DOI:10.16016/j.1000-5404.202012240

人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖所致小鼠心肌损伤的保护作用

李 赓,汪子铃,侯吉颖,黄彩虹,肖含先之,曾 娣,姜 蓉,王 璐,王亚平 400016 重庆,重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,基础医学院组织学与胚胎学教研室

[**摘要**] **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)所致小鼠心肌损伤的保护作用和初步机制。**方法** C57BL/6J 小鼠按抽签法随机分为 4 组,每组 10 只。D-gal 损伤模型组:给小鼠腹腔注射 D-gal(200 mg·kg^{-1}·d^{-1}×42 d);Rg1 干预模型组:按 D-gal 损伤模型组小鼠处理,从建模第 16 天起腹腔注射 Rg1(40 mg·kg^{-1}·d^{-1}×26 d);对照组:腹腔注射等量生理盐水 42 d;Rg1 对照组:按对照组处理小鼠 16 d,再腹腔注射 Rg1(剂量同 Rg1 干预模型组)。各组处理完成后第 2 天,取心脏测定脏器指数;石蜡切片,HE 染色观察心肌组织病理学,透射电镜观察心肌纤维超微结构;酶标比色法检测心肌组织匀浆中谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)表达量;Western blot 检测心肌组织中 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达。**结果** D-gal 损伤模型组小鼠心脏指数明显升高($P<0.01$);心肌纤维间胶原纤维沉积量增加;肌原纤维束排列紊乱,心肌纤维直径显著增大,线粒体形态异常伴有肿胀;心肌组织的 AST、LDH 活力显著升高,T-SOD、CAT 活性显著降低,MDA 表达量显著升高($P<0.05$);Nrf2、HO-1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$),Keap1 蛋白表达量无显著变化。Rg1 干预模型组小鼠心脏指数明显降低($P<0.01$);胶原纤维沉积量减少,肌原纤维束排列较为整齐,心肌纤维直径与正常对照组相比无统计学差异,线粒体形态基本正常,无明显肿胀;AST、LDH 活力显著降低,T-SOD、CAT 活性显著升高,MDA 表达量显著降低($P<0.05$);Nrf2、HO-1 蛋白表达量显著升高,Keap1 蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。**结论** Rg1 能有效拮抗 D-gal 对小鼠心肌组织结构和超微结构的损伤,其机制可能与抑制氧化应激和上调 Nrf2 抗氧化信号通路有关。

[**关键词**] 人参皂苷 Rg1;D-半乳糖;心肌;氧化应激损伤;Nrf2 信号通路

[**中图法分类号**] R285.5; R542.2; R589.1 [**文献标志码**] A

Protective effects of ginsenoside Rg1 on cardiac muscle of aging mice induced by D-galactose

LI Geng, WANG Ziling, HOU Jiying, HUANG Caihong, XIAO Hanxianzhi, ZENG Di, JIANG Rong, WANG Lu, WANG Yaping Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Collge of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effects and primary mechanism of ginsenoside Rg1 on cardiac muscle of aging mice induced by D-galactose (D-gal). **Methods** C57BL/6 J mice were randomly divided into normal control, model, Rg1 intervention and negative control groups, with 10 animals in each group. D-gal (200 mg/kg) was injected intraperitoneally to the mice for 42 d to establish the model group, and the mice of the Rg1 intervention group was given 40 mg/kg Rg1 per day for 26 d intraperitoneally from the 16th day of model establishment. The mice of the normal control group were given same amount of normal saline for 42 d, and those of the negative control group were treated with normal saline after model establishment. On the 2nd day after treatment, the hearts were taken to measure the organ index. HE staining

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81673748,81873103)

