

DOI: 10.3724/cbls.2026099

CSTR: 32203.14.cbls.2026099

文章编号: 1004-0374(2026)06-1124-11



赵玉政, 华东理工大学讲席教授、博士生导师, 北京协和医学院博士生导师、药学院院长, 国家现代生物医药产业联合学院院长, 医工融合创新中心常务副主任, 上海市前沿科学研究基地主任, 中国医学科学院创新单元主任。研究方向是细胞代谢监测与生命健康, 主要研究成果发表在 *Nature Methods*、*Cell Metabolism* (4篇)、*Nature Metabolism* (2篇)、*Nature Protocols* (3篇)、*Nature Structural & Molecular Biology* (2篇)、*Developmental Cell*、*Science Advances* (2篇)、*PNAS*、*JCI* 等国际权威学术期刊; 授权或申请国内外发明专利 70 余项。研究成果在国际上产生重要影响, 被国际同行称为“颠覆性技术”, 目前已被来自哈佛大学、斯坦福大学、麻省理工学院、牛津大学、剑桥大学的 1000 多个国际一流研究机构实验室应用。

基于代谢分子探针的细胞衰老动态检测新方法

王傲雪^{1,2}, 池佼妮^{1,3}, 夏亚乐¹, 陈亚琼¹, 张 卓^{1,2*}, 赵玉政^{1,2*}

(1 华东理工大学药学院, 生物反应器工程全国重点实验室, 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地, 上海市新药设计重点实验室, 光遗传学与合成生物学交叉研究中心, 上海 200237; 2 中国医学科学院细胞代谢监测成像新技术创新单元, 北京 100730; 3 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院变态反应科, 疑难重症及罕见病全国重点实验室, 北京 100730)

摘 要: 细胞衰老蕴含复杂的机制, 包括端粒缩短、氧化损伤、炎症因子分泌、代谢重塑等。当前的突出问题是用于鉴定细胞衰老的生物标志物, 如常用的半乳糖苷酶染色、端粒长度分析、衰老相关分泌因子检测等, 均难以示踪细胞衰老过程中的动态变化以及刻画细胞之间的异质性。这里我们提出采用基于代谢分子探针的细胞衰老动态检测新方法。代谢重塑不仅是细胞衰老的标志物, 其在推动细胞衰老演变过程中也发挥了关键作用。采用基于遗传编码荧光探针的代谢示踪方法, 除了可以在单细胞、亚细胞水平原位实时地显示代谢衰老的动态变化, 还可以分析不同亚群中代谢与衰老之间的复杂联系, 是研究代谢衰老的强有力工具。本文聚焦与衰老密切相关的代谢物 NAD⁺、乳糖/半乳糖、 α -酮戊二酸和多胺, 总结其在机体和细胞衰老中的变化和函数, 以及相关遗传编码荧光探针的发展现状, 分析了针对关键衰老代谢物开发高性能探针面临的技术挑战, 并讨论了这些前沿工具在衰老代谢研究中的重要机遇。

关键词: 细胞衰老; 代谢重塑; 荧光蛋白探针; 代谢异质性; 动态监测

中图分类号: Q255; Q503 **文献标识码:** A

New methods for dynamic monitoring of cellular senescence based on metabolite biosensors

WANG Ao-Xue^{1, 2}, CHI Jiao-Ni^{1, 3}, XIA Ya-Le¹, CHEN Ya-Qiong¹, ZHANG Zhuo^{1, 2*}, ZHAO Yu-Zheng^{1, 2*}

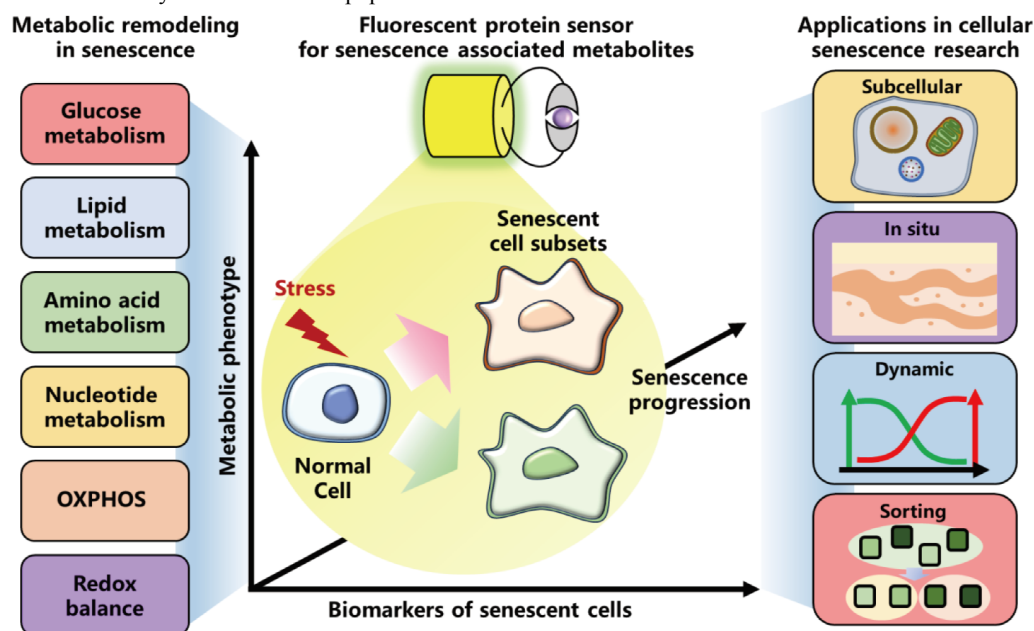
收稿日期: 2026-01-08; 修回日期: 2026-02-11

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFA0917700, 2023YFA1802000); 国家自然科学基金项目(32530064, 92457301, 32121005); 上海市“科技创新行动计划”(24HC2810700); 上海市自然科学基金项目(25ZR1402109); 教育部基础学科和交叉学科突破计划(JYB2025XDXM404); 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地; 上海高校 IV 类高峰学科建设项目; 中央高校基本科研业务费专项资金

***通信作者:** E-mail: zhangzhuo@ecust.edu.cn (张卓), yuzhengzhao@ecust.edu.cn (赵玉政)

(1 Optogenetics & Synthetic Biology Interdisciplinary Research Center, Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, Shanghai Frontiers Science Center of Optogenetic Techniques for Cell Metabolism, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2 Research Unit of New Techniques for Live-cell Metabolic Imaging, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 3 Department of Allergy, State Key Laboratory of Complex Severe and Rare Diseases, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Abstract: Cellular senescence can be induced through multiple mechanisms, including telomere shortening, DNA damage, replicative stress via oncogene activation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and metabolic remodeling. A prominent challenge in current research is that biomarkers commonly used to identify cellular senescence, such as cellular morphology remodeling, β -galactosidase activity, expression of key genes like p16, senescence-associated secretory phenotypes, and DNA damage foci, are difficult to use for tracking the dynamic changes of senescence in living cells or capturing phenotypic heterogeneity among cells. Here, we propose a novel metabolite-biosensor-based approach to dynamically detect cellular senescence. Metabolic remodeling is not only a hallmark of cellular senescence but also a crucial driver of its progression. By using genetically encoded fluorescent sensors, this method will not only enable real-time, in situ visualization of senescent cell phenotypes at the single-cell and subcellular level, but also offer new insights into the metabolic roots of cellular senescence, making it a powerful tool for studying metabolic senescence. Considering the universality and specificity of metabolites as senescence biomarkers, we highlight a few key metabolites closely associated with cellular senescence, including NAD^+ , lactose/galactose, α -ketoglutarate, and polyamines, and summarize their fluctuations and roles in organismal and cellular aging, as well as the current research status of fluorescent biosensors for these metabolites. We analyze the technical challenges in developing high-performance sensors for these metabolites and discuss the potential applications of these advanced tools in aging research, including in situ, dynamic monitoring of senescent cells and functional analysis of cellular subpopulations.



