

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.16.002
文章编号: 1005-8982 (2019) 16-0010-07

高剂量 D-半乳糖复制 C57BL/6J 衰老小鼠模型的研究

赵焕东¹, 胥洪鹃², 李坚³, 任彩萍², 陈玉祥⁴

(1. 中南大学湘雅医院 手术室, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学基础医学院 肿瘤研究所, 湖南 长沙 410078; 3. 中南大学湘雅医院 普外科, 湖南 长沙 410008; 4. 中南大学湘雅药学院, 湖南 长沙 410013)

摘要: 目的 探讨高剂量 D-半乳糖复制 C57BL/6J 衰老小鼠模型的效果。**方法** 选用 30 只 9 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 随机分为 3 组: 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组、1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组及对照组, 持续皮下注射 8 周后解剖小鼠, 测定血液和组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 及丙二醛 (MDA) 等, Western blotting 检测组织中血红素加氧酶-1 (HO-1) 的表达, 并对部分组织行苏木精-伊红染色。**结果** 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠出现不同程度的脱毛现象。D-半乳糖组小鼠的 SOD 和 GSH-Px 低于对照组 ($P < 0.05$), 而 MDA 和 HO-1 高于对照组 ($P < 0.05$)。D-半乳糖组小鼠肝、脑组织有不同程度的衰老相关病理学改变。**结论** D-半乳糖可以成功诱导小鼠衰老, 是复制小鼠衰老模型的较好选择。

关键词: D-半乳糖; 衰老模型; C57BL/6J; 氧化应激

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

Aging model induced by high-dose D-galactose in C57BL/6J mice

Huan-dong Zhao¹, Hong-juan Xu², Jian Li³, Cai-ping Ren², Yu xiang Chen⁴

(1. Operation Room, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 2. Cancer Research Institute, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China; 3. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 4. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of the high-dose D-galactose inducing aging model in C57BL/6J mice. **Methods** Thirty C57BL/6J mice were divided into 3 groups: 500 mg/(kg·d) D-galactose group, 1000 mg/(kg·d) D-galactose group and the 0.9% saline group by daily subcutaneous injection for 8 weeks. The superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde levels in serum, liver and brain were evaluated. The expression of heme oxygenase-1 expression in liver and brain was detected by western blotting. Tissues were observed by H&E staining. **Results** There were no differences in the appearance between 500 mg/(kg·d) group and control group, but the mice in 1000 mg/(kg·d) group showed the phenomenon of hair loss. The activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase significant decreased in the groups treated with D-galactose compared with control group ($P < 0.05$), and the concentration of the malondialdehyde was significantly higher than the control group ($P < 0.05$). The expression of heme oxygenase-1 was increased in the D-galactose group. There

收稿日期: 2019-02-08

[通信作者] 陈玉祥, Tel: 0731-84327993; E-mail: yuxiangchen@csu.edu.cn

were Pathological changes in D-galactose groups. **Conclusions** The D-galactose could induce the aging model and the dose of 1000 mg/ (kg·d) D-gal could cause the appearance change in C57BL/6J mice.

Keywords: galactose; models, aging; c57bl/6j mice; oxidative stress

随着医疗水平不断提高, 人口老龄化已成为当今亟需解决的问题。近年来, 衰老机制与抗衰老的研究备受关注^[1]。众所周知, 衰老是一个与氧化应激密切相关而又复杂的过程, 不仅会导致机体形态学改变, 而且会影响心、脑、肺等器官的功能^[2-3]。为提高人们生活质量并有效延缓衰老, 抗氧化和衰老药物或食品的研究成为热点。动物衰老模型的复制是衰老相关研究中必然涉及到的内容, 选择合适的衰老模型极为重要。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

D-半乳糖(美国 Sigma 公司), 水合氯醛(北京索莱宝科技有限公司), 聚氰基丙烯酸正丁酯(Butyleanoacrylate, BCA)试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司), 十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 组织裂解液、苯甲基磺酰氟购自上海碧云天生物技术有限公司, 抗血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(美国 Abcam 公司), 抗 β -actin 抗体(美国 CST 公司), 辣根过氧化物酶标记二抗(杭州联科生物技术股份有限公司), 增强型化学发光液(Electrochemiluminescence, ECL)(苏州新赛美生物技术公司)。