[**通信作者**] 王亚平,E-mail:ypwangcq@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and transmission electron microscopy were performed to observe the morphology and micro-structures of the heart tissue from each group. The activities of aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT) and contents of malondialdehyde (MDA) in the myocardial tissue homogenate were tested by enzyme-labeled colorimetry; The expression levels of Nrf2, Keap1 and HO-1 in the heart tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the model group had significantly increased heart index ($P<0.01$); larger amount of deposited collagen fibers between myocardial fibers, disordered myofibril bundles, thicker myocardial fibers, and abnormally swollen mitochondria; enhanced AST and LDH activities, declined T-SOD and CAT activities, and increased MDA content ($P<0.05$); remarkably down-regulation of Nrf2 and HO-1 ($P<0.05$), and no changed Keap1 level. While in the Rg1 intervention group, all the above phenomena were greatly improved after the intervention, with obviously decreased heart index ($P<0.01$), not notable morphological changes with normal control mice, reversed AST, LDH, T-SOD and CAT activities and MDA contents ($P<0.05$), and elevated protein levels of Nrf2 and HO-1, and decreased level of Keap1 ($P<0.01$). **Conclusion** Rg1 effectively alleviates the damage of D-gal to the morphology and ultrastructure of mouse myocardium, and its mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress and the up-regulation of the Nrf2 antioxidant signal pathway.

[**Key words**] ginsenoside Rg1; D-galactose; myocardium; oxidative stress injury; Nrf2 signal pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81673748, 81873103). Corresponding author: WANG Yaping, E-mail: ypwangcq@aliyun.com

心血管疾病是老年人群的主要疾患之一,也是主要死亡因素之一[1]。D-半乳糖(D-galactose,D-gal)是公认的氧化致衰剂,已经广泛用于动物衰老模型与体外细胞衰老模型的构建。D-gal 构建动物衰老模型可致机体多种器官出现氧化应激损伤[2-3]。我们既往研究显示,人参皂苷 Rg1 是中医临床"补气要药"人参的重要抗衰老成分,它能拮抗 D-gal 所致的脑、肝脏、肾脏和生殖腺等多个器官的氧化应激损伤[4-5]。有研究证明[6-7],人参皂苷 Rg1 对心脑血管疾病和心肌细胞损伤有良好的预防作用,但其机制尚不清楚。本研究采用 D-gal 构建小鼠心脏损伤模型,探讨人参皂苷 Rg1 拮抗 D-gal 所致小鼠心脏损伤的保护作用及其激活 Nrf2 抗氧化信号通路的初步机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 C57BL/6J 小鼠,体质量 15~20 g,雌雄各半,由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)2007-0001]。

1.2 材料与试剂

人参皂苷 Rg1(成都曼思特生物科技有限公司,纯度>99%);D-半乳糖(上海麦克林生化科技有限公司,纯度>99%);BCA 蛋白浓度测定试剂盒与超氧化物歧化酶试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST/GOT)与乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(南京建成科技有限公司);兔单克隆抗体 Nrf2、兔单克隆抗体 Keap1、兔单克隆抗体 HO-1、β-actin 鼠单克隆抗体、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗(Signaling 公司)。

1.3 D-gal 损伤小鼠模型构建与分组给药

小鼠按抽签法随机分为 4 组,每组 10 只。D-gal 损伤模型组[8]:腹腔注射 D-gal(200 mg·kg^{-1}·d^{-1}×42 d);Rg1 干预模型组:按 D-gal 损伤模型组小鼠处理,从建模第 16 天起腹腔注射 Rg1(40 mg·kg^{-1}·d^{-1}×26 d);对照组:腹腔注射等量生理盐水 42 d;Rg1 对照组:按对照组处理小鼠 16 d,再腹腔注射 Rg1(剂量同 Rg1 干预模型组)。建模与给药完成后第 2 天检测相关指标。

