

基于斑马鱼模型的紫河车冻干粉水提物抗衰老功效研究

孙晨^{1#}, 洪凡真^{2#}, 李艳彤³, 巴帅康¹, 郑红宝¹, 张云¹, 臧传宝⁴, 付开玲⁴, 张虎⁴, 侯海荣¹, 任季禹^{4*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

2. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

3. 山东电力中心医院, 山东 济南 250001

4. 银丰低温医学科技有限公司, 山东 济南 250000

摘要:目的 应用斑马鱼模型评价紫河车冻干粉水提物(PHFAE)抗衰老的功效。方法 将健康产妇新鲜胎盘冷冻干燥后碾磨为粉, 并使用蒸馏水进行提取, 制成紫河车冻干粉水提物(PHFAE)。发育8 h(8 hpf)的AB系斑马鱼使用PHFAE(0、1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)连续作用72 h, 对其体内 β -半乳糖苷酶进行染色。随后将AB系与皮肤荧光转基因斑马鱼均随机分成对照组、模型组和PHFAE(1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组, 对照组给予培养水, 模型组给予0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液制备氧化损伤模型, PHFAE组同时给予 H_2O_2 与不同浓度PHFAE, 连续作用72 h后, 测定皮肤表面荧光斑点的数量; 试剂盒法检测鱼体内活性氧(ROS)含量; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测 ampk 、 mdm2 、 Cu/Zn-sod 和 Mn-sod 的mRNA表达变化。结果 与对照组比较, 1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PHFAE组斑马鱼体内 β -半乳糖苷酶的活性均显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PHFAE显著抑制 H_2O_2 诱导的角质细胞的死亡($P<0.01$), 明显抑制ROS的积聚, 显著升高 ampk 、 mdm2 、 Cu/Zn-sod 和 Mn-sod 的mRNA表达($P<0.01$)。结论 PHFAE通过调控 ampk 、 mdm2 、 Cu/Zn-sod 和 Mn-sod 基因的表达, 提高了机体的抗氧化能力, 进而发挥抗衰老之功效。

关键词: 紫河车冻干粉; 水提取; 抗衰老; 抗氧化; 斑马鱼

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)11-2374-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.11.012

Research on anti-senescence effect of *Placenta Hominis* freeze-dried power aqueous extract based on zebrafish

SUN Chen¹, HONG Fanzhen², LI Yanlong³, BA Shuaikang¹, ZHENG Hongbao¹, ZHANG Yun¹, ZANG Chuanbao⁴, FU Kailing⁴, ZHANG Hu⁴, HOU Hairong¹, REN Jiyu⁴

1. Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) Biology Institute, Jinan 250103, China

2. Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

3. Shandong Electric Power Central Hospital, Jinan 250001, China

4. Yinfeng Cryogenic Medical Technology Co., Ltd., Jinan 250000, China

Abstract: Objective To explore the anti-senescence effect of *Placenta Hominis* freeze-dried power aqueous extract (PHFAE) *in vivo*.

Methods The fresh placentas from healthy puerperae were freeze-dried. Then, they were ground into powder, and extracted by water to prepare the water extracts from *Placenta Hominis* freeze-dried power. 8 hpf AB strain zebrafish were treated with the different concentrations of PHFAE (0, 1, 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 72 h. Followingly, zebrafish β -galactosidase was stained. Then both AB and Tg ($\text{kr}4$: NTR-hKikGR) strain zebrafish were divided into control, model and PHFAE (0, 1, 10 and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) groups. The control group was given zebrafish culture water, the model group was given 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 solution to prepare oxidative damage model, and the administration group was given H_2O_2 solution and different concentrations of PHFAE at the same time. After 72 h of

收稿日期: 2023-05-14

基金项目: 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目(2022TSGC1036); 山东省自然科学基金面上项目(ZR2022MD102); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2022PX061, 2022PX021)。

