

罗布麻蛋白多肽部位制备及其抗衰老作用研究

谈 慧, 刘吉华*

中国药科大学中药学院, 江苏 南京

收稿日期: 2025年4月2日; 录用日期: 2025年5月2日; 发布日期: 2025年5月9日

摘 要

目的: 探讨罗布麻蛋白多肽部位对过氧化氢(H_2O_2)、D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)衰老的作用。方法: 采用碱提酸沉法提取罗布麻蛋白(LQ), 采用胃-胰蛋白酶进行酶解得到罗布麻蛋白多肽部位(LH)。以过氧化氢(H_2O_2)、D-半乳糖诱导的人脐静脉内皮细胞作为衰老模型, 通过对细胞活力、 β -半乳糖苷酶活性、活性氧(ROS)含量和线粒体膜电位指标进行测定, 研究罗布麻蛋白及多肽对HUVEC衰老细胞的缓解作用。结果: 与模型组相比, 给予罗布麻蛋白多肽可显著增加HUVEC衰老细胞的细胞活力和线粒体膜电位($P < 0.05$), 显著降低 β -半乳糖苷酶阳性细胞比例和ROS荧光强度($P < 0.05$)。结论: 罗布麻蛋白及多肽部位可抑制由衰老诱发的氧化应激损伤, 从而延缓衰老。

关键词

罗布麻, 抗衰老, 蛋白多肽部位

Study on Preparation of *Apocynum venetum* L. Protein Polypeptide Site and Its Anti-Aging Effect

Hui Tan, Jihua Liu*

School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Apr. 2nd, 2025; accepted: May 2nd, 2025; published: May 9th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the effect of the protein polypeptide site of *Apocynum venetum* L., which is

*通讯作者。

on hydrogen peroxide (H₂O₂) and D-galactose-induced senescence of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** The polypeptide part (LH) of *Apocynum venetum* L. protein (LQ) was extracted by alkali extraction and acid precipitation method, and *Apocynum venetum* L. protein polypeptide site (LH) was obtained by enzymatic hydrolysis by gastric-trypsin. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and D-galactose-induced human umbilical vein endothelial cells were used as a model of senescence, and the alleviating effects of *Apocynum venetum* L. protein and polypeptides on HUVEC senescent cells were studied by measuring cell viability, β -galactosidase activity, reactive oxygen species (ROS) content and mitochondrial membrane potential. **Results:** Compared with the model group, the administration of *Apocynum venetum* L. protein polypeptide significantly increased the cell viability and mitochondrial membrane potential of HUVEC senescent cells ($P < 0.05$), and significantly decreased the proportion of β -galactosidase-positive cells and ROS fluorescence intensity ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Apocynum venetum* L. protein and polypeptide sites can inhibit oxidative stress damage induced by aging, thereby delaying aging.

Keywords

Apocynum venetum L., Anti-Aging, Protein Polypeptide Site

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

衰老是一个不可逆的过程, 发生在细胞、器官和整个生物体水平, 导致生理功能中断和生物体内相关退行性疾病的发作[1]。随着时间的推移, 生物功能变弱, 生物体减轻氧化应激的能力减弱。过量 ROS 的积累可能导致细胞结构和代谢过程受损[2], 这种损伤通常会导致氧化应激和炎症, 随后导致细胞衰老和死亡, 从而加速衰老过程[3]。鉴于与年龄相关的退行性疾病患者所承受的经济和心理负担, 寻求预防或减轻衰老影响的方法已获得全球关注[4]。

中药罗布麻 *Apocynum venetum* L. 为夹竹桃科罗布麻属植物罗布麻的干燥叶, 性甘、苦, 凉。归肝经。具有平肝安神, 清热利水的药理作用, 用于治疗肝阳眩晕, 心悸失眠, 浮肿尿少。现代药理学表明罗布麻也具有抗衰老的功效[5], 但大多聚焦于罗布麻黄酮与罗布麻多糖[6], 少有研究罗布麻蛋白。由于植物蛋白成本更低、健康益处更多、功能特性更好, 人们对植物蛋白作为动物蛋白替代品的兴趣一直在迅速增长[7], 罗布麻叶中蛋白含量丰富, 含 15.24%~19.57% [8], 因此, 从罗布麻叶中寻找有生物活性的肽类成分, 会极大促进罗布麻的资源利用与开发。

