

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.23.002

补肾解毒方抗脑老化机制的体外研究 *

杨 阳 区浩松 刘 焱 马 鑫 李 佳 赵丕文 赵俊云[△]

(北京中医药大学生命科学学院 北京 102488)

摘要 目的:探讨补肾解毒方含药血清抗脑老化的体外分子机制。方法:采用过氧化氢诱导制备人脑胶质细胞衰老模型,使用补肾解毒方含药血清干预以期达到对人脑胶质细胞衰老模型的治疗效果,CCK-8法检测细胞活力,采用 β -半乳糖苷酶染色法观察衰老阳性细胞比例,活性氧荧光探针法检测胞内活性氧水平,流式细胞术检测细胞凋亡比例,qPCR检测细胞中衰老相关基因CXCL1、FOXO1、P16、IL1A、IGFBP3、IL6的转录水平。结果:补肾解毒方含药血清可显著增强细胞活力($P<0.05$),显著减少过氧化氢诱导的衰老阳性细胞比例($P<0.05$),降低活性氧水平,显著减少凋亡细胞比例($P<0.01$),下调IL1A、IL6、CXCL1、IGFBP3、FOXO1转录水平。结论:补肾解毒方含药血清可显著抑制过氧化氢诱导的人脑胶质细胞衰老,其可能与增强细胞活力、抗炎、抗凋亡、降低胞内活性氧水平等有关。

关键词: 补肾解毒方;含药血清;人脑胶质细胞;脑老化

中图分类号:R-33;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)23-4407-06

In Vitro Study on the Anti-Brain Aging Mechanism of Bushen Jiedu Decoction*

YANG Yang, OU Hao-song, LIU Jiao, MA Xin, LI Jia, ZHAO Pi-wen, ZHAO Jun-yun[△]

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of anti-brain aging in vitro using medicated serum of Bushen Jiedu Decoction (BSJD). **Methods:** Human glial cell aging model was prepared by H_2O_2 induction. An intervention using BSJD-containing serum to investigate the pharmacodynamic effects of BSJD on senescent glial cells. Cell viability was detected by CCK-8 method using medicated serum of Bushen Jiedu Decoction. The proportion of senescence positive cells was assessed by β -galactosidase staining. The intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were assessed by DCFH-DA assay, the apoptosis proportions were assessed by flow cytometry, and the transcripts levels of senescence associated genes CXCL1, FOXO1, P16, IL1A, IGFBP3, and IL6 were assessed by qPCR. **Results:** Medicated serum of Bushen Jiedu Decoction significantly enhanced cell viability ($P<0.05$), significantly reduced the proportion of senescence positive cells induced by H_2O_2 ($P<0.05$), reduced the level of reactive oxygen species, significantly reduced the proportion of apoptotic cells ($P<0.01$), and down-regulated CXCL1, FOXO1, P16, IL1A, IGFBP3, and IL6 transcript levels. **Conclusion:** The medicated serum of Bushen Jiedu Decoction significantly inhibits H_2O_2 induced human glial cell senescence, which may be associated with enhancing cell viability, reducing intracellular oxidative stress levels, anti-inflammation, and anti-apoptosis.

Key words: Bushen Jiedu Decoction; Medicated serum; Human glial cell; Brain Aging

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)23-4407-06

前言

衰老主要表现为行动迟缓、各组织器官退行性改变以及记忆功能减退等变化的生物学过程^[1]。随着人均寿命的提高,衰老所带来的认知与行为改变逐渐得到大家的重视^[2]。脑老化是众多神经退行性病变的危险因素之一,包括帕金森病与阿尔茨海默症等^[3]。田金洲院士运用中医药治疗老年痴呆有丰富临床经验^[4]。结合循证医学方法^[5],筛选出了补肾解毒方(肉苁蓉30 g,黄连15 g),其中肉苁蓉用于补肾阳、益精血;黄连则用于解毒

通络,是临床常用于治疗血管性痴呆、阿尔兹海默病等的基础配伍,已有大量研究显示其主要有效成分松果菊苷和黄连素均具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种功效^[6-8]。本文选用人脑胶质细胞(HEB)制备细胞衰老模型,使用补肾解毒方含药血清进行干预,从衰老表型、细胞活力、细胞凋亡、胞内氧化水平及衰老相关基因的表达等方面探讨补肾解毒方抗脑老化的分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞、动物与试剂

