

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：進修研究)

## 研究老年醫學及長壽基因分析

服務機關：台中榮民總醫院

出國人職稱：主治醫師

姓名：唐憶淨

出國地區：美國

出國期間：89年12月8日至92年6月7日

報告日期：92年7月18日

J3/coq>01908

系統識別號:C09201908

公務出國報告提要

頁數: 15 含附件: 否

報告名稱:

研究老年醫學及長壽基因分析

主辦機關:

行政院輔導會臺中榮民總醫院

聯絡人/電話:

/

出國人員:

唐億淨 行政院輔導會臺中榮民總醫院 家庭醫學科 主治醫師

出國類別: 進修 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 89 年 12 月 08 日 - 民國 92 年 06 月 07 日

報告日期: 民國 92 年 07 月 18 日

分類號/目: J3/醫療 J3/醫療

關鍵詞: 老年醫學, 長壽基因, 家族, 基因晶片

內容摘要: 儘管醫藥科技不斷進步, 老化仍是人類難以避免的過程。敝人一向對研究老年醫學及老化機制極感興趣, 這次十分榮幸接受國家衛生研究院 (NHRI) 之獎助, 至美國肯塔基州路易威爾大學 (University of Louisville) 醫學院生化與分子生物學部 Dr. Eugenia Wang 的實驗室進行研究訓練。目的在學習各種實驗方法來研究與人類長壽相關的遺傳基因, 及其在老化過程中之表現機轉。在兩年半的訓練過程中, 不僅學到了分子生物學及生物化學之實驗室基本操作如細胞培養、動物組織取樣及保存, 核糖核酸 (RNA/DNA) 之萃取, RT-PCR 等技術; 還參與分子序列微陣 (microarrays) 又稱生物基因晶片 (biochip) 的製作流程, 以及生命科學中各類資料的整理與分析。Dr. Wang 的訓練嚴謹, 要求嚴格, 讓我吃不少苦, 但也打下紮實的基礎。人類基因體 (Human Genome) 已完成定序與定位, 使生物醫學的研究進入新紀元, 基因功能的檢測與分析動輒數以千計。個人埋首, 單打獨鬥的時代已經過去, 「後基因體」年代 (Post-Genomic Era) 講求團隊合作, 資源交流及成果共享。敝人將致力於老化機轉與長壽基因之研究, 結合分子生物科技與臨床醫學應用, 為國內老年醫學貢獻心力, 竭盡所學。並向國內外相關研究單位或實驗室請益, 交換心得, 擴大視野, 共同為人類謀求健康而長壽的生活而努力。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

# 目 次

| 內容              | 頁碼 |
|-----------------|----|
| 1. 研究背景-----    | 1  |
| 2. 研究目的-----    | 2  |
| 3. 研究訓練過程-----  | 4  |
| 4. 研究心得與建議----- | 9  |
| 5. 結語-----      | 13 |
| 6. 附錄-----      | 15 |

# 研究老年醫學及長壽基因分析

## 一、 研究背景

人類對於長壽一直有一份憧憬，總希望能活得久一點。事實上隨著醫藥科技的進步，及公共衛生的改善，人類的壽命確實不斷延長。在已開發國家中，百歲人瑞級的高齡者數目正以每年百分之八的速率快速增加，老年醫學研究成為各學術界重視的課題。包括生物醫學領域的學者們，一致認為「活得久，也要活得好」。然而儘管醫藥、科技隨時在更新進步，身體功能的老化仍是人類無法避免的過程，只是每個人快慢不同。許多觀察研究發現，特別高齡的老年族群（九十歲以上甚至超過一百歲）似乎豁免了一些主要與老年相關的慢性疾病，譬如心血管與腦血管疾病，老年失智症及癌症等；或是這些慢性病很晚才出現，病程的發生與進展被壓縮到生命的最終點。這些高齡老人大多保有基本的日常生活功能，還能照顧自己，非常難得。是什麼因素讓這群高齡者活得久又活得好，而且長壽還有家族性。除了生活習慣及外在環境外，基因遺傳的因素更值得我們注意與關切。

敝人一向對研究老年醫學及老化機制極感興趣，參與本院老年醫學小組共同投入老年醫學研究已有多年。在前主任秘書黃孝鏘醫師的整合領導下，主要負責老年人身體機能的評估，著重生理健康狀態與

