

신생아와 노인 유래 섬유아세포의 노화과정에서의 세포학적 성질의 비교

이혜원 · 황은성*

서울시립대학교 생명과학과

Received January 21, 2008 / Accepted March 5, 2008

Comparison of Cellular Senescence Phenotype in Human Fibroblasts from New-born and Aged Donors. Hye Won Yi and Eun Seong Hwang*. *Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Republic of Korea* - Normal somatic cells proliferate for a limited number of doublings in culture and then enter an irreversible growth-arrest state called replicative senescence. Replicative senescence has been believed a reason for the limited cellular turnover and deterioration of tissue function in aged animals. However, there is no experimental evidence supporting this assumption. Furthermore, cells from aged person have been poorly characterized with an exception of the cases of T cells. In this study, we examined cell biological changes occurring in replicative senescence of fibroblast strains originated from a new-born (NHF-NB) and a 87 year old man (NHF-87). NHF-87 (and the cells from a 75-year old) proliferated to smaller population doublings and with longer doubling times than NHF-NB did. At early passages, NHF-87 exhibited a low senescence-associated β -Gal (SA β -Gal) activity and lipofuscin level, typical markers for cellular senescence. Furthermore, they maintained low levels of lysosome and reactive oxygen species (ROS). All of these levels increased dramatically in the late passage NHF-87 quite similarly as those in the late passaged NHF-NB did. These results indicate that most cells originated from the aged maintain a phenotype of the cells originated from new-born donors and undergo replicative senescence with the same kinetics as that of the cells from new-born. It is also indicated that not SA β -gal activity but cell proliferation rate may be qualified as a biomarker for cells aged *in vivo*.

Key words : Senescence-associated β -galactosidase activity (SA β -Gal activity), replicative senescence, aging, reactive oxygen species, lysosome

서 론

정상의 체세포는 *in vitro*에서 배양할 때에 제한된 수의 분열을 한 뒤에 비가역적인 증식억제상태인 세포노화(replicative senescence)에 들어간다[16]. 인간유래의 세포가 노화하는 과정에서는 p53, p21WAF1 또는 p16INK4a의 발현이 증가하고, hypophosphorylated Rb의 양이 증가하는 등[11] p53-growth inhibitory 경로가 활성화되는데, 이는 많은 부분, telomere shortening 현상에 기인하는 것으로 추측되고 있다[7]. 인간 섬유아세포에 telomerase의 catalytic subunit인 hTERT의 유전자를 도입하여서 telomerase를 활성화시키면 세포가 노화하지 않고 무한히 증식할 수 있다는 것을 이를 잘 증명하고 있다[5]. Telomere shortening은 DNA damage checkpoint 반응을 유도하여서 p53-growth inhibitory 경로를 활성화시킨다[10,23].

한편, 세포가 노화하면서 세포내 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)의 수준이 점차 증가한다[17]. 활성산소는 미토콘드리아의 전자전달체로부터의 전자이탈에 의해서 주로 생성되는 것으로 추측되며[14,19], 세포내에서 DNA mu-

tation, protein oxidation, lipid peroxidation 등의 산화적 손상을 야기하고, 신체 내에서는 당뇨 합병증, 동맥경화, 염증 등 여러 퇴행성 질병의 원인이 된다[2,3]. 활성산소 축적의 증가는 또한 세포노화의 중요한 원인 인자로 작용할 것으로 추측되고 있다. 세포에 산화스트레스를 주면 p53-growth inhibitory pathway가 활성화되고[30] telomere shortening도 촉진된다[32]. 그리고 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 활성산소 소거제 효소를 과발현시키면 초파리의 수명이 증가하고[21,22], 인간 섬유아세포에 SOD1을 knock-down시키면 세포노화가 유도된다[3].

