doi:10.11659/jjssx.02E024034

·基础研究·

核桃分心木总皂苷改善大鼠睾丸功能的机制研究

刘 鹏[1],王 震[1],王 英[1],胡本祥[2] (1.商洛职业技术学院医学院,陕西 商洛 726000;2.陕西中医药大学药学院,陕西 咸阳 712000)

[摘 要] **目的** 探讨核桃分心木(DJF)总皂苷对大鼠睾丸功能的改善作用及可能机制。**方法** 将50只SD雄性大鼠随机分为NC组、MG模型组(MG组)、DJF低剂量组(LDJF组)、DJF中剂量组(MDJF组)和DJF高剂量组(HDJF组),每组10只;NC组每日皮下注射生理盐水500 mg/kg,其余各组连续8周每日皮下注射D-半乳糖500 mg/kg以建立亚急性衰老大鼠模型。皮下注射4周时,LDJF组、MDJF组、HDJF组大鼠分别给予100 mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg的DJF总皂苷提取物灌胃,NC组和MG组大鼠分别给予100 mg/kg生理盐水灌胃,共连续28 d。称量各组大鼠体质量,分析各组大鼠睾丸指数及精子参数,并观察大鼠睾丸组织形态学变化;检测各组大鼠血清中睾酮及氧化因子超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;Western blot检测相关蛋白表达。**结果** 与NC组相比,MG组大鼠睾丸重量、睾丸指数、血清睾酮、SOD水平及精子密度、存活率、活动度下降,MDA水平升高,睾丸组织中Nrf2和HO-1蛋白表达下调,p53和p21蛋白表达则上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与MG组相比,HDJF组大鼠睾丸重量、睾丸指数、血清睾酮、SOD水平及精子密度、存活率、活动度升高,MDA水平下降,睾丸组织中Nrf2和HO-1蛋白表达上调,p53和p21蛋白表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$);LDJF组、MDJF组上述指标与MG组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与NC组相比,MG组大鼠睾丸组织生精细胞排列紊乱,细胞数量减少,曲细精管管腔内精子数量明显减少;与MG组相比,给予DJF总皂苷干预后,大鼠睾丸组织形态有所改善,精子数量有所增加,以HDJF组大鼠改善最为明显。**结论** DJF总皂苷能有效改善大鼠睾丸功能衰退,这可能与激活Nrf2/HO-1通路,增强抗氧化应激水平,抑制衰老相关蛋白表达有关。

[关键词] 核桃分心木;总皂苷;D-半乳糖;衰老;睾丸功能,Nrf2/HO-1通路

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-02-19

Study on the mechanism of total saponins of diaphragma juglandis fructus improving testicular function in rats

LIU Peng[1], WANG Zhen[1], WANG Ying[1], HU Ben-xiang[2] (1.Shangluo Vocational and Technical College Medical School, Shangluo Shaanxi 726000, China; 2.College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of total saponins of diaphragma juglandis fructus (DJF) on testicular function in rats and its possible mechanism. **Methods** Fifty SD male rats were randomly divided into NC group, MG model group (MG group), DJF low-dose group (LDJF group), DJF medium-dose group (MDJF group) and DJF high-dose group (HDJF group), with 10 rats in each group. The NC group was given daily subcutaneous injection of normal saline 500 mg/kg, and the other groups were given daily subcutaneous injection of D-galactose 500 mg/kg for 8 weeks to establish the subacute aging rat model. After 4 weeks of subcutaneous injection, rats of the LDJF group, MDJF group and HDJF group were given 100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg DJF total saponin extract by gavage, respectively, and rats of the NC group and MG group were given 100 mg/kg normal saline by gavage, respectively, for 28 consecutive days. The body weight of rats in each group was measured, the testicular index and sperm parameters of rats in each group were analyzed, and the pathological changes of testicular tissue were observed. The serum levels of testosterone, oxidation factor superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in each group were detected. The expression of related proteins was detected by Western blot. **Results** Compared with the NC group, testicular weight, testicular index, serum testosterone and SOD levels, sperm density, sperm survival rate and sperm activity of rats in MG group were decreased, and MDA level of rats in MG group was increased; the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in testicular tissue of rats in MG group were down-regulated, and the protein expressions of p53 and p21 in testicular tissue of rats in MG group were up-regulated, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the MG group, testicular weight, testicular index, serum testosterone and SOD levels, sperm density, sperm survival rate and sperm activity of rats in HDJF group were increased, and MDA level of rats in HDJF group was decreased; the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in testicular tissue of rats in HDJF group were up-regulated, and the protein expressions of p53 and p21 in testicular tissue of rats in HDJF group were down-regulated, with statistically significant differences ($P<0.05$). There was no significant difference in the above indexes between LDJF group, MDJF group and MG group ($P>0.05$). Compared with the NC group, the

