



研究论文 ORIGINAL PAPERS

过氧化氢诱导马鹿鹿茸
软骨组织原代细胞衰老模型的建立

王博, 郑茜之, 吴玄烨, 成佳婧, 郑冬*, 刘学东*

(东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨 150040)

稿件运行过程

收稿日期: 2024-12-12
修回日期: 2025-02-09

关键词: 马鹿;

鹿茸软骨;
原代细胞;
过氧化氢;
细胞衰老模型Keywords: Red deer (*Cervus elaphus*);Antler cartilage;
Primary cell;
H₂O₂;
Cellular senescence model

中图分类号: Q255

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2025)-04-0797-08

DOI: 10.12375/ysdwxb.202412013

摘要

为深入探究细胞水平衰老与再生机制的差异,采用过氧化氢(H₂O₂)诱导马鹿(*Cervus elaphus*)快速生长期鹿茸软骨组织(CA)原代细胞,旨在探索构建衰老细胞模型的实验方法。通过使用不同浓度H₂O₂处理原代细胞,培养72 h后,利用CCK-8法筛选出半数效应浓度,同时结合衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色评估衰老情况,以确定建模相关参数。进一步通过RT-qPCR和Western Blotting检测细胞中控制衰老TP53-CDKN1A(P21)轴的关键标记基因转录和蛋白表达水平。结果表明:经400 μmol/L H₂O₂处理后,试验组细胞存活率下降约50%($P < 0.001$),SA-β-Gal染色阳性率升高约70%($P < 0.001$),细胞呈现明显扁平不规则形的衰老特征。RT-qPCR检测显示,试验组TP53和P21转录水平上调($P < 0.001$);Western Blotting结果进一步证实,TP53和P21的蛋白水平均显著升高($P < 0.001$),表明H₂O₂成功诱导鹿茸软骨原代细胞发生衰老。本研究成功建立了利用H₂O₂诱导马鹿鹿茸软骨原代细胞衰老的实验方法,为后续研究提供了细胞水平的衰老模型。

Establishment of Hydrogen Peroxide
Induced Senescence Model of Antler
Cartilage-Derived Primary Cell from the Red DeerWANG Bo, ZHENG Qianzhi, WU Xuanye,
CHENG Jiajing, ZHENG Dong*, LIU Xuedong*(College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University,
Harbin 150040, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671283);中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572023CT13-1)

第一作者简介: 王博(1999—),男,硕士研究生;主要从事野生动物遗传学研究。E-mail:1114309628@qq.com

*通信作者: 郑冬, E-mail: zhengdong89@163.com;刘学东, E-mail: liuxuedong89@126.com

Abstract: To further reveal the difference in the mechanism of aging and regeneration at the cellular level, hydrogen peroxide (H_2O_2) was utilized to induce cellular senescence in primary cells derived from the antler cartilage (CA) of rapidly growing red deer (*Cervus elaphus*). Various concentrations of H_2O_2 were used to treat primary cells, and after 72 h of cultivation, the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined using the CCK-8 assay. Cellular senescence was analyzed through SA- β -Gal staining, and the corresponding parameters for model construction were established. Additionally, quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western Blotting were employed to detect changes in the transcription and protein expression of key senescence-related genes, including *TP53* and *CDKN1A* (*P21*), which regulate senescence. The results showed that compared to the control group, treatment with 400 μ mol/L H_2O_2 reduced cell viability by approximately 50% ($P < 0.001$), significantly increased the SA- β -Gal staining positivity rate by about 70% ($P < 0.001$), and resulted in distinct morphological signs of cellular senescence, including flattened and irregular features of aging. RT-qPCR analysis revealed upregulated transcription levels of *TP53* and *P21* in the experimental group ($P < 0.001$). Western Blotting further confirmed an increase in the protein expression of TP53 and P21 ($P < 0.001$), indicating that H_2O_2 effectively induced cellular senescence in primary cells from antler cartilage. In conclusion, an experimental method was successfully established to induce senescence in primary cells from antler cartilage of red deer using H_2O_2 , providing a cellular-level model for future research on aging.