1.2 主要仪器

电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), 全波长酶标仪(美国 BioTek 公司), 化学发光、可见光成像系统购自美国 ProteinSimple 公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物与分组 9 周龄 C57BL/6J 小鼠 30 只, 体重(20 ± 2) g, 由湖南斯莱克景达实验动物公司提供, 许可证号: SYXK(湘)2015-0017。小鼠饲养环境中南大学实验动物学部提供, SPF 级, 温度 25℃, 相对湿度 60%, 12 h 昼/夜循环照明, 自由进食、饮水。

小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 3 组: 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组、1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组及对照组。每组 10 只, 每组分 2 笼饲养, 每笼 5 只。500 和 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠分别经颈背部皮下注射 500 和 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖, 对照组小鼠按体重经颈背部注射 0.9% 生理盐水 1 次/d, 持续 8 周。本研究所用动物实验方法通过中南大学实验动物学系的审批。

1.3.2 SOD、GSH-Px、MDA 的检测 给药结束后, 小鼠禁食 24 h, 经水合氯醛麻醉, 摘眼球取血, 室温静置 1 h, 4℃、12 000 r/min 离心分离血清, 保存于 -20℃。同时取肝、脑组织保存于 -80℃ 备用。严格按试剂盒说明书进行操作, 测定血清 SOD、GSH-Px 及 MDA。制备肝脏和脑组织匀浆液, 4℃、12 000 r/min 离心, 测定 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量。

1.3.3 苏木精-伊红(HE)染色 解剖小鼠时取部分肝脏和脑组织于 10% 甲醛浸泡, 脱水后石蜡包埋, 切片, 行 HE 染色, 样品扫描后用 Case Viewer 软件分析。

1.3.4 Western blotting 制备肝脏和脑组织匀浆液, 4℃、12 000 r/min 离心, 取上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将电泳后的蛋白转至 PVDF 膜上, 用 5% 牛血清蛋白 TBST 溶液室温封闭 1 h, 相继孵育一抗(抗 HO-1 和抗 β -actin)和二抗。采用 ECL 发光显色, AlphaView 软件进行条带分析。

1.4 统计学方法

数据处理分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高剂量 D-半乳糖诱导 C57BL/6J 小鼠发生形态学改变

3 组小鼠初始体重比较, 经方差分析, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 3 组小鼠末次体重比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 且 3 组体重增值均 > 7 g(见表 1)。小鼠在形态表现上也有较大差异, 从第 6 周开始, 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠

表 1 3 组小鼠药物干预第 1 天和最后 1 天的体重比较
($n=10, g, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	最后 1 天
对照组	24.660 ± 0.680	30.600 ± 0.758
500 mg/(kg·d) D-半乳糖组	24.700 ± 0.570	28.000 ± 0.224
1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组	24.580 ± 0.618	25.240 ± 0.483
F 值	0.480	125.604
P 值	0.953	0.000



图 1 3 组小鼠外观形态变化

组 ($P < 0.05$); 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠血清、肝脏和脑组织 SOD 活性低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2.2 GSH-Px 活性 3 组小鼠血清、肝脏和脑组织 GSH-Px 活性比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD- t 检验, 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠血清、肝脏和脑组织 GSH-Px 活性低于对照组 ($P < 0.05$); 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠血清、肝脏和脑组织 GSH-Px 活性低于对照组 ($P < 0.05$); 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠肝脏 GSH-Px 活性低于 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组 ($P < 0.05$)。

2.2.3 MDA 含量 3 组小鼠血清、肝脏和脑组织 MDA 含量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD- t 检验, 500 mg/(kg·d)

头颈部陆续发生不同程度的脱毛现象, 且随着干预时间延长, D-半乳糖组小鼠毛色逐渐泛黄, 出现精神萎靡、皮肤弹性变差等 (见图 1)。

2.2 3 组小鼠血清、肝脏和脑组织生化指标比较

2.2.1 SOD 活性 3 组小鼠血清、肝脏和脑组织 SOD 活性比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD- t 检验, 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠脑组织 SOD 活性低于对照

D-半乳糖组小鼠血清、肝脏和脑组织 MDA 含量高于对照组 ($P < 0.05$); 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠血清、肝脏和脑组织 MDA 含量高于对照组 ($P < 0.05$); 1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组小鼠血清和肝脏 MDA 含量高于 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组 ($P < 0.05$)。见表 2 ~ 4 和图 2。

