

综述

实时监测衰老报告小鼠模型的研究进展

孙洁^{1,2,*}, 王宇宁³, 罗珊珊⁴, 刘宝华^{1,2,*}

¹深圳大学基础医学院, 深圳 518060; ²深圳市系统衰老与主动健康重点实验室, 深圳 518060; ³临床试验中心, 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021; ⁴汕头大学医学院罗湖临床学院, 深圳 518005

摘要: 衰老是老年慢性疾病的独立危险因素, 理解衰老机制是实现这些疾病早期预防与有效干预的关键之一。系统衰老是动态演进的过程, 其机制研究面临挑战。随着对细胞衰老与系统衰老相关生物标志物研究的进展以及小动物活体光学成像的发展, 国内外同行构建了越来越多的实时监测衰老报告小鼠模型, 助力衰老机制与干预策略研究。本文基于几种经典的、广泛应用的衰老生物标志物(p16^{Ink4a}、p21^{Waf1/Cip1}、p53和Glb1), 归纳了近些年来与其相关的实时监测衰老报告小鼠模型, 综合分析了它们在系统衰老研究中的应用价值。

关键词: 衰老; 实时监测报告小鼠; p16^{Ink4a}; p21^{Waf1/Cip1}; p53; Glb1

Advances in live-imaging aging reporter mice

SUN Jie^{1,2,*}, WANG Yu-Ning³, LUO Shan-Shan⁴, LIU Bao-Hua^{1,2,*}

¹School of Basic Medical Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; ²Shenzhen Key Laboratory for Systemic Aging and Intervention (SKL-SAI), Shenzhen 518060, China; ³Clinical Trial Center, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; ⁴Luo-hu Clinical Institute of Shantou University Medical College, Shenzhen 518005, China

Abstract: Aging is an independent risk factor for chronic diseases in the elderly, and understanding aging mechanisms is one of the keys to achieve early prevention and effective intervention for the diseases. Aging process is dynamic and systemic, making it difficult for mechanistic study. With recent advances in aging biomarkers and development of live-imaging technologies, more and more reporter mouse models have been generated, which can live monitor the aging process, and help investigate aging mechanisms at systemic level and develop intervention strategies. This review summarizes recent advances in live-imaging aging reporter mouse models based on widely used aging biomarkers (p16^{Ink4a}, p21^{Waf1/Cip1}, p53 and Glb1), and discusses their applications in aging research.

Key words: aging; live-imaging reporter mice; p16^{Ink4a}; p21^{Waf1/Cip1}; p53; Glb1

随着人口老龄化趋势的加重, 我国正面临日益严重的老龄化问题, 老龄化引发的各种社会问题以及衰老对机体各方面的影响引起越来越广泛的关注。健康老龄化是我国社会的重大需求, 理解衰老机制是关键, 但至今我们对衰老的理解尚处于初级阶段。衰老是机体的细胞、组织和器官在结构和功

能上逐渐出现的不可逆转的全面退行性改变。衰老研究的国际同行总结了衰老的 12 个特征: 基因组不稳定、端粒损耗、表观遗传改变、蛋白质稳态丧失、大自噬失能、营养感应失调, 线粒体功能障碍、细胞衰老、干细胞耗竭、细胞间通讯改变、慢性炎症和生态失调^[1]。其中细胞衰老是机体衰老的细胞生

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82125012, 91849208) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2021ZD0202400).

*Corresponding authors. SUN Jie: Tel: +86-755-86670623; E-mail: jiesun_szu@126.com; LIU Bao-Hua: Tel: +86-755-26935407; E-mail: ppliew@szu.edu.cn

物学基础, 是肿瘤发生的天然屏障^[2]。细胞衰老分为3种类型: 复制性衰老 (replicative senescence, RS)、应激性衰老 (stress-induced premature senescence, SIPS) 和发育程序性衰老 (developmentally programmed senescence, DPS)。RS 是指生理因素引起的细胞分裂能力减退直至最终消失, 是最早被发现的衰老方式, 即 Hayflick 定义的细胞衰老^[3]。SIPS 是指由于外界环境的各种刺激 (如过量的氧化自由基、离子辐射、丝裂霉素 C、乙醇等) 导致细胞分裂复制寿命缩短, 在达到 Hayflick 极限之前就开始出现衰老指征, 也称为加速衰老现象^[4, 5]。DPS 是指生命体征还在胚胎发育时期就开始的衰老^[6, 7]。衰老的细胞形态不规则, 变大、变扁平, 功能上的改变体现在细胞周期停滞、细胞复制能力丧失、细胞周期基因表达下调、细胞周期抑制因子及其他衰老相关基因表达上调等^[8]。

随着衰老相关生物标志物的发展和更新, 越来越多的生物标志物开始应用于监测、定量以及报告衰老, 但往往缺乏足够的敏感性和特异性。鉴于细胞水平研究周期短, 过去监测衰老的手段多停留在细胞水平, 个体或系统水平的研究受到限制。随着小动物活体光学成像 (*in vivo* imaging systems, IVIS) 的发展, 持续性非侵入性可视化小鼠衰老成为可能。近年来, 一系列实时监测衰老报告小鼠模型建立 (发展时间轴见图 1), 为衰老以及肿瘤等方面的研究提供了新工具和新思路。

近年来的研究发现, $p16^{Ink4a}$ 、 $p21^{Waf1/Cip1}$ 、 $p53$ 和 $Glb1$ 是主要的衰老生物标志物。 $p16^{Ink4a}$ 和 $p21^{Waf1/Cip1}$ 调控细胞周期和增殖, $p53$ 参与 DNA 损伤修复和细胞凋亡, 而 $Glb1$ 则与细胞外基质的变化和老化相关。这些生物标志物的异常表达或活性改变可以与细胞衰老和相关疾病的发生和发展相关联。本文基于上述几种经典的、广泛应用的衰老生物标志物, 归纳了与其相关的实时监测衰老报告小鼠 (图 2), 以综合分析其在个体衰老报告研究中的应用的可行性及应用价值。

1 $p16^{Ink4a}$ 报告小鼠

$p16^{Ink4a}$ 蛋白, 即细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDK-N2A), 由 *Ink4a* 基因位点编码, 是细胞衰老过程中的关键效应物, 在遗传控制程序中起主要作用。研究证实 $p16^{Ink4a}/Rb$ 途径在某些肿瘤细胞中被阻断,

提示其可以抑制潜在的肿瘤生长^[9]。 $p16^{Ink4a}$ 的表达是高度动态的, 其在健康的年轻组织中几乎无法检测到, 但在许多衰老或损伤的组织中表达急剧升高。 $p16^{Ink4a}$ 已经成为报告衰老的主要生物标志物, 基于 $p16^{Ink4a}$ 构建的衰老报告小鼠已经成为衰老研究领域不可或缺的部分 (表 1)。

