

[药 理]

桂附地黄丸对衰老大鼠回肠干细胞增殖分化稳态的调节作用

李玉婷¹, 郭煜晖¹, 程志豪¹, 刘 洁¹, 何毓敏¹, 袁 丁², 张长城¹, 顿耀艳^{1*}

(1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学附属仁和医院, 湖北 宜昌 443002)

摘要: **目的** 探讨桂附地黄丸对衰老大鼠回肠干细胞增殖分化稳态的调节作用。**方法** 40 只大鼠中 10 只 2 月龄的分为青年组、其余 30 只 18 个月龄的随机分为衰老组及桂附地黄丸低、高剂量组 (0.4、1.6 g/kg), 每组 10 只, 给予生理盐水或桂附地黄丸药液灌胃 4 个月后, 处死大鼠。HE 染色、阿利新蓝染色、免疫组织化学染色、RT-PCR 考察回肠组织形态学、干细胞增殖分化稳态及 Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与衰老组比较, 桂附地黄丸组回肠绒毛缩短, 隐窝变浅, 绒毛长度与隐窝深度比值 (V/C) 增大, 杯状细胞数量、细胞核增殖抗原 (PCNA) 表达、干细胞标记物 mRNA 表达下降, Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达下调, 但 Notch 信号通路相关蛋白表达无明显变化。**结论** 桂附地黄丸可改善衰老大鼠回肠干细胞增殖分化稳态, 其机制可能与下调 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词: 桂附地黄丸; 回肠干细胞; 增殖; 分化稳态; 衰老

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)11-2361-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.001

Regulatory effects of Guifu Dihuang Pills on the proliferation and differentiation homeostasis of ileal stem cells in aging rats

LI Yu-ting¹, GUO Yu-hui¹, CHENG Zhi-hao¹, LIU Jie¹, HE Yu-min¹, YUAN Ding², ZHANG Chang-cheng¹, DUN Yao-yan^{1*}

(1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Renhe Hospital Affiliated to China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the regulatory effects of Guifu Dihuang Pills on the proliferation and differentiation homeostasis of ileal stem cells in aging rats. **METHODS** Among the forty rats, 10 two-month old ones were assigned into the young group, the other 30 18-month old ones were assigned into the aging group and low-dose, high-dose Guifu Dihuang Pills groups (0.4, 1.6 g/kg), 10 rats in each group. HE staining, Alcian blue staining, immunohistochemical staining, RT-PCR were applied to investigating ileal histomorphology, stem cell proliferation and differentiation homeostasis, Wnt/ β -catenin and Notch signaling pathways-related protein expressions. **RESULTS** Compared with the aging group, Guifu Dihuang Pills groups demonstrated shortened ileal villus, shallowed crypt, increased villus length-crypt depth ratio (V/C), decreased goblet cell number, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and stem cell marker mRNA expressions, down-regulated Wnt/ β -catenin signaling pathway-related protein expressions, but without obvious changes in Notch signaling pathway-related protein expressions. **CONCLUSION** Guifu Dihuang Pills show their effect in the down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway and therefore in the improvement of the proliferation and differentiation homeostasis of ileal stem cells in aging rats.

KEY WORDS: Guifu Dihuang Pills; ileal stem cells; proliferation; differentiation homeostasis; aging

收稿日期: 2018-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81503423, 81403307)

作者简介: 李玉婷 (1994—), 女, 硕士生, 从事中药药理研究。Tel: 17362310547, E-mail: 1010621597@qq.com

* 通信作者: 顿耀艳 (1980—), 女, 博士, 硕士生导师, 从事中药药理研究。Tel: (0717) 6397198, E-mail: dydxy2004@163.com

在自然衰老机体中，各器官会发生不同程度老化，研究显示，机体衰老始于肠道衰老，故维持健康的肠道内稳态对于延缓衰老至关重要^[1]。回肠位于小肠末端，下续大肠，对营养物质的消化吸收不如十二指肠和空肠，同时它靠近大肠而兼具小肠、大肠的功能特点，故探究衰老肠道变化情况时选择其作为研究对象。肠道为干细胞驱动组织，其稳定的结构与功能由位于肠道隐窝基底部的肠道干细胞来维持^[2]，在衰老机体内其功能减退，增殖分化能力异常^[3]，Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路是肠道干细胞微环境的重要组成部分，也是其关键调节因子，其中前者参与调节其增殖，后者主要调节其向吸收型上皮细胞分化^[4]。