[基金项目] 陕西省重点研发计划项目(2017NY-195)

[通信作者] 王 震,E-mail:Wang_Yg20513@163.com。

arrangement of spermatogenic cells in testicular tissue was disordered, the number of spermatogenic cells was reduced, and the number of spermatozoa in seminiferous tubule was reduced in the MG group. Compared with the MG group, the testicular morphology was improved and the number of spermatozoa was increased after DJF total saponins intervention, and the improvement was most obvious in the HDJF group. **Conclusion** DJF total saponins can effectively ameliorate the decline of testicular functionin in rats, which may be related to activation of Nrf2/HO-1 pathway, enhancement of antioxidant stress level and inhibition of aging-related protein expression.

Keywords: diaphragma juglandis fructus; total saponins; D-galactose; aging; testicular function; Nrf2/HO-1 pathway

随着衰老、生活压力增加、生活方式的改变等，男性睾丸系统机能会发生老化，进而引起性欲减退、抑郁、暴躁等不良情绪，对其身心健康和生活质量造成严重影响[1]。目前衰老的机制尚不清楚，但普遍认为氧化应激损伤是男性生殖器官功能衰退的主要机制之一[2]。核桃分心木(diaphragma juglandis fructus，DJF)作为一味临床常用的中医良药，具有固精止遗、涩精缩尿、止泻治痢等多种药用功效，其主要活性成分皂苷类化合物同样具有较高的药用价值[3]。研究表明，DJF总皂苷具有抗氧化作用，能够很好地清除机体产生的羟基自由基[4]。此外，动物实验证实，DJF总皂苷可抑制D-半乳糖诱导的小鼠衰老[5-7]。然而DJF总皂苷是否能够缓解衰老相关的生殖功能衰退目前尚不清楚。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2)/血红素氧化酶1(hemeoxygenase-1，HO-1)轴是氧化应激中的关键信号通路，Nrf2作为调控抗氧化应激的一种关键转录因子，在诱导机体的抗氧化应答中起着重要调节作用[8-9]；HO-1被认为是一种有效的抗氧化剂，Nrf2可以调节HO-1启动子活性，在维持细胞内氧化还原平衡中发挥着重要作用[10]。Nakamura等[11]的研究显示，敲除Nrf2基因能够加速衰老模型鼠的精子生成障碍。基于既往研究报道结果，本研究通过D-半乳糖皮下注射构建雄性衰老大鼠模型，拟探讨DJF总皂苷对衰老大鼠睾丸功能衰退的影响，以及潜在的分子作用机制，以期为临床改善男性生殖器官功能衰退提供更多理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50只8周龄SD雄性大鼠[使用许可证号：SYXK(陕)2021-003]，体质量为(200±20)g，饲养温度为(25±2)℃，湿度为(55±5)%，每12 h明暗交替，自由饮水和饮食，所有大鼠适应性喂养1周。

1.2 实验试剂及仪器

DJF(云南玉溪)；D-半乳糖(纯度≥99.0%，上海化学试剂总厂)；ELISA试剂盒(上海一研生物科技有限公司)；BCA蛋白定量试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]；Nrf2、HO-1、p21、p53兔抗大鼠抗体(中杉金桥生物技术有限公司)；HRP标记山羊抗兔二抗(美国Cell Signaling Technology公司)。光学显微镜(日本奥林巴斯公司)；低温高速离心机(型号TGL20M，北京白洋离心机有限公司)；酶标仪(型号MK-3，美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DJF总皂苷的提取、纯化 取核桃果核内的分心木，经粉碎机粉碎后过80目筛，称取100 g，置于圆底烧瓶，按1∶20的比例加入75%乙醇，水浴加热回流提取3次，每次2 h，所得提取液混合浓缩至50 mL，得到粗提液，然后稀释、过滤后利用D-101大孔吸附树脂进行分离、纯化，干燥后所得粉末即为DJF总皂苷。

