

# 虾青素对 D-半乳糖致衰老大鼠肾脏和心脏组织氧化损伤的修复作用

侯晓宁, 张育昆, 陈祉晴, 肖杰, 曹庸, 刘晓娟\*

(华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510640)

**摘要:** 通过建立 D-半乳糖致衰老模型, 研究虾青素对衰老大鼠肾脏和心脏组织氧化损伤的修复作用。实验设空白组、模型组、虾青素低、中、高 (5、10、15 mg/kg) 剂量组和二甲双胍 (MET) 阳性对照组。检测肾脏和心脏系数, 肾脏和心脏组织中过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力和丙二醛 (MDA) 含量等指标, 观测苏木精-伊红染色 (HE) 病理组织切片。结果表明, 与模型组相比, 虾青素能改善 D-半乳糖造成的肾脏和心脏系数下降, 减少肾脏和心脏组织中 MDA 含量, 并显著提高抗氧化物酶 (SOD、CAT、GSH-Px) 活力。其中, 高剂量组 (15 mg/kg) 大鼠肾脏和心脏中 MDA 含量显著降低了 70.48% 和 38.02% ( $p < 0.01$ ), 对于 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力, 肾脏中分别提高了 37.22%、43.73% 和 52.01% ( $p < 0.01$ ), 心脏中分别提高了 85.47%、52.08% 和 64.77% ( $p < 0.01$ )。病理切片显示虾青素能有效缓解肾脏和心脏组织的氧化损伤。以上结果全面揭示虾青素能通过减轻氧化应激来抑制衰老大鼠肾脏和心脏组织的损伤, 其机制可能与抗氧化有关。

**关键词:** 虾青素; D-半乳糖; 衰老模型; 氧化应激; 肾脏; 心脏

文章编号: 1673-9078(2022)12-146-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0174

## Protective Effects of Astaxanthin against Oxidative Damage of the Kidney and Heart Tissues in D-galactose Induced Aging Rats

HOU Xiaoning, ZHANG Yukun, CHEN Zhiqing, XIAO Jie, CAO Yong, LIU Xiaojuan\*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The protective effects of astaxanthin against oxidative damage of the kidney and heart tissues in aging rats were investigated through establishing a D-galactose-induced aging animal model. The experiments included a blank group, model group, low-, medium- and high-dose astaxanthin (5, 10, 15 mg/kg) groups, and metformin (MET) positive control group. The renal and cardiac coefficients were measured, along with the indexes such as the contents of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) activity and malondialdehyde (MDA) in the kidney and heart tissues. The H&E (hematoxylin-eosin) stained pathological tissue sections were examined. The results showed that compared with the model group, astaxanthin could ameliorate the decreases of the renal and cardiac coefficients caused by D-galactose, reduce the contents of MDA in the kidney and heart tissues, and significantly increase the activities of SOD, CAT and GSH-Px. In the high-dose group (15 mg/kg), the MDA contents in the kidney and heart of rats significantly decreased by 70.48% and 38.02% ( $p < 0.01$ ), and the activities of SOD, CAT and GSH-Px increased by 37.22%, 43.73% and 52.01% ( $p < 0.01$ ), respectively, in the kidney, and increased by 85.47%, 52.08% and 64.77% ( $p < 0.01$ ), respectively, in the heart. The examination of the pathological sections showed that astaxanthin could effectively alleviate oxidative damage of the kidney and heart tissues. These results suggested that astaxanthin can inhibit the damage of kidney

引文格式:

侯晓宁,张育昆,陈祉晴,等.虾青素对 D-半乳糖致衰老大鼠肾脏和心脏组织氧化损伤的修复作用[J].现代食品科技,2022,38(12):146-153

HOU Xiaoning, ZHANG Yukun, CHEN Zhiqing, et al. Protective effects of astaxanthin against oxidative damage of the kidney and heart tissues in D-galactose induced aging rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 146-153

收稿日期: 2022-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172195); 广东省自然科学基金项目 (2019A1515011391)

作者简介: 侯晓宁 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品学、食品生物化学及营养学, E-mail: 985476248@qq.com

通讯作者: 刘晓娟 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 功能食品学、食品生物化学及营养学, E-mail: liuxj@scau.edu.cn

and heart tissues in aging rats by alleviating oxidative stress, and the mechanism may be related to antioxidant actions.

**Key words:** astaxanthin; D-galactose; aging model; oxidative stress; kidney; heart

衰老是机体自发正常的生理过程,常伴随着心脑血管疾病、恶性肿瘤、中风、阿尔茨海默症等疾病的发生<sup>[1]</sup>。氧化应激理论认为,当机体遭遇有害刺激时,体内活性氧(ROS)增多,过量的自由基攻击细胞膜、蛋白质和酶等生物大分子,产生大量代谢产物MDA,加剧衰老甚至死亡<sup>[2]</sup>。机体在对抗氧化应激损伤时,存在一定的抗氧化自我防御系统,包括内源性抗氧化酶(如SOD、CAT、GSH-Px)以及非酶性抗氧化物。肾脏是衰老相关组织损伤的典型靶器官。“肾元盛则寿延,肾元衰则寿夭”《医学正传》。人体衰老与否、衰老的速度以及寿命的长短,很大程度上取决于肾气的强弱。心脏是心血管系统的重要器官,发挥着泵功能的作用。心肌细胞内线粒体数量较多,线粒体不仅是ROS介导细胞氧化损伤的主要靶点,也是ROS产生的重要位点<sup>[3]</sup>,使得心脏更容易遭受氧化损伤。