#共同第一作者: 孙晨 E-mail: mornings0123@163.com

洪凡真 E-mail: hongfz@sdu.edu.cn

*通信作者: 任季禹, 中级工程师, 研究方向为冻干技术产品和服务的开发及应用。E-mail: renjiyu@yinfeng.com.cn

treatment, the number of fluorescent spots on the skin surface were detected, content of reactive oxygen species were detected by kits, and the expressions of *ampk*, *mdm2*, *Cu/Zn-sod* and *Mn-sod* were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with control group, the activity of β -galactosidase in PHFAE group of 1, 10, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared to model group, PHFAE of 1, 10, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ significantly inhibited H_2O_2 induced keratinocyte death ($P < 0.01$), significantly inhibited ROS accumulation, and significantly increased mRNA expression of *ampk*, *mdm2*, *Cu/Zn-sod*, and *Mn-sod* ($P < 0.01$). **Conclusion** PHFAE can improve the antioxidant capacity of the body and play the anti-aging effect by regulating the expressions of *ampk*, *mdm2*, *Cu/Zn-sod* and *Mn-sod* genes.

Key words: *Placenta Hominis* freeze-dried power; aqueous extraction; anti-aging; antioxidation; zebrafish

紫河车又名胞衣、胎盘、混沌衣等,始载于《本草拾遗》:主血气羸瘦、妇人劳损、面瘦皮黑、腹内诸病渐瘦悴者^[1]。中医认为紫河车具有温肾补精、益气养血之功效^[2]。现代药理学研究发现,紫河车富含多种免疫因子、维生素和微量元素等,可调节机体激素水平,具有抗衰老之功效,但是其具体的作用机制目前尚不十分明确^[3-4]。

斑马鱼是近年来新兴起的一种脊椎类模式生物,个体较小、发育迅速、繁殖力强、体外受精、体外发育、发育早期全身透明。它不但在基因和蛋白水平与人类高度同源,在发育过程、器官构造、生理功能等方面更是与人类十分相似^[5-7]。研究表明,斑马鱼的老化与人类的衰老过程十分相似,均表现出体内脂褐素的积累、认知功能下降等^[8]。在诸多潜在的衰老驱动因素中,只有端粒不断缩短是目前唯一已知的遵循发育程序调控的时钟规律。斑马鱼端粒的长度与小鼠相比,更接近人类;且与小鼠相比,斑马鱼的体细胞和人类体细胞一样,均不存在端粒酶活性^[9-10]。基于上述特点,以斑马鱼为实验动物,进行抗衰老研究独具优势。与酿酒酵母、线虫和果蝇等低等模式动物相比,斑马鱼实验所得结果更适用于人体;与啮齿类小鼠或灵长类恒河猴等相比,斑马鱼实验不但所需样本量少,且实验总耗时短,可实现微克级样品的高通量快速筛选,大大节省实验成本。本研究以斑马鱼为实验动物,对紫河车冻干粉水提物(*Placenta Hominis* freeze-dried power aqueous extract, PHFAE)的抗衰老功效与机制进行了研究,旨在为紫河车这一中国传统中药的抗衰老活性提供新的实验数据。

1 材料

1.1 实验动物

野生AB系和皮肤荧光转基因斑马鱼(*Tg:krt4:NTR-hKikGR*)均由山东省科学院斑马鱼药物筛选平台提供。斑马鱼的饲养和繁殖参照文献报道^[11]。6月龄雌、雄斑马鱼在28.5℃、14 h光照/10 h黑暗条件下分开养殖,每日于10:00(am)和4:00(pm)

分别喂食2次丰年虫。交配获取胚胎前日,将健康成熟斑马鱼按雌雄比1:2的比例放入交配缸内,中间放置隔板,置于黑暗环境中。次日亮灯前抽去隔板,光照刺激雌鱼排卵。排卵后半小时将成鱼捞出,收集受精卵,并对其进行消毒。将受精卵置于28.5℃恒温培养箱中,保持14 h光照/10 h黑暗周期培养。

1.2 药物与主要试剂

胎盘由山东省妇幼保健院产妇捐献,捐献及后续处理当事人均知情并同意。人源胎盘使用过程严格遵照《卫生部关于产妇分娩后胎盘处理问题的批复》(卫政法发[2005]123号)的相关规定。 β -半乳糖苷酶活性检测试剂盒与活性氧(ROS)检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;过氧化氢(H_2O_2)溶液购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RNA提取试剂盒、反转录试剂盒与qPCR试剂盒均购自诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器