1.3.2 实验建模 将50只SD雄性大鼠适应性喂养1周后，随机分为NC组、MG模型组(MG组)、DJF低剂量组(LDJF组)、DJF中剂量组(MDJF组)和DJF高剂量组(HDJF组)，每组10只。NC组每日皮下注射生理盐水500 mg/kg，其余各组连续8周每日皮下注射D-半乳糖500 mg/kg以建立亚急性衰老大鼠模型。皮下注射4周时，LDJF组、MDJF组、HDJF组大鼠分别给予100 mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg的DJF总皂苷提取物灌胃，NC组和MG组大鼠分别给予100 mg/kg生理盐水灌胃，共连续28 d。

1.3.3 标本采集 实验结束，称量各组大鼠体质量，抽取静脉全血约5 mL，12 000 r/min离心20 min，取上清，-20 ℃保存备用。麻醉并处死所有大鼠，迅速切开阴囊取出睾丸称其湿重，计算睾丸指数(睾丸湿重/体质量)；然后取大鼠左侧睾丸进行HE染色病理观察，取右侧睾丸用于Western blot实验；取附睾尾及输精管分析精子参数。根据大鼠一般状态、睾丸指数、睾酮水平、睾丸组织形态、精子数量及存活率等评估亚急性衰老大鼠建模情况。

1.3.4 血清中睾酮、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)及丙二醛(malondialdehyde，MDA)含量检测 取上述离心后的血清样品，根据ELISA试剂盒步骤检测各组大鼠血清中睾酮及氧化因子SOD、MDA水平。

1.3.5 HE染色观察睾丸组织形态学变化 取大鼠新鲜睾丸组织制成石蜡组织标本,5 μm厚度连续切片,放入烘烤机60 ℃烘干30 min;将切片置入玻片架,依次置入二甲苯中脱蜡2次,每次5 min,梯度乙醇脱水5 min,加入苏木精溶液染色5 min,去除多余染液,加入盐酸乙醇分化30 s使组织返蓝,伊红染液染色2 min,终止染色,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,用中性树胶封片,镜下观察。

1.3.6 精子参数检测 取大鼠附睾尾用眼科剪剪碎,并用细针扎破输精管,置于提前预热至37 ℃的PBS液中,水浴10 min,使精子充分溢出,取10 μL液体滴于载玻片,自然晾干,4%多聚甲醇固定,显微镜下观察精子活力及密度,2%伊红溶液染色2 h后镜检计算精子存活率。

1.3.7 Western blot检测睾丸组织衰老相关蛋白表达 取大鼠睾丸组织加入蛋白裂解液,提取组织总蛋白并检测其浓度,取20 μg蛋白进行凝胶电泳,分离蛋白,转至PVDF膜上,封闭1 h后分别加入Nrf2、HO-1、p21、p53蛋白一抗(1∶1 000)孵育过夜,次日加入相应二抗,室温孵育2 h,缓冲液洗涤3次,暗室曝光、显影,用ImageJ软件分析灰度值。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用*one-way ANOVA*分析,两两比较采用*LSD-t*检验;以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 亚急性衰老大鼠模型的构建

与NC组相比,其余各组大鼠在注射D-半乳糖后状态逐渐变差,表现为毛发发黄、褪毛,皮肤干燥、松弛,活动量减少,精神状态不佳。注射D-半乳糖8周后,无大鼠死亡,待各组大鼠完成体质量称量及采血留样后处死大鼠,观察到与NC组相比,MG组、LDJF组、MDJF组、HDJF组大鼠睾丸指数及睾酮水平明显降低,睾丸组织形态破坏,精子数量减少、存活率降低,提示皮下注射D-半乳糖成功建立了亚急性衰老大鼠模型。