D-半乳糖(D-galactose, D-gal)致大鼠衰老模型凭借其寿命缩短、学习记忆障碍和免疫力降低等多种自然衰老类似特征,广泛应用于抗衰老相关研究<sup>[4]</sup>。当机体积累过量的D-gal时,D-gal氧化酶会将其转化为醛糖和氢过氧化物,从而导致ROS和糖基化终末产物(AGE)的产生<sup>[5]</sup>,严重损伤肾脏和心脏组织<sup>[6]</sup>。研究发现,雷帕霉素、二甲双胍和阿卡波糖等药物能有效延长实验动物的寿命<sup>[7]</sup>,目前已注册用于抗衰老的临床试验。然而服用过多药物会给机体带来副作用,研究逐步转向寻找一些天然抗氧化剂,如姜黄素、白藜芦醇、槲皮素、花青素等<sup>[8-10]</sup>。

虾青素是1938年从龙虾中首次被分离出来的天然胞外抗氧化剂<sup>[11]</sup>,广泛存在于雨生红球藻、红法夫酵母和虾蟹外壳中。虾青素分子中的共轭双键链,以及共轭双键链末端的不饱和羟基和酮基具有比较活泼的电子效应,使它具有比其它他类胡萝卜素更高的抗氧化能力<sup>[12]</sup>。大量研究证实虾青素在抗炎、抗肿瘤、预防心血管疾病和神经保护等方面都有积极的促进作用<sup>[13-16]</sup>。基于D-gal致衰老模型,El-Baz<sup>[17]</sup>、陈祉晴等<sup>[18]</sup>发现虾青素可以缓解实验大鼠肝脏的氧化应激状态,修复肝脏的免疫损伤。刘涵等<sup>[19]</sup>发现虾青素可以减轻大鼠的脑衰老。近年来研究表明,虾青素还可以改善糖尿病大鼠的氧化应激,缓解肾脏纤维化<sup>[20-22]</sup>;减轻异丙肾上腺素、半胱氨酸、高脂饮食等诱导的心脏线粒体功能障碍,从而抑制氧化应激<sup>[22-25]</sup>。本实验从氧化应激的角度,研究虾青素对D-gal致衰老大鼠肾脏和心脏组织氧化损伤的修复作用,为虾青素的开发利用

提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

雄性SD大鼠,体质量120~140g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:SYXK 2019-0135。

#### 1.1.2 药品与试剂

全反式虾青素标准品(人工合成),纯度为97.00%±0.50%,由广东巨源生化有限公司生产。

总蛋白定量(BCA)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;D-gal,美国Sigma-Aldrich试剂公司;MET,北京索莱宝生物技术有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),天津润圣纤维素科技有限公司;无水乙醇、二甲基亚砷等其他化学品和试剂均为分析纯。

#### 1.1.3 仪器与设备

Enspire2300多功能酶标仪,美国PerkinElmer公司;RM2235石蜡切片机,德国Leica公司;CX41光学显微镜,广州市明美光电技术有限公司;JXFSTPR-32全自动样品快速研磨仪,上海净信实业发展有限公司;5415R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;KQ-500B型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;WZ-100恒温水浴锅,上海申升科技有限公司;旋涡混合仪,上海精科实业有限公司;各种规格移液器,德国Eppendorf公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物分组与饲养

48只SD雄性大鼠(120~140g)适应性饲养7d后,随机分为6组:空白组(CK)、模型组(MOD)、阳性对照组(二甲双胍, MET)和虾青素低、中、高剂量组(AST-L、AST-M、AST-H),每组8只,每笼4只。实验大鼠建模后用专用塑料鼠笼饲养,食用标准饲料,自由饮水,每日更换无菌碎木屑垫料,饲料和垫料由华南农业大学实验动物中心提供。鼠房光暗交替循环12h,恒温(25±1)℃,相对湿度50%±10%。所有动物均按中国动物中心和华南农业大学动物委员会批准的方案进行治疗,所有动物程序均按照华南农业大学实验动物护理和使用指南进行,实验通过了中

国动物中心动物伦理委员会和华南农业大学的批准。

### 1.2.2 模型建立与给药

将虾青素和二甲双胍均溶于含质量分数 0.25% CMC-Na 的生理盐水中, 以获得均匀悬浮液。空白组注射生理盐水, 其余各组每日腹腔注射 300 mg/kg (以体质量计, 下同) 的 D-gal 生理盐水溶液。同时, 实验组灌胃虾青素 (低、中、高剂量各为 5、10、15 mg/kg) 或二甲双胍 (300 mg/kg), 空白组和模型组灌胃与实验组等容量的生理盐水 (含 0.25% CMC-Na)。连续 9 周喂养大鼠, 腹腔注射及灌胃给药的剂量根据大鼠体质量的变化实时调整。其中虾青素给药剂量参考依据: 人类推荐的虾青素每日摄取量为 4~50 mg, 大鼠功能食品的剂量一般是人的 5~30 倍。结合预实验结果, 选择剂量分别为 5、10、15 mg/kg 的虾青素用于本实验。

### 1.2.3 大鼠体质量及脏器指数的测定

实验期间, 每日测量大鼠的体质量并观察记录其表观生理变化。末次给药后, 先称重再麻醉处死大鼠。迅速解剖并取出肾脏及心脏组织, 生理盐水洗去表面浮血, 无菌滤纸吸干。称质量, 按照下式计算脏器系数:

$$Z = \frac{m_1}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Z——脏器系数, %;