2.3 肝脏和脑组织 HE 染色结果

对照组肝组织切片显示细胞核大且圆, 肝索排列整齐, 细胞无变性或者坏死, D-半乳糖处理后肝细胞出现点状坏死、水肿和空泡样变性, 并且出现淋巴细胞浸润, 肝索排列排混乱 (见图 3A ~ C)。从脑组织海马区齿状回切片可以观察到, 与对照组比较, D-半乳糖处理过的小鼠脑颗粒细胞排列混乱, 细胞形状变小, 细胞核形状改变, 发生固缩, 且核深染 (见图 3D ~ F)。

表 2 3 组小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

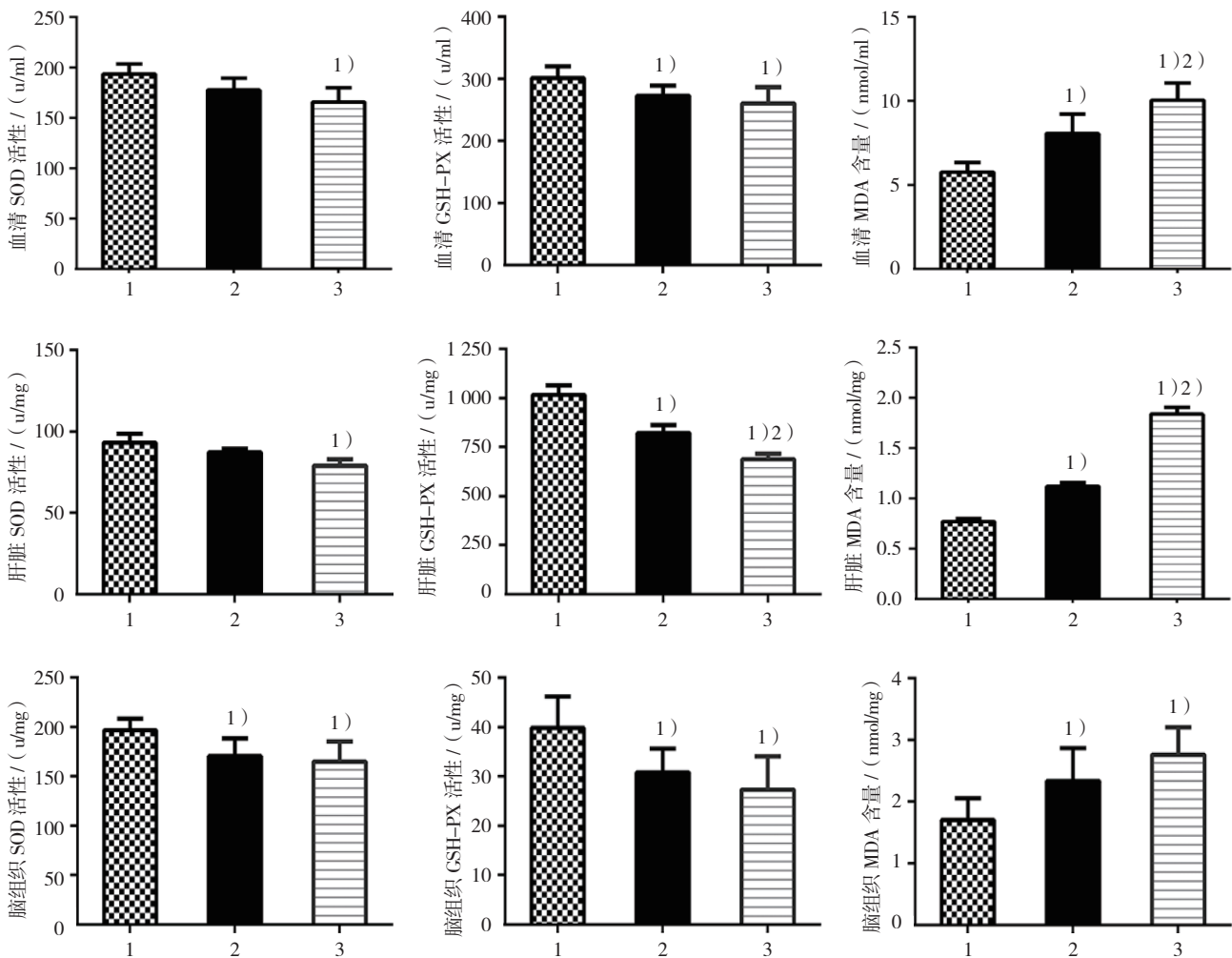
组别	SOD/(u/ml)	GSH-Px/(u/ml)	MDA/(nmol/ml)
对照组	198.85 ± 9.96	301.58 ± 18.28	5.79 ± 0.57
500 mg/(kg·d) D-半乳糖组	177.81 ± 11.83	272.53 ± 16.43	8.07 ± 1.15
1 000 mg/(kg·d) D-半乳糖组	166.00 ± 13.93	260.00 ± 26.26	10.06 ± 1.02
F 值	7.143	5.379	27.496
P 值	0.008	0.020	0.000