Key words: cellular senescence; metabolic remodeling; fluorescent protein sensor; metabolic heterogeneity; dynamic monitoring

1 细胞衰老标志物的现状和局限

细胞衰老是一种不可逆的细胞周期停滞状态,是细胞在响应各种内外源性应激信号时启动的一种至关重要的防御机制,其核心特征在于“生存但不再分裂”。最初,细胞衰老被认为是一种体外培养细胞

的固有限制,即Hayflick极限,但后续研究揭示,它在活体组织中同样广泛存在,扮演着复杂的生理与病理角色,也与个体衰老密切相关^[1]。然而需要指出,个体衰老一般指器官随着年龄增长发生的功能减退,与细胞衰老不完全相同。启动细胞衰老的常

见因素包括增龄相关的端粒缩短、药物诱导的DNA损伤、癌基因激活引起的复制胁迫,或比较强烈的氧化应激等,这些因素通过p53和p16途径传递关键的细胞周期进程停滞信号。然而,越来越多的研究发现,以细胞代谢重塑为核心的调节机制,包括代谢紊乱、线粒体功能障碍、氧化应激、内质网应激以及相关的表观遗传改变等,在细胞衰老进程中发挥了重要的作用^[2,3]。

在活体组织器官中,衰老细胞数目较为稀少,常常不到全体细胞的2%^[4,5]。因此,准确识别衰老细胞是研究细胞衰老生物学的基础。目前,科学家们确立了一系列细胞衰老生物标志物^[6](图1)。在细胞形态上,衰老细胞常常表现为细胞和核体积的增大,以及核膜皱缩。在细胞核内,细胞衰老常常伴随着形成致密DNA结构的异染色质以及DNA损伤位点—— γ -H2AX灶。在分子水平,衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)在pH 6.0条件下呈现活性上调是鉴定衰老细胞的一个常用标志。p21和p16^{INK4a}的表达水平升高也

是指示细胞衰老的常用标志,而衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)所包含的因子,如白介素6、白介素8、基质金属蛋白酶等,反映了衰老相关的功能变化。

然而,这些形态学、组织化学和分子生物学的标志物在特异性、细胞衰老状态的异质性和动态性几个方面面临挑战^[5]。并非所有 β -半乳糖苷酶活性,或者p16^{INK4a}/p21表达水平升高的细胞都是衰老细胞,如一些干细胞表现出SA- β -gal和p16染色阳性^[7]。由于不同诱因、不同类型细胞产生的衰老状态不同,细胞衰老表现出高度的异质性,而且不同阶段衰老细胞的标志物表达波动明显,展现出复杂的动态性^[2]。例如,衰老相关的异染色质主要发生在癌基因诱导的衰老模型中,而在复制性衰老或化疗诱导的衰老中可能不明显; γ -H2AX灶和衰老细胞分泌因子则表现出明显的动态变化^[8,9]。重要的是,组织染色和基因表达分析需要固定或者裂解细胞,因此难以在活细胞中进行连续示踪和功能分析。基于细胞代谢重塑在细

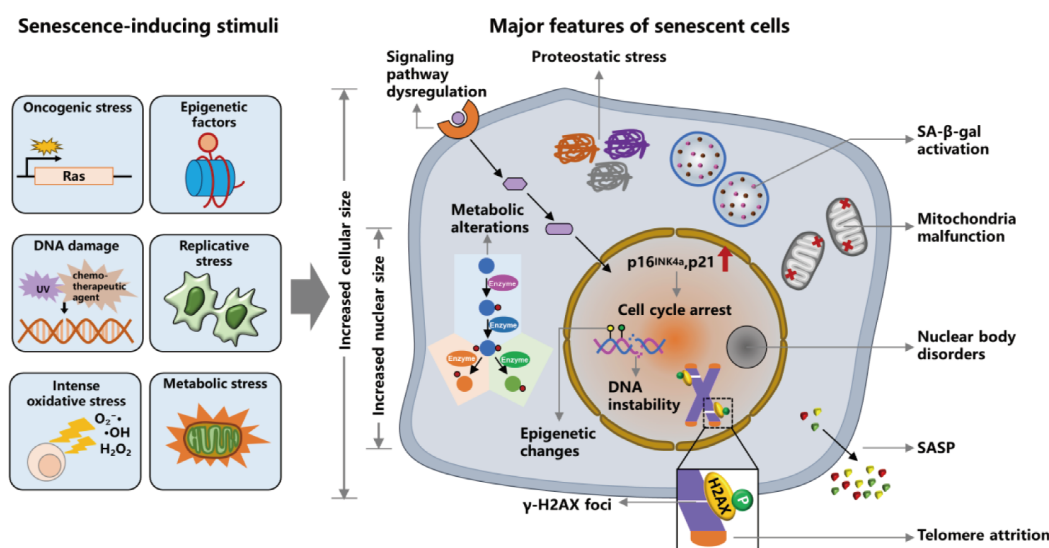


图1 细胞衰老诱导因素和主要特征

目前常见的细胞衰老诱导因素包括致癌基因激活、表观遗传失调、DNA损伤、复制应激、强烈的氧化应激或代谢应激等。衰老细胞的主要特征包括细胞体积增大和扁平形态改变、细胞周期抑制、p16和p21表达增加、因DNA损伤导致的 γ -H2AX积累、SA- β -gal活性增加,以及衰老相关分泌表型。其启动、建立和维持的机制复杂,其中基因组不稳定、表观遗传改变、信号通路失调、蛋白质稳态应激、代谢重塑发挥重要作用。

Figure 1 Inducing stimuli and major features of senescent cells

Established inducers of cellular senescence include oncogene activation, epigenetic dysregulation, DNA damage, replication stress, and severe oxidative or metabolic stress. Key biomarkers of senescent cells encompass morphological changes (typically increased size and flattening), cell cycle arrest, elevated expression of p16 and p21, γ -H2AX accumulation due to DNA damage, heightened SA- β -gal activity, and the senescence-associated secretory phenotype (SASP). The mechanisms underlying its initiation, establishment, and maintenance are complex, involving genomic instability, epigenetic alterations, dysregulated signaling pathways, proteostasis stress, and metabolic remodeling.

