

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003185

电针对衰老模型大鼠睾丸 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路的影响

姚太万¹, 陈艳华², 卜凡², 邓紫婷², 李怡³, 何昕璐³, 李学智³

(1. 重庆市人民医院中医科, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学附属康复医院中医康复科, 重庆 400050;

3. 重庆医科大学中医药学院中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨电针对衰老模型大鼠睾丸腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、沉默信息调节因子 1(silent information regulator of transcription 1, SIRT1)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 蛋白表达的影响及其延缓生殖衰老的作用机制。**方法:**将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组($n=10$)和造模组($n=30$), 造模组经腹腔注射 D-半乳糖复制衰老模型大鼠, 从造模成功的大鼠中随机筛选 24 只平均分为 3 组: 模型组、药物组和电针组, 每组 8 只。电针组取“肾俞”“关元”予电针治疗, 每日治疗 1 次, 每次 15 min, 治疗 5 d 休息 2 d, 连续治疗 8 周。药物组予腹部皮下注射丙酸睾酮注射液(7 mg/kg, 每 3 日 1 次), 连续 8 周。对照组和模型组给予腹部皮下注射 0.9% 氯化钠溶液, 注射剂量及疗程同药物组。治疗前后检测大鼠血清总睾酮(total testosterone, TT)和游离睾酮(free testosterone, FT)水平, 免疫组化法、Western blot 检测大鼠睾丸 AMPK、p-AMPK、SIRT1、NF- κ B p65 蛋白表达。**结果:**治疗前, 与对照组比较, 模型组、药物组及电针组血清 TT、FT 水平降低($P=0.000$, $P=0.001$; $P=0.000$, $P=0.001$; $P=0.000$, $P=0.000$); 治疗后, 与对照组比较, 模型组、药物组及电针组血清 TT、FT 水平降低($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.009$, $P=0.025$; $P=0.006$, $P=0.022$), 与模型组比较, 药物组及电针组血清 TT、FT 明显升高($P=0.001$, $P=0.004$; $P=0.001$, $P=0.004$)。与对照组比较, 模型组、药物组及电针组 p-AMPK、SIRT1 蛋白表达均明显降低($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$), NF- κ B p65 蛋白表达明显升高($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.005$)。与模型组及药物组比较, 电针组 p-AMPK、SIRT1 蛋白表达明显升高($P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.023$, $P=0.002$), NF- κ B p65 蛋白表达明显降低($P=0.000$, $P=0.000$)。**结论:**电针可能通过激活睾丸间质细胞(Leydig 细胞)AMPK/SIRT1/NF- κ B 通路, 抑制 Leydig 细胞炎性反应, 从而改善血清 TT、FT 水平, 这可能是电针延缓生殖衰老的作用机制之一。

【关键词】电针; 生殖衰老; 腺苷酸活化蛋白激酶; 沉默信息调节因子-1; 核因子- κ B**【中图分类号】**R245.9⁺7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-03-11

Effect of electroacupuncture on the AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway in testis of aging model rats

Yao Taiwan¹, Chen Yanhua², Bu Fan², Deng Ziting², Li Yi³, He Xinlu³, Li Xuezhi³

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Chongqing General Hospital; 2. Department of Traditional Chinese

Medicine Rehabilitation, The Affiliated Rehabilitation Hospital of Chongqing Medical University;

3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Cure of Metabolic Diseases,

College of Traditional Chinese Medicine of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) on the protein expression of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), silent information regulator of transcription 1 (SIRT1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in testis of aging model rats and its mechanism of delaying reproductive aging.

