

# 鸡胚外泌体对小鼠延缓衰老的作用

李莉<sup>1</sup>, 赵莎莎<sup>1</sup>, 王小强<sup>1</sup>, 戴晓宇<sup>1</sup>, 季冬<sup>2</sup>, 李栋<sup>1,3\*</sup>

(1. 济南万泉生物技术有限公司, 山东济南 250102) (2. 德州市妇幼保健院, 山东德州 253000)  
(3. 山东大学齐鲁医院, 山东济南 250012)

**摘要:** 研究鸡胚外泌体对小鼠延缓衰老的作用。超高速离心法制备鸡胚外泌体并鉴定; 通过体外造血集落形成实验证明其促进造血的能力; 用 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 制作小鼠衰老模型, 灌胃不同浓度鸡胚外泌体, 检测行为学、血清学指标和肝肾病理等。集落实验显示鸡胚外泌体组的红系爆式集落形成单位 (Burst Forming Unit-Erythroid, BFU-E) 集落体积更大, 低、中、高剂量组的集落数量分别比对照组增加了 63.90%、59.47%、68.82% ( $P<0.01$ )。与衰老组相比, 鸡胚外泌体高剂量组小鼠的胸腺指数、原站台象限停留时间占比、四肢抓力分别升高了 71.12%、54.46% ( $P<0.05$ ) 和 21.21% ( $P<0.01$ ), 而疲劳仪掉落次数则减少了 64.89% ( $P<0.05$ )。抗氧化相关指标中, 血清总抗氧化能力 (Total Antioxidant Capacity, T-AOC) 和谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的含量分别比衰老组升高了 60.41% 和 396.72% ( $P<0.01$ ), 而丙氨酸氨基转移酶 (Alanine Aminotransferase, ALT) 降低了 27.88% ( $P<0.05$ )。病理组织分析显示, 鸡胚外泌体低、高剂量组均可有效缓解由 D-gal 致衰引起的小鼠肝肾损伤。综上, 鸡胚外泌体可显著促进造血、改善衰老小鼠的脑功能和肌肉力量, 减少体内炎症并提高机体抗疲劳及抗氧化能力, 改善肝肾等脏器的结构和功能, 从而发挥显著的延缓衰老功能。该本文为开发具有延缓衰老功能的新产品提供理论依据。

**关键词:** 抗衰老; 造血; 鸡胚外泌体; 空间学习与记忆; 肌力

文章编号: 1673-9078(2024)09-45-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1004

## The Anti-aging Effects of Exosomes from Chicken Embryos on Mice

LI Li<sup>1</sup>, ZHAO Shasha<sup>1</sup>, WANG Xiaoqiang<sup>1</sup>, DAI Xiaoyu<sup>1</sup>, JI Dong<sup>2</sup>, LI Dong<sup>1,3\*</sup>

(1. Jinan Wanquan Biotechnology Co. Ltd., Jinan 250102, China)

(2. Dezhou Maternal and Child Health Hospital, Dezhou 253000, China)

(3. Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** The anti-aging effects of exosomes from chicken embryos on mice was carried out. Exosomes from chicken embryos were prepared by ultracentrifugation. The ability to promote hematopoiesis was proven by an *in vitro* hematopoietic colony formation assay. A model of D-galactose (D-gal) induced aging in mice was constructed, and different concentrations of exosomes from chicken embryos were administered by gavage to mice, and their physiology and behavior-related indicators, and hepatic and renal pathology, were detected. The colony formation assay showed that, compared with the blank group, the volume of burst forming unit-erythroid (BFU-E) colonies in groups with low, middle and high doses of exosomes from chicken embryos was larger, and the number of colonies significantly increased by 63.90%, 59.47% and 68.82%

引文格式:

李莉, 赵莎莎, 王小强, 等. 鸡胚外泌体对小鼠延缓衰老的作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 45-55.

LI Li, ZHAO Shasha, WANG Xiaoqiang, et al. The anti-aging effects of exosomes from chicken embryos on mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 45-55.

收稿日期: 2023-08-25

基金项目: 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目 (2022TSGC2001)

作者简介: 李莉 (1986-), 女, 学士, 技术员, 研究方向: 细胞免疫, E-mail: 1426355968@qq.com

通讯作者: 李栋 (1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 再生医学, E-mail: lidong73@sdu.edu.cn

respectively ( $P<0.01$ ). The animal experiments showed that, compared with the aging model group, the thymus index, the proportion of dwell time on the original platform quadrant, and the grip power of limbs in the high-dose exosome group significantly increased by 71.12%, 54.46% ( $P<0.05$ ) and 21.21% ( $P<0.01$ ), respectively, and the number of drops of fatigue meter significantly decreased by 64.89% ( $P<0.05$ ). In the indices related to antioxidation, the total antioxidant capacity (T-AOC) of blood serum and glutathione (GSH) contents significantly increased, by 60.41%, 396.72% ( $P<0.01$ ), respectively. The alanine aminotransferase (ALT) significantly decreased by 27.88% ( $P<0.05$ ). Pathological analysis of the low and high dose groups of exosomes from chick embryos both showed effectiveness in alleviating the hepatic and renal damage caused by D-gal. In summary, exosomes from chicken embryos can significantly promote hematopoiesis, improve brain function and muscle strength in aging mice, reduce inflammation, enhance anti-fatigue and antioxidant abilities, improve the structure and function of major organs such as the liver and kidneys, and thus play a significant role in delaying aging. This article provides a theoretical basis for the development of new products aimed at delaying aging.

**Key words:** anti-aging, hematopoiesis, exosomes from chicken embryos, spatial learning and memory, muscle strength

目前人口年龄结构的老龄化是世界性的普遍问题,在2022年,我国65岁以上人口已突破2亿,正式步入“深度老龄化社会”<sup>[1]</sup>。随之,衰老问题也逐渐受到大家的重新审视。衰老是一种由多种因素引起的微妙而复杂的生理现象,不仅包括各种细胞、组织、器官功能的改变,还涉及认知和行为能力的退化,严重拉低了生活质量<sup>[2]</sup>。所以,抗衰老研究日益成为当今热点。鸡胚蛋,又叫“活珠子”、“毛蛋”、“喜蛋”等,是指还未破壳的可食用的受精鸡蛋,含有多种营养成分。在民间鸡胚蛋被认为是具有补血益精、活血理虚、延缓衰老的高级补品,也有动物研究显示,其确有促进生长、提高免疫力等功效,但研究多集中于鸡胚整体的功效学上,具体哪种成分发挥功效尚未研究<sup>[3]</sup>。目前,外泌体研究领域日渐活跃。外泌体是细胞通过胞吐作用产生的小囊泡,直径通常为40~200 nm,具有与质膜相似的脂质双层结构;它携带细胞表面蛋白、细胞内蛋白、RNA、DNA、脂质、氨基酸和代谢物等生理活性物质,不断的由细胞产生并被细胞吸收,作为信息载体在调节细胞间通讯中发挥作用;不同细胞来源的外泌体其大小、内容物和对受体细胞产生的功能均有所不同<sup>[4,5]</sup>。体外研究表明<sup>[6,7]</sup>,外泌体及其miRNA可以抵抗胃肠道的环境条件,在蛋白水解消化中存活下来,经肠上皮细胞吸收进入体循环,特别是miRNA会影响基因的转录与表达,调节机体的生理、免疫等功能。经研究,口服外泌体在多种疾病模型中具有疗效,如糖尿病、抗癌、炎症治疗等,可知外泌体是一种潜在的食源性生物活性物质<sup>[8,9]</sup>。本文通过研究鸡胚外泌体是否具有抗衰老的功效,为进一步开发抗衰老新产品提供科学依据。