1.1 $p16^{Luc}$ 报告小鼠

最初 Yamakoshi 等人为了寻找既可以补充组织培养研究, 又有助于理解体内调节人类 $p16^{Ink4a}$ 基因表达的作用和机制的替代方法, 构建了人源 $p16^{Luc}$ 报告小鼠模型, 该模型携带用萤火虫荧光素酶标记的人类 $p16^{Ink4a}$ 基因座^[10]。监测荧光素酶活性可以实现在活体动物的各种生理条件下无创实时观察人类 $p16^{Ink4a}$ 基因的表达。尽管先前的报道在年轻人类和啮齿动物的正常组织中几乎检测不到 $p16^{Ink4a}$ 表达, 但生物发光成像 (bioluminescence imaging) 可以在 6 周小鼠的宫颈、胸部、中央腹部和睾丸中检测到 $p16^{Luc}$ 的表达。研究发现致癌 Ras 信号通过降低 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 水平作为体内 DNA 损伤反应 (DNA-damage response, DDR) 促进 $p16^{Ink4a}$ 基因表达。此项研究同时发现该途径在 $p53$ 功能丧失的情况下加速 $p16^{Ink4a}$ 基因表达, 表明 $p53$ 和 $p16^{Ink4a}$ 肿瘤抑制因子之间存在调节反馈回路。这种调节回路可能在 $p53$ 失活后引发 $p16^{Ink4a}$ 的备用肿瘤抑制作用, 有助于理解这些关键的肿瘤抑制基因是如何在体内相互联系^[11]。

Burd 等人通过将萤火虫荧光素酶 cDNA 与 SV40 多腺苷酸化信号结合, 靶向到内源性 $p16^{Ink4a}$ 基因座的翻译起始位点, 构建了鼠源 $p16^{Luc}$ 报告小鼠模型。该模型能够准确地反映 $p16^{Ink4a}$ 基因的表达情况^[12]。与先前报道的由 $p16^{Ink4a}$ 启动子片段驱动的转基因报告小鼠^[10, 13] 不同, 研究人员采用靶向敲入策略, 将顺式调控元件着丝粒保留在 $p16^{Ink4a}$ 开放阅读框上。终身发光评估显示随着年龄的增长, $p16^{+Luc}$ 小鼠的荧光信号呈指数级增长, 然而在同一批次饲养的同基因型小鼠中存在较大的异质性。此外, 随着年龄的增长, $p16^{Ink4a}$ 的表达并不能预测癌症的发展, 这表明衰老细胞的积累并非导致癌症相关死亡的主要因素。在 14 种肿瘤模型中的实验结果显示, 早期肿瘤事件可以局部激活 $p16^{Luc}$ 的表达, 从而使肿瘤可视化的灵敏度超过其他成像模式。此外, $p16^{Ink4a}$ 在早期肿瘤和周围基质细胞中被激活,

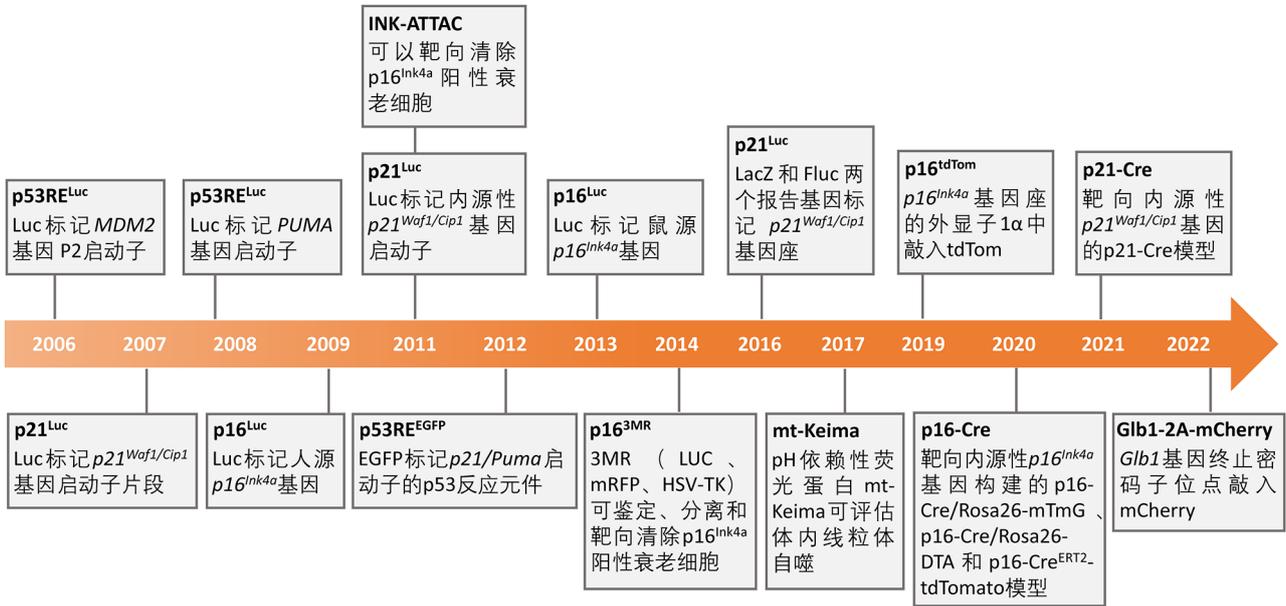


图 1. 衰老报告小鼠模型的发展时间轴
Fig. 1. Timeline of aging reporting mice.

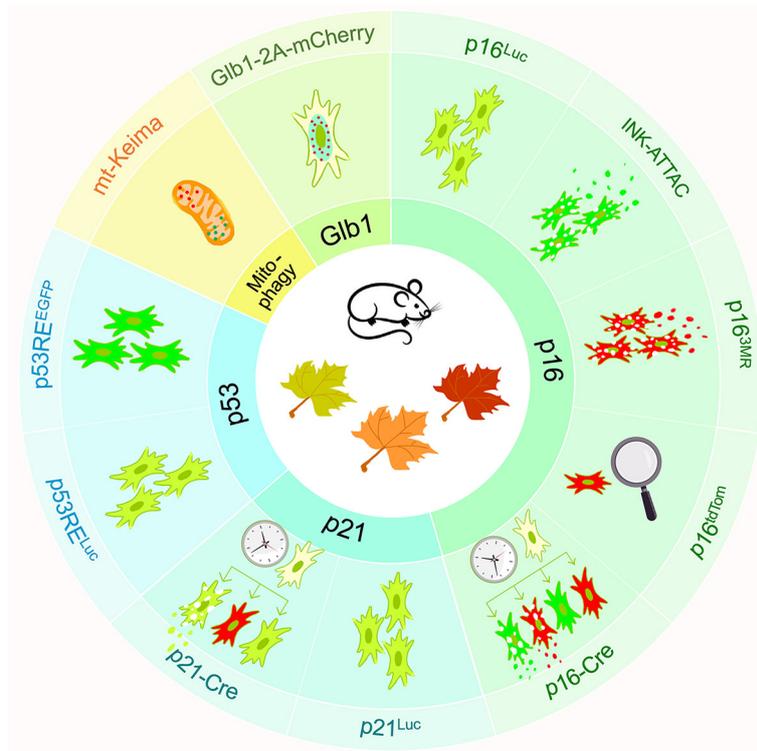


图 2. 实时监测衰老报告小鼠模型
Fig. 2. Live-imaging aging reporter mice.