器官功能檢查。同時與國內外研究機構互相合作，如前「台灣省家庭計畫研究所」今屬行政院衛生署國民健康局，以及加拿大 McGill 大學附屬醫院之老年研究中心，從民國 87 年 7 月就開始合作研究。先後訪視了台中縣市七個長壽家族，以及台灣中北部高齡老人和其兄弟姊妹，並採集血樣進行生化及分子生物學的分析。因為彼此間已建立良好之合作基礎，當原 McGill 大學附屬醫院之老年研究中心的主持人 Dr. Eugenia Wang 接受美國肯塔基州 Louisville 大學禮聘至生化與分子生物學部擔任專任教授與老年研究之領導人時，即提供本院老年醫學小組成員研究訓練的機會。適逢國家衛生研究院提出「醫師研究獎助」計畫，鼓勵臨床主治醫師從事基礎醫學研究。敝人十分榮幸被本院推薦，並獲選接受國家衛生研究院之獎助，於民國 89 年 12 月至美國肯塔基州 Louisville 大學生化與分子生物學部 Dr. Eugenia Wang 的實驗室進行全時間研究訓練。

## 二、 研究目的

藉由這次機會在 Dr. Eugenia Wang 的實驗室接受嚴格的研究訓練，目的不僅在學習各種實驗技術與方法來研究與人類長壽相關的遺傳基因，及其在老化過程中之表現機轉；並且吸取國際水準實驗室及研究學者之經驗，從實驗設計、個案選取、樣本採集、實驗操作過程與結果判讀，資料統計與分析，以及論文撰寫等；讓我了解到如何設

立一個標準的實驗室環境，和如何發展一個結合老年醫學與分子生物學的研究系統。我們關注的研究對象是世居台灣本土的長壽老人及其家族，包括兄弟姊妹及子孫。目標朝著前瞻性的世代研究來進行，希望能建立台灣本土特有的長壽基因之研究基礎，累積經驗並且與國內外相關研究單位互相交流。

目前國際間有關老化與長壽的研究包括下列主題：(一) 熱量攝取的限制。動物實驗廣泛證實若在幼年期減少熱量攝取(約減少百分之十五至二十)，可以有意義地延長個體壽命並且延後或減緩老化過程。熱量限制與壽命延長之間的關係，已知是經由基因調節新陳代謝引發連鎖反應，細節仍在深入研究中。(二) 細胞凋零 (apoptosis) 的過程與機轉。每一個細胞都有一定的生命時程，而且受許多基因調節機轉控制著。有些基因調控細胞對各種壓力 (stress) 的反應，有些基因負責對營養狀態的感受能力；有些會增加細胞新陳代謝的耐量，或是安定那些會加速老化的基因，來達成延長壽命的目的。然而當細胞逐漸老化，有一群基因會引導操控一種主動的、有計畫的細胞自然死亡，稱為細胞凋零 (apoptosis)。參與細胞凋零過程的基因群主要有兩組：一組會加速細胞死亡，如 caspase gene family, 另一組則抑制細胞死亡，如 Bcl-2 family。身體正常時兩組分工合作達成平衡，排除老化或多餘的細胞，來幫助體內維持恆定狀態。一旦基因發生變

異，細胞自然凋零的機制失去平衡，如果加速細胞死亡那組基因功能強過抑制細胞死亡那組基因，那麼細胞老化及死亡的過程就會加快，壽命則減短。反之，若抑制細胞死亡那組基因功能較強，或是加速細胞死亡那組基因功能受到阻礙，則細胞會停止或減慢死亡過程。譬如有些細胞會進入長眠狀態，稱為（senescence），以對抗凋零死亡。Senescence 是研究長壽基因的重點之一，科學家希望能多了解細胞進入長眠狀態的基因控制機轉，以及在延長壽命中所扮演的角色。不過 Senescence 若是發生在不正常細胞如惡性腫瘤細胞的話，則會產生癌症，這也是研究癌症相關基因的重要課題。（三）染色體端粒子（telomeres）的研究。端粒子是位於染色體終端的一小段基因加蛋白質的構造，會隨著每次細胞分裂而逐次縮短，它並可保護染色體的末端不被降解退化或與其他染色體融合而造成變異。許多實驗證明端粒子的縮短與細胞老化的過程有關。但也有研究發現一種端粒酶（telomerase）的酵素在生殖細胞或某些突變的細胞中被活化起來，阻止端粒子隨細胞分裂而縮短，造成細胞不斷分裂卻不會衰老死亡。端粒酶（telomerase）的活性與細胞長眠（senescence）及腫瘤形成的關係需要進一步探討。