胞衰老中的关键调控作用,以及新型活细胞代谢时空分辨监测技术的发展,我们提出利用代谢分子探针示踪细胞衰老的新方法。

2 活细胞代谢监测技术是示踪细胞衰老的新方法

2.1 细胞衰老伴随广泛的代谢重塑

细胞衰老过程中发生广泛的物质和能量代谢变化^[10](图2A)。在葡萄糖、脂肪酸、氨基酸、核苷酸这四类主要生物分子中,葡萄糖转运蛋白和糖酵解酶在细胞衰老过程中通常上调^[11],但目前对不同细胞衰老诱导条件下糖代谢水平是否有一致的显著变化还没有坚实的结论,如诱导衰老细胞周期停滞的关键蛋白p53抑制糖酵解活动,而RB蛋白则促进糖酵解活动^[2,3]。脂质代谢方面的合成与分解失衡均有报道。衰老细胞常表现出脂肪酸和胆固醇合成通路的激活,一些特定的脂质代谢重编程,包括脂滴、3-磷酸甘油、磷脂酰乙醇胺的异常堆积,以及心磷脂和肉碱乙酰辅酶A的缺乏^[12-15]。脂肪

酸的 β -氧化过程则常常受损,长期的脂质积累可能通过脂毒性途径诱发内质网应激等,进一步加剧细胞的功能障碍并影响分泌表型^[16]。此外,有研究报道氨基酸是不同细胞衰老诱导条件下变化最显著的代谢物类型,而多种核苷酸丰度则在衰老细胞中下降^[17,18]。线粒体网络在衰老过程中常发生结构和功能退化,表现为氧化磷酸化效率下降、膜电位降低以及活性氧产生增加,形成氧化损伤与功能衰退的恶性循环^[3,8,18,19]。这种功能障碍不仅削弱了细胞的能量储备,同时也改变了乙酰辅酶A、 α -酮戊二酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)等关键代谢物的水平,这些代谢物是组蛋白乙酰化、甲基化等表观遗传修饰的重要底物或辅助因子,从而直接关联了代谢重塑与衰老相关的表观基因组改变^[2,20]。

2.2 活细胞代谢监测是示踪细胞衰老的潜在新方法

尽管细胞衰老过程中发生了广泛的代谢重塑,要找到能示踪细胞衰老的代谢标志物却非常困难。这是因为这些代谢标志物需要同时满足特异性和

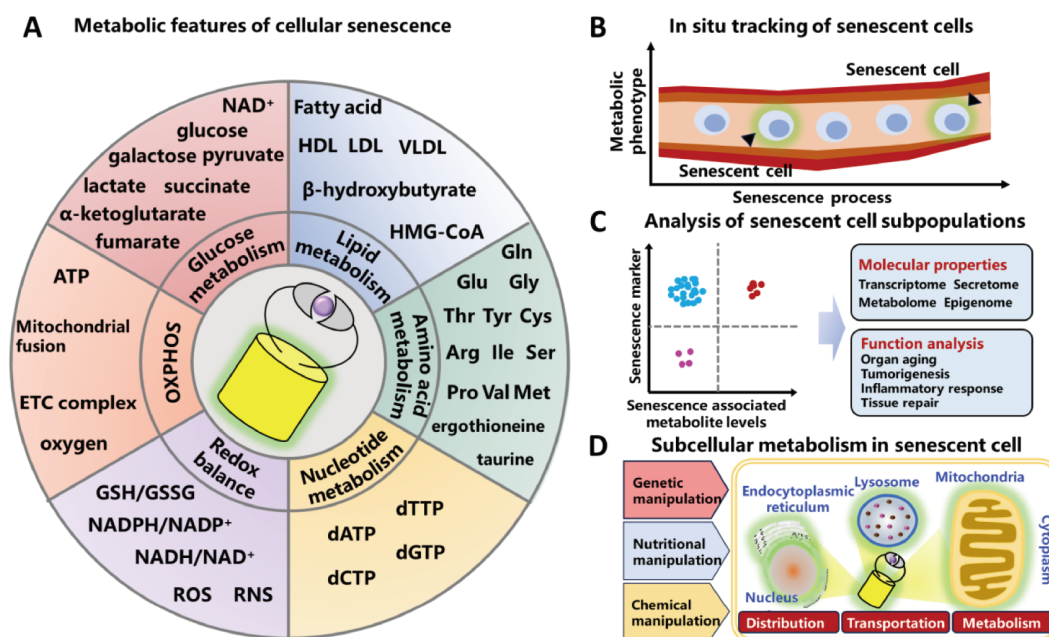


图2 活细胞代谢监测技术在细胞衰老研究中的应用

A:细胞衰老的代谢特征;B:利用荧光蛋白探针原位和实时示踪机体各器官和组织中的衰老细胞;C:联用经典衰老标志物和代谢分子探针建立衰老细胞亚群,分析其代谢、功能和分子机制;D:利用荧光蛋白探针解析衰老细胞的亚细胞代谢

Figure 2 The application of live-cell metabolic monitoring technology in cellular senescence research

A: Metabolic features of cellular senescence; B: In situ and real-time tracking of senescent cells in various organs and tissues using fluorescent protein sensors; C: Establishment of senescent cell subpopulations by joint use of classical senescence biomarkers and metabolite sensors, and analysis of the metabolism, function and molecular mechanism; D: Analysis of subcellular metabolism in senescent cells via fluorescent protein sensors

普适性的要求,这正是当前面临的关键挑战。首先,由于代谢与各种细胞功能活动密切相关,在衰老细胞中观察到的代谢改变也可能存在于其他非衰老的生理或病理状态中,因此要发现衰老细胞特异的代谢标志物并不容易。例如,很多成体干细胞与衰老细胞一样,表现出线粒体呼吸作用的降低^[21,22]。其次,正如前文所述,衰老细胞代谢高度依赖于细胞类型、组织来源、诱导衰老的具体方式(如复制性衰老、癌基因诱导或DNA损伤诱导)和衰老阶段,因此需要寻找不同衰老模型共有和特有的代谢变化特征。此外,识别和示踪在衰老过程中发挥“驱动”而非仅仅“伴随”作用的核心代谢物至关重要。这些代谢物通常是细胞能量状态、氧化还原平衡和生物合成的关键枢纽,它们的改变能够直接调控衰老相关的信号通路和表观遗传景观。后面我们将集中讨论几个在细胞衰老过程中发挥重要作用的代谢物。