这表明 *p16^{Ink4a}* 的激活可能是新发癌症的共同特征，使 *p16^{Luc}* 等位基因成为敏感且无偏差的肿瘤转化报告基因。总之，该模型在小鼠系统中是监测衰老和

肿瘤发生的最早步骤。

Sorrentino 等人进一步利用 *p16^{Luc}* 报告小鼠来鉴定环境中促进衰老的物质^[14]。通过将 *p16^{Luc}* 报告

表1. 实时监测衰老报告小鼠模型总结
Table 1. Summary of live-imaging aging reporter mice

衰老生物标志物	衰老报告小鼠	构建方法及应用	作者及构建年份	参考文献
p16	p16 ^{Luc}	用萤火虫荧光素酶标记的人源 <i>p16^{Ink4a}</i> 基因	Yamakoshi <i>et al.</i> , 2009	[10]
		用萤火虫荧光素酶标记鼠源 <i>p16^{Ink4a}</i> 基因	Burd <i>et al.</i> , 2013	[12]
		(应用)用p16 ^{Luc} 报告小鼠鉴定环境中会促进衰老的物质	Sorrentino <i>et al.</i> , 2014	[14]
		(应用)构建p16 ^{Cre/Luc} ; <i>Ercc1^{-Δ}</i> 早衰报告小鼠	Yousefzadeh <i>et al.</i> , 2020	[15]
		构建靶向清除p16 ^{Ink4a} 阳性衰老细胞的INK-ATTAC报告小鼠并评估衰老细胞在早衰中的作用	Baker <i>et al.</i> , 2011	[13]
		(应用)用INK-ATTAC模型评估衰老细胞在自然衰老中对寿命和组织器官的作用	Baker <i>et al.</i> , 2016	[16]
		(应用)用INK-ATTAC模型评估衰老细胞在特发性肺纤维化中的作用	Schafer <i>et al.</i> , 2017	[18]
		(应用)用INK-ATTAC模型评估衰老细胞在肝脂肪变性中的作用	Ogrodnik <i>et al.</i> , 2017	[19]
		(应用)构建PS19;ATTAC模型评估衰老细胞在神经退行性疾病中的作用	Bussian <i>et al.</i> , 2018	[17]
		(应用)用INK-ATTAC模型评估衰老细胞在心脏再生受损中的作用	Lewis-McDougall <i>et al.</i> , 2019	[20]
p16 ^{3MR}	p16 ^{3MR}	用3MR (LUC, mRFP, HSV-TK)构建可鉴定、分离和靶向清除p16 ^{Ink4a} 阳性衰老细胞的p16 ^{3MR} 报告小鼠	Demaria <i>et al.</i> , 2014	[21]
		(应用)构建Ldlr ^{-/-} ;3MR小鼠评估衰老细胞在动脉粥样硬化中的作用	Childs <i>et al.</i> , 2016	[22]
		(应用)用p16 ^{3MR} 模型评估衰老细胞在骨关节炎中的作用	Jeon <i>et al.</i> , 2017	[23]
		在p16 ^{Ink4a} 基因座的外显子1 α 中敲入tdTom	Liu <i>et al.</i> , 2019	[24]
p16-Cre	p16-Cre	(应用)用p16 ^{tdTom} 报告小鼠构建可评估Senolytics治疗的软骨外植体模型	Sessions <i>et al.</i> , 2019	[25]
		靶向内源性p16 ^{Ink4a} 基因构建标记p16细胞的p16-Cre/Rosa26-mTmG和清除p16细胞的p16-Cre/DTA模型小鼠	Grosse <i>et al.</i> , 2020	[26]
p21	p21 ^{Luc}	构建p16-Cre ^{ERT2} -tdTomato报告模型并进行单细胞转录组学分析	Omori <i>et al.</i> , 2020	[27]
		用萤火虫荧光素酶标记p21 ^{Hgf/Cip1} 基因启动子片段	Ohtani <i>et al.</i> , 2007	[31]
		用萤火虫荧光素酶标记内源性p21 ^{Hgf/Cip1} 基因启动子	Tinkum <i>et al.</i> , 2011	[32]
		用LacZ和Fluc两个报告基因标记p21 ^{Hgf/Cip1} 基因座	McMahon <i>et al.</i> , 2016	[33]
p21-Cre	p21-Cre	靶向内源性p21 ^{Hgf/Cip1} 基因的p21-Cre小鼠与不同floxed小鼠杂交实现体内监测、调控或清除p21 ^{high} 细胞	Wang <i>et al.</i> , 2021	[34]
		用萤火虫荧光素酶标记MDM2基因 P2启动子	Hamstra <i>et al.</i> , 2006	[40]
p53	p53RE ^{Luc}	用萤火虫荧光素酶标记PUMA基因启动子	Briat <i>et al.</i> , 2008	[41]
		用EGFP标记p21/Puma启动子的p53反应元件	Goh <i>et al.</i> , 2012	[42]
Mitophagy	mt-Keima	pH依赖性荧光蛋白mt-Keima可评估体内线粒体自噬	Sun <i>et al.</i> , 2017	[43]
Glb1	Glb1-2A-mCherry	在Glb1基因终止密码子位点敲入mCherry监测系统衰老	Sun <i>et al.</i> , 2022	[45]

小鼠暴露于候选促衰老物质, 包括砷、高脂饮食、紫外线和香烟烟雾, 并对小鼠进行连续成像以监测这些物质对衰老的诱导, 发现高脂饮食不会加速 $p16^{Ink4a}$ 的表达, 而砷会适度增加, 紫外线和香烟烟雾会显著增加 $p16^{Ink4a}$ 介导的衰老的激活。这项工作作为研究哺乳动物衰老提供了一个可视化毒理学平台, 并发现直接损伤 DNA 的物质会促进衰老。该研究系统存在一定的局限性: 首先, 尽管荧光素酶成像比光学方法更灵敏, 但 $p16^{Luc}$ 等位基因在检测深层器官或罕见细胞亚型中的衰老方面可能不敏感。因此, 尽管没有观察到高脂饮食对全身荧光素酶成像的影响, 但高脂饮食可能激活一些重要细胞 (如胰岛 β 细胞和血管细胞) 的衰老, 但尚未达到该系统可检测到的水平。其次, 虽然研究发现促衰老物质诱导的 $p16^{Ink4a}$ 表达在衰老细胞附近空间发生, 但尚未明确表达 $p16^{Ink4a}$ 细胞在所有情况下都是衰老的。最后, $p16^{Luc}$ 等位基因不能用于识别 $p16^{Ink4a}$ 非依赖性促衰老物质或衰老过程。

ERCC-XPF 是一种保护核基因组的多种 DNA 修复机制所需的 DNA 修复内切酶。这种酶表达减少的人类或小鼠会因为自发的遗传毒性应激水平的增加而迅速衰老。该现象是否对应衰老细胞水平的增加? Yousefzadeh 等人为了在 $Ercc1^{-/-}$ 背景下长期检测 $p16^{Ink4a}$ 的表达, 将 $Ercc1^{-/-}$ 早衰小鼠和 $p16^{Luc}$ 报告小鼠杂交构建了 $p16^{+/Luc};Ercc1^{-/-}$ 早衰报告小鼠, 发现生物发光随着年龄的增长稳步上升, 尤其在肺、胸腺和胰腺, 这些数据揭示了加速衰老小鼠的衰老发生位置, 以及不同组织间衰老的相对程度^[15]。该研究还发现雄性小鼠的衰老程度更高, 直到生命结束。此外, 该研究通过比较 $Ercc1^{-/-}$ 早衰小鼠和衰老 WT 小鼠之间的相似性得出结论, 即 DNA 修复缺陷小鼠能以快 6 倍的速度准确模拟衰老细胞的年龄相关积累。