* 基金项目:北京中医药大学横向课题(2170071720009)

作者简介:杨阳(1998-),男,硕士研究生,主要研究方向:中医药抗衰老,E-mail: bucmym2time@163.com

△ 通讯作者:赵俊云(1978-),女,副教授,主要研究方向:中医药抗衰老,E-mail: junyunzhao@126.com

(收稿日期:2022-03-29 接受日期:2022-04-25)

SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 10 只, 体质量 200 ± 20 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京)2015-0015。肉苁蓉和黄连饮片购自北京同仁堂。HEB 细胞购自苏州北纳创联生物技术有限公司。CCK-8 试剂盒购自北京翱翔生物科技有限公司。细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒、活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。总 RNA 小提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司。RevertAid FirstStrand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Fisher Scientific。2× Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。Hoechst33342 荧光染料购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器

二氧化碳培养箱(Sanyo MCO-20AIC), 正倒置一体显微镜(Echo), 酶标仪(BioTek), 共聚焦显微镜(Olympus FV3000), 流式细胞仪(CytoFLEX), 超微量分光光度计(Pultton), QuantStudioTM6 Flex Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific)。

1.3 方法

1.3.1 补肾解毒方含药血清的制备 大鼠随机分为 2 组: 复方组与空白组, 每组 5 只, 适应性喂养 1 周后开始实验, 饲养过程中采取正常环境光照, 正常饮食。复方组灌胃肉苁蓉黄连(2:1)水提液, 生药含量 0.47 g/mL, 大鼠灌胃量为 2 mL/次, 1 次/d, 连续 5 d。空白组灌胃等体积蒸馏水。试验第 5 d, 禁食不禁水, 最后一次灌胃 4 h 后, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 3000 rpm 10 min 离心取血清, 过滤除菌, 56 °C 补体灭活 30 min, 分装后于 -20 °C 保存备用。使用时, 将血清与 DMEM 培养基配成 10% 完全培养基, 现用现配。

1.3.2 CCK-8 法检测 HEB 细胞活力 将 HEB 以每孔 1 × 10⁴ 接种于 96 孔板, 12 h 后分为 3 组 (control 组, H₂O₂ 组, H₂O₂+BSJD 组), 每组 6 个复孔, control 组和 H₂O₂ 组细胞中加入空白组大鼠的血清培养, H₂O₂+BSJD 组加入复方组大鼠的含药血清培养。24 h 后, H₂O₂+BSJD 组和 H₂O₂ 组加入终浓度为 2 μM 的 H₂O₂ 处理 1 h, control 组加入等体积 PBS 的完全培养基, 更换培养基, 24 h 后, 吸弃培养液, 每孔加入 100 μL CCK8 工作液, 2 h 后酶标仪测 OD450, 按照(处理组 OD450- 空白组 OD450/ control 组 OD450- 空白组 OD450) × 100% 计算细胞活力。

1.3.3 β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老比例 以 4 × 10⁴/ 孔密度将 HEB 接种于 24 孔板, 分组如上, 每组三个复孔。加入终浓度为 2 μM 的 H₂O₂ 处理 1 h, 更换培养基, 24 h 后, 吸弃培养液, PBS 洗涤 1 次, 加入染色固定液室温固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 500 μL β-半乳糖苷酶染色工作液, 37 °C 孵育过夜。镜下观察, 取细胞密度大致相同的随机视野, 每孔三个视野取均值, 按照(视野内阳性细胞数 / 视野内总细胞数) × 100% 计算阳性细胞比例。

1.3.4 PI/Hoechst33342 法检测细胞凋亡水平 以 20 × 10⁴/ 孔密度将 HEB 接种于 6 孔板, 12 h 后分为 3 组, 每组 3 个复孔, 分组如上。培养 24 h 后, 消化离心收集细胞, 加入终浓度为 2 μM 的 H₂O₂ 于 37 °C 孵育处理 1 h, 离心弃上清, 加入终浓度 5 μg/mL 的 Hoechst33342 和终浓度 10 μg/mL 的 PI 染液, 37 °C 孵育 20 min, 离心弃上清, PBS 重悬, 上机检测。流式细胞仪设定第一组通道激发波长为 405 nm, 检测波长 450 nm; 第二组通道激发波长为 488 nm, 检测波长 610 nm。