表 3 3 组小鼠肝脏 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/ (u/mg)	GSH-Px/ (u/mg)	MDA/ (nmol/mg)
对照组	92.84 ± 5.81	1 015.56 ± 47.45	0.77 ± 0.03
500 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组	87.23 ± 2.03	820.07 ± 41.81	1.12 ± 0.03
1 000 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组	78.69 ± 4.29	687.13 ± 28.63	1.83 ± 0.07
F 值	14.971	95.454	677.962
P 值	0.000	0.000	0.000

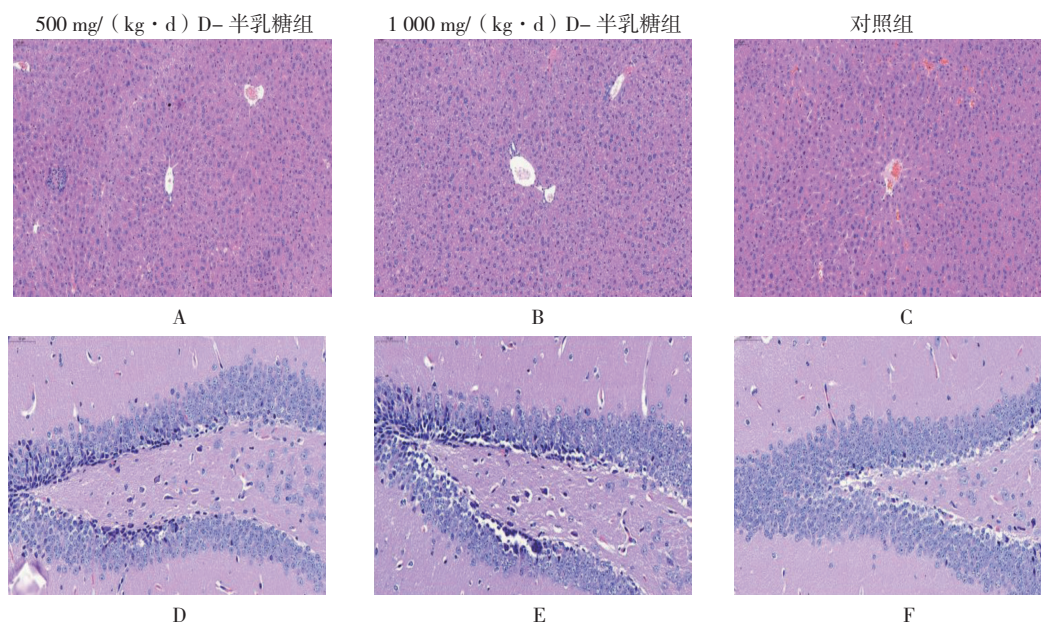
表 4 3 组小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/ (u/mg)	GSH-Px/ (u/mg)	MDA/ (nmol/mg)
对照组	196.32 ± 12.14	39.83 ± 6.34	1.70 ± 0.35
500 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组	170.54 ± 17.61	30.80 ± 4.78	2.33 ± 0.54
1 000 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组	164.71 ± 20.30	27.34 ± 6.68	2.76 ± 0.44
F 值	4.968	6.053	7.669
P 值	0.025	0.014	0.006



1: 对照组; 2: 500 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组; 3: 1 000 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组。1) 与对照组比较, P<0.05; 2) 与 500 mg/ (kg · d) D- 半乳糖组比较, P<0.05

图 2 3 组小鼠血清、肝、脑组织生化指标比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)



A、B、C: 肝脏 (×300); D、E、F: 脑组织海马区齿状回 (×500)

图 3 小鼠肝脏和脑组织病理切片图 (HE 染色)