1.2 INK-ATTAC 报告小鼠

为了研究衰老细胞在衰老和年龄相关疾病中的作用以及清除衰老细胞是否有益健康, Baker 等人设计了一种可以清除小鼠 $p16^{Ink4a}$ 阳性衰老细胞的转基因策略^[13]。他们通过将 *Fabp4* 启动子替换成 $p16^{Ink4a}$ 启动子中的片段, 并添加了一个内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 和编码增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 用于检测和收集 $p16^{Ink4a}$ 阳性衰老细胞, 从而构建了

INK-ATTAC 报告小鼠。在 BubR1 早衰背景下, 该小鼠在给药后可以清除 $p16^{Ink4a}$ 阳性衰老细胞。Baker 等人进一步用 INK-ATTAC 模型对小鼠进行药物干预实验, 每周两次注射合成药物 AP20187, 诱导 INK-ATTAC 小鼠体内 $p16^{Ink4a}$ 阳性细胞发生凋亡^[16]。结果显示, 与对照组相比, AP20187 治疗延长了两种不同遗传背景下的雄性和雌性小鼠的中位寿命。此外, 清除 $p16^{Ink4a}$ 阳性细胞还延缓了肿瘤发生, 并在没有明显副作用的情况下减轻了肾脏、心脏和脂肪的年龄相关性病变。这些结果表明, 成年时期积累的 $p16^{Ink4a}$ 阳性细胞对寿命产生负面影响, 并促使一些器官发生与年龄相关的改变, 而清除 $p16^{Ink4a}$ 阳性细胞可能会延长健康寿命。

为了研究衰老细胞在神经退行性疾病发展中的作用, Bussian 等人将 tau 依赖性神经退行性疾病模型 MAPT^{P301S}PS19 小鼠与 INK-ATTAC 报告小鼠杂交, 获得 PS19;ATTAC 小鼠, 通过给予 AP20187 药物来清除 $p16^{Ink4a}$ 阳性衰老细胞^[17]。研究发现, 清除衰老细胞可以防止胶质增生、可溶性和不溶性 tau 的过度磷酸化导致的神经元纤维缠结沉积, 以及皮层和海马神经元的退化, 从而保持认知功能。这一研究结果表明, 衰老细胞在 tau 介导的神经退行性疾病的发生和发展中发挥着作用。靶向衰老细胞可能为治疗这类疾病提供新途径。

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种致命性疾病, 其特征是间质重塑, 导致肺功能受损。研究发现, 在 IPF 肺组织中可检测到细胞衰老标志物, 并且清除衰老细胞可以恢复老龄小鼠的肺部健康。为了研究衰老细胞在 IPF 中的作用, Schafer 等人构建了博来霉素诱导的肺纤维化 INK-ATTAC 小鼠模型^[18]。他们发现, 通过清除衰老细胞早期干预该模型小鼠, 可以改善肺功能和身体健康, 但肺纤维化没有明显改变。这提示纤维化肺病在一定程度上由衰老细胞介导, 靶向衰老细胞可能能够改善肺部健康和功能。

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发病率随着年龄的增长而增加。Ogrodnik 等人发现, 衰老细胞的积累会促进肝脏脂肪沉积和变性, 并且肝脏脂肪沉积与肝细胞衰老标志物之间存在密切相关性。通过使用 INK-ATTAC 小鼠的自杀基因介导清除 $p16^{Ink4a}$ 阳性衰老细胞, 以及使用选择性消除衰老细胞的药物 (Senolytics) 即达沙替尼和槲皮素组合 (D+Q) 清除衰老细胞, 研究

人员发现这些方法都可以减少老龄、肥胖和糖尿病小鼠的肝脂肪变性。机制上可能是衰老细胞中的线粒体失去了有效代谢脂肪酸的能力。该研究结果表明, 细胞衰老会导致肝脏脂肪变性, 并且清除衰老细胞可能是减少肝脂肪变性的新策略^[19]。

衰老会导致衰老细胞增多, 并与组织特异性干/祖细胞潜能下降有关。Lewis-Mcdougall 等人对从心血管疾病患者身上分离的心脏祖细胞 (cardiac progenitor cells, CPCs) 进行分析, 发现在老年患者中, 超过一半的 CPCs 是衰老的。这些衰老的 CPCs 在功能和增殖能力上明显受到限制, 与年龄相关的 CPCs 衰老可能是心力衰竭发展的一个重要因素^[20]。进一步的研究显示, 清除心脏中的 $p16^{Ink4a}$ 阳性衰老细胞可以改善老年小鼠的心功能, 恢复 CPCs 的功能和增殖能力, 并且保护心脏免受肥厚、纤维化和心脏病变的影响。这些发现表明, 靶向清除衰老细胞可能是治疗心血管疾病的一种新策略。

总的来说, INK-ATTAC 小鼠模型的研究揭示了衰老细胞在不同年龄相关疾病中的重要作用, 如神经退行性疾病、肺纤维化、NAFLD 和心血管疾病。清除衰老细胞可能成为治疗这些疾病的新途径, 改善器官功能, 并延长健康寿命。然而, 需要进一步研究来验证这些发现, 并探索更有效的方法来靶向和清除衰老细胞。

1.3 $p16^{3MR}$ 报告小鼠

为了解复杂的衰老表型在体内的生理作用, Demaria 等人利用 3MR (trimodality reporter) 融合蛋白 (包含合成的 Renilla 荧光素酶 LUC、单体红色荧光蛋白 mRFP 和截短的单链疱疹病毒 1 型胸苷激酶 HSV-TK 的功能结构域), 以 $p16^{Ink4a}$ 启动子驱动 3MR 表达, 构建了 $p16^{3MR}$ 报告模型^[21]。在该模型中, 通过 LUC 发光可以检测出 $p16^{3MR}$ 阳性的细胞, mRFP 红色荧光可以从组织中分选出这类细胞, HSV-TK 可以将更昔洛韦 (ganciclovir, GCV) 转化为有毒的 DNA 链终止子, 破坏线粒体 DNA, 导致 HSV-TK 表达即 $p16^{Ink4a}$ 阳性表达的衰老细胞凋亡。研究发现衰老的成纤维细胞和内皮细胞很早就出现在皮肤伤口处, 通过分泌血小板衍生生长因子 AA [platelet derived growth factor AA, PDGF-AA, 一种衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 因子] 诱导肌成纤维细胞分化, 加速伤口闭合。与野生型小鼠相比, 不管是 GCV 处理的 $p16^{3MR}$ 小鼠还是 $p16/p21$ 双敲小鼠的伤口在

创伤后显示出明显更少的肌成纤维细胞, 伤口愈合能力减弱, 而用重组 PDGF-AA 局部治疗无衰老细胞的伤口可以挽救伤口闭合延迟和肌成纤维细胞分化不足, 提示 SASP 在组织修复中具有有益作用, 并有助于解释 SASP 参与其中的原因。