桂附地黄丸源自《金匱要略》肾气丸，由肉桂、附子（制）、熟地黄、山茱萸（制）、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻 8 味中药组成，在肾气丸的基础上将干地黄、桂枝分别改为熟地黄、肉桂，其功效与原方有诸多相似之处，但更具温补之性。现代研究表明，肾气丸能通过提高大鼠体内 SOD 活性使自由基生成减少，并抑制脂质过氧化反应，从而降低凋亡细胞比率^[5]；可调节自然衰老大鼠血中各激素含量，增强组织抗氧化能力^[6]；临床上能有效改善老年患者肾虚症状，减缓老年相关疾病的发生发展，延缓衰老；桂附地黄丸也广泛应用于老年疾病的防治^[7]。此外，补肾方药可调节 Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路，对机体多种干细胞功能有明显调节作用^[8-10]，激活前者时表皮干细胞增殖增加^[11]，特异性阻断后者时骨髓间充质干细胞分化增多^[12]，并且中医学“益火补土”理论为该方药改善肠道功能提供了理论依据。因此，本实验旨在探讨桂附地黄丸对自然衰老大鼠回肠干细胞增殖分化功能的调节作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只，购自三峡大学医学院实验动物中心，实验动物许可证号 SCXK（鄂）2011-0012，每笼饲养 5 只，自由摄食饮水。

1.2 试药 桂附地黄丸（浓缩丸）购自仲景宛西制药股份有限公司（批号 140907），双蒸水完全溶解，配制质量浓度分别为 0.1、0.4 g/mL 的药液。阿利新蓝-核固红染色试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司）；一抗 PCNA（苏州睿赢生物科技有限公司）， β -catenin、GSK-3 β 、Notch1、Hes1（美国 Cell Signaling Technology 公司）；二抗山羊抗

兔 IgG（武汉科瑞生物技术有限公司）；RNA 逆转录试剂盒（日本 TaKaRa 公司）；Lgr5、Olfm4、 β -actin 由上海生工生物工程有限公司合成生产，引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	正向(5'-3')	反向(3'-5')
Lgr5	CCTGGGAAGCAAACCCG	CGGAATCGGAAGGCAAGTC
Olfm4	CTCCTCTGCTCTGGAAGC	ACCCTGGCATCTGTATTCAAAGG
β -actin	TGACCGAGCGTGCTACAG	CAGGGAGGAAGAGGATGCG

1.3 仪器 UltraCut 超薄切片机（德国 Leica 公司）；CS-V1 恒温摊烤片一体机（孝感宏业医用仪器有限公司）；CX41 光学显微镜（日本 Olympus 公司）；1-15K 离心机（德国 Sigma 公司）；DU-730 微量核酸蛋白分析仪（美国贝克曼库尔特公司）；Veriti™ 96-Well Thermal Cycler 梯度 PCR 仪（德国 Applied Biosystems 公司）；Gene Genius 凝胶分析系统（英国 Syngne 公司）；Gel Logic 200 凝胶成像系统（美国柯达公司）。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 取 2 月龄大鼠 10 只作为青年组；另取 18 月龄大鼠 30 只，随机分为衰老组及桂附地黄丸低、高剂量组，每组 10 只。根据药物说明书上成人每天推荐剂量，以及人和大鼠体表面积比值，换算成大鼠每日给药低剂量为 0.4 g/kg，并以其 4 倍为高剂量，即 1.6 g/kg。桂附地黄丸低、高剂量组大鼠从 18 月龄开始灌胃给药，1 次/d，每周 6 d，连续 4 个月，至 22 月龄；青年组、衰老组大鼠分别自 2、18 月龄开始，给予相应剂量生理盐水灌胃，1 次/d，每周 6 d，连续 4 个月，分别至 6、22 月龄。

2.2 指标检测

2.2.1 HE 染色 各组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后，钝性分离肠道组织，取远端回肠组织约 0.5 cm，4% 多聚甲醛浸泡 24 h 后，常规脱水，石蜡包埋，制成厚度 4 μ m 的横断切片，病理级清洁载玻片贴片，烘烤 4 h 以上，脱蜡至水，常规 HE 染色。光学显微镜下观察并采集各组回肠病理图像，每组选取回肠形态完整的切片 5 张，每张选取同一视野排列整齐、长度相当的肠绒毛 5 根，通过 Image-Pro Plus 7.0 软件测量相应数值，计算绒毛长度与隐窝深度比值（V/C）。