Senescence-associated β -galactosidase (SA β -Gal) 활성은 노화된 세포에서 특징적으로 관찰되어 노화표지자로 광범위하게 활용되고 있다. 이는 pH 6.0에서 β -galactoside 결합을 분해하는 활성으로서 X-Gal을 기질로 이용한 assay를 통해 세포내에서 *in situ*로 쉽게 확인할 수 있다[11]. 최근의 연구에서 SA β -Gal 활성은 노화된 세포에서 lysosome의 β -galactosidase의 발현양이 증가하여 최적 pH가 아닌 pH 6.0에서 그 활성이 검출되는 것임이 밝혀진 바 있다[18]. 처음 SA β -Gal 활성을 보고한 논문에서는 이 활성이 노화 세포 뿐 아니라, 노인에서 유래한 조직에서도 양성으로 나타났는데, 이 때문에 SA β -Gal 활성이야말로 *in vitro* 와 *in vivo*를 망라하는 진정한 노화표지자라고 간주되어 지금까지 1,000건 이

*Corresponding author

Tel : +82-2-2210-2608, Fax : +82-2-2210-2888

E-mail : eshwang@uos.ac.kr

상의 노화관련 논문에서 인용되었다[11]. 그러나 근래 이 활성이 노화된 개체를 구분하는 표지로 사용될 수 있는지에 대해서는 논란이 일고 있다. 실제 노인 조직에서 이 활성이 관찰되지 않는다는 보고도 있고 노화상태가 아닌 다른 조건에서도 이 활성이 유도될 수 있다는 보고들도 있다[6,28,34,36]. 한편, 노화된 세포에서 lysosome의 수는 증가되어 있고 [6,25], 이들 lysosome의 효소에 의해 분해되지 않는 형광성 물질인 lipofuscin이 축적되어 있어 또 하나의 중요한 노화 표지자로 인용되고 있다[28].

세포노화는 노인의 신체에서도 일어나서 노인조직의 세포가 재생능력과 기능활성을 잃어버림으로서 신체 노화의 원인이 되는 것으로 기대되어 왔다[8]. 그러나, 이러한 추정을 확실히 지지할 수 있는 자료는 사실 부재하다. *in vitro*에서 관찰되고 있는 세포노화가 실제로 *in vivo*, 즉, 노인의 신체에서 일어나고 있는지에 대해서도 확인되어 있지 않다. 초기의 연구들에서는 세포공여자의 나이와 세포의 *in vitro* 증식한계 (proliferative capacity) 사이에 역비례관계가 존재한다고 보고되었지만[1,16,19,22,26], 근래의 연구에서는 이러한 상관관계가 나타나고 있지 아니하다[9,20,29]. 이렇게 세포노화의 *in vivo* 유의성이 아직 확인되지 못하였음에도 불구하고 지금까지의 세포노화에 대한 연구는 주로 신생아와 태아에서 유래한 발생초기의 섬유아세포를 대상으로만 이루어져 왔다.

본 논문에서 우리는 75세 이상의 노인에서 유래한 섬유아세포들의 노화과정에서의 세포학적 변화를 확인하고자 하였다. 노인세포에서의 세포 증식한계와 증식속도(population doubling time), SA β-Gal 활성의 발현, 노화과정에서의 lysosome수, lipofuscin 축적도, 활성산소 축적도 등을 신생아 세포에 대비하여 관찰하였는데, 그 결과 노인에게서 유래한 섬유아세포는 증식속도에서는 유의하게 낮았지만, 노화과정에서 신생아의 세포가 겪는 것과 거의 동일한 세포학적 변화를 겪는다는 것을 확인 할 수 있었다.

재료 및 방법

세포의 배양

신생아의 포피(foreskin)에서 유래한 섬유아세포(NHF-NB라 칭함)와 75세와 87세의 건강한 남자 노인의 둔부에서 유래한 섬유아세포(각각 NHF-75, NHF-87라 칭함)는 서울대학교 피부학교실의 정진호 박사로부터 분주받아 10% fetal bovine serum (Biowhitaker, Walkersville, MD, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biowhitaker)에서 배양하였다. 이들 세포를 20일 동안에 세포의 수가 전혀 늘지 않는 시점에 도달할 때까지 계속해서 계대배양하여 증식곡선을 완성하였다. 배양 중 세포의 population doubling (PD)은 $PD = (\ln F - \ln I) / \ln 2$ 의 식으로 계산하였다(F: 한 passage가 끝날 때의 세포 수; I: 한 passage를 시작할 때

seeding된 세포 수).