HUVEC 细胞源自脐带, 易于获取, 容易培养, 在体外培养生长快速, 可以用于研究多种衰老相关的生物学过程和疾病。并且 HUVEC 细胞在体外培养过程中会表现出衰老特征, 如细胞增殖减缓、细胞形态改变、染色质结构紊乱等, 因此可以用于研究衰老及相关治疗药物的筛选。本项目通过体外培养 HUVEC, 初步考察罗布麻蛋白及多肽成分的抗衰老作用, 为后期基于其肽类抗衰老成分的开发奠定基础。

2. 实验部分

2.1. 仪器与材料

细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司)、酶标仪(美国 Biotech 公司)、超净工作台(美国 Thermo Scientific 公司)、倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)、HIS-SIM 智能超灵敏超分辨显微镜(广州超视计生物科技

有限公司)。

罗布麻(安徽亳州)、胃蛋白酶(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)、D-半乳糖(北京普西唐生物科技有限公司)、30%过氧化氢(南京化学试剂股份有限公司)、MTT (Biosharp 公司)、高糖 DMEM 培养基含双抗(中国凯基生物有限公司)、 β -半乳糖苷酶检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) (上海碧云天生物技术有限公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 罗布麻蛋白多肽部位制备

将干燥的罗布麻叶粉末与纯水按 1:20 的比例(w/v)混合均匀,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 12,在 60℃ 的条件下水浴超声提取 2 h,提取完成后,在 4℃、5000 r/min 的条件下离心 20 min,抽滤后得到罗布麻蛋白上清液。用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4,4℃静置一夜后,在 4℃、5000 r/min 的条件下离心 20 min,过滤上清液后得到罗布麻蛋白沉淀,沉淀加水溶解,用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 2,加入胃蛋白酶(E/S 1:25, W/W),37℃震荡孵育 1 h,随后用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5,加入胰酶(E/S 1:25, W/W),37℃震荡孵育 1 h,将混合物置于 95℃水浴锅中使酶失活,在 4℃、5000 r/min 的条件下离心 20 min [9] [10],抽滤后冷冻干燥得到罗布麻蛋白多肽样品(LH)。同时制备未经过胃-胰蛋白酶酶解的罗布麻蛋白空白对照(LQ)。

2.2.2. HUVEC 细胞培养

HUVEC 细胞复苏后接种于含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中,置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养。

2.2.3. LQ、LH 对 HUVEC 细胞的安全给药浓度筛选

以 1.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 96 孔板中,放入 37℃培养箱里培养 12 h。培养结束后,加入不同浓度 LQ、LH 培养 24 h,加入 MTT 溶液培养 4 h,在 570 nm、650 nm 波长处用酶标仪测各孔的吸光值。

2.2.4. H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞衰老模型的建立

以 1.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 96 孔板中,放入 37℃培养箱里培养 24 h 后加入不同浓度的 H₂O₂ 溶液(0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、和 5 mmol/L),并放入培养箱中培养 4 h,加入 MTT 溶液继续培养 4 h,在 570 nm、650 nm 波长处用酶标仪测各孔的吸光值。

2.2.5. D-半乳糖诱导的 HUVEC 细胞衰老模型建立

以 1.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 96 孔板中,放入 37℃培养箱里培养 12 h 后,加入不同浓度的 D-半乳糖溶液(20 mg/mL、40 mg/mL、60 mg/mL 和 80 mg/mL),放入培养箱中培养 36 h,加入 MTT 溶液继续培养 4 h,在 570 nm、650 nm 波长处用酶标仪测各孔的吸光值。

2.2.6. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞活力测定

分为空白对照组、模型组、模型(H₂O₂) + LQ 组、模型(H₂O₂)+LH 组,给药组在 LQ (4 mg/mL)、LH (4 mg/mL)处理 24 h 后,加入配制好的 H₂O₂ 溶液培养 4 h 后加入 MTT 溶液继续培养 4 h,在 570 nm、650 nm 波长处用酶标仪测各孔的吸光值。