基于遗传编码荧光探针的活细胞代谢监测技术为克服传统终点法检测在捕捉关键代谢物动态变化和异质性方面的局限提供了创新性的解决方案。这类探针能将目标代谢物的浓度实时转化为可定量检测的荧光信号,从而允许在单细胞和亚细胞分辨率下,无损、原位、动态地追踪代谢物在衰老启动、建立和维持不同阶段的波动。这将助力解析代谢变化与衰老的因果关系,并能揭示更加丰富的衰老细胞亚群间独特的代谢状态,直接关联其特定的分泌谱和生物学功能。

3 遗传编码荧光蛋白探针简介

代谢物遗传编码荧光蛋白探针是基于合成生物学理念设计构建的嵌合蛋白质,主要分为两类:一类是基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理设计创建,通常采用“三明治”结构,即一个代谢物结合蛋白连接FRET荧光蛋白;另一类则将代谢物结合蛋白直接与单个荧光蛋白融合,既可以将代谢物结合蛋白插入荧光蛋白的结构域之间,也可以将完整的荧光蛋白插入代谢物结合蛋白内部。代谢物结合后,蛋白质构象通常发生改变,引起与其融合的荧光蛋白的荧光光谱变化。设计这类探针时,常常采用环形排列的荧光蛋白(circularly permuted fluorescent protein, cpFP)。在cpFP中,荧光蛋白原始的N端和C端通

过一段多肽连接封闭起来,同时在荧光生色团(Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷)附近产生新的N端和C端,使得生色团对分子内微环境的感受更灵敏,从而提高探针的响应性。

探针荧光读出通常为荧光强度或者荧光寿命。其中荧光强度可以通过荧光显微镜、流式细胞仪和多功能酶标仪等常规仪器检测,是更为常用的荧光读出方式。FRET型探针具有一个激发光和两个发射光,以FRET效率,即两个发射光的比值作为读出。单荧光蛋白型探针包括强度型和比率型。强度型探针荧光光谱只有单个激发峰和单个发射峰,其荧光强度读出易受探针浓度(如活细胞中表达水平)和成像条件的影响。比率型探针荧光光谱具有“双激发、单发射”的特性,通常以两个通道的荧光比值作为读出,这类比率型输出可以用来定量报告代谢物的绝对浓度。荧光寿命读出则是描述激发态停留的平均时间,其优点是输出更为稳定,不过需要比较昂贵的设备和复杂的算法,较少使用。

代谢物遗传编码荧光探针的关键性能包括:对目标代谢物的特异性、亲和力,荧光响应的动态范围、响应速度和荧光亮度。首先,探针必须对目标分子具有特异性,即不响应结构类似物或其他分子产生的变化;其次,大动态范围、高响应速度和合适的亲和力可以使探针即时感应到更微小的目标分子涨落,由于生理病理状态下,很多代谢波动并不显著,探针灵敏度显然对于活细胞代谢监测的实际应用来说非常重要;最后,在活组织或者活体监测成像时需要高亮度的探针,这样才能获得信噪比较好的稳健的荧光读出。

探针在复杂组织或活体应用中面临技术挑战,包括穿透深度、光谱串扰、长期光毒性等。如目前已发展的荧光蛋白探针多基于黄绿色荧光蛋白,其激发和发射波长较短,在活体检测方面更适用于浅表组织。为了让探针在活组织或活体中有更理想的表现,研究人员采用波长更长的红色或近红外荧光蛋白,或使用荧光内窥镜进行荧光监测。多重代谢物示踪时,可能发生光谱串扰,这需要发展波长不同的多色荧光蛋白探针。相对于FRET型探针,单荧光蛋白探针更有利于进行多色代谢成像。另外,荧光蛋白内源表达通常没有毒性,但是长时程成像可能引起光毒性,可以采取长波长激发荧光蛋白(如iRFP713^[23]等),优化表达手段以提高表达量而降

低激发光强度,采用光片显微镜或双光子成像等方式降低光暴露。

4 发展细胞衰老关键代谢物的遗传编码探针技术

本节聚焦几个在细胞衰老过程中发挥重要作用的代谢物,总结讨论它们在细胞衰老代谢中的作用,及其探针研发现状和挑战。

4.1 NAD⁺

NAD⁺是氧化还原反应的核心辅酶,在细胞能量代谢和维持氧化还原稳态中发挥关键作用。哺乳动物细胞NAD⁺合成途径主要有三种,包括以色氨酸为底物的从头合成途径、依赖烟酰胺磷酸核糖转移酶的补偿途径,以及以烟酸为底物的Preiss-Handler途径。NAD⁺除了转变成NADH,还作为一些重要的酶底物被降解消耗,主要包括膜蛋白和胞外酶CD38、多聚ADP核糖聚合酶PARPs、SIRT蛋白家族,以及神经元中的NAD⁺水解酶SARM1,它们参与DNA修复、信号转导、轴突修复等过程。

NAD⁺水平在多种组织细胞的衰老过程中下降,这是NAD⁺合成减少和降解增加共同作用的结果^[24]。但是在人体大脑、精子、血液等组织器官中,NAD⁺的水平随着衰老并没有表现出明显的改变或者报道结果并不一致^[25]。慢性炎症诱导巨噬细胞上调胞外NAD⁺消耗酶CD38的表达,显著降低了NAD⁺的水平^[26]。重要的是,在多种物种中开展的实验均显示补充NAD⁺或者前体能延缓器官衰老^[24,25]。相似地,NAD⁺也能缓解细胞衰老表型,包括小鼠胚胎成纤维细胞、小胶质细胞,以及人体脑部分成纤维细胞等^[27-29]。其分子机制涉及NAD⁺增强线粒体代谢活动以及通过cGAS-STING途径减轻局部炎症等。

鉴于NAD⁺代谢在多种生理和病理过程中的关键作用,目前已经发展了多种可用于活细胞代谢监测的NAD⁺探针。包括基于单个荧光蛋白的LigA-cpVenus和FiNad探针^[30,31]、半合成探针NAD-Luc^[32]和NAD-Snifit^[33],以及基于BRET和FRET原理的NS-Goji、NS-Olive和NS-Grapefruit等系列探针^[32,34]。这些探针已应用于活细胞、亚细胞代谢监测。其中,FiNad探针可视化地展示了在复制性衰老细胞、端粒酶缺失早衰及自然衰老小鼠组织和细胞,以及不同年龄志愿者的人尿源干细胞中NAD⁺水平

的衰退^[31]。

4.2 乳糖和半乳糖

β -半乳糖苷酶催化乳糖水解产生半乳糖,其中,溶酶体的 β -半乳糖苷酶活性在衰老细胞中上调是被广泛认可且适用的衰老标志^[35]。已有研究表明,清除 β -半乳糖苷酶阳性的细胞能发挥抗衰老作用,我国科学家也开发了毒性极小的前药^[36,37]。 β -半乳糖苷酶活性被广泛用作细胞衰老的标志物,不过处于终末分化的神经元、巨噬细胞等健康细胞的溶酶体 β -半乳糖苷酶活性也会升高,而非哺乳动物细胞由于很少利用乳糖, β -半乳糖苷酶活性也难以作为非哺乳动物细胞衰老的标志物^[7]。

