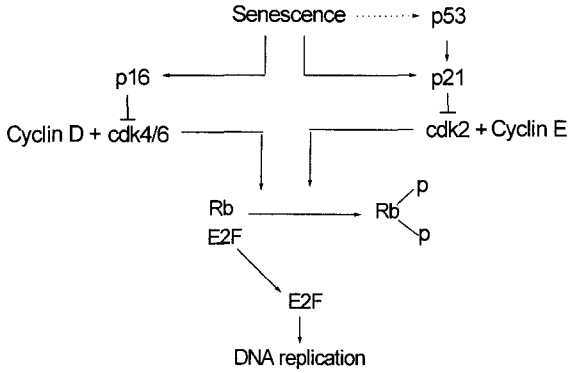


**그림 1.** 세네센스와 p53-dependent pathway: p53과 pRb는 세포주기를 조절하는 중요한 조절인자이다. 세네센스 세포에서 Rb 단백질의 인산화 정도가 감소되는 것이 확인되었다. Rb 단백질의 인산화는 tanscription factor인 E2F의 방출을 유도하여 세포주기를 촉진시키다. Rb 단백질의 인산화 감소는 E2F의 불활성화를 유도하여 DNA 합성과 세포주기를 $G_1$ 시기에서의 정지를 유도한다. 세네센스 세포에서 Rb 단백질의 인산화 감소는 인산화-저해 단백질인 p16과 암억제유전자인 p53을 통해 전사되는 p21에 의한 cyclin과 cyclin-dependent kinase(cdk) 복합체 활성의 감소를 통해 이루어진다.

Rb 단백질의 인산화는 tanscription factor인 E2F의 방출을 유도하여 세포주기를 촉진시킨다. Rb 단백질의 인산화 감소는 E2F의 불활성화를 유도하여 DNA 합성과 세포주기를 $G_1$ 시기에서의 정지를 유도한다(Reznicoff, 1996; Li 등, 1994; Nevins 등, 1992). 세네센스 세포에서 Rb 단백질의 인산화 감소는 인산화-저해단백질인 p16과 암억제유전자인 p53을 통해 전사되는 p21에 의한 cyclin과 cdk 복합체 활성의 감소를 통해 이루어진다(Harper 등, 1993; Reznicoff 등 1996; Mawal-Dewan 등, 2003) (그림 1). 이러한 p53 dependent-pathway에 의한 세포의 세네센스 현상은 p53 유전자의 돌연변이형 섬유아세포의 세네센스 유도가 지연 또는 소실된다는 연구 결과에서도 확인되었다(Bond 등, 1995; Wyllie 등, 2003). 그러나 p21의 활성과 유도가 반드시 p53에 의존해서 세네센스 현상이 이루어지지는 않는다는 결과도 있어 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다(Zeng 등, 1996).

정상보다 빠르게 세포의 세네센스 현상을 보이는 WS 환자는 유한적 세포분열이라는 세네센스 특성을 고려하다면 암의 발생이 낮아야함에도 불구하고 높은 발암율의 특성을 보인다(Goto 등, 2000; Thweatt, 등 1992). 이는 정상적인 섬유아세포의 세네센스 세포보다 WS 환자의 세포에서 발암단백질인 c-fos의 발현이 훨씬 높은 것으로 설명되고 있다(Oshima 등, 1995). 이와 같이 암환자와 조로증 환자에게서 Rb 또는 p53 유전자의 돌연변이와 발암유전자의 발현은 세네센스로의 진입을 통한 세포분열 정지 기능이 저하되어 발암율도 높다 것을 설명해준다.

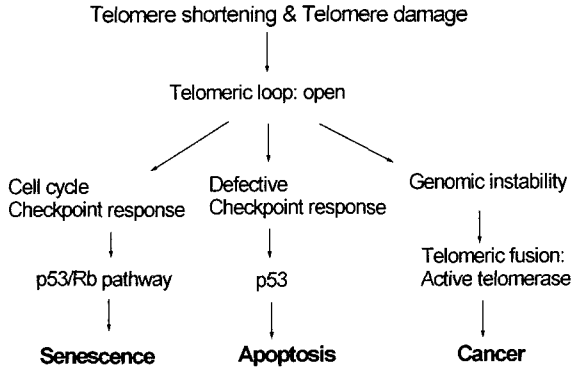


**그림 2.** Telomere의 단축과 상해에 의한 세포 반응: 세포분열 또는 상해에 의해 "terminal telomeric structure(t loop)"가 파괴 또는 노출된다. 세포는 세포주기와 관련된 check point 즉 p53/Rb dependent-pathway에 반응하여 세네센스가 유도된다. 그러나 checkpoint에 문제가 있다면 세포는 p53-dependent apoptosis를 통해 죽는다. p53이나 Rb가 돌연변이에 의해 정상적 기능을 못한다면 telomere fusion이 발생하고 telomerase 발현을 통해 세포의 암화가 진행된다.

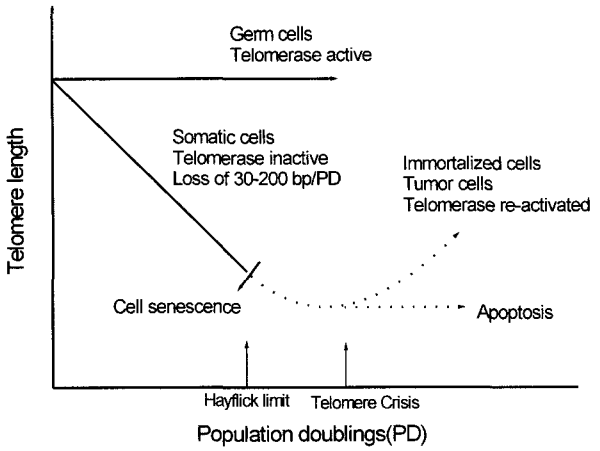


**그림 3.** Telomere 길이와 세포분열과의 관계: 생식세포는 telomerase의 활성을 통해 초기의 telomere 길이를 유지한다. 그러나 모든 체세포는 telomerase 활성이 없기 때문에 세포분열과 더불어 telomere 길이가 짧아진다. 단축된 특정 telomere 길이는 세포주기의 check point에 신호를 보내 세포분열을 멈추게하여 senescence로 세포를 유도한다(Hayflick limit or Threshold). 불멸화된 세포와 암세포인 경우, 형질전환을 통해 telomerase가 재활성되며 지속적 세포분열을 한다. 체세포가 senescence로 진입하지 않고 분열을 하면 telomere crisis에 도달하게 되고 chromosome fusion 등에 의해 apoptosis가 유도된다.