1.3.5 活性氧荧光探针法检测细胞活性氧水平 以 10 × 10⁴/ 孔密度将 HEB 接种于激光共聚焦小皿, 12 h 后分组及处理同上。建造模型及培养结束后, 吸弃培养液, 加入终浓度为 1 μM 的 DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) 和终浓度为 5 μg/mL 的 Hoechst33342, 37 °C 孵育 20 min, 用 DMEM 培养基轻柔洗涤 3 次, 最后加入新鲜配制的 PBS 溶液, 镜下观察。激光共聚焦显微镜设定第一组通道激发波长为 405 nm, 检测波长范围 430-470 nm; 第二组通道激发波长为 488 nm, 检测波长范围 500-600 nm。

1.3.6 RT-qPCR 检测衰老相关 mRNA 表达水平 以 20 × 10⁴/ 孔密度将 HEB 接种于 6 孔板, 12 h 后分组处理同上。复制模型及培养结束后, 吸弃培养液, 按照试剂盒方法提取总 RNA, 定量, 逆转录采用 Oligo(dT) 引物, 条件: 42 °C 60 min, 70 °C 5 min。SYBR Green 染料法检测 CXCL1、FOXO1、P16、IL1A、IGFBP3、IL6 的转录水平, GAPDH 作为内参, 条件: 95 °C 30 s, 之后 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 最后运行机器自带熔解曲线。记录每个基因的循环阈值(Ct)使用 2^{-ΔΔ Ct} 方法计算相对 mRNA 表达量。引物序列如表 1, 引物序列通过 Primer 5.0 软件自行设计, 委托上海生工公司进行合成。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 qPCR primer sequence

Gene name	Forward(5' → 3')	Reverse(5' → 3')
FOXO1	AAACACCAGTTGAATTCA	TCGACTTATTGCCCTGAAGTGT
SIRT1	TATACCCAGAACATAGACACGC	CTCTGGTTTCATGATAGCAAGC
P16	CCGTGGACCTGGCTGAGGAG	CAGGGATGTCTGAGGGACCTTC
IL1A	CTATCATGTAAGCTATGCCCA	GCTTAAACTCAACCGTCTCTTC
CXCL1	AAGAACATCCAAAGTGTGAACG	CACTGTTCAAGCAGCTTTTGAT
IL6	CACTGGCTTTGGAGTTGAG	GGACTTTGTACTCATCTGCAC
IGFBP3	CATCAAGAAAGGGCATGCTAAA	GAGGAGAAGTTCTGGGTATCTG
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGAA

1.3.7 数据处理 使用统计学软件 SPSS20 进行分析, 数据符合正态分布且方差齐时采用单因素 ANOVA 检验 LSD 两两比较, 方差不齐时采用单因素 ANOVA 检验 Tamhane's 两两比较; 数据不符合正态分布则采用非参数检验。结果以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

表 2 HEB 细胞活力($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 HEB Cell viability level ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Control	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ +BSJD
Cell viability level (%)	99.43± 4.84	49.75± 1.62 [△]	53.49± 2.49*

Note: Compared with the control group, [△]: $P < 0.05$; Compared with the H₂O₂ group, *: $P < 0.05$.

2.2 补肾解毒方含药血清显著降低衰老染色阳性细胞比例

β -半乳糖苷酶染色结果显示,与 control 组 (19.56± 1.77%) 相比, H₂O₂ 组阳性细胞比例显著上升 (32.62± 1.92%,

2.1 补肾解毒方含药血清显著提高 HEB 细胞活力

CCK-8 检测结果显示,与 control 组相比, H₂O₂ 组细胞活力显著下降 ($P < 0.05$);与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+BSJD 组细胞活力显著增加 ($P < 0.05$),见表 2。说明补肾解毒方含药血清能够提高 HEB 细胞活力。