细胞衰老是指细胞进入稳定的细胞周期停滞状态,此时增殖细胞对促生长刺激因子产生耐受,这一过程通常由DNA损伤触发^[1]。细胞衰老通常表现出多种典型特征,包括形态学和代谢变化、染色质重构、基因表达改变以及出现衰老相关分泌表型(SASP)的促炎症表型^[2]。细胞衰老不同于机体老化,其不随时间推移发生进行性衰退。衰老在整个生命周期中都可发生,其生物学作用复杂,起保护作用还是有害作用主要取决于生理环境。尽管衰老可能是作为抑制受损细胞恶性转化的机制进化而来,但衰老可能也会导致许多与年龄相关的病变^[3],包括癌症、组织退化和炎症性疾病^[4-5]。

细胞衰老根据衰老机制分为复制衰老和过早衰老。前者是由发育过程中遗传编程决定的,包括细胞衰老、神经内分泌和免疫系统的变化;而后者源于随机损伤,如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)、紫外线导致的体细胞突变积累和氧化应激(oxidative stress, OS)^[6]。其中 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 等活性氧(reactive oxygen species, ROS)的作用与其水平密切相关,低水平ROS可通过诱导细胞的适应性反应来增强防御机制,有助于抗压和延寿,而高水平ROS则因细胞适应性反应不足加速衰老的发生与发展^[7]。

H_2O_2 作为一种强氧化剂,是诱导型衰老模型构建中最常用的衰老诱导剂。细胞自身代谢过程也会

产生内源性 H_2O_2 产物,是部分细胞活动的信号分子^[8]。因此使用 H_2O_2 作为诱导剂,易于进入细胞,其强氧化性能使细胞在短时间内产生大量ROS导致细胞内DNA损伤。这些损伤信号进一步激活应激感应器蛋白ATM/ATR,促使*TP53*磷酸化;活化后的*TP53*会促进其下游*P21*等有关细胞周期调控的基因表达,引发细胞周期阻滞,使细胞进入衰老状态^[9]。

与衰老相反,再生是一种修复受损组织、替换衰老细胞的生理过程^[4,10]。但是,器官/附件级别的再生过程在哺乳动物中很稀有。鹿茸是已知成体哺乳动物中唯一可周期性完全再生的器官,它不仅是研究再生机制的理想模型^[11],而且对于衰老机制的揭示也具有较高价值。以马鹿(*Cervus elaphus*)为例,在鹿茸快速生长期,其再生过程包括软骨生成和骨生成两个过程。作为鹿茸再生过程的一个关键发育事件,软骨生成发生在鹿茸顶端生长区近颅骨区域,在这个过程中鹿茸顶端增生点细胞不断增殖分化形成软骨组织(CA)^[12],这就为构建一种处于再生背景中的细胞衰老模型提供了可能性。该细胞衰老模型将为在细胞水平上更深入地比较衰老与再生的机制和功能、重新理解再生与衰老间的关系提供支撑。

由于细胞衰老的本质是一种非增殖的代谢活跃状态^[13],从组织器官中分离到的衰老细胞无法通过常规的细胞增殖、传代的培养方式获得实验所需的

细胞数量。因此,探索一种适用于鹿茸软骨原代细胞构建衰老模型的技术体系是亟待解决的问题。本研究采用 H_2O_2 作为鹿茸软骨原代细胞衰老诱导剂,通过设置不同浓度梯度筛选其半数效应浓度,并结合细胞增殖减缓、形状不规则等镜检特征,以及衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence associated β -galactosidase, SA- β -Gal)染色阳性率,确定最佳建模条件。进一步通过RT-qPCR和Western Blotting检测调控衰老的 $TP53$ - $CDKN1A(P21)$ 轴中标记基因转录本和蛋白水平变化。综合以上实验结果,证实本研究成功构建出马鹿鹿茸软骨细胞衰老模型,为后续相关机制研究提供了可靠的细胞平台。

1 材料与方法

1.1 鹿茸样品采集与鹿茸软骨组织原代细胞分离

鹿茸样品于2023年5月采集自秦皇岛野生动物园的雄性马鹿。软骨组织层与原代细胞的分离参考文献[14-15]进行。主要过程:首先,通过测量鹿茸尖端的层长对鹿茸软骨及其他不同类型组织进行快速精准采样;随后使用手术刀依据解剖结构迅速分离各组织,并立即置于Hanks平衡盐溶液中暂存。软骨组织经胶原酶和透明质酸酶消化分离后,一部分转入细胞培养瓶中进行原代培养,另一部分经冻存后保存于液氮中。

