

原花青素 B2 通过 Akt/FoxO4 通路拮抗内皮细胞衰老的实验研究

熊海容¹, 段丽¹, 李聪¹, 魏承亮², 韩美文², 张长城², 袁丁^{2,3}, 刘朝奇^{1*}

¹肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学;

²三峡大学医学院, 宜昌 443002; ³三峡大学仁和医院, 宜昌 443001

摘要: 研究原花青素 B2 (PCB2) 对内皮细胞衰老的调控作用, 探讨其可能的分子机制。以棕榈酸 (PA) 50 $\mu\text{mol/L}$ 处理胰岛内皮细胞 MS-1 建立细胞衰老模型, 根据细胞活力、 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 染色以及细胞周期相关基因的表达来评估内皮细胞衰老; 同时加入 PCB2 干预, 检测衰老相关指标及 Akt/FoxO4 通路的蛋白表达水平的变化情况。MS-1 细胞经 PA 处理后 SA- β -Gal 阳性细胞增加, 细胞周期相关基因 p53 和 p21 上调显示细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 表明 PA 处理后能诱导内皮细胞衰老发生; 经 PCB2 (50 $\mu\text{g/mL}$) 干预后能够有效改善 PA 诱导的细胞衰老。相比于正常组, 经 PA 处理后抑制 Akt 活化, 其表达由胞核转至胞浆, 在胞核中表达明显减少; 导致 Akt 下游信号 FoxO4 的磷酸化降低, 使其在细胞核中明显增加; 而应用 PCB2 (50 $\mu\text{g/mL}$) 处理后能有效逆转这一现象; PCB2 对棕榈酸诱导的内皮细胞衰老有明显的保护作用, 其可能通过 Akt/FoxO4 信号通路发挥调控作用。

关键词: 细胞衰老; 原花青素 B2; 内皮细胞; Akt; FoxO4

中图分类号: R966

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.11.006

Protective Effects of Procyanidin B2 against Palmitic Acid-Induced Endothelial Cell Senescence through Akt/FoxO4 Pathway

XIONG Hai-rong¹, DUAN Li¹, LI Cong¹, WEI Cheng-liang², HAN Mei-wen²,
ZHANG Chang-cheng², YUAN Ding^{2,3}, LIU Chao-qi^{1*}

¹Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University;

²Medical College, Three Gorges University, Yichang 443002, China;

³Renhe Hospital, Three Gorges University, Yichang 443001, China

Abstract: To investigate the protective effects of Procyanidin B2 against hyperlipidemia mediated endothelial cell injury the cellular senescence model was established through saturated fatty acid in vitro. Pancreatic islet endothelial cells (MS-1) were treated with palmitic acid (PA) at 50 $\mu\text{mol/L}$ to establish the senescence model, which were evaluated based on cell viability, senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining and expression of cell cycle-related genes. To investigate the senescence mechanism of the endothelial cells the proteins related Akt/FoxO4 signaling pathway were detected by immunofluorescence assay. And intervention of cellular senescence by PCB2 was simultaneously studied. The positive cells of SA- β -Gal staining were significantly increased in the MS-1 cells treated with PA. The cell cycle-related genes p21 and p53 were up-regulated which indicated the cell cycle arrest in G0/G1 phase. After intervention with PCB2 (50 $\mu\text{g/mL}$), cellular senescence could be effectively improved by decreasing p21 and p53 expression. Compared with the control, PA treatment promoted Akt translocation from nucleus to cytoplasm, and FoxO4 translocation into the nucleus. While PCB2 (50 $\mu\text{g/mL}$) could effectively reverse the translocation of Akt and FoxO4 with PA treatment. PCB2 has a significant protective effect on palmitic acid-induced endothelial cellular senescence, and its possible mechanism may be regulated by the Akt/FoxO4 signaling pathway.