SA β-Gal 활성의 assay

6-well plate에 세포를 분주하고 3일 후 PBS로 씻어낸 뒤 10 분간 3.7% formaldehyde로 고정시켰다. 이후, 2 mM MgCl₂를 포함한 PBS (pH 6.0)로 씻어낸 뒤 SA β-Gal staining buffer [1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside, 5 mM K₃Fe[CN]₆, 5 mM K₄Fe[CN]₆, 2 mM MgCl₂를 포함한 PBS (pH 6.0)]에서 37°C에서 overnight 반응시켰다.

세포내 autofluorescence 와 lysosome mass 수준 측정

세포를 60 mm plate에 분주하고 24시간 뒤에 50 μM LysoTracker Red DND-99 (L7528, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 가하고 30분간 반응시켰다. 이후 trypsin-EDTA 처리로 분리된 세포를 PBS에 재현탁하고 FACS에서 분획하였다. LysoTracker 처리된 세포는 590 nm emission을, 처리되지 않은 세포는 530 nm emission을 이용하여 측정하고 개수하였으며, 결과는 Cell Quest 3.2 Software (Beckton Dickson)로 분석하였다.

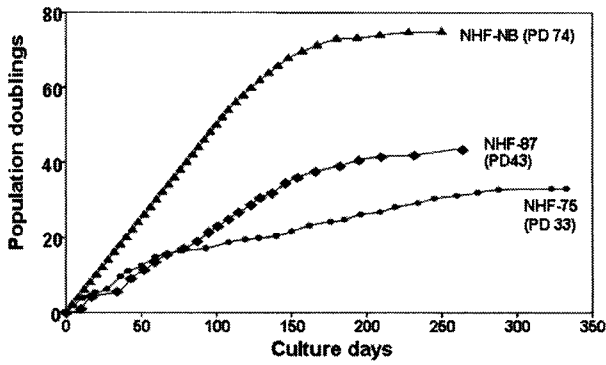
세포내 활성산소 수준의 측정

세포를 60 mm 용기에 분주하고 24시간 후 5 μg/ml의 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA; Sigma, St. Louis, MS, USA)와 2 μM dihydroethidium (DHE; Invitrogen)를 넣고 30분간 반응시켰다. 이후, trypsin-EDTA처리를 통해 분리된 세포를 모은 뒤 EDTA가 포함된 PBS로 재현탁하고 FACS (Beckton Dickson FACScan)로 분획하였다. DCF-DA의 형광은 530 nm emission을, DHE의 형광은 650 nm emission을 이용하여 측정, 개수하였다.

결과 및 고찰

노인유래의 섬유아세포의 증식곡선과 life span

우선, 신생아(NHF-NB) 및 75세 노인(NHF-75)과 87세 노인(NHF-87)에서 유래한 섬유아세포 strain들을 240-340일간 지속적으로 계대배양하였는데, NHF-NB는 PD74, NHF-75는 PD33, NHF-87은 PD43에 이르러 세포수 증가가 멈춰 이 시점에서 노화상태(replicative senescence)에 진입하였다고 판단하였다(Fig. 1). Schineider 등[26]은 21-36세 사이의 청년에서 유래한 섬유아세포의 최대 PD (life span)가 63세 이상의 노인들에서 유래한 섬유아세포의 최대 PD보다 유의하게 크다고 보고한 반면, Maier 등[20]은 90세 노인들에서 유래한 섬유아세포들도 여전히 높은 증식능력을 갖고 있으며 세포들의 최대 PD는 서로 간 큰 차이를 보인다는 보고를 한 바



