

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.01.0035

论著

虾青素通过自噬改善快速老化小鼠心脏组织损伤

靳可青, 刘银玥, 王萌, 张绪梅

(天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 天津 300070)

摘要 目的: 研究虾青素对快速老化小鼠心脏组织形态以及纤维化的影响, 并探讨自噬及氧化应激在其中的作用。方法: 将8只正常老化小鼠(SAMR1)作为正常对照组。将56只快速老化小鼠(SAMP10)随机分为模型对照组(16只)、虾青素低剂量[0.4 mg/(g·d)]干预组(8只)、虾青素中剂量[0.8 mg/(g·d)]干预组(16只)、虾青素高剂量[1.6 mg/(g·d)]干预组(8只)和虾青素中剂量加3-甲基腺嘌呤(3-MA)抑制剂组(8只)。苏木精-伊红(HE)染色法检测小鼠心脏组织细胞形态改变。Masson染色检测小鼠心肌组织纤维化程度。比色法检测血浆和心脏组织中氧化应激指标丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的水平。蛋白免疫印迹检测各组小鼠心脏组织微管相关蛋白1轻链3(LC3)和自噬效应蛋白(Beclin-1)的表达。结果: 与SAMR1组相比, SAMP10模型对照组小鼠心肌细胞纤维疏松、排列紊乱、纤维化严重; 血浆和心脏组织MDA水平显著升高、SOD活力显著降低、心脏组织LC3和Beclin-1蛋白表达显著降低($F=23.73, 9.43, 7.04, 14.81, 13.73, 15.38$, 均 $P<0.05$)。与SAMP10模型对照组相比, 虾青素干预后SAMP10小鼠心肌组织形态及纤维化显著改善; 血浆和心脏组织MDA水平显著降低, SOD活力显著升高, 心肌组织LC3和Beclin-1蛋白表达均显著增加(均 $P<0.05$), 且高剂量改善作用最为明显; 与中剂量虾青素干预组相比, 中剂量虾青素加3-MA抑制剂组心脏纤维化程度升高, 血浆和心脏组织MDA水平升高、SOD活力降低、心脏组织LC3和Beclin-1蛋白表达降低($F=18.75, 6.353, 15.77, 14.08, 22.83, 8.657$, 均 $P<0.05$)。结论: 虾青素通过增强自噬、降低氧化应激, 从而改善SAMP10衰老小鼠心脏组织损伤。

关键词 虾青素; SAMP10小鼠; 心脏组织; 自噬

中图分类号 R151

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)01-0035-05

Astaxanthin improves cardiac tissue damage in rapidly aging mice through autophagy

JIN Keqing, LIU Yinyue, WANG Meng, ZHANG Xumei

(Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of astaxanthin on cardiac morphology and fibrosis in rapidly aging mice, and to explore the role of autophagy and oxidative stress. **Methods:** Eight normal aging mice (SAMR1) were used as normal control group. 56 rapidly aging mice (SAMP10) were randomly divided into model control group (16 mice), astaxanthin low-dose [0.4 mg/(g·d)] group (8 mice), astaxanthin medium-dose [0.8 mg/(g·d)] group (16 mice), and astaxanthin high-dose [1.6 mg/(g·d)] group (8 mice) and astaxanthin medium dose plus 3-MA inhibitor group (8 mice). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the morphological changes of mouse heart tissues. Masson staining was used to detect the degree of myocardial fibrosis. The levels of oxidative stress indexes such as malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in plasma and heart tissue were detected by colorimetry. The expressions of microtubule associated protein 1, light chain 3 (LC3) and autophagy effector protein 1 (Beclin-1) in heart tissue were detected by Western blotting. **Results:** Compared with SAMR1 group, SAMP10 model control group showed loose cardiomyocyte fibers, disordered arrangement, increased fibroblasts, severe fibrosis, and significantly increased MDA levels in plasma and heart tissue, SOD activity significantly decreased, LC3 and Beclin-1 protein expression in heart tissue were significantly decreased ($F=23.73, 9.43, 7.04, 14.81, 13.73, 15.38$, all $P<0.05$). However, compared with the SAMP10 model control group, the myocardial morphology and fibrosis were significantly improved, and the plasma and cardiac MDA levels were significantly decreased after astaxanthin intervention in SAMP10 mice, SOD activity significantly increased, and LC3 and Beclin-1 protein expression in myocardial tissue were significantly increased (all $P<0.05$), and the effect of high dose was the most obvious. Compared with the medium-dose astaxanthin group, the degree of cardiac fibrosis in the medium-dose astaxanthin intervention plus 3-MA inhibitor group was increased, MDA levels in plasma and heart tissue were increased, SOD activity was decreased, LC3 and Beclin-1 protein expression in heart tissue were decreased ($F=18.75, 6.353, 15.77, 14.08, 22.83, 8.657$, all $P<0.05$). **Conclusion:** Astaxanthin can improve cardiac tissue damage in SAMP10 aging mice by enhancing autophagy and reducing oxidative stress.