GZL-3型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);SZX16体视荧光显微镜、DP2-BSW图像软件、FSX100智能生物图像导航仪(日本Olympus公司);斑马鱼饲养繁殖系统(北京爱生科技有限公司);311型水套式二氧化碳培养箱(美国ThermoForma公司);实时荧光定量PCR(RT-qPCR)仪、酶标仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 PHFAE制备

取自健康产妇的新鲜胎盘低温运至实验室后,去除羊膜和周边组织,0.9%氯化钠溶液反复清洗后搅碎。-40℃条件下冷冻胎盘,随后将其置于真空冷冻干燥箱内冷冻干燥。碾磨干燥后的胎盘组织,制成冻干粉。随后称取20 g冻干粉,加入20倍量蒸馏水,室温静置12 h后5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,收集上清液,旋转蒸发器于45℃减压浓缩至干,制备成PHFAE干浸膏,收率为28.54%。采用紫外分光光度法,测定干浸膏中

总蛋白质质量分数为40.68%，总磷脂质量分数为15.80%。

2.2 β -半乳糖苷酶活性检测

将受精后8 h(8 hpf)的AB系斑马鱼随机分成对照组和PHFAE 1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组，每组同时设置3个平行孔，每孔15个胚胎。上述各组均置于28.5 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中连续处理72 h后，首先使用斑马鱼培养水清洗胚胎，随后使用 β -半乳糖苷酶染色试剂盒对斑马鱼体内的 β -半乳糖苷酶进行染色。结束后于显微镜下观察拍照，应用Image-Pro Plus软件测量着色强度。

2.3 皮肤荧光斑点数量检测

将8 hpf的皮肤荧光转基因斑马鱼 *Tg(krt4:NTR-hKikGR)* 随机分成对照组、模型组和PHFAE(1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组，每组同时设置3个平行孔，每孔15个胚胎。对照组中不添加任何药物或待测物，模型组中添加终浓度为0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 ^[12]，PHFAE组中同时添加终浓度为0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 和不同浓度PHFAE。上述各组均置于28.5 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中连续处理72 h后，荧光显微镜下观察拍照，应用Image-Pro Plus软件计数皮肤表面荧光点的数目。

2.4 ROS含量检测

如“2.3”项所述处理受精8 hpf的AB系斑马鱼胚胎后，利用ROS检测试剂盒对斑马鱼体内的ROS进行荧光探针标记，随后在荧光显微镜下观察，并在相同曝光条件下拍照。

2.5 基因表达检测

如“2.3”项所述处理受精8 hpf的AB系斑马鱼胚胎后，应用试剂盒分别提取各组斑马鱼的总RNA，并将其反转录为cDNA。荧光实时定量PCR(qRT-PCR)扩增条件见表1。结果分析时以 β -actin为内参。内参与目的基因的引物序列见表2。

表1 qRT-PCR扩增条件
Table 1 qRT-PCR amplifying condition

步骤	循环数	温度/ $^{\circ}\text{C}$	t/s
预变性	1	95	30
循环反应	40	95	10
		60	30
		95	15
融解曲线	1	95	15
		60	60
		95	15

表2 引物序列信息

Table 2 Details of primers sequences

基因名称	引物序列/(5'→3')
β -actin	L-AGAGCTATGAGCTGCCTGACG
	R-CCGCAAGATTCCATACCCA
ampk	L-ATCATAGACAACCGCCGCATTA
	R-TTGGCTCGCCGTACACCA
mdm2	L-GACTACTGGAAGTGTCCCAAAT
	R-GTCCACTCCATCATCTGTTTCT
Cu/Zn-sod	L:GTCGTCTGGCTTGTGGAGTG
	R:TGTCAGCGGGCTAGTGCTT
Mn-sod	L:CCGACTATGTTAAGGCCATCT
	R:ACACTCGGTTGCTCTCTTTTCTCT

2.6 统计学分析

采用GraphPad软件对数据进行统计学分析并作图，计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。3组或以上数据之间应用One-way-ANOVA进行检验，两组数据之间应用t-test进行检验。