$m_1$ ——脏器质量, g;

$m$ ——大鼠体质量, g。

### 1.2.4 抗氧化指标的测定

称取一定质量的肾脏和心脏组织, 剪碎后在生理盐水中均质, 制备 10% ( $m/V$ ) 组织匀浆。低温间断研磨后, 以 4 °C, 3 600 r/min 离心 10 min, 吸取上清液用于后续实验。用市售试剂盒测定组织匀浆中的蛋白浓度, MDA 含量以及 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性。所有指标的测定均严格按照试剂盒说明书操作。

### 1.2.5 组织病理学检查

将肾脏和心脏组织置于质量分数 4% 多聚甲醛中,

固定 24 h 后用无水乙醇脱水。再将组织包埋于石蜡中, 切片机切割至 5  $\mu$ m 厚。苏木精-伊红 (HE) 染色后, 依次观察肾脏和心脏组织在 40 $\times$ 、100 $\times$ 、200 $\times$ 、400 $\times$  光学显微镜下的形态, 以评估病理学变化。

### 1.2.6 数据统计处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 测定数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用单因素方差分析并 LSD 法进行多重比较, 结果在  $p < 0.05$  时被认为具有统计学意义。采用 Origin 8.0 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 虾青素对大鼠表观及脏器系数的影响

实验期间, 大鼠正常生长和摄食。随着灌胃时间的延长, 各组大鼠体质量均有所上升。和 CK 组相比, MOD 组大鼠表现出明显的衰老相关体征, 如皮毛暗淡粗糙、脱毛增多、行动迟缓等。和模型组相比, 虾青素组大鼠的生活状态相对活跃, 行动敏捷, 性情温和, 毛发呈淡黄色。AST-H 组和 MET 组大鼠有趋于 CK 组的表现。初步判断虾青素可以增强 D-gal 衰老模型大鼠的行为活动, 延缓表观生理变化。

脏器系数可以一定程度反映机体的衰老程度<sup>[26]</sup>, 脏器系数增大表示脏器充血、水肿或增生肥大, 脏器系数减小常表示脏器出现萎缩及其它退行性改变。由表 1 可知, 各组大鼠的体质量之间无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 说明虾青素不会干扰实验大鼠的生长状况。与 CK 组相比, MOD 组大鼠肾脏及心脏系数均显著降低 ( $p < 0.05$ ), 表征肾脏和心脏组织的肥厚程度有所影响, 出现了不同程度的萎缩现象, 可能与遭受 D-gal 带来的氧化损伤有关。和 MOD 组相比, 虾青素组大鼠肾脏和心脏系数均有所提高, AST-M 组和 AST-H 组改善明显 ( $p < 0.05$ )。说明虾青素能缓解 D-gal 导致的肾脏和心脏组织的氧化损伤, 对大鼠的衰老有延缓作用。

表 1 虾青素对衰老大鼠脏器系数的影响

Table 1 Effects of astaxanthin on organ indexes in rats ( $n=8$ )

组别	体质量/g	肾脏系数/(mg/g)	心脏系数/(mg/g)
CK	526.87 $\pm$ 14.96	7.09 $\pm$ 0.37	3.56 $\pm$ 0.28
MOD	506.51 $\pm$ 4.48	6.59 $\pm$ 0.04*	3.10 $\pm$ 0.19*
AST-L (5 mg/kg)	518.52 $\pm$ 7.47	6.73 $\pm$ 0.20	3.28 $\pm$ 0.15
AST-M (10 mg/kg)	497.25 $\pm$ 10.82	6.93 $\pm$ 0.22 $\Delta$	3.36 $\pm$ 0.13 $\Delta$
AST-H (15 mg/kg)	525.61 $\pm$ 14.55	6.89 $\pm$ 0.16 $\Delta$	3.49 $\pm$ 0.18 $\Delta$
MET (300 mg/kg)	517.52 $\pm$ 21.86	6.74 $\pm$ 0.23	3.41 $\pm$ 0.17 $\Delta$

注: 各组大鼠的数值以平均值 $\pm$ 标准差表示; \*表示与 CK 组相比, 差异显著 ( $p < 0.05$ ); \*\*表示与 CK 组相比, 差异极显著 ( $p < 0.01$ );  $\Delta$ 表示与 MOD 组相比, 差异显著 ( $p < 0.05$ );  $\Delta\Delta$ 表示与 MOD 组相比, 差异极显著 ( $p < 0.01$ )。下同。

## 2.2 虾青素对衰老模型大鼠肾脏和心脏组织中

### MDA 含量的影响

MDA 含量的高低可以反映机体脂质过氧化的程度,间接反映出细胞损伤的程度<sup>[27]</sup>。如图 1 所示,MOD 组大鼠肾脏和心脏组织中的 MDA 含量均显著高于空白组 ( $p < 0.01$ ),分别增加了 57.30%、65.74%。由此推测,D-gal 导致衰老大鼠体内的脂质过氧化产物增加,衰老模型构建成功。虾青素作用后大鼠肾脏和心脏组织中的 MDA 含量显著降低,其中高剂量组分别减少了 29.52%、38.02% ( $p < 0.01$ ),和 MET 组之间无明显差异 ( $p > 0.05$ )。推测虾青素可以有效抑制衰老大鼠体内的脂质过氧化,保护生物膜免受氧化损伤,从而延缓衰老。