收稿日期: 2018-04-09 接受日期: 2018-09-13

基金项目: 国家自然科学基金 (8147346); 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室 (三峡大学) 开放基金 (2015KZL13, 2015KZL05, 2016KZL06)

* 通信作者 Tel: 86-717-6397979; E-mail: ctgulcq@163.com

Key words: cellular senescence; procyanidin B2; endothelial cells; Akt; FoxO4

细胞衰老表现为一种稳定的细胞周期停滞,驱使生物体逐渐衰退的复杂生理和病理过程。血管内皮细胞衰老与心血管相关的诸多疾病包括心脏衰竭,糖尿病,动脉粥样硬化性疾病等密切相关,衰老细胞的主动分泌和旁分泌信号通路在心血管疾病的发生发展中起着重要作用^[1,2]。因此通过改善内皮细胞的衰老成为预防与治疗心血管相关疾病的有效措施。

原花青素 B2 (Procyanidin B2, PCB2), 作为原花青素的结构类型之一, 是一种纯天然的多酚化合物, 其具有显著的抗氧化活性^[3]。原花青素是包括 A 型和 B 型两种结构类型的化合物, 其特殊结构由儿茶素和表儿茶素经 C4-C6, C4-C8 多聚合而成。该类化合物存在于日常生活中多种水果及蔬菜中, 对于其药理学活性已有很多报道, 参与多个信号通路, 如 PI3K/Akt、AMPK、ERK 的调节, 在改善代谢性相关疾病如糖尿病, 脂质代谢, 炎症疾病, 癌症, 氧化应激及衰老等具有重要作用^[4], 可参与改善糖尿病中的脂质代谢, 减少肝脏中脂质合成及增加脂肪酸 β -氧化, 可减弱衰老小鼠体内的氧化应激, 对衰老小鼠的学习记忆能力有明显改善^[5,6]。提示 PCB2 对于代谢性疾病与改善衰老具有重要意义。

本文以胰岛内皮细胞株 MS-1 模拟体内血管内皮细胞, 利用棕榈酸建立细胞衰老模型, 使用 PCB2 不同剂量对衰老细胞的干预作用, 并研究其发挥作用可能的机制, 为延缓与改善心血管疾病的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验细胞

MS-1 细胞株, 正常小鼠胰岛内皮细胞, 购买自中国科学院细胞典藏中心上海细胞库。

1.1.2 试剂

DMEM 培养基 (Gibico 公司, 美国); 原花青素 B2 单体粉末 (成都指标化纯生物技术有限公司); 棕榈酸 (sigma 公司, 美国); 多聚甲醛粉末 (国药集团化学试剂有限公司); 牛血清蛋白 (组分 V) (武汉科瑞生物技术有限公司); 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠 (国药集团化学试剂有限公司); 总 RNA 提取试剂盒, 逆转录试剂盒 (大连宝生物科技有限公司); PCR 引物 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成);

JNK (#9252) (cell signaling 美国; 兔多抗); Akt (#2920) (cell signaling 美国; 鼠单抗); FoxO4 (ab63254) (abcam 公司 英国; 兔多抗); Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Mouse IgG (H + L), Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L) (上海优宁维生物科技有限公司); β -半乳糖苷酶检测试剂盒 (GMS10012.1 v. A) (上海杰美基因医药科技有限公司)。

1.1.3 仪器与设备

梯度 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 德国); Gene Genius 凝胶分析系统 (SYNGNE 公司, 英国); Gellologic 200 凝胶成像分析系统 (Kodak 公司, 美国); DU730 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter 公司, 美国); Confocal 共聚焦显微镜尼康 AIR + (尼康公司, 日本)。

1.2 试验方法

1.2.1 内皮细胞的培养

配制 DMEM 培养基, 按照体积比 10:1 加入 FBS, 体积比 100:1 加入青霉素和链霉素双抗配制成为 10% FBS DMEM 培养基; 在 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养, 当细胞密度达到 90% 左右可进行细胞传代。

1.2.2 棕榈酸 (PA) 的配制

称取 1.2 g BSA 加入 3 mL PBS, 55 °C 充分溶解配制成 40% BSA 溶液; 称取 0.04 g NaOH 溶解于 10 mL 双蒸水中配制成 0.1 M NaOH; 称取 0.030 7 g PA 固体粉末加入 3 mL 0.1 M NaOH, 在 75 °C 中水浴皂化 30 min ~ 1 h 至溶液呈现无色透明状, 而后趁热加入 3 mL 40% BSA 溶液, 在 55 °C 下助溶 30 min ~ 1 h, 使其完成溶解, 冷却至室温后呈现棕黄色澄清状液体, 即得 20 mM PA 溶液, 经 0.22 μ m 微孔滤器过滤后, 保存于 4 °C 冰箱。