3 结果

3.1 PHFAE抑制斑马鱼体内 β -半乳糖苷酶的活性

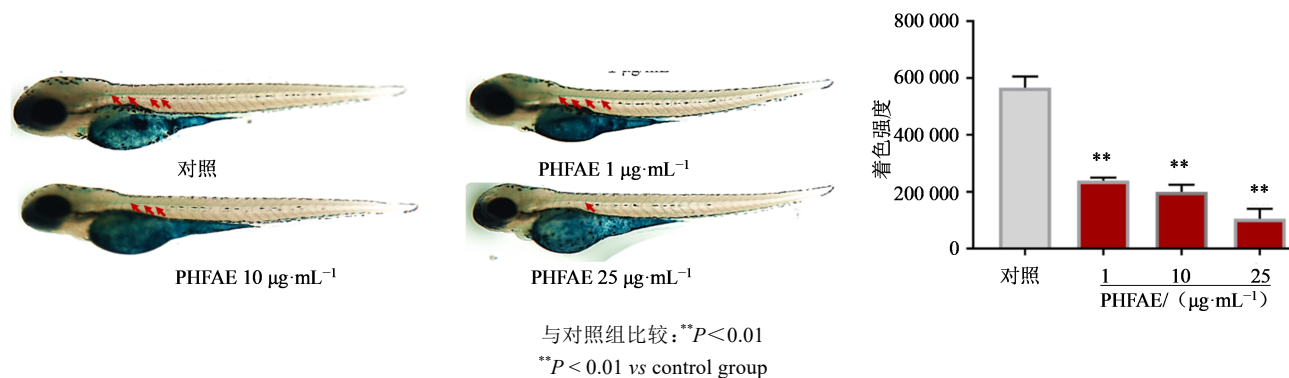
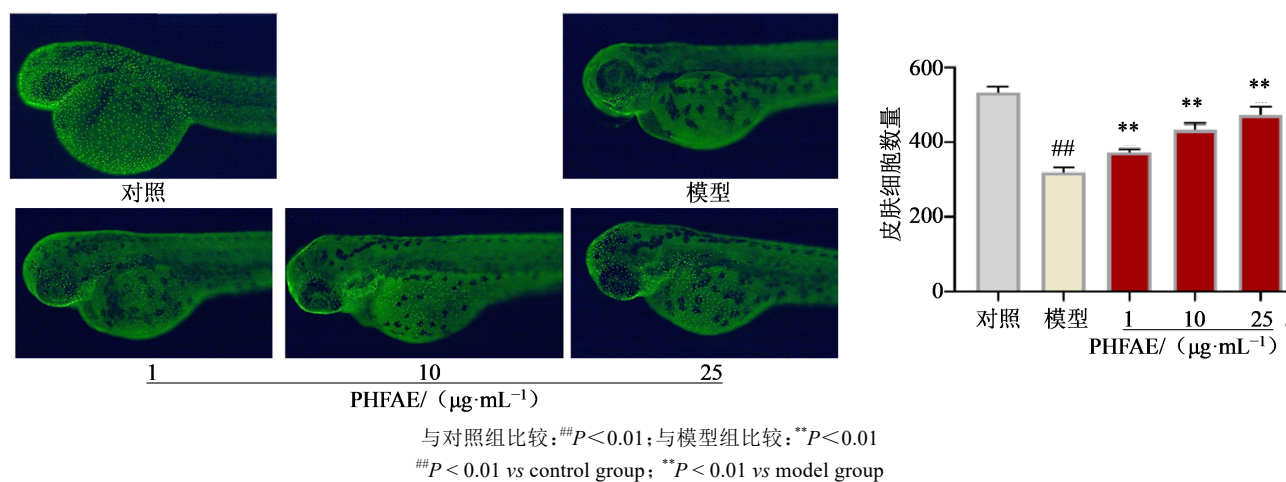
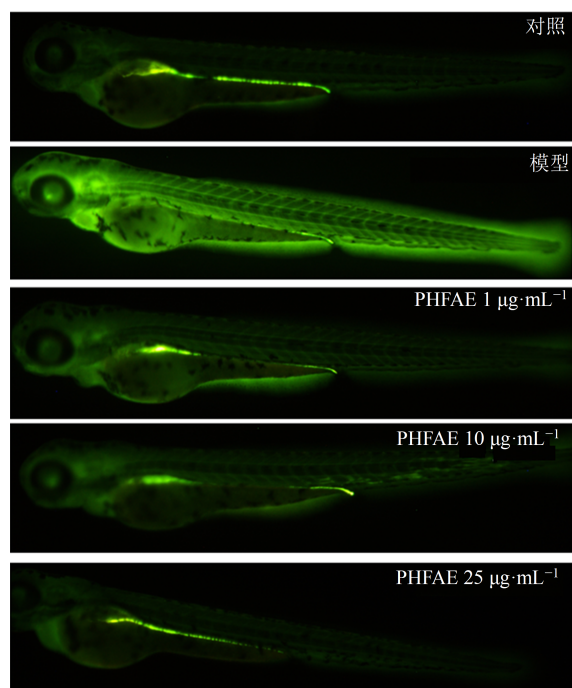
如图1所示，使用1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PHFAE连续作用8 hpf的斑马鱼72 h后，与对照组比较，斑马鱼体内 β -半乳糖苷酶的活性均显著降低($P<0.01$)。由于 β -半乳糖苷酶是一种细胞溶酶体中的水解酶，其活性的升高是细胞老化的显著特征^[13]。因此本实验结果表明，PHFAE具有一定的抗衰老功效。