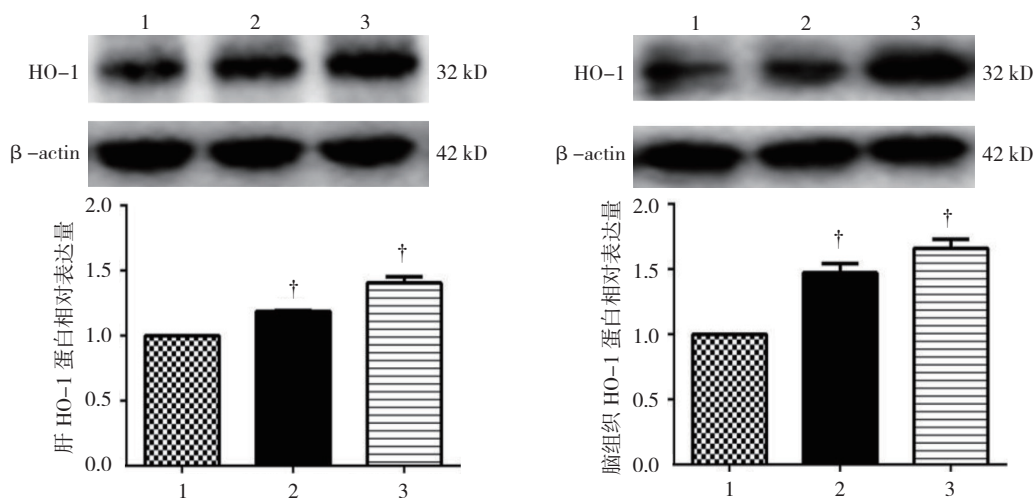
2.4 肝脏和脑组织 HO-1 蛋白的表达

3 组大鼠肝脏 HO-1 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组肝 HO-1 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$); 1000 mg/(kg·d) D-半乳糖组肝 HO-1 表达水平高于 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组 ($P < 0.05$)。3 组大鼠脑组织 HO-1 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组脑 HO-1 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$);

1000 mg/(kg·d) D-半乳糖组脑 HO-1 表达水平高于 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

表 5 3 组小鼠肝脏和脑组织 HO-1 蛋白表达水平比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	肝脏	脑组织
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
500 mg/(kg·d) D-半乳糖组	1.22 ± 0.03	1.41 ± 0.09
1000 mg/(kg·d) D-半乳糖组	1.48 ± 0.09	1.82 ± 0.10
F 值	161.525	104.939
P 值	0.000	0.000



1: 对照组; 2: 500 mg/(kg·d) D-半乳糖组; 3: 1000 mg/(kg·d) D-半乳糖组。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 小鼠肝脏和脑组织 HO-1 的表达

3 讨论

以往研究对于动物衰老模型的选择包括以下 5 种: ①自然衰老小鼠; ②快速衰老小鼠 SAMP8^[4]; ③胸腺切除小鼠^[5]; ④ γ 射线辐射衰老小鼠模型^[6]; ⑤ D- 半乳糖诱导的衰老小鼠模型。其中 D- 半乳糖法复制衰老小鼠模型由我国学者龚国清等^[7]在 1991 年提出, 因其操作简便、成本低廉和周期短等优点, 受到众多科研工作者青睐。不同文献报道中使用的 D- 半乳糖剂量并不一致, 最低为 50 mg/(kg·d)^[8], 而最高可达 1 250 mg/(kg·d)^[9], 但多数研究剂量为 120 ~ 200 mg/(kg·d)^[10-11], 小鼠品种多为 ICR 和昆明种。目前未见关于 D- 半乳糖处理的小鼠是否会发生明显形态学改变的报道。C57BL/6J 近交系小鼠相比 ICR 和昆明小鼠具有个体差异小、生长速率慢的特点, 用于多种领域的研究^[12-13]。关于 D- 半乳糖诱导衰老的机制仍不明确, 目前有 2 种猜想: 一种认为在半乳糖氧化酶的催化下, D- 半乳糖反应产生醛糖和过氧化氢, 导致 ROS 增加和超氧自由基大量累积, 使机体受到损伤, 发生衰老^[14]; 另一种观点认为, 在醛糖还原作用下, 体内高浓度 D- 半乳糖被还原为半乳糖醇, 不能发生进一步代谢而在细胞内累积, 影响到渗透压, 继而导致细胞发生肿胀和功能障碍^[15]。本研究采用高浓度 D- 半乳糖 500 mg/(kg·d) 和 1 000 mg/(kg·d) 诱导小鼠衰老模型, 研究其对小鼠体内氧化应激相关指标的影响及对小鼠外观形态上的改变。