Key words astaxanthin; SAMP10 mice; cardiac tissue; autophagy

基金项目 汤臣倍健营养科学研究基金(TY0181104)

作者简介 靳可青(1999-), 女, 硕士在读, 研究方向: 营养与衰老; 通信作者: 张绪梅, E-mail: zhangxumei@tmu.edu.cn。

随着我国老龄化程度加剧,由年龄导致的心血管事件的发生率和严重程度也显著增加,为老年人的生活和健康带来了极大的负担。心脏衰老与心血管疾病的发生、发展密切相关。衰老心肌的细胞生物学变化主要表现为心肌肥大和纤维化、蛋白质错误折叠和功能失调以及线粒体积累^[1-3]。寻找延缓心肌细胞衰老的有效方法对防治年龄相关的心血管疾病的发生、发展具有重要意义。

虾青素是一种酮式类胡萝卜素,在海洋生物、藻类、真菌及少数植物中广泛存在^[4]。近年来,虾青素已被证明具有广泛的生物效应,例如抗氧化、抗炎和抗肿瘤特性^[5-7]。研究发现,虾青素通过上调和激活沉默调节蛋白1(SIRT1)对高脂饮食诱导的大鼠心脏损伤和纤维化具有保护作用,但虾青素对衰老过程中心脏损伤的影响及具体的调控机制尚不清楚^[8]。

研究显示,虾青素在多种不同疾病模型、组织中均具有调控自噬的能力^[9]。自噬是一种进化上保守的过程,可通过降解细胞器和细胞质蛋白来响应各种形式的应激(如氧化应激)从而维持细胞存活。在健康生理状态下,自噬能够限制错误折叠的蛋白质积累、线粒体功能障碍和氧化应激,从而调节心脏稳态和保护心脏功能。3-MA是经典自噬抑制剂,被广泛应用于自噬研究,Wu等^[10]研究发现,3-MA下调了白细胞介素-33(IL-33)诱导的自噬,导致内质网应激和细胞凋亡增加,减少了IL-33对糖尿病小鼠心脏舒张功能的保护作用。Sun等^[11]发现,3-MA通过抑制自噬预防阿霉素诱导的心脏毒性。在衰老心脏中,自噬活性通常会降低,从而影响心脏的结构和功能^[12]。因此,增强自噬可能是延缓心脏衰老和预防心脏疾病的一个可能靶点。本研究旨在通过使用不同剂量的虾青素对快速老化小鼠进行干预,观察虾青素对衰老心脏组织形态的影响,进一步探讨自噬在虾青素延缓心脏衰老过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 AstaReal A1010 虾青素由汤臣倍健公司提供;3-MA 购自 Sigma-Aldrich;兔抗 β -actin 抗体、兔抗 Beclin 1 抗体、兔抗 LC3 抗体购自美国 CST 公司;山羊抗兔二抗、BCA 蛋白定量试剂盒、苏木素伊红(HE)染色试剂盒购自中国思科捷公司;丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、Masson 染色试剂盒购自中国索莱宝公司。