1.2.3 内皮细胞衰老模型的建立

将处于对数生长期的 MS-1 细胞接种于 6 孔板中, 待 12 h 培养贴壁后, 加入 PA 50 μ mol/L 处理 3 天, 收集细胞提取总 RNA 检测细胞周期相关基因如 p21、p53、CDK4 等的表达以及通过 β -Gal 染色法验证衰老的建立情况。

1.2.4 MTT 技术检测 PCB2 对 MS-1 细胞活力的影响

将处于对数生长期的 MS-1 细胞接种于 96 孔板中, 每孔接种细胞 5 000 个, 待 12 h 培养贴壁后, 分别加入 12.5、25、50、100、200、300 μ M 的浓度梯度

的 PCB2, 在 5% CO₂, 37 °C 孵育 24 h, 向每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后终止培养, 弃上清后每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 室温条件下置于摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD 490 nm 或 570 nm 处测量各孔的吸光值。

1.2.5 β-Gal 染色法检测衰老情况

将处于对数生长期的 MS-1 细胞接种于 6 孔板中, 待 12 h 培养贴壁后, 加入 PA 50 μmol/L 处理 3 天, 显微镜下观察细胞生长状态长至 80% ~ 90% 时终止培养, 去掉培养基, 加入 PBS 冲洗 3 遍后, 按照 GENMED 细胞衰老特异性 β-半乳糖苷酶检测试剂盒产品说明书的操作步骤进行染色, 在光学显微镜下观察和计数;

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences used for real-time PCR assay

基因 Gene	引物序列 Prime sequence	扩增长度 Amplification length
P53	Sense: 5' ATGAACCGCCGACCTATCC3' Antisense: 5' GGCAGGCACAAACACGAA3'	97 bp
P21	Sense: 5' ACCCTTGTGCCTCGCTCA3' Antisense: 5' CCGCGTTTGGACTGGTAGAA3'	116 bp
CDK4	Sense: 5' GAATTGCCTCCAGAAAGACGAC3' Antisense: 5' AAAGCTCAGCATTTCCACTAGCAG3'	144 bp
GAPDH	Sense: 5' GGTGCTCTCTCGGACTTCAA 3' Antisense: 5' CCACCCTGTGCTGTAGCC 3	134 bp

1.2.7 免疫荧光法检测 FoxO4, Akt, JNK 蛋白的表达情况

将处于对数生长期的 MS-1 细胞接种于 8 孔板中, 待 12 h 培养贴壁后, 加入 PA 50 μmol/L 和 PCB2 50 μg/mL 处理 3 天后, 终止培养, 去掉上清, 加入 PBS 冲洗 3 遍后, 加入新鲜配制的 4% 多聚甲醛室温固定 30 min 后, 加入 PBS 冲洗 3 遍, 5 min/遍; 加入以 1% BSA, 0.2% TritonX-100 配成的破膜剂冰上破膜处理 15 min, 加入 PBS 冲洗 3 遍, 5 min/遍后, 加入 5% BSA 37 °C 封闭 1 h 后, 以 PBS 配制一抗 (FoxO4 1:500, Akt 1:200, JNK 1:200) 4 °C 孵育过夜, 次日 37 °C 水浴复温 90 min, 加入 PBS 冲洗 3 遍, 5 min/遍; 以 PBS 配制荧光二抗 (R488 1:400), 37 °C 水浴孵育 1 h, 加入 PBS 冲洗 3 遍, 10 min/遍后, 室温下复染 DAPI 5 min, 加入 PBS 冲洗 3 遍, 5 min/遍后, 加上盖玻片, 以抗荧光淬灭剂封片, 可用于共聚焦显微镜下观察蛋白表达情况。