## 복제 세네센스 현상과 텔로미어

**텔로미어 단축:** 세네센스 현상에 대한 중요한 기전으로 "telomere shortening" 이론이 지난 10여년 동안 3가지 측면, 세네센스, apoptosis 그리고 암 등을 통해 주요하게 연구되어 왔다(그림 2). 텔로미어는 특수화된 단백질에 의해 둘러싸여 있는 염색체 말단 부위에 위치하며 "TTAGGG" 염기 서열의 수많은 반복으로 구성되어 있다. 텔로미어는 염색체의 융합을 방지하고 유전자 안정화에 있어서 중요한 역할을 한다(Blackburn 등, 1991). Harley 등(1990)에 의하여 세포의 PD 횟수에 따라 텔로미어 길이가 짧아지는 것이 사람 섬유아세포의 *in vitro* 시스템에서 확인되었다. 또한 텔로미어 길이에 의해 세포의 잠재적 복제 능력을 예견할 수 있을 뿐만 아니라 연령 증가와 더불어 길이가 짧아지는 것이 확인되었다(Lanza 등, 2000; Whikehart 등, 2000; Allsopp 등, 1992). 특히 텔로미어 길이의 단축은 사람 섬유아세포의 경우에는 전체 분열 횟수 동안에 약 2,000~3,000 bp(base pairs)정도 감소하며 한번 PD마다 약 30~200 bp씩 감소하는 것으로 확인되었다(Hastie 등; 1990; Counter 등, 1992). 이는 텔로미어 길이가 세포 PD 횟수와 역비례하며 세포의 세네센스와 개체 노화와의 관련성을 보여주는 중요한 도구임을 설명해 준다.

세네센스 유도와 관련하여 세포분열과 더불어 짧아진 텔로미어의 특정 길이는 앞서 언급한 세포주기의 중요한 조절인자인 p53/Rb-dependent pathway을 자극하여 세포분열을 비가역적으로 정지시키게 된다(Allsopp 등, 1996; Carson 등, 1995). 그러나 p53이나 Rb 유전자에 이상 즉 돌연변이인 경우, 세네센스 현상은 발생하지 않으며 세포는 지속적인 분열을 하게 되어 텔로미어의 기능을 상실하게 된다(Lundberg 등, 2000). 분열과 더불어 텔로미어가 더 이상 짧아질 수 없는 지점에 이르게 되는데 이를 "텔로미어 위기(telomere crisis)"로 표현되고 있다(그림 3). 즉 "텔로미어 위기"는 결국 세포주기와 관련된 조절인자의 이상으로 인하여 텔로미어의 특정길이에 대해 p53/Rb-dependent pathway가 반응을 하지 않은 결과이다. "텔로미어 위기"에 도달한 세포는 염색체의 불안정성과 생존에 필수적인 DNA 합성 상실 등으로 p53-dependent apoptosis을 통해 죽는 것으로 확인되었다(Counter 등, 1992; Allsopp 등, 1995; Karlseder 등, 1999).

그러나 p53의 결핍으로 인하여 apoptosis에 의해 죽지 않은 세포는 텔로미어의 결핍으로 인하여 염색체 자체가 상당히 불안정하게 된다. 이러한 세포는 telomeric fusion, DNA break 등의 돌연변이를 통해 텔로미어 합성하는 teloemease 발현을 유도하여 염색체를 안정화시키는 것으로 확인되었다(Chiu 등, 1997; Shay 등, 1997; Dunham 등, 2000). 또한 telomerase 활성 없이도 생존을 위해 텔로미어의 길이를 유지하는 다른 기전도 확인되었다(Brayan 등, 1997). 결국 합성된 텔로미어는 세포의 지속적 분열을 가능하게 하고 암화를 유도하는데 결정적인 역할을 하게 된다. 그러나 "텔로미어 위기"에서 발생하는 돌연변이

등이 어떠한 기전을 통해 암화를 유도하는 과정에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

이와 같이 텔로미어의 특정 길이는 유사 분열의 조절 시계(mitotic clock)로서 역할을 하고 있음을 보여주고 있다. 텔로미어의 이러한 조절 시계의 역할을 고려할 때, 과연 "텔로미어 위기" 이전에 세네센스를 유도하는 "trigger"로서 텔로미어 길이의 특정 "서한치(threshold)"가 존재하는가? 특히 이러한 서한치가 모든 세포의 세네센스 유도에 있어서 "trigger"로 적용될 수 있느냐하는 의문도 제기되었다. 사람 섬유아세포가 세네센스에 도달했을 때 텔로미어 평균 길이가 15~20 kb에서 4~7 kb의 크기로 감소하였다(Harley 등, 1990; von Zglinicki 등, 1995). 그러나 다른 종류의 섬유아세포에서는 텔로미어 길이가 확연히 차이가 있는 것으로 알려졌다(Figueroa 등, 2000). 이러한 점은 텔로미어 서한치가 세네센스 유도에 있어서 결정적인 역할을 하지만 종류에 따라 차이가 있으며 또한 다른 기전의 가능성을 암시한다. 특히 설치류를 비롯하여 몇몇 다른 종은 텔로미어의 길이와 상관없이 세네센스 현상이 유도되는 것으로 알려졌다(Sherr 등, 2000; Wright 등, 2000). 그러나 지금까지 텔로미어가 세포 분열의 횟수를 인식, 유한한 복제 잠재력을 계산하는 "replicometer (복제 측정기)"로서의 역할이 많은 연구 결과에서 확인되었다.