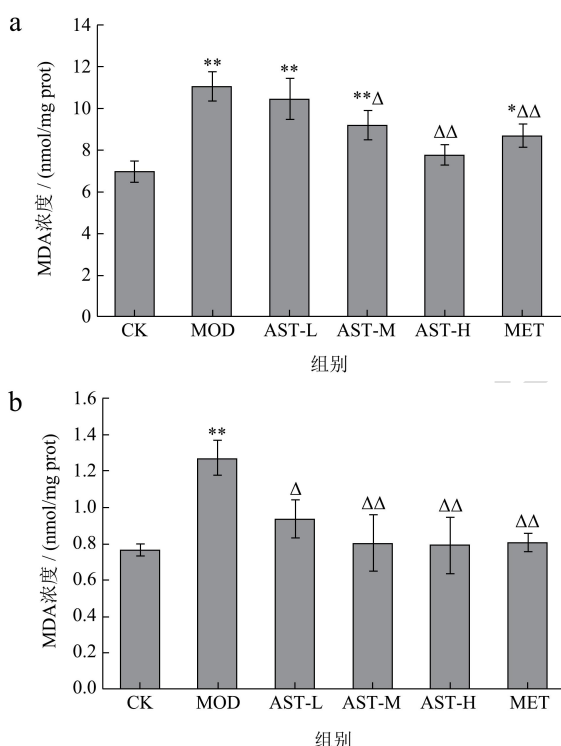


图 1 不同处理下衰老大鼠肾脏 (a) 和心脏 (b) 组织中 MDA 含量  
Fig.1 MDA content in kidney (a) and heart (b) tissues of aged rats under different treatments

## 2.3 虾青素对衰老模型大鼠肾脏和心脏组织中

### CAT 活力的影响

CAT 是过氧化物酶体的标志酶,约占过氧化物酶体酶总量的 40%。它存在于动物的各个组织中,通过催化  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  与  $O_2$ ,使机体免受有害物质的损伤<sup>[28]</sup>。图 2 显示,和 CK 组相比,模型组大鼠肾脏和

心脏组织中的 CAT 活力显著降低 ( $p < 0.01$ )。随着虾青素浓度的增加,大鼠肾脏和心脏组织中的 CAT 活力逐渐上升,呈现一定的剂量依赖效应。其中 AST-H 组的 CAT 活力较模型组显著增加了 43.73%、52.08%,差异具有统计学显著性 ( $p < 0.01$ )。和 MET 组之间无明显显著性差异 ( $p > 0.05$ )。虾青素能提高机体清除  $H_2O_2$  的能力,从而减轻氧化损伤,达到延缓衰老的功效。

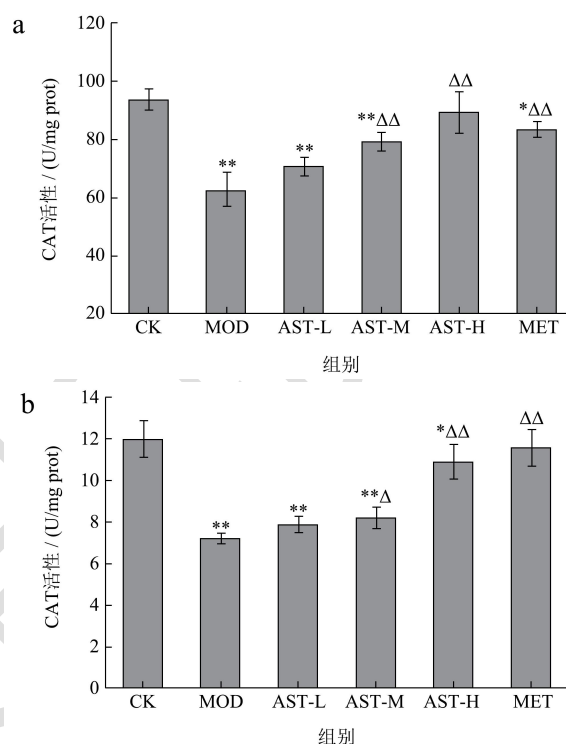


图 2 不同处理下衰老大鼠肾脏 (a) 和心脏 (b) 组织中 CAT 活力  
Fig.2 CAT activity in kidney and heart of aged rats under different treatments

## 2.4 虾青素对衰老模型大鼠肾脏和心脏组织中

### SOD 活力的影响

SOD 存在于绝大多数生物细胞中,它能催化超氧化物发生歧化反应转化为  $O_2$  和  $H_2O_2$ ,其活性大小可以反映机体清除自由基能力<sup>[29]</sup>。如图 3 所示,和 CK 组相比,模型组大鼠肾脏和心脏组织中的 SOD 活力明显降低 ( $p < 0.01$ )。和 MOD 组相比,虾青素和 MET 作用后各组大鼠肾脏和心脏组织中的 SOD 活力显著增加,其中肾脏组织中虾青素各组呈现出一定的剂量依赖效应,心脏组织中 AST-L 和 AST-M 组较为相近。AST-H 作用下大鼠肾脏和心脏组织中的 SOD 活力最强 ( $p < 0.01$ ),分别提高了 37.22%、85.47%,且高于 MET 组 ( $p > 0.05$ )。由此判断虾青素可能通过减少体内自由基的积累,从而抵御氧化应激。