结本研究果发现, 3 组药物干预初始体重体重无显著性差异, 而末次体重 D- 半乳糖组较对照组低, 说明 D- 半乳糖对小鼠体重有一定影响。此外, 本研究中, 3 组初次和末次体重增值均 >7 g, 而其他研究中 ICR 和昆明小鼠 8 周内体重增值均 <10 g^[16-17], 说明 C57BL/6J 个体差异相对较小, 生长速率慢, 体重对后续检测指标影响小, 有利于提高检测结果的可比性。1 000 mg/(kg·d) D- 半乳糖处理 8 周后的小鼠头颈部出现脱毛现象, 而其他部位没有, 该症状通常与干细胞、细胞凋亡、氧化应激及黑色素含量丧失密切相关, 与人体衰老特征相似^[18-19], 但这种脱毛以 1 个部位为中心的现象也类似斑秃, 这是一种慢性炎症自身免疫性疾病, 以无疤痕脱发为主要表现^[20]。研究发现, 斑秃与许多因素相关, 其中就包括氧化应激^[21]。但 D- 半乳糖是否会诱导出现斑秃并没有报道, 还有待进一步研究。

SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量与氧化应激和

衰老密切相关^[22-23]。其中, SOD 与 GSH-Px 具有很强的清除自由基能力, 是机体重要的抗氧化酶, MDA 含量能反映脂质过氧化的程度及自由基对组织和细胞的攻击作用^[24]。结果显示, D- 半乳糖处理过后对以上指标都产生影响, 尽管 500 和 1 000 mg/(kg·d) D- 半乳糖组并不是所有指标都有差异, 但从趋势上看 1000 mg/(kg·d) D- 半乳糖组对以上指标影响更大。

衰老在细胞层面常常表现出细胞体积缩小, 水分减少、核变形固缩、异常分叶、染色加深等病理学改变^[25]。本研究结果发现, 小鼠肝小叶细胞出现水肿、点状坏死等病理学改变, 这与炎症密切相关, 提示 D- 半乳糖诱导的衰老模型可能同时伴随着组织炎症反应, 脑海马区齿状回颗粒细胞核深染固缩, 这与细胞衰老所表现出的现象一致。

HO-1 是血红素加氧酶中的诱导型酶, 近年来发现其广泛参与体内抗炎与抗氧化过程, 机体在正常情况下, HO-1 的表达水平很低, 但出现氧化应激时, 作为应激蛋白 HO-1 表达水平会明显升高以抑制损伤的发生^[26-27]。目前小鼠衰老模型的主要检测指标仍为生化指标, 尚无检测 HO-1 的报道, 本研究显示, D- 半乳糖组小鼠肝脏和脑组织中 HO-1 表达水平高于对照组, 证实 HO-1 与小鼠衰老密切相关。1 000 mg/(kg·d) D- 半乳糖组 HO-1 表达水平比 500 mg/(kg·d) D- 半乳糖组更高, 这与生化检测结果趋势基本一致。

D- 半乳糖诱导的小鼠衰老模型是一种简便的氧化应激和抗氧化、抗衰老的研究方法。虽然目前仍存在争议, 但是已广泛应用到氧化应激相关研究中。本研究选用高剂量 D- 半乳糖诱导个体差异较小的近交系小鼠 C57BL/6J, 成功地复制一种可用于氧化应激和抗氧化、抗衰老研究的衰老模型。

参 考 文 献:

- [1] DIAMANTI-KANDARAKIS E, DATTOLO M, MACUT D, et al. Mechanisms in endocrinology: aging and anti-aging: a combination of endocrinology overview[J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 176(6): R283-R308.
- [2] FORMAN H J. Redox signaling: an evolution from free radicals to aging[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 97: 398-407.
- [3] JYOTI A, MISHRA N, DHAS Y. Ageing: consequences of excessive free radicals and inflammation[J]. *Current Science*, 2016, 111(11): 1787-1793.
- [4] AKIGUCHI I, PALLAS M, BUDKA H, et al. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: toshio Takeda's legacy and future directions[J]. *Neuropathology*, 2017, 37(4): 293-305.