D-gal致衰动物模型具有操作简单、造模时间短、重复性好等优点,在衰老和抗衰老领域已被广泛认可和应用<sup>[10-13]</sup>。本实验首先提取鸡胚外泌体,鉴定其质量,其次利用集落培养实验检测其体外促进造血能力,最后通过小鼠在D-gal诱导衰老过程中灌胃鸡胚外泌体,检测小鼠空间学习与记忆能力、耐力、脏器结构及功能、血清抗氧化及炎症因子指标,探究鸡胚外泌体延缓衰老的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

第11.5天的鸡胚,购自山东无特定病原鸡实验种鸡场,SPF级,由山东省实验动物中心检测合格,检验报告编号:鲁动动检字[2020]DJ0009号;脐血来自山东大学齐鲁医院妇产科正常妊娠脐带血,均知情同意并获得了山东大学齐鲁医院科研伦理委员会批准[KYLL-2021(KS)-0144]。

### 1.2 动物来源

KM小鼠,雌性,24只,体质量18~22 g,SPF级,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。由苏州西山生物技术有限公司于2021年9月22日检测合格,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010,质量许可编号:1102290038808。该实验经过了山东大学齐鲁医院实验动物福利伦理审查[批准文号:DWLL-2021-036]。

### 1.3 主要仪器设备与试剂

#### 1.3.1 主要仪器设备

DDL5 冷冻低速离心机, YINGTAI; LYNX 6000

超高速离心机, Thermo; JEM-1200EX 透射电镜, 日本电子; 马尔文 NanoZS 纳米粒度电位仪, 山东大学晶体研究所; MULTISKAN MK3 酶标仪, Thermo; Zeta View 纳米颗粒跟踪分析仪, Particle Metrix; UER2005012 紫外可见分光光度计, MAPADA; Morris 水迷宫测试系统、抓力仪、轮转式疲劳仪, 自制。

### 1.3.2 主要试剂

MethoCult™ H4434 Classic 培养基 (批号: 1000030547), STEMCELL; D-半乳糖 (批号: 726M052), 索莱宝; ALT 活性检测试剂盒 (批号: 20211110), 索莱宝; 谷草转氨酶 (Aspartate Transaminase, AST) 活性检测试剂盒 (批号: 20211116), 索莱宝; 尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 含量检测试剂盒 (批号: 20211118), 索莱宝; 脂质过氧化物丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号: 20211202), 凯基生物; T-AOC 测定试剂盒 (批号: 20211203), 凯基生物; Mouse TNF-alpha ELISA Kit (批号: 40001024), Proteintech; Mouse IL-1 beta ELISA Kit (批号: 40001033), Proteintech; GSH 测定试剂盒 (20211203), 凯基生物。

### 1.4 鸡胚外泌体的提取

根据参考文献<sup>[4]</sup>中鸡胚外泌体提取方法, 采用超速离心法对所购鸡胚进行鸡胚组织外泌体的提取。鸡胚蛋表面用体积分数为 75% 的酒精消毒, 取出鸡胚, 冰 PBS 冲洗 3 次, 匀浆, 加入适量质量分数为 1.0% 的胶原酶 III, 37 °C 恒温震荡水浴 40 min, 搅拌 1 次 / 5 min, 加入适量的冰 PBS 进行稀释, 70 目筛网过滤, 4 °C 下依次进行 300、2 000、20 000 g 离心, 分别离心 15、15、30 min, 上清进行 1 μm、0.22 μm 滤膜过滤, 100 000 g 离心 70 min, 去上清, 加入适量冰 PBS 重悬, 100 000 g 离心 70 min, 沉淀重悬于适量的冰 PBS 中, 分装并置于 -80 °C 冰箱保存, 备用。

### 1.5 造血干细胞集落形成实验

分离脐血单个核细胞 (Mononuclear Cells, MNCs), 每 5 mL 半固体培养基中加入 250 μL 的 MNCs 混悬液 (MNCs 终接种密度为  $5 \times 10^3$  / mL)、250 μL 的质量浓度分别为 400、800、1 200 μg/mL 的鸡胚外泌体 (以 PBS 缓冲液为空白对照), 混匀, 接种于 6 孔板, 每孔 1.1 mL, 放入 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 14 d 后观察集落形态并拍照、计数。

### 1.6 实验动物分组及造模给药

小鼠在温度为 (24±1) °C、相对湿度为 50%±10%、日光灯照明 12 h 交替的 SPF 环境下饲养, 自由饮水和进食, 正常单笼饲养 7 d 后按体重随机进行分组, 分为 4 组, 每组 6 只。分组命名如下: ①正常组 (Normal Group)、② D-半乳糖模型组 (D-gal Model Group)、鸡胚外泌体 (Chicken Embryo Exosome, CEE) 口服: ③低剂量组 (D-gal+L-CEE Group)、④高剂量组 (D-gal+H-CEE Group)。每天称重 1 次, 按照 0.1 mL/10 g BW 容积给药。正常组外各组均颈背部皮下注射 D-半乳糖, 剂量为 200 mg/(kg·d), 连续 8 周; 正常组注射等量的质量分数为 0.9% 的生理盐水。与此同时, 鸡胚外泌体口服低、高剂量组灌胃鸡胚外泌体, 剂量分别为 2、4 mg/(kg·d), 连续 8 周; 正常组和 D-半乳糖模型组均灌胃等量的 PBS 缓冲溶液。

### 1.7 观察小鼠外观及测定体重

每天观察小鼠外观及形态的变化情况, 称重, 每 7 天作为一个周期, 对小鼠体重变化进行分析。

### 1.8 行为学指标检测

#### 1.8.1 水迷宫测试

给药结束前 3 d 进行水迷宫测试。试验前, 将小鼠放入带有可视平台的泳池中, 若小鼠毫无困难地直接游向平台, 则说明小鼠的游泳能力和视力均正常, 开始测试。

##### 1.8.1.1 定位航行试验

水池划分为四个象限, 站台固定放于其中一个象限, 每天同一时间, 按一定象限顺序, 将小鼠面向池壁分别放入其它三个象限水中, 记录小鼠登上站台的时间 (最长纪录时间为 120 s), 并在站台上适应 10 s, 若小鼠 120 s 内无法登上站台, 用棍子引导其登上站台并保障适应 10 s。训练完后, 及时擦干小鼠身上水分。按每天 3 次对小鼠进行训练, 训练间隔 30 min, 连续训练 4 d 后进行最终测试, 以小鼠每天 3 次登上站台时间的平均值作为当天的逃避潜伏期, 同时记录最终测试时小鼠入水至站台的路径。