1.2 H_2O_2 诱导细胞衰老半数效应浓度测定

将复苏后传代培养至第3代的原代细胞以2 000个/孔的密度接种于96孔板中,每孔含100 μ L完全培养基,培养24 h后分为对照组与试验组。对照组加入无血清培养基(Gibco,美国),试验组分别加入含100、200、400、800、1 600 μ mol/L H_2O_2 (Sigma,美国)的无血清培养基,诱导2 h后,更换为正常完全培养

基,继续培养72 h。随后参照文献[16-17]的方法,使用CCK-8试剂(上海碧云天生物技术有限公司)检测细胞活力,并计算 H_2O_2 诱导细胞衰老的半数效应浓度。

1.3 衰老细胞SA- β -Gal染色与观察

将复苏后传代培养至第3代的原代细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,并分为对照组与试验组。两组 H_2O_2 处理方法参见1.2节。培养72 h后,使用SA- β -Gal染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),依据实验手册对细胞进行染色。于光学显微镜下观察,衰老细胞胞质呈现蓝色。随机选取3个视野计数阳性细胞,并计算阳染率。

1.4 RNA提取与cDNA的合成

鹿茸软骨原代细胞衰老诱导试验组的构建方法参见1.2节。实验设对照组,将原代细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,待细胞融合度达到70%~80%时,加 H_2O_2 处理并培养72 h。随后,在各孔中加入细胞裂解液(上海碧云天生物科技股份有限公司)消化裂解细胞,使用总RNA提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)相关试剂提取细胞总RNA。采用NanoDrop One(赛默飞公司)测定提取得到的总RNA浓度并检测其完整性。最后,使用cDNA合成试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),参照说明书流程,在去除基因组DNA后合成cDNA,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.5 利用RT-qPCR技术检测衰老相关标记基因的转录水平变化

根据GenBank中马鹿 $TP53$ 基因(登录号:XM_043903734.1)和 $P21$ 基因(登录号:XM_043907314.1)的序列,利用NCBI-Primers-BLAST在线设计qPCR引物。引物序列交由北京睿博兴科生物技术有限公司(哈尔滨分公司)合成,具体引物信息见表1。

表1 RT-qPCR检测用引物信息

Table 1 Information on primers used for RT-qPCR assays

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	产物大小/bp Product size
$TP53$	F: 5'-TGGGACGGAACAGCTTTGAG-3'	57	214
	R: 5'-TTACGCCACGGATCTGAAG-3'		
$P21$	F: 5'-AGACCAGCATGACAGATTCTAC-3'	57	154
	R: 5'-CGCACAAACTGAAGACCAAG-3'		
$GAPDH$	F: 5'-TCACTGCCACCCAGAAGACC-3'	60	100
	R: 5'-GCAGCGCCAGTAGAAGCAGG-3'		

注: $GAPDH$ 作为内参基因用于标准化。

Note: $GAPDH$ was used as the reference gene for normalization.

以 *GAPDH* 作为内参基因,分别以对照组和试验组细胞 cDNA 为模板,表达采用定量 PCR (Light Cycler 96, 罗氏(美国))检测 *TP53* 和 *P21* 基因转录本的相对表达水平。总反应体系 20.0 μL , 包含 $2 \times \text{SYBR Green qPCR Master Mix}$ (翌圣生物科技(上海)股份有限公司) 10.0 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 模板 1.0 μL , ddH₂O 8.0 μL 。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 45 个循环。其中变性程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 开始每 5 s 上升 5 $^{\circ}\text{C}$ 至 95 $^{\circ}\text{C}$ 。每个样品具有 3 个独立重复。

1.6 利用 Western Blotting 检测衰老细胞标记基因的蛋白表达动态

根据前期试验结果,选择 400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 作为最适剂量处理鹿茸软骨原代细胞以建立衰老模型,同时设对照组(加入等量无血清培养基)。收集细胞并加入细胞裂解液,低温离心制备总蛋白样品。采用 NanoDrop One 分光光度计,选择 BSA280 法检测蛋白浓度后,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液进行蛋白凝胶电泳(180 V, 25 min)。电泳后进行转膜(40 V, 90 min)。用 5% 脱脂牛奶封闭膜,顺序孵育抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。最后,使用 Odyssey CLx 全自动核酸蛋白分析仪(LI-COR, 美国)扫膜、采集图像和数据分析。