1.1.2 仪器 倒置荧光显微镜 (IX81)(日本 OLYMPUS 公司);电泳仪、ChemiDoc™ XRS 成像系统(美

国 Bio-RAD 公司);酶标仪(奥地利 TECAN 公司);高速低温离心机(德国 sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及干预 64 只雄性 6 月龄、SPF 级的 SAM 小鼠,购自天津中医药大学附属医院[许可证号:SYXK(京)2019-0002],包括 8 只 SAMR1 和 56 只 SAMP10 小鼠。小鼠于南开大学附属医院动物实验中心饲养。在干预之前进行 1 周的适应性喂养。本实验已获天津医科大学动物伦理委员会批准(伦理审批号:IRM-DWLL-2019063)。根据不同的目的,实验分组如下:第一批正常对照组(con-R1)、模型对照组(con-P10)、低剂量虾青素组[AST L (0.4 mg/(g·d))、中剂量虾青素组[AST M (0.8 mg/(g·d))、高剂量虾青素组[AST H (1.6 mg/(g·d))、第二批模型对照(con-P10)、中剂量虾青素组(ASTM)、中剂量虾青素+抑制剂组 (AST M+3-MA)。AstaReal A1010 虾青素溶于橄榄油中每天通过灌胃干预小鼠 3 个月,con-R1 和 con-P10 每天灌胃同等量的橄榄油。3-MA (1.5 mg/kg) 于处死前 5 d 起每天腹腔注射。

1.2.2 样品制备

1.2.2.1 血清样品 小鼠干预结束后,颈椎脱臼法处死前,股动脉取血放入 3 mL 促凝采血管中,3 000 r/min 离心 15 min 后取上层分离出血清,储存于-80℃冰箱。

1.2.2.2 石蜡切片 将小鼠心脏组织完整取出(每组 4 只),立即浸泡在 4%多聚甲醛中,进行固定 48 h 左右,在梯度酒精中脱水,分别为:75%,1 h;80%,1 h;95%,2 h;100%,5 h。浸泡于二甲苯中使其透明化,3 次,每次 10 min。用 56~58℃溶解的石蜡包埋组织,冷却。将包埋好的脑组织蜡块按冠状位方向用自动切片机切片,每张厚度约为 5 μ m。

1.2.2.3 心脏组织样本 小鼠干预结束后,颈椎脱臼法处死后,将小鼠心脏组织分离并放于冻存管中,液氮中速冻后于-80℃冰箱储存。

1.2.3 HE 染色 根据制造商说明,将石蜡切片脱蜡水化后,苏木素染液染色 5~20 min,冲洗后用伊红染液染色 30 s~2 min,冲洗后脱水、透明、封片、镜下观察拍照。

1.2.4 Masson 染色 根据制造商说明,将石蜡切片脱蜡水化后,用 Weigert 铁苏木素染色液染色 5~10 min,酸性乙醇分化 5~15 s 后用 Masson 蓝液反蓝 3~5 min。冲洗后用丽春红品红染液染色 5~10 min,放入苯胺蓝染色液中染色 1~2 min。冲洗后脱水、透明、封片、镜下观察拍照。

1.2.5 氧化指标检测 按照 SOD、MDA 试剂盒的说明书,检测小鼠心脏组织和血清中 MDA、SOD 活

性。操作过程均参照相应检测试剂盒说明书进行。

1.2.6 Western 印迹检测心脏组织 LC3 和 Beclin-1 的蛋白表达 心脏组织加入裂解液后使用超声仪匀浆提取蛋白,通过 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 电泳,并转移到 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。再加入 LC3、Beclin-1 抗体(1:1 000)和 β -actin 抗体(1:1 000)4℃过夜。TBST 清洗后加相应二抗室温孵育 1 h,使用 Chemi-Doc™ XRS+成像系统进行观察,Image J 2.0 软件进行定量分析。

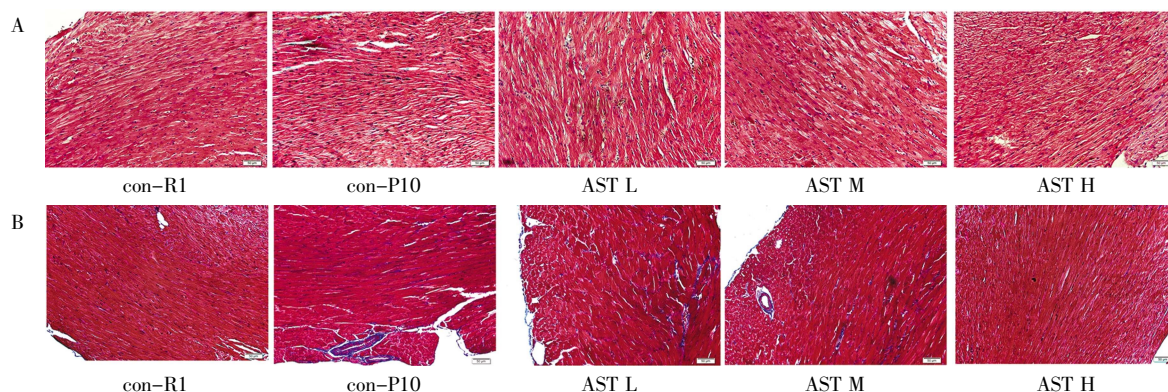
1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析,当数据满足正态分布及方差齐性时,采用单因素方差分析进行多组比较,若多组间存在显著性差异,进一步组间比较采用 SNK-*q* 或 Dunnett-*t* 检验。方差不齐或不满足正态分布采用 Kruskal-