##### 1.8.1.2 空间探索试验

定位航行试验结束 24 h 后, 撤去站台。在最远离原站台的那一象限, 将小鼠面向池壁放入水中, 记录小鼠在 120 s 内在原站台象限的停留时间。

## 1.8.2 小鼠肌肉力量、抗疲劳能力测定

### 1.8.2.1 小鼠四肢抓力测定

测定前,将小鼠置于抓力仪上提前适应下,确保待测小鼠均会抓握。测定时,待小鼠四肢脚掌完全抓牢后,抓住其尾巴末梢平稳向后拉动,仪器自动记录最大拉力,每只小鼠连续测定3次取平均值。

### 1.8.2.2 小鼠耐力测定

测定前,让小鼠在疲劳仪上训练适跑,摸索出最佳轮转速度和测定时间。测定时,将小鼠置于疲劳仪转轴上,慢慢升高转速至15 r/min,适应1 min后再开始计时,记录每只小鼠5 min内的掉落次数,休息30 min后进行下一次测定,每只小鼠共测3次取平均值。

## 1.9 动物处理及样本采集

行为学测试结束后,小鼠禁食不禁水12 h,称重并记录。行眼球取血,37 °C水浴孵化全血1 h,1 000 g离心15 min,收集血清并分装,-80 °C保存,按照试剂盒说明书对血清各指标进行检测。脱颈椎处死,在冰袋上快速取出脾脏、胸腺、肝脏、肾脏,用4 °C生理盐水洗净表面血液,滤纸吸干,称重、计算脏器指数;肾脏、肝脏用4 wt.%多聚甲醛固定暂存、制备病理切片并HE染色。

## 1.10 统计学处理

运用GraphPad Prism 8.3.0软件对数据进行统计分析并绘制数据统计图,所有数据全部以Mean±SE表示,多组间比较采用单或双因素方差分析, $P<0.05$ 认为存在显著性差异, $P<0.01$ 认为存在极显著差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鸡胚外泌体的蛋白质量浓度及质量鉴定

使用BCA法对所提取的鸡胚外泌体进行蛋白定量分析,得到鸡胚外泌体的蛋白质量浓度为8.13 mg/mL。见图1所示,鸡胚外泌体在透射电镜下能看到许多完整的椭圆形膜型结构囊泡;纳米粒度电位仪检测外泌体显示,直径高峰分布在70~140 nm之间,30~190 nm间囊泡占比高达91.1%;纳米颗粒跟踪分析仪检测到外泌体囊泡直径高峰为124.6 nm,其囊泡数量为每毫升 $3.1\times 10^6$ 个,直径为(124.6±82.5) nm的囊泡占比是98.3%,此范围内囊泡数量为每毫升 $3.05\times 10^{10}$ 个;以上结果提示,所提鸡胚外泌体的外

观形态、粒径大小与参考文献<sup>[5,9,14]</sup>中基本一致,符合外泌体的典型特征,可判定提取产物即为外泌体。

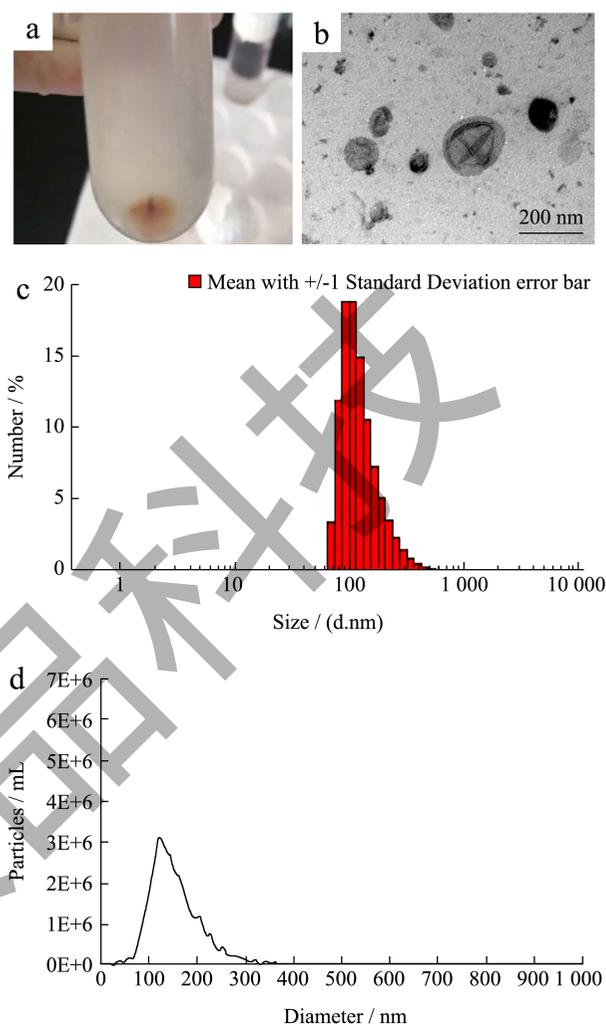


图1 鸡胚外泌体的质量鉴定

Fig.1 Quality test of chicken embryo exosomes

注:a.超速离心后所得外泌体沉淀;b.透射电镜下鸡胚外泌体形态;c.鸡胚外泌体直径分布柱状图;d.鸡胚外泌体囊泡大小及数量分布图。

### 2.2 造血干细胞集落生长统计

造血干细胞具有自我更新和分化为成熟造血细胞的能力;在适当的半固体培养基中培养,单个祖细胞会增殖和分化形成离散的集落;目前来源有脐带血、骨髓、外周血<sup>[15-17]</sup>。本实验通过典型的半固体培养方法,检测鸡胚外泌体是否可以促进脐带血造血干细胞的增殖与集落形成,来研究其促进造血功能。培养至14 d时,见图2a~2d可知,各组集落绝大部分为颜色呈现红色的BFU-E集落,几乎无其它种类集落;与空白组的集落比较,低、中、高

鸡胚外泌体组的集落体积更大, 每个集落所含红细胞数目更多。由表 1 可知, 低、中、高鸡胚外泌体组的集落数量比空白组分别显著增加了 63.90%、59.47%、68.82% ( $P < 0.01$ )。以上结果说明, 鸡胚外泌体在体外具有促进造血的功能, 特别是促红系造血。另外, 低、中、高鸡胚外泌体各组间集落形态与数量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 分析原因可能是外泌体实验剂量均偏高, 在此实验条件下已达到其促进造血功能的上限, 未能看出随着外泌体剂量的增加促进造血效果越好的趋势。中医有通过滋补五脏、营养六腑, 以“补”来减少身体的虚损, 来达到延年益寿效果的理论。其中补血是一个重要方面, 血足则全身细胞、组织与器官得到营养物质的滋养, 同时也有利于有害代谢产物的排出, 从而减缓衰老<sup>[18]</sup>。综上, 鸡胚外泌体可通过促进造血来延缓机体衰老。