1.7 数据处理与分析

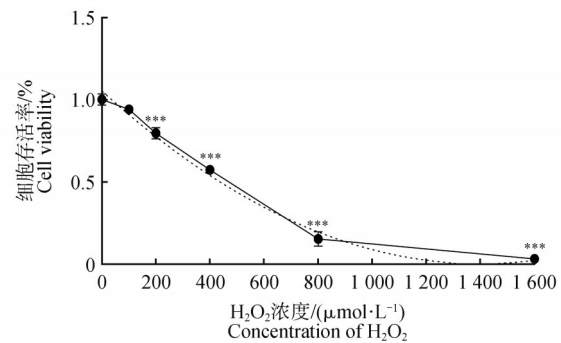
使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析 RT-qPCR 数据,计算对照组与试验组种标记基因的相对表达量。Western Blot 电泳图像通过 ImageJ 软件进行灰度分析并量化。所有数据均采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析处理并作图。组间比较使用单因素方差分析和 *t* 检验,显著性水平设定为 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义(*), $P < 0.01$ 表示差异显著(**), $P < 0.001$ 表示差异极显著(***)。

2 结果与分析

2.1 H₂O₂ 处理对原代细胞存活率的影响

不同浓度 H₂O₂ 对鹿茸软骨原代细胞存活率的影响具有显著差异,且与浓度呈负相关(图 1)。与对照组相比,200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理使细胞存活率均值下降至 79%;当浓度升至为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率约为 50%,此时细胞出现明显的增殖减缓、边界模糊,形态由梭形变为不规则椭圆形或细长形等衰老

特征(图 2(c)A);当 H₂O₂ 浓度达到 800 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,细胞停止生长,大部分细胞开始死亡,其余细胞胞体出现皱缩(图 2(d)A)。结果经非线性回归拟合,曲线方程为 $y = 1.053 - (1.501 \times 10^{-3})x + (5.357 \times 10^{-7})x^2$, $R^2 = 0.9863$,表明 400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理 2 h 为该实验条件下的半数效应浓度。