**Telomerase:** 텔로미어 합성단백질인 telomerase는 ribonucleoprotein으로서 적어도 3가지 즉, RNA component(hTERC), telomerase-associated protein(TEP1)과 telomerase catalytic subunit(hTERT)로 구성되어 있다(Feng 등, 1995; Nakayama 등, 1997; Meyerson 등, 1997). 이들에 연구에 의하면 telomerase-negative 세포인 경우, hTERC와 TEP1의 발현은 되지만 hTERT의 발현이 되지 않는 것으로 확인되었다. 이는 telomerase의 활성이 hTERT 발현과 밀접한 관계가 있다는 것을 의미한다. 특히 hTERT 발현이 발암유전자 c-Myc에 의해 이루어진다는 것은 telomerase 발현이 암화 과정에 있어서 중요한 역할로 해석하고 있다(Greenberg 등 1999; Wu 등, 1999).

Telomerase는 생식세포와 몇몇 혈액세포를 제외한 사람의 체세포에서는 활성이 없으나 모든 암세포의 약 70~90% 정도에서 활성이 나타나는 것으로 확인되었다(Dhaene 등, 2000; Kim 등, 1994). 이러한 연유로 1990년대 중반, 지속적인 암세포 성장에 있어서 telomerase 발현이 필수적이라는 가설이 대두되었다. 이는 Telomerase 활성이 증가되면 세포의 세네센스 현상이 저해되어 지속적 세포 분열의 유도를 통해 암화에 기여하는 한다는 해석에 기인한다. 실제로 telomerase를 사람의 fibroblast, retinal epithelial cells, endothelial cells 등에서 유도한 결과, 텔로미어 길이가 짧아지는 것을 막을 뿐만 아니라 세네센스 현상을 막는 것으로 확인되었다(Vaziri 등, 1998; Yang 등, 1999). 그러나 발암유전자 ras의 돌연변이와 DNA-damaging agent에 의해 유도된 세네센스 세포에 teloemerase 발현을 유도했지만 세네센스 특성이 없어지지는 않았다(Wei 등, 1999). 특히 쥐의 세포인 경우, telomerase의 유도발현에도 불구하고 세포 세네센스에 도달하는 것으로 확인되었다(Sherr 등, 2000; Wright 등 2000). 이는 반드시 텔로미어만 세포의 세네센스를 유도하는 것이 아니라 telomere-independent senescence의 기전이 존재한다는 것을 의미한다. 최근에는 telomere-dependent senescence를 "replicative senescence", telomere-independent senescence를 "cellular senescence"로 구별하여 세네센스 현상을 이해하려는 연구들이 진행되고 있다. 세네센스에 대한 다양한 기전의 가능성에도 불구하고 telomerase 활성이 대부분의 암세포에서 발견된다는 사실에 기초하여 표 1에서처럼 활성을 저해하는 "저해물질" 개발과 더불어 암치료제의 가능성에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

그러나 telomerase의 부정적인 측면에도 불구하고 정상 세포의 telomerase 유도 발현을 통해 세포의 PD가 증가하는 것을 입증, 수명연장의 가능성이 제시되었다(Bodnar 등, 1998; Zhu 등, 1999). 최근 사람의 myoblast를 이용한 실험에서 telomerase 활성을 유도한 결과, 세

**표 1.** Telomerase inhibitors

| Telomerase inhibitor | 암세포 | 참고문헌 |
|---|---|---|
| Cisplatin | Human choroidal melanoma | Cheng 등, 2003 |
| 2,3,7-trichloro-5-nitroquinoaline | Human cancer cell | Kim 등, 2003 |
| BIBR 1532 | Human cancer cell | Barma 등, 2003 |
| Gossypol | Gonadal cancer cell | Mego 등, 2002 |
| 3'-azido-3'-deoxythymidine | Osteosarcoma | Mo 등, 2003 |
| Distmycin derivative | Human melanoma cell | Zaffaroni 등, 2002 |
| 3-(3,5-dichlorophenoxy)-nitrostyrene | Human cancer cell | Kim 등, 2003 |
| Telomestatin | Interaction with G-quadruplex structure of telomerase | Kim 등, 2002 |
| Pentacyclic acridine | Ovarian carcinoma cell | Gowan 등, 2001 |

포의 PD는 증가되었지만 암화의 전단계인 세포 불멸화는 유도되지 않는 것으로 확인되었다(Donna 등 2003). 그러나 비록 생식세포에서 telomerase 활성을 보이지만 체세포에 telomerase 활성 유도가 개체 수준에서 수명 연장의 가능성을 제시하기에는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 특히 노화의 진화 유전학 측면에서 노화를 조절하는 단 하나의 특별한 유전자는 존재하지 않고 다양한 경로를 통한 체세포 손상의 누적이라는 가설을 기초로 한다면(Kirkwood 등, 2000) 인위적인 telomerase의 유도 발현보다 텔로미어의 손상을 감소시켜 수명연장의 방법을 모색하는 것이 더 바람직한 방법이 아닐까 사료된다.

## 산화적 스트레스에 의한 세네센스 현상

산화성 물질과 항산화적 방어 기전의 불균형에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 세네센스 유도의 주요한 기전으로 주요하게 연구되어 왔다. 특히 약물이나 독성물질 등 외인성 스트레스보다 정상적 대사를 비롯한 내인성에 기인하는 산화적 스트레스에 의한 세네센스는 노화의 점차적이고 장기 퇴행성 특성을 고려한다면 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 이러한 점을 고려할 때, 세포내에서 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)이 가장 많이 생성되는 미토콘드리아의 respiratory system과 세네센스에 대한 이해가 반드시 필요하다. 특히 glucose, pyruvate 등과 같은 에너지가 풍부한 기질이 ATP 재생의 감소를 유도하여 미토콘드리아의 ROS 생성에 의한 세포 독성을 감소시킨다는 점은 에너지 대사와 ROS 생성의 중요성을 잘 대변해준다(Toussaint 등, 1994). 추정에 의하면 NADH에서 산소로 전달되는 총 전자의 약 1% 정도가 superoxide 생성을 하며 특히 과잉열량 등에 의한 과도하게 공급된 전자와 전자전달계의 uncoupling reaction과 미토콘드리아의 기능 저하는 ROS의 생성을 증가시킨다(Boveris 등, 1977; Gredilla 등, 2002). 최근 연구에 의하면 미토콘드리아의 기능 저하에 의한 산화적 스트레스 증가가 텔로미어의 단축과 더불어 세네센스를 유도하는 것으로 확인되었다(Liu 등, 2002). 역으로 산화적 스트레스의 정도를 낮추기 위해 정상적 식이의 약 40% 정도에 해당하는 열량제한(caloric restriction)를 했을 때 세네센스 현상이 지연되는 것이 확인되었다(Warner 등, 1995). 다른 연구결과에 의하면 40% 열량제한을 통해 $H_2O_2$ 발생이 약 40% 정도 감소되었는데 이는 식이에 의한 산화적 스트레스와 세네센스와의 직접적 관련성을 통해 소식에 의한 개체 수준의 노화 지연의 기전을 유추할 수 있다(Gredilla 등, 2001).