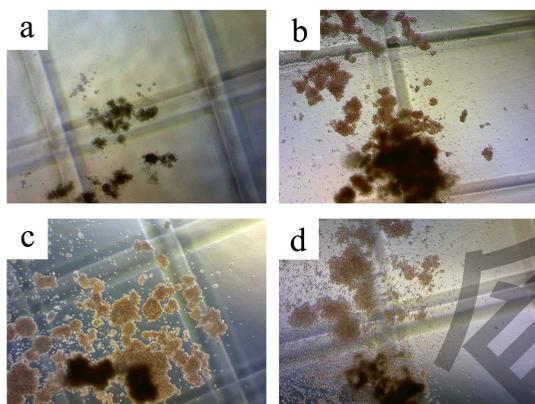


图 2 不同浓度鸡胚外泌体对造血干细胞集落形态 (40×) 的影响

Fig.2 Effects of chick embryo exosomes with different concentrations on hematopoietic stem cell colony morphology (40×)

注: a. 空白组集落形态; b. 低剂量组集落形态; c. 中剂量组集落形态; d. 高剂量组集落形态。

表 1 不同浓度鸡胚外泌体对造血干细胞集落数量的影响  
Table 1 Effects of chick embryo exosomes with different concentrations on hematopoietic stem cell colony number

组别	集落数量/个
对照组	81.33 ± 1.53
低剂量组	133.30 ± 18.72**
中剂量组	129.70 ± 12.50**
高剂量组	137.30 ± 14.50**

注: \*\* $P < 0.01$  vs 对照组。

### 2.3 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠生理状态、体质量、器官指数的影响

外观及生理的改变一定程度上可以反映小鼠的健康指数<sup>[11]</sup>。实验结束后, 见图 3 所示, 正常组小鼠毛发顺滑有光泽且皮肤弹性好, 精神状态好; D-gal 模型组小鼠毛发有些稀疏、无光泽且易掉, 精神不振。以上结果提示, D-gal 致衰模型造模成功<sup>[10]</sup>。与模型组相比, 鸡胚外泌体治疗组小鼠毛发明显增多、顺滑、有光泽性, 精神有所好转, 特别是鸡胚外泌体高剂量组小鼠的生理状态与正常组十分接近。综上, 鸡胚外泌体能一定改善 D-gal 致衰小鼠的生理状态, 且存在一定的量效关系。

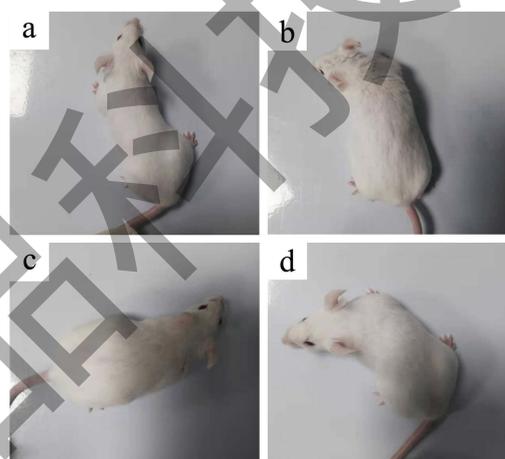


图 3 实验后各组小鼠外观形态变化情况

Fig.3 Changes of appearance of mice in each group after the experiment

注: (a) Normal Group; (b) D-gal model Group; (c) D-gal+L-CEE Group; (d) D-gal+H-CEE Group。图 6、7 同。

由图 4 可知, 第 0 周时各组小鼠体质量十分接近, 且每周内各组小鼠体质量均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 整个实验周期内, 各组小鼠体质量均缓缓增长, 其中正常组小鼠增长趋势最为缓慢, D-gal 模型组小鼠体质量增长最快, 鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠体质量增长趋势介于正常组与模型组之间, 且最后 1 周体质量稍微有所下降。由表 2 可知, 实验前后有关小鼠的体质量增长率, D-gal 模型组较正常组显著增加了 98.25% ( $P < 0.01$ ), 鸡胚外泌体低剂量组与正常组、D-gal 模型组、鸡胚外泌体高剂量组均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 鸡胚外泌体高剂量组较 D-gal 模型组显著降低了 27.38% ( $P < 0.05$ )。从小鼠外观及生理状态了解, D-gal 在一定程度上能降低小鼠的活动能力, 与模型组小鼠体质量增长最

为迅速相符，与参考文献结果基本一致，验证模型建立成功<sup>[10]</sup>；鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠体质量增长趋势均小于模型组，特别是高剂量组，提示鸡胚外泌体一定程度上能提高小鼠的活动能力，并且存在一定的量效关系。

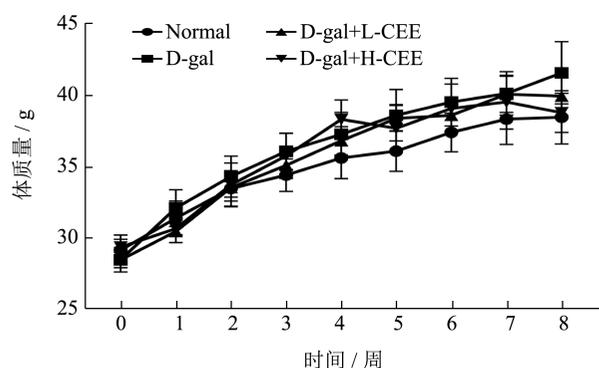


图 4 实验后各组小鼠体质量变化情况

Fig.4 Changes of body weight of mice in each group after the experiment

表 2 实验后各组小鼠体质量变化情况

Table 2 Changes of body weight of mice in each group after the experiment

组别	体质量增长率/%
Normal	16.55 ± 7.21
D-gal	32.81 ± 9.84**
D-gal+L-CEE	25.73 ± 6.18
D-gal+H-CEE	20.20 ± 6.17 <sup>#</sup>

注: \*\* $P < 0.01$  vs. 正常组。<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. 模型组。

脏器指数可以反映器官的结构与功能变化，随着衰老，肝、肾细胞会水肿，胸腺也会萎缩导致机体的代谢及免疫功能下降，D-gal 致衰模型往往也会出现此种现象<sup>[10,11,19]</sup>。由表 3 可知，D-gal 模型组小鼠的肝脏指数比正常组显著升高了 21.49%

表 4 鸡胚外泌体对D-gal小鼠定位航行和空间探索能力的影响

Table 4 Effects of chick embryo exosomes on positioning navigation and spatial exploration ability of D-gal mice