	Doubling time
NHF-NB	2.08 days
NHF-75	4.34 days (Phase I)
	12.5 days (Phase II)
NHF-87	4.16 days

Fig. 1. Growth curves of NHF-NB, NHF-75 and NHF-87. Each line was obtained at passage 4 for NHF-NB (-▲-) and NHF-75 (-●-), and 6 for NHF-87 (-◆-), and thereafter continuously passaged to PD75 (passage 33), PD33 (passage 21), and PD43 (passage 28), respectively, at which point the cell number did not increase during 20-day period. At each passage, cell number was counted from which the number of population doublings was calculated. Growth rates were calculated within the linear range in the growth curves and expressed as Doubling time in the table.

있는데, 이번 조사에서 나타난 75세와 87세 노인유래 세포들의 최대 PD인 33과 43은 노인세포간의 상이성을 잘 보여주고 있다. 한편, 이들 수치는 신생아 세포의 최대 PD인 75에 비해 크게 낮은 것이어서 Schneider 등[26]의 보고와 가까운 결과로 나타났다. 한편, 세포증식이 직선으로 증가한 배양초기에 각 strain들의 doubling time은 각각 2.08일(NHF-NB), 4.34일(NHF-75), 4.16일(NHF-87)에 달하여서, 두 노인 유래 세포들의 초기 증식속도는 거의 동일하게 나타났다. 또한, 노인 유래 세포의 증식속도는 NHF-NB의 증식속도의 1/2 정도로 낮은 것으로 나타났다. 특히하게 NHF-75는 PD19 이후부터는 증식속도가 줄어든 상태로(doubling time 12.5 day) 분열하여 2단계의 증식패턴을 보였다. 이렇게 노인의 섬유아 세포가 신생아의 세포에 비해 낮은 증식속도로 분열한다는 결과는 활발히 성장하는 신생아의 체내에서는 노인 신체에서 보다 활발한 세포증식이 일어날 가능성을 시사하는 것이라 하겠다.

이후의 실험들에서는 NHF-NB와 분열속도가 일정하게 유지된 NHF-87를 대상으로 조사하였으며, 각각의 early passage (NHF-NB는 PD20~28, NHF-87은 PD16~24)와 세포노화 단계에 근접한 late passage (NHF-NB는 PD66~70, 87세는

PD42)의 세포들이 이용되었다. Early passage 세포들은 증식이 활발하여 NHF-NB의 경우 2-3일에 한번 분열하였던 반면, late passage 세포들은 1회 분열에 2주 정도가 소요되었다.

SA β-galactosidase 활성과 세포 morphology의 비교

노인 유래 세포에서의 SA β-Gal 활성 변화가 신생아 유래의 세포의 경우에 비해 어떻게 다른지 알아보기 위해 NHF-87의 SA β-Gal 활성을 조사하였다. 기존에 보고된 바 [17]와 같이 NHF-NB는 세포노화에 근접한 late passage에서 SA β-Gal 활성이 완전히 나타났고(Fig 2, NB(L)) 세포의 크기가 커지고 morphology도 전형적인 노화세포의 모습을 띄었다. NHF-87 세포들은 NHF-NB과 같이 early passage에서 SA β-Gal 활성이 거의 나타나지 않았고 late passage에서야 비로소 그 활성이 관찰되었다(Fig.2, 87(E) 와 87(L)). 또한, early passage에서는 세포의 모습이 가늘고 길어서 활발히 증식하는 섬유아세포의 형태를 보이다가 late passage에서는 NHF-NB와 마찬가지로 크기가 커지고 모양도 평편하게 변화하였다(Fig. 2). 한편, 세포가 노화하면 세포내의 입자밀집도(granularity)도 증가하여 FACS로 분석하면 side scattering (SSC)이 유의하게 증가한다. 실제로 NHF-NB의 경우 early passage 세포에 비해 late passage에서는 높은 SSC값을 갖는 세포가 상당히 늘어나 있었는데(Fig. 3, NB(L)), NHF-87 세포들도 early passage에 비해 late passage에서 SSC값이 크게 증가한 것이 관찰되었다. 오히려 NHF-87의 경우에 매우 높은 SSC 값을 갖는 세포들이 더욱 많이 발생하였다(Fig. 3, 87(L)). 한편, 이 조사에서 세포의 크기를 알려주는 forward scattering (FSC)은 late passage에서 크게 증가하지 않았으나, early passage 세포들을 비교하였을 때, 신생아세포보다