1.4 小鼠生物学表现观察

损伤造模过程中每天观察记录各组小鼠生物学表现(包括小鼠精神状态、活动能力、毛色、饮食与饮水量、大便情况等,并测定体质量)。

1.5 心脏指数测定

建模与给药完成后第 2 天称体质量(g),颈椎脱臼处死小鼠,快速取出心脏称湿质量(g),心脏指数=心脏湿质量(mg)/体质量(g)。

1.6 心脏组织学病理学观察

5%多聚甲醛溶液固定心脏,常规方法制备石蜡切

片,HE 染色,光学显微镜下观察心肌组织结构变化,Masson 染色观察胶原纤维沉积。每组随机选取 5 个视野,Image-Pro Plus 图像分析软件进行细胞直径测量与心肌纤维间胶原纤维量计算。

1.7 心肌超微结构观察

取各组小鼠左心室心尖部组织,2.5%戊二醛固定液前固定 24 h,1%四氧化锇后固定 2 h。乙醇与丙酮梯度脱水、Epon812 树脂包埋,制成 50~70 nm 的超薄切片,醋酸双氧铀和硝酸铅电子染色,透射电镜下观察心肌纤维超微结构变化。

1.8 心肌酶测定与心肌氧化和抗氧化指标测定

取各组小鼠适量心脏组织制备 10%组织匀浆,3 500 r/min 离心 10 min,收集上清液。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各组上清液的蛋白浓度,按 AST、LDH(n=5),MDA、T-SOD、CAT(n=6)检测试剂盒说明书进行相关检测并分析数据。

1.9 心脏组织中 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达量检测

取冷冻心脏组织制备蛋白样品,BCA 蛋白浓度试剂盒检测各组蛋白浓度。蛋白定量后调整其浓度,按 30 μg/泳道加样。SDS-PAGE 凝胶分离,PVDF 膜进行转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h。兔抗 Nrf2(1∶1 000)、兔抗 Keap1(1∶1 000)、兔抗 HO-1(1∶1 000)、鼠抗 β-actin(1∶1 000),4 ℃孵育过夜,山羊抗鼠二抗(1∶10 000)、山羊抗兔二抗(1∶10 000)室温摇床孵育 2 h,洗膜,ECL 发光液显色,Image J 软件计算目的蛋白与内参蛋白 β-actin 比值。

1.10 统计学分析

用 GraphPad Prism 统计软件进行分析和作图,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生物学动态情况

随着注射 D-gal 时间和累计剂量增加,D-gal 损伤模型组小鼠毛发逐渐粗糙,毛色晦暗,精神萎靡,活动能力下降,进食较少,大便稀溏,体质量增加缓慢,其余 3 组无明显不良体征。