组别	逃避潜伏期/s					原站台象限停留时间占比/%
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	最后 1 天	
Normal	46.28 ± 9.67	30.17 ± 20.48	30.06 ± 19.13	22.33 ± 7.94	14.17 ± 11.11	53.89 ± 9.74
D-gal	35.50 ± 24.38	61.50 ± 9.89 <sup>*</sup>	32.33 ± 17.14	49.86 ± 20.56 <sup>*</sup>	41.70 ± 23.06 <sup>*</sup>	34.30 ± 14.81 <sup>*</sup>
D-gal+L-CEE	56.72 ± 22.79	27.67 ± 21.98 <sup>##</sup>	32.89 ± 14.83	25.56 ± 19.42	30.19 ± 14.44	38.34 ± 9.42
D-gal+H-CEE	51.67 ± 25.25	33.45 ± 19.34 <sup>##</sup>	15.00 ± 8.39	16.11 ± 7.09 <sup>##</sup>	16.72 ± 16.55	52.98 ± 8.59 <sup>##</sup>

注: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs. 正常组。<sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. 模型组。

( $P < 0.05$ )，鸡胚外泌体低、高剂量组与正常组相比均无显著差异 ( $P > 0.05$ )，鸡胚外泌体高剂量组小鼠的肝脏指数比低剂量组降低了 6.14%，但显著差异 ( $P > 0.05$ )。D-gal 模型组的肾脏指数比正常组显著升高了 9.56% ( $P < 0.05$ )，鸡胚外泌体低、高剂量组与正常组相比均无显著差异 ( $P > 0.05$ )，鸡胚外泌体高剂量小鼠的肾脏指数比低剂量组降低了 7.30，但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。各组的脾脏指数均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。D-gal 模型组小鼠的胸腺指数比正常组显著降低了 41.45% ( $P < 0.05$ )；鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠的胸腺指数比 D-gal 模型组分别显著升高了 76.98%、71.12% ( $P < 0.05$ )，且与正常组均无显著差异 ( $P > 0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠的胸腺指数比低剂量组升高了 3.23%，但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。综上，D-gal 致衰模型中小鼠代谢功能受损，免疫功能减弱，衰老加快，而鸡胚外泌体一定程度上能延缓肝、肾器官的老化肿大和胸腺的萎缩，增强机体的代谢及免疫功能，但并未看出明显的量效关系，通过增加低、高剂量组间外泌体的灌胃剂量差，量效关系可能会被明显呈现出来。

表 3 各组小鼠的器官指数 (mg/g)

Table 3 Organ index of mice in each group

组别	肝脏指数	肾脏指数	脾脏指数	胸腺指数
Normal	28.76 ± 1.67	9.83 ± 0.19	2.34 ± 0.21	3.58 ± 0.54
D-gal	34.94 ± 3.42 <sup>*</sup>	10.77 ± 0.46 <sup>*</sup>	2.58 ± 0.74	2.10 ± 0.55 <sup>*</sup>
D-gal+L-CEE	31.43 ± 4.25	10.69 ± 0.87	2.37 ± 0.23	3.71 ± 1.06 <sup>#</sup>
D-gal+H-CEE	33.36 ± 4.41	9.91 ± 0.54	2.45 ± 0.56	3.59 ± 0.96 <sup>#</sup>

注: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs. 正常组。<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. 模型组。

## 2.4 鸡胚外泌体对D-gal行为学指标的影响

### 2.4.1 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠空间学习与记忆的影响

经研究, 机体的学习及记忆能力随着衰老会变化, D-半乳糖给药已被证明会导致衰老小鼠的空间学习及记忆能力受损<sup>[13,19]</sup>。目前 Morris 水迷宫试验作为经典行为学实验, 通过测定动物找到隐藏站台的时间、游泳轨迹和动物凭借空间参照物在原站台停留时间来评价其空间学习、记忆能力<sup>[20,21]</sup>。见表 4, 在定位航行试验中, 训练的第 1 天, 各组间小鼠逃避潜伏期均无显著差异 ( $P>0.05$ )。训练的第 2 天, 与正常组小鼠逃避潜伏期相比, D-gal 模型组显著延长了 103.84% ( $P<0.05$ ), 而鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 并且与 D-gal 模型组小鼠逃避潜伏期相比, 鸡胚外泌体低剂量组显著缩短了 55.01% ( $P<0.01$ ), 鸡胚外泌体高剂量组显著缩短了 45.61% ( $P<0.05$ ); 鸡胚外泌体低、高剂量组间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。训练的第 3 天, 各组间小鼠逃避潜伏期均无显著性差异 ( $P>0.05$ )。训练的第 4 天, 与正常组小鼠逃避潜伏期相比, D-gal 模型组显著延长了 123.29% ( $P<0.05$ ), 而鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 与 D-gal 模型组小鼠逃避潜伏期相比, 鸡胚外泌体低剂量组无显著差异 ( $P>0.05$ ), 而鸡胚外泌体高剂量组显著缩短了 67.69% ( $P<0.01$ ); 鸡胚外泌体低、高剂量组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。训练的最后 1 天, 与正常组相比, D-gal 模型组小鼠逃避潜伏期显著延长了 194.28% ( $P<0.05$ ), 鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 鸡胚外泌体低、高剂量组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。见图 5, 训练的最后 1 天, D-gal 致衰模型组小鼠的游泳轨迹最为复杂, 正常组小鼠游泳轨迹最短, 鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠游泳轨迹介于两者之间, 但鸡胚外泌体低、高剂量组间未看到明显差异。见表 4, 在空间探索试验中, 与正常组相比, D-gal 致衰小鼠在原站台象限停留时间显著减少了 36.35% ( $P<0.05$ ), 鸡胚外泌体低、高剂量组无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 与模型组小鼠在原站台象限停留时间相比, 鸡胚外泌体低剂量组无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但高剂量组显著增加了 54.46% ( $P<0.05$ ); 鸡胚外泌体高剂

量组小鼠在原站台象限停留时间比低剂量组增加了 38.18%, 但无显著差异 ( $P>0.05$ )。综上, 在整个定位航行实验中, 随着训练天数的增加, 除模型组以外的其余各组逃避潜伏期大致呈下降趋势, 而模型组逃避潜伏期忽高忽低; 训练的最后 1 d, 模型组游泳轨迹最为复杂; 在空间探索实验中, 模型组小鼠在原站台停留时间占比与正常组相比显著减少。以上结果均说明, 模型组小鼠的空间学习及记忆能力受损。实验后, 与正常组相比, 鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠逃避潜伏期、在原站台停留时间占比均无显著差异, 特别是鸡胚外泌体高剂量组小鼠在原站台停留时间占比与模型组相比显著升高, 并且外泌体口服组小鼠游泳轨迹与模型组相比均得到明显改善, 鸡胚外泌体高剂量组小鼠在原站台象限停留时间比低剂量组明显增加。以上提示, 鸡胚外泌体在一定程度上能延缓 D-gal 致衰小鼠空间学习及记忆能力的受损, 对小鼠空间学习及记忆能力有保护作用, 且存在一定的量效关系, 通过分别增加、降低鸡胚外泌体高、低剂量组小鼠外泌体灌胃剂量, 此量效关系应该会更明显。