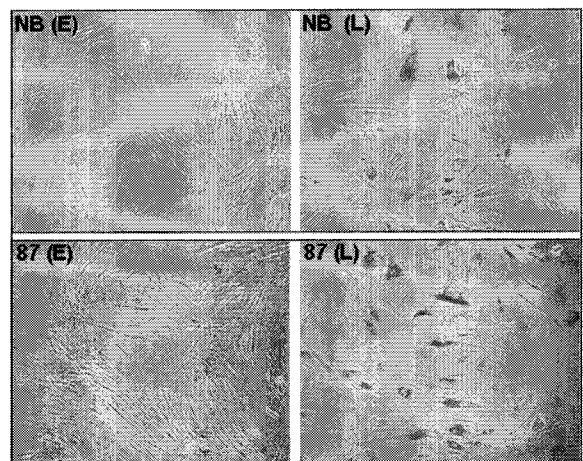


Fig. 2. SA β-Gal activity in the early- and late-passaged NHF-NB and NHF-87. NHF-NB at PD20 (NB (E)) and PD70 (NB (L)) and NHF-87 at PD16 (87 (E)) and PD42 (87 (L)) were cultured in 6 well plates and assayed for SA β-Gal activity 3 days later.

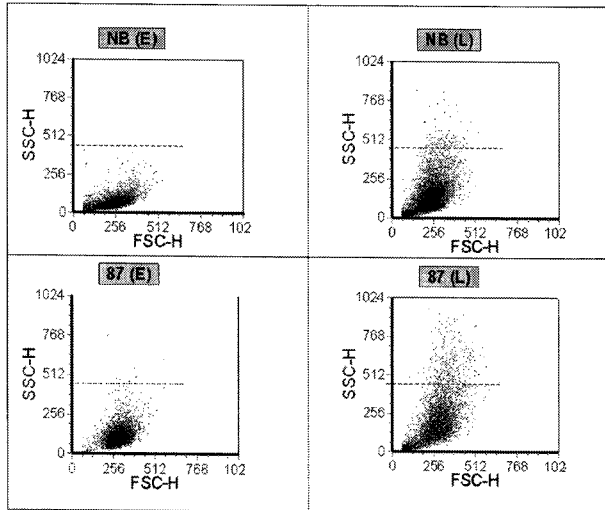


Fig. 3. Forward and side scattering patterns of the early and late-passaged NHF-NB and NHF-87. 1x 10⁴ NHF-NB at PD20 (NB (E)) and PD70 (NB (L)) and NHF-87 at PD16 (87 (E)) and PD42 (87 (L)) were applied to FACS, and their forward (FSC-H) and side scattering (SSC-H) patterns were analyzed.

는 NHF-87세포가 다소 높은 FSC 중앙값을 보여서, 노인 유래 세포가 신생아의 세포보다는 다소 커져 있음을 추측케 한다. 그러나, 이것이 사람 간의 상이성에 기인할 가능성도 배제할 수 없다. 이상의 결과들은 NHF-87 세포가 *in vitro* 노화 과정에서 NHF-NB와 동일한 패턴의 SA β-Gal 활성과 세포 형태 측면에서의 변화를 겪었다는 것을 보여주고 있다. 즉, 87세 노인 유래의 세포는 신생아의 세포와 같이 *in vitro* 에서의 배양초기에는 노화세포의 형질을 보이지 않고 세포노화 단계에 근접해서야 비로소 노화된 세포의 형질을 띄게 됨을 알 수 있다. 따라서, 이 결과는 노인의 신체에 존재하는 섬유아세포에는 SA β-Gal 활성이나 노화세포의 형태적 성질이 존재하지 않고 있다는 것을 예측케 한다. 이러한 결과는 노인의 조직에서는 *in vitro*에서 노화된 세포와 달리 SA β-Gal 활성이 없다는 보고[27]와 일치하는 것이라고 하겠다.