1.2.8 数据处理

根据上述的实验数据采用 SPSS 18.0 软件来进

1.2.6 RT-PCR 检测细胞 p53, p21, CDK4 的表达

收集正常组, PA 组, PCB2 不同浓度的处理组细胞, 裂解细胞并提取细胞的总 RNA, 电泳检测 RNA 的完整性。利用核酸仪测定不同组别提取的 RNA 浓度, 使用逆转录试剂盒再逆转录得到 cDNA。以 GAPDH 为内参, 经 PCR 反应扩增目的基因。PCR 的反应体系为 25 μL 体系, 体系比例为 2 × PCR Master mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL, p53、p21 或 CDK4 引物 1 μL, cDNA 1 μL。RT-PCR 实验反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 5 min, 4 °C 保存; 经 PCR 反应程序结束后, 配制 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统检测, 分析条带的灰度值, 计算 p53、p21、CDK4 与 GAPDH 的相对表达量, 进行统计学分析。

行统计学分析, RT-PCR 的凝胶成像结果利用 Image J 软件分析后数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示; 而且利用单因素方差分析组间数据差异, 以 $P < 0.05$ 判定为具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCB2 对内皮细胞生长活性的影响

应用 MTT 实验方法检测不同浓度的 PCB2 药物对 MS-1 细胞活力的影响如图 1。活细胞中线粒

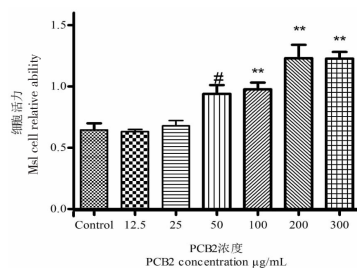


图 1 不同浓度 PCB2 对 MS1 细胞活力的影响 ($n = 6$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of PCB2 on MS1 by MTT ($n = 6$)

体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为不溶性的蓝紫色甲瓚,二甲基亚砷能溶解细胞中的甲瓚,且在 490 nm 波长处可检测其吸光度。试验结果显示在 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$) 时可明显增加细胞活力,结合浓度增大对细胞的毒性随之增加,在后续实验中采用 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为实验的最佳浓度。

2.2 PCB2 改善棕榈酸诱导内皮细胞衰老

有研究报道,PA 构成甘油三酯中大部分游离脂

肪酸,可诱导肝细胞中的脂质积聚并导致细胞衰老^[7],在本实验中同样用 PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理内皮细胞诱导细胞衰老模型。细胞衰老的特征之一是衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色阳性。本试验结果显示,PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理后 MS-1 细胞的 SA- β -Gal 阳性细胞着色增加;经过 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后可明显改善衰老的阳性表达。

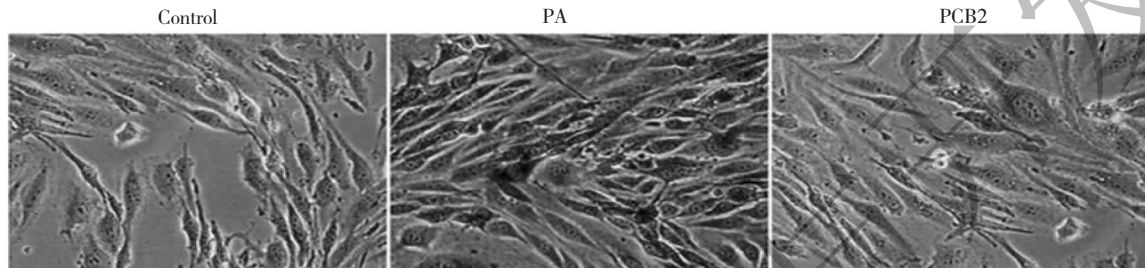


图 2 SA- β -Gal 阳性表达比较(200X)

Fig. 2 Comparison of the staining of SA- β -Gal

2.3 PCB2 调节棕榈酸诱导内皮细胞衰老相关基因表达

经过半定量 PCR 检测细胞周期相关基因的表达如图 3,试验结果显示,相比于正常组,PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理细胞后可见细胞周期相关基因 p21、

p53、CDK4 的表达增加($P < 0.01$),而 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后表达明显降低($P < 0.01$);而相对于 PCB2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对衰老细胞的改善情况,PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 呈现出更显著的效果($P < 0.01$),在后续试验中采用 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行实验。