***: 与对照组差异极显著($P < 0.001$)。

***: An extremely significant difference from the control group ($P < 0.001$).

图 1 不同浓度 H₂O₂ 对鹿茸软骨原代细胞存活率的影响

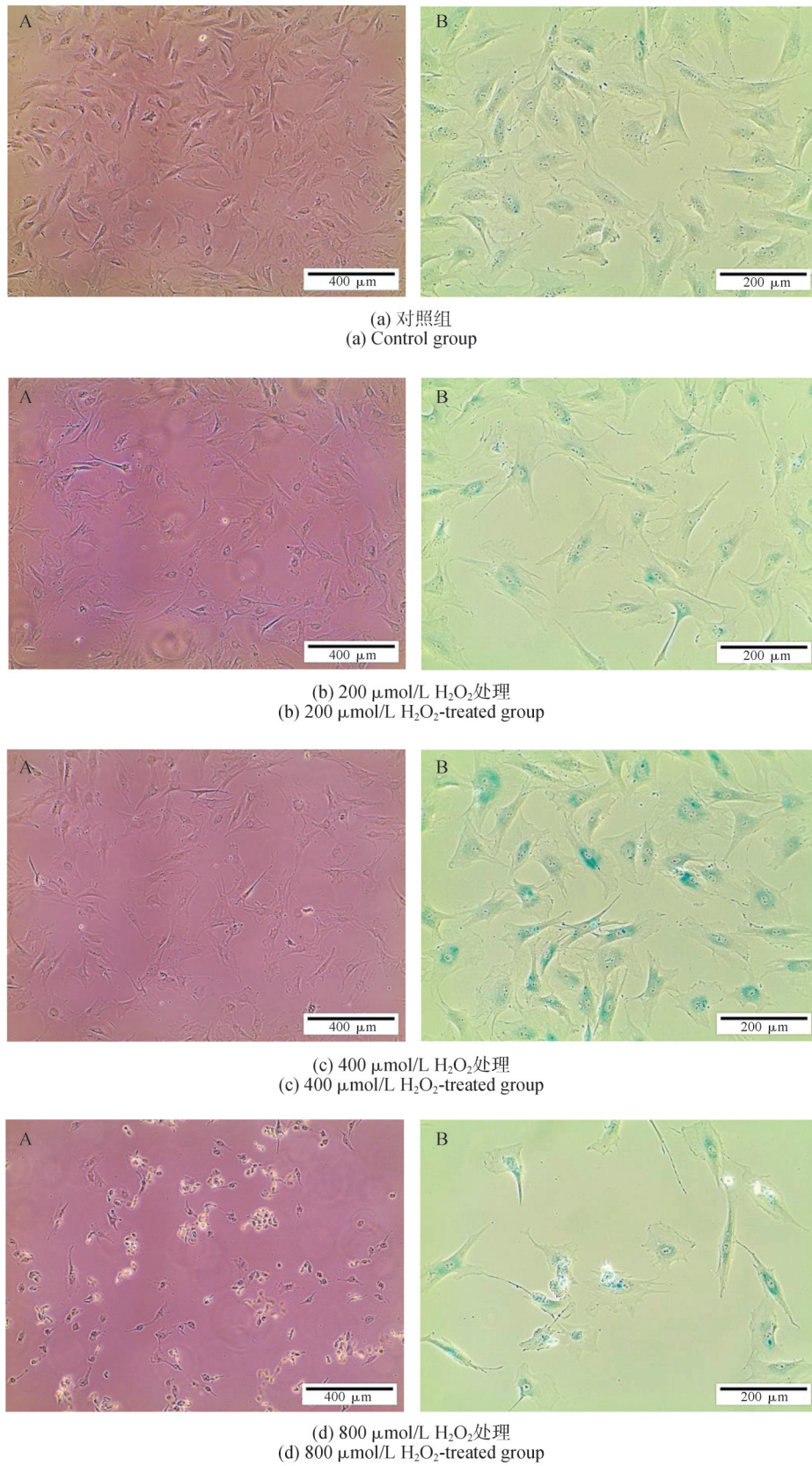
Figure 1 Effect of different concentrations of H₂O₂ on the viability of deer antler cartilage-derived primary cells

2.2 SA- β -Gal 染色检测 H₂O₂ 诱导的原代细胞衰老

采用 SA- β -Gal 染色法,通过检测细胞内 β -半乳糖苷酶活性来评估细胞老化状态。染色结果显示,经 200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理后,原代细胞 β -半乳糖苷酶活性增强,部分细胞核周围开始呈现出较淡的天蓝色(图 2(b)B);当浓度升至 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞核周围天蓝色明显(图 2(c)B);至 800 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,大部分细胞已皱缩、死亡(图 2(d))。细胞阳染率显示,200、400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理均可致衰老细胞阳染率达到通常使用的理想阳染率标准(接近 70%) (图 3)。结合 2.1 节细胞活性结果,后续试验选择 400 $\mu\text{mol/L}$ 作为构建鹿茸软骨原代细胞衰老模型的最佳浓度。

2.3 H₂O₂ 处理建模后衰老标记基因 *TP53*、*P21* mRNA 表达差异

TP53-*P21* 轴是细胞响应氧化应激并调控衰老进程的核心信号通路。RT-qPCR 检测结果显示,经 400 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理后,试验组 *TP53* 和其下游靶基因 *P21* 的转录水平均较对照组显著上调($P < 0.001$),其中,*P21* 的转录表达水平约为对照组的 3 倍(图 4)。

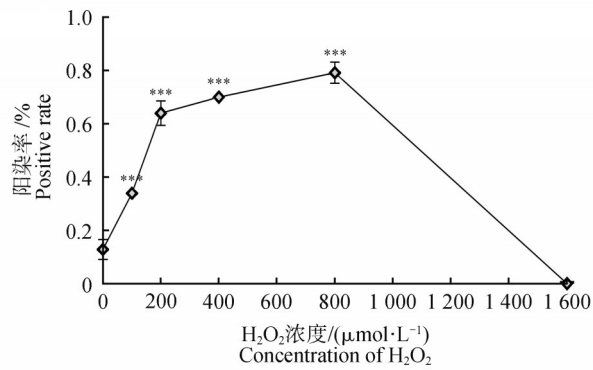


A. 未染色; B. SA- β -Gal染色。

A. Unstained; B. SA- β -Gal staining.

图2 不同浓度 H_2O_2 诱导下鹿茸软骨原代细胞SA- β -Gal染色结果

Figure 2 SA- β -Gal staining results of deer antler cartilage primary cells induced by different concentrations of H_2O_2



