DOI:10.16016/j.1000-5404.202103187

当归多糖拮抗 D-半乳糖致大鼠脑衰老的作用

汪 兰[1,2],张梦思[1],王顺和[1,2],汪子铃[1],侯吉颖[1],肖含先之[1],黄彩虹[1],曾 娣[1],张 进[1,2],牛雪芳[1],牛依琳[1],王 璐[1],王亚平[1] 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:组织学与胚胎学教研室,干细胞与组织工程研究室[1],病理学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide,ASP)拮抗氧化致衰剂 D-半乳糖(D-galactose,D-gal)致大鼠脑衰老的作用。**方法** 将 SD 大鼠分为对照组、ASP 组、衰老模型组、ASP 衰老模型组。采用水迷宫检测各组大鼠空间学习记忆能力;衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色检测脑组织细胞衰老;色谱法测量海马匀浆 SOD、MDA 和 GSH 的含量;ELISA 法检测海马组织匀浆中 IL-1β,IL-6 的含量;Southern blot 检测海马细胞端粒长度,TRAP-PCR 检测端粒酶活性。从 SD 胎鼠脑组织中分离、培养、鉴定神经干细胞(neural stem cells,NSCs)。将培养第 3 代 NSCs 分为对照组、ASP 组、衰老模型组、ASP 衰老模型组。色谱法测定细胞内 MDA 含量;流式细胞仪测定细胞内 ROS 水平;RT-PCR 检测衰老相关基因的 p19、p21、p53 mRNA 的表达。**结果** 与衰老模型组相比,ASP 衰老模型组大鼠空间学习记忆能力明显改善;脑组织中 SA-β-Gal 染色阳性的细胞数减少($P<0.05$);海马区 SOD、GSH 含量增高,MDA 含量降低($P<0.05$);IL-1β,IL-6 的分泌水平降低($P<0.05$);端粒长度和端粒酶活性增加。成功分离并鉴定出 NSCs;与 NSCs 衰老组相比,ASP 衰老组 NSCs 中 MDA 含量和 ROS 水平显著降低($P<0.05$);衰老相关基因 p19、p21、p53 mRNA 表达降低($P<0.05$)。**结论** ASP 可能通过调控细胞端粒长度和端粒酶活性,下调衰老相关基因表达,降低炎症因子表达,提高细胞抗氧化能力,进而拮抗 D-gal 对 NSCs 和海马细胞的致衰作用。

[关键词] 当归多糖;D-半乳糖;脑衰老;神经干细胞;抗衰老
[中图法分类号] R285.5; R338.64; R339.38 [文献标志码] A

Angelica sinensis polysaccharide antagonizes D-galactose induced brain aging in rats

WANG Lan[1,2], ZHANG Mengsi[1], WANG Shunhe[1,2], WANG Ziling[1], HOU Jiying[1], XIAO Hanxianzhi[1], HUANG Caihong[1], ZENG Di[1], ZHANG Jin[1,2], NIU Xuefang[1], NIU Yilin[1], WANG Lu[1], WANG Yaping[1] [1]Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, [2]Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the antagonistic effect of *Angelica sinensis polysaccharide* (ASP) on brain aging induced by D-galactose (D-gal) in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, ASP group, aging model group, and ASP aging model group. Their spatial learning and memory abilities were detected by water maze test. The aging of brain tissue cells were detectded by aging-related β-galactosidase (SA-β-Gal) staining. The contents of SOD, MDA and GSH in hippocampal homogenate were measured by chromatography, and those of IL-1β and IL-6 in hippocampal homogenate were detected by ELISA. Southern blotting and TRAP-PCR were used to detect telomere length and telomerase activity in the hippocampal cells. Neural stem cells (NSCs) were isolated, cultured and identified from the brain tissue of

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673748,81873103)
[通信作者] 王亚平,E-mail:ypwangcq@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