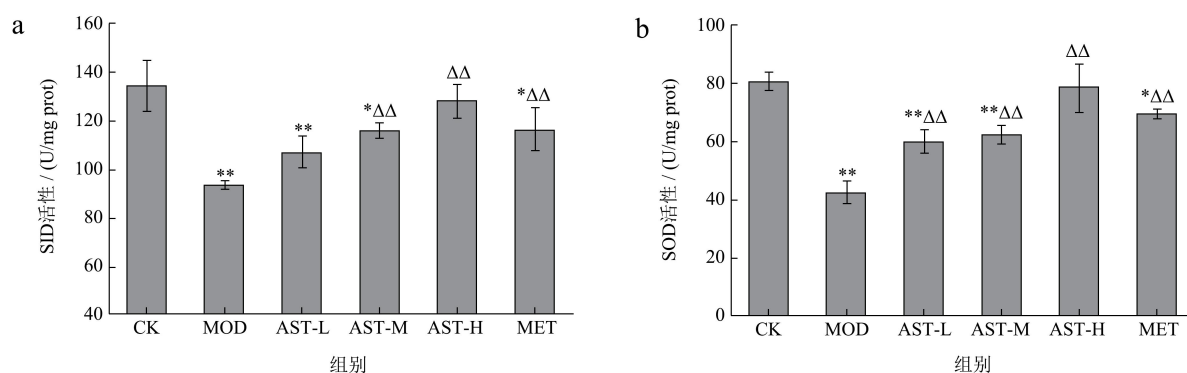


图3 不同处理下衰老大鼠肾脏 (a) 和心脏 (b) 组织中 SOD 活力

Fig.3 SOD activity in kidney and heart of aged rats under different treatments

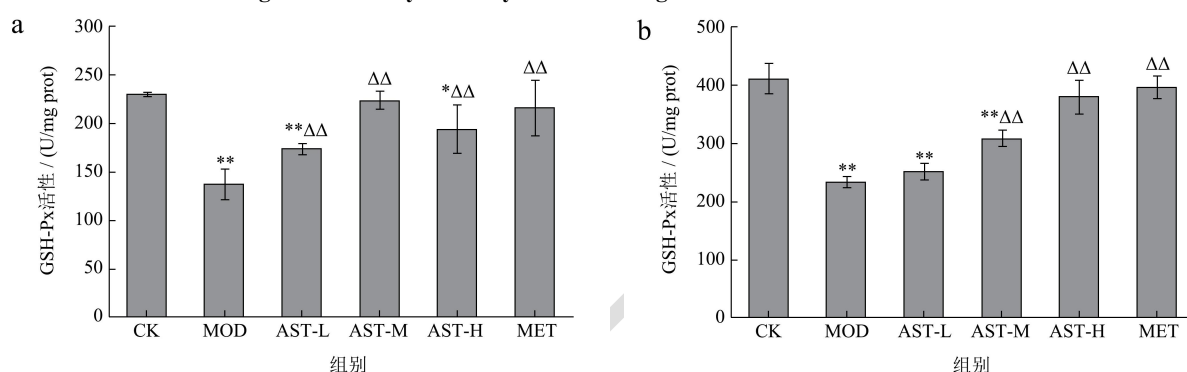


图4 不同处理下衰老大鼠肾脏 (a) 和心脏 (b) 组织中 GSH-Px 活力

Fig.4 GSH-Px activity in kidney of aged rats under different treatments

## 2.5 虾青素对衰老模型大鼠肾脏和心脏组织中

### GSH-Px 活力的影响

GSH-Px 是体内重要的自由基捕获酶之一,它通过特异催化还原性 GSH 与  $H_2O_2$  反应,生成对机体无毒害的水和氧化型 GSH,从而保护细胞膜结构和功能的完整<sup>[30]</sup>。如图 4 所示,和 CK 组相比,MOD 组大鼠肾脏和心脏组织中的 GSH-Px 活力显著下降 ( $p < 0.01$ )。MET 和虾青素各组大鼠肾脏和心脏组织中的 GSH-Px 活力较 MOD 组显著提高。其中虾青素对肾脏组织中 GSH-Px 活力的作用强于心脏组织,均表现出极显著差异 ( $p < 0.01$ )。肾脏组织中,AST-M 组大鼠 GSH-Px 活力改善最为明显,较 MOD 组提高了 63.01%,和 MET 组之间无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。心脏组织中,随着虾青素浓度的增加,GSH-Px 活力不断提高,AST-H 组显著提高了 64.77% ( $p < 0.01$ )。以上结果说明虾青素可能通过消灭自由基,减轻细胞膜的氧化损伤,从而增强机体的抗氧化防御机制。

## 2.6 虾青素对 D-半乳糖致衰老大鼠肾脏和心

### 脏组织形态学的影响

随着年龄的增长,肾脏的宏观和微观结构均会发生变化。在宏观结构水平上,肾皮质体积减小,肾脏总体积也会逐渐收缩;在微观结构水平上,肾脏的衰老主要表现在肾间质纤维化、肾小球硬化、肾小管萎缩和肾小囊囊腔扩充等方面。图 5 可以观察到 CK 组大鼠肾脏组织中的肾小球分布密集,数量正常,呈圆形或椭圆形,外周规整,血管球内毛细血管襻密集,肾小囊的囊腔狭小。肾小管的管腔大多为规整、狭小。而 MOD 组大鼠肾小球分布稀疏,直径明显增大,数量减少,肾小囊囊腔显著增宽,血管球不规则而松散,体积缩小,缩向血管极一侧,并可见散在的空泡样肾小球。虾青素处理后,肾脏组织的形态较模型组有所改善。随着虾青素浓度的增加,肾小球直径逐渐减小,肾小囊囊腔变窄,血管球分布趋于正常。MET 组肾小球少量血管球缩向血管极一侧,直径接近 AST-M 组,肾小囊囊腔接近 AST-H。说明虾青素能一定程度缓解 D-半乳糖带来的肾脏组织的氧化损伤。