2.2 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏质量及心脏指数影响

D-gal 损伤模型组小鼠心脏指数明显升高,Rg1 干预模型组心脏指数明显降低($P<0.01$,表 1)。

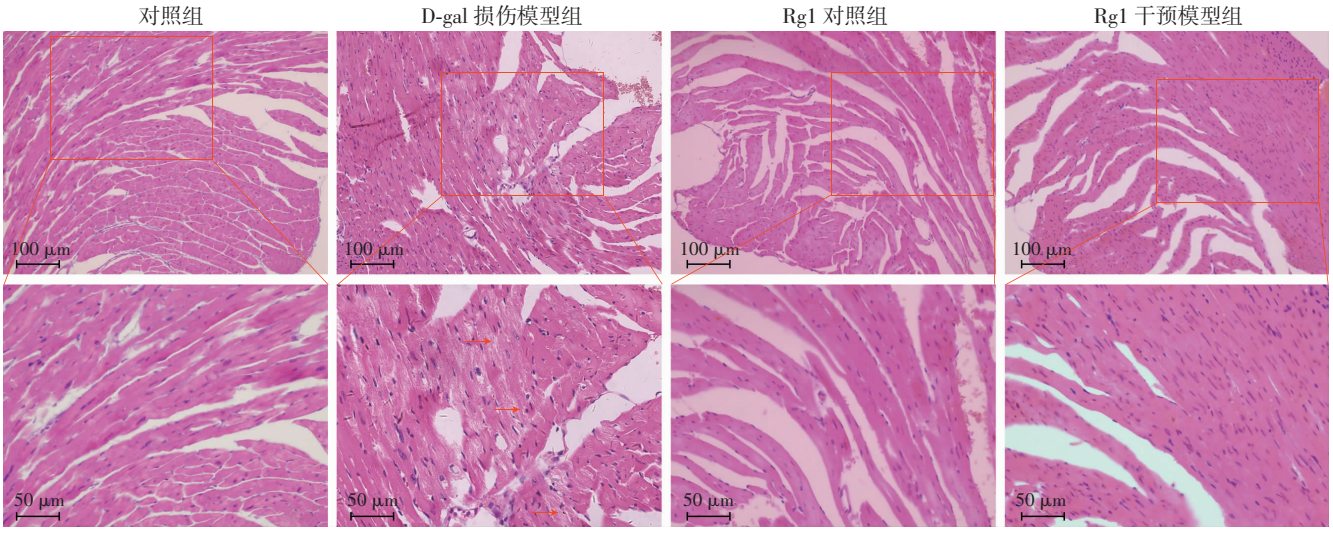
表 1 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏质量及心脏指数的影响($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	心脏湿质量/g	体质量/g	心脏指数
对照组	0.095 7±0.000 9	20.390±0.217	4.695±0.031
D-gal 损伤模型组	0.100 7±0.001 2	20.290±0.172	4.965±0.066[a]
Rg1 对照组	0.096 5±0.001 2	20.950±0.196	4.606±0.032[b]
Rg1 干预模型组	0.096 1±0.001 4	20.310±0.207	4.731±0.031[b]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 D-gal 损伤模型组比较

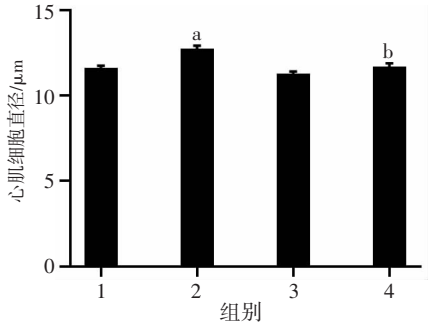
2.3 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心肌组织病理学影响

对照组心肌纤维排列整齐,形态正常,胞质染色均匀;D-gal 损伤模型组小鼠心肌纤维排列紊乱,心肌纤维直径增大($P<0.01$),胞质染色不均,心肌纤维肿胀,部分心肌纤维断裂和坏死;注射 Rg1 干预后,心肌纤维直径增大不明显,心肌纤维排列和形态基本正常(图 1、2)。



箭头示受损的心肌纤维

图 1 HE 染色观察 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心肌组织的影响



1:对照组;2:D-gal 损伤模型组;3:Rg1 对照组;4:Rg1 干预模型组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 D-gal 损伤模型组比较

图 2 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心肌细胞直径的影响

2.4 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏纤维超微结构的影响

对照组超微结构形态正常,表现为肌丝束排列整齐,肌节明带、暗带、Z 线、M 线等结构完整,线粒体排列整齐。D-gal 损伤模型组心肌肌丝束排列紊乱,肌节及明暗带结构不清楚,心肌纤维部分线粒体嵴断裂,基质肿胀,排列不齐;Rg1 干预后,心肌纤维损伤明显减轻,胶原纤维沉积减少(图 3)。

2.5 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏胶原纤维沉积的影响

对照组无明显胶原纤维沉积;D-gal 损伤模型组胶原纤维沉积增多;Rg1 干预后,胶原纤维沉积明显减少(图 4)。

2.6 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏组织心肌酶谱的影响

D-gal 损伤模型组 AST 活力显著增加($P<0.05$),LDH 活力显著增加($P<0.01$);Rg1 干预模型组 AST、LDH 活力显著降低($P<0.05$,表 2)。

表 2 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏组织匀浆中 AST 和 LDH 的影响($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