目前已开发了检测 β -半乳糖苷酶活性的化学小分子探针,包括开关型探针、比率型探针、聚集发光型探针、近红外二区探针等^[38]。不过,开发遗传编码的生物探针仍然是非常有必要的,这在长时间动态追踪方面有显著优势。目前尚未见报道乳糖/半乳糖的遗传编码探针。一些利用葡萄糖/半乳糖结合蛋白构建的探针对葡萄糖和半乳糖都表现出显著的响应,其底物特异性显然具有严重的局限性^[39]。将来需要发展乳糖和半乳糖的探针,尤其是能在生理浓度范围内测定乳糖和半乳糖比例的探针。

4.3 α -酮戊二酸

α -酮戊二酸是三羧酸循环中重要的二羧酸。它既可以由异柠檬酸或者谷氨酸经过脱氢反应产生,也可由谷氨酸转氨基反应合成。研究表明, α -酮戊二酸可延长线虫、果蝇及小鼠等模式生物的健康寿命,减缓器官衰老^[40,41],但其对细胞衰老的作用研究相对较少。我国科学家发现,补充 α -酮戊二酸可以减缓间充质干细胞和软骨细胞的衰老表型^[42,43]。 α -酮戊二酸可以通过多种途径发挥作用,除了经典的促进三羧酸循环和线粒体代谢外,也作为底物通过调节组蛋白去甲基化酶TET和DNA甲基转移酶影响表观遗传修饰,还可以通过直接结合线粒体ATP合酶和核糖体翻译调节因子,以及调节TOC信号途径等发挥作用^[40,43]。尽管 α -酮戊二酸的抗衰老作用较为清楚,其在细胞衰老以及机体衰老过程中的水平变化却依赖于细胞类型和环境刺激。例如有研究表明, α -酮戊二酸含量在化学诱导的衰老细胞中升高,而在砷诱导的精原细胞衰老中呈下降趋势^[44]。

目前已发展的 α -酮戊二酸荧光蛋白探针,包括PII-NAGK^[45]、OGsor^[46]、PROBS1-4^[47]、PII-TC3系

列^[48]、F-mT系列^[49]等FRET型探针,以及基于单荧光蛋白的探针mOGsor^[50]。但是,现有 α -酮戊二酸探针普遍在动态范围、 K_d 方面存在缺陷,且其应用未涉及细胞衰老相关代谢研究。因此,亟需开发高性能的,适用于哺乳动物 α -酮戊二酸原位实时动态检测的遗传编码荧光探针。

4.4 多胺

多胺类物质主要包含腐胺、亚精胺、精胺三种,它们均是精氨酸的分解代谢产物。多胺类物质延缓机体衰老作用已得到广泛认可,例如通过膳食补充亚精胺能增强心肌细胞的自噬和线粒体自噬,从而预防心脏肥厚病变和延缓衰老^[51];在分离的B细胞、牙周韧带干细胞和多种培养的细胞系中,亚精胺也可以通过羟腐胺化修饰等途径增强细胞自噬、蛋白质合成和线粒体呼吸,逆转细胞衰老^[51-54];补充精胺也能通过调节自噬缓解肾上皮细胞衰老^[55]。衰老过程常伴随多胺丰度下降,如肺上皮细胞在复制压力下进入细胞衰老状态,腐胺水平随之减少^[56];我国科学家的跨物种研究显示,多胺类物质的含量会随年龄增长而下降^[57]。

目前,针对多胺前体精氨酸,已经发展了FRET型^[58-61]和单荧光蛋白型探针^[62,63],其中STAR探针特异性好,对结构类似物均无响应,灵敏度高,在活细胞中可以对低至1 $\mu\text{mol/L}$ 的胞外精氨酸快速响应。应用该探针,我们发现基质细胞基因毒性药物诱导的细胞衰老过程,以及复制性衰老过程中精氨酸分解代谢增强,胞内丰度下降。剥夺精氨酸能够缓解细胞衰老特征,表现为下调衰老相关 β -半乳糖苷酶活性,减少DNA损伤标志物 γ -H2AX灶点累积,并抑制衰老相关分泌因子释放^[62]。但是,关于多胺只有一个基因回路型探针已被开发出来,它在mCherry和eYFP的编码序列中插入感应多胺而诱导翻译移码的RNA元件,被应用于活细胞中多胺的长时间示踪和转运修饰基因的筛选^[64]。

5 活细胞代谢监测技术在细胞衰老研究中的潜在应用

遗传编码荧光探针具有多种应用,这里我们从活体、单细胞、亚细胞三个层面讨论细胞衰老研究的问题:一是作为活体原位示踪工具,实时解析衰老过程中的代谢动力学与细胞异质性;二是作为活细胞荧光分选标记,实现基于特定代谢状态的衰老细胞

亚群分离,从而研究不同代谢状态与衰老细胞功能的深刻联系;三是通过结合遗传、营养、药理调控手段,研究衰老过程中亚细胞尺度代谢物分布、运输、代谢的调控规律(图2)。

5.1 原位动态示踪

衰老细胞的代谢状态并非恒定不变,而是随诱导因素、细胞类型、组织微环境及衰老阶段动态演变。一系列关键代谢物的探针,如监测氧化还原稳态和SIRT活性的 NAD^+ 探针、反映TCA循环通量和表观遗传调控底物水平的 α -酮戊二酸探针、指示溶酶体功能的乳糖/半乳糖探针、与自噬密切关联的多胺探针等,共同构成了一个强大的实时监测网络。

这些遗传编码的代谢物探针可以通过细胞类型特异的启动子或者组织特异性病毒载体实现不同组织特定细胞的原位标记(图2B)。与现有的细胞衰老遗传报告系统(如基于p16或p21的荧光报告基因)进行整合,可实现多参数活细胞成像。这允许我们直接探究一系列有趣的问题,例如,在复制性、癌基因诱导、药物损伤诱导条件下,关键代谢途径如何改变? 组织细胞在应激、代偿、损伤和修复期,常常伴随着细胞衰老的发生,利用代谢物探针,我们可以对不同细胞类型(如备受关注的成体干细胞、内皮细胞、神经元、皮肤成纤维细胞、造血细胞、免疫细胞等)的衰老代谢表型图谱进行绘制。此外,在细胞衰老启动时,是p16^{INK4a}/p21等的表达先上调,还是 NAD^+ 的下降或 α -酮戊二酸的波动先行? 在衰老建立和维持过程中,精胺或甲硫氨酸的代谢有何改变? 它们与衰老细胞基因组全局甲基化的变化有何关联? 利用探针在动态监测方面的优势,我们可以对上述问题进行直观阐释。