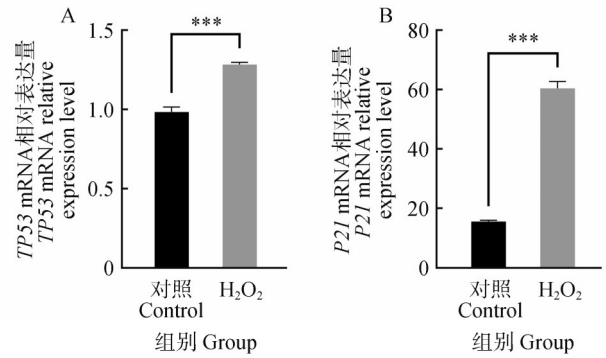
***. 与对照组差异极显著($P < 0.001$).

***. An extremely significant difference from the control group ($P < 0.001$).

图3 不同浓度H₂O₂诱导的鹿茸软骨原代细胞SA-β-Gal阳性率
Figure 3 SA-β-Gal positivity in deer antler cartilage-derived primary cells induced by different concentrations of H₂O₂

2.4 H₂O₂诱导衰老细胞中TP53和P21蛋白表达水平上调

为进一步明确H₂O₂对衰老相关蛋白的影响,研究团队检测了TP53和P21的蛋白表达水平。结果显示,经400 μmol/L H₂O₂处理后,原代细胞中的



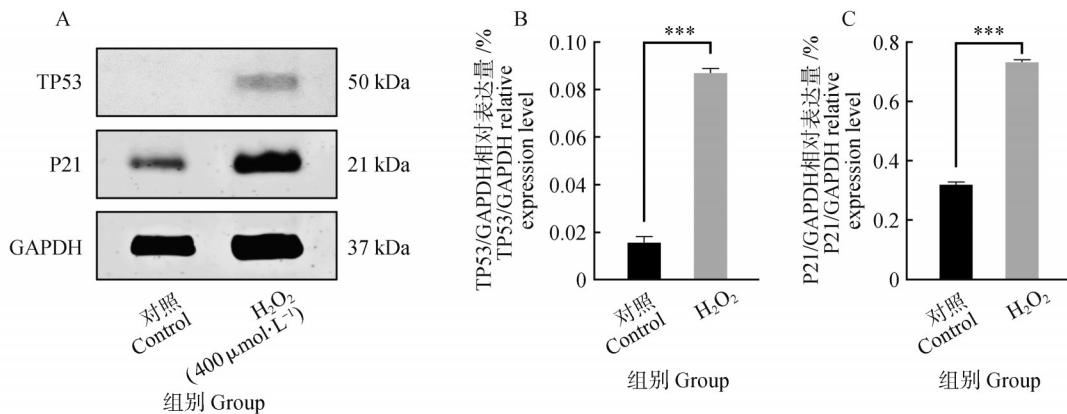
***. 与对照组差异极显著($P < 0.001$).

***. An extremely significant difference from the control group ($P < 0.001$).

图4 400 μmol/L H₂O₂诱导衰老建模后TP53(A)和P21(B)基因表达的差异

Figure 4 Differences in the expression of TP53 (A) and P21 (B) genes after the induction of senescence by 400 μmol/L H₂O₂

TP53、P21蛋白表达水平较对照组显著上调(图5)。结合RT-qPCR结果综合分析,提示H₂O₂可能通过激活TP53基因的上游转录调控通路并增强TP53蛋白稳定性,进而促进其下游靶基因P21的转录及蛋白表达。



A. Western Blot结果; B. TP53蛋白的灰度分析结果; C. P21蛋白的灰度分析结果; ***. 与对照组差异极显著($P < 0.001$).

A. Western Blot results; B. Quantitative analysis of TP53 protein (grayscale); C. Quantitative analysis of P21 protein (grayscale); ***. An extremely significant difference from the control group ($P < 0.001$).