作者介绍:姚太万, Email: 406373895@qq.com,
研究方向: 针灸延缓衰老的机制研究。

通信作者:陈艳华, Email: 900003@cqmu.edu.cn。

基金项目:重庆市教育委员会科学技术研究资助项目(编号: KJQN201900447)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230302.0956.002.html>
(2023-03-03)

Methods: Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control group ($n=10$) and the model group ($n=30$). The aging model rats were replicated by intraperitoneal injection of D-galactose in the model group. Twenty-four rats were randomly selected from the successful model rats and divided into three groups:

the model group, the drug group and the EA group, with 8 rats in each group. In the EA group, “Shen yu” and “Guan yuan” were used for EA treatment, once a day, 15 minutes each time, 5 days of treatment and 2 days of rest, continuous treatment for 8 weeks. The drug group received abdominal subcutaneous injection of testosterone propionate (7 mg/kg once, once every 3 days) for continuous 8 weeks. The control group and model group were given abdominal subcutaneous injection of 0.9% sodium chloride solution. The injection dose and course of treatment were the same as those in the drug group. The levels of serum total testosterone (TT) and free testosterone (FT) were detected before and after treatment. The protein expression of AMPK, p-AMPK, SIRT1 and NF- κ B p65 in rat testis were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Before treatment, compared with the control group, the levels of serum TT and FT in the model group, drug group and EA group were decreased ($P=0.000, P=0.001; P=0.000, P=0.001; P=0.000, P=0.000$). After treatment, compared with the control group, the levels of serum TT and FT in the model group, drug group and EA group were decreased ($P=0.000, P=0.000; P=0.009, P=0.025; P=0.006, P=0.022$). Compared with the model group, the levels of serum TT and FT in the drug group and EA group were significantly increased ($P=0.001, P=0.004; P=0.001, P=0.004$). Compared with the control group, the protein expression of p-AMPK and SIRT1 in the model group, drug group and EA group was significantly decreased ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$), and the expression of NF- κ B p65 was significantly increased ($P=0.000, P=0.000, P=0.005$). Compared with the model group and drug group, the protein expression of p-AMPK and SIRT1 in the EA group were significantly increased ($P=0.000, P=0.000; P=0.023, P=0.002$), and the protein expression of NF- κ B p65 was significantly decreased ($P=0.000, P=0.000$). **Conclusion:** EA may inhibit the inflammatory response of Leydig cells by activating the AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway of Leydig cells, thereby improving the levels of serum TT and FT, which may be one of the mechanisms of EA in delaying reproductive aging. **[Key words]** electroacupuncture; reproductive aging; adenosine monophosphate activated protein kinase; silent information regulator of transcription 1; nuclear factor- κ B

睾丸间质细胞(Leydig细胞)合成分泌睾酮。随机体衰老, Leydig细胞睾酮的合成逐渐减少, 导致骨密度降低、性欲下降、代谢综合征和肥胖等^[1-2]。研究证实睾酮补充疗法(testosterone supplementation therapy, TST)是改善睾酮缺乏的最佳治疗, 但长期的外源性睾酮补充可导致睾丸内睾酮减少和精子受损等^[3]。前期研究表明, 电针可明显提高自然生殖衰老大鼠血清总睾酮(total testosterone, TT)和游离睾酮(free testosterone, FT)水平, 降低Leydig细胞炎性反应及氧化应激损伤, 改善睾酮合成的微环境, 促进睾酮合成, 疗效与TST相当^[4-5]。研究发现腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)在衰老过程的调节中起重要作用^[6], AMPK可诱导沉默信息调节因子1(silent information regulator of transcription 1, SIRT1)激活^[7], 在糖尿病和心血管疾病^[8-11]等老年病中均发现AMPK/SIRT1/NF- κ B发挥重要作用。本研究通过观察电针对衰老模型大鼠血清TT、FT水平及Leydig细胞AMPK/SIRT1/NF- κ B信号通路的影响, 探讨电针延缓生殖衰老的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2月龄同批次SPF级SD雄性大鼠40只, 体质量(200 \pm 20)g; 由重庆医科大学实验动物中心提供, 动物使用许可证: SYXK(渝)2018-0003。随机分为对照组10只和造模组30只。实验过程均遵循2006年中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂及仪器