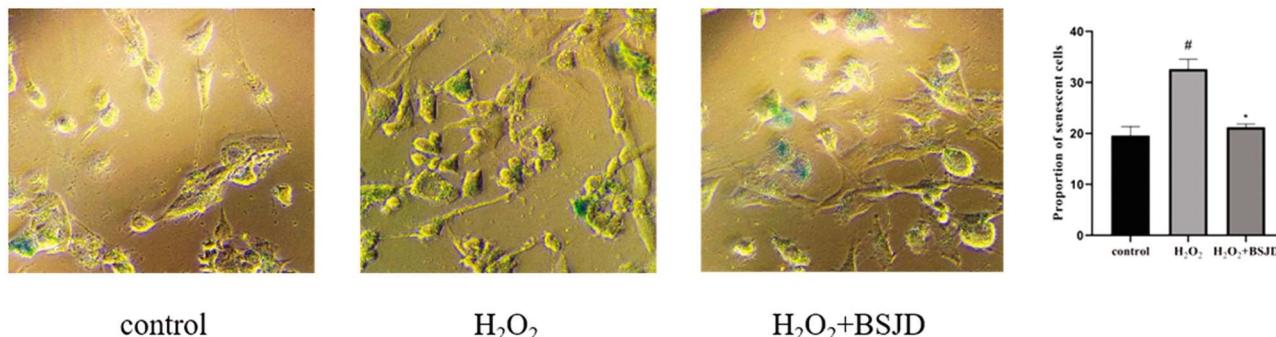


图 1 HEB 细胞 β -半乳糖苷酶染色

Fig.1 HEB cell β -galactosidase staining

Note: $\times 400$. From left to right, control group, H₂O₂ group, H₂O₂+BSJD group. Compared with the control group, #: $P < 0.05$; Compared with the H₂O₂ group, *: $P < 0.05$.

2.3 补肾解毒方含药血清降低 HEB 凋亡细胞比例

流式细胞术结果显示,与 control 组 (5.64± 4.44%) 相比, H₂O₂ 组凋亡细胞比例显著上升 (59.37± 1.70%, $P < 0.01$);

与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+BSJD 组凋亡细胞比例显著降低 (29.60± 0.61%, $P < 0.01$),见图 2。说明补肾解毒方含药血清能够缓解 H₂O₂ 导致的 HEB 细胞凋亡。

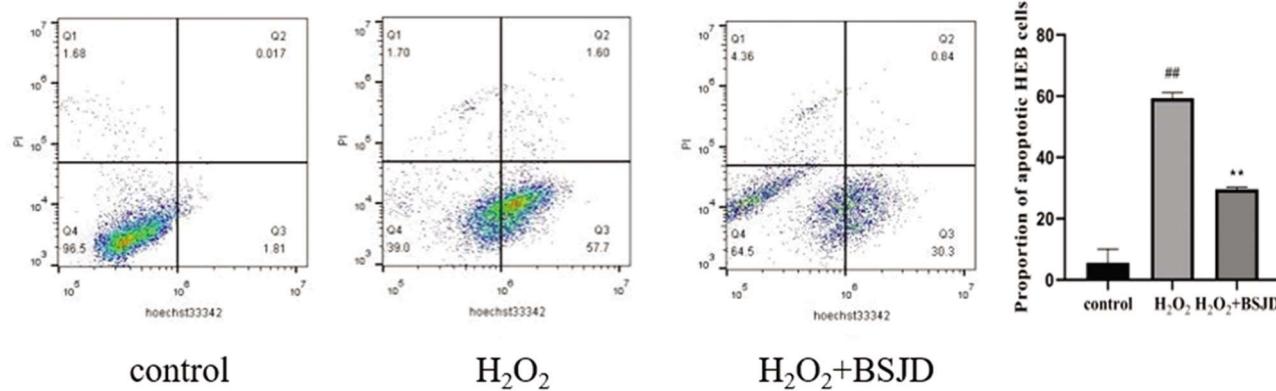


图 2 HEB 细胞凋亡比例

Fig.2 Proportion of apoptotic HEB cells

Note: From left to right, control group, H₂O₂ group, H₂O₂+BSJD group. Compared with the control group, ##: $P < 0.01$; Compared with the H₂O₂ group, **: $P < 0.01$.

2.4 补肾解毒方含药血清显著降低 HEB 细胞活性氧水平

激光共聚焦显微镜下观察可见:control 组细胞生长良好,细胞数量多,轮廓清晰,细胞饱满,胞体有许多突起,核膜边界清晰可见,呈椭圆形。 H_2O_2 组细胞形态发生明显改变,细胞内

部产生空泡,细胞膜边缘模糊,轮廓不清,核膜边界模糊,ROS 荧光强度增强;与 H_2O_2 组相比, H_2O_2+BSJD 组细胞膜与核膜结构较为完整,ROS 荧光强度减弱,见图 3。说明补肾解毒方含药血清能够降低细胞内部的氧化水平,缓解 H_2O_2 造成的氧化损伤。