2.2.2 阿利新蓝染色 各组回肠组织病理切片，脱蜡至水，双蒸水冲洗干净，根据阿利新蓝-核固

红染色试剂盒说明书操作步骤染色。光学显微镜下观察并采集图像，每组选取 5 张，计算其隐窝及绒毛杯状细胞数量。

2.2.3 免疫组织化学染色 制备各组回肠石蜡切片，厚度 4 μm，多聚赖氨酸处理后的防脱载玻片贴片，60 ℃烘箱烘烤 8 h，常规脱蜡至水，柠檬酸盐抗原修复液高压修复 5 min，自然冷却至室温，3% H₂O₂ 于 37 ℃恒温箱中孵育 10 min，5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h，滴加一抗，4 ℃冰箱中孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，HRP-DAB 显色液显色。光学显微镜下观察并控制显色时间，苏木素染液复染 30 s，流水冲洗反蓝，1% 盐酸乙醇分化，常规脱水透明，封片，显微镜下采集图像，通过 Image-Pro Plus 6.0 软件分析。

2.2.4 RT-PCR 根据 RNA 提取试剂盒说明书操作步骤提取各组回肠组织中总 RNA，核酸测定仪检测其浓度和 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ ，重复 1 次，取 2 次测得结果的平均值作为 RNA 实际浓度，其中 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 控制在 1.8~2.0 范围以保证所提 RNA 质量。再进行逆转录，PCR 扩增，体系总体积为 25 μL [10.5 μL DEPC 水，12.5 μL PCR Master mix (×2)，正、反向引物各 0.5 μL，模板 cDNA 1 μL]；选择 β-actin 作为内参，扩增条件为 94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，GOTO2，35 次，72 ℃ 5 min，4 ℃低温保存，扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶 100 V 恒压电泳 30 min，凝胶成像仪拍照，通过 Image J 软件测定目的基因条带光密度值，以其与 β-actin 光密度值之比作为统计量。

2.2.5 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处

理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠组织形态学及结果的影响 图 1 显示，青年组大鼠回肠绒毛呈指状，排列整齐，隐窝深度适中；衰老组大鼠回肠绒毛显著增长，隐窝明显加深，结构稍欠整齐；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠回肠绒毛长度、隐窝深度、排布情况等均有所改善。再通过 Image-Pro Plus 7.0 软件测量回肠绒毛长度、绒毛宽度、隐窝深度，并计算 V/C，结果见表 2，可知与青年组比较，衰老组大鼠回肠绒毛长度、隐窝深度显著增加 ($P < 0.01$)，V/C 显著减小 ($P < 0.01$)；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠前两者显著降低 ($P < 0.01$)，后者显著增大 ($P < 0.01$)。

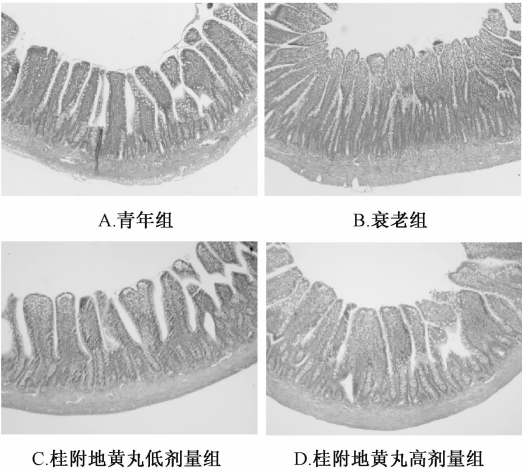


图 1 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠组织形态学的影响
Fig.1 Effects of Guifu Dihuang Pills on ileal histomorphology of aging rats

表 2 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠黏膜形态学变化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 25$)