心脏衰老常伴随着宏观上的心脏萎缩(心脏体积减小、重量减轻、呈深褐色)、心肌肥大(心室壁及室间隔增厚、心室腔减小)及纤维素性心包炎,以及微观上心肌细胞的坏死、心肌组织纤维化。图 6 可以观察到 CK 组心肌组织胞浆丰富呈粉红色,横纹结构隐约

可见；心肌细胞饱满，排列整齐，胞膜完整，核清晰可见，无病理改变。然而经 D-gal 处理后，MOD 组心肌纤维淡染，间质水肿明显，间隙增大，细胞排列紊乱，部分心肌细胞坏死，较多空泡。虾青素作用后仍有部分心肌细胞出现空泡现象，但较 MOD 组有明显改善。随着虾青素浓度的增加，心肌纤维排列趋于规整，细胞间质减少且间隙减小，细胞排列整齐。MET 组较 MOD 组有明显改善，病理形态介于 AST-L 和 AST-M 组之间。说明虾青素对 D-gal 带来的心脏组织的氧化损伤有一定的修复作用。

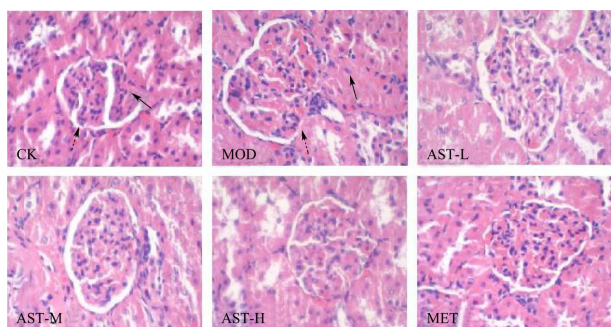


图5 虾青素对衰老大鼠肾组织形态学的影响 (HE 染色,  $\times 400$ )

Fig.5 Effect of astaxanthin on renal histomorphology in aged rats (HE staining,  $\times 400$ )

注：实线箭头指向血管球；虚线箭头指向肾小囊。

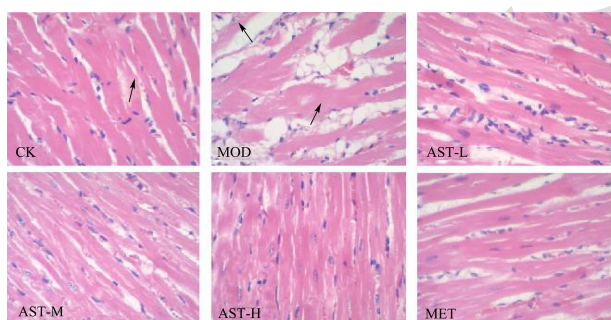


图6 虾青素对衰老大鼠心脏组织形态学的影响 (HE 染色,  $\times 400$ )

Fig.6 Effect of astaxanthin on renal histomorphology in aged rats (HE staining,  $\times 400$ )

注：左边箭头指向心肌纤维；中间箭头指向心肌细胞；右边箭头指向胞质。

### 3 讨论

D-半乳糖是一种还原性己醛糖，通常存在于人体、牛奶、甜菜、某些树胶和植物黏液中。半乳糖是肠道内吸收最快的单糖，可在摄入后 8 h 内由机体代谢并排出体外<sup>[31]</sup>。然而摄入过多 D-半乳糖会使机体产生大量 ROS，从而诱导氧化应激，并引起记忆障碍、神经炎症和神经退行性改变等疾病的发生<sup>[32]</sup>。D-半乳糖致衰老模型以氧化应激理论为基础，诱导机体老化，且在整个过程中副作用最小、存活率较高，是目前公认的

衰老动物造模方法。本研究连续 9 周给大鼠腹腔注射 D-半乳糖 (300 mg/kg)，和空白组相比，模型组大鼠表现出明显的衰老相关特征，肾脏系数和心脏系数显著下降，肾脏和心脏组织中 MDA 含量显著升高，抗氧化酶 (SOD、CAT 和 GSH-Px) 活力均有不同程度的降低，且肾脏和心脏组织都显示出明显的氧化损伤，衰老大鼠模型构建成功。

本实验结果表明虾青素各剂量组能不同程度地改善衰老大鼠的表观生理变化，恢复肾脏系数和心脏系数，其中高剂量组效果最为明显。说明虾青素能有效增强衰老大鼠的体质，减缓肾脏和心脏组织萎缩现象的发生。陈宏运等<sup>[33]</sup>连续 30 d 给小鼠皮下注射 D-半乳糖 (100 mg/kg)，模型组小鼠的脾脏指数和胸腺指数均有所下降，可能与衰老过程伴随免疫器官的萎缩、免疫功能的下降有关；牛佳玮等<sup>[34]</sup>给小鼠注射 120 mg/kg 的 D-半乳糖，连续造模 4 周后，模型组小鼠肝脏系数和肾脏系数显著减小，推测是由氧化损伤带来的机体代谢能力下降所造成的。这些研究虽与本实验在 D-半乳糖浓度和造模时间的选择上略有异同，但也表现出类似的衰老趋势。注射 D-半乳糖会导致实验动物各脏器出现不同程度的萎缩，极大干扰脏器的正常功能，破坏机体稳态，从而加速衰老进程。