大鼠TT、FT试剂盒(上海沪尚生物科技有限公司); p-AMPK、AMPK、SIRT1、NF- κ B p65一抗(美国Affinity公司); 免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); Western blot相关试剂(上海碧云天生物有限公司); D-半乳糖(北京索莱宝生物科技有限公司); 丙酸睾酮注射液(25 mg/支, 批号H12020531, 天津金耀药业股份有限公司); HANS-100型韩氏电针治疗仪(南京济生医疗科技公司); 华佗牌一次性针灸针(0.28 mm \times 25 mm, 苏州医疗用品厂有限公司); 奥林巴斯光学显微镜(CX-31, 日本), 石蜡切片机(Leica SM 200R, 德国); 化学发光仪(Li Cor, 基因公司); Image-Pro Plus分析软件(Media Cybernetics, 美国); 电泳、电转仪、电子天平、酶标仪、低温离心机等由重庆医科大学中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室提供。

1.3 造模方法及实验分组

参考文献^[12-15]方法,造模组大鼠经腹腔注射 D-半乳糖 (300 mg/kg, 每日 1 次), 连续 30 d, 复制衰老模型大鼠。造模后大鼠出现毛色发黄、光泽度明显降低, 运动迟缓, 饮食减少等衰老体征^[12]。造模后检测对照组大鼠 TT、FT, 并计算其 95% 置信区间, 检测造模组大鼠 FT、TT, 同时低于该数字即造模成功, 纳入实验。将纳入的造模组大鼠按体质量随机分为模型组 8 只, 药物组 8 只, 电针组 8 只。

1.4 治疗方法

电针组: 根据中国针灸学会制定的《动物穴位图谱》, 选取“关元”和辅助针刺点(“关元”所属经络上近心端 2 mm 处, 因关元为任脉上的独穴, 故配以辅助针刺点形成局部电流回路, 加强治疗效果^[16])直刺 3 mm 及双侧“肾俞”直刺 6 mm, 分别连接电针仪, 留针 15 min, 疏密波, 频率 2 Hz/100 Hz, 电流强度为 1 mA, 每日 1 次, 每 5 d 间隔 2 d, 连续治疗 8 周。药物组: 大鼠腹部皮下注射丙酸睾酮注射液, 7 mg/kg, 每日 3 次, 注射部位左右交替。对照组: 与药物组同期腹部皮下注射 0.9% 氯化钠溶液, 用量标准同药物组。模型组: 与药物组同期腹部皮下注射 0.9% 氯化钠溶液, 用量标准同药物组。

1.5 观察指标及检测方法

血清 TT、FT 含量检测: 各组大鼠于治疗前后采用目内眦取血 1 mL, 血液采集后于 4℃ 离心 (3 000 r/min, 15 min), 分离上清液, 试管分装, -20℃ 保存。严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠治疗前后血清 TT、FT 水平。

免疫组化检测右侧睾丸 SIRT1 表达: 取血后迅速打开阴囊, 分离睾丸, 将右侧睾丸置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 左侧睾丸置于液氮中保存备用。右侧睾丸常规脱水、透明、石蜡包埋、连续冠状面切片, 切片厚度 4 μm, 常规脱蜡至水, EDTA 抗原修复, 3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 10 min, 滴加山羊血清室温封闭 20 min, 滴加一抗 SIRT1 (稀释浓度 1:200), 4℃ 过夜。逐一滴加试剂 1、试剂 2, DAB 显色后复染、脱水、透明、封片。显微镜下观察, SIRT1 染色阳性的细胞质呈棕褐色。每张切片观察 5 个高倍视野 (400×), Image-Pro Plus 6.0 软件分析平均吸光度值。