### 2.4.2 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠肌肉力量、抗疲劳能力的影响

衰老会引起动物肌肉力量变弱、抗疲劳能力降低, 且随着衰老程度加重, 这些功能损害也会加重<sup>[22,23]</sup>。如表 5 显示, 与正常组相比, D-gal 模型组小鼠四肢抓力显著降低了 13.04% ( $P<0.05$ ), 而鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 与模型组相比, 鸡胚外泌体低剂量组无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但鸡胚外泌体高剂量组小鼠四肢抓力显著升高了 21.21% ( $P<0.01$ ); 鸡胚外泌体高剂量组小鼠四肢抓力比低剂量组增加了 6.93%, 无显著差异 ( $P>0.05$ )。与正常组相比, D-gal 模型组小鼠掉落次数显著增加了 212.13% ( $P<0.05$ ), 而鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 与模型组相比, 鸡胚外泌体低剂量组无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 但鸡胚外泌体高剂量组小鼠掉落次数显著减少了 64.89% ( $P<0.05$ ); 鸡胚外泌体高剂量组小鼠掉落次数比低剂量组减少 56.92%, 无显著差异 ( $P>0.05$ )。以上结果提示, 鸡胚外泌体能一定程度增加 D-半乳糖致衰小鼠的肌肉力量和运动耐力, 且存在一定的量效关系。

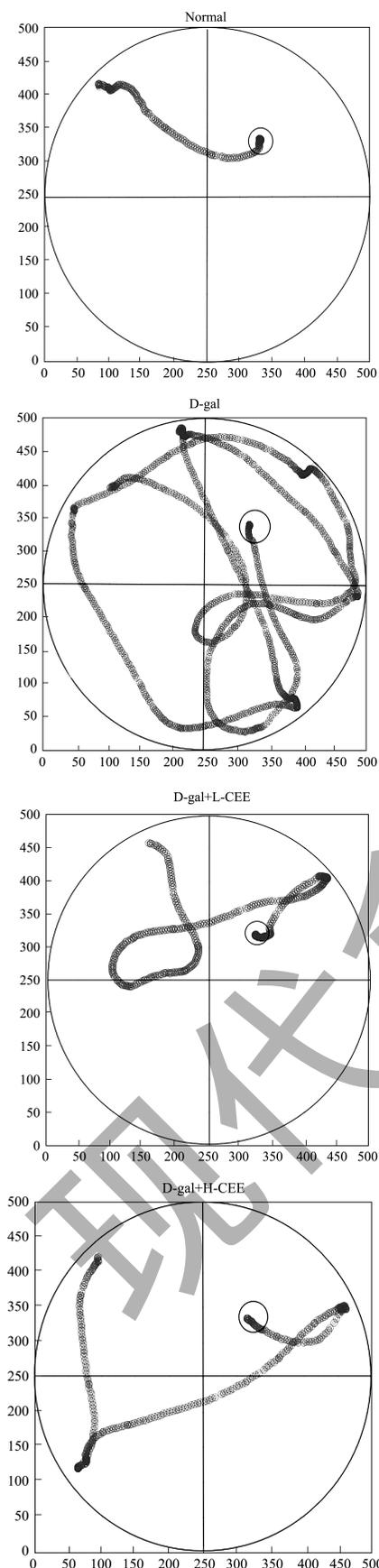


图5 定位航行实验中各组小鼠的游泳轨迹

Fig.5 Typical swimming trajectories of mice in each group during the positioning navigation experiment

表5 鸡胚外泌体对D-gal小鼠肌肉力量、抗疲劳能力的影响

Table 5 Effects of chick embryo exosomes on muscle strength and fatigue resistance of D-gal mice

组别	四肢抓力/g	掉落次数/次
Normal	328.11 ± 17.46	2.05 ± 0.95
D-gal	285.25 ± 26.11*	6.41 ± 1.92*
D-gal+L-CEE	323.38 ± 19.55	5.22 ± 4.28
D-gal+H-CEE	345.77 ± 36.36 <sup>##</sup>	2.25 ± 0.76 <sup>#</sup>

注: \* $P < 0.05$  vs. 正常组。# $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. 模型组。

### 2.5 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠肝脏、肾脏组织病理形态的影响

经研究 D-gal 致衰动物模型的肝、肾组织结构会发生一系列变化<sup>[24]</sup>。肝脏病理结果显示, 正常组小鼠肝小叶结构正常, 中央静脉形状规则, 肝索呈放射状排列, 肝窦结构规整, 肝细胞呈多边形, 细胞核大而圆(图6); 而模型组肝小叶结构明显改变, 表现为中央静脉严重变形, 肝细胞水肿且部分坏死, 胞浆疏松、空泡变性, 肝索萎缩变形; 经过口服鸡胚外泌体后, D-gal 致衰小鼠的肝小叶结构趋于清晰, 中央静脉形状重新变的规则, 以中央静脉为中心呈放射状排列的肝索结构重现, 肝窦结构也比模型组归整, 肝细胞水肿得到明显改善, 胞浆疏松、空泡变性明显减轻, 特别是高剂量组与正常组相比, 几乎无差异。以上提示, 鸡胚外泌体可以有效抑制 D-gal 致衰小鼠肝组织的损伤, 具有一定的延缓衰老对肝脏造成的损伤功能, 且存在量效关系。

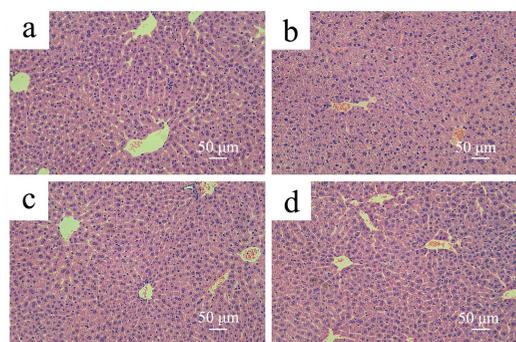


图6 鸡胚外泌体对衰老小鼠肝脏组织病理形态的影响

Fig.6 Effects of chicken embryo exosomes on liver histopathology of aging mice (200×)

肾脏病理结果显示: 正常组的肾小球数量丰富, 形态饱满, 肾小管结构清楚、正常, 肾小囊囊腔清晰且大小合适; D-gal 模型组肾小球萎缩, 肾小球内血管肿胀, 肾小囊囊腔变大, 肾小管上皮细胞肿胀、胞浆疏松、空泡变性; 经过口服鸡胚外泌体后, 肾小球形态重新变得饱满, 肾小囊囊腔缩小。低高剂