wallis 秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 虾青素对 SAMP10 小鼠心脏组织形态和心肌纤维化的影响 HE 染色可见,con-R1 组心肌结构清晰,细胞排列整齐。con-P10 组心肌细胞肿胀,排列疏松,细胞间隙增大,成纤维细胞增多,胶原纤维增生明显。虾青素干预组与 con-P10 组相比,小鼠心肌细胞均有所改善,且 AST H 组心肌细胞排列较整齐,纤维完整。

Masson 染色结果显示,con-R1 组心肌细胞间胶原纤维网完好,分布均匀。con-P10 组心肌细胞间胶原纤维排列紊乱、分布不均,胶原纤维增生明显。虾青素干预组与 con-P10 组相比,小鼠心肌组织纤维化减少,且 AST H 组胶原纤维增生减轻更明显,见图 1。



注:A:心肌组织 HE 染色(比例尺=50 μ m);B:心肌组织 Masson 染色,蓝色区域为心肌纤维化范围,红色区域为正常心肌范围(比例尺=50 μ m);con-R1:正常对照组;con-P10:模型对照组;AST L:低剂量虾青素干预组;AST M:中剂量虾青素干预组;AST H:高剂量虾青素干预组; $n=4$

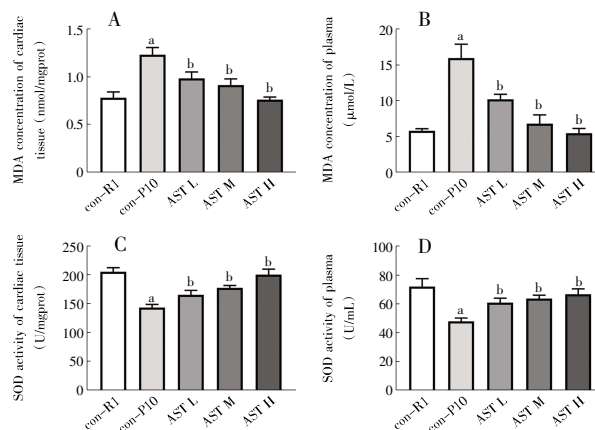
图 1 心脏组织 HE 染色和 Masson 染色

Fig.1 HE staining and Masson staining of heart tissue

2.2 虾青素对 SAMP10 小鼠血浆以及心脏组织氧化应激水平的影响 与 con-R1 组比较,con-P10 组血浆和心脏组织 MDA 水平显著升高($F=23.73, 9.43$, 均 $P<0.05$),而 SOD 活力显著降低($F=7.04, 14.81$, 均 $P<0.05$)。与 con-P10 组相比,虾青素干预后,P10 小鼠血浆和心脏组织 MDA 水平显著降低(均 $P<0.05$),而 SOD 活力显著升高(均 $P<0.05$),见图 2。

2.3 虾青素对 SAMP10 小鼠心脏组织自噬蛋白表达的影响 与 con-R1 组相比,con-P10 组心肌组织 LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 蛋白表达显著降低($F=13.73, 15.38$, 均 $P<0.05$)。与 con-P10 组相比,虾青素干预后小鼠心肌组织 LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 蛋白表达均增加(均 $P<0.05$),见图 3。

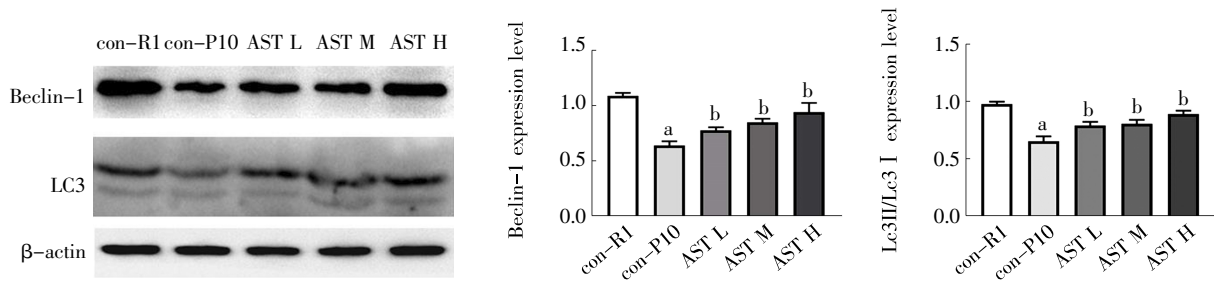
2.4 虾青素通过自噬改善 SAMP10 小鼠心脏组织纤维化 与 AST M 组相比,AST M+3-MA 组心肌细胞肿胀,排列疏松,细胞间隙增大,成纤维细胞增