图5 鹿茸软骨原代细胞衰老后TP53、P21蛋白的表达差异

Figure 5 Differential expression of TP53 and P21 proteins in senescence deer antler cartilage-derived primary cells

3 讨论与结论

目前衰老模型构建方式总体上分为两类:复制型衰老模型与诱导型衰老模型^[18]。复制型衰老模型是通过分离出正常的细胞经反复传代并培养的方式制备大量的衰老细胞,该方法制备时间长,消耗大量人力物力,且在一个实验周期通常仅能制备一次;而诱导型衰老模型是通过氧化剂、高糖、辐射和药物等

刺激损伤细胞内DNA的方式诱导细胞衰老^[19],通常可在一周内完成建模,且在多种细胞中均有良好效果^[20]。相比之下,诱导型衰老模型更适合本研究中的细胞类型。H₂O₂作为一种小分子物质,具有相对较低的生物反应性并能跨膜扩散,由于其本身的强氧化性,会在短时间内提高细胞中ROS水平,诱发细胞衰老,利用该氧化剂诱导构建的衰老模型的衰老率不仅与其他诱导剂如D-半乳糖等模型相比更高,

且细胞衰老状态与细胞正常复制形成的复制型衰老模型展现出相似性^[20]。因此本研究最终采用H₂O₂来构建鹿茸软骨原代细胞衰老模型。

细胞衰老程度的检测指标众多,由于SA-β-Gal在各种类型的衰老细胞中均会特异性的积累^[20],其在pH 6.0的条件下细胞内的SA-β-Gal酶可催化底物X-Gal(5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖苷)水解,最终在细胞内生成不溶性的蓝色产物。因此,SA-β-Gal染色是检测细胞衰老最广泛、最基本的指标之一^[21],并且可以通过该指标将各类细胞衰老模型进行对比。

*TP53*作为细胞内关键的肿瘤抑制因子,在调控细胞衰老与凋亡过程中起着重要作用,*TP53-P21*轴也是细胞衰老涉及的主要信号通路之一^[22]。有研究表明,*TP53*在氧化应激反应中参与了许多氧化应激调节基因的转录^[23]。在氧化应激引起DNA损伤的过程中,信号分子启动*TP53*磷酸化,转录激活下游*P21*基因,*P21*是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,通过抑制cyclin E1/E2-CDK2的活性,阻止参与细胞周期调控的细胞因子活化,引起细胞周期阻滞,最终诱发细胞衰老^[24]。Xu *et al.*^[25]关于H₂O₂介导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)衰老的研究证实,*TP53/P21*途径能够促使细胞衰老;此外,Wei *et al.*^[26]在H₂O₂诱导人原代成纤维细胞(NHFs)衰老的实验中证明,*TP53/P21*通路是氧化应激致细胞衰老的核心通路。在本研究中,鹿茸软骨原代细胞内同样通过*TP53*的上游转录调控,进而改变*TP53*蛋白的稳定性,延长该蛋白因子的半衰期,同时引起*P21*基因的高表达,从而抑制与细胞周期相关蛋白的活性,诱发细胞衰老。与其他类型的细胞衰老模型(如辛伐他汀(Simvastatin)衰老模型)相比,虽然二者均通过*TP53/P21*通路调控细胞衰老,且在转录水平上二者*TP53*、*P21*基因的表达水平差异倍数几乎一致,但在蛋白水平上,辛伐他汀衰老模型中*TP53*、*P21*蛋白的表达量与对照组无显著差异^[27];而在本研究的H₂O₂衰老模型中,*TP53*、*P21*蛋白的表达量均较对照组展现出了显著的差异性。

细胞衰老是绝大部分细胞都无法避免的过程,本研究通过H₂O₂处理原代鹿茸软骨细胞,诱导原代鹿茸软骨细胞衰老,并对模型中的各项衰老相关指标进行检测,筛选出400 μmol/L H₂O₂半数效应浓度,该浓度下细胞SA-β-GAL阳性率较高,故以此浓度构

建衰老模型。在该模型下,细胞生长速度减缓,衰老特征明显,且衰老相关标志物*TP53*、*P21*的转录表达与蛋白表达量均显著上调。综上所述,本研究利用H₂O₂诱导再生马鹿鹿茸软骨细胞构建出的衰老模型稳定可靠,可用于进行后期衰老和再生机制研究。

参考文献:

- [1] SHMULEVICH R, KRIZHANOVSKY V. Cell senescence, DNA damage, and metabolism [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2021, 34(4): 324-334.
- [2] HUANG W J, HICKSON L J, EIRIN A, *et al.* Cellular senescence: The good, the bad and the unknown [J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2022, 18(10): 611-627.
- [3] TRAXLER L, LUCCIOLA R, HERDY J R, *et al.* Neural cell state shifts and fate loss in ageing and age-related diseases [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2023, 19(7): 434-443.
- [4] LIU Z P, LI W, GENG L L, *et al.* Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor [J]. *Cell Discovery*, 2022, 8: 6.
- [5] DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, *et al.* Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(2): 75-95.
- [6] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, *et al.* ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 3565127.
- [7] SRINIVAS U S, TAN B W Q, VELLAYAPPAN B A, *et al.* ROS and the DNA damage response in cancer [J]. *Redox Biology*, 2019, 25: 101084.
- [8] MOLONEY J N, COTTER T G. ROS signalling in the biology of cancer [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018, 80: 50-64.
- [9] FITZGERALD A L, OSMAN A A, XIE T X, *et al.* Reactive oxygen species and p21^{Waf1/Cip1} are both essential for p53-mediated senescence of head and neck cancer cells [J]. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(3): e1678.
- [10] EMING S A, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation [J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(265): 265sr6.
- [11] SU H, TANG X L, ZHANG X C, *et al.* Comparative proteomics analysis reveals the difference during antler regeneration stage between red deer and sika deer [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7299.
- [12] CHEN Y X, ZHANG Z X, ZHANG J J, *et al.* RNA sequencing-based identification of microRNAs in the antler cartilage of Gansu red deer (*Cervus elaphus kansuensis*) [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13947.
- [13] WU Z M, QU J, LIU G H. Roles of chromatin and genome instability in cellular senescence and their relevance to ageing and related diseases [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,

- 2024, 25(12): 979–1000.
- [14] LI C Y, CLARK D E, LORD E A, *et al.* Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery [J]. *The Anatomical Record*, 2002, 268 (2): 125–130.
- [15] 吴尽. 鹿茸源 microRNA PC-5p-1090 功能、调控机制及转化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023.
- WU J. Functional, regulatory mechanisms, and translational research of antler-derived microRNA PC-5p-1090 [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2023.
- [16] FU B W, SHEN J L, ZOU X N, *et al.* Matrix stiffening promotes chondrocyte senescence and the osteoarthritis development through downregulating *HDAC3* [J]. *Bone Research*, 2024, 12: 32.
- [17] GENG N N, FAN M T, KUANG B, *et al.* 10-hydroxy-2-decenoic acid prevents osteoarthritis by targeting aspartyl β hydroxylase and inhibiting chondrocyte senescence in male mice preclinically [J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 7712.
- [18] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: An overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763–782.
- [19] SCHUMACHER B, POTHOF J, VIJG J, *et al.* The central role of DNA damage in the ageing process [J]. *Nature*, 2021, 592 (7856): 695–703.
- [20] WANG Z, WEI D D, XIAO H Y. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1048: 135–144.
- [21] ASHRAF H M, FERNANDEZ B, SPENCER S L. The intensities of canonical senescence biomarkers integrate the duration of cell-cycle withdrawal [J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 4527.
- [22] EL MAÏ M, MARZULLO M, DE CASTRO I P, *et al.* Opposing *p53* and *mTOR/AKT* promote an *in vivo* switch from apoptosis to senescence upon telomere shortening in zebrafish [J]. *eLife*, 2020, 9: e54935.
- [23] ENGELAND K. Cell cycle regulation: *p53-p21-RB* signaling [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2022, 29(5): 946–960.
- [24] WANG L Q, LANKHORST L, BERNARDS R. Exploiting senescence for the treatment of cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2022, 22(6): 340–355.
- [25] XU J X, TANG M L, LU Z F, *et al.* A novel role for *YPEL2* in mediating endothelial cellular senescence *via* the *p53/p21* pathway [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2023, 211: 111803.
- [26] WEI Z, GUO H Y, LIU Z J, *et al.* *CUL4B* impedes stress-induced cellular senescence by dampening a *p53*-reactive oxygen species positive feedback loop [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 79: 1–13.
- [27] DE LIMA BARBOSA GUTERRES F A, MARTINEZ G R, ROCHA M E M, *et al.* Simvastatin rises reactive oxygen species levels and induces senescence in human melanoma cells by activation of *p53/p21* pathway [J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319(19): 2977–2988.