### 三、 研究訓練過程

在 Dr. Eugenia Wang 的實驗室兩年半的的訓練過程中，我很幸

運地加入 Dr. Eugenia Wang 實驗室中的主要工作團隊－生物基因晶片 (microarrays 又稱 biochip) 小組。基因晶片的製作與研究應用乃是目前世界先進生物科技之一，在一張不到 5 公分的薄膜晶片上，可承載數百至數千個基因產物，所進行的特殊實驗可以同時檢測這些上百甚至上千的基因。基因晶片的發展使得分子生物學研究向前跨進了一大步，不但縮短實驗的時間，節省大量的人力與物力；並將實驗結果影像化、數位化，以電腦軟體來分析比較，提高精確度與準確性。這也是一門新興的科技稱為「生物資訊」(Bio-informatics)。我所接受的研究訓練，與基因晶片的製作有密切的關係：

#### (一) 細胞株的培養

各種細胞株的培養對於生物醫學的研究非常重要。我首先培養的是老鼠纖維母細胞 (Swiss mouse fibroblasts) 叫做 3T3 cells。它具有細胞長眠的特性，當細胞在培養皿中分裂達到飽和 (稱之 confluent) 時，細胞便會靜止下來不再繼續分裂，若營養狀態供應足夠，3T3 cells 可以維持很久不變；假使將其中少許細胞分植到新的培養皿中加上培養液，它又會活化起來繼續分裂繁殖。第二種培養的細胞是人類白血病 T 型淋巴細胞 (Human leukemia T lymphoid cells) 叫做 Jurket cell。我們知道人類的組織樣本取得不易，非常寶貴。所以大部分的實驗室會用培養的細胞株先進行體外試驗 (In vitro)，再



決定是否進一步做活體試驗 (In vivo)。這些細胞株的第一代都是由志願者 (包括正常人或病患) 所捐獻的，培養成功後便成為生物醫學研究的材料。在數代繁衍過程中，細胞有可能發生基因突變，或經人為有目的地轉化細胞，改變基因特性而產生新型的細胞株，如此可以擴大研究的層面與多樣性。

(二) 解剖動物，摘取動物組織並作冷凍處理與保存。因實驗需要，我必須從不同種的實驗室老鼠身上取得十種器官組織，包括腦、心臟、肺臟、胸腺組織、肝臟、脾臟、腎臟、淋巴節、骨骼肌，雄性的睪丸及前列腺，或是雌性的子宮加卵巢。這些組織在低溫無菌的環境被迅速取出老鼠體內，於新鮮的狀態下立即以液態氮冷凍保存，以免核酸分子 (RNA&DNA) 降解變性。因為我具有解剖學的基礎，與共同操作的夥伴合作無間，為 Dr. Eugenia Wang 的實驗室儲存了大量的動物器官與組織，供應各種實驗所需。

(三) 從培養的細胞或冷凍的動物組織中萃取核糖核酸 (Ribonucleic acid, 簡稱 RNA)。RNA 分子非常不穩定，萃取 RNA 必須非常小心謹慎，整個過程一定要避免任何污染，預防核糖核酸分解酶 (RN-ase) 將 RNA 破壞分解掉。在 Dr. Eugenia Wang 實驗室採用的是 TriZOL 試劑法 (TriZOL method)。首先將培養達到飽和的動物細胞過濾掉培養液，清洗後加入一定比例的 TriZOL 試劑，以滴定

吸管將兩者混合均勻；或將先前急速冷凍的動物組織無菌切割成小塊，再加入一定比例的 TriZOL 試劑，以高速運轉的電動均質器（homogenizer）在低溫環境下將組織與 TriZOL 試劑混合均勻。接著利用化學分層與多次離心、沉澱、精鍊以及純化的過程，才能得到寶貴的 RNA 分子。尤其是傳訊者 RNA（messenger RNA）的使用範圍很廣，經特殊方法標記（labeling）後，可以作為生物晶片測試基因表達程度的探針（probe）；或是經過反轉錄（reverse transcription）反應產生互補性 DNA（complementary DNA 簡稱 c-DNA）。cDNA 乃是進行 DNA 聚合酶鏈反應（Polymerase chain reaction 簡稱 PCR）中不可或缺的元素之一。