SD fetal rats. The third-generation NSCs were divided into control group, ASP group, aging model group, and ASP aging model group. The content of MDA in the cells was determined by chromatography. The intracellular ROS level was determined by flow cytometry. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of p19, p21 and p53 of senescence related genes. **Results** Compared with the aging model group, the injection of ASP significantly improved the spatial learning and memory abilities of aging rats. The number of SA-β-Gal positive cells in the brain tissue was decreased ($P<0.05$). The contents of SOD and GSH in the hippocampus were increased, but that of MDA was decreased ($P<0.05$). The secretion levels of IL-1β and IL-6 were decreased ($P<0.05$). The telomere length and telomerase activity were increased ($P<0.05$). NSCs were successfully isolated and identified. Compared with the aging group, the MDA content and ROS level were significantly reduced in the ASP aging group ($P<0.05$), and the mRNA levels of senescence-related genes p19, p21, and p53 were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** ASP may regulate cell telomere length and telomerase activity, down-regulate the expression of aging-related genes, reduce the expression of inflammatory factors, improve the cell's antioxidant capacity, and then antagonize the degeneration effect of D-gal on NSCs and hippocampal cells.

[**Key words**] *Angelica sinensis* polysaccharide; D-galactose; brain aging; neural stem cells; anti-aging

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81673748, 81873103). Corresponding author: WANG Yaping, E-mail: ypwangcq@aliyun.com

人口老龄化进程加快,研究衰老生物学与老年性疾病是当今社会科学和生命科学共同关注的研究课题。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)、帕金森病(Parkinson's disease,PD)等神经系统退行性疾病随年龄增长而发病率增高。目前认为,神经元退变、衰老、丢失和死亡是慢性神经性系统退行性疾病的关键因素,这与神经干细胞(neural stem cells,NSCs)衰老密切相关[1-5],迄今还没有找到有效防治方法。

当归是中医临床"补血"要药,有补益气血,延缓衰老,修复损伤等作用[6]。课题组前期研究证明:当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide,ASP)是当归中重要的抗衰老成分,可以通过抗氧化应激损伤调控组织细胞衰老[7]。本研究通过构建 D-半乳糖(D-galactose,D-gal)致大鼠脑衰老模型和 NSCs 体外衰老模型,探讨 ASP 拮抗氧化致衰剂 D-gal 对脑衰老与 NSCs 衰老影响及其机制。本研究旨在为阐释祖国医学抗衰老理论和现代医学抗衰老新理论提供实验依据,也为抗衰老天然药物有效成分用于防治神经退行性疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 180~200 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号 SCXK(渝)2007-0001]。

1.2 主要试剂

包括:ASP(陕西慈缘生物技术公司,纯度≥95 %);D-gal(美国 Sigma 公司);GSH 试剂盒(南京建成科技有限公司);衰老相关 β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);IL-1β、IL-6 试剂盒(武汉博士德公司);Nestin 抗体(武汉三鹰公司);神经干细胞完全培养基(广州赛业公司);qRT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 大鼠衰老模型构建与分组给药

大鼠分为 4 组,每组 10 只。衰老模型组:皮下注射 D-gal[120 mg/(kg·d),42 d];ASP 衰老模型组,同衰老模型组处理,第 15 天起腹腔注射 ASP[100 mg/(kg·d),28 d];对照组,皮下注射等量生理盐水 42 d;ASP 对照组,注射等量生理盐水 14 d,第 15 天起腹腔注射 ASP(同 ASP 衰老模型组)。于药物注射完成第 2 天进行相关指标检测。

1.4 衰老大鼠空间学习记忆能力检测(水迷宫实验)

定位航行实验:每天 1 次,共 6 d,大鼠背朝池壁,轮流从 4 个入水点下水,记录在 120 s 内寻找到平台的时间(逃避潜伏期),如果 120 s 以上未找到平台,则潜伏期记为 120 s,引导大鼠上平台并停留 30 s。空间探索试验:第 7 天,撤去隐形平台,将大鼠由某一入水点下水,记录大鼠入水后 120 s 内的游泳轨迹,计算大鼠逃避潜伏期、穿越原平台所在位置的次数及在原平台象限停留时间的百分比。