3.2 PHFAE增强斑马鱼的抗氧化能力

*Tg(krt4:NTR-hKikGR)*品系斑马鱼是一种可快速评价活性物质抗氧化能力的转基因斑马鱼，其皮肤表面角质细胞均被绿色荧光特异标记^[14]。与对照组相比，0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 连续作用上述转基因斑马鱼后，虽对其存活率未造成影响，但是却诱导该转基因斑马鱼发生了氧化损伤，促使其抗氧化能力减弱，诱导角质细胞死亡，进而造成斑马鱼皮肤表面绿色荧光斑点数量显著减少($P<0.01$)。当使用1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PHFAE与 H_2O_2 同时作用该转基因斑马鱼时，与模型组相比，皮肤表面荧光斑点数量明显增多($P<0.01$) (图2)。结果表明，PHFAE在机体内抑制了 H_2O_2 诱导的角质细胞的死亡，因此其具有一定的抗氧化能力。

3.3 PHFAE抑制 H_2O_2 诱导的ROS积聚

如图3所示，与对照组比较，模型组 H_2O_2 可诱导斑马鱼体内产生大量ROS；与对照组比较，1、

图1 PHFAE对斑马鱼体内β-半乳糖苷酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Fig. 1 Effects of PHFAE on activity of β -galactosidase in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=9$)图2 PHFAE对斑马鱼体内H₂O₂诱导的角质细胞死亡的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Fig. 2 Effects of PHFAE on death of keratinocytes induced by H₂O₂ in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=9$)图3 PHFAE对H₂O₂诱导的斑马鱼体内ROS含量的影响
Fig. 3 Effects of PHFAE on level of ROS induced by H₂O₂ in zebrafish

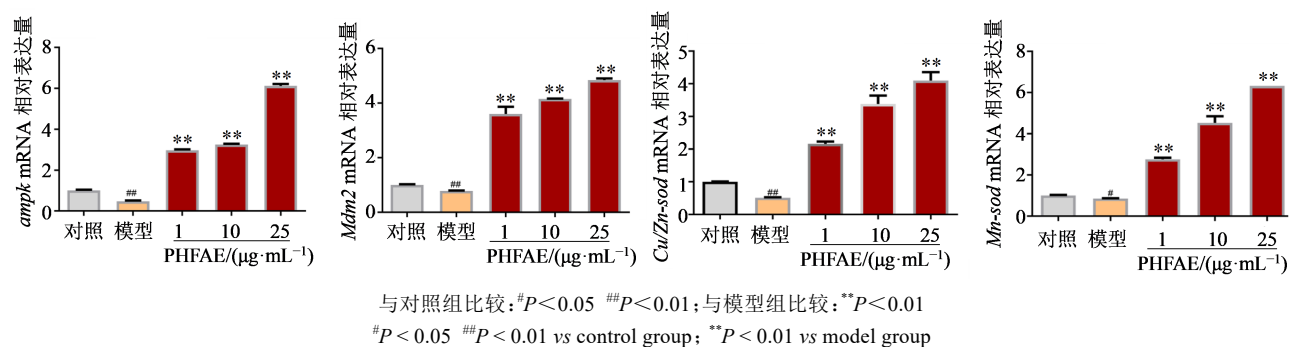
10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PHFAE组ROS水平明显减少。结果表明,PHFAE可抑制机体氧化损伤所导致的ROS的积聚。