외인성 물질에 기인하는 산화적 스트레스인 경우, Chen 등(1994)의 연구에서 $H_2O_2$를 처리한 결과, 섬유아세포가 정상적인 세포보다 조숙한 세네센스 현상을 보였다. 또한 산소분압을 높여 ROS를 유도한 결과, 조숙한 세네센스 현상이 확인되었다(von Zgliniki 등 1995). 이러한 산화적 스트레스에 의한 조숙한 세네센스는 *in vivo*에서 특정 조직과 기관의 노화를 비롯하여 기능 저하와 밀접한 관계가 있다. 표 2에서처럼 독성물질을 비롯하여 여러 가지 스트레스에 의해 유도된 세네센스 현상이 *in vivo*와 *in vitro* 시스템에서 질환과의 연관성이 확인되었다.

이와는 대조적으로 섬유아세포를 이용한 실험에서 항산화물질인 mercaptoethanol과 더불어 catalase와 superoxide dismutase를 처리한 결과, life span과 PD가 증가되었다(Zhou 등, 2002). 또한 superoxide 생성을 저해하는 hydrocortisone을 세포에 처리한 결과, 약 20~50회 정도의 PD가 증가되었다(Okada 등, 2000). 이러한 항산화적 물질의 항노화 효과를 *in vitro* 수준에서 세네센스 지연을 통한 *in vivo* 수준에서 수명 연장의 기전으로 해석할 수 있다.

## 산화적 스트레스에 의한 텔로미어 단축 기전

산화적 스트레스에 의한 세네센스에 대한 연구는 텔로미어 단축의 관점에서 다소 이루어졌다. 연구 결과에 의

**표 2.** 다양한 스트레스에 의한 *in vivo*와 *in vitro* 세네센스 유도와 질환

| Stress 또는 원인물질 | 세네센스 세포 | 질환 | 참고문헌 |
|---|---|---|---|
| Homocysteine-induced Oxidative stress | Umbilical endotherial cell | Atherosclerosis | Xu 등, 2000 |
| Aging-induced oxidative stress | Prostatic epithelial cells | Benign prostatic hyperplasia | Castro 등, 2003 |
| tert-butylhydroperoxide | WI-38 human diploid fibroblasts | Premature aging | Dumont P 등, 2001 |
| Iron-induced Oxidative stress | Erythrocyte | β-thalassemia | Comporti 등, 2002 |
| Oxidative stress | Chondrocyte | Osteoarthritis | Martin 등, 2002 |
| Cirrhosis samples | Hepatocyte | Human liver cirrhosis | Wiemann 등, 2002 |
| Venous hypertension | Fibroblasts isolated from venous ulcers | Venous ulcers | Stanley 등, 2001 |
| Patients | Leucocyte | Coronary artery disease | Samani 등, 2001 |
| Oxidative stress | Blood lymphocyte | Vascular dementia | Saretzki 등, 2002 |
| Ischemia by transplantation | Tubular epithelial cells | Chronic renal allograft rejection | Joosten 등, 2003 |

하면 $H_2O_2$, tert-butyl-hydroperoxide와 고산소 환경 등에 의해 섬유아세포의 텔로미어가 약 5~10배 정도 빠르게 단축이 이루어지며 조숙한 세네센스를 유도하는 것이 확인되었다(von Zglinicki 등 2000; von Zglinicki 등 1995; Vaziri 등, 1997). 따라서 세포분열에 의해 감소하는 텔로미어은 산화적 스트레스에 의한 손상을 통해 더욱 단축되어 세포의 조숙한 세네센스 현상 유도하는 것으로 해석된다.

텔로미어 단축은 세포분열시 DNA 이중나선의 지연가닥(lagging strand)에서 DNA 합성과 관련하여 "end-replication problem"으로 알려졌다(Proctor 등, 2002). 지연가닥의 DNA 합성시 RNA primer가 Okazaki fragment를 형성한 후 빠져나오게 되면 gap이 생성된다. 이 gap은 다시 합성, ligation이 이루어진다. 그러나 gap이 염색체의 최극단(distal 3' end of the lagging strand)에 위치하면 "overhang" 형성과 동시에 DNA 합성이 불가능하게 되어 텔로미어가 단축되는 기전으로 설명되고 있다.

사람의 섬유아세포를 이용한 실험한 결과에 따르면 산소의 정상 조건하에서 약 PD당 100 bp 감소하며 고산소 환경에서는 약 PD당 600 bp 텔로미어가 단축되는 것으로 확인되었다(von Zglinicki 등 1995; Vaziri 등, 1997). 이는 텔로미어 단축이 분열마다 규칙적으로 단축되는 것과 더불어 산화적 스트레스에 의해 더욱 단축되며 특히 세포의 조숙한 세네센스를 유도하는 원인으로 사료된다. 따라서 산화적 스트레스에 의한 조숙한 세네센스를 유발하는 텔로미어 단축에 대한 기전을 이해할 필요성이 있다. 이는 결국 환경인자에 의한 개체의 조숙한 노화를 세포 수준에서 그 기전을 설명할 수 있는 논리적 근거가 될 것이다.