2.2 各组大鼠体质量、睾丸重量、睾丸指数比较

实验结束后称量所有大鼠,各组大鼠体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$);与NC组相比,MG组大鼠的睾丸重量及睾丸指数明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);给予DJF总皂苷干预后,HDJF组大鼠睾丸重量和睾丸指数均较MG组显著增加($P<0.05$),LDJF组、MDJF组与MG组上述指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 各组大鼠体质量、睾丸重量、睾丸指数比较

组别	n	体质量(g)	睾丸重量(g)	睾丸指数($\times10^{-3}$)
NC组	10	472±30.28	1.85±0.63	5.12±0.35
MG组	10	428±19.56	1.27±0.32*	2.97±0.13*
LDJF组	10	436±20.17	1.35±0.29	3.23±0.30
MDJF组	10	453±15.80	1.42±0.37	3.56±0.21
HDJF组	10	474±29.05	1.72±0.44#	4.73±0.19#
F		9.508	23.180	35.427
P		0.430	<0.001	<0.001

*:与NC组比较,$P<0.05$;#:与MG组比较,$P<0.05$

2.3 各组大鼠血清中睾酮、SOD及MDA水平比较

ELISA检测显示,与NC组比较,MG组大鼠血清中睾酮及SOD水平下降,MDA水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与MG组比较,HDJF组大鼠血清中睾酮及SOD水平升高,MDA水平下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);LDJF组、MDJF组与MG组上述指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 各组大鼠血清中睾酮、SOD及MDA水平比较

组别	n	睾酮(nmol/L)	SOD(U/mg)	MDA(U/mg)
NC组	10	8.17±1.04	121.52±11.30	3.32±0.41
MG组	10	3.54±0.84*	75.80±6.18*	6.08±0.72*
LDJF组	10	3.95±0.59	84.02±5.87	5.70±0.53
MDJF组	10	4.17±0.35	91.13±8.05	5.26±0.28
HDJF组	10	6.42±0.55#	115.78±9.60#	3.50±0.47#
F		57.250	80.549	42.672
P		<0.001	<0.001	<0.001

*:与NC组比较,$P<0.05$;#:与MG组比较,$P<0.05$

2.4 各组大鼠睾丸组织形态学观察

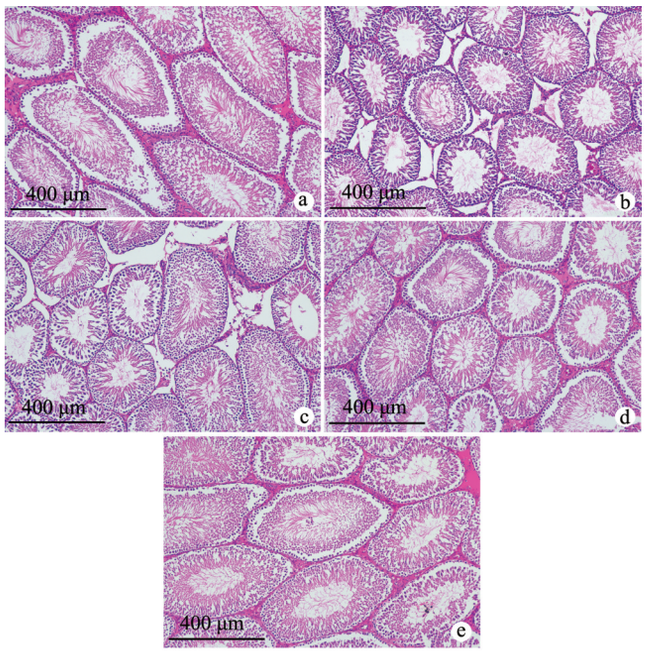
HE染色显示,NC组大鼠睾丸组织结构正常,生精细胞排列整齐,曲细精管中含有大量精子;MG组睾丸组织生精细胞排列紊乱,细胞数量减少,曲细精管管腔内精子数量明显减少;与MG组相比,给予DJF总皂苷干预后,大鼠睾丸组织形态有所改善,精子数量有所增加,以HDJF组大鼠改善最为明显,见图1。