Lysosome과 autofluorescence 수준의 변화

노화된 세포에서는 세포의 산화적 손상정도를 나타내주는 척도가 되는 lipofuscin의 축적이 일어나며[28], 아마도 이러한 산화손상물들을 제거하기위한 프로그램의 하나로 lysosome 구조체의 수가 증가해 있다[6,24]. 노인유래의 세포에 이러한 lysosome 관련 변화가 이미 존재하는지 아니면 세포가 *in vitro*에서 세포노화를 겪으면서 이러한 변화가 일어나는지를 알아보기 위해 NHF-NB와 NHF-87 세포들의 lipofuscin에서 유래하는 autofluorescence의 수준과 LysoTracker를 이용한 lysosomal content를 조사, 비교하였다. 기대하였던 바대로 NHF-NB는 세포가 노화상태에 들어가면서 autofluorescence (Fig.

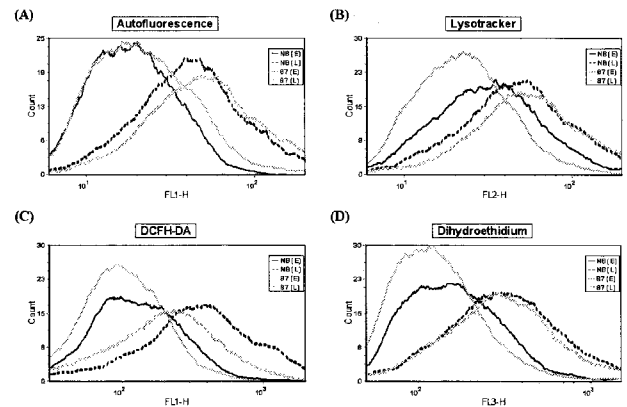


Fig. 4. Analysis on the levels of autofluorescence, lysosomal content, and ROS in the early and late-passaged NHF-NB and NHF-87. (A) 1x 10⁴ NHF-NB early-passaged (black line) and late-passaged (dotted black line) cells, and NHF-87 early-passaged (gray line) and late-passaged (dotted gray line) cells were directly applied to FACS (with emission of 530 nm). (B, C, and D) The same number of cells treated with either LysoTracker Red DND-99 (B), DCFH-DA (C), or dihydroethidium and applied to FACS (with emission of 530 nm and 650 nm, respectively).

4A)와 lysosomal content (Fig. 4B)가 모두 유의하게 증가하였다. Autofluorescence는 2.2배, lysosomal content는 약1.5배 증가하였다. NHF-87 세포들은 early passage에서 NHF-NB와 거의 동일하거나 오히려 낮은 수준의 autofluorescence와 lysosomal content를 보였고, late passage에서는 NHF-NB에서와 같이 이 둘의 값들이 증가하였는데, 그 양상이 NHF-NB의 경우와 매우 비슷하였다. 이는 노인유래의 세포가 배양 초기에 높은 수준의 lipofuscin과 lysosome을 갖고 있지 않음을 나타내주는 것이다. 이 결과들은 노인의 신체에 존재하는 섬유아세포들이 높은 수준의 lipofuscin과 lysosome을 갖고 있지는 않다는 것을 시사한다. 또한, 이들이 노화상태에 들어가면서 신생아 유래의 세포와 동일한 수준으로 세포내 lipofuscin의 양과 lysosome의 수가 증가한다는 것도 잘 말해주고 있다.