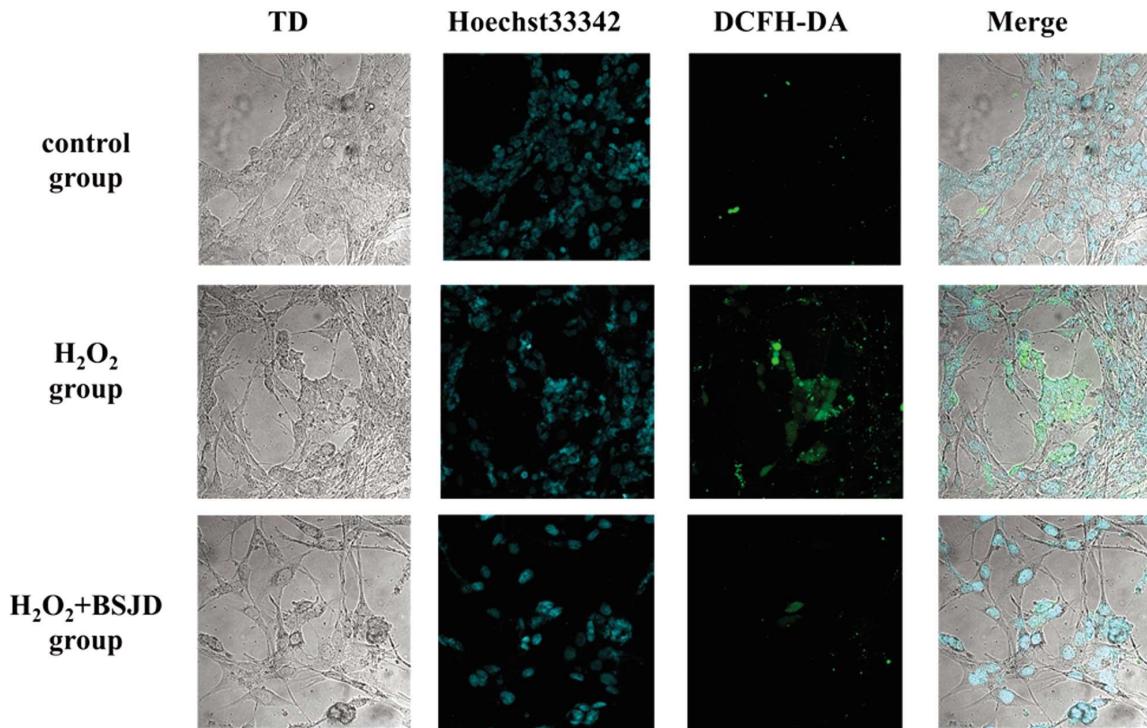


图 3 HEB 细胞活性氧荧光染色($\times 400$)

Fig.3 Fluorescent staining of HEB cells for reactive oxygen species

Note: From top to bottom, control group, H_2O_2 group, H_2O_2+BSJD group.

2.5 补肾解毒方含药血清影响衰老相关基因的转录水平

qPCR 检测结果显示,与 control 组相比, H_2O_2 组 IL1A、IL6 转录水平上升;与 H_2O_2 组相比, H_2O_2+BSJD 组 IGFBP3 转录水平下降 ($P<0.05$),IL1A、IL6、CXCL1、FOXO1 转录水平下降,但差异均无统计学意义。见表 3。

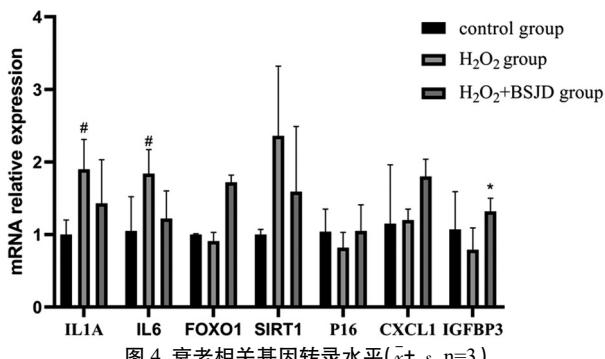


图 4 衰老相关基因转录水平($\bar{x}\pm s$, n=3)

Fig.4 Transcript levels of senescence-associated genes ($\bar{x}\pm s$, n=3)

Note: Compared with the control group, #: $P<0.05$; Compared with the H_2O_2 group, *: $P<0.05$.