Western blot 检测左侧睾丸组织 p-AMPK、AMPK 和 SIRT1

和 NF-κB p65 蛋白表达: 取液氮保存的睾丸约 100 mg, 加入 RIPA 裂解液及 PMSF, 冰上裂解 20 min, 4℃ 离心机下离心 (12 000 r/min, 15 min), 提取上清以备检测, 采用 BCA 蛋白定量法测蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样品上样, 进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转膜 2 h 至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加一抗 β-actin (稀释浓度 1:5 000)、p-AMPK (稀释浓度 1:500)、AMPK (稀释浓度 1:500)、SIRT1 (稀释浓度 1:1 000)、NF-κB p65 (稀释浓度 1:1 000)。4℃ 摇床孵育过夜, TBST 漂洗后加二抗 (抗兔, 稀释浓度 1:5 000) 室温摇床孵育 2 h。以 β-actin 为内参, ECL 化学发光显影, Image Studio 5.0 进行结果分析, 以目的蛋白/内参蛋白比值为该蛋白相对表达量。

1.6 统计学处理

实验数据采用 Graph-Pad Prism 5 软件进行分析。各组数据均符合正态分布, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间差异的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗前后 TT、FT 的比较

ELISA 法检测各组大鼠治疗前后血清 TT、FT 水平, 单因素方差分析 4 组大鼠治疗前血清 TT、FT 水平, 差异有统计学意义 ($P=0.000, P=0.001$)。两两比较结果显示, 与对照组相比, 模型组、药物组及电针组血清 TT、FT 均明显降低 ($P<0.01$), 而模型组、药物组及电针组 TT、FT 两两比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

单因素方差分析 4 组大鼠治疗后血清 TT、FT 水平, 差异有统计学意义 ($P=0.000, P=0.000$)。两两比较结果显示, 与对照组相比, 模型组、药物组及电针组血清 TT、FT 均明显降低 ($P<0.05$), 但药物组及电针组血清 TT、FT 均明显高于模型组 ($P=0.001, P=0.004$), 药物组与电针组血清 TT、FT 无明显性差异 ($P=0.868, P=0.959$), 提示电针干预后可改善衰老模型大鼠血清 TT、FT 水平, 疗效与药物组相当。见表 1。

表 1 各组大鼠治疗前后 TT、FT 变化 ($n=8; \bar{x} \pm s; \text{pg/mL}$)

组别	TT		FT	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	239.046 ± 29.219	237.775 ± 27.195	80.324 ± 10.528	80.601 ± 6.647
模型组	149.466 ± 24.814 ^a	146.376 ± 30.780 ^a	63.680 ± 7.861 ^a	58.306 ± 10.048 ^a
药物组	146.895 ± 16.625 ^a	198.718 ± 31.368 ^{ab}	63.280 ± 7.725 ^a	71.024 ± 8.703 ^{ab}
电针组	147.376 ± 24.673 ^a	196.390 ± 19.901 ^{ab}	61.078 ± 10.452 ^a	70.815 ± 6.264 ^{ab}
F 值	28.234	14.640	7.145	10.280
P 值	0.000	0.000	0.001	0.000

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$; b, 与模型组比较, $P<0.05$

2.2 SIRT1 在睾丸组织的表达

免疫组化检测各组大鼠睾丸组织 SIRT1 的表达,对照组大鼠睾丸组织 SIRT1 表达量较多,可见棕褐色颗粒主要分布在睾丸组织各细胞胞质中,模型组和药物组仅有少量表达(图 1)。单因素方差分析各组大鼠睾丸组织 SIRT1 表达水平,差异有统计学意义($P=0.000$)。两两比较结果显示,与对照组比较,模型组 SIRT1 表达水平明显降低($P=0.000$);与模型组比较,电针组 SIRT1 表达水平明显升高($P=0.000$),药物组与模型组比较差异无统计学意义($P=0.485$);与药物组比较,电针组 SIRT1 表达水平明显升高($P=0.000$);见表 2。