量组的肾小管上皮细胞肿胀、胞浆疏松、空泡变性情况均明显改善（图7）。这部分结果提示，鸡胚外泌体可以有效的抑制 D-gal 致衰小鼠肾组织的损伤，具有一定的延缓衰老对肾脏造成的损伤功能，且存在量效关系。

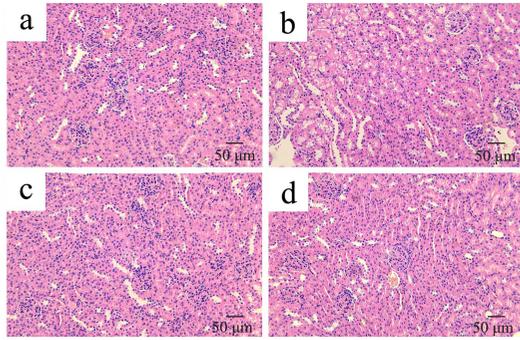


图7 鸡胚外泌体对衰老小鼠肾脏组织病理形态的影响

Fig.7 Effects of chicken embryo exosomes on the pathological morphology of kidney in aging mice (200×)

## 2.6 鸡胚外泌体对血清多项指标的影响

### 2.6.1 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠血清抗氧化功能的影响

大量研究显示<sup>[25-27]</sup>，氧化应激反应与机体衰老密切相关；高浓度的 D-gal 在体内导致氧化应激，产生对细胞有毒的自由基，破坏生物膜，生产有害的脂质过氧化物，损伤 DNA，引起蛋白质分子交联和酶类失活，细胞结构及功能出现异常，导致衰老；防御氧化应激，主要依靠机体的抗氧化体系。T-AOC 与 GSH 是抗氧化体系的代表，它们的高低是机体抗氧化和清除自由基能力强弱的体现<sup>[26]</sup>。由表 6 可知，与正常组相比，D-gal 模型组小鼠血清 T-AOC

含量极显著降低了 39.24% ( $P < 0.01$ )，而鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著差异 ( $P > 0.05$ )；与模型组相比，鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠血清 T-AOC 含量分别显著升高了 50.14% ( $P < 0.05$ )、60.41% ( $P < 0.01$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 T-AOC 含量比低剂量组升高 6.84%，但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。D-gal 模型组与正常组小鼠血清 GSH 含量无显著差异 ( $P > 0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 GSH 含量比正常组显著升高了 198.07% ( $P < 0.01$ )；鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠血清 GSH 含量比模型组分别显著升高了 208.36% ( $P < 0.05$ )、396.72% ( $P < 0.01$ )；高剂量组小鼠血清 GSH 含量比低剂量组升高 61.08%，但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。MDA 反映机体脂质过氧化速率、强度和组织过氧化损伤程度<sup>[26]</sup>。模型组、鸡胚外泌体低剂量组小鼠血清 MDA 含量比正常组分别显著升高了 11.70%、10.82% ( $P < 0.05$ )；而鸡胚外泌体高剂量组与正常组无显著差异 ( $P > 0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 MDA 含量比低剂量组降低 5.81%，但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。综上，鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠血清 T-AOC、GSH 含量比 D-gal 模型组显著升高，鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 MDA 含量基本维持在正常水平，没有出现像 D-gal 模型组显著升高的趋势，提示鸡胚外泌体通过提高血清 T-AOC 与 GSH 含量、降低血清 MDA 含量，来增强机体的抗氧化功能和减轻脂质过氧化对机体造成的损伤，起到延缓机体衰老的作用，且随着外泌体剂量的增加，出现抗氧化功能增强、过氧化损伤减少的趋势。

表 6 鸡胚外泌体对D-gal小鼠血清指标的影响

Table 6 Effects of chick embryo exosomes on serum indexes of D-gal induced aging mice

血清指标	组别			
	Normal	D-gal	D-gal+L-CEE	D-gal+H-CEE
T-AOC/(单位/mL)	12.18 ± 1.98	7.40 ± 2.34**	11.11 ± 1.94 <sup>#</sup>	11.87 ± 1.80 <sup>##</sup>
GSH/(mg/L)	2.23 ± 0.79	1.34 ± 0.57	4.13 ± 1.76 <sup>#</sup>	6.66 ± 2.07 <sup>**##</sup>
MDA/(nmol/μL)	0.83 ± 0.03	0.93 ± 0.08*	0.92 ± 0.04*	0.87 ± 0.05
ALT/(μmol/mL)	0.24 ± 0.07	0.34 ± 0.03**	0.25 ± 0.06 <sup>#</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>#</sup>
AST/(μg/mL)	0.23 ± 0.04	0.32 ± 0.05*	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.04
BUN/(μg/mL)	175.30 ± 43.86	164.11 ± 68.90	178.32 ± 28.29	132.03 ± 23.88
TNF-α/(pg/mL)	88.21 ± 12.51	112.96 ± 19.76*	102.52 ± 8.82	97.37 ± 6.73
IL-1β/(pg/mL)	117.68 ± 14.70	171.79 ± 22.18*	175.23 ± 48.31*	142.20 ± 20.31

注：\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$  vs. 正常组。<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. 模型组。

### 2.6.2 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠肝功、肾功的影响

ALT、AST 是反映肝损伤的特异性指标，BUN 是反映肾功能状况的指标之一，经研究 D-gal 致衰模型的肝、肾功能均会受到不同程度的损伤<sup>[19]</sup>。由表 6 可知，D-gal 模型组小鼠血清 ALT 含量比正常组显著升高了 43.04% ( $P<0.01$ )；与 D-gal 模型组相比，鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠血清 ALT 含量分别显著降低了 27.15%、27.88% ( $P<0.05$ )；鸡胚外泌体低、高剂量组无显著差异 ( $P>0.05$ )。与正常组相比，D-gal 模型组小鼠血清 AST 含量显著升高了 40.43% ( $P<0.05$ )，而鸡胚外泌体低、高剂量组均无显著差异 ( $P>0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 AST 含量低降低 9.49%，但无显著差异 ( $P>0.05$ )。各组小鼠血清 BUN 含量均无显著差异 ( $P>0.05$ )。综上，鸡胚外泌体能有效降低 D-gal 小鼠血清 ALT 与 AST 的水平，提示鸡胚外泌体能有效抑制 D-gal 引起的肝功能损伤，但未发现存在明显的量效关系，分析因为这两个指标可能对外泌体的敏感度不同，通过调整灌胃剂量即可出现明显的量效关系。