5.2 细胞亚群功能解析

清除衰老细胞通常可以作为一种抗衰疗法^[65],但也有研究表明,清除衰老细胞有时会加剧肝脏损伤,表明衰老细胞具有功能异质性^[66,67]。因此,对衰老细胞亚群进一步细分并明确其功能,将有助于衰老过程的精准干预。代谢通常是塑造这些不同功能表型的关键机制。因此,利用代谢物探针,进行基于代谢状态的亚群分选,有望解锁衰老细胞功能多样性。通过多色流式细胞术,我们可以同时依据衰老标志物和一种或多种代谢物探针的荧光强度或比率,对复杂组织样本中的细胞进行高维分选(图2C)。例如,利用代谢探针和衰老标志,可从纤维化

肝脏中同时分选出 $p16^+$ / NAD^+ -低、 $p16^+$ /半乳糖-乳糖比例高、 $p16^+$ / α -酮戊二酸-高、 $p16^+$ /多胺-低等不同的巨噬细胞或内皮细胞亚群。随之而来的核心科学问题是:这些代谢特征定义的亚群,其转录组、分泌组和表观遗传组有何独特特征?它们在促进器官衰老、肿瘤发生、炎症反应、组织修复、血管生成等过程中是否具有不同的功能?通过对比这些纯化亚群的功能,可以直接验证代谢状态如何决定衰老细胞的病理或生理功能。

需要说明的是,基于代谢分子探针的衰老示踪技术与现有技术能形成优势互补。例如,我国科学家开发了基于Dre/Cre双重组酶系统的衰老细胞遗传示踪与操控技术 Sn-cTracer。该技术依托 $p16$ 基因启动子活性,可依据基因表达的“历史记录”实现衰老细胞的永久标记与分离分选,示踪稳定性优异^[66]。而代谢物探针分选则基于细胞实时的“生理功能状态”,能动态反映细胞的代谢活性,识别出遗传标记相同但代谢状态和功能潜能迥异的亚群。将两种策略结合——例如,先用遗传系统标记 $p16^+$ 的特定细胞类型,再用代谢探针根据其 NAD^+ 或精氨酸水平进行亚群细分——将能构建出从基因激活程序到代谢状态以及生命功能活动的较为完整、精细的细胞命运图谱。

5.3 亚细胞代谢解析

随着真核细胞演化出多种膜包被细胞器,代谢活动呈现出复杂的区域化特征。不同亚细胞区室的代谢过程相对独立,同时区室间的物质交流活跃,这主要通过两种方式实现:一是依赖膜融合与囊泡运输的途径,二是更为普遍的代谢物直接穿梭机制,如营养物质的跨膜摄取与外排;此外,部分代谢物需先经区室特异性代谢转化,再通过间接方式完成转运,典型例子包括胞质与线粒体之间由苹果酸-天冬氨酸穿梭系统介导的 $NADH$ 转运,以及依赖丙氨酸-丙酮酸相互转化的跨区室运输。

在细胞衰老领域,亚细胞层面的代谢调控仍存在诸多亟待解决的科学问题。例如,尽管氧化还原损伤是驱动细胞衰老的核心因素之一,但不同亚细胞来源的活性自由基及其对应的抗氧化防御机制,对衰老进程的调控效应可能存在显著差异。这类自由基普遍具有半衰期短、易受生化检测流程干扰的特点,而基于特异性探针的实时原位监测技术,有望为精准解析其时空动态变化提供有效解决方案^[68]。

此外,已有研究证实,胞质与细胞核之间的 NAD^+ 竞争性分配可调控脂肪细胞分化,但对于 α -酮戊二酸、 NAD^+ 等兼具线粒体代谢功能与细胞核表观调控作用的多功能代谢物,其跨区室的分配机制与功能关联性仍缺乏系统性研究^[69]。具体而言, α -酮戊二酸作为依赖 Fe^{2+} / α -酮戊二酸的双加氧酶超家族(一类DNA 甲基化酶与组蛋白甲基化酶)的必需底物, NAD^+ 作为 PARP1/2介导的组蛋白多聚 ADP化修饰、SIRT 家族催化的蛋白质去乙酰化修饰,以及RNA的5'端 NAD^+ 加帽修饰的共同底物,上述代谢物在细胞衰老过程中如何实现亚细胞区室间的功能竞争与协同,是有趣的科学问题^[24,70]。此外,溶酶体作为负责蛋白质降解并生成氨基酸的代谢仓库,其氨基酸输出需与胞质、内质网及线粒体的蛋白质翻译过程高度协调——不仅要实现不同亚细胞区室间氨基酸利用效率的平衡,还需维持各类氨基酸的稳态丰度。鉴于蛋白质稳态失衡是细胞衰老的标志性事件之一,深入阐明亚细胞区室特异性的氨基酸代谢调控网络,对于揭示衰老的分子机制具有重要意义。

通过融合不同的亚细胞定位信号肽,遗传编码探针可以方便地实现亚细胞尺度的代谢示踪,这对于研究跨膜的动态运输过程是一项有力的技术手段。利用乳酸探针,我们发现在基质细胞衰老过程中,有氧糖酵解增强,乳酸生成和分泌增多,通过 $NADPH$ 氧化酶促进活性氧生成,进而促进SASP产生,而抑制乳酸产生可改善机体运动功能障碍,并预防年龄相关性衰弱^[71]。更重要的是,针对亚细胞区室间代谢物的转运与代谢调控研究,利用探针的定量荧光信号输出,能够高效开展高通量的遗传学与化学生物学筛选,揭示微妙的衰老代谢调控规律(图2D)。

6 总结与前瞻

综上所述,围绕 NAD^+ 、 α -酮戊二酸、乳糖/半乳糖、多胺等关键节点代谢物开发的遗传编码探针,为细胞衰老研究提供了前所未有的强大工具集。它们既是从事空维度解析衰老代谢动力学的“实时成像仪”,也是依据功能性代谢特征分离和解码衰老细胞异质性的“精密分选器”。

目前,代谢分子探针研发面临重要的机遇和挑战。首先,已发展的荧光蛋白探针大多基于绿色荧光蛋白或者黄色荧光蛋白,限制了其在深组织的应

用;其次,荧光蛋白探针开发流程仍依赖理性设计、定向进化、大量的突变文库筛选,效率有待进一步提高;最后,荧光蛋白探针的结合蛋白通常选择与底物结合的结构明确的蛋白质,对有些代谢物可选择范围非常有限。为此,基于深度学习和传统机器学习的方法为蛋白质的从头设计和定向进化提供了新的解决方案^[72,73]。此外,目前已开发出多种高通量筛选方法,包括基于液滴微流控技术的体外突变体生成、翻译和检测平台,以及借助自动化分析的活细胞水平探针筛选方法等^[74,75]。这些新技术有望加速代谢分子探针的开发。

已有荧光蛋白探针应用于衰老过程代谢研究。如前文所述,利用NAD⁺探针FiNad,我们对复制性衰老细胞模型、自然衰老小鼠模型和早衰小鼠模型,以及来自不同年龄人群的尿源干细胞样本中NAD⁺水平进行测定,均一致性地显示NAD⁺衰退^[31]。利用精氨酸探针STAR,我们揭示了复制性衰老和化疗药物诱导的细胞衰老模型中精氨酸水平的下调,而基于STAR-H的临床样本代谢物研究却揭示了血清精氨酸水平随着年龄的增长而逐渐增加^[62]。这种差异可能是血清精氨酸水平受到机体各组织器官代谢的影响,或者是由不同衰老诱导因素引起的,后续需要更加系统的研究。