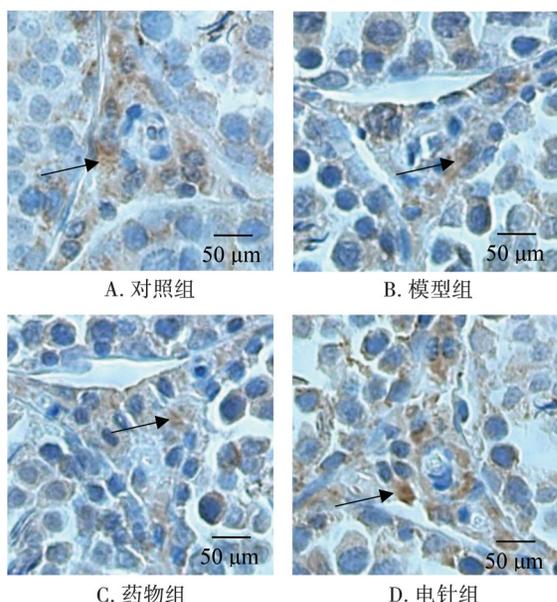


图 1 各组大鼠睾丸组织 SIRT1 免疫组化染色结果(黑色箭头所指)

表 2 各组大鼠睾丸 SIRT1 平均吸光度值($n=8; \bar{x} \pm s$)

组别	免疫组化法 SIRT1 表达
对照组	25.118 ± 3.218
模型组	12.788 ± 1.694 ^a
药物组	12.021 ± 1.505 ^a
电针组	17.490 ± 1.812 ^{ab}
<i>F</i> 值	61.700
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组及药物组比较, $P < 0.05$

2.3 各组大鼠睾丸组织 p-AMPK、AMPK、SIRT1、NF-κB p65 蛋白表达的比较

单因素方差分析 4 组 p-AMPK、SIRT1、NF-κB p65 差异均有统计学意义($P=0.000, P=0.000, P=0.000$),而 AMPK 差异无统计学意义($P=0.870$)。两两比较结果显示,与对照组比较,模型组、药物组、电针组 p-AMPK 蛋白表达明显降低($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);与模型组及药物组比较,电针组 p-AMPK 蛋白表达明显升高($P=0.000, P=0.000$)。与对照组比较,模型组、药物组、电针组 SIRT1 蛋白表达明显降低($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);与模型组及药物组比较,电针组 SIRT1 ($P=0.023, P=0.002$)蛋白表达明显升高,模型组与药物组比较无统计学意义($P=0.157$)。与对照组比较,模型组、药物组、电针组 NF-κB p65 蛋白表达明显升高($P=0.000, P=0.005$);与模型组及药物组比较,电针组 NF-κB p65 蛋白表达明显降低($P=0.000, P=0.000$),模型组与药物组比较无统计学意义($P=0.679$),见图 2、表 3。

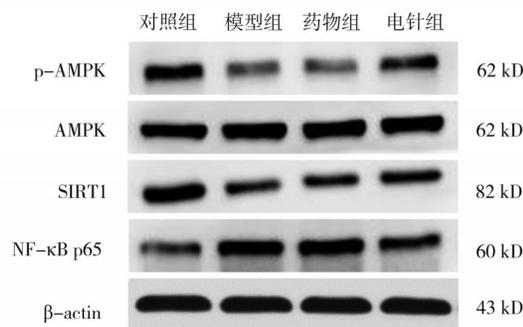


图 2 各组大鼠睾丸 p-AMPK、AMPK、SIRT1、NF-κB p65 蛋白表达情况

表 3 各组大鼠睾丸 p-AMPK、AMPK、SIRT1、NF-κB p65 相对表达量($n=8; \bar{x} \pm s$)