1.5 脑组织衰老检测(Sa-β-Gal 染色)

制备海马冠状部冷冻切片,按照 SA-β-gal 试剂盒说明书进行操作,37 ℃孵育过夜,光学显微镜观察海马 DG 区蓝染细胞即为衰老神经细胞,采用用 ImageJ 图像分析法计算 SA-β-Gal 染色阳性区相对光密度值(ROD)。

1.6 海马匀浆中 IL-1β、IL-6 含量与 SOD、MDA 和 GSH 活性检测

制备海马组织匀浆,离心并收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度。按试剂盒说明方法测定海马匀浆中 IL-1β、IL-6(pg/mg)含量与 SOD(U/mg)、MDA(nmol/mg)、GSH(μmol/L)活性。

1.7 检测海马细胞端粒长度(Southern blot 法)与海马端粒酶活性(TRAP-PCR 银染法)

提取海马组织 DNA,37 ℃酶消化 2 h,1%琼脂糖凝胶电泳分离 DNA,虹吸法转移 DNA 至尼龙膜,预杂交 1 h,加入端粒探针,42 ℃杂交过夜。洗膜 30 min,封闭液封闭 15 min。用 Strptavdin-HRP 缓冲液 37 ℃振荡 40 min,PBS 洗 3 次,DAB 显色液显色 10 min 后,置 X 线片夹中显影。按 L=Σ(ODi∶1∶Li)/Σ(ODi)公式计算端粒长度;ODi 为所测条带中对应于每一个 Marker 位置上的光密度值,Li 为对应的每一个 Marker 的分子长度。取新鲜海马组织,生理盐水清洗组织后按照试剂盒说明书要求进行端粒酶活性测量。酶活力比值=荧光强度/蛋白浓度,计算端粒酶活力。

1.8 神经干细胞分离纯化与分组

取 SD 胎鼠,取全脑分离、纯化与培养细胞,培养至第 3 代,用 Nestin 免疫荧光鉴定 NSCs。将 NSCs 以 5×10^5/mL 接种至细胞培养瓶中,分为 4 组:对照组,常规培育 48 h;ASP 组,常规培养 24 h,再添加 ASP(终浓度 100 μg/mL)共同培育 24 h;衰老模型组,加入 D-gal(终浓度 10 mg/mL)培育 48 h;ASP 衰老模型组,加入 D-gal 培育 24 h,再加入 ASP 共同培育 24 h。于建模结束后第 2 天检测相关指标。

1.9 流式细胞仪检测 NSCs 的 ROS 水平

收集并调整 NSCs 为 1×10^6/mL,悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,37 ℃孵育 20 min,无血细胞培养基洗涤细胞 3 次,去除未进入细胞内的 DCFH-DA;流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平,以 DCF 的平均荧光强度表示其含量。

1.10 酶标比色法检测 NSCs 的 MDA 含量

制备 NSCs 培养上清液,BCA 法测定蛋白浓度。按试剂盒说明书方法测定光密度值 D(532),计算 NSCs 上清液的 MDA 含量。

1.11 qRT-PCR 检测 NSCs 的 p19、p21、p53 mRNA 表达

用 TRIzol 方法提取 NSCs 的 RNA,通过 D(260)/D(280)的比例检测 RNA 的质量。逆转录进行 cDNA 的合成。94 ℃预变性 5 min,1 个循环;变性 94 ℃ 5 min,退火 61 ℃ 5 min,延伸 72 ℃ 5 min,30 个循环;延伸 72 ℃ 3 min。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列与片段长度

引物	引物序列(5′→3′)	片段长度/bp
GAPDH	上游:CCCACGGCAAGTTCAACGGCA 下游:TGGCAGGTTTCTCCAGGCGGC	606
p19	上游:ACCCCAAGTGAGGGTTTTCT 下游:GATCCTCTCTGGCCTCAACA	106
p21	上游:GTGATGTCCGACCTGTTCC 下游:GCAAAGTTCCACCGTTCTC	139
p53	上游:GCCATCTACAAGAAGTCACAGC 下游:GATGATGGTAAGGATAGGTCGG	285