注:A:心脏组织 MDA 水平;B:血浆 MDA 水平;C:心脏组织 SOD 活力;D:血浆 SOD 活力;与 con-R1 组相比,^a $P<0.05$;与 con-P1 组相比,^b $P<0.05$;MDA:丙二醛;SOD:超氧化物歧化酶;con-R1:正常对照组;con-P10:模型对照组;AST L:低剂量虾青素干预组;AST M:中剂量虾青素干预组;AST H:高剂量虾青素干预组; $n=4$

图 2 小鼠心脏组织以及血浆 MDA 和 SOD 水平

Fig.2 MDA and SOD levels in mouse cardiac tissue and plasma



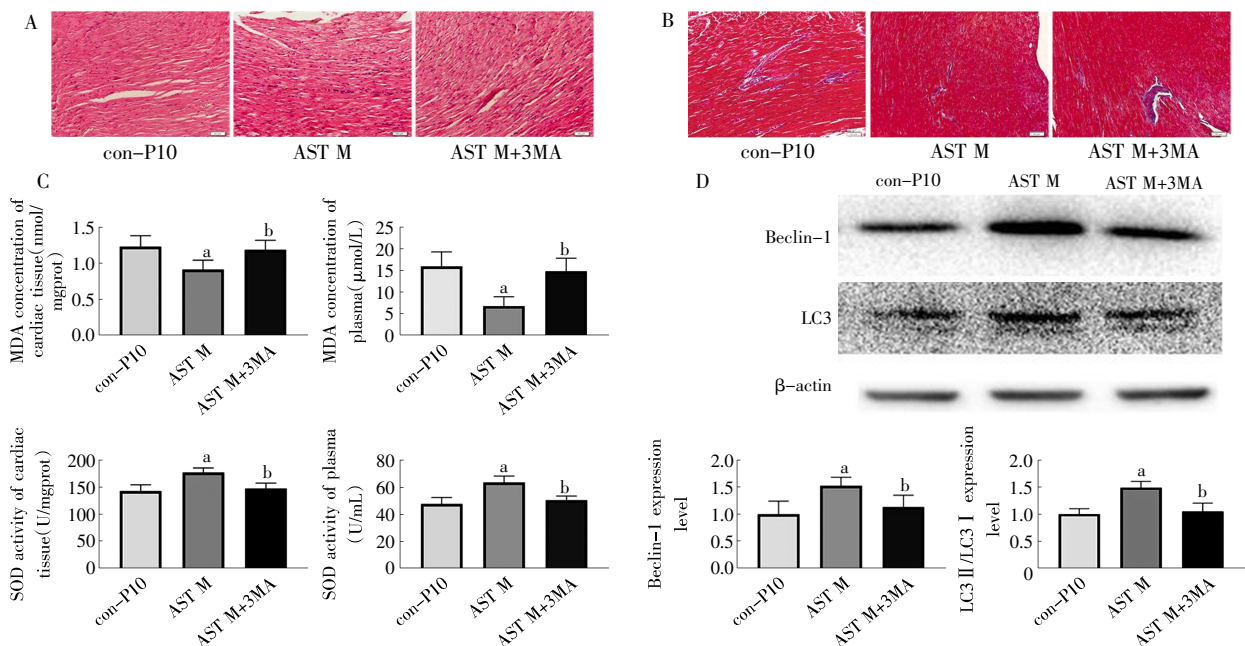
注:与 con-R1 组相比,^a $P<0.05$;与 con-P1 组相比,^b $P<0.05$;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3;beclin-1:自噬效应蛋白;con-R1:正常对照组;con-P10:模型对照组;AST L:低剂量虾青素干预组;AST M:中剂量虾青素干预组;AST H:高剂量虾青素干预组; $n=4$