3.4 PHFAE调控抗衰老和抗氧化相关基因的表达

如图4所示,与对照组相比,H₂O₂处理可导致斑马鱼体内 *ampk*、*mdm2*、*Cu/Zn-sod*和 *Mn-sod* 基因表达显著下调 ($P < 0.05, 0.01$);当1、10、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PHFAE与H₂O₂共同作用斑马鱼后,与模型组相比,4个基因的表达量均显著上调 ($P < 0.01$)。

4 讨论

紫河车为健康产妇分娩的胎盘加工品,作为一种名贵药材,在我国已有悠久的历史。既往研究虽已广泛报道其具有长寿、抗衰老之功效,但多为经验之医学。本研究从现代生物医药角度出发,对紫河车的抗衰老功效进行了实验验证。本研究所用样本为胎盘冻干处理后水提,可有效避免高温对胎盘中活性物质的破坏。同时本研究以斑马鱼整体为受试对象,可反映紫河冻干粉水提物在体内的吸收、分布、代谢和排泄等动态生理过程。

图4 PHFAE对 $ampk$ 、 $mdm2$ 、 $Cu/Zn-sod$ 和 $Mn-sod$ mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effects of PHFAE on expression of $ampk$, $mdm2$, $Cu/Zn-sod$ and $Mn-sod$ mRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

ROS是机体内一类氧的单电子还原产物。在正常生理条件下,机体具有一套完整的抗氧化体系,可有效调控ROS的含量。但是随着年龄的增加,机体抗氧化能力将逐渐减弱,过量ROS可在体内积聚,进而诱导生物大分子,如脂质、蛋白和核酸等发生过氧化,破坏蛋白结构与功能,抑制DNA转录与翻译,最终降低细胞活性和代谢能力,促使机体衰老^[15-16]。本研究发现,PHFAE可有效提高斑马鱼的抗氧化能力,抑制其体内ROS的过量积聚,该结果提示PHFAE可能通过提高机体的抗氧化能力,进而发挥抗衰老之功效。

$Ampk$ 、 $mdm2$ 、 $Cu/Zn-sod$ 和 $Mn-sod$ 等为抗氧化与抗衰老相关基因,其中 $ampk$ 可编码生成腺苷酸激活蛋白激酶,该激酶是调控能量代谢和衰老的关键因子。研究发现激活 $ampk$ 基因可增加ATP的合成,提高机体能量代谢,进而起到延缓衰老的作用^[17-18]。 $Mdm2$ 的编码蛋白MDM2是抑癌基因p53的重要负调控因子。已有研究发现,P53蛋白活性增加可导致细胞衰老加速。MDM2蛋白可通过3种作用机制抑制P53蛋白的活性:①MDM2可直接与p53基因的转录激活结构域结合,抑制其转录;②MDM2与P53蛋白结合后,可诱导其从细胞核中转运出来,阻止P53蛋白与靶点DNA的结合;③MDM2可诱导P53蛋白发生泛素化,进而诱导其降解^[19-20]。 $Cu/Zn-sod$ 和 $Mn-sod$ 是编码超氧化物歧化酶的2个基因,它们是机体抗氧化酶系的重要组成成员,可有效清除体内过量ROS,起到抗氧化作用^[21]。本研究应用qRT-PCR技术发现,PHFAE可诱导上述4个基因高表达。基于此推测, $ampk$ 、 $mdm2$ 、 $Cu/Zn-sod$ 和 $Mn-sod$ 可能是PHFAE发挥抗氧化和抗衰老功效的分子作用靶点。