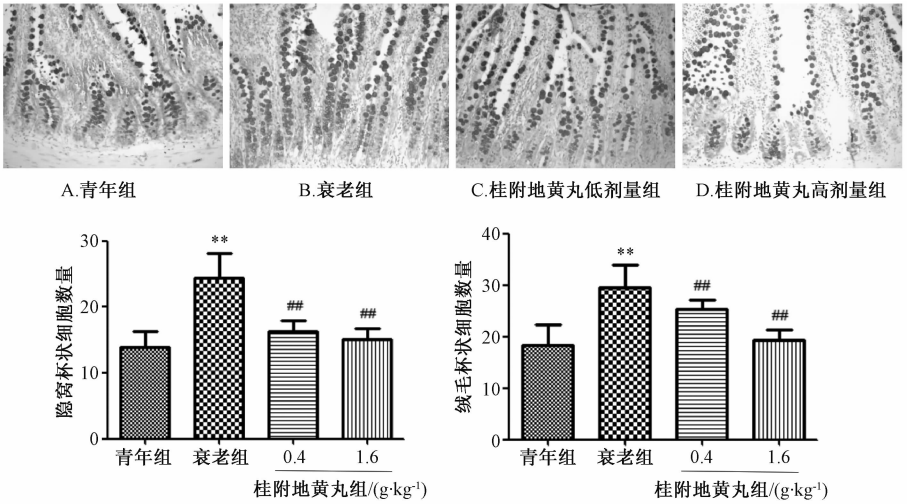
Tab.2 Effects of Guifu Dihuang Pills on morphological changes of aging rats' ileal mucosa ($\bar{x} \pm s$, $n = 25$)					
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	绒毛长度/μm	绒毛宽度/μm	隐窝深度/μm	V/C
青年组	—	627.78 ± 54.89	175.70 ± 32.23	222.54 ± 23.84	2.85 ± 0.38
衰老组	—	896.92 ± 31.46 **	187.04 ± 57.47	422.33 ± 26.97 **	2.13 ± 0.16 **
桂附地黄丸低剂量组	0.4	797.30 ± 47.11 ##	178.68 ± 26.21	271.89 ± 27.93 ##	2.96 ± 0.35 ##
桂附地黄丸高剂量组	1.6	734.23 ± 61.67 ##	168.54 ± 32.89	272.95 ± 17.54 ##	2.71 ± 0.34 ##

注:与青年组比较,** $P < 0.01$;与衰老组比较,## $P < 0.01$

3.2 桂附地黄丸对衰老大鼠杯状细胞数量的影响 图 2 显示，杯状细胞内富含酸性黏液物质，经阿利新蓝染色后呈蓝色小泡状，分布于回肠隐窝内及绒毛边缘。与青年组比较，衰老组大鼠回肠组织隐窝、绒毛杯状细胞数目显著增加 ($P < 0.01$)；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠两者数目显著减

少 ($P < 0.01$)。

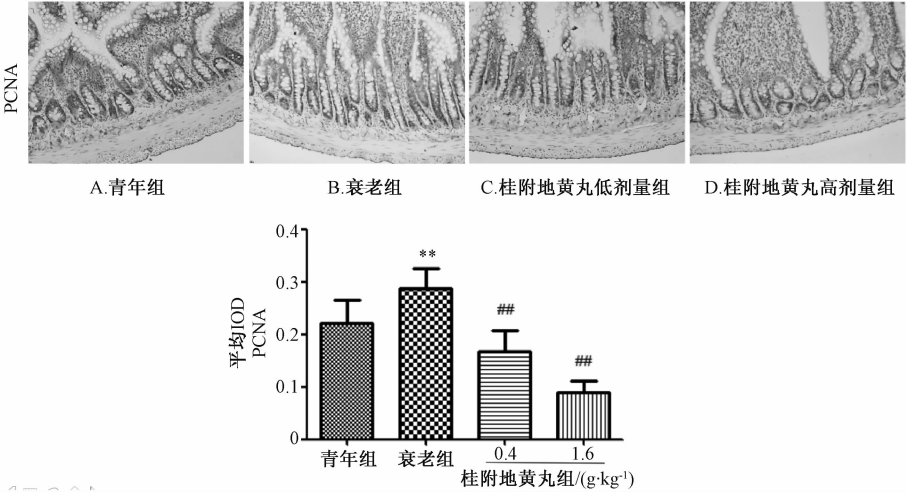
3.3 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠干细胞增殖情况的影响 图 3 显示，PCNA 阳性表达呈棕黄色，位于隐窝内处于分裂期的干细胞胞核。与青年组比较，衰老组大鼠 PCNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠其表达显著降低