组别	p-AMPK	AMPK	SIRT1	NF-κB p65
对照组	1.052 ± 0.018	1.036 ± 0.094	1.100 ± 0.059	0.629 ± 0.028
模型组	0.487 ± 0.012 ^a	1.062 ± 0.066	0.684 ± 0.050 ^a	1.126 ± 0.065 ^a
药物组	0.417 ± 0.010 ^a	1.080 ± 0.122	0.625 ± 0.037 ^a	1.107 ± 0.072 ^a
电针组	0.841 ± 0.011 ^{ab}	1.022 ± 0.085	0.790 ± 0.035 ^{ab}	0.802 ± 0.044 ^{ab}
<i>F</i> 值	1 614.762	0.234	62.684	57.952
<i>P</i> 值	0.000	0.870	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组及药物组比较, $P < 0.05$

3 讨论

衰老在《素问·上古天真论》中认为与“肾”和“命门”关系密切,其主要表现为面色和毛发的改变、生活能力下降以及精气减少,强调养生的关键在于“收摄精气,不使外鹜”^[17]。古代文献对针灸延

缓衰老的记载不胜枚举。现代研究表明,电针双侧“肾俞”可降低力竭游泳大鼠肾脏 MDA 水平,提高线粒体氧化代谢能力,对延缓衰老具有重要作用^[18];电针涌泉穴可下调 D-半乳糖致衰老模型大鼠 p53 基因表达,并改善大鼠怕冷及行动迟缓等症状,起到延缓衰老的作用^[19];艾灸可通过调节衰老模型大鼠线粒体 DNA、血清白细胞介素(interleukin, IL)-2 和 IL-6 含量,发挥抗氧化、调节免疫的功能^[20];同时灸法还能作用于细胞周期相关通路,延缓细胞衰老^[21]。“关元”穴为人体阴阳元气交会之处,其所治病症多为虚证,如遗精、阳痿、尿频等,针灸“关元”穴具有固本培元之功。“肾俞”穴为藏精之关,其所治病症多因肾虚导致,如腰痛、虚劳、耳聋等,针灸“肾俞”穴具有补肾益精的效果。故两穴配合电针可共奏补肾培元的功效。因此,本实验采用 D-半乳糖诱导衰老模型大鼠后,大鼠体内 TT、FT 水平明显降低,电针干预“肾俞”“关元”可提高血清 TT、FT 水平,提示电针可有效改善衰老模型大鼠生殖功能。

AMPK 作为体内重要的能量代谢受体,在机体的能量代谢中起重要作用。研究发现,在机体衰老过程中 AMPK 可通过调控能量代谢、细胞自噬及氧化应激反应等途径,与众多老年病关系密切^[22-23]。AMPK 能在转录水平激活烟酰胺磷酸核糖基转移酶,上调 NAD⁺/NADH,然后诱导 SIRT1 的激活,产生抗炎作用和抑制氧化应激^[24]。SIRT1 作为沉默信息调节因子 2(silent information regulator 2, Sir2)家族的重要成员,与机体的炎症反应、氧化应激和衰老关系密切^[25-26]。Xu GQ 等^[27]研究发现,褪黑素可通过激活 SIRT1 抑制小鼠 Leydig 细胞凋亡和氧化应激。而 SIRT1 可将 NF- κ B p65 去乙酰化阻止 NF- κ B p65 信号通路活化,降低多种促炎细胞因子表达,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 或 IL-1 β ,并和 SF-1 共激活起保护作用,促进 Leydig 细胞中的类固醇生成^[28-30]。前期研究表明,电针可通过调控 NF- κ B 慢性炎症通路及抗氧化应激通路 ERK/Nrf2,降低老年大鼠睾丸组织炎症反应及氧化应激损伤,从而促进睾酮的合成^[4-5]。本实验显示模型组大鼠血清 TT、FT 水平及睾丸 p-AMPK、SIRT1 表达明显低于对照组,说明 AMPK、SIRT1 参与衰老模型大鼠 Leydig 细胞睾酮合成过程的调节,