산화적 스트레스에 의한 텔로미어 단축은 DNA 상해 특히 single-strand break(SSB)의 telomere-specific accumulation으로 대부분 설명되고 있다(그림 4). SSB의 크기와 발생빈도는 $H_2O_2$를 비롯하여 alkylating agent, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosogunidine 등에 의해 증가되는 것으로 확인되었다(Petersen 등, 1998; Sitte 등 1998). 또한 세네센스 세포는 $H_2O_2$에 반응하여 정상적인 세포보다 약 30% 이상 DNA 상의 oxo$^8$dG 발생을 증가시키며 free SSB 생성을 촉진시킨다(Chen 등, 1995). 이러한 SSB의 축적은 base excision repair system의 불활성의해 수복 효소의 활성 결핍에 기인하는 것으로 알려졌다(Petersen 등, 1998; von Zglinicki 등 2000). 즉 DNA 합성시 SSB가 발생했을 때 replication folk와 Okazaki fragment 형성이 일시적으로 멈추며 결과적으로 텔로미어의 DNA 합성이 이루어지지 않아 단축이 촉

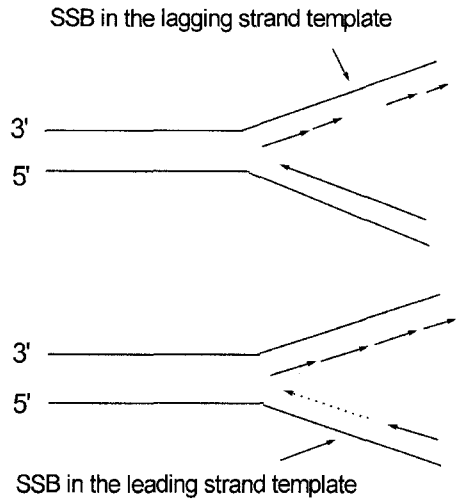


**그림 4.** Single-strand break(SSB)에 의한 telomere 손실: SSB는 텔로미어의 어느 부위에서도 발생한다. SSB의 누적은 텔로미어 길이를 단축시키는 결정적 요인이다.

진된다(von Zgliniki 등, 2000; Chen 등, 1995; Garvik 등, 1995). 또한 free SSB는 DNA polymerase 활성을 저해하여 텔로미어 단축을 유도하는 것으로 확인되었다(Sitte 등, 1998). 그러나 DNA polymerase의 기여는 세포 분열 당 약 10 base pair 이하 정도이다(Harley, 1991). 어떤 스트레스도 없는 정상적인 조건하에서 평균적으로 세포분열당 약 30~200 base pair 정도 텔로미어가 단축된다는 것을 감안하면 산화적 스트레스에 의한 텔로미어 단축은 polymerase의 활성 저해보다 DNA 나선성의 SSB 존재에 더 기인하는 것으로 사료된다.

또한 산화적 손상에 의한 SSB의 특수 구조 즉 "telomeric loop"는 세포주기를 조절하는 p53-dependent pathway와 밀접한 관계가 있다. 연구 결과에 의하면 텔로미어 특정 부위에 telomere loop를 형성하는 "single-stranded G-rich 3' overhang"가 TRF1, TRF2와 TIN-2라는 텔로미어 결합단백질에 둘러싸여 안정화되어 있는 것이 확인되었다(Makarov 등, 1997; Griffith 등; 1999; Kim 등, 1999). 이 loop는 세포주기와 관련된 신호전달 단백질과의 상호작용 차단과 텔로미어의 최극단을 보호하는데 반드시 필요한 구조이다(Griffith 등, 1999). 그러나 telomeric loop는 텔로미어 단축 또는 상해에 의해 그 안정성이 상실되어 노출 또는 분리된다(von Zgliniki 등, 2000). 노출 또는 분리된 loop(free single-stranded G-rich 3' overhang)는 DNA damage check point 즉 p53-dependant pathway를 활성화시키고 세네센스를 유도하는 것으로 추정되고 있다(Karlseder 등, 1999; Saretzki 등, 1999). 여러 연구를 통해 p53이 DNA strand break 형태 등의 DNA상해에 반응하여 활성화된다는 것이 확인

되었다(Huang 등, 1996; Nelson 등, 1994). 앞서 언급하여 듯, 활성화된 p53는 cdk 저해단백질인 p21을 통해 $G_1$기에 세포분열을 멈추게 한다.

텔로미어의 loop가 세포의 복제 횟수를 인식하여 세네센스를 유도한다면 이러한 물리적 신호가 세포의 화학적 신호 즉 p53-dependent pathway을 어떻게 자극할 것인가? 여러 연구에 의하면 SSB의 telomeric loop와 topoisomerase의 상호작용, Ataxia Telangiectasia gene의 생성물과 작용, telomere-telomere dicentric의 직접적 작용 등 여러 기전이 제시되고 있으나 앞으로 해결해야할 과제이다(Vaziri 등, 1996; Brown 등, 1997; Wong 등, 2003).

### 항산화적 방어능력과 텔로미어 단축 그리고 질환과의 관계

사람 섬유아세포 20종류를 이용한 von Zgliniki 등(1995)의 연구에 의하면 항산화적 방어능력과 텔로미어 단축이 역비례하는 것으로 확인되었다. 즉 항산화적 방어능력이 약한 섬유아세포는 텔로미어 단축이 훨씬 빠르게 진행되었다. Free-radical 제거 물질인 α-phenyl-t-butyl-nitrone와 vitamin C 등을 처리했을 때, 섬유아세포의 텔로미어 감소가 현저히 감소하였으며 특히 세네센스 현상을 지연시켰다(Furumoto 등 1998; von Zglinicki 등 2000; Sitte 등, 1998). 이는 결국 텔로미어 길이가 산화적 스트레스와 항산적 방어능력의 관계에 의해 결정된다는 것을 설명해준다.

Saretzki 등(2002)은 18-98세 사이 연령에 있는 환자 186 명의 텔로미어를 분석하였다. 이중 97명이 혈관성 치매를 포함한 혈관계 질환을 가진 환자였다. 97명의 혈관계 질환을 가진 환자는 연령이 보정된 건강한 대조군과 비교하여 임파구의 텔로미어 길이가 현저히 짧았다. 특히 혈관성 치매를 가진 환자의 텔로미어는 대조군보다 약 400 bp 정도 텔로미어가 짧았다. 최근 혈관성 질환의 주요 원인물질인 homocysteine을 투여한 실험에서 혈관의 내포세피의 세네센스 상태로 진입이 빠르고 특히 산화적 스트레스와 텔로미어의 역비례적 관계를 확인되었다(Xu 등, 2000). 산화적 스트레스는 노화와 더불어 증가하고 반대로 항산화 능력은 노화와 더불어 감소하는 것이 일반적 시각이다. 이러한 측면에서 혈관성 질환을 비롯한 노화성 질환의 발생이 산화적 스트레스에 의한 텔로미어 단축과 연관성을 추정할 수 있다. 이러한 사실에 연유하여 볼 때, *in vitro*의 텔로미어 길이가 *in vivo*의 항산화적 방어능력의 생물학적 지표임과 동시에 질환의 진단과 예단에 있어서 중요한 도구로 이용 가능성도 모색할 수 있다.