注：与青年组比较，** $P < 0.01$ ；与衰老组比较，## $P < 0.01$

图 2 桂附地黄丸对衰老大鼠杯状细胞数量的影响 (×200)

Fig. 2 Effects of Guifu Dihuang Pills on goblet cell number in aging rats (×200)



注：与青年组比较，** $P < 0.01$ ；与衰老组比较，## $P < 0.01$

图 3 桂附地黄丸对衰老大鼠 PCNA 蛋白表达的影响 (×200)

Fig. 3 Effects of Guifu Dihuang Pills on PCNA protein expression in aging rats (×200)

($P < 0.01$)。

3.4 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠干细胞标记物 mRNA 表达情况的影响 图 4 显示，与青年组比较，衰老组大鼠 *Lgr5*、*Olfm4* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠两者 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。

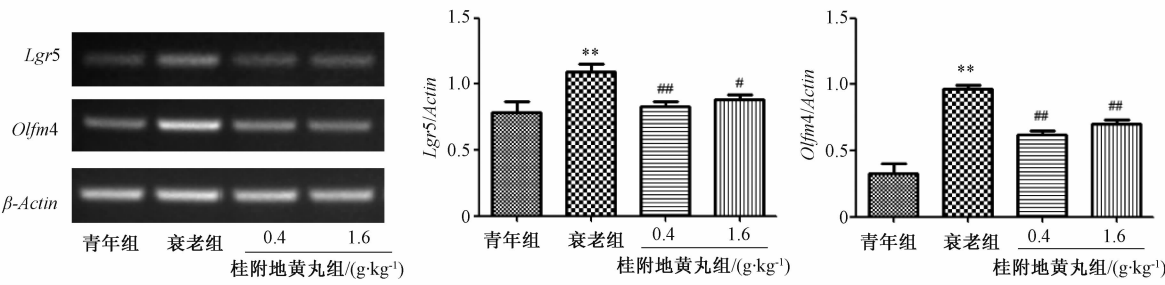
3.5 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 图 5 显示，GSK-3 β 、 β -catenin 阳性表达呈棕黄色，位于隐窝及绒毛处的肠上皮细胞胞质中。与青年组比较，衰老组大鼠 GSK-3 β 表达显著降低 ($P < 0.01$)， β -catenin 表达显著升高 ($P < 0.01$)；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠前者表达显著升高 ($P < 0.01$)，

后者表达显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 桂附地黄丸对衰老大鼠回肠组织 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响 图 6 显示，Notch1、Hes1 阳性表达呈棕黄色，Notch1 位于隐窝及绒毛处的肠上皮细胞胞质中，Hes1 位于隐窝处胞核中。与青年组比较，衰老组大鼠 Notch1、Hes1 表达显著降低 ($P < 0.01$)；与衰老组比较，桂附地黄丸组大鼠两者表达无显著变化 ($P > 0.05$)。

4 讨论

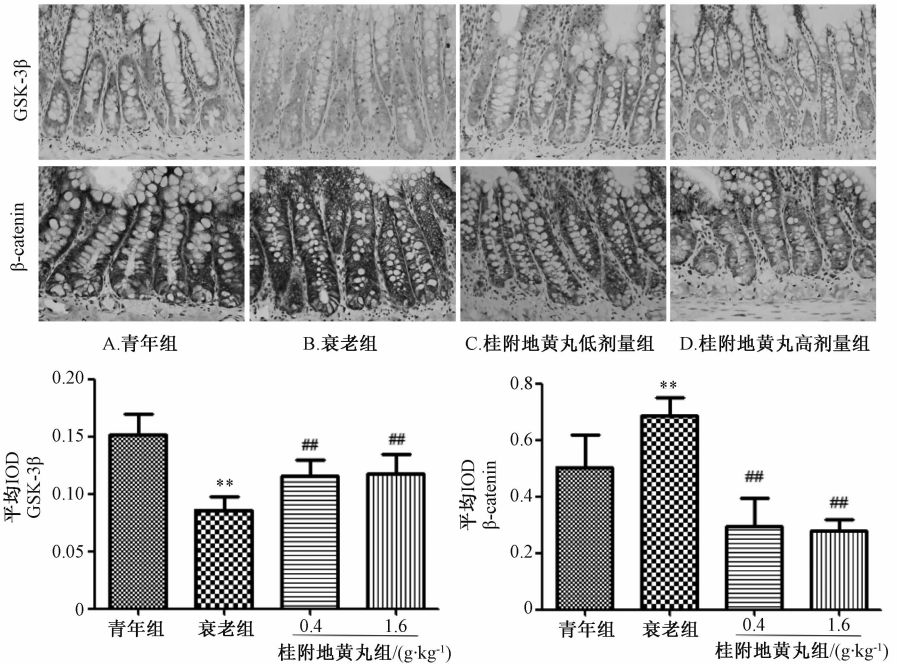
肠道干细胞增殖通过维持自身数量，并分化形成各种类型肠上皮细胞来维持肠黏膜再生及损伤后修复。绒毛-隐窝轴为肠道结构基础和功能基础，各种类型肠上皮细胞均由肠道干细胞增殖分化而