电针干预后可通过提高模型组大鼠睾丸 p-AMPK、SIRT1 蛋白表达水平,降低 NF- κ B 蛋白表达,改善衰老模型大鼠血清 TT、FT 水平。

综上所述,电针可能通过上调衰老模型大鼠睾丸 Leydig 细胞 AMPK 和 SIRT1 的表达,进而减少 Leydig 细胞炎症反应,改善血清 TT、FT 水平,起到延缓生殖衰老的作用,为针灸延缓衰老提供更多的临床前研究证据。

参 考 文 献

- [1] Pechersky A. Features of diagnostics and treatment of partial androgen deficiency of aging men[J]. *Central Eur J Urol*, 2014, 67(4): 397-404.
- [2] Traish AM. Negative impact of testosterone deficiency and 5 α -reductase inhibitors therapy on metabolic and sexual function in men[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1043:473-526.
- [3] Coward R, McBride J. Recovery of spermatogenesis following testosterone replacement therapy or anabolic-androgenic steroid use[J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(3):373.
- [4] 姚太万,刘嘉,李学智,等.电针对睾酮低下老年大鼠睾丸间质细胞慢性炎症反应的影响[J]. *针刺研究*, 2018, 43(3):163-168. Yao TW, Liu J, Li XZ, et al. Electroacupuncture intervention improves physical power of aged rats with low testosterone by reducing chronic inflammatory response of Leydig cells[J]. *Acupunct Res*, 2018, 43(3): 163-168.
- [5] 曾婷婷,姚太万,李学智,等.电针对睾酮低下老年大鼠睾丸间质细胞抗氧化功能的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(8):566-570,582. Zeng TT, Yao TW, Li XZ, et al. Electroacupuncture intervention increases testosterone level of aged rats by activating ERK/Nrf2/HO-1 signaling of Leydig cells[J]. *Acupunct Res*, 2019, 44(8):566-570,582.
- [6] Michalik A, Jarzyna R. The key role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in aging process[J]. *Postepy Biochem*, 2016, 62(4): 459-471.
- [7] Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(3):213-219.
- [8] Kume S, Koya D. Autophagy: a novel therapeutic target for diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Metab J*, 2015, 39(6):451-460.
- [9] Sciarretta S, Hariharan N, Monden Y, et al. Is autophagy in response to ischemia and reperfusion protective or detrimental for the heart?[J]. *Pediatr Cardiol*, 2011, 32(3):275-281.
- [10] Li FT, Chen Y, Li YJ, et al. Geniposide alleviates diabetic nephropathy of mice through AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 886:173449.
- [11] 宋亚男,袁丁,张长城,等.竹节参总皂苷通过调节 AMPK/