本研究发现PHFAE具有一定的抗衰老功效,作用机制可能与其增强机体抗氧化能力有关。在未

来的研究中,本课题组将继续以PHFAE为研究对象,应用啮齿类动物为实验模型,对其抗衰老的作用机制进行更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王亚琼,祝庆华,唐明文,等.紫河车临床应用研究概况[J].亚太传统医药,2020,16(7):189-192.
Wang Y Q, Zhu Q H, Tang M W, et al. Research on the clinical application of *Placenta Hominis* [J]. Asia Pac Tradit Med, 2020, 16(7): 189-192.
- [2] 张莉莉,韦宇,于同月,等.鹿胎膏、阿胶、紫河车补精益髓经验——全小林三味小方撷萃[J].吉林中医药,2020,40(11):1408-1410.
Zhang L L, Wei Y, Yu T Y, et al. Supplementing body essence and marrow experience of Deer Placenta, *Colla Corii Asini*, *Placenta Hominis*—three prescription by professor TONG Xiaolin [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2020, 40(11): 1408-1410.
- [3] 童鑫,王菲,帅维维,等.基于网络药理学探讨紫河车治疗卵巢功能早衰的机制研究[J].中国民间疗法,2022,30(2):104-107.
Tong X, Wang F, Shuai W W, et al. Study on the mechanism of Ziheche in the treatment of premature ovarian failure based on network pharmacology [J]. China's Naturopathy, 2022, 30(2): 104-107.
- [4] 宋航,臧传宝,刘小盾,等.胎盘冻干粉对小鼠延缓衰老作用的研究[J].中国生化药物杂志,2014,34(1):65-67.
Song H, Zhang C B, Liu X D, et al. Anti-aging function of placenta freeze-dried powder on mice [J]. Chin J Biochem Pharmaceut, 2014, 34(1): 65-67.
- [5] Yang H B, Luan Y, Liu T T, et al. A map of cis-regulatory elements and 3D genome structures in zebrafish [J]. Nature, 2020, 588(7837): 337-343.
- [6] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish

- reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [7] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 278-287.
Fan Q q, Li Z q, Chen M l, et al. Research progress on safety evaluation of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(1): 278-287.
- [8] 周玉枝, 闫明亮, 高丽, 等. 衰老动物模型的研究及其在抗衰老药物活性筛选中的应用 [J]. *中草药*, 2017, 48(6): 1061-1071.
Zhou Y Z, Yan M L, Gao L, et al. Study on aging animal models and its application in activity screening of anti-aging drug [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2017, 48(6): 1061-1071.
- [9] Ying Y L, Hu X F, Han P, et al. The non-telomeric evolutionary trajectory of TRF₂ in zebrafish reveals its specific roles in neurodevelopment and aging [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(4): 2081-2095.
- [10] Carneiro M C, de Castro I P, Ferreira M G. Telomeres in aging and disease: Lessons from zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(7): 737-748.
- [11] Monte W. *The Zebrafish Book* [M]. Eugen: Inst of Neuro Science, 2000.
- [12] 张梦斯. 琼玉膏通过 sirt1/p53 信号通路延缓 H₂O₂ 诱导斑马鱼衰老的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
Zhang M S. Study on Qiongyugao delaying the senility of zebrafish induced by H₂O₂ through sirt1/p53 signaling pathway [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [13] Mohamad Kamal N S, Safuan S, Shamsuddin S, et al. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99(6): 151108.
- [14] Chen C F, Chu C Y, Chen T H, et al. Establishment of a transgenic zebrafish line for superficial skin ablation and functional validation of apoptosis modulators *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20654.
- [15] 杨善岚, 吴磊, 涂嘉欣, 等. 自由基致衰老的研究进展 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2022, 26(5): 589-594.
Yang S L, Wu L, Tu J X, et al. Research progress of free radical induced aging [J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2022, 26(5): 589-594.
- [16] Moskalev A, Guvatova Z, De Almeida Lopes I, et al. Targeting aging mechanisms: Pharmacological perspectives [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2022, 33(4): 266-280.
- [17] Jensen T E, Rose A J, Jørgensen S B, et al. Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(5): E1308-E1317.
- [18] 王继岚, 乔巨慧, 刘颖, 等. 人参提取物延缓果蝇衰老的作用及机制研究 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(3): 406-413.
Wang J L, Qiao J H, Liu Y, et al. Anti-aging effect of ginseng extract and its mechanism on *Drosophila melanogaster* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(3): 406-413.
- [19] Chibaya L, Karim B, Zhang H, et al. Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(4): e2003193118.
- [20] Han X, Wei W Y, Sun Y. PROTAC degraders with ligands recruiting MDM2 E3 ubiquitin ligase: An updated perspective [J]. *Acta Mater Med*, 2022, 1(2): 244-259.
- [21] Lu X, Wang C, Liu B. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 42(1): 58-65.

[责任编辑 兰新新]