注：与青年组比较，** $P < 0.01$ ；与衰老组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图 4 桂附地黄丸对衰老大鼠干细胞标记物 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of Guifu Dihuang Pills on stem cell marker mRNA expressions in aging rats



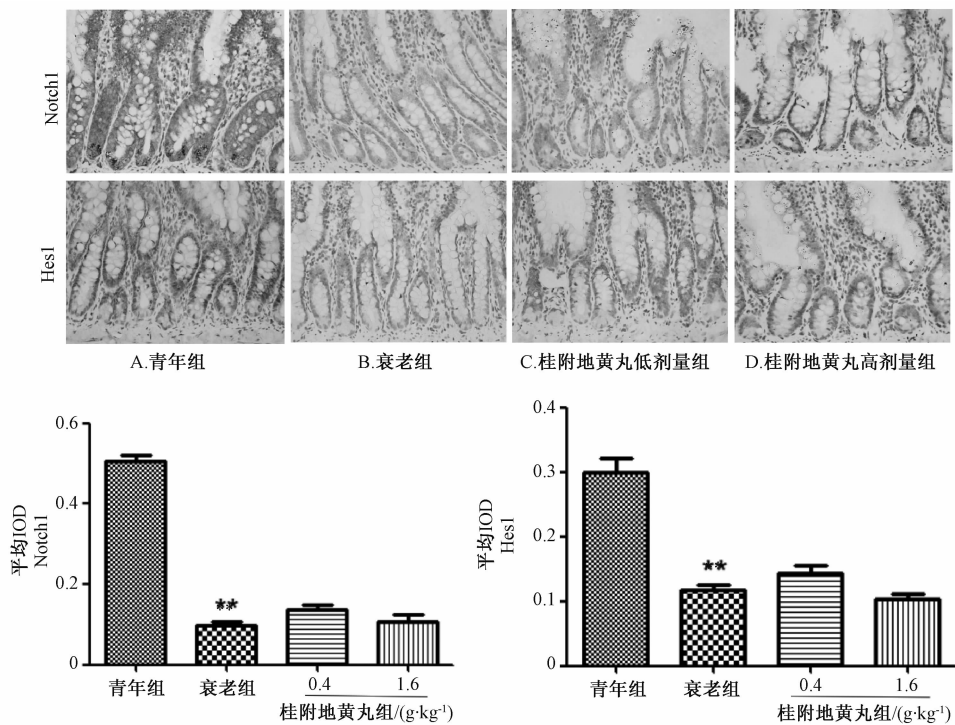
注：与青年组比较，** $P < 0.01$ ；与衰老组比较，## $P < 0.01$

图 5 桂附地黄丸对衰老大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\times 400$)

Fig. 5 Effects of Guifu Dihuang Pills on Wnt/ β -catenin signaling pathway-related protein expressions in aging rats ($\times 400$)

来，绒毛长度、隐窝深度、V/C 等形态学指标可间接反映肠道干细胞增殖分化情况；杯状细胞为一种分泌型肠上皮细胞，由肠道干细胞分化而来，其数量多少可反映肠道干细胞分化功能的活跃程度；PCNA 表达直接反映肠道干细胞增殖情况；Lgr5、Olfm4 表达可反映处于活跃增殖状态的干细胞数量。本实验发现，衰老大鼠回肠绒毛长度、隐窝深度增加，V/C 减小，杯状细胞增多，PCNA 蛋白表达和 Lgr5、Olfm4 mRNA 表达提高，呈现出病理性增生现象，干细胞增殖分化功能稳态失衡，而给予桂附地黄丸干预后上述情况均明显改善，表明它可改善衰老过程中肠道的病理性增生，维持肠道干细胞增殖分化功能的稳定性。

Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路是 2 个重要的肠道干细胞微环境信号通路，两者相互协调是肠道干细胞增殖分化功能稳态的保证，其中前者主要维持增殖，后者可调节向吸收上皮细胞分化，从而抑制向分泌型细胞的分化^[13]。细胞外基质中的 Wnt 配体与细胞膜表面的 Frizzled 蛋白、低密度脂蛋白相关受体 LRP5/6 结合，通过蓬乱蛋白 Dvl 将信号传至胞内，抑制由 APC、GSK-3 β 、Axin 等组成的降解复合物活性，使得 β -catenin 不能被其降解，而在胞浆中大量积累，进而发生核转位，在胞核内与淋巴增强因子 (LEF) 或 T 细胞因子 (TCF) 结合，激活相应靶基因的转录，从而发挥作用。研究显示，抑制 Wnt/ β -catenin 信号可导致小鼠肠道干



注：与青年组比较，***P* < 0.01

图 6 桂附地黄丸对衰老大鼠 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 6 Effects of Guifu Dihuang Pills on Notch signaling pathway-related protein expressions in aging rats (×400)

细胞增殖减少^[14]；在果蝇肠中，当 Wnt 靶基因表达超活化时，肠道干细胞过度增殖，肠上皮增生^[15]。Notch 信号通过细胞间的接触而发挥作用，当位于胞膜 Delta 样配体 (Dll1/Dll4) 与邻近细胞 Notch 受体 (如 Notch1) 胞外结构域结合时，经过 γ 分泌酶的蛋白水解反应，释放其胞内活化片段 (NICD)，进入细胞核后通过与转录因子 Rbpj 结合，启动相应靶基因 (如 Hes1) 表达；Hes 因子可抑制分泌型细胞分化的关键转录因子 Atoh1 的表达，从而抑制分泌型细胞分化^[16]；研究表明，抑制 Notch 信号可促进小鼠肠道干细胞向杯状细胞分化^[17]。本实验发现，衰老大鼠回肠组织 β -catenin、Notch1、Hes1 表达增加，GSK-3 β 表达减少，经桂附地黄丸干预后 β -catenin 表达减少，GSK-3 β 表达增加，Notch1、Hes1 表达无明显变化，表明衰老过程中回肠组织 Wnt/ β -catenin 信号上调，Notch 信号下调，而桂附地黄丸可逆转前者，但对后者无影响，表明桂附地黄丸调控肠道干细胞分化功能并不是通过 Notch 信号通路来发挥作用。研究显示，肠上皮细胞 Sirt1 基因敲除衰老小鼠的肠道杯状细胞增生^[18]；课题组前期研究也发现，衰老鼠肠道的 Sirt1 蛋白表达减少^[19]，故推测桂附地黄丸调控肠道干细胞分化功能的作用靶点可能与 Sirt1 蛋白有关。

然而，关于哺乳动物小肠由衰老所致变化的研究存在争议。Nalapareddy 等^[20]报道，C57BL/6 老龄小鼠小肠绒毛增长，隐窝加深，杯状细胞数目增多，干细胞数目无明显变化但其增殖活动减少，Wnt/ β -catenin 信号通路下调；本实验结果也显示，衰老大鼠回肠绒毛增长，隐窝加深，杯状细胞数目增多，但回肠干细胞数目增多，其增殖活动增强，Wnt/ β -catenin 信号通路上调；课题组前期^[21-22]发现，衰老大鼠十二指肠及空肠绒毛缩短，隐窝变浅，杯状细胞数目减少，干细胞数量及其增殖活动减少，Wnt/ β -catenin 信号通路下调，初步推测衰老所致肠道不同形态及信号通路变化可能与动物种属、肠段生理功能差异有关，具体原因仍有待进一步探索。桂附地黄丸对衰老大鼠不同肠段形态及微环境信号通路均有一定改善作用，提示它可能在维持肠道稳态方面发挥重要作用。

综上所述，稳定的肠道干细胞增殖分化稳态是维持肠道正常运作的保证，调控其正常增殖分化需要干细胞微环境 Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路等共同作用。本实验结果显示，桂附地黄丸可改善增龄过程中回肠病理性增生情况，恢复肠道干细胞增殖分化稳态，其机制可能与抑制过度活跃的 Wnt/ β -catenin 信号通路有关，但其对肠道干细胞向杯

状细胞分化的机制与 Notch 信号通路无明显关联，具体机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Rera M, Azizi M J, Walker D W. Organ-specific mediation of lifespan extension: more than a gut feeling? [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(1): 436-444.