2.5 各组大鼠精子参数比较

检测附睾尾及输精管内精子参数发现,MG组大鼠精子密度、存活率及活动度较NC组下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);与MG组比较,HDJF组大鼠精子密度、存活率及活动度增加,差异均有统计学意义($P<0.05$);LDJF组、MDJF组与MG组上述指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表3。

2.6 各组大鼠睾丸组织衰老相关蛋白表达比较

Western blot结果显示,与NC组比较,MG组大鼠睾丸组织中Nrf2和HO-1蛋白表达下调,p53和p21蛋



a:NC组;b:MG组;c:LDJF组;d:MDJF组;e:HDJF组

图1　HE染色观察各组大鼠睾丸组织形态变化

表3　各组大鼠精子参数比较

组别	*n*	精子密度（×10⁶/mL）	精子存活率（%）	精子活动度（%）
NC组	10	21.40±0.75	67.50±12.14	76.20±0.60
MG组	10	9.72±0.26*	41.35±9.72*	45.15±0.48*
LDJF组	10	11.59±0.17	45.82±10.56	50.66±0.30
MDJF组	10	12.33±0.30	48.15±10.12	56.32±0.41
HDJF组	10	16.83±0.52#	55.27±9.28#	73.10±0.35#
F		9.508	23.180	35.427
P		0.430	<0.001	<0.001

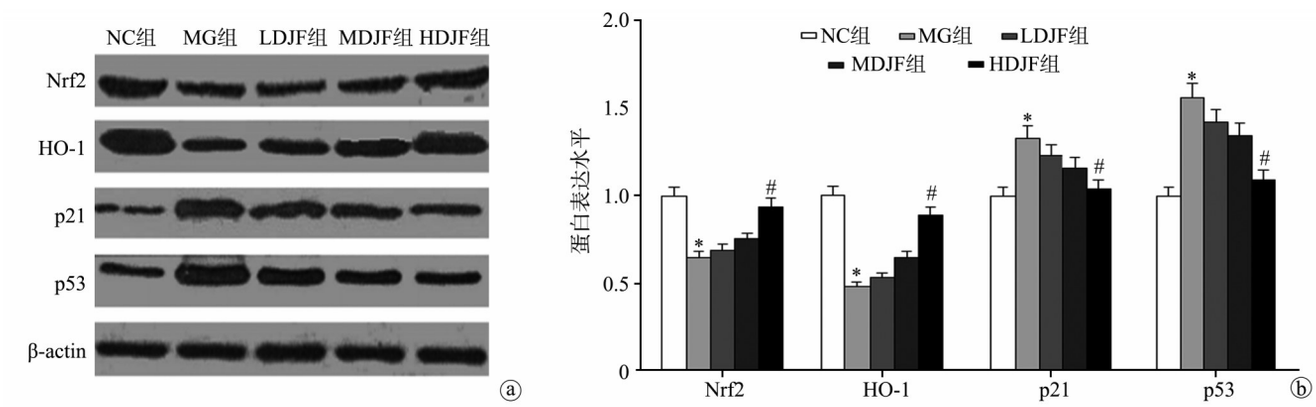
*:与NC组比较,*P*<0.05;#:与MG组比较,*P*<0.05

白表达则上调,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与MG组比较,HDJF组大鼠睾丸组织中Nrf2和HO-1蛋白表达上调,p53和p21蛋白表达则下调,差异均有统计学意义(*P*<0.05);LDJF组、MDJF组与MG组上述指标比较差异均无统计学意义(*P*>0.05),见图2。

3　讨论

近年来随着生活压力的增大,男性机体衰老过程相对提前,其中生殖器官的衰老及机制研究引起了广泛关注。在衰老过程中,机体抗氧化能力下降,导致氧自由基增多,随着年龄增长,男性睾丸生殖功能逐渐下降,表现为血清总睾酮及游离睾酮水平下降。因此,探究衰老对睾丸形态、功能的影响对于延缓男性生殖器官衰老具有重要意义。D-半乳糖是一种致衰剂,研究证实连续皮下注射大剂量D-半乳糖可获得可靠的衰老模型,已广泛用于衰老机制研究中[12]。本研究通过构建SD雄性大鼠衰老模型,发现MG组大鼠精子数量减少、存活率降低,睾丸功能下降,睾丸组织形态破坏,提示大鼠衰老模型构建成功。给予高剂量DJF总皂苷干预后,大鼠睾丸组织形态及功能得到有效改善,提示适量的DJF总皂苷具有延缓大鼠睾丸功能衰退的作用。