未来,通过将这些探针与先进的遗传模型、单细胞多组学技术及活体成像技术深度整合,我们有望实现:(1)在多种衰老相关疾病模型中原位绘制“代谢-衰老”动态图谱,识别疾病特异性的代谢脆弱性;(2)鉴定驱动有害衰老表型(如强烈SASP)的关键代谢枢纽,并开发相应的代谢干预策略;(3)发现并利用特定有益衰老亚群(如促修复的内皮细胞)的独特代谢特征,促进组织再生。这将推动衰老生物学从现象描述向机制解析和精准干预的突破。

参考文献

- [1] de Magalhaes JP. Cellular senescence in normal physiology. *Science*, 2024, 384: 1300–1.
- [2] Nakao M, Tanaka H, Koga T. Cellular senescence variation by metabolic and epigenomic remodeling. *Trends Cell Biol*, 2020, 30: 919–22.
- [3] Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: Mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*, 2021, 3: 1290–301.
- [4] Moiseeva V, Cisneros A, Sica V, et al. Senescence atlas reveals an aged-like inflamed niche that blunts muscle regeneration. *Nature*, 2023, 613: 169–78.
- [5] Herman AB, Gorospe M. Molecular tools for analysing *in vivo* senescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25: 954.
- [6] Aging Biomarker Consortium, Bao H, Cao J, et al. Biomarkers of aging. *Sci China Life Sci*, 2023, 66: 893–1066.
- [7] de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, et al. Is senescence-associated β -galactosidase a reliable *in vivo* marker of cellular senescence during embryonic development? *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 623175.
- [8] Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab*, 2016, 23: 303–14.
- [9] Siddiqui MS, Francois M, Fenech MF, et al. Persistent gammaH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015, 766: 1–19.
- [10] Kim Y, Jang Y, Kim MS, et al. Metabolic remodeling in cancer and senescence and its therapeutic implications. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35: 732–44.
- [11] Liu B, Meng Q, Gao X, et al. Lipid and glucose metabolism in senescence. *Front Nutr*, 2023, 10: 1157352.
- [12] Yu DM, Jung SH, An HT, et al. Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*, 2017, 16: 773–84.
- [13] Song MJ, Park CH, Kim H, et al. Carnitine acetyltransferase deficiency mediates mitochondrial dysfunction-induced cellular senescence in dermal fibroblasts. *Aging Cell*, 2023, 22: e14000.
- [14] Tighanimine K, Nabuco Leva Ferreira Freitas JA, Nemazanyy I, et al. A homeostatic switch causing glycerol-3-phosphate and phosphoethanolamine accumulation triggers senescence by rewiring lipid metabolism. *Nat Metab*, 2024, 6: 323–42.
- [15] Liu X, Hartman CL, Li L, et al. Reprogramming lipid metabolism prevents effector T cell senescence and enhances tumor immunotherapy. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eaaz6314.
- [16] Yamauchi S, Sugiura Y, Yamaguchi J, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation drives senescence. *Sci Adv*, 2024, 10: eado5887.
- [17] Berardi D, Farrell G, AlSultan A, et al. Senescence cell induction methods display diverse metabolic reprogramming and reveal an underpinning serine/taurine reductive metabolic phenotype. *Aging Cell*, 2025, 24: e70127.
- [18] Wang Z, Ge S, Liao T, et al. Integrative single-cell metabolomics and phenotypic profiling reveals

- metabolic heterogeneity of cellular oxidation and senescence. *Nat Commun*, 2025, 16: 2740.
- [19] Desdin-Mico G, Soto-Hereder G, Aranda JF, et al. T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. *Science*, 2020, 368: 1371–6.
- [20] Smith HJ, Sharma A, Mair WB. Metabolic communication and healthy aging: Where should we focus our energy? *Dev Cell*, 2020, 54: 196–211.
- [21] Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 243–56.
- [22] Xu Y, Xie W, Zhang J. Metabolic regulation of key developmental events during mammalian embryogenesis. *Nat Cell Biol*, 2025, 27: 1219–29.
- [23] Humpton TJ, Hock AK, Kiourtis C, et al. A noninvasive iRFP713 p53 reporter reveals dynamic p53 activity in response to irradiation and liver regeneration in vivo. *Sci Signal*, 2022, 15: eabd9099.
- [24] Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, et al. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 119–41.
- [25] Vinten KT, Trętowicz MM, Coskun E, et al. NAD⁺ precursor supplementation in human ageing: Clinical evidence and challenges. *Nat Metab*, 2025, 7: 1974–90.
- [26] Camacho-Pereira J, Tarragó MG, Chini CCS, et al. CD38 dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through an SIRT3-dependent mechanism. *Cell Metab*, 2016, 23: 1127–39.
- [27] Hou Y, Wei Y, Lautrup S, et al. NAD⁺ supplementation reduces neuroinflammation and cell senescence in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via cGAS-STING. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2011226118.
- [28] Yang B, Dan X, Hou Y, et al. NAD⁺ supplementation prevents STING-induced senescence in ataxia telangiectasia by improving mitophagy. *Aging Cell*, 2021, 20: e13329.
- [29] Kasprzyk-Pawełec A, Tan M, Rahhal R, et al. Inactivation of the SLC25A1 gene during embryogenesis induces a unique senescence program controlled by p53. *Cell Death Differ*, 2025, 32: 818–36.
- [30] Cambronne XA, Stewart ML, Kim D, et al. Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD⁺. *Science*, 2016, 352: 1474–7.
- [31] Zou Y, Wang A, Huang L, et al. Illuminating NAD⁺ metabolism in live cells and in vivo using a genetically encoded fluorescent sensor. *Dev Cell*, 2020, 53: 240–52.
- [32] Yu Q, Pourmandi N, Xue L, et al. A biosensor for measuring NAD⁺ levels at the point of care. *Nat Metab*, 2019, 1: 1219–25.
- [33] Sallin O, Reymond L, Gondrand C, et al. Semisynthetic biosensors for mapping cellular concentrations of nicotinamide adenine dinucleotides. *Elife*, 2018, 7: e32638.
- [34] Chen L, Chen M, Luo M, et al. Ratiometric NAD⁺ sensors reveal subcellular NAD⁺ modulators. *ACS Sens*, 2023, 8: 1518–28.
- [35] Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 2006, 5: 187–95.
- [36] Cai Y, Zhou H, Zhu Y, et al. Elimination of senescent cells by beta-galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res*, 2020, 30: 574–89.
- [37] Dungan CM, Murach KA, Zdunek CJ, et al. Deletion of SA beta-Gal⁺ cells using senolytics improves muscle regeneration in old mice. *Aging Cell*, 2022, 21: e13528.
- [38] Yao Y, Zhang Y, Yan C, et al. Enzyme-activatable fluorescent probes for beta-galactosidase: From design to biological applications. *Chem Sci*, 2021, 12: 9885–94.
- [39] Li X, Wen X, Tang W, et al. Elucidating the spatiotemporal dynamics of glucose metabolism with genetically encoded fluorescent biosensors. *Cell Rep Methods*, 2024, 4: 100904.
- [40] Chin RM, Fu X, Pai MY, et al. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 2014, 510: 397–401.
- [41] Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, et al. Alpha-ketoglutarate, an endogenous metabolite, extends lifespan and compresses morbidity in aging mice. *Cell Metab*, 2020, 32: 447–56.
- [42] Ye X, Li X, Qiu J, et al. Alpha-ketoglutarate ameliorates age-related and surgery induced temporomandibular joint osteoarthritis via regulating IKK/NF-kappaB signaling. *Aging Cell*, 2024, 23: e14269.
- [43] Cui Z, Li J, Li C, et al. Identifying the target, mechanism, and agonist of alpha-ketoglutaric acid in delaying mesenchymal stem cell senescence. *Cell Rep*, 2025, 44: 115917.
- [44] Zhang XY, Zhang YH, Liang NN, et al. The m⁶A modification-mediated upregulation of ETS2 translation drives arsenic-induced spermatogonial senescence. *Free Radic Biol Med*, 2025, 240: 384–96.
- [45] Lüddecke J, Forchhammer K. From PII signaling to metabolite sensing: A novel 2-oxoglutarate sensor that details PII-NAGK complex formation. *PLoS One*, 2013, 8: e83181.
- [46] Zhang C, Wei ZH, Ye BC. Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in *Escherichia coli* cells by a fluorescence