- Sirt1/NF- κ B 通路抑制衰老大鼠心肌细胞凋亡的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4656-4660.
- Song YN, Yuan D, Zhang CC, et al. Effect of saponins extracted from *Panax japonicus* on inhibiting cardiomyocyte apoptosis by AMPK/Sirt1/NF- κ B signaling pathway in aging rats[J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(23): 4656-4660.
- [12] 赵凡凡, 周玉枝, 高 丽, 等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展[J]. 药学报, 2017, 52(3): 347-354.
- Zhao FF, Zhou YZ, Gao L, et al. Advances in the study of the rat model of aging induced by D-galactose[J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(3): 347-354.
- [13] Haider S, Liaquat L, Shahzad S, et al. A high dose of short term exogenous D-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process[J]. Life Sci, 2015, 124: 110-119.
- [14] Samad N, Imran I, Zulfiqar I, et al. Ameliorative effect of lithium chloride against d-galactose induced behavioral and memory impairment, oxidative stress and alteration in serotonin function in rats[J]. Pharmacol Rep, 2019, 71(5): 909-916.
- [15] Saleh DO, Mansour DF, Hashad IM, et al. Effects of sulforaphane on D-galactose-induced liver aging in rats: role of Keap-1/Nrf-2 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 855: 40-49.
- [16] 王德军, 常小荣, 严 洁, 等. 针刺足阳明胃经特定穴与非特定穴治疗功能性消化不良疗效比较[J]. 中国针灸, 2012, 32(8): 703-708.
- Wang DJ, Chang XR, Yan J, et al. Comparative study on therapeutic effect between acupuncture at special acupoints and non-specific acupoints in Foot Yangming Meridian for functional dyspepsia[J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2012, 32(8): 703-708.
- [17] 何 任. 养生与长寿[J]. 安徽中医学院学报, 1982, 1(3): 43-44.
- He R. Health preservation and longevity[J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll, 1982, 1(3): 43-44.
- [18] 罗 磊, 许晓瑾. 电针对力竭游泳大鼠肾脏线粒体自由基代谢和线粒体功能的影响[J]. 中国针灸, 2001, 21(6): 366-368.
- Luo L, Xu XJ. Effect of electroacupuncture on M etabolism of mitochondrial free radicals and mitochondrial function in kidney in rats of full swimming[J]. Chin Acupuncture & Moxibustion, 2001, 21(6): 366-368.
- [19] 李 珉, 张 卫, 王 刚, 等. 电针涌泉穴对 D-半乳糖致衰老模型大鼠的 p53 和 bcl-2 基因表达的影响[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(4): 589-591.
- Li M, Zhang W, Wang G, et al. Influence of electro-acupuncture of YONGQUAN-POINT on the expression of p53 and bcl-2 in the aging model rat induced by D-dalactose[J]. J West China Univ Med Sci, 2002, 33(4): 589-591.
- [20] 李丽红, 李 丽, 赵志恩, 等. 艾灸、中药对衰老模型大鼠线粒体 DNA、血清 IL-2、IL-6 含量的影响[J]. 中国针灸, 2008, 28(9): 681-684.
- Li LH, Li L, Zhao ZE, et al. Effects of moxibustion and Chinese herbs on contents of mitochondrial DNA, serum IL-2 and IL-6 in the aging model rat[J]. Chin Acupunct & Moxibustion, 2008, 28(9): 681-684.
- [21] 杜 艳, 赵利华, 吴海标, 等. 艾炷灸对 D-半乳糖衰老小鼠大脑皮层细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子、视网膜母细胞瘤抑制蛋白及 c-fos 的影响[J]. 针刺研究, 2010, 35(4): 250-254, 276.
- Du Y, Zhao LH, Wu HB, et al. Effects of moxibustion on the expression of cell cycle protein and retinoblastoma and c-fos in the cerebral cortex of senile mice[J]. Acupunct Res, 2010, 35(4): 250-254, 276.
- [22] Burkewitz K, Weir HJM, Mair WB. AMPK as a pro-longevity target[J]. Exp Suppl, 2016, 107: 227-256.
- [23] Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network[J]. Ageing Res Rev, 2012, 11(2): 230-241.
- [24] Han XJ, Tai HR, Wang XB, et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD⁺ elevation[J]. Aging Cell, 2016, 15(3): 416-427.
- [25] Xie J, Zhang XM, Zhang L. Negative regulation of inflammation by SIRT1[J]. Pharmacol Res, 2013, 67(1): 60-67.
- [26] Hubbard BP, Sinclair DA. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35(3): 146-154.
- [27] Xu GQ, Zhao J, Liu HY, et al. Melatonin inhibits apoptosis and oxidative stress of mouse leydig cells via a SIRT1-dependent mechanism[J]. Molecules, 2019, 24(17): 3084.
- [28] El Assar M, Angulo J, Rodríguez-Mañás L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65: 380-401.
- [29] Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis[J]. Cell Cycle, 2011, 10(4): 640-647.
- [30] Wu L, Zhang AJ, Sun YJ, et al. Sirt1 exerts anti-inflammatory effects and promotes steroidogenesis in Leydig cells[J]. Fertil Steril, 2012, 98(1): 194-199.

(责任编辑: 冉明会)