为了研究衰老细胞在动脉粥样硬化过程中的作用, Childs 等人将易患动脉粥样硬化的 $Ldlr^{-/-}$ (低密度脂蛋白受体缺陷型) 小鼠和 $p16^{3MR}$ 报告小鼠杂交, 构建了 $Ldlr^{-/-};3MR$ 小鼠, 通过 GCV 处理清除衰老细胞后发现这些衰老细胞在整个疾病发病机制中有害^[22]。研究发现具有衰老标志物的泡沫状巨噬细胞在动脉粥样硬化发作时积聚在内皮下空间, 通过促使关键的致动脉粥样硬化炎症细胞因子和趋化因子的表达增加来驱动疾病发生。在晚期病变中衰老细胞又通过增加金属蛋白酶促进斑块不稳定性。这些结果表明衰老细胞可能是动脉粥样硬化形成和成熟的关键驱动因素, 选择性清除这些衰老细胞有助于动脉粥样硬化的治疗。

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨退化导致疼痛和身体残疾为特征的慢性疾病, 衰老和创伤是 OA 发展的危险因素。尽管在接受关节置换手术的患者们的软骨组织中发现了衰老的软骨细胞, 但这些衰老细胞在疾病发病机制中的作用尚不清楚。为了验证衰老细胞是否在 OA 中起致病作用, Jeon 等人利用 $p16^{3MR}$ 报告小鼠构建了损伤型 OA 模型, 可以在前交叉韧带横断 (anterior cruciate ligament transection, ACLT) 术后追踪和选择性清除衰老细胞^[23]。研究发现 ACLT 后衰老细胞在关节软骨和滑膜中积累, 给予 GCV 处理后可以选择性清除衰老细胞, 减缓创伤后 OA 的发展, 减轻疼痛并促进软骨发育, 提示靶向衰老细胞可以作为治疗退行性关节疾病的新靶点。

1.4 $p16^{tdTom}$ 报告小鼠

尽管研究发现 $p16^{Luc}$ 报告小鼠在衰老、肿瘤、炎症和受伤情况下体内 $p16^{Ink4a}$ 启动子活性增加, 但在体内检测和分离 $p16^{Ink4a}$ 启动子激活的单个细胞中仍有一定的难度。这主要是由于活体成像技术在分辨率和深度透射方面的局限性, 难以准确监测细胞层面的信号。为了研究单个 $p16^{Ink4a}$ 激活的细胞, Liu 等人通过在 $p16^{Ink4a}$ 基因座的外显子 1 α 中敲入串联二聚体 Tomato (tandem-dimer Tomato, tdTom), 构建了一个基于荧光的 $p16^{tdTom}$ 报告等位基因, 利用该等位基因量化了衰老或炎症组中的 $tdTom^+$ 细

胞, 并分离出这些细胞进行功能和基因表达方面的表征^[24]。研究发现该报告基因的表达与 $p16^{Ink4a}$ 启动子激活的相关性比 $p16^{Ink4a}$ 转录物丰度更好。在成年 $p16^{tdTom}$ 报告小鼠的许多组织中可以很容易地检测到 $tdTom^+$ 细胞, 并且这些细胞随着年龄的增长而增加。在 $p16^{tdTom}$ 报告小鼠的腹膜炎模型中, 发现 $tdTom^+$ 巨噬细胞表现出一些衰老特征, 包括增殖减少、衰老相关的 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 激活、以及 SASP 相关因子的表达增加。这些结果表明携带 $p16^{Ink4a}$ 启动子激活的细胞在体内随着衰老和炎症而积累, 并表现出衰老的特征。

OA 的一种新兴治疗策略是通过启动细胞凋亡来选择性地消除衰老细胞。Session 等人将 $p16^{Ink4a}$ 的表达作为衰老的生物标志物, 应用 $p16^{tdTom}$ 报告小鼠构建了诱导衰老和清除衰老的软骨外植体模型^[25]。由于生长因子对外植体的刺激可以在 mRNA 和蛋白水平上增加 $p16^{Ink4a}$ 的表达, 将该培养体系应用于 $p16^{tdTom}$ 报告小鼠的软骨外植体后, 通过流式细胞术对 $tdTomato$ 荧光的定量分析可分选出 $p16$ 高表达软骨细胞。与 $p16^{Ink4a}$ 低表达细胞相比, $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞表现出更高的 SA- β -gal 激活和 SASP 基因表达增加。该研究还利用抗衰老化合物 Navitoclax (ABT-263) 评估软骨细胞外基质内的衰老细胞清除潜力, 发现 Navitoclax 可以降低 $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞比例, 并增加裂解的 caspase-3, 证实了细胞凋亡活性。这项研究提出的可用于测试诱导和清除衰老软骨细胞的软骨外植体模型, 将有助于 OA 的 Senolytics 治疗研究。

1.5 $p16$ -Cre系列报告小鼠

为了解对部分 $p16^{Ink4a}$ 基因组序列构建的报告模型是否完全模拟内源性 $p16^{Ink4a}$ 基因表达的担忧, 尤其是在衰老过程中, Grosse 等人采取了一项创新的方法。他们在内源性 $p16^{Ink4a}$ 基因的最后一个外显子中整合了靶向序列盒, 然后将 $p16$ -Cre 基因敲入小鼠模型与两个报告系列进行杂交。通过这种策略, 研究人员成功获得了两个模型小鼠, 分别是 $p16$ -Cre/Rosa26-mTmG (可以连续标记 $p16^{Ink4a}$ 表达细胞) 和 $p16$ -Cre/Rosa26-DTA (可以连续清除 $p16^{Ink4a}$ 表达细胞)。这些模型可以帮助研究人员更加准确地研究和追踪 $p16^{Ink4a}$ 基因的表达和功能, 特别是在衰老过程中^[26]。该研究发现年龄诱导的 $p16^{Ink4a}$ 高表达衰老是一个缓慢过程, 在小鼠 10~12 月龄左

右显现, 且大多数 $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞主要是肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSECs), 而巨噬细胞和脂肪细胞较少。因此, $p16^{Ink4a}$ 高表达的衰老细胞的持续或急性清除会破坏血液组织屏障, 进而导致肝脏和血管周围组织纤维化和健康恶化, 且衰老的 LSECs 在清除后不会被取代, 说明其在衰老的生物体中具有重要的结构和功能作用。反过来, 延缓衰老或替换衰老的 LSECs 可能是减缓衰老的有效措施。

Omori 等人为了在单细胞水平上分析衰老细胞的体内动力学及其转录组学, 通过将 Cre^{ERT2} 插入内源性 $Ink4a$ 基因座第一个外显子并将这些小鼠与 Rosa26-CAG-lsl-td Tomato 小鼠杂交构建了 $p16$ -Cre^{ERT2}-tdTomato 报告模型^[27]。研究发现在所有器官中都可以检测到 $tdTomato$ 阳性的 $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞, 且这些细胞随年龄增长而富集。肝脏和肾脏的单细胞转录组学显示, $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞存在于各种细胞类型中, 尽管在肝脏内皮细胞和肾近端和远端小管上皮细胞中占主导地位, 但这些细胞具有不同的衰老相关表型。此外, 清除 $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞可以改善 NAFLD 相关的肝脂质沉积和免疫细胞浸润。该衰老报告模型和单细胞分析为揭示未知的体内衰老功能提供了丰富资源。

2 $p21^{Waf1/Cip1}$ 报告小鼠

$p21^{Waf1/Cip1}$ 是细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A) 基因的产物, 在小鼠体内主要通过 $p19^{Arf}/p53/p21^{Waf1/Cip1}$ 途径调控细胞周期进程^[28]。作为最为成熟和公认的 p53 靶基因之一, CDKN1A/ $p21^{Waf1/Cip1}$ 已经被证明在复制性衰老期间表达增加^[29, 30]。因此 $p21^{Waf1/Cip1}$ 作为衰老的生物标志物在衰老研究中被广泛使用。以下是近年来构建的 $p21^{Waf1/Cip1}$ 报告小鼠模型及应用 (表 1)。