세포내 활성산소 수준의 변화

세포가 노화하면서 세포내 활성산소의 양은 점차 증가한다[17]. 노인유래의 세포에서 활성산소의 발생정도를 파악하고자 활성산소의 주류를 이루는 superoxide radical (O₂⁻)과 hydroxyl radical (·OH) 수준에 대해 이들에 의해 산화된 DCF-DH와 DHE의 형광을 FACS를 통해 조사하였다. NHF-NB는 기대한 바와 같이 late passage에서 DCF-DH (Fig. 4C)와 DHE (Fig. 4D) 모두의 형광이 크게 증가하여 있었다. 한편, NHF-87의 세포들도 NHF-NB와 비슷하게 early passage에서 활성산소 수준이 낮았고, late passage에 들어가서 높게

나타났다. 이 결과는 첫째, NHF-87 세포들이 *in vitro* 배양 초기에는 적은 양의 활성산소를 갖고 있다는 것과, 둘째, 그러나 이들 세포가 노화하면서 NHF-NB의 경우와 동일하게 증가된 수준의 활성산소가 축적된다는 것을 보여준다. 따라서, 87세 노인의 신체 내에서는 그리 높지 않은 수준의 활성산소가 발생하고 있다고 추정되며, 노인유래의 세포도 *in vitro* 노화과정에서 신생아의 세포와 거의 동일한 산화적 자극과 손상을 받는다는 것을 추정할 수 있다.

요 약

이 논문에서는 신생아와 노인 유래의 섬유아세포들의 노화의 특징들을 비교하여 사람의 나이와 세포의 수명 및 세포형질의 관계에 대해 연구하였다.

본 연구의 결과는 비록 한가지의 노인세포에 대해 얻어진 것이기는 하지만 다음과 같은 세 가지 중요한 가능성을 제시한다. 첫째로, 노인에서 유래한 섬유아세포의 증식속도가 신생아 유래의 세포에 비해서 느릴 가능성이 있다. 이러한 결과는 실제로 노인 신체에 존재하는 세포가 신생아에 존재하는 세포에 비해 낮은 속도로 증식할 가능성을 시사하는 것으로서, 노인에서 관찰되는 조직실질의 감소 원인을 설명하는 자료가 될 수 있겠다. 둘째로, 노인 유래 섬유아세포의 early passage 세포가 신생아 유래의 세포의 early passage 세포와 동일하게 낮은 수준의 SA β -Gal 활성, autofluorescence, lysosome 함량, 그리고 활성산소 수준을 갖고 있었다. 이 점은, early passage 때의 세포가 보이는 형질이 신체에 존재하는 세포의 상황과 크게 다르지 않다고 가정할 때, 노인 신체의 조직에 존재하는 세포들이 신생아의 세포와 유사한 상태로 존재할 가능성을 시사하는 것이다. 즉, 노인 신체에서는 *in vitro* 노화세포에서 나타나는 수준의 세포노화가 일어나 있지 않다는 것이다. 셋째, 노인세포가 노화했을 때는 신생아세포의 경우와 거의 동일한 수준의 활성산소, lysosome, SA β -Gal activity 증가를 보이고 있었는데, 이는 노인 유래의 세포가 *in vitro* 배양 시 신생아 유래의 세포보다 더 심하거나 또는 빠른 산화적 손상이나 세포학적 변화를 겪지는 않는다는 것을 보여주는 것으로서, 세포가 보유한 항산화적 기능이 노인이 되면서 크게 약화되지는 않음을 시사하고 있다. 결론적으로 노인 유래의 세포는 세포증식 속도를 제외하면 대체로 신생아 때의 상태와 동일한 세포 내 상태를 갖고 있다고 결론 내릴 수 있겠다.

감사의 글

본 연구논문은 2006년도 서울시립대학교 교내 연구비의 지원을 받아 이루어졌다.