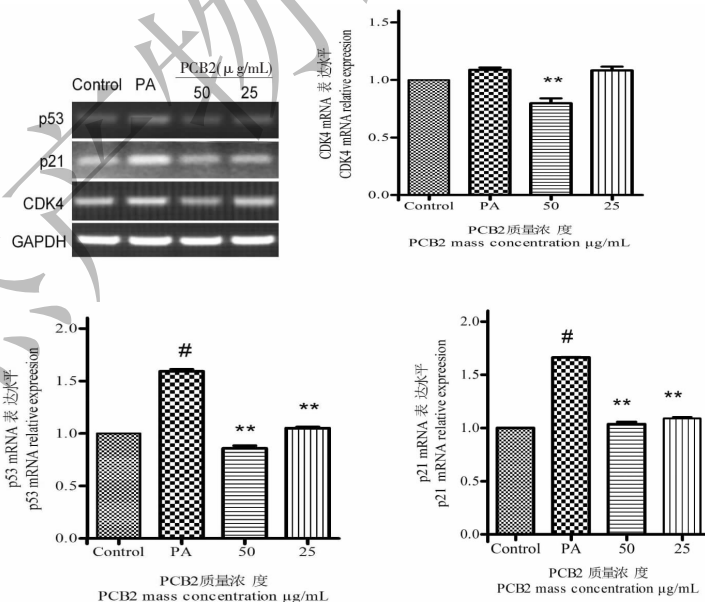


图 3 RT-PCR 检测 p53、p21 和 CDK4 的表达情况

Fig. 3 Expression of p53,p21,CDK4 by RT-PCR

2.4 PCB2 对衰老细胞中 FoxO4 蛋白表达的影响

PCB2 处理后 MS-1 细胞中 FoxO4 蛋白的表达

情况如图 4。相比于正常组,PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理后 FoxO4 的表达在胞核中增加,而 PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ +

PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理能够有效逆转这一现象(可见红色荧光);相比于正常组,PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理组的

细胞核体积增大,亮度增加,而 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后恢复至正常组的细胞核。

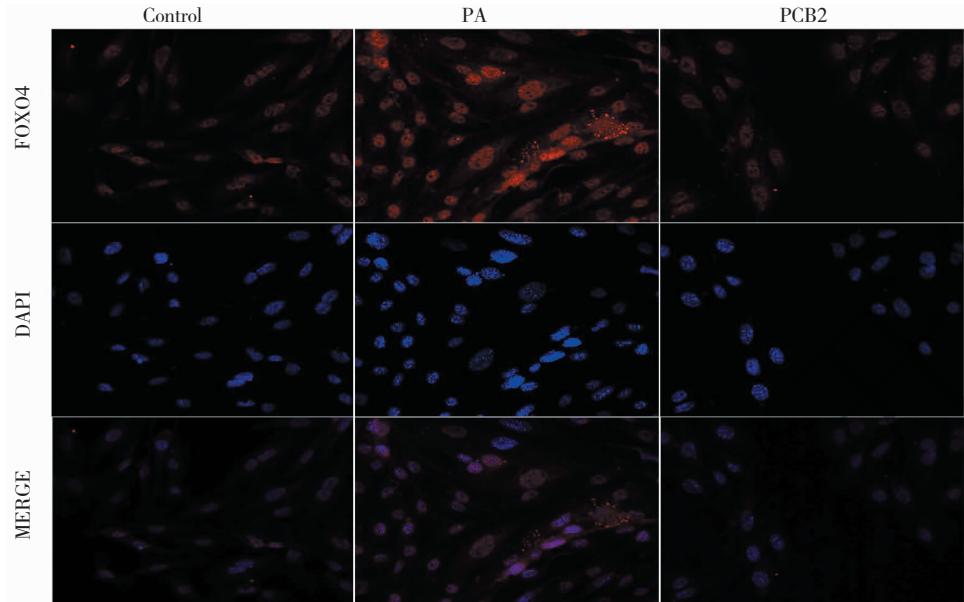


图4 免疫荧光法检测 FoxO4 蛋白的表达(200X)

Fig. 4 Expression of FoxO4 protein on level of MS-1 cell by confocal

2.5 PCB2 调节衰老细胞的 Akt/JNK 蛋白表达

PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对于由 PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 诱导衰老细胞中 Akt/JNK 蛋白表达的影响如图 5。相对于正常组,PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理组的 Akt 的表达由胞核转至胞浆,呈现表达均匀的状态;相比于 PA 组,PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后 Akt 的表达在胞核中增加,