衰老是多种病理、生理及心理过程综合作用,导致机体生理功能退化及丧失的必然过程,目前较为认可的学说是:在衰老过程中多种来源的促氧化剂增加,而抗氧化酶减少,导致机体内氧化还原失衡,造成氧化应激损伤,进而导致细胞衰老[13-14]。DJF总皂苷提取物具有较强的抗氧化活性,能够清除自由基和超氧离子,提高内源性抗氧化酶活性,增强抗氧化功能[15]。相关研究也报道,给予DJF醇提物干预能够通过清除自由基,有效改善D-半乳糖诱导的器官衰老和损伤[16]。Meng等[17]的研究则表明,DJF提取物通过增强细胞活力显著减弱了H_2O_2在人源正常肝细胞LO2中诱导的氧化损伤,阐明了DJF的潜在生物活性。而本研究发现,给予高剂量DJF总皂苷干预后,大鼠氧化损伤较MG组显著降低,提示适量的DJF总皂苷干预可降低氧化应激损伤,改善衰老大鼠睾丸功能。



a:蛋白电泳图;b:蛋白表达定量统计　*:与NC组比较,*P*<0.05;#:与MG组比较,*P*<0.05

图2　各组大鼠睾丸组织衰老相关蛋白表达水平比较

Nrf2/HO-1信号途径已被证实在抗氧化应激反应中发挥重要作用。相关研究表明,知母皂苷能够阻断高脂饮食诱导的肥胖大鼠的炎症和血脂异常,改善氧化应激,其原因与Nrf2/HO-1信号通路激活密切相关[18-19]。太白龙牙总皂苷能提高抗氧化能力,有效改善D-半乳糖诱导的器官损伤,对D-半乳糖诱导的大鼠衰老具有逆转作用,其原因与Nrf2/HO-1通路激活有关[20]。本研究发现,给予高剂量DJF总皂苷干预后,Nrf2/HO-1通路相关蛋白Nrf2、HO-1表达较MG组显著上调,推断DJF总皂苷可调控Nrf2/HO-1通路活性。此外,研究证明,p53是细胞衰老的中心介质,而p21是响应p53表达所必需的,激活p53/p21通路能诱导细胞周期阻滞,引发细胞衰老[21]。Bonda等[22]研究也表明,阻断p53/p21通路明显抑制了细胞衰老过程。本研究发现,与MG组相比,高剂量DJF总皂苷干预下调了大鼠睾丸组织中p21和p53蛋白表达,说明适量的DJF总皂苷可以抑制衰老蛋白表达,从而延缓D-半乳糖诱导的睾丸组织衰老。

综上所述,DJF总皂苷可能通过激活Nrf2/HO-1通路,增强抗氧化应激水平,抑制衰老相关蛋白表达,进而缓解大鼠睾丸功能衰退,为下一步DJF的深度开发利用提供了一定的实验依据。

[参考文献]

[1] 邓春华,张 弛,谢 云,等. 睾丸衰老的研究现状与展望[J]. 中华男科学杂志,2020,26(4):291-296. doi:10.13263/j.cnki.nja.2020.04.001.

[2] Beigi Harchegani A, Rahmani H, Tahmasbpour E, et al. Hyperviscous semen causes poor sperm quality and male infertility through induction of oxidative stress[J]. Curr Urol, 2019, 13(1): 1-6. doi: 10.1159/000499302.

[3] Liu RX, Zhao ZY, Dai SJ, et al. Identification and quantification of bioactive compounds in diaphragma juglandis fructus by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and UHPLC-MS/MS[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(13): 3811-3825. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06890.

[4] 洪茜茜,叶永丽,张银志,等. 核桃分心木化学成分及功能活性研究进展[J]. 食品研究与开发,2021,42(7):194-202. doi:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.07.031.