1.12 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

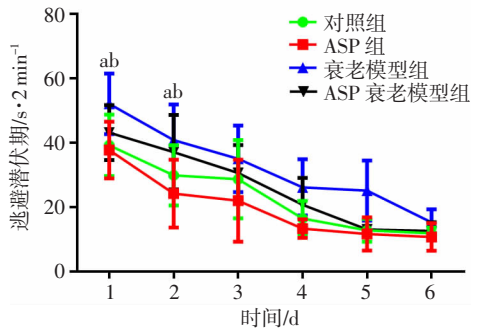
2 结果

2.1 小鼠衰老生物学动态情况

随着注射 D-gal 时间和累积剂量的增加,衰老模型组小鼠毛发逐渐枯燥,色暗淡,精神不振,活动力下降,进食减少,大便不成形,体质量增加缓慢,呈典型的自然衰老体征,其余 3 组无明显衰老体征。

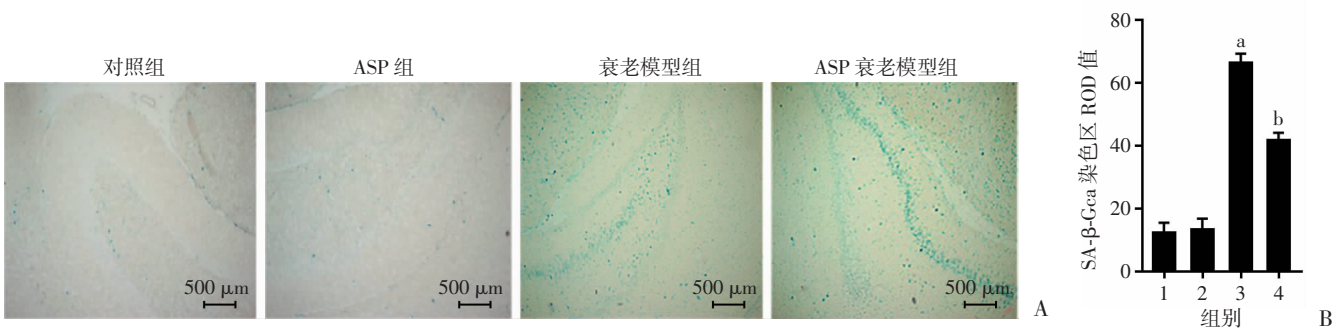
2.2 ASP 对脑衰老大鼠空间学习记忆能力的影响

定位航行实验结果显示:衰老模型组大鼠找到隐形平台前的逃避潜伏期显著长于对照组,ASP 衰老模型组的逃避潜伏期短于衰老模型组($P<0.05$,图 1);空间探索实验结果显示:衰老模型组大鼠跨越原平台所在位置的次数和在原平台象限停留时间的百分比显著低于对照组,ASP 衰老模型组跨越原平台的次数和在原平台象限停留时间的百分比明显高于衰老模型组($P<0.05$,表 2)。



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 ASP 衰老模型组比较

图 1 ASP 对脑衰老大鼠定位航行实验的影响



A:SA-β-gal 染色;B:统计分析结果 1:对照组;2:ASP 组;3:衰老模型组;4:ASP 衰老模型;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老模型组比较

图 2 ASP 对脑衰老大鼠海马神经细胞衰老的影响

表 2 ASP 对脑衰老大鼠空间探索实验的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	跨越原平台次数/次·2 min^{-1}	原平台象限停留时间百分比(%)
对照组	10.20±1.85	35.91±7.64
ASP 组	10.70±1.46	37.33±5.34
衰老模型组	8.80±1.87[a]	26.48±3.14[a]
ASP 衰老模型组	9.96±1.45[b]	39.22±4.46[b]