- [5] DUTARTRE P, PASCAL M. Thymectomy at weaning. An accelerated aging model for the mouse immune system[J]. *Mech Ageing Dev*, 1991, 59(3): 275-289.
- [6] 梁欣, 李文丽, 海春旭, 等. γ 射线照射引起氧化损伤促进衰老[J]. *癌变 畸变 突变*, 2010(05): 335-338.
- [7] 龚国清, 徐猷本. 小鼠衰老模型研究[J]. *中国药科大学学报*, 1991, (2): 101-103.
- [8] YU X, LI S, YANG D, et al. A novel strain of lactobacillus mucosae isolated from a gaotian villager improves in vitro and in vivo antioxidant as well as biological properties in D-galactose-induced aging mice[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(2): 903-914.
- [9] WANG P, SUN H, LIU C, et al. Racemic oleracein E increases the survival rate and attenuates memory impairment in D-galactose/NaNO₂-induced senescent mice[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(5): 460-467.
- [10] LEI L, OU L, YU X. The antioxidant effect of asparagus cochinchinensis (Lour). Merr. shoot in D-galactose induced mice aging model and in vitro[J]. *J Chin Med Assoc*, 2016, 79(4): 205-211.
- [11] YE Y, JIA R, TANG L, et al. In vivo antioxidant and anti-skin-aging activities of ethyl acetate extraction from idesia polycarpa defatted fruit residue in aging mice induced by D-Galactose[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, DOI: org/10.1155/2014/185716.
- [12] ZHAO R L, HE Y M. Network pharmacology analysis of the anti-cancer pharmacological mechanisms of Ganoderma lucidum extract with experimental support using Hepa1-6-bearing C57 BL/6 mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210: 287-295.
- [13] SHANG Y, WANG L, LI Y, et al. Vinpocetine improves scopolamine induced learning and memory dysfunction in C57 BL/6J mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(9): 1412-1418.
- [14] QU Z, ZHANG J, YANG H, et al. Protective effect of tetrahydropalmatine against D-galactose induced memory impairment in rat[J]. *Physiol Behav*, 2016, 154(11): 114-125.
- [15] 雷鸣, 朱祖健. D-半乳糖致衰老的研究进展[J]. *解剖科学进展*, 2011, 17(1): 83-85.
- [16] 黄双. D-半乳糖致小鼠衰老模型剂量和给药方式探讨[D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- [17] 李小梅, 周云龙, 高焱焱, 等. 猪胎盘水提取物对 D-半乳糖诱导衰老小鼠抗氧化及学习记忆调节作用的影响[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(23): 2696-2700.
- [18] LEI M X, CHUONG C M. Aging, alopecia, and stem cells[J]. *Science*, 2016, 351(6273): 559-560.
- [19] MIRMIRANI P. Age-related hair changes in men: mechanisms and management of alopecia and graying[J]. *Maturitas*, 2015, 80(1): 58-62.
- [20] LI Y, KILANI R T, PAKYARI M, et al. Increased expression of PD-L1 and PD-L2 in dermal fibroblasts from alopecia areata mice[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2590-2601.
- [21] PRIE B E, VOICULESCU V M, IONESCU-BOZDOG O B, et al. Oxidative stress and alopecia areata[J]. *J Med Life*, 2015, 8: 43-46.
- [22] SELVARATNAM J S, ROBAIRE B. Effects of aging and oxidative stress on spermatozoa of superoxide-dismutase 1 and catalase-null mice[J]. *Biol Reprod*, 2016, 95(3): 1-13.
- [23] SUNDE R A, ZEMAITIS E N, BLINK A B, et al. Impact of glutathione peroxidase-1 (Gpx1) genotype on selenoenzyme and transcript expression when repleting selenium-deficient mice[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 2018: 1-11.
- [24] YONNY M E, GARCIA E M, LOPEZ A, et al. Measurement of malondialdehyde as oxidative stress biomarker in goat plasma by HPLC-DAD[J]. *Microchem J*, 2016, 129: 281-285.
- [25] PANNESE E. Neuroglial cells: morphological changes during normal aging[J]. *Rend Lincei-Sci Fis*, 2013, 24(2): 101-106.
- [26] SHU L, WANG C, WANG J, et al. The neuroprotection of hypoxic preconditioning on rat brain against traumatic brain injury by up-regulated transcription factor Nrf2 and HO-1 expression[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 611: 74-80.
- [27] 李艳丽, 徐功玉, 肖金文, 等. 血红素加氧酶 1 在斑马鱼低氧应激中的保护作用研究[J]. *水生生物学报*, 2017(1): 43-49.

(童颖丹 编辑)