[5] Rusu ME, Georgiu C, Pop A, et al. Antioxidant effects of walnut (Juglans regia L.) kernel and walnut septum extract in a D-galactose-induced aging model and in naturally aged rats[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(5): 424. doi: 10.3390/antiox9050424.

[6] 周本文,张长城,邓 何,等. 竹节参总皂苷减轻高脂饮食诱导的小鼠睾丸支持细胞连接功能损伤[J]. 南方医科大学学报,2023,43(7):1145-1154. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2023.07.11.

[7] 岳博文,倪 露,郑 莹,等. 竹节参总皂苷通过减轻成纤维细胞生长因子21抵抗改善自然衰老大鼠的认知功能障碍[J]. 中药新药与临床药理,2023,34(5):605-612. doi:10.19378/j.issn.1003-9783.2023.05.005.

[8] Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection[J]. Physiol Genomics, 2018, 50(2): 77-97. doi: 10.1152/physiolgenomics.00041.2017.

[9] Kumar SS, Manna K, Das A. Tender coconut water attenuates heat stress-induced testicular damage through modulation of the NF-κB and Nrf2 pathways[J]. Food Funct, 2018, 9(10): 5463-5479. doi: 10.1039/c8fo01207e.

[10] Luo WW, Wang Y, Yang HW, et al. Heme oxygenase-1 ameliorates oxidative stress-induced endothelial senescence via regulating endothelial nitric oxide synthase activation and coupling[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(7): 1722-1744. doi: 10.18632/aging.101506.

[11] Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(9): 1368-1379. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.019.

[12] Azman KF, Safdar A, Zakaria R. D-galactose-induced liver aging model: its underlying mechanisms and potential therapeutic interventions[J]. Exp Gerontol, 2021, 150: 111372. doi: 10.1016/j.exger.2021.111372.

[13] Wang L, Tang JH, Wang L, et al. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(12): 7966-7983. doi: 10.1002/jcp.30468.

[14] Gaetano AD, Gibellini L, Zanini G, et al. Mitophagy and oxidative stress: the role of aging[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(5): 794. doi: 10.3390/antiox10050794.

[15] Wang D, Mu Y, Dong HJ, et al. Chemical constituents of the ethyl acetate extract from Fructus Diaphragmae Juglandis and their inhibitory activity on nitric oxide production in vitro[J]. Molecules, 2018, 23(1): 72. doi: 10.3390/molecules23010072.

[16] Hu GS, Gao S, Mou DH. Water and alcohol extracts from diaphragma juglandis on anti-fatigue and anti-oxidative effects in vitro and vivo[J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(8): 3132-3139. doi: 10.1002/jsfa.10942.

[17] Meng QR, Chen F, Xiao TC, et al. Inhibitory effects of polysaccharide from diaphragma juglandis fructus on α-amylase and α-D-glucosidase activity, streptozotocin-induced hyperglycemia model, advanced glycation end-products formation, and H_2O_2 induced oxidative damage[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 124(3): 1080-1089. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.011.

[18] 王甜甜,陈淳媛,杨 雷,等. Nrf2/HO-1信号轴在氧化应激相关疾病机制中的作用[J]. 中南大学学报(医学版),2019,44(1):74-80. doi:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.01.012.

[19] Liu F, Feng M, Xing J, et al. Timosaponin alleviates oxidative stress in rats with high fat diet-induced obesity via activating Nrf2/HO-1 and inhibiting the NF-κB pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 56(14): 174377-174386. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174377.

[20] Li H, Zhai BT, Sun J, et al. Antioxidant, anti-aging and organ protective effects of total saponins from aralia taibaie[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4025-4042. doi: 10.2147/DDDT.S330222.

[21] Kim YY, Jee HJ, Um JH, et al. Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence[J]. Aging Cell, 2017, 16(5): 1094-1103. doi: 10.1111/acel.12639.

[22] Bonda TA, Dziemidowicz M, Cielińska M, et al. Interleukin 6 knockout inhibits aging-related accumulation of p53 in the mouse myocardium[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2019, 74(2): 176-182. doi: 10.1093/gerona/gly105.

(编辑:魏 源)