组别	AST/U·g^{-1}	LDH/U·g^{-1}
对照组	14.84±2.42	3 278.3±176.4
D-gal 损伤模型组	18.56±1.55^{a}	3 878.9±252.2^{b}
Rg1 对照组	15.43±1.18^{d}	3 219.3±232.6^{d}
Rg1 干预模型组	15.54±1.49^{c}	3 440.5±117.9^{c}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 D-gal 损伤模型组比较

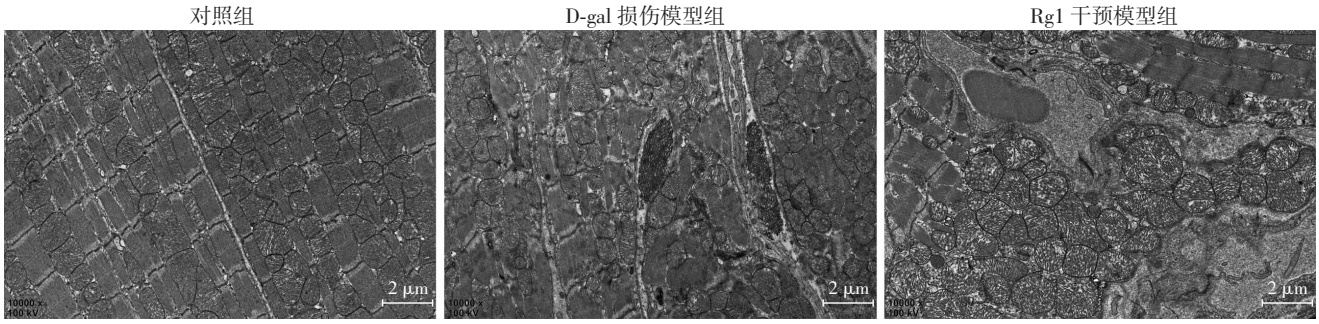
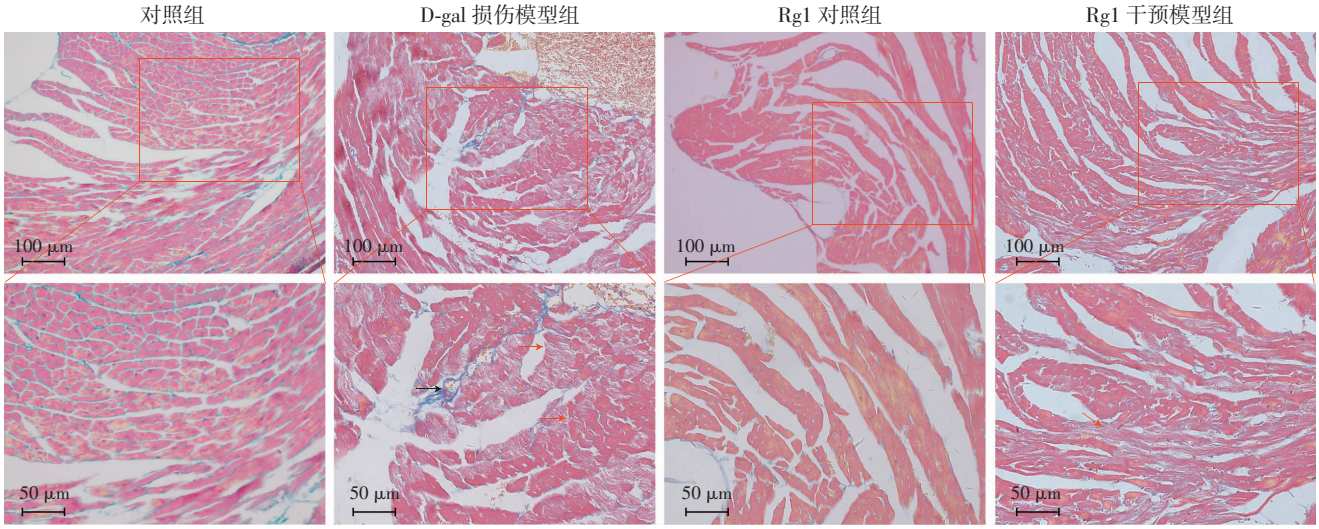