进一步地，组织切片结果不但能直观反映出病变组织的物理损伤情况，还可以间接评估机体的衰老程度。组织形态学观察发现，肾脏纤维化与炎症反应有关，肾小管硬化与自由基攻击蛋白质相关，肾小球皱缩减少说明存在衰老现象<sup>[35]</sup>。本研究中模型组大鼠肾脏组织表现出肾间质纤维化、肾小囊囊腔增宽、肾小球明显皱缩、数量减少且排列紊乱，虾青素作用后各组大鼠肾脏组织的氧化损伤有所修复，肾小囊囊腔变窄，血管球分布趋于正常。说明虾青素可能通过抵御自由基攻击、清灭或局限致炎因子，从而保护肾脏组织免受氧化损伤。研究表明 D-半乳糖可通过增加氧化应激、降低抗氧化剂水平损伤心脏形态，从而诱导心脏衰老。本实验中，模型组大鼠心脏组织中心肌细胞淡染，细胞间质水肿增大，以及部分心肌细胞坏死。而经虾青素作用后，衰老大鼠心脏组织的氧化损伤有所修复，心肌细胞胞浆丰富，心肌纤维排列趋于规整。可能是虾青素抑制 D-gal 诱导的氧化应激反应，减少了 ROS 积累量，从而缓解了心脏组织的氧化损伤。

抗氧化酶系统是机体抵抗自由基的重要防御体系，多种抗氧化酶相互作用所构成的网络能保护细胞免受氧化损害，提高抗氧化水平。SOD、CAT 和 GSH-Px 是主要的内源性抗氧化酶，常被用作衡量机体抗氧化能力的重要指标。其中，SOD 将超氧阴离子自由基

( $O_2\cdot^-$ )歧化为 $O_2$ 和 $H_2O_2$ , CAT和GSH-Px进一步催化 $H_2O_2$ 变为 $H_2O$ ,从而阻止机体中羟基自由基的产生,达到抗氧化效果。此外,自由基作用于脂质产生氧化终产物MDA,同时MDA还可与DNA、蛋白质交联,与细胞膜上的磷脂产生化学作用,从而进一步损害细胞<sup>[36]</sup>。因此,MDA含量的高低不但可判断脂质过氧化程度,还可用来评价机体衰老程度<sup>[37]</sup>。MDA含量越高,说明生成的氧自由基越多,氧化反应越激烈,组织的氧化损伤也越严重。本研究中,15 mg/kg虾青素作用后,衰老大鼠肾脏和心脏中MDA含量分别减少了29.52%、38.02%。SOD、CAT和GSH-Px活力均显著提升,并表现出随着虾青素剂量增加而效果逐渐明显的趋势。说明虾青素能增强衰老大鼠的抗氧化能力,且存在一定的剂量依赖效应。Chen等<sup>[18]</sup>发现15 mg/kg虾青素能使衰老大鼠脑、肝脏和血清中MDA含量分别减少34.82%、95.74%和41.32%。此外,虾青素还显著提高了衰老大鼠脑、肝脏、血清中的抗氧化酶活力<sup>[19]</sup>。据报道,藏红花素可以保护D-半乳糖诱导的肝脏损伤,抑制衰老大鼠体内MDA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)水平<sup>[38]</sup>;杜氏盐藻能改善D-半乳糖造成的心脏功能障碍,提高衰老大鼠心脏中SOD、CAT活力,降低MDA、TNF- $\alpha$ 和IL-6水平<sup>[39]</sup>;Zhang<sup>[40]</sup>发现红酵母红素不但能提高衰老小鼠体内的SOD、CAT和GSH-Px活力,还降低了炎症因子水平,显著改善了由D-半乳糖诱导的记忆功能障碍、氧化应激和神经炎症。

#### 4 结论

本实验基于D-半乳糖诱导的衰老大鼠模型,研究虾青素对衰老大鼠肾脏和心脏组织的保护作用。结果表明,虾青素可以通过降低脂质过氧化物的产生,提高抗氧化酶活力和修复肾脏和心脏组织的氧化损伤来延缓衰老。其机制可能与减少肾脏和心脏自由基损伤有关,具体作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Barbagallo M, Veronese N, Dominguez L J. Magnesium in aging, health and diseases [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 463-472
- [2] Luo J, Mills K, le Cessie S, et al. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next? [J]. *Ageing Research Reviews*, 2020, 57: 1568-1637
- [3] Hernansanz-Agustin P, Enriquez J A. Generation of reactive oxygen species by mitochondria [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 415-423
- [4] 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]. *药理学学报*, 2017, 52(3): 347-354
- [5] Azman K F, Zakaria R. D-galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782
- [6] Frimat M, Daroux M, Litke R, et al. Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation [J]. *Clinical Science*, 2017, 131(11): 1069-1092
- [7] Partridge L, Deelen J, Slagboom P E. Facing up to the global challenges of ageing [J]. *Nature*, 2018, 561(7721): 45-56
- [8] Pisoschi A M, Pop A, Iordache F, et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 209: 1-23
- [9] Zia A, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri A M, et al. The role of curcumin in aging and senescence: molecular mechanisms [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 134: 1-10
- [10] Shen C, Jiang J, Yang L, et al. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(11): 1395-1425
- [11] Galasso C, Corinaldesi C, Sansone C. Carotenoids from marine organisms: biological functions and industrial applications [J]. *Antioxidants*, 2017, 6(4): 1-8
- [12] Yuan J, Peng J, Yin K, et al. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011, 55(1): 150-165
- [13] Cao Y, Yang L, Qiao X, et al. Dietary astaxanthin: an excellent carotenoid with multiple health benefits [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 18(2): 169-182
- [14] Visioli F, Artaria C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps [J]. *Food & Function*, 2017, 8(1): 39-63
- [15] Kanwugu O N, Glukhareva T V, Danilova I G, et al. Natural antioxidants in diabetes treatment and management: prospects of astaxanthin [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 10(5): 585-596
- [16] Grimmig B, Kim S, Nash K, et al. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration [J]. *Geroscience*, 2017, 39(1): 19-32
- [17] El-Baz F K, Hussein R A, Abdel Jaleel G A R, et al. Astaxanthin-rich haematococcus pluvialis algal hepatic modulation in D-galactose-induced aging in rats: role of Nrf2 [J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 8(3): 523-528