3 讨论

中医肾虚衰老学说认为肾精是维持生命活动、脏腑机能的原动力,肾精虚损则脏腑功能减退,表现出衰老征象。肾虚证是

衰老的根本,补肾是中医抗衰老的立法治则^[9]。肾脑理论认为,肾精可化生为髓,脑为髓海,以肾精化生为脑髓的形式将肾脑联系起来^[10]。“毒损脑络”理论重视“毒”在衰老相关性疾病中的作用,而内生的“毒”是人体内产生的病理性产物,易侵犯大脑^[11]。依据中医对衰老病因病机的相关认识,临床常见治疗肾虚衰老复方主要有六味地黄丸,金匮肾气丸,左归丸等补益脾肾等效方^[12]。循证医学有使用肉苁蓉、黄连等中药干预认知功能损害,并且具有较好的临床疗效的记录。在神经退行性疾病中,通过对 52 项研究共 4218 例患者的循证医学分析,中药干预可降低远期痴呆转化率,改善总体认知功能及日常生活能力,并且具有较高的临床有效率,总体耐受性及安全性较好,使用频率最多的 15 种中药由高到低排列为:石菖蒲、何首乌、地黄、银杏叶、人参、川芎、枸杞子、益智仁、远志、黄芪、肉苁蓉、天麻、党参、黄连、白术^[13]。本文结合复方与验方,选用的补肾解毒方中肉苁蓉与黄连进行相关机制研究。肉苁蓉味甘、咸,性温,补肾阳、益精血,能保护神经,改善认知下降^[13];黄连味苦,性寒,清热燥湿、泻火解毒,且具有抗炎、抗氧化、保护神经等作用^[14],两药配伍体现了中医补肾解毒抗衰的治则治法。药理研究显示肉苁蓉具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗菌、抗骨质疏松等功效^[15],同时还有抑制细胞凋亡、增加神经元分化等抗衰老与神经保护作用^[16]。在糖尿病合并脑缺血再灌注大鼠模型中,通过检测黄连对大鼠脑组织中 BAX 和 BCL-2 蛋白水平发现,黄连能修复神经功能损伤、改善细胞凋亡、保护脑组织^[17]。

人体衰老影响整个机体的状态,大脑衰老的重要性尤为显著,神经元是高度分化的有丝分裂后细胞,其中大部分出生后的寿命等于整个器官的寿命^[18],因此脑老化研究于机体抗衰老作用尤为重要。现代医学认为衰老细胞的累积是生物体衰老的主要特征之一,其中脑细胞的老化可导致一系列神经退行性病变的发生^[19]。常见退行性疾病如阿尔茨海默症、帕金森病等^[20]在老龄化社会已引起广泛关注。胶质细胞占神经细胞数量的90%,起到营养、调节、保护等多种作用,胶质细胞的衰老可导致脑老化进程加速^[21]。脑具有耗氧量高和脂质含量高的特点,极易受到氧化应激的影响^[22]。氧化应激是机体不平衡的一种体现,极易增加活性氧(ROS)的产生^[23]。ROS产生过多会引起糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、心血管疾病及神经退行性病变等疾病^[24]。机体经常受到ROS的威胁,ROS可以无选择性地与包括蛋白质、脂质和DNA在内的许多细胞生物分子发生反应,进而造成氧化损伤^[25]。ROS具有较高的氧自由基,例如超氧阴离子自由基(O_2^-)和羟基自由基,以及非自由基氧化剂,例如过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧^[26]。因此本文使用终浓度为2 μM的 H_2O_2 处理HEB细胞,复制了细胞衰老模型($P<0.05$),含药血清培养基预处理显著降低了细胞衰老比例($P<0.05$),表明含药血清处理能有效抵抗 H_2O_2 诱导的HEB细胞衰老,从细胞水平证实了补肾解毒方抗脑老化的功能。使用含药血清预处理的HEB细胞活力显著增强($P<0.05$),说明含药血清能有效促进 H_2O_2 处理的细胞活力恢复,提示补肾解毒方对脑组织具有一定保护作用。