图 3 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心肌纤维超微结构的影响



红色箭头示受损的心肌纤维,黑色箭头示胶原纤维沉积

图 4 Masson 染色观察 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏胶原纤维沉积的影响

2.7 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏组织氧化与抗氧化损伤的影响

D-gal 损伤模型组 T-SOD 活性显著降低($P<0.05$),MDA 含量显著增加,CAT 活性显著降低($P<0.01$);Rg1 干预模型组 T-SOD、CAT 活性较损伤模型组显著增加,MDA 含量显著降低($P<0.05$,表 3)。

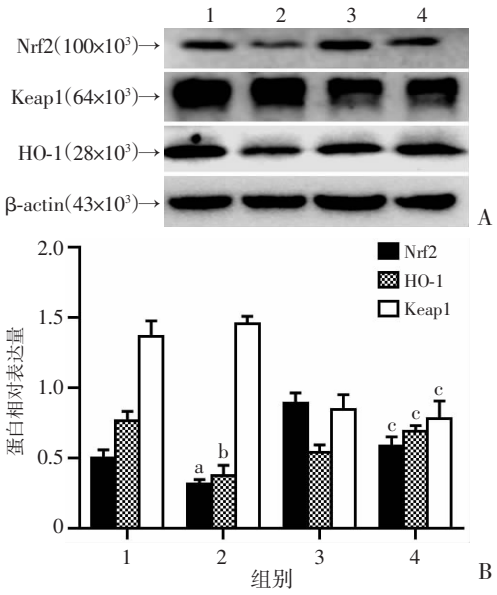
表 3 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏组织匀浆中 T-SOD、CAT 及 MDA 的影响($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	T-SOD/U·mg^{-1}	CAT/U·mg^{-1}	MDA/μmol·mg^{-1}
对照组	95.29±3.54	50.84±4.13	1.28±0.05
D-gal 损伤模型组	84.07±2.60^{a}	23.31±5.89^{b}	1.51±0.03^{b}
Rg1 对照组	102.60±3.97^{d}	60.47±6.86^{d}	1.26±0.09^{c}
Rg1 干预模型组	97.55±4.31^{c}	49.88±8.89^{c}	1.32±0.06^{c}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 D-gal 损伤模型组比较

2.8 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏组织 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与对照组相比,D-gal 损伤模型组 Nrf2 表达量明显降低($P<0.05$),HO-1 的表达量明显降低($P<0.01$),Keap1 表达量无明显变化;Rg1 干预后,Nrf2、HO-1 表达量明显升高,Keap1 表达量明显降低($P<0.01$,图 5)。



1:对照组;2:D-gal 损伤模型组;3:Rg1 对照组;4:Rg1 干预模型组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与 D-gal 损伤模型组比较

图 5 Rg1 对 D-gal 损伤小鼠心脏组织 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达的影响

3 讨论

随着年龄的增长,心脏逐渐出现器官水平和细胞水平的退行性改变,从而诱发冠心病、心力衰竭等与心脏衰老相关疾病。人参是中医临床补气要药,人参皂苷 Rg1 是人参重要的抗衰老单体成分,具有抗氧化应激损伤和延缓细胞衰老作用[4-5]。本研究采用 D-半乳糖(D-gal)构建小鼠损伤模型,探讨人参皂苷 Rg1 拮抗 D-gal 对心脏的氧化损伤作用与激活 Nrf2 抗氧化信号通路的初步机制。