2.1 $p21^{Luc}$ 报告小鼠

为了解 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因表达在体内的作用, Ohtani 等人构建了在 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因启动子控制下表达萤火虫荧光素酶的转基因小鼠 ($p21$ - p -luc), 可以在体内监测内源性 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因的表达^[31]。通过对小鼠整个生命过程中 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因表达的持续监测和量化, 揭示了 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因表达在衰老过程中的动态变化。 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因表达的上调与细胞衰老有关, 而细胞衰老是由多种应激 (例如 DNA 损伤

或致癌基因)引起的稳定的细胞周期停滞状态。研究发现诱导该报告小鼠发生皮肤癌后, $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因表达水平在良性皮肤乳头状瘤中显著升高, 表明 $p21^{Waf1/Cip1}$ 在皮肤肿瘤形成过程中具有预防作用, 而 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因的破坏会增加乳头状瘤形成或恶性转化。

为了研究基础和各种应激条件下内源性 $p21^{Waf1/Cip1}$ 启动子活性, Tinkum 等人构建了在 *Cdkn1a* 基因位点内的内源性 $p21^{Waf1/Cip1}$ 启动子控制下表达萤火虫荧光素酶 (FLuc) 的 $p21$ -FLuc 报告小鼠^[32]。该报告小鼠与先前报道的有设计策略缺陷的 $p21$ -*p-luc* 转基因小鼠不一样, 因为前者用了 $p21$ 启动子的片段 (2.5 kb) 驱动报告基因表达, 会丢失调节 $p21^{Waf1/Cip1}$ 启动子活性的关键信号。研究发现不管在基础条件下还是基因毒性应激条件下, $p21$ -FLuc 报告小鼠的 Fluc 的表达都可以准确地报告内源性 $p21^{Waf1/Cip1}$ 的表达, 且光子通量与 mRNA 丰度相关。生物发光成像证实体内应对电离辐射时需要 $p53$ 激活 $p21^{Waf1/Cip1}$ 启动子。此外, 弱光生物发光成像还发现 $p21^{Waf1/Cip1}$ 会在单个器官的特定区域表达。该模型有助于对 $p53$ 依赖性和非依赖性应激反应进行活体成像研究。

许多靶向 DNA 损伤反应的药物可能会增加对正常组织的毒性。为了构建临床前安全模型来测量该类药物对体内 DNA 的损伤, McMahon 等人在 DNA 损伤诱导的 $p21^{Waf1/Cip1}$ 基因座同时插入 β -半乳糖苷酶 (LacZ) 和萤火虫荧光素酶 (Fluc), 构建了 $p21$ -LacZ-Fluc 报告小鼠^[33]。原位 β -gal 染色有助于在单细胞分辨率下对多个器官和组织中的 $p21^{Waf1/Cip1}$ 表达进行高保真度反映, 而荧光素酶报告基因可以通过生物发光成像反映 $p21^{Waf1/Cip1}$ 表达情况, 可以确保该报告小鼠能够以高保真度和高分辨率监测小鼠 $p21^{Waf1/Cip1}$ 的表达和 DNA 损伤情况。该报告模型在评估肿瘤新型治疗方案安全性方面具有重大意义。

2.2 $p21$ -Cre 报告小鼠

衰老细胞与衰老、肥胖以及其他病理情况下的各种组织功能障碍相关, 然而目前大多数衰老报告小鼠仅靶向 $p16^{Ink4a}$ 高表达细胞, 因此 Wang 等人构建了一个包含 $p21^{Waf1/Cip1}$ 启动子驱动的诱导性 Cre 的 $p21$ -Cre 小鼠模型, 可以检测 $p21^{Waf1/Cip1}$ 高表达 ($p21^{high}$) 的细胞, 这群细胞具有衰老细胞经典特征但从未被探索过^[34]。通过将 $p21$ -Cre 小鼠和不同 floxed 小鼠杂交, 构建了 $p21$ -Cre/+;LUC/(PL)、

$p21$ -Cre/+;tdTomato/(PT) 和 $p21$ -Cre/+;LUC/DTA(PLD) 小鼠, 可以实现在体内监测、分选、成像、清除或调节 $p21^{high}$ 细胞。研究发现 $p21^{high}$ 细胞可以被各种条件诱导, 而且在老龄小鼠 (23 月龄) 的不同组织中 $p21^{high}$ 细胞占比差异较大, 间歇性清除 $p21^{high}$ 细胞可以改善老龄小鼠的身体功能, 提示 $p21$ -Cre 小鼠模型有助于在体研究 $p21^{high}$ 细胞在自然衰老和各种衰老相关疾病中的作用和机制。

3 $p53$ 报告小鼠

$p53$ 作为一种常见的抑癌蛋白, 在多数肿瘤中呈现失活状态, 且随着细胞衰老其表达上调^[35]。研究发现衰老的启动和维持依赖 $p53$ ^[36-38], $p53$ 通过调节细胞衰老抑制肿瘤生长的^[39]。 $p53$ 作为熟知的转录因子和肿瘤抑制剂在细胞衰老和肿瘤治疗方面具有重要作用, 因此构建 $p53$ 报告小鼠实现对 $p53$ 基因体内表达的可视化, 在衰老及肿瘤相关研究中具有重大意义 (表 1)。

3.1 $p53RE^{Luc}$ 报告小鼠

为了研究动物体内 $p53$ 转录活性, Hamstra 等人构建了在 *MDM2* (murine double minutes 2, 一种典型的 $p53$ 依赖性转录物) 基因 P2 启动子控制下表达萤火虫荧光素酶的转基因小鼠 (*MDM2*-Luc), 可以无创监测动物体内 $p53$ 功能^[40]。小鼠在电离辐射后的生物发光活性具有辐射剂量、时间和 $p53$ 依赖性。研究发现 $p53$ 及其激活形式的表达和 $p53$ 靶基因 (*MDM2* 和 $p21^{Waf1/Cip1}$) 的表达都与生物发光活性相关, 提示该报告小鼠可以增强对 $p53$ 在体内转录作用的理解。

尽管通过监测 $p53$ 转录活性可以识别药物诱导引起的基因毒性损伤, 但这种方法仅适用于体外实验。Briat 等人构建了在 $p53$ 上调凋亡调节因子 ($p53$ up-regulated modulator of apoptosis, PUMA, PUMA 蛋白参与 $p53$ 依赖性细胞凋亡并受 $p53$ 严格调控) 基因启动子控制下表达萤火虫荧光素酶的转基因小鼠 ($p53RE^{Luc}$)^[41]。用多柔比星作为已知的毒性药物来验证该模型, 体内外实验充分验证了荧光素酶的活性具有 $p53$ 特异性和依赖性, 且该模型可以在体内监测化学诱导性 DNA 损伤下 $p53$ 的激活。经多柔比星治疗后, 观察到雄性小鼠下腹部区域的荧光素酶信号显著增加, 而雌性小鼠仅在口腔部位有较弱荧光素酶活性。因此, 该转基因小鼠可在器官和细胞水平上预测、描绘和表征化合物的毒性, 并有