### 2.6.3 鸡胚外泌体对D-gal致衰小鼠炎症水平的影响

衰老伴随着炎症的发生，慢性炎症又会加剧机体的衰老，血清中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素  $1\beta$  (Interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ ) 水平可以准确判断炎症程度<sup>[28]</sup>。D-gal 致衰模型中炎症因子会明显升高<sup>[29]</sup>。由表 6 可知，D-gal 模型组小鼠血清比正常组显著升高了 28.10% ( $P<0.05$ )；而鸡胚外泌体低、高剂量组与正常组均无显著差异 ( $P>0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 TNF- $\alpha$  含量比低剂量组降低了 5.02%，无显著差异 ( $P>0.05$ )。D-gal 模型组、鸡胚外泌体低剂量组小鼠血清 IL- $1\beta$  含量比正常组分别显著升高了 45.96%、48.85% ( $P<0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组与正常组无显著差异 ( $P>0.05$ )；鸡胚外泌体高剂量组小鼠血清 IL- $1\beta$  含量比低剂量组降低了 18.84%，无显著差异 ( $P>0.05$ )。综上，鸡胚外泌体低、高剂量组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  含量基本维持在正常水平，没有出现像 D-gal 模型组显著升高的趋势，提示鸡胚外泌体能通过降低体内炎症因子水平，来延缓机体的衰老，且存在一定的量效关系。

## 3 结论

综上所述，细胞学实验证明鸡胚外泌体有明显的促进造血的作用。口服鸡胚外泌体后，衰老小鼠在脑功能、肌力、抗炎症/抗氧化和大脏器指标均表现出显著的改善。鸡胚外泌体是胚胎发育过程中各组织器官分泌的外泌体的混合物，外泌体是细胞间通讯的工具，在胚胎快速发育时期的外泌体包涵了丰富的细胞发育和分化相关指令分子，包括蛋白、小分子核酸和小分子代谢物。口服过程中，外泌体的双层膜结构既有助于保护这些小分子免于核酸酶、蛋白酶的破坏，又有利于口腔粘膜层、上消化道粘膜层及粘膜下丰富的血管系统对外泌体的快速吸收。我们推测部分外泌体无需到达胃部即可被口腔和上消化道吸收利用。这些富含发育信号的纳米囊泡进入体内循环系统后，在被肝和脾脏破坏清除之前，对血管内皮、神经系统、肌肉系统、肝、肾、骨髓等组织器官均有良好的营养、抗凋亡、修复和改善微循环的作用。具体表现为空间学习及记忆能力显著增强、四肢抓力显著增加、耐力增强、脏器组织形态改善、抗氧化和抗炎症能力提高，说明鸡胚外泌体对于延缓机体衰老具有积极的作用。考虑到鸡胚是我国传统食品，通过外泌体的提取做进一步精加工，有利于在避免血腥味等不利因素的同时，提高活性物质纯度、提高食疗效果并促进其商品化。

## 参考文献

- [1] 朱翠明.中国现代化进程中的人口老龄化问题与应对研究[D].长春:吉林大学,2021.
- [2] GUILLAUME F C, FRANÇOIS-XAVIER P, MIROSLAV R. Common cause and mechanism for all pathologies of aging [J]. Med Sci(Paris), 2020, 36(12): 1129-1134.
- [3] 张运龙.鸡胚外泌体分离及其功能分析[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [4] RAGHU K, VALERIE S L. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): 640.
- [5] SHAO H L, HYUNGSOON L, CESAR M C, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles [J]. Chem Rev, 2018, 118(4): 1917-1950.
- [6] BO L. Human milk microRNAs/exosomes: composition and biological effects [J]. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2019, 90: 83-92.

- [7] GU Y R, LI M Z, WANG T, et al. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes [J]. *Plos One*, 2012, 7(8): e43691.
- [8] 李莹,王艳,王劫,等.鸡胚外泌体miRNAs功能分析[J]. *畜牧兽医学报*,2020,51(6):1260-1270.
- [9] 张梦丹,王浪,李伟,等.骆驼奶中外泌体对 I 型糖尿病小鼠治疗的作用研究[J]. *食品研究与开发*,2020,41(24):8-11.
- [10] 吕行.麦胚球蛋白对D-半乳糖诱导衰老小鼠多重保护作用研究[D].郑州:河南工业大学,2020.
- [11] ZHONG J J, WANG Z F, XIE Q, et al. Shikonin ameliorates D-galactose-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice via the MAPK and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106491.
- [12] ZHENG S Y. Protective effect of polygonatum sibiricum polysaccharide on D-galactose-induced aging rats model [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2246.
- [13] YE C, LIN L Y, ZHANG P L, et al. The protective effect of PK11195 on D-galactose-induced amnesic mild cognitive impairment in rats [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(18): 1190.
- [14] 李莹,瞿浩,何静怡,等.鸡胚来源的外泌体不同提取方法比较[J]. *广东农业科学*,2020,47(5):93-101.
- [15] LI Z R, HE X C, LI L H. Hematopoietic stem cells: self-renewal and expansion [J]. *Curr Opin Hematol*, 2019, 26(4): 258-265.
- [16] KAMILA B, MAGDA K, JANINA R, et al. Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1201: 49-77.
- [17] MÉLANIE V, ANNE-LINE C, CARINE M, et al. Validation of a semi automatic device to standardize quantification of colony-forming unit (CFU) on hematopoietic stem cell products [J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(8): 820-823.
- [18] 欧阳兵.髓的中医文献研究[D].济南:山东中医药大学, 2013.
- [19] CHEN L L, ZHANG D R, LI J, et al. Albicanol alleviates D-galactose-induced aging and improves behavioral ability via by alleviating oxidative stress-induced damage [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(5): 1058-1067.
- [20] CLARK R A, JORDAN W, KRISTOFER J, et al. Accelerated failure time survival model to analyze morris water maze latency data [J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(4): 435-445.
- [21] MARIANA B N, DANIELLA B V, MARCIA J G, et al. Effects of fish oil supplementation on spatial memory in rats with pilocarpine-induced epilepsy assessed using the morris water maze test [J]. *Epileptic Disord*, 2021, 23(3): 476-484.
- [22] EMANUELE M. Musculoskeletal aging and sarcopenia in the elderly [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2808.
- [23] SOPHIA L, DAVIDE D, ERIC S, et al. Effect of urolithin a supplementation on muscle endurance and mitochondrial health in older adults: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(1): e2144279.
- [24] LI L, LI Y M, LUO J, et al. Resveratrol, a novel inhibitor of GLUT9, ameliorates liver and kidney injuries in a D-galactose-induced ageing mouse model via the regulation of uric acid metabolism [J]. *Food Funct*, 2021, 12(18): 8274-8287.
- [25] YANG X L, JIA J, DING L, et al. The role of Nrf2 in D-galactose-induced cardiac aging in mice: involvement of oxidative stress [J]. *Gerontology*, 2021, 67(1): 91-100.
- [26] CARLO C, PAUL L W, ARIANNA R, et al. Oxidative challenge in Alzheimer's disease: state of knowledge and future needs [J]. *J Investig Med*, 2016, 64(1): 21-32.
- [27] GU Y P, HAN J X, JIANG C P, et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 59: 101036.
- [28] LEENA P B, MADHUR A, GRACE M, et al. Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 44-55.
- [29] PAVLOS B, VERONICA B, EIRINI T. Inflammation, aging and hematopoiesis: a complex relationship [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1386.