（四）利用傳訊者 RNA 分子進行反轉錄反應（reverse transcription，簡稱 RT）。經過 TriZOL 法萃取並純化後的 RNA 分子為整體的 RNA 分子（Total RNA），包含了核糖體 RNA（Ribosome RNA）、搬運者 RNA（Transfer RNA）以及傳訊者 RNA（Messenger RNA）。其中只有傳訊者 RNA 能擔任反轉錄（reverse transcription）的工作，產生互補性 DNA（complementary DNA 簡稱 c-DNA）。簡單而言，反轉錄反應就是以傳訊者 RNA 為模板，選擇隨機或特定的引物（random primer or specific primer or Oligo-dT），加入 dNTPs（dATP, dTTP, dCTP and dGTP）作材料，同時需要非常重要的反轉錄酶

(Reverse transcriptase) 來催化反應的進行，譬如 M-MLV 就是一種常用的反轉錄酶。我曾經由反轉錄反應，合成各種組織的 cDNA，包括老鼠的腦、心、肺、肝、腎、脾、胸腺、骨骼肌及纖維母細胞等，並應用於許多分子生物實驗，對研究團隊有相當的貢獻。

(五) DNA 聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction 簡稱 PCR)。

在基因遺傳與其他分子生物學的研究上，PCR 的技術已經被廣泛運用。我們在 Dr. Eugenia Wang 的實驗室中，利用 PCR 的產物來製作基因晶片。首先針對想要研究的基因群，設計並選取適當的引物 (primers)，加上以下必需而重要的元素：1. 從各種組織得到的 cDNA 分子作為複製的模板；2. 複製 DNA 所需的材料 dNTPS；3. 觸發反應的酵素：DNA 聚合酶 (DNA Polymerase)，目前最通用的聚合酶就是 Taq polymerase. 4. 提供 PCR 最佳環境的緩衝液加上適當濃度的鉀離子與鎂離子。DNA 分子經 PCR 以等比級數複製增加，所得到的 PCR 產物稱之為 amplicons，將上百成千的 amplicons 純化並調整濃度後，打印到基因晶片的薄膜上，便可與想要偵測之標的物 cDNA 進行雜交試驗 (Hybridization)。結合成功的基因配對會在特殊染色下顯示出來，經過雷射掃瞄將影像數位化，再由特殊電腦程式進行分析、比較與統計。因為每一筆數位化的資料代表了數百甚至數千個基因，以個人憑肉眼判讀，紙筆計算根本不可能，不但耗時費力還容易出錯，絕

對需要精密週延的電腦軟體來輔助。所以目前新興了一門當紅的學科稱為生物資訊 (Bioinformatics)，借重電腦科技快速有效率的特性，來幫助生物醫學界分析日新月異，數量龐大的實驗數據和結果。不僅結省時間及人力，也達到同步篩檢、品質一致的目的；避免了因時、地或其它條件不同而比較實驗結果所產生的偏差。

#### 四、 研究心得與建議

##### (一) 初步成果與發現

在 Dr. Eugenia Wang 的實驗室已發展出非常穩定的方法，可同時自冷凍的動物組織或是新鮮的血液淋巴球細胞中提取 DNA 及 RNA (請參考附錄 1)。我也學到此方法並特別熟練 RNA 的萃取。我們曾將民國 88 年至 89 年間在台灣中北部收集到的長壽家族血液樣本與對照組的年輕族群血液樣本作仔細的比較，發現 DNA、RNA、蛋白質及淋巴球細胞的質與量，並不因年齡高低而有顯著的差別；表示高齡老人仍具有高品質的遺傳因子，這對研究者是一大振奮。我們進一步發現高齡老人的血液淋巴球細胞中，caspase-1 及 caspase-3 的 mRNA 表現較強。Caspase 基因群乃是導引細胞凋零過程中不可或缺的一環，這項有趣的發現似乎與遺傳訊息的調節有關，值得我們進一步研究。以上的研究結果，已分別發表在國際知名的老年醫學雜誌，請參考附錄 2 及附錄 3。