[2] Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 274-284.

[3] Moorefield E C, Andres S F, Blue R E, *et al.* Aging effects on intestinal homeostasis associated with expansion and dysfunction of intestinal epithelial stem cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(8): 1898-1915.

[4] Horvay K, Abud H E. Regulation of intestinal stem cells by Wnt and Notch signalling[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 786: 175-186.

[5] 王新玲, 李月彩, 侯颖春. 金匱肾气丸抗自由基和细胞凋亡的作用[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21 (10): 1209-1211.

[6] 张莹雯, 陈友香, 夏振信. 金匱肾气丸对老年雌性大鼠一氧化氮、性激素的影响[J]. 中成药, 2003, 25 (3): 252-253.

[7] 刘春援, 张 莉, 邓建新. 桂附地黄丸在老年病防治中的应用[J]. 江西中医药, 2005, 36(2): 45-48.

[8] 王 宁, 陈西华, 张树成, 等. 金匱肾气丸对小鼠生精恢复的基因表达谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (10): 215-220.

[9] 苏麒麟, 孙 鑫, 杨 芳, 等. 补肾中药对绝经后骨质疏松症模型大鼠骨及肌肉组织 Notch 信号通路蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8): 3208-3212.

[10] 陶 智, 郑小利, 薛 莎, 等. 不同补肾方对卵巢摘除术后骨质疏松大鼠 Wnt 信号表达的影响[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2016, 18(5): 839-845.

[11] 张季林, 徐 彭, 董德刚, 等. 白花檉木有效部位治疗糖尿病皮肤溃疡机制研究[J]. 中草药, 2017, 48 (14): 2907-2911.

[12] 赵红斌, 甄英丽, 田 蓉, 等. Notch 和 BMP 信号通路介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经元细胞定向分化研究[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2294-2300.

[13] Tian H, Biehs B, Chiu C, *et al.* Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis[J]. *Cell Rep*, 2015, 11(1): 33-42.

[14] Janeckova L, Faflek B, Krausova M, *et al.* Wnt signaling inhibition deprives small intestinal stem cells of clonogenic capacity [J]. *Genesis*, 2016, 54(3): 101-114.

[15] Tian A, Benchabane H, Wang Z, *et al.* Intestinal stem cell overproliferation resulting from inactivation of the APC tumor suppressor requires the transcription cofactors Earthbound and Erect wing[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(7): e1006870.

[16] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.

[17] Van Es J H, Van Gijn M E, Riccio O, *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells [J]. *Nature*, 2005, 435 (7044): 959-963.

[18] Wellman A S, Metukuri M R, Kazgan N, *et al.* Intestinal epithelial sirtuin 1 regulates intestinal inflammation during aging in mice by altering the intestinal microbiota[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(3): 772-786.

[19] 王海英, 顿耀艳, 袁 丁, 等. 竹节参总皂苷对自然衰老大鼠小肠上皮细胞紧密连接蛋白的调节作用及其机制研究[J]. 中药材, 2016, 39(9): 2091-2096.

[20] Nalapareddy K, Nattamai K J, Kumar R S, *et al.* Canonical Wnt signaling ameliorates aging of intestinal stem cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(11): 2608-2621.

[21] 彭丹丽, 郭煜晖, 李玉婷, 等. 肾气丸对衰老大鼠小肠干细胞及其微环境 Wnt/ β -catenin 信号通路的调节作用[J]. 中药材, 2017, 40(9): 2177-2181.

[22] 陈 静, 郭煜晖, 彭丹丽, 等. 淫羊藿总黄酮对衰老大鼠小肠干细胞及其微环境的调节作用[J]. 中药材, 2016, 39 (12): 2839-2845.