References

1. Allsopp, R. C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. V. Younglai, A. B. Futcher, C. W. Greider and C. B. Harley. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10114-10118.
2. Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7915-7922.
3. Beckman, K. B. and B. N. Ames. 1979. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
4. Blander, G., R. M. de Oliveira, C. M. Conboy, M. Haigis and L. Guarente. 2003. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblast. *J. Biol. Chem.* **278**, 38966-38969.
5. Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
6. Brunk, U. T., J. L. E. Ericsson, J. Ponten and B. Westermarck. 1973. Residual bodies and 'aging' in cultured human glia cells. *Exp. Cell Res.* **79**, 1-14.
7. Campisi, J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends. Cell Biol.* **11**, S27-S31.
8. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729-740.
9. Cristofalo, V. J., R. G. Allen, R. J. Pignolo, B. G. Martin and J. C. Beck JC. 1998. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10614-10619.
10. d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter and S. P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198.
11. Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj and O. Pereira-Smith. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9363-9367.
12. Dimri, G. P., A. Testori, M. Acosta and J. Campisi. 1996. Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biol. Signals* **5**, 154-162.
13. Edward, L. S., and M. Youji. 1976, The Relationship between *in Vitro* Cellular Aging and *in Vivo* Human Age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10**, 3584-3588.
14. Genova, M. L., M. M. Pich, A. Bernacchia, C. Bianchi, A. Biondi, C. Bovina, A. I. Falasca, G. Formiggini, G. P. Castelli and G. Lenaz. 2004. The mitochondrial production of reactive oxygen species in mitochondria to aging and pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1011**, 86-100.
15. Hayflick, L. and P. S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621.

16. Hayflick, L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614-636.
17. Kang, H. T., H. I. Lee and E. S. Hwang. 2006. Nicotinamide extends replicative lifespan of human cells. *Aging cell* **5**, 423-436.
18. Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang. 2006. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195.
19. Loschen, G. and A. Azzi. 1975. On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria. *Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab.* **7**, 3-12.
20. Maier, A. B., S. le Cessie, C. de Koning-Treurniet, J. Blom, R. G. Westendorp and D. van Heemst. 2007. Persistence of high-replicative capacity in cultured fibroblasts from nonagenarians. *Aging Cell* **6**, 27-33.
21. Orr, W. C. and R. S. Soha. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128-1130.
22. Parkes, T. L., A. J. Elia, D. Dickinson, A. J. Hilliker, J. P. Phillips and G. L. Boulianne. 1998. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* **19**, 171-174.
23. Reaper, P. M., F. di Fagagna and S. P. Jackson. 2004. Activation of the DNA damage response by telomere attrition: a passage to cellular senescence. *Cell Cycle* **3**, 543-546.
24. Robbins, E., E. M. Levine and H. Eagle. 1970. Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J. Exp. Med.* **131**, 1211-1222.
25. Schneider, E. L. and Y. Mitsui. 1976. The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3584-3588.
26. Serra, V. and T. von Zglinicki. 2002. Human fibroblasts *in vitro* senesce with a donor-specific telomere length. *FEBS Lett.* **516**, 71-74.
27. Severino, J., R. G. Allen, S. Balin, A. Balin and V. J. Cristofalo. 2000. Is β -galactosidase staining a marker of senescence *in vitro* and *in vivo*? *Exp. Cell Res.* **257**, 162-171.
28. Terman, A. and U. T. Brunk. 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1400-1404.
29. Tesco, G., M. Vergelli, E. Grassilli, P. Salomoni, E. Bellesia, E. Sikora, E. Radziszewska, D. Barbieri, S. Latorraca, U. Fagiolo, S. Santacaterina, L. Amaducci, R. Tiozzo, C. Franceschi and S. Sorbi. 1998. Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 912-916.
30. Toussaint, O., E. E. Medrano and T. von Zglinicki. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* **35**, 927-945.
31. Untergasser, G., R. Gander, H. Rumpold, E. Heinrich, E. Plas and P. Berger. 2003. TGF- β cytokines increase senescence-associated β -galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. *Exp. Gerontol.* **38**, 1179-1188.
32. Von Zglinicki, T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 339-344.
33. Yegorov, Y. E., S. S. Akimov, R. Hass, A. V. Zelenin and I. A. Prudovsky. 1998. Endogenous β -galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Exp. Cell Res.* **243**, 207-211.