至於長壽相關基因的分類，大致有以下幾種假說：

1. 直接導致老化的基因，例如 p53。研究發現若提高 p53 的活性將會降低癌症的發生率，但同時卻也加快生物體的老化速率。
2. 影響或導致老化相關疾病的基因。例如 ApoE  $\epsilon$  4 與老年失智症之一的阿茲海默症（Alzheimer's disease）有密切關聯。
3. 有些基因能延長壽命至最大限度，並減緩老化過程。如類似果蠅體內的 daf gene.
4. 多形性的基因序位也會影響老化的速率。例如有些老化相關疾病如糖尿病不只由一處的基因變異造成，乃是由多處基因位點決定，並且影響程度高低不同。
5. 就算是同類與長壽相關的基因，在不同物種，影響壽命長短的程度也不同。
6. 有些基因會增加早年特殊疾病的發生率，如 CF 基因相關於囊性纖維瘤（Cystic fibrosis），多數患者凋零於青春期，使個體壽命減短，未能達到老年。另外一種基因也是因為增加幼年期特殊疾病的危險性，使老化現象提早出現，而縮短壽命。譬如 Werner's gene 與 Werner's disease 有關。

目前的老化學說認為，與老化相關的基因還涉及身體 DNA 的複製與修補，以維持體細胞的恆定。由於細胞不斷受到內生性

(endogenous) 及外源性 (exogenous) 的物質刺激，持續地造成 DNA 的損害，可能會影響 DNA 的複製與轉錄，降低基因的活性，使細胞產生保護反應，以細胞凋零 (apoptosis) 或進入長眠狀態 (senescence) 來維持身體功能正常運行。但是若當基因修補時發生錯誤，或是受損的 DNA 逕自進行複製與合併，則容易導致基因突變，增加罹患癌症或其他老年相關疾病的發生率。基因的研究也可以應用在表現型態較為複雜的老年相關疾病如阿茲海默症、巴金森氏症、骨質疏鬆症及糖尿病等等。評估這些複雜型的老年相關疾病必須考慮多基因的模式，勢將面臨更多的挑戰。

## (二) 未來的研究方向與目標

基因晶片技術的發展乃是生物醫學研究上的一大革新。自從西元 2000 年 6 月美國總統宣佈人類基因體 (Human genome) 初步完成定序與定位，直到今年 4 月正式圓滿達成基因體完整定序，使得生物醫學研究邁入後基因體時代 (Post-genomic era) 的新紀元。基因體的結構組成以及各個基因的位置名稱都成了共享的資源、公共的資訊，未來研究的方向將朝著發掘各個基因的功能與運作機制而努力。況且因為各家競爭激烈，尚待研究的基因又至少有三萬多，如何提昇實驗的速率和效率是非常重要的。基因晶片可幫助研究者同時分析比較數百或數千個基因，這些基因的名稱和基本結構及特性皆可從公開的基

因體資料庫中查閱得知，我們只要將想要研究探測的標的組織或細胞中的 RNA 提取出來，加以特殊標記並反轉錄成 cDNA，然後與基因晶片上整批的基因分子進行雜交試驗。特殊表達的基因會形成雜合子 (hybrid) 而在特殊染色下表現強訊號而被偵測出，再利用電腦程式軟體呈現影像，轉化為數據以便於比較分析，進一步作資料統計。

敝人自覺非常榮幸能加入 Dr. Eugenia Wang 實驗室的主力團隊—生物基因晶片團隊之中，雖然吃了不少苦，卻也收穫良多。即使我回到台灣，仍然與實驗室的伙伴們維持著合作關係與良好默契，他們依然視我為團隊的一份子。事實上，一個人埋頭苦思，單打獨鬥的研究時代已經過去；現代的科學研究講求團隊合作、資源交流與成果共享。國家衛生研究院獎助計畫的後三年，敝人將留在台中榮總家庭醫學科服務，並且持續研究工作。未來研究計畫的重點在於：

1. 繼續收集台灣地區長壽老人及其家族的個案，並同時從人群中收集個案作為對照組，經同意後採取血液樣本。先將新鮮血液淋巴球中的 RNA 萃取出來妥為保存 (必須冷凍在攝氏-80 度下)，或將 RNA 純化後反轉錄為 cDNA 較為穩定，以利隨時需要作 PCR 偵測特殊基因的表現。
2. 與 Dr. Eugenia Wang 的實驗室維持長久合作關係。先前合作研究已累積有 200 多個研究樣本，我們將繼續同一系列研究，不斷累