在衰老过程中细胞会分泌细胞因子、趋化因子、生长因子和蛋白酶等多种物质,参与多种生理和病理过程。这一过程被称为衰老相关分泌表型(Senescence-associated secretory phenotype,SASP)^[27]。组织中的衰老细胞倾向于积累,并能通过具有促炎特征的SASP对其微环境产生负面影响^[28]。IL1A、IL6、P16、CXCL1、IGFBP3均是衰老相关基因,IL-1处于SASP上游,可调节下游IL-6的表达^[29]。IL-6是促炎症细胞因子,参与炎症调节,促炎反应的不断增加将引起细胞衰老^[30]。IGFBP3是IGF1家族中一种结合蛋白,IGFBP3与IGF1结合参与衰老表型的传播^[31]。本文结果中 H_2O_2+BSJD 组IL-1A、IL-6、CXCL1、IGFBP3转录水平有所下降,提示补肾解毒方可能通过抗炎和改善衰老相关分泌表型途径减少细胞衰老的发生。试验中观察到P16表达量无明显变化,后续还将设计时间剂量等梯度进一步深入探讨可能的分子水平变化。

流式细胞术结果显示, H_2O_2+BSJD 组凋亡细胞比例显著降低($P<0.01$),提示补肾解毒方可能通过抗凋亡途径抵抗细胞老化。免疫荧光试验显示 H_2O_2+BSJD 组ROS荧光强度显著减弱,表明含药血清能显著降低胞内氧化水平。胞内活性氧能通过JNK/P38途径激活FOXO通路,从而产生多种过氧化物酶以达到抗氧化效果^[32,33]。FOXO1是Sirtuins通路中的重要转录因子,其中SIRT1是明星长寿基因^[34],本文 H_2O_2+BSJD 组与 H_2O_2 组的SIRT1水平并无差异,提示 H_2O_2+BSJD 组可能通过其他途径达到抗衰老的作用,后续还将从其他通路多角度探究抗衰老的机制。

本文基于中医药补肾抗衰老理论,通过含药血清干预体外细胞模型,初步探讨了补肾解毒方抗脑老化的机制,后续还将

结合体内研究进一步深入研究,为中医药补肾抗衰及肾脑理论的生物学阐释提供实验依据,为抗衰老保健及临床治疗、预防年龄相关疾病提供实验基础。

参考文献(References)

- [1] He Q L, Liu G H, Bao Z J, et al. Expert Consensuses of China for Aging and Antiaging (2019 Edition)[J]. Geriatrics & Health Care, 2019, 25(05): 551-553
- [2] Yin J A, Liu X J, Yuan J, et al. Longevity manipulations differentially affect serotonin/dopamine level and behavioral deterioration in aging *Caenorhabditis elegans*[J]. J Neurosci, 2014, 34(11): 3847-3958
- [3] Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(10): 565-581
- [4] Yuan Y J, Shi J, Tian J Z. Professor TIAN Jin-zhou's clinical experience in treating dementia by stages [J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 38(08): 770-773
- [5] Zheng G Q. Prevention and Treatment of Mild Cognitive Impairment Caused by Alzheimer's Disease by Integrative Medicine [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2022, 42(02): 143-147
- [6] Wu C J, Chien M Y, Lin N H, et al. Echinacoside Isolated from *Cistanche tubulosa* Putatively Stimulates Growth Hormone Secretion via Activation of the Ghrelin Receptor[J]. Molecules, 2019, 24(4): 720
- [7] Li T, Wang P, Guo W, et al. Natural Berberine-Based Chinese Herb Medicine Assembled Nanostructures with Modified Antibacterial Application[J]. ACS Nano, 2019, 13(6): 6770-6781
- [8] Hu Z, Zhao P W, Yang Y, et al. Experimental Study of Berberine Combined with Echinacoside on the Senescence of Human Brain Glial Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2021, 21(13): 2406-2409
- [9] Guan L C, Zhang M Z, Wang Z L, et al. Discussion of mechanism of tonifying kidney and anti-aging based on the correlation between vitamin D deficiency and kidney deficiency syndrome[J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2019, 25(06): 766-8+837
- [10] Li X, Xie L H, Qi M X, et al. Status of Diagnosis and Treatment of Stroke Based on the Theory of "Kidney-brain Homotherapy"[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 1-4
- [11] 苏芮, 韩振蕴, 范吉平, 等."毒损脑络"理论在阿尔茨海默病中医研究领域中的意义[J]. 中医杂志, 2011, 52(16): 1370-1371
- [12] 刘娟, 蒋俊和. 中医抗衰老方剂的实验研究进展[C]. 中华中医药学会第十四次中医方剂学学术年会, 2014: 252-255
- [13] Wang N, Ji S, Zhang H, et al. Herba Cistanches: Anti-aging[J]. Aging Dis, 2017, 8(6): 740-759
- [14] Xu Z, Feng W, Shen Q, et al. Rhizoma Coptidis and Berberine as a Natural Drug to Combat Aging and Aging-Related Diseases via Anti-Oxidation and AMPK Activation[J]. Aging Dis, 2017, 8(6): 760-777
- [15] Feng D, He Y, Jiang Y J, et al. Journal of Food Safety & Quality[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(11): 4429-4437
- [16] Fu Z, Han L, Zhang P, et al. Cistanche polysaccharides enhance echinacoside absorption in vivo and affect the gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 149(7): 32-40
- [17] Gai X H, Liu S X, Ren T, et al. Research progress on chemical constituents of *Coptidis Rhizoma* and its pharmacological activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(20): 4919-4927