图3 Western 印迹检测 LC3 和 Beclin-1 蛋白表达

Fig.3 Expression of Beclin-1 and LC3 detected by Western blotting

多,胶原纤维增生明显,心脏组织和血浆中 MDA 升高,SOD 活力降低,自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I 和

Beclin1 表达降低 ($F=18.75、6.353、15.77、14.08、22.83、8.657$,均 $P<0.05$),见图 4。



注:A:心肌组织 HE 染色(比例尺=50 μ m);B:心肌组织 Masson 染色,蓝色区域为心肌纤维化范围,红色区域为正常心肌范围(比例尺=50 μ m);C:柱形图显示各组小鼠心脏组织及血浆 MDA 和 SOD 水平;D:Western 印迹检测 LC3 和 Beclin-1 蛋白表达;与 con-R1 组相比,^a $P<0.05$;与 AST M 组相比,^b $P<0.05$;con-P10:模型对照组;AST M:中剂量虾青素干预组;AST M+3MA:虾青素中剂量干预+3MA 抑制剂组

图4 AST 通过自噬改善 SAMP10 小鼠心脏组织纤维化

Fig.4 AST improves cardiac tissue fibrosis in SAMP10 mice by autophagy

3 讨论

快速老化小鼠能够在较短时间内达到衰老状态,是研究衰老相关问题的优势模型,SAMP 小鼠与许多人类衰老相关疾病的生物学改变相类似,而 SAMR 亚系的各项生理指标及存活期限与正常小鼠相类似,大量相关 SAMP 不同品系研究均以 SAMR 系作为正常对照^[13]。本研究发现 SAMP10 小鼠心肌细胞排列疏松,细胞间隙增大,成纤维细胞增多,胶原纤维增生明显。虾青素干预改善了心脏组织衰老的表现,表明虾青素可以延缓心脏衰老。

自噬是一种内源性自我保护机制,是维持心脏稳态和功能的主要调节因子^[14],并且在心脏衰老过程中逐渐减少,这表明自噬的下调是心脏衰老进展

的基础^[15]。越来越多研究表明,激活自噬可能改善心脏衰老,延长寿命。Eisenberg 等^[16]研究发现,给老龄小鼠口服亚精胺能够显著提高心脏的自噬水平,改善心肌肥厚,增强舒张功能,延缓心脏的衰老,进而延长寿命。自噬的关键成分 Beclin-1 和 LC3 是常用的自噬标志物,Beclin-1 是第一个被发现的哺乳动物自噬蛋白,也是第一个确定的哺乳动物必需酵母自噬基因 Atg6 的同源物^[17],Beclin-1 的缺失会削弱自噬活性,上调 Beclin-1 的表达可诱导自噬。当自噬启动时 LC3 I 会被水解,转变为 LC3 II,结合在自噬小体膜上,LC3 II/LC3 I 的比值可反映自噬水平。本研究中 LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 在心脏衰老过程中被下调,而在虾青素干预后显著增加。加入自

噬抑制剂后,虾青素诱导的自噬被部分抵消,且改善心肌组织结构能力减弱,表明虾青素可以诱导衰老心脏自噬水平上调,且自噬对于虾青素改善衰老心脏结构和功能,延缓衰老至关重要。

氧化损伤是一些衰老相关疾病病理的主要原因,累积的氧化损伤往往在细胞大分子中普遍存在,引起细胞的蛋白质结构和功能改变、脂质过氧化、RNA 降解和 DNA 断裂^[18]。特别是持续作用于心脏组织,后者更容易发生氧化损伤。氧化应激可促进心脏组织纤维化^[19]。虾青素有强大的抗氧化作用,有研究发现其能够改善心肌组织的氧化应激^[20-21]。MDA 作为脂质过氧化物的标志物,常用来评价机体氧化应激和氧化损伤程度,本研究发现虾青素会显著减少 SAMP10 小鼠心脏组织和血浆 MDA 的含量,增强 SOD 活性。这些结果表明虾青素主要是通过增加抗氧化酶和减少脂质过氧化来改善衰老的心脏组织纤维化。虾青素是海洋动物产生的一种类胡萝卜素,具有很强的抗氧化活性,作用机制是猝灭单线态氧,清除自由基对脂质过氧化的作用^[22]。自噬是一种分解代谢过程,通过清除自由基改善细胞微循环,从而达到抗衰老的效果^[23]。本研究用自噬抑制剂 3-MA 加中剂量虾青素进行干预,显示 3-MA 可降低中剂量虾青素对衰老心脏氧化损伤的改善作用,表明虾青素改善的 SAMP10 小鼠心肌组织氧化应激水平可能部分是由自噬介导的。然而,关于虾青素诱导心脏组织自噬的具体作用机制,还有待进一步研究。