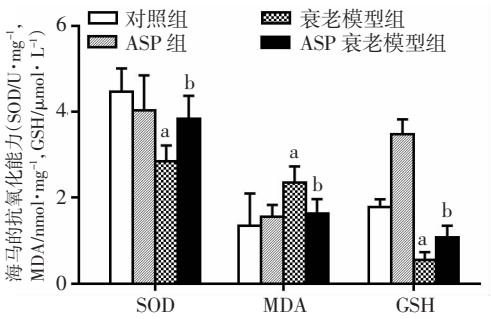
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老模型组比较

2.3 ASP 对脑衰老模型大鼠海马神经细胞衰老的影响

衰老模型组大鼠海马 SA-β-gal 染色阳性细胞数量较对照组明显增高;而 ASP 衰老模型组较衰老模型组阳性细胞数量明显降低($P<0.05$,图 2)。

2.4 ASP 对脑衰老大鼠海马抗氧化能力的影响

衰老模型组大鼠海马中 SOD 含量、GSH 活性较对照组均降低,而 MDA 含量显著增高;ASP 衰老模型组大鼠海马中 SOD 含量、GSH 活性较衰老模型组增高,而 MDA 含量降低($P<0.05$,图 3)。



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老模型组比较

图 3 ASP 对脑衰老大鼠海马抗氧化能力的影响

2.5 ASP 对脑衰老大鼠海马 IL-1β,IL-6 含量的影响

衰老模型组大鼠海马区 IL-1β、IL-6 显著高于对照组;而 ASP 衰老模型组 IL-1β、IL-6 显著低于衰老模型组($P<0.05$,表 3)。

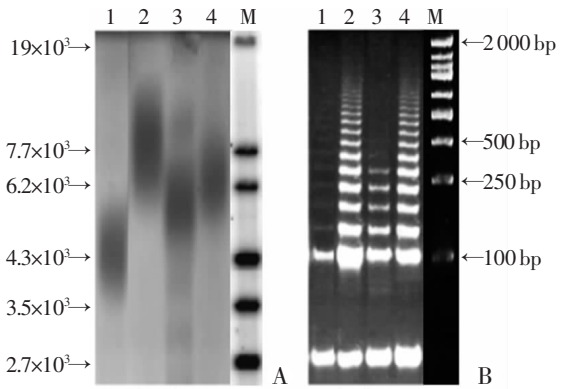
表 3 ASP 对脑衰老大鼠海马 IL-1β、IL-6 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	IL-1β/pg·mg^{-1}	IL-6/pg·mg^{-1}
对照组	0.46±0.02	56.05±3
ASP 组	0.45±0.01	50.17±9.31
衰老模型组	0.62±0.03[a]	70.54±11.58[a]
ASP 衰老模型组	0.56±0.02[b]	62.08±10.19[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老模型组比较