- [18] Chen Z, Xiao J, Liu H, et al. Astaxanthin attenuates oxidative stress and immune impairment in D-galactose-induced aging in rats by activating the Nrf2/Keap1 pathway and suppressing the NF-kappa B pathway [J]. *Food & Function*, 2020, 11(9): 8099-8111
- [19] Liu H, Zhang X, Xiao J, et al. Astaxanthin attenuates D-galactose-induced brain aging in rats by ameliorating oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and regulating metabolic marker [J]. *Food & Function*, 2020, 11(5): 4103-4113
- [20] Chen Q, Tao J, Xie X. Astaxanthin promotes Nrf2/ARE signaling to inhibit HG-induced renal fibrosis in GMCs [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(4): 117-126
- [21] Chen Z, Li W, Shi L, et al. Kidney-targeted astaxanthin natural antioxidant nanosystem for diabetic nephropathy therapy [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, 156: 143-154
- [22] Alam M N, Hossain M M, Rahman M M, et al. Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats [J]. *Journal of Dietary Supplements*, 2018, 15(1): 42-54
- [23] Krestinin R, Baburina Y, Odinkova I, et al. Isoproterenol-induced permeability transition pore-related dysfunction of heart mitochondria is attenuated by astaxanthin [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(10): 437-441
- [24] Shatoor A S, Al Humayed S. Astaxanthin ameliorates high-fat diet-induced cardiac damage and fibrosis by upregulating and activating SIRT1 [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(12): 7012-7021
- [25] Fan C, Sun J, Fu X, et al. Astaxanthin attenuates homocysteine-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo* by inhibiting mitochondrial dysfunction and oxidative damage [J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 1041-1051
- [26] 罗磊,张冰洁,关宁宁,等.金银花叶黄酮对衰老模型小鼠的体内抗氧化作用[J].*食品科学*, 2017,38(19):171-176
- [27] Ma J, Wang H, Liu B, et al. Combination of chick embryo and nutrient mixture prevent D-galactose-induced cognitive deficits, immune impairment and oxidative stress in aging rat model (vol 9, 4092, 2019) [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 4978-4999
- [28] Michalek M, Tabis A, Paslawska U, et al. Antioxidant defence and oxidative stress markers in cats with asymptomatic and symptomatic hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study [J]. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16(1): 26-35
- [29] Wang Y, Branicky R, Noe A, et al. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling [J]. *Journal of Cell Biology*, 2018, 217(6): 1915-1928
- [30] 刘乔,管晓辉,黄翠菊,等.GA 的提取分离工艺优化及其体内抗氧化活性作用[J].*食品科学*,2015,36(24):89-94
- [31] Morava E. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2014, 112(4): 275-279
- [32] Ullah F, Ali T, Ullah N, et al. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain [J]. *Neurochemistry International*, 2015, 90: 114-124
- [33] 陈宏运,崔红燕,吴彬彬,等.植物发酵液对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化活性研究 [J]. *现代食品科技*,2015,31(8):7-11
- [34] 牛佳玮,莫玲,王子铨,等.恭城油茶减轻 D-半乳糖致小鼠衰老的氧化应激[J].*现代食品科技*,2021,37(4):1-6
- [35] 杨忠敏,沈以红,王祖文,等.桑叶生物碱对 D-半乳糖诱导氧化损伤模型小鼠肾脏的改善作用 [J]. *食品科学*,2020,41(19):198-203
- [36] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker [J]. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 2004, 57(9-10): 453-455
- [37] Mas-Bargues C, Escriva C, Dromant M, et al. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2021, 709(18): 108941
- [38] Omidkhoda S F, Mehri S, Heidari S, et al. Protective effects of crocin against hepatic damages in D-galactose aging model in rats [J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2020, 19(3): 440-450
- [39] El-Baz F K, Jaleel G A A, Saleh D O, et al. Protective and therapeutic potentials of *Dunaliella salina* on aging-associated cardiac dysfunction in rats [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2018, 8(8): 403-410
- [40] Zhang W, Hua H, Guo Y, et al. Torularhodin from *Sporidiobolus pararoseus* attenuates D-galactose/AICl3-Induced cognitive impairment, oxidative stress, and neuroinflammation via the Nrf2/NF-kappa B pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(24): 6604-6614