## 결 론

*In vitro*에서의 세네센스 현상이 *in vivo*에서도 확인되었다. 노화와 암 그리고 apoptosis에 대한 저항성 등의 생물학적 중요성을 고려할 때 "Replicative Senescence"에 대한 이해는 여러 질환의 원인과 예방 그리고 치료에 상당히 중요한 방안을 제시할 수 있다. 그러나 세네센스에 대한 연구가 '90 년대 초반부터 본격적으로 시작되었다는 것은 아직 많은 부분에 대해 이해가 필요하다는 점을 시사한다. 특히 세네센스의 중요한 특징인 비가역적 세포복제 중지와 관련하여 텔로미어의 "single-stranded G-rich 3' overhang"와 p53-dependent pathway가 어떠한 신호전달체계를 통해 이루어지는가에 대한 명확한 이해를 위해 더 많은 노력이 필요할 것으로 사료된다.

노화 이론은 "free radical" 설과 유전자 설이 크게 대변되고 있다. 조숙한 세네센스 현상과 여러 효소들의 발현과 관련하여 노화를 이해한다면 두 이론의 분리보다 통합적 접근이 필요하다. 특히 free radical을 비롯한 산화적 스트레스는 발병 기전의 원인으로 모든 질환의 약 90% 정도에 직, 간접적으로 영향을 준다. 따라서 독성물질 특히 산화적 스트레스 그리고 세네센스 현상에 미치는 영향에 대한 연구는 특정 세포, 조직 그리고 기관의 질환 발병 기전을 이해하는데 있어서 새로운 방법을 제시할 수 있다.

## 감사의 글

본 논문은 계명대학교 TMR 센터의 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

Allsopp, R.C., (1996): Models of initiation of replicative senescence by loss of telomeric DNA, *Exp. Gerontol.*, **31**, 235-243.

Allsopp, R.C. and Harley C.B. (1995): Evidence for a critical telomere lengh in senescent human fibroblast. *Exp. Cell. Res.*, **219**, 130-136.

Barma, D.K., Elayadi, A., Falck, J.R. and Corey, D.R. (2003): Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. *Bioorg Med Chem Lett.*, **13**, 1333-1336.

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Francz, P.I. and Maier, K. (1988): Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell. Sci. Suppl.*, **10**, 115-130.

Bierman, E.L. (1978): The effect of donor age on the *in vitro* lifespan of cultured human arterial smooth-muscle cells. *In vitro cell, Dev. Biol.*, **14**, 951-955.

Blackburn, E. (1991): Structure and function of telomeres. *Nature*, **350**, 569-573.

Brown, J.P., Wei, W. and Sedivy, J.M. (1997): Bypass of

senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, **277**, 831-4.

Boveris, A. (1977): Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **78**, 67-82.

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley, C.B., Shay J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.

Bond, J.A., Blaydes, J.P., Rowson, J., Haugh, M.F., Smith, J.R., Wynford, T.D. and Wyllie, F.S. (1995): Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting in induction of SDI1/WAF1. *Cancer Res.*, **55**, 2404-2409.

Campisi, J. (1996): Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell.*, **84**, 497-500.

Carson, D.A. and Lois, A. (1995): Cancer progression and p53. *Lancet.* **346**, 1009-1011.

Castro, P., Giri, D., Lamb, D. and Ittmann, M. (2003): Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.*, **55**, 30-38.

Chadeneau, C., Siegel, P., Harley, C.B., Muller, W.J. and Bacchetti, S. (1995): Telomerase activity in normal and malignant murine tissues. *Oncogene.*, **11**, 893-898.

Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J. and Ames, B.N., (1995): Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 4337-4341.

Cheng, H., Wu, Z., Zheng, J., Lu, G., Yan, J., Liu, M., Huang, D. and Lin, J. (2003): Inhibition on telomerase activity and cytotoxic effects by cisplatin in cultured human choroidal melanoma cells. *Yan Ke Xue Bao.*, **19**, 54-9.

Chiu, C.P. and Harley, C.B. (1997): Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **214**, 99-106.

Comporti, M., Signorini, C., Buonocore, G. and Ciccoli, L. (2002): Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 568-576.

Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Narley, C.B. and Bacchetti, S. (1992): Telomere shorterning assocciated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*, **11**, 1921-1929.

Dhaene, K., Van Marck, E. and Parwaresch, R. (2000): Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch.*, **437**, 1-16.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. and Campisi, J., (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 9363-9367.

Dubrez, L., Coll, J.L., Hurbin, A., de Fraipont, F., Lantejoul, S. and Favrot, M.C. (2001): Cell cycle arrest is sufficient for p53-mediated tumor regression. *Gene Ther.*, **8**, 1705-1712.

Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J.F., Chainiaux, F., Frippiat, C., de Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001): Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett.*, **502**,109-112.

Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L. and Reddel, R.R. (2000): Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.*, **26**, 447-450.

Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R,, Chang, E., Allsopp, R.C. and Yu, J. (1995): The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**, 1236-1241.

Figueroa, R., Lindenmaier, H., Hergenhahn, M., Nielsen, K.V. and Boukamp, P. (2000): Telomere erosion varies during *in vitro* aging of normal human fibroblasts from young and adult donors. *Cancer Res.*, **60**, 2770-2774.

Furumoto, K., Inoue, E., Nagao, N., Hiyama, E. and Miwa, N. (1998): Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci.*, **63**, 935-948.

Garvik, B., Carson, M. and Hartwell, L., (1995): Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6128-6138.

Gredilla, R., Barja, G. and Lopez-Torres, M. (2001): Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. *Free Radic Res.*, **35**, 417-425.

Goldstein, S.E. (1990): Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, **249**, 1129-1132.

Goletz, T.J., Robetorye, S. and Pereeira-Smith, O.M. (1994): Genetic analysis of indefinite division in human cells: evidence for a common immotalizing mechanism in T and B lymphoid cell lines. *Exp. Cell. Res.*, **215**, 82-89.