2.6 ASP 对脑衰老大鼠海马区端粒长度及端粒酶活性的影响

衰老模型组大鼠海马区细胞的端粒长度缩短和端粒酶活性下降较对照组明显;而 ASP 衰老模型组较衰老模型组明显增高(图 4)。

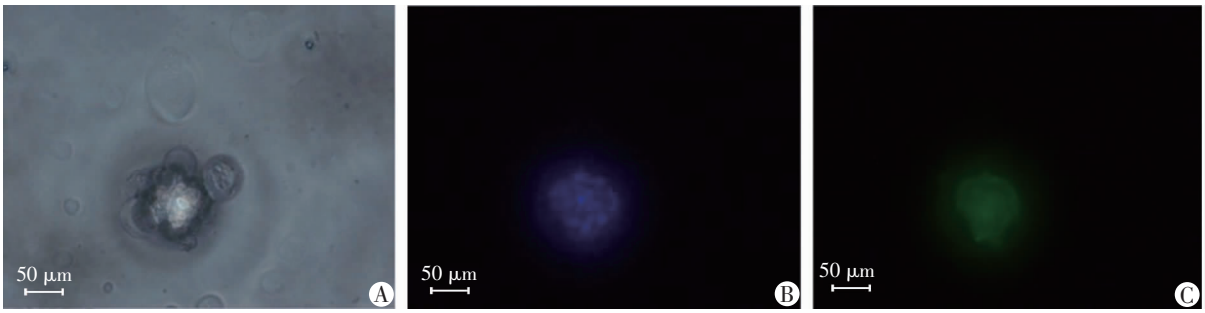


1:衰老模型组;2:ASP 组;3:ASP 衰老模型组;4:对照组;M:标准

图 4 ASP 对衰老大鼠海马端粒长度(A)和端粒酶活性(B)的影响

2.7 NSCs 的 Nestin 表达鉴定

从 SD 胎鼠大脑中成功分离、培养出 NSCs。NSCs 可以继续培养成为神经球,免疫荧光鉴定 NSCs 的 Nestin 表达呈阳性(绿色荧光),见图 5。



A:未染色的神经球;B:DAPI 免疫荧光染色阳性的神经球;C:Nestin 免疫荧光染色阳性的神经球

图 5 免疫荧光染色鉴定 NSCs 的 Nestin 表达

2.8 ASP 对衰老 NSCs 的 ROS 水平和 MDA 含量的影响

衰老模型组 NSCs 的 ROS 水平、MDA 含量高于对照组;而 ASP 衰老模型组低于衰老模型组($P<0.05$,表 4)。

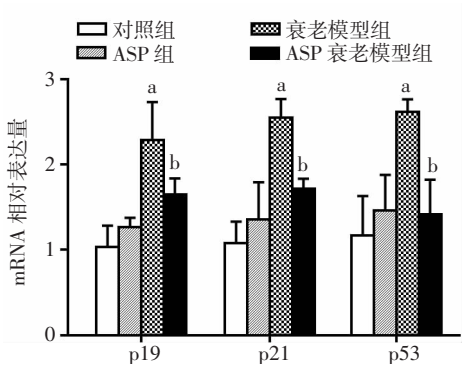
表 4 ASP 对衰老 NSCs 的 ROS 水平和 MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	ROS 荧光强度	MDA/nmol·mg^{-1}
对照组	129.74±3.89	95.10±6.35
ASP 组	94.10±2.47	82.70±5.34
衰老模型组	187.71±12.23[a]	117.20±7.56[a]
ASP 衰老模型组	161.50±9.45[b]	97.40±5.41[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老模型组比较

2.9 ASP 对衰老 NSCs 的 p19、p21、p53 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 检测结果显示:衰老组 p19、p21、p53 mRNA 表达较对照组明显增高;而 ASP 衰老模型组较衰老模型组明显降低($P<0.05$,图 6)。



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与衰老模型组比较

图 6 ASP 对衰老 NSCs 的 p19、p21、p53 mRNA 表达的影响

3 讨论

课题组前期研究证明:当归多糖可以延缓脑衰老和 NSCs 的衰老[8]。本研究采用氧化致衰剂 D-gal[6]构建衰老大鼠模型,探讨 ASP 拮抗 D-gal 对脑衰老和 NSCs 衰老的机制。SA-β-gal 染色是鉴定细胞衰老的特异性生物学标志[9],本研究发现:D-gal 致衰大鼠表现出明显的空间学习记忆能力降低,且 SA-β-Gal 染色显示衰老模型大鼠海马组织中衰老细胞数量明显增多,提示脑衰老模型成功建立。注射 ASP 干预致衰过程可以显著减轻 D-gal 对大鼠空间学习记忆能力的损害,并减少海马组织中衰老细胞数量。

D-gal 致衰机制是氧自由基所致的氧化应激损伤,氧化应激损伤学说是细胞衰老的主流学说[10-11],MDA、SOD、GSH 是评价细胞氧化应激损伤和衰老的重要指标。本研究发现:D-gal 可以诱导海马组织产生大量的 MDA,并减少 SOD 含量,消耗 GSH 存量,这些都是促进脑衰老发生的主要因素[12]。注射 ASP 干预衰老过程后,海马内 MDA 含量明显减少,同时 SOD 含量增加,GSH 消耗量减少,提示 ASP 可通过提高海马的抗氧化损伤与清除自由基的能力拮抗 D-gal 对海马的致衰作用。