積研究個案，研究資源互相交流，擴大樣本數目使研究結果更利於統計分析，也提高可信度。成果共享一起發表於國際性的生物醫學科學雜誌，將有助於提昇本院的學術地位。

3. 向國內各研究單位多方請益，相互交換心得，並推動成立本土的生物基因晶片研究團隊。目前國內醫療學術單位僅有台大醫學院領導一組製作基因晶片的團隊；而商業公司製造供給基因晶片的技術仍未臻成熟。未來希望能集思廣益，各家學者交換經驗，因為基因晶片的製作成本很高，每一片都非常珍貴。而同樣重要的是基因晶片製作過程與實驗過程的品質管制與監控。每個過程皆是環環相扣，只要稍有疏忽失誤，就可能前功盡棄。每位參與過基因晶片團隊的人，都有寶貴的成功經驗與失敗教訓。應該拋開門戶之見，綜合大家所學，建立國內多功能的基因晶片製作團隊，不論在老年醫學、遺傳診斷、癌症基因檢測以及新藥研發方面，皆能各取所需，互為所用。如此才能提高國際競爭力，使我國的生物科技不落人後。

## 五、 結語

感謝國家衛生研究院提供如此難得的機會，及本院長官們苦心的栽培，讓我在臨床工作學習之外，還能到國際級的生化及分子生物學實驗室接受紮實的基礎醫學訓練，內心十分感激。特別感念已故前



家醫科主任王玉濤醫師，由於他的大力推薦，加上與 Dr. Eugenia Wang 多年合作所打下的研究基礎，使我一到美國 Dr. Eugenia Wang 的實驗室，便能很快進入狀況。因為研究樣本是從台灣收集取得，研究伙伴也曾來過台灣一起實地工作，相處融洽，無溝通障礙；並且幸運地加入其主力團隊—基因晶片研究小組。然而 Dr. Eugenia Wang 實驗室的水準相當高，研究經費多來自國家級的單位如美國國家衛生院（NIH），美國國家航空及太空總署（NASA）及美國國防部研究發展中心（DARPA）等；因此研究極為嚴謹，對實驗要求非常嚴格。我剛開始作實驗也曾屢敗屢戰，吃了不少苦，但也確實從根本學起，奠立良好的實驗基礎。路易威爾大學醫學院擁有全肯塔基州最豐富的醫療及學術資源，三家附屬的教學醫院皆為國家級醫學中心，彼此緊鄰、各有特色。其中路易威爾大學醫院以創傷（Trauma）急症醫療中心著名；猶太總醫院（Jewish General Hospital）的心肺醫學在全美國名列前茅，還完成全球首例人工心臟植入人體成功的創舉；此外另一家諾頓醫學中心（Norton medical center）則以手部整型外科馳名，成功完成手移植而被國際媒體爭相報導。因此路易威爾大學醫學中心區儼然成為美國中部一大醫療重鎮。然而其臨床醫療每一部門都有堅強的學術研究作為後盾，臨床醫師與醫學院教授經常碰面熱烈討論，並不一定都在正式的會議上，有時午餐時間精采的意見交流，反

而激發許多研究的點子。他們這種密切的互動與開放的討論令我印象深刻，非常值得我們學習。臨床與基礎結合，乃是現代醫學研究的潮流，兩者相輔相成。敝人將致力於老化機轉與長壽基因之研究，結合分子生物科技與臨床醫學應用，為國內老年醫學貢獻心力，竭盡所學。並向國內外相關研究單位或實驗室請益，交換心得，擴大視野，共同為人類謀求健康而長壽的生活而努力。

## 六、附錄

1. Riol H, Jeune B, Moskovic A, Bathum-L, Wang-E. Optimized lymphocyte protein extraction performed simultaneously with DNA and RNA isolation: application to the study of factors affecting DNA, RNA, and protein recovery from lymphocytes of the oldest individuals. *Anal-Biochem.* 1999; 275(2): 192-201.
2. Lacelle C, Riol H, Xu S, Tang YJ, Wang YS, Chuang YL, Lin HS, Chang MC, Liang J, Wang E. Blood-sample processing for the study of age-dependent gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002; 57(7): B285-7.
3. Lacelle C, Xu S, Wang E. Identification of high caspase-3 mRNA expression as a unique signature profile for extremely old individuals. *Mech Ageing Dev* 2002; 123(8): 1133-44