D-gal 是一种公认的氧化致衰剂,用其构建的衰老动物模型与自然衰老相似,已被广泛用于抗衰老药物的研究[9]。研究证明[10],D-gal 对组织细胞有明确的致衰作用,对心脏具有氧化应激损伤作用。脏器指数测定和组织病理学观察可反映器官结构的变化,本实验结果表明,随着注射 D-gal 时间和累计剂量增加,损伤模型组小鼠脏器指数明显增加;组织病理学和超微结构观察显示,D-gal 可致心肌排列紊乱,心肌纤维出现退行性损伤,心肌纤维的线粒体肿胀,形态异常;胶原纤维沉积量增多,提示 D-gal 能造成心脏结构损伤。在建立损伤模型中注射 Rg1 干预进程,结果证明,心脏指数显著降低,心肌组织结构和超微结构损伤明显减轻;胶原纤维沉积量也明显减少,说明 Rg1 能拮抗 D-gal 对心脏结构的损伤。

心肌特异性酶检测是评价心肌损伤的重要指标,当心肌纤维损伤坏死时,细胞膜通透性增强时,大量心肌酶将释放入血液,通过测定心肌酶水平有助于诊断心肌损伤程度[11]。本研究结果表明,D-gal 损伤模型组小鼠心肌组织匀浆中谷草转氨酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)活力显著上升,Rg1 干预后 AST 和 LDH 活力均显著降低,这进一步证明 Rg1 有明确保护心脏作用。氧化应激学说是细胞损伤的主要学说;细胞内含有大量的抗氧化物质,如 SOD 能将细胞内的超氧化物自由基转化为过氧化氢和分子氧,而 CAT 能将过氧化氢转化为水,通过这种方式以可防止或修复由超氧化物自由基和过氧化氢引起的细胞损伤[12-13]。丙二醛(MDA)是脂质过氧化作用的稳定最终产物,是间接测量脂质过氧化作用的指标之一[14]。本研究结果表明,D-gal 损伤模型小鼠的心肌组织匀浆中 T-SOD、CAT 活性显著降低,MDA 表达量显著升高,采用 Rg1 干预后,T-SOD、CAT 活性显著升高,MDA 表达量显著降低。以上结果提示 Rg1 拮抗 D-gal 对小鼠心脏损伤的机制与降低氧化应激有关。

研究证明[15] Keap1/Nrf2/ARE 信号通路是重要的抗氧化应激通路。正常情况时,Nrf2 处于非活化状态,与 Keap1 结合于细胞质内;氧化应激时,Keap1 中的

-SH 基团的修饰和 Nrf2 的磷酸化促进了 Nrf2 与 Keap1 解离并易位到核中,Nrf2 结合 Maf 蛋白后,激活抗氧化剂反应元件(ARE)并增加 Nrf2 调控基因 HO-1 的转录,发挥抗氧化的作用[16]。本研究结果表明,D-gal 损伤模型小鼠心脏组织匀浆中 Nrf2、HO-1 蛋白表达量显著减少,Rg1 干预后,Nrf2、HO-1 表达量明显增加,Keap-1 表达量明显减少,提示 Rg1 拮抗 D-gal 对小鼠心脏氧化损伤可能与激活 Keap1-Nrf2-ARE 通路相关。

综上所述,Rg1 的干预能有效拮抗 D-gal 对心肌的损伤,其机制可能是 Rg1 抑制 D-gal 对心脏的氧化应激损伤,以及上调了 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路。

参考文献:

[1] FAJEMIROYE J O, DA CUNHA L C, SAAVEDRA-RODRÍGUEZ R, *et al*. Aging-induced biologi-cal changes and cardiovascular diseases[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018:7156435. DOI: 10.1155/2018/7156435.

[2] 侯吉颖, 陈雄斌, 陈鄴波, 等. D-半乳糖诱导大鼠骨髓基质细胞衰老及其机制[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(3): 307-312. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2017.03.003.
HOU J Y, CHEN X B, CHEN L B, *et al*. Senescence induced by D-galactose and its biological mechanism in rat bone marrow stromal cells[J]. Basic Clin Med, 2017, 37(3): 307-312. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2017.03.003.