氧化应激和炎症反应紧密相关,也是诱发衰老的主流原因[13]。文献[14]报道:神经胶质细胞被激活是脑源性炎症性细胞因子的根源,过多炎症因子释放使神经元间相互作用发生障碍,进而导致空间学习记忆功能受损。本研究观察到:注射 ASP 干预衰老模型大鼠或正常大鼠,使海马内 IL-1β、IL-6 水平显著降低,提示 ASP 可能通过抑制慢性炎症过程,从而拮抗致衰剂对海马的损伤。

端粒损耗的速度是衡量“生物衰老”的重要方法,端粒酶在维持端粒长度中起作用[15-17]。本研究发现:衰老模型大鼠海马区端粒长度与端粒酶活性明显低于正常对照组,注射 ASP 后,大鼠海马区端粒长度缩短受到抑制,端粒酶活性降低得以阻滞,提示 ASP 可通过调控端粒系统达到延缓脑衰老的作用。

NSCs 是神经系统特定区域内具有高度自我更新能力与多向分化潜能的未分化细胞,可增殖分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等[10]。NSCs 对中枢神经系统的发育、维持和修复有着极为重要的作用。有研究结果表明:脑衰老与 NSCs 衰老有密切相关,干预 NSCs 衰老进程可以有效延缓脑衰老[18]。本研究从胎大鼠脑中成功的提取、纯化与鉴定了大鼠 NSCs[19],并建立了 NSCs 体外衰老模型。研究结果显示:ASP 体外干预 D-gal 致衰过程后,NSCs 中的 MDA 含量与 ROS 水平显著降低,进一步验证了 ASP 抗氧化损伤作用。p19-p21-p53 信号通路是控制细胞衰老的重要通路[20]。本研究发现:衰老 NSCs 的 p19、p21、p53 mRNA 表达明显增高,ASP 干预致衰过程后,p19、p21、p53 mRNA 表达明显下降。提示 ASP 通过提高抗氧化能力和降低衰老相关基因的表达拮抗了 D-gal 对 NSCs 的致衰作用,也许是 APS 拮抗 D-gal 致脑衰老机制之一。

综上所述,ASP 可能通过调控细胞端粒长度和端粒酶活性,下调衰老相关基因表达,降低炎症因子表达,提高细胞抗氧化能力,进而拮抗 D-gal 对 NSCs 和海马细胞的致衰作用。

参考文献:

[1] DE HAAN G, LAZARE S S. Aging of hematopoietic stem cells[J]. Blood, 2018, 131(5): 479-487. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412.

[2] REN R T, OCAMPO A, LIU G H, *et al*. Regulation of stem cell aging by metabolism and epigenetics[J]. Cell Metab, 2017, 26(3): 460-474. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.07.019.

[3] ZHU J H, MU X Y, ZENG J, *et al*. Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and Hippocampus senescence in a rat model of D-galactose-induced aging[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e101291. DOI: 10.1371/journal.pone.0101291.

[4] GLORIOSO C, SIBILLE E. Between destiny and disease: genetics and molecular pathways of human central nervous system aging[J]. Prog Neurobiol, 2011, 93(2): 165-181. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.11.006.

[5] OLARIU ANA, CLEAVER K M, CAMERON H A. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle[J]. J Comp Neurol, 2007, 501(4): 659-667. DOI: 10.1002/cne.21268.

[6] 邱竹, 姜蓉, 汪子铃, 等. 当归多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠睾丸的保护作用[J]. 解剖学报, 2019, 50(4): 506-511. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2019.04.017.
QIU Z, JIANG R, WANG Z L, *et al*. Protective effects of *Angelica sinensis* polysacchairides on the testis of aging model mice induced by D-galactose[J]. Acta Anat Sin, 2019, 50(4): 506-511. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2019.04.017.