- resonance energy transfer-based biosensor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 8307–16.
- [47] Chen HL, Bernard CS, Hubert P, et al. Fluorescence resonance energy transfer based on interaction of PII and PipX proteins provides a robust and specific biosensor for 2-oxoglutarate, a central metabolite and a signalling molecule. *FEBS J*, 2014, 281: 1241–55.
- [48] Lüddecke J, Francois L, Spät P, et al. PII protein-derived FRET sensors for quantification and live-cell imaging of 2-oxoglutarate. *Sci Rep*, 2017, 7: 1437.
- [49] Chen HL, Latifi A, Zhang CC, et al. Biosensors-based in vivo quantification of 2-oxoglutarate in cyanobacteria and proteobacteria. *Life*, 2018, 8: 51.
- [50] Zhang C, Ye BC. A single fluorescent protein-based sensor for in vivo 2-oxoglutarate detection in cell. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 15–9.
- [51] Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med*, 2016, 22: 1428–38.
- [52] Jiang X, Baig AH, Palazzo G, et al. P53-dependent hypusination of eIF5A affects mitochondrial translation and senescence immune surveillance. *Nat Commun*, 2024, 15: 7458.
- [53] Zhou Y, Wang D, Xiao Q, et al. Spermidine alleviates diabetic periodontitis by reversing human periodontal ligament stem cell senescence via mitophagy. *Free Radic Biol Med*, 2025, 227: 379–94.
- [54] Zhang H, Alsaleh G, Feltham J, et al. Polyamines control eIF5A hypusination, TFEB translation, and autophagy to reverse B cell senescence. *Mol Cell*, 2019, 76: 110–25.e9.
- [55] Luo D, Lu X, Li H, et al. The spermine oxidase/spermine axis coordinates ATG5-mediated autophagy to orchestrate renal senescence and fibrosis. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11: e2306912.
- [56] Vasiliogiannakopoulou T, Begou O, Karali CS, et al. Putrescine functions as a metabolic checkpoint in replication stress-induced senescence. *Cell Mol Life Sci*, 2025, 82: 410.
- [57] Liu Z, Li W, Geng L, et al. Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor. *Cell Discov*, 2022, 8: 6.
- [58] Bogner M, Ludewig U. Visualization of arginine influx into plant cells using a specific FRET-sensor. *J Fluoresc*, 2007, 17: 350–60.
- [59] Okada S, Ota K, Ito T. Circular permutation of ligand-binding module improves dynamic range of genetically encoded FRET-based nanosensor. *Protein Sci*, 2009, 18: 2518–27.
- [60] Whitfield JH, Zhang WH, Herde MK, et al. Construction of a robust and sensitive arginine biosensor through ancestral protein reconstruction. *Protein Sci*, 2015, 24: 1412–22.
- [61] Vanoaica L, Behera A, Camargo SM, et al. Real-time functional characterization of cationic amino acid transporters using a new FRET sensor. *Pflugers Arch*, 2016, 468: 563–72.
- [62] Li R, Li Y, Jiang K, et al. Lighting up arginine metabolism reveals its functional diversity in physiology and pathology. *Cell Metab*, 2025, 37: 291–304.
- [63] Wang C, Zhang X, Mao H, et al. Development of a genetically encoded sensor for arginine. *ACS Sens*, 2025, 10: 1260–9.
- [64] Sharma P, Kim CY, Keys HR, et al. Genetically encoded fluorescent reporter for polyamines. *Nat Commun*, 2025, 16: 4921.
- [65] van Deursen JM. Senolytic therapies for healthy longevity. *Science*, 2019, 364: 636–7.
- [66] Zhao H, Liu Z, Chen H, et al. Identifying specific functional roles for senescence across cell types. *Cell*, 2024, 187: 7314–34.
- [67] Cheng N, Kim KH, Lau LF. Senescent hepatic stellate cells promote liver regeneration through IL-6 and ligands of CXCR2. *JCI Insight*, 2022, 7: e158207.
- [68] Murphy MP, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab*, 2022, 4: 651–62.
- [69] Ryu KW, Nandu T, Kim J, et al. Metabolic regulation of transcription through compartmentalized NAD⁺ biosynthesis. *Science*, 2018, 360: eaan5780.
- [70] Wolfram-Schauerte M, Hofer K. NAD-capped RNAs-a redox cofactor meets RNA. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48: 142–55.
- [71] Dou X, Fu Q, Long Q, et al. PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy. *Nat Metab*, 2023, 5: 1887–910.
- [72] Unger EK, Keller JP, Altermatt M, et al. Directed evolution of a selective and sensitive serotonin sensor via machine learning. *Cell*, 2020, 183: 1986–2002.
- [73] Koh HY, Zheng Y, Yang M, et al. AI-driven protein design. *Nat Rev Bioeng*, 2025, 3: 1034–56.
- [74] Lin C, Liu L, Zou P. Functional imaging-guided cell selection for evolving genetically encoded fluorescent indicators. *Cell Rep Methods*, 2023, 3: 100544.
- [75] Koveal D, Rosen PC, Meyer DJ, et al. A high-throughput multiparameter screen for accelerated development and optimization of soluble genetically encoded fluorescent biosensors. *Nat Commun*, 2022, 13: 2919.