[3] LI J, CAI D, YAO X ,*et al*. Protective effect of Ginsenoside Rg1 on hematopoietic stem/progenitor cells through attenuating oxidative stress and the Wnt/β-catenin signaling pathway in a mouse model of d-Galactose-induced aging[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6):849. DOI: 10.3390/ijms17060849.

[4] 向玥, 陈鄴波, 姚辉, 等. 人参皂苷 Rg1 对 D-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3789-3795. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.019.
XIANG Y, CHEN L B, YAO H, *et al*. Protective mechanism of ginsenoside Rg1 on Hippocampus of aging mice induced by D-galactose[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(18): 3789-3795. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.019.

[5] ZHU J, MU X, ZENG J, *et al*. Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and Hippocampus senescence in a rat model of D-galactose-induced aging[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e101291. DOI:10.1371/journal.pone.0101291.

[6] TANG F, LU M, YU L, *et al*. Inhibition of TNF-α-mediated NF-κB activation by ginsenoside Rg1 contributes the attenuation of cardiac hypertrophy induced by abdominal aorta coarctation[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2016, 68: 257-264. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000410.

[7] DONG G, CHEN T, REN X,*et al*. Rg1 prevents myocardial hypoxia/reoxygenation injury by regulating mitochondrial dynamics imbalance *via* modulation of glutamate dehydrogenase and mitofusin 2[J]. Mitochondrion, 2016, 26:7-18. DOI: 10.1016/j.mito.2015.11.003.

[8] EL-BAZ F K, SALEH D O, ABDEL JALEEL G A, *et al*. Heamatococcus Pluvialis ameliorates bone loss in experimentally-induced osteoporosis in rats *via* the regulation of OPG/RANKL pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 116: 109017. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109017.

[9] HO S C, LIU J H, WU R Y, *et al*. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose[J]. Biogerontology, 2003, 4(1): 15-18. DOI: 10.1023/a:1022417102206.

[10] BO-HTAY C, PALEE S, APAIJAI N, *et al*. Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1392-1410. DOI:10.1111/jcmm.13472.

[11] WANG R, WANG M, ZHOU J, *et al*. Shuxuening injection protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through reducing oxidative stress, inflammation and thrombosis[J]. Ann Transl Med, 2019,7(20):562. DOI: 10.21037/atm.2019.09.40.

[12] WEYDERT C J, CULLEN J J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue[J]. Nat Protoc, 2010, 5(1): 51-66. DOI:10.1038/nprot.2009.197.

[13] LIU B H, MA R D, ZHANG J, *et al*. Preventive effect of small-leaved Kuding tea (Ligustrum robustum (roxb.) bl.) polyphenols on D-galactose-induced oxidative stress and aging in mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 3152324. DOI:10.1155/2019/3152324.

[14] MAO C, YUAN J Q, LV Y B, *et al*. Associations between superoxide dismutase, malondialdehyde and all-cause mortality in older adults: a community-based cohort study[J]. BMC Geriatr, 2019, 19(1):104. DOI: 10.1186/s12877-019-1109-z.

[15] 段懿涵, 盛瑜, 徐健, 等. 姬松茸多糖对 D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠的抗衰老作用及其 Keap1/Nrf2/ARE 信号转导途径机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(2): 346-351, 435. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20200223.
DUAN Y H, SHENG Y, XU J, *et al*. Anti-aging effects of Agaricus blazei polysaccharide in D-galactose-induced aging model mice and Keap1/Nrf2/ARE signal transduction pathway mechanism[J]. J Jilin Univ Med Ed, 2020, 46(2): 346-351,435. DOI:10.13481/j.1671-587x.20200223.

[16] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, *et al*. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(5): 721-733. DOI:10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

(**收稿**:2020-12-30;**修回**:2021-02-07)
(编辑 张 维)