[7] MU X Y, ZHANG YY, LI J, *et al*. Angelica sinensis polysaccharide prevents hematopoietic stem cells senescence in D-galactose-induced aging mouse model[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 3508907. DOI: 10.1155/2017/3508907.

[8] 姚辉. 当归多糖延缓 D-半乳糖所致巢蛋白-绿色荧光蛋白小鼠脑衰老作用及其机制[J]. 解剖学报, 2016, 47(6): 731-737. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2016.06.002.
YAO H. Anti-aging effects of *Angelica sinensis* polysaccharides on brain aging induced by D-galactose in nestin-green fluorescent protein transgenic mice and its mechanism[J]. Acta Anat Sin, 2016, 47(6): 731-737. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356.2016.06.002.

[9] TOMINAGA T, SHIMADA R, OKADA Y, *et al*. Senescence-associated-β-galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum[J]. PLoS ONE, 2019, 14(3): e0213673. DOI: 10.1371/journal.pone.0213673. eCollection 2019.

[10] 吴奇, 王顺和, 程霄, 等. 神经干细胞衰老与核因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件信号通路的关系[J]. 解剖学报, 2020, 51(6): 815-820. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356-2020.06.002.
WU Q, WANG S H, CHENG X, *et al*. The relationship between neural stem cell senescence and nuclear factor E2-related factor/antioxidant response element signaling pathway[J]. Acta Anat Sin, 2020, 51(6): 815-820. DOI: 10.16098/j.issn.0529-1356-2020.06.002.

[11] 汪子铃, 邱竹, 陈雄斌, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠睾丸结构与功能变化及其氧化应激相关机制[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(6): 476-481,500.
WANG Z L, QIU Z, CHEN X B, *et al*. Change in the testis

structure and function of D-gal induced aging mice and the oxidative stress-related mechanism[J]. Chin J Histochem Cytochem,2016, 25(6): 476-481,500.

[12] GENG Y Q, GUAN J T, XU X H, *et al*. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(4): 866-869. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.011.

[13] JURK D, WANG C F, MIWA S, *et al*. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response[J]. Aging Cell, 2012, 11(6): 996-1004. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x.

[14] WANG Z, LI DD, LIANG Y Y, *et al*. Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(11): 974-980.

[15] NUSSEY D H, BAIRD D, BARRETT E, *et al*. Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology[J]. Methods Ecol Evol, 2014, 5(4): 299-310. DOI: 10.1111/2041-210X.12161.

[16] ZHU Y K, LIU X W, DING X L, *et al*. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction[J]. Biogerontology, 2019, 20(1): 1-16. DOI: 10.1007/s10522-018-9769-1.

[17] MANNA S, MCCARTHY C, MCCARTHY F P. Placental ageing in adverse pregnancy outcomes: telomere shortening, cell senescence, and mitochondrial dysfunction[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3095383. DOI: 10.1155/2019/3095383. eCollection 2019.

[18] HU W X, JING P W, WANG L, *et al*. The positive effects of Ginsenoside Rg1 upon the hematopoietic microenvironment in a D-Galactose-induced aged rat model[J]. BMC Complementary Altern Med, 2015, 15(1): 1-8. DOI: 10.1186/s12906-015-0642-3.

[19] ENCINAS J M, MICHURINA T V, PEUNOVA N, *et al*. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(5): 566-579. DOI: 10.1016/j.stem.2011.03.010.

[20] 周鑫, 张磊, 扶世杰, 等. 少阳主骨方介导 p19~(Arf)-p53-p21~(Cip1)信号通路调控食蟹猴关节软骨退变的机制[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(3): 346-352.
ZHOU X, ZHANG L, FU S J. The mechanism of Shaoyang Zhugufang mediating the p19Arf-p53-p21Cip1 signaling pathwayto regulate the degeneration of cynomolgus monkey articular cartilage[J]. J South Med Univ, 2018, 38(3): 346-352.

(**收稿**:2021-03-22;**修回**:2021-05-10)

(编辑 王 红)