恢复至正常组表达水平;相比于正常组,PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理组 JNK 的表达在胞核中增加,而用 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后出现空核现象,在胞核中的表达水平降低。综合以上试验结果说明 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 参与对 Akt/FoxO4 信号通路的调节作用。

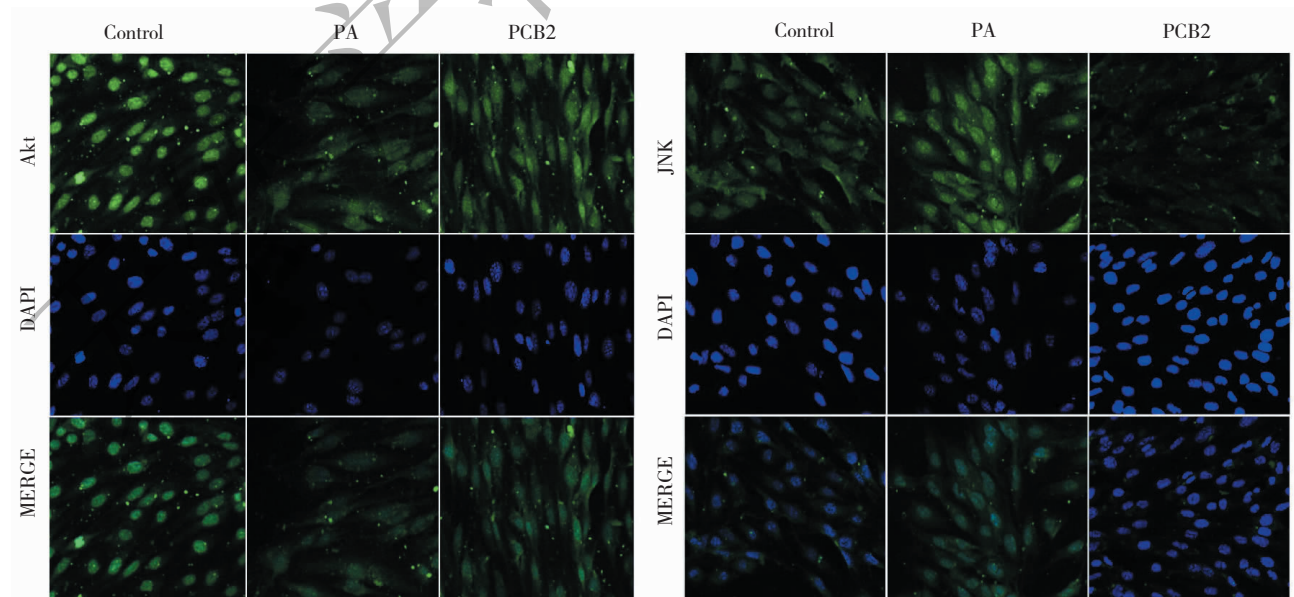


图5 免疫荧光法检测 Akt 与 JNK 蛋白的表达情况(200X)

Fig. 5 Expression of Akt and JNK protein on level of MS-1 cell by confocal

3 结论

棕榈酸(PA)为体内最常见的饱和脂肪酸,其为总脂肪的20%~30%,由膜磷脂与脂肪三酰甘油组成,PA的过量摄入导致血脂异常,脂质堆积,高血糖以及增加炎症等^[8],诱导细胞损伤,衰老表型的发生。研究发现临床上心脑血管疾病的致病性危险因素,主要的是血管内皮细胞损伤引起的衰老^[1,9]。衰老细胞表型有出现生长停滞,形态上表现为细胞核体积增大,胞质中出现空泡,染色质出现聚集,固缩,溶解,端粒缩短等现象以及呈现出核膜内陷。衰老细胞表现为 β -半乳糖苷酶染色阳性以及细胞周期相关基因 p21、p16^{INK4a} 等表达水平增高,且细胞衰老与氧化应激,DNA 损伤,蛋白表达的稳态失衡有关^[10-14]。在我们的实验中由 PA 处理后内皮细胞表现出衰老的相关表征, β -半乳糖苷酶染色结果出现强烈的阳性表达,同时检测细胞周期相关基因如 p21 和 p53 发挥着重要的作用,RT-PCR 结果表明相较于正常组,PA 处理后检测 p21、p53 的表达增加,进一步证实内皮细胞出现衰老状态;而应用 PCB2 干预后明显减少 p21、p53 的表达,说明在 mRNA 水平上 PCB2 可缓解细胞的衰老情况。