综上,本研究发现,衰老会导致小鼠心脏组织损伤、心肌组织纤维化、氧化应激水平增高以及自噬降低。虾青素会改善 SAMP10 衰老小鼠心脏组织纤维化、氧化应激以及自噬抑制,从而保护心脏组织。同时,本研究证明了虾青素改善的 SAMP10 小鼠心肌组织氧化应激水平降低部分是由自噬介导的,为有关虾青素的抗衰老产品的开发应用提供了依据。

参考文献:

- MESCHIARI C A, ERO O K, PAN H, et al. The impact of aging on cardiac extracellular matrix[J]. *Geroscience*, 2017, 39(1): 7-18.
- SALCAN S, BONGARDT S, MONTEIRO BARBOSA D, et al. Elastic titin properties and protein quality control in the aging heart[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(3): 118532.
- PICCA A, MANKOWSKI R T, BURMAN J L, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(9): 543-554.
- KIM S H, KIM H. Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction-A mini-review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1137.
- EREN B, TUNCAY TANRIKVERDI S, AYDIN KÖSE F, et al. Antioxidant properties evaluation of topical astaxanthin formulations as anti-aging products[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2019, 18(1): 242-250.
- FARRUGGIA C, KIM M B, BAE M, et al. Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 62: 202-209.
- SHAO Y, NI Y, YANG J, et al. Astaxanthin inhibits proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest of Mice H22 hepatoma cells[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2152-2160.
- SHATOOR A S, AL HUMAYED S. Astaxanthin ameliorates high-fat diet-induced cardiac damage and fibrosis by upregulating and activating SIRT1[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(12): 7012-7021.
- KIM S H, KIM H. Astaxanthin modulation of signaling pathways that regulate autophagy[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(10): 546.
- WU M X, WANG S H, XIE Y, et al. Interleukin-33 alleviates diabetic cardiomyopathy through regulation of endoplasmic reticulum stress and autophagy via insulin-like growth factor-binding protein 3[J]. *J Cell Physiol*. 2021, 236(6): 4403-4419.
- SUN X, MENG H, XIAO J, et al. Pretreatment of 3-MA prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of autophagy initiation[J]. *Toxicology*, 2023, 490: 153512.
- TANEIKE M, YAMAGUCHI O, NAKAI A, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy[J]. *Autophagy*, 2010, 6(5): 600-606.
- MORI M, HIGUCHI K. The senescence-accelerated mouse as a model for geriatrics and aging biology[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2019, 153(4): 179-185.
- LIU Y, SHOJI-KAWATA S, SUMPTER R M Jr, et al. Autosis is a Na⁺, K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(51): 20364-20371.
- OBAS V, VASAN R S. The aging heart[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(13): 1367-1382.
- EISENBERG T, ABDELLATIF M, SCHROEDER S, et al. Cardio-protection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine[J]. *Nat Med*, 2016, 22(12): 1428-1438.
- SHI B, MA M, ZHENG Y, et al. mTOR and Beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12562-12568.
- VENKATARAMAN K, KHURANA S, TAI T C. Oxidative stress in aging--matters of the heart and mind[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 17897-17925.
- SHAH A K, BHULLAR S K, ELIMBAN V, et al. Oxidative stress as a mechanism for functional alterations in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *Antioxidants Basel*, 2021, 10(6): 931.
- QU X, ZHANG Z, HU W, et al. Attenuation of the Na/K-ATPase/ROS amplification signaling pathway by astaxanthin ameliorates myocardial cell oxidative stress injury[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5125-5134.
- CUI G, LI L, XU W, et al. Astaxanthin protects ochratoxin A-induced oxidative stress and apoptosis in the heart via the Nrf2 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7639109.
- YAZAKI K, YOSHIKOSHI C, OSHIRO S, et al. Supplemental cellular protection by a carotenoid extends lifespan via Ins/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2011, 2011: 596240.
- WONG S Q, KUMAR A V, MILLS J, et al. Autophagy in aging and longevity[J]. *Hum Genet*, 2020, 139(3): 277-290.