助于开发新的治疗药物。

3.2 p53RE^{EGFP} 报告小鼠

p53 转录因子通过参与调节诱导细胞周期停滞、衰老或凋亡的基因表达程序阻止肿瘤发生，而选择哪一种命运的机制尚不清楚。p21^{Waf1/Cip1} 和 Puma 是 p53 靶基因，是决定这些细胞命运的关键执行者。其中 p21^{Waf1/Cip1} 介导细胞周期停滞和衰老，而 Puma 参与 p53 介导的细胞凋亡。为了解 p53 靶基因的选择以实现其在癌症治疗中的最佳操作，Goh 等人构建了两个靶基因报告小鼠 p21_{p53RE}-EGFP 和 Puma_{p53RE}-EGFP，其中 EGFP 的表达受 p21^{Waf1/Cip1} 或 Puma 启动子的 p53 反应元件控制，分别诱导细胞周期停滞、衰老或细胞凋亡^[42]。研究发现 p53 反应元件本身的序列足以影响 p53 靶基因的选择。通过 p53 诱导细胞周期停滞、衰老或凋亡是药物开发中常用的方法，该报告小鼠可以在体内外监测 p53 活性，并可以检测在不同反应元件、组织类型和刺激下 p53 活性的变化，提示了其在临床前肿瘤、衰老以及相关药物研究中的可行性。

4 mt-Keima 报告小鼠

线粒体自噬是一种选择性清除受损、衰老和功能异常的线粒体的细胞过程。线粒体自噬缺陷被认为有助于正常衰老和年龄相关疾病（例如神经退行性疾病、心血管疾病等）的发生^[43]。为了更方便地评估体内线粒体自噬，Sun 等人构建了靶向线粒体在 *Hipp11* 基因座插入表达 pH 依赖性荧光蛋白 mt-Keima 的报告小鼠^[44]。Keima 是一种对 pH 敏感的双激发珊瑚衍生荧光蛋白，同时对溶酶体蛋白酶具有抗性。该研究发现 mt-Keima 报告小鼠各组织之间的线粒体自噬基线存在显著差异，并进一步检测了在饮食、供氧、亨廷顿舞蹈症转基因表达、大白噬缺乏、线粒体突变负荷增加、肿瘤转移和正常衰老条件下线粒体自噬的改变，提示该报告小鼠在评估正常和患病状态方面具有应用潜能（表 1）。

5 Glb1-2A-mCherry 报告小鼠

SA-β-gal 是一种在复制或诱导性衰老的培养细胞中，在 pH6.0 下可检测到，但在增殖细胞中不存在的 β-半乳糖苷酶。由于分析方法简单，对衰老细胞具有明显的特异性，SA-β-gal 活性一直是最广泛使用的衰老生物标志物。研究发现衰老过程中 SA-β-gal 的活性实际上是由溶酶体 β-半乳糖苷酶基

因 (*Glb1*) 编码，且在衰老过程中溶酶体 β-半乳糖苷酶水平增加。Sun 等人用细胞衰老特异性标志物以及衰老检测金标准的 SA-β-gal 活性来源的 *Glb1* 基因，构建了 Glb1-2A-mCherry (GAC) 衰老报告模型^[45]。研究发现在小鼠中年时期，约 20% 比例的小鼠具有较高 GAC 荧光信号，有意思的是，这群小鼠出现心脏肥大、心功能异常，且寿命显著缩短，提示组织 / 器官老化在寿命中的重要作用。该报告小鼠能在衰老早期（即中年时期）实时监测系统衰老，有助于发现衰老早期的分子标志物，进而更有效地预防和治疗衰老相关疾病。同时，该报告小鼠也有助于深入解析系统衰老机制以及抗衰老药物的研发（表 1）。

6 结语与展望

p16^{Ink4a} 等位基因已经成为衰老研究领域不可或缺的部分。p16^{Luc} 报告小鼠已经证实随着年龄的增长或外界压力促使衰老细胞的聚集与肿瘤的发生和衰老之间存在密切关系。鉴于对衰老细胞的分析欠缺，另外一种报告小鼠 p16^{tdTom} 通过荧光实现可视性提取衰老细胞，可以进行分类和衰老机制研究，并靶向清除衰老细胞。INK-ATTAC 报告小鼠通过消除 p16^{Ink4a} 阳性表达细胞可选择性延缓组织衰老，证明衰老细胞的消极作用。p16^{3MR} 报告小鼠证明高表达 p16^{Ink4a} 衰老细胞在伤口愈合中的积极作用，同时清除衰老细胞可改善年龄相关疾病（例如动脉粥样硬化和骨关节炎）。p16^{tdTom} 报告小鼠通过流式分选出 p16^{Ink4a} 高表达和低表达细胞并分析这类细胞的衰老表型。mt-Keima 报告小鼠表明与年龄相关的线粒体功能下降可能与自噬能力下降有关。值得注意的是，清除衰老细胞的优点是可以促进组织再生和修复，减少衰老相关疾病的发生。然而，过度清除衰老细胞可能会导致细胞和组织功能丧失，进而影响整个生理系统的平衡和稳定。因此，需要审慎权衡治疗效果和潜在的副作用，并寻求更精确的方法来清除衰老细胞。

尽管 p19^{Arf}/p53/p21^{Waf1/Cip1} 通路相关的报告小鼠在衰老方面的研究报道较少，但在肿瘤及其他领域应用广泛，需进一步研究其在衰老研究中的应用。目前，实时监测衰老报告小鼠研究的瓶颈是缺乏特异性衰老标志物，常用的衰老生物标志物虽然可以在一定程度上反映衰老，但缺乏敏感性和特异性，因此需要联合多种生物标志物反映衰老。值得注意

的是，靶向衰老生物标志物 SA- β -gal 活性来源的 *Glib1* 基因构建的实时监测衰老报告小鼠研究处于初始阶段，值得进一步探索。我们期待在未来更加深入地了解衰老，发现更敏感、更特异的衰老生物标志物，构建出更高效的实时监测衰老报告小鼠用于衰老、衰老相关疾病及新型抗衰老药物的研究。