Gonos, E.S., Burns, J.S., Mazars, G.R., Koborna, A., Riley, T.E., Barnett, S.C., Zafarana, G., Ludwig, R.L., Ikram, Z., Powell, A.J. and Jat, P.S. (1996): Rat embryo fibroblasts immortalized with simian virus 40 large T antigen undergo senescence upon its inactivation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5127-5138.

Goto, M. and Ishikawa, Y. (2000): Werner syndrome, *Nippon Rinsho*, **58**, 1490-1495.

Gowan, S.M., Heald, R., Stevens, M.F. and Kelland, L.R. (2001): Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol. Pharmacol.*, **60**, 981-988.

Gray, M.D., Shen, J.C., Kamath-Loeb, A.S., Blank, A., Sopher, B.L., Martin, G.M., Oshima, J. and Loeb, L.A. (1997): The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat. Genet.*, **17**, 100-103.

Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (2001): Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.*, **15**, 1589-1591.

Gredilla, R., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (2002): Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial $H_2O_2$ production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microsc. Res. Tech.*, **59**, 273-277.

Greenberg, R.A., O'Hagan, R.C., Deng, H., Xiao, Q., Hann,

S.R., Adams, R.R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G.B. and DePinho, R.A. (1999): Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene.*, **18**, 1219-1226.

Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. and de Lange, T. (1999): Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.*, **97**, 503-514.

Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. *Nature*, **345**, 458-460.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, **75**, 803-816.

Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. and Allshire, R.C. (1990): Telomere reduction in human colorectal carnoma and with ageing. *Nature*, **346**, 866-868.

Hayflick, L. (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.*, **37**, 614-636.

Hayflick, L. (1976): The cell biology of human aging. *N. Engl. Med.*, **295**, 1302-1308.

Joosten, S.A., van Ham, V., Nolan, C.E., Borrias, M.C., Jardine, A.G., Shiels, P.G., van Kooten, C. and Paul, L.C. (2003): Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. *Am. J. Pathol.*, **162**, 1305-1312.

Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. and de Lange, T. (1999): p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*, **283**, 1321-1325.

Kim, J.H., Kim, J.H., Lee, G.E., Lee, J.E. and Chung, I.K. (2003): Potent inhibition of human telomerase by nitrostyrene derivatives. *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1117-1124.

Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K. and Hurley, L.H. (2002): Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2098-2099.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R,, Harley, C.B,, West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.

Kim, S.H., Kaminker, P. and Campisi, J. (1999): TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.*, **23**, 405-412.

Kumazaki, T., Robetorye, R.S., Robetorye, S.C. and Smith, J.R., (1991): Fibronetin expression increases during *in vitro* cellular senescence; correlation with increased cell area. *Exp. Cell Res.*, **195**, 13-19.

Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Blackwell, C., Cristofalo, V.J., Francis, M.K., Baerlocher, G.M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E.A., Sawyer, N., Lansdorp P.M. and West M.D. (2000): Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, **288**, 665-669.

Liu, L., Trimarchi, J.R., Smith, P.J. and Keefe, D.L. (2002): Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell.*, **1**, 40-46.

Lumpkin, C.K., McClung, J.J.K., Pereira-Smith and Smith J.R. (1986): Existemce of high abundance antiproliferative mRNAs in senescent human diploid fibroblasts. *Science*, **232**, 393-395.

Lundberg, A.S., Hahn, W.C., Gupta, P. and Weinberg, R.A. 2000. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 705-709.

Makarov, V.L., Hirose, Y. and Langmore, J.P. 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell.*, **88**, 657-666.

Masoro, E.J. (2000): Caloric restriction and aging: an update. *Exp. Gerontol.*, **35**, 299-305.

Martin, J.A. and Buckwalter, J.A. (2002): Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biorheology*, **39**, 145-152.

Mawal-Dewan, M., Lorenzini, A., Frisoni, L., Zhang, H., Cristofalo, V.J. and Sell, C. (2002): Regulation of collagenase expression during replicative senescence in human fibroblasts by Akt-forkhead signaling, *J. Biol. Chem.*, **277**, 7857-7864.

Mawal-Dewan, M., Frisoni, L., Cristofalo, V.J. and Sell, C. (2003): Extension of replicative lifespan in WI-38 human fibroblasts by dexamethasone treatment is accompanied by suppression of p21 Waf1/Cip1/Sdi1 levels, *Exp. Cell Res*, **285**, 91-98.

Mego, M. (2002): Telomerase inhibitors in anticancer therapy: gossypol as a potential telomerase inhibitor. *Bratisl. Lek. Listy.*, **103**, 378-381.

Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A. and Weinberg, R.A. (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.*, **90**, 785-795.

Millis, A.J., Hoyle, M., McCue, H.M. and Martini, H. (1992): Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **201**, 373-379.

Mo, Y., Gan, Y., Song, S., Johnston, J., Xiao, X., Wientjes, M.G. and Au, J.L. (2003): Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach. *Cancer Res.*, **63**, 579-585.

Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, Jr, R.M., Jr, Bohr, V.A. and Hickson, I.D. (2001): The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2843-2849.

Murano, S.R., Thweatt, R.J., Shmookler-reis, R.A., Jones, Mereman, E.J. and Goldstein S. (1991): Diverse gene sequences are overexpressed in Waner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3905-3914.

Newbold, R.F., Overell, R.W. and Connell, J.R. (1982): Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogenesis. *Nature*, **299**, 633-634.

Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A. and Ishikawa, F. (1997): TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novelmember

of WD repeats family. *Cell.*, **88**, 875-884.

Oshima, J., Chang, E.U., Boennke, M., Weber, J.L., Edelhoff, S., Wagner, M.J., Wells, D.E., Wood, S.,' Disteche, C.M., Martin, G.M. and Schllenberg, G.D. (1994): Intergrated mapping analysis of the werner syndrome region of chromosome 8. *Genomics.*, **23**, 100-113.

Oshima, J., Campisi, J., Tannock, T.C.A. and Martin, G.M. (1995): Regulatiobn of c-fos expression in senescencing werner syndrome fibroblasts differs from that observed in senescing fibroblasts from normal donors. *J. of Cell. Physi.*, **162**, 277-283.

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J., Gredilla, R. and Barja, G. (2002): Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 1437-1446.

Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R., (1988): Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 6042-6046.

Petersen, S., Saretzki, G. and von Zglinicki, T. (1998): Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, **239**, 152-160.

Proctor, C.J. and Kirkwood, T.B. (2002): Modelling telomere shortening and the role of oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 351-363.

Reenstra, W.R., Yaar, M. and Gilchrest, B.A. (1996): Aging affects epidermal growth factor receptor phosphorylation and traffic kinetics. *Exp. Cell Res.* **227**, 252-255.

Reznikoff, C.A., Yeager, T.R., Belair, C.D., Savelieva, E., Puthenveeyttil, J.A. and Stadler, W.M. (1996): Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.*, **56**, 2886-2890.

Riabowol, K., Schiff, J. and Gilman, M.Z. (1992): Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 157-161.

Rohme, D. (1981): Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life-spans of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 5009-5013.

Sager, R. (1991): Senescence as a mode of tumor suppression. *Env. Heal. Pers.*, **93**, 59-62.

Samani, N.J., Boultby, R., Butler, R., Thompson, J.R. and Goodall, A.H. (2001): Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet.*, **358**, 472-473.

Saretzki, G. and Von Zglinicki, T. (2002): Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **959**, 24-29.

Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R.E. and von Zglinicki, T. (1999): Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene.*, **18**, 5148-5158.

Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997): A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, **33**, 787-791.

Sherr, C.J. and DePinho, R.A. (2000): Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.*, **102**, 407-410.

Sitte, N., Saretzki, G. and von Zglinicki, T. (1998): Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 885-893.

Stanley, A. and Osler, T. (2001): Senescence and the healing rates of venous ulcers. *J. Vasc. Surg.*, **33**, 1206-1211.

Stanulis-Praeger, B.M. (1989): *In vitro* studies of aging. *Clin. Geriatr. Med.*, **5**, 23-40.

Stein, G.H., Beeson, M. and Gordon, L. (1990): Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science*, **249**, 666-669.

Thomas, D.M., Yang, H.S., Alexander, K. and Hinds, P.W. (2003): Role of the retinoblastoma protein in differentiation and senescence, *Cancer Biol. Ther.*, **2**, 124-130.

Thweatt, R., Murano, S., Fleischmann, R.D. and Goldstein, S. (1992): Isolation and characterization of gene sequences overexpressed in Werner syndrome fibroblasts during premature replicative senescence. *Exp. Gerontol.*, **27**, 433-440.

Toussaint, O. and Remacle, J. (1994): Arguments in favour of the concept of critical threshold of accumulation of errors in cell death. Qualities and limits of this concept in cell aging. *Pathol. Biol.*, **42**, 305-311.

Vaziri, H. and Benchimol, S. (1998): Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.*, **8**, 279-282.

Vaziri, H. (1997): Critical telomere shortening regulated by the ataxia-telangiectasia gene acts as a DNA damage signal leading to activation of p53 protein and limited life-span of human diploid fibroblasts. *Biochemistry*, **62**, 1306-1310.

Vaziri, H. and Benchimol, S. (1996): From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.*, **31**, 295-301.

von Zglinicki T., Saretzki, G., Docke, W. and Lotze, C. (1995): Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.*, **220**, 186-193.

von Zglinicki, T., Pilger, R. and Sitte, N. (2000): Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 64-74.

Wang, E. (1995): Senescent human fibroblast resist programmed cell death, and failure to suppresss bcl2 is involved. *Cancer Res.*, **55**, 2284-2292.

Wang, E., Lee, M.J. and Pandey, S. (1994): Control of fibroblast senescence and activation of programmed cell death. *J. Cell. Biochem.*, **54**, 432-439.

Wei, S. Wei, S. and Sedivy, J.M. (1999):. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res.*, **59**, 1539-1543.

Wiemann, S.U., Satyanarayana, A., Tsahuridu, M., Tillmann, H.L., Zender, L., Klempnauer, J., Flemming, P., Franco, S., Blasco, M.A., Manns, M.P. and Rudolph, K.L. (2002): Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.*, **16**, 935-942.

Weinberg, W.C. and Denning, M.F. (2002): P21Waf1 control

of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **13**, 453-464.

West, M.D., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1989): Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Exp. Cell Res.*, **184**, 138-147.

Whikehart, D.R., Register, S.J., Chang, Q. and Montgomery, B. (2000): Relationship of telomeres and p53 in aging bovine corneal endothelial cell cultures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1070-1075.

Wong, K.K., Maser, R.S., Bachoo, R.M., Menon, J., Carrasco, D.R., Gu, Y., Alt, F.W. and DePinho, R.A. (2003): Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*, **421**, 643-648.

Wright, W.E. and Shay, J.W. (2000): Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med.*, **6**, 849-851.

Wu, K.J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J. and Dalla-Favera R. (1999): Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.*, **21**, 220-224.

Wyllie, F., Haughton, M., Bartek, J., Rowson, J. and Wynford-Thomas, D. (2003): Mutant p53 can delay growth arrest and loss of CDK2 activity in senescing human fibroblasts without reducing p21 (WAF1) expression. *Exp. Cell Res.*, **285**, 236-242.

Xu, D., Neville, R. and Finkel, T. (2000): Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett.*, **470**, 20-24.

Yang, J., Chang, E., Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C.P. and Herron, G.S. (1999): Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26141-26148.

Yang, L., Didenko, V.V., Noda, A., Bilyeu, T.A., Darlington, G.J., Smith, J.R. amd Hornsby, P.J. (1995): Increased expression of p21 Sdi1 in adrenocortical cells when they are placed in culture. *Exp. Cell Res.*, **221**, 126-131.

Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G.M., Mulligan, J. and Schellenberg, G.D. (1996): Positional cloning of the werner's syndrome gene. *Science*, **272**, 258-262.

Zeng, G. and Millis, A.J. (1996): Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage cultures of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **222**, 150-156.

Zeng, Y.X. and El-Deiry, W.S. (1996): Regulation of p21WFI/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene.*, **12**, 1557-1564.

Zhu, J., Wang, H., Bishop, J.M. and Blackburn, E.H. (1999): Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 3723-2728.

Zhou, Y., Ouyang, AL., Hua, P. and Tan, W.S. (2002): The effect of antioxidants on the *in vitro* life-span of keratinocyte. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.*, **18**, 630-633.