- [18] Isaev N K, Genrikhs E E, Oborina M V, et al. Accelerated aging and aging process in the brain[J]. Rev Neurosci, 2018, 29(3): 233-273
- [19] Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(10): 565-581
- [20] Lin L, Xiong M, Jin Y, et al. Review on Neuroimaging Studies of Cognitive Reserve During Brain Aging [J]. Journal of Beijing University of Technology, 2022, 48(7): 794-804
- [21] Boisvert M M, Erikson G A, Shokhirev M N, et al. The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain [J]. Cell Rep, 2018, 22(1): 269-285
- [22] Singh A, Kukreti R, Ssao L, et al. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1583
- [23] Peluso I, Morabito G, Urban L, et al. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst [J]. Endocr Metab Immune, 2012, 12(4): 351-360
- [24] Phaniendra A, Jestadi D B, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases [J]. Indian J Clin Biochem, 2015, 30(1): 11-26
- [25] Weyemi U, Dupuy C. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses [J]. Mutat Res, 2012, 751(2): 77-81
- [26] Zorvo D B, Juhaszova M, Sollott S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. Physiol Rev, 2014, 94(3): 909-950
- [27] Acosta J C, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(8): 978-90
- [28] Ovadya Y, Krizhanovsky V. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies[J]. Biogerontology, 2014, 15(6): 627-642
- [29] Orjalo A V, Bhaumik D, Gengler B K, et al. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(40): 17031-17036
- [30] Laberge R M, Sun Y, Orjalo A V, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(8): 1049
- [31] Ushakov R E, Aksenov N D, Pugovkina N A, et al. Effects of IGFBP3 knockdown on human endometrial mesenchymal stromal cells stress-induced senescence [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 570(9): 143-147
- [32] Lennicke C, Cochemé H M. Redox regulation of the insulin signalling pathway[J]. Redox biology, 2021, 42: 101964
- [33] Zhang L Q, Li C H, Jiang L, et al. ROS Factors in Aging Hypothesis [J]. Progress in Physiological Sciences, 2020, 51(05): 327-331
- [34] Jenwitheesuk A, Boontem P, Wongchirat P, et al. Melatonin regulates the aging mouse hippocampal homeostasis via the sirtuin1-FOXO1 pathway[J]. Excli Journal, 2017, 16: 340-353

(上接第 4455 页)

- [28] Fawaz R, Baumann U, Ekong U, et al. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2017, 64(1): 154-168
- [29] Tan AP, Svrckova P, Cowan F, et al. Intracranial hemorrhage in neonates: A review of etiologies, patterns and predicted clinical outcomes[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2018, 22(4): 690-717
- [30] Wirz Y, Meier MA, Bouadma L, et al. Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on clinical outcomes in intensive care unit patients with infection and sepsis patients: a patient-level meta-analysis of randomized trials[J]. Crit Care, 2018, 22(1): 191
- [31] Hung YC, Huang KL, Chen PL, et al. UQCRC1 engages cytochrome c for neuronal apoptotic cell death[J]. Cell Rep, 2021, 36(12): 109729
- [32] 李玉华, 马兵, 胡莹莹, 等. 重症肺炎患儿血清颗粒蛋白前体、血清淀粉样蛋白 A 水平变化及其与病情和预后的关系 [J]. 山东医药, 2021, 61(16): 16-19
- [33] 钟婉玲, 黄宇戈. 早期乳酸测定联合儿童危重病例评分在重症监护室脓毒症患儿预后评估中的作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(12): 934-937