FoxO 家族转录因子是 PI3k/Akt 信号通路传导一类重要的生理学靶点,有研究报道抑制 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 可引起 FoxO 转录因子的活化,导致胰腺癌细胞周期停滞和凋亡^[15];Akt 通过磷酸化 FoxO,再通过泛素-蛋白酶体系统抑制 FoxO4 核转位,失去 FoxO 结合共有核心识别基序 TTGTTTAC 介导转录激活的作用^[16]。我们的实验结果表明经 PA 处理后观察到细胞中 Akt 在细胞核中表达明显减少,其下游信号 FoxO4 在细胞核中表达增加,JNK 在细胞核中的表达也是增加的,介导细胞衰老进程的发展,该现象与文献^[17]报道一致;而应用 PCB2 后能明显逆转这一现象,进一步证实 PCB2 在 Akt/FoxO4 相关信号通路中的调控作用。

随着对抗衰老的相关研究发现,在日常的食物中某些活性成分以及常见的中药材中活性成分均具有抗衰老的功效^[18,19],如木瓜,苹果和葡萄籽中分离的原花青素等。而对于 B 型花青素(PCB2)的结构分析及其药理作用的研究较多,从构效关系上分析,PCB2 具有很强的抗氧化活性归源于在结构上具有 8 个的酚羟基且与碳碳双键共轭的特征。有研究报道,随着多酚结构中聚合度的增加,对脂质过氧化

的抑制能力增加;花青素的抗肿瘤和抗衰老活性作用部分源于其具有的高抗氧化和促氧化酶活性^[20],提示 PCB2 可作为抗衰老治疗的有效药物之一。在本试验中得出,经过 PCB2 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后能明显逆转 PA 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 诱发的细胞衰老以及对 Akt/FoxO4 信号通路的干预作用,提示 PCB2 参与调节由一定浓度 PA 诱导的细胞衰老进程,为开发延缓衰老的有效中药材提供新的视角。

参考文献

- 1 Katsuomi G, Shimizu I, Yoshida Y, et al. Vascular senescence in cardiovascular and metabolic diseases [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5:18.
- 2 Gevaert AB, Shakeri H, Leloup AJ, et al. Endothelial senescence contributes to heart failure with preserved ejection fraction in an aging mouse model [J]. *Circ Heart Fail*, 2017; 10:e003806.
- 3 Gao J, Lv S, Li C, et al. Bioactivity-based antioxidative components screening and evaluation in grape seed proanthocyanidin extract [J]. *J Food Sci Technol*, 2017, 54:2645-2652.
- 4 Yin W, Li B, Li X, et al. Critical role of prohibitin in endothelial cell apoptosis caused by glycated low-density lipoproteins and protective effects of grape seed procyanidin B2 [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 65(1):13-21.
- 5 Mei Y, Pei Z, Fei Y, et al. Grape seed procyanidin B2 ameliorates hepatic lipid metabolism disorders in db/db mice [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16:2844-2850.
- 6 Hu ZZ (胡中志). Effect of procyanidin B2 on anti-aging and identification of its metabolites [M]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology (上海应用技术大学), 2017.
- 7 Chisato I, Chong Z, Yumi T. Smad1 regulates senescence-associated lipid accumulation in hepatocytes [J]. *NPJ Aging Mech Dis*, 2017, 3:11.
- 8 Gianfranca C, Elisabetta M, Sebastiano B, et al. Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications [J]. *Front Physiol*, 2017, 8:902.
- 9 Izzo C, Carrizzo A, Alfano A, et al. The impact of aging on cardio and cerebrovascular diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19:481-512.
- 10 Frenk S, Houseley J. Gene expression hallmarks of cellular ageing [J]. *Biogerontology*, 2018, S1:1-20.
- 11 Waaijer, Mariette E. C, Gunn D, et al. Do senescence markers correlate *in vitro* and *in situ* within individual human donors? [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10:278-289.
- 12 Tong Q (童侨), Wang ZW (王哲伟), Huang XH (黄新河). Mitochondrial function-related anti-aging natural products [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30:1649-1654.