参考文献

- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 2013; 152(2): 243–278.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 685–705.
- Greider CW. Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr Biol* 1998; 8(5): R178–R181.
- Wu Z, Shi Y, Lu M, Song M, Yu Z, Wang J, Wang S, Ren J, Yang YG, Liu GH, Zhang W, Ci W, Qu J. METTL3 counteracts premature aging via m6A-dependent stabilization of MIS12 mRNA. *Nucleic Acids Res* 2020; 48(19): 11083–11096.
- Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 2000; 35(8): 927–945.
- Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 2013; 155(5): 1104–1118.
- Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 2013; 155(5): 1119–1130.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24(22): 2463–2479.
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 2004; 51(3–4): 146–153.
- Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E. Real-time *in vivo* imaging of p16^{INK4a} reveals cross talk with p53. *J Cell Biol* 2009; 186(3): 393–407.
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. Real-time *in vivo* imaging of p16 gene expression: a new approach to study senescence stress signaling in living animals. *Cell Div* 2010; 5: 1.
- Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, Darr DB, Krishnamurthy J, Deal AM, Bardeesy N, Castrillon DH, Beach DH, Sharpless NE. Monitoring tumorigenesis and senescence *in vivo* with a p16^{INK4a}-luciferase model. *Cell* 2013; 152(1–2): 340–351.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16^{INK4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011; 479(7372): 232–236.
- Sorrentino JA, Krishnamurthy J, Tilley S, Alb JG Jr, Burd CE, Sharpless NE. p16^{INK4a} reporter mice reveal age-promoting effects of environmental toxicants. *J Clin Invest* 2014; 124(1): 169–173.
- Yousefzadeh MJ, Zhao J, Bukata C, Wade EA, McGowan SJ, Angelini LA, Bank MP, Gurkar AU, McGuckian CA, Calubag MF, Kato JI, Burd CE, Robbins PD, Niedernhofer LJ. Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice. *Aging Cell* 2020; 19(3): e13094.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzoza GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM. Naturally occurring p16^{INK4a}-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016; 530(7589): 184–189.
- Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 2018; 562(7728): 578–582.
- Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, Oberg AL, Birch J, Salmonowicz H, Zhu Y, Mazula DL, Brooks RW, Fuhrmann-Stroissnigg H, Pirtskhalava T, Prakash YS, Tchkonia T, Robbins PD, Aubry MC, Passos JF, Kirkland JL, Tschumperlin DJ, Kita H, LeBrasseur NK. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 2017; 8: 14532.
- Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonia T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, Day CP, Burt A, Palmer A, Anstee QM, Grellescheid SN, Hoeijmakers JHJ, Barnhoorn S, Mann DA, Bird TG, Vermeij WP, Kirkland JL, Passos JF, von Zglinicki T, Jurk D. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* 2017; 8: 15691.
- Lewis-McDougall FC, Ruchaya PJ, Domenjo-Vila E, Shin Teoh T, Prata L, Cottle BJ, Clark JE, Punjabi PP, Awad W, Torella D, Tchkonia T, Kirkland JL, Ellison-Hughes GM. Aged-senescent cells contribute to impaired heart regeneration. *Aging Cell* 2019; 18(3): e12931.
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dolle ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 2014; 31(6): 722–733.
- Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious

- at all stages of atherosclerosis. *Science* 2016; 354(6311): 472–477.
- 23 Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, Chung JW, Kim DH, Poon Y, David N, Baker DJ, van Deursen JM, Campisi J, Elisseff JH. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* 2017; 23(6): 775–781.
- 24 Liu JY, Souroullas GP, Diekman BO, Krishnamurthy J, Hall BM, Sorrentino JA, Parker JS, Sessions GA, Gudkov AV, Sharpless NE. Cells exhibiting strong p16^{INK4a} promoter activation *in vivo* display features of senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(7): 2603–2611.
- 25 Sessions GA, Copp ME, Liu JY, Sinkler MA, D'Costa S, Diekman BO. Controlled induction and targeted elimination of p16^{INK4a}-expressing chondrocytes in cartilage explant culture. *FASEB J* 2019; 33(11): 12364–12373.
- 26 Grosse L, Wagner N, Emelyanov A, Molina C, Lacas-Gervais S, Wagner KD, Bulavin DV. Defined p16^{high} senescent cell types are indispensable for mouse healthspan. *Cell Metab* 2020; 32(1): 87–99.e6.
- 27 Omori S, Wang TW, Johmura Y, Kanai T, Nakano Y, Kido T, Susaki EA, Nakajima T, Shichino S, Ueha S, Ozawa M, Yokote K, Kumamoto S, Nishiyama A, Sakamoto T, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Shimizu E, Katayama K, Yamada Y, Yamazaki S, Iwasaki K, Miyoshi C, Funato H, Yanagisawa M, Ueno H, Imoto S, Furukawa Y, Yoshida N, Matsushima K, Ueda HR, Miyajima A, Nakanishi M. Generation of a p16 reporter mouse and its use to characterize and target p16^{high} cells *in vivo*. *Cell Metab* 2020; 32(5): 814–828.e6.
- 28 Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999; 19(3): 2109–2117.
- 29 Herbig U, Wei W, Dutriaux A, Jobling WA, Sedivy JM. Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence. *Aging Cell* 2003; 2(6): 295–304.
- 30 Lanigan F, Geraghty JG, Bracken AP. Transcriptional regulation of cellular senescence. *Oncogene* 2011; 30(26): 2901–2911.
- 31 Ohtani N, Imamura Y, Yamakoshi K, Hirota F, Nakayama R, Kubo Y, Ishimaru N, Takahashi A, Hiraio A, Shimizu T, Mann DJ, Saya H, Hayashi Y, Arase S, Matsumoto M, Kazuki N, Hara E. Visualizing the dynamics of p21^{Waf1/Cip1} cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(38): 15034–15039.
- 32 Tinkum KL, Marpegan L, White LS, Sun J, Herzog ED, Piwnicka-Worms D, Piwnicka-Worms H. Bioluminescence imaging captures the expression and dynamics of endogenous p21 promoter activity in living mice and intact cells. *Mol Cell Biol* 2011; 31(18): 3759–3772.
- 33 McMahon M, Frangova TG, Henderson CJ, Wolf CR. Olaparib, monotherapy or with ionizing radiation, exacerbates DNA damage in normal tissues: insights from a new p21 reporter mouse. *Mol Cancer Res* 2016; 14(12): 1195–1203.
- 34 Wang B, Wang L, Gasek NS, Zhou Y, Kim T, Guo C, Jellison ER, Haynes L, Yadav S, Tchkonja T, Kuchel GA, Kirkland JL, Xu M. An inducible p21-Cre mouse model to monitor and manipulate p21-highly-expressing senescent cells *in vivo*. *Nat Aging* 2021; 1(10): 962–973.
- 35 Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268(10): 2784–2791.
- 36 Kumar M, Lu Z, Takwi AA, Chen W, Callander NS, Ramos KS, Young KH, Li Y. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene* 2011; 30(7): 843–853.
- 37 Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(21): 9660–9664.
- 38 Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22(16): 4212–4222.
- 39 Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 2013; 32(43): 5129–5143.
- 40 Hamstra DA, Bhojani MS, Griffin LB, Laxman B, Ross BD, Rehemtulla A. Real-time evaluation of p53 oscillatory behavior *in vivo* using bioluminescent imaging. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7482–7489.
- 41 Briat A, Vassaux G. A new transgenic mouse line to image chemically induced p53 activation *in vivo*. *Cancer Sci* 2008; 99(4): 683–688.
- 42 Goh AM, Lim CY, Chiam PC, Li L, Mann MB, Mann KM, Menendez S, Lane DP. Using targeted transgenic reporter mice to study promoter-specific p53 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(5): 1685–1690.
- 43 Sun N, Malide D, Liu J, Rovira II, Combs CA, Finkel T. A fluorescence-based imaging method to measure *in vitro* and *in vivo* mitophagy using mt-Keima. *Nat Protoc* 2017; 12(8): 1576–1587.
- 44 Sun N, Yun J, Liu J, Malide D, Liu C, Rovira II, Holmstrom KM, Fergusson MM, Yoo YH, Combs CA, Finkel T. Measuring *in vivo* mitophagy. *Mol Cell* 2015; 60(4): 685–696.
- 45 Sun J, Wang M, Zhong Y, Ma X, Sun S, Xu C, Peng L, Li G, Zhang L, Liu Z, Ai D, Liu B. A Gbl1-2A-mCherry reporter monitors systemic aging and predicts lifespan in middle-aged mice. *Nat Commun* 2022; 13(1): 7028.