2.2.7. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导的细胞 β -半乳糖苷酶水平测定

分组给药方式同 2.2.6。用 PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 15 min。吸出细胞固定液,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。弃 PBS,每孔加入 1 mL 染色工作液,置于 37℃生化培

养箱孵育过夜后使用普通光学显微镜进行观察。

2.2.8. LQ、LH 对 H_2O_2 诱导的细胞活性氧(ROS)水平测定

分组给药方式同 2.2.6。用无血清培养基洗 3 遍, 取 2 mL 含 DCFH-DA (10 μ M) 的无血清培养基加入各孔孵育, 用胰酶消化细胞转移至黑色 96 孔板中, 立即用荧光酶标仪测量荧光强度。

2.2.9. LQ、LH 对 H_2O_2 诱导的细胞线粒体膜电位(MMP)水平测定

分组给药方式同 2.2.6。PBS 洗涤 1 次, 加入 500 μ L 细胞培养液, 加入 1 mL JC-1 染色工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后, 用 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次。加入 1 mL 细胞培养液, 超高分辨荧光显微镜下观察。

2.2.10. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导的细胞活力测定

分别设立对照组、模型组、模型(D-半乳糖) + LQ 组、模型(D-半乳糖) + LH 组, 在 D-半乳糖培养 12 h 后, 加入 LQ (4 mg/mL)、LH (4 mg/mL) 与 D-半乳糖共培养 24 h, 移去培养基, 加入 MTT 孵育 4 h 后在 570 nm、650 nm 下检测吸光度。

2.2.11. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导的细胞 β -半乳糖苷酶水平测定

分组给药方式同 2.2.10。用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液固定 15 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。每孔加入 1 mL 染色工作液, 置于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱孵育过夜后使用普通光学显微镜进行观察。

2.2.12. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导的细胞活性氧(ROS)水平测定

分组给药方式同 2.2.10。用无血清培养基洗三遍。按照 1:1000 比例用无血清培养基稀释 DCFH-DA, 使其最终浓度为 10 μ M, 取 2 mL 含 DCFH-DA (10 μ M) 的无血清培养基加入各孔, 用胰酶将细胞消化下来加至黑色 96 孔板中, 立即用荧光酶标仪测量荧光强度。

2.2.13. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导的细胞线粒体膜电位水平测定

分组给药方式同 2.2.10。用 PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 500 μ L 细胞培养液。加入 1 mL JC-1 染色工作液 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。孵育结束后, 用 JC-1 染色缓冲液(1X)洗涤 2 次。加入 1 mL 细胞培养液, 超高分辨荧光显微镜下观察。

3. 结果与讨论

3.1. HUVEC 细胞衰老模型建立

结果见图 1, LQ 在 4000 μ g/mL 以内对 HUVEC 细胞无明显细胞毒性, LH 在 8000 μ g/mL 以内对 HUVEC 细胞无明显细胞毒性, 选择 4000 μ g/mL 作为 LQ、LH 安全给药浓度。 H_2O_2 在 1000 μ mol/L 下作用 HUVEC 细胞 4 h, 细胞活力在 50% 左右, 40 mg/mL 的 D-gal 作用 36 h, HUVEC 细胞存活率约为 70%, 如图 1(C)、如图 1(D)。

3.2. LQ、LH 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 细胞存活率的影响

用 MTT 法检测细胞活力, 如图 2 所示, 与空白组相比, 模型组可显著降低细胞存活率, 与模型组相比, LQ、LH 均可以使细胞存活率显著上升。

3.3. LQ、LH 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 细胞 SA- β -gal 的影响

如图 3 所示, 与正常组相比, 模型组 SA- β -gal 阳性率显著上升; 与模型组相比, 经过 LQ 及 LH 给药后, 可使 HUVEC 细胞 SA- β -gal 阳性率下降; 与 LQ 组相比, 同浓度下 LH 组阳性率较少, 说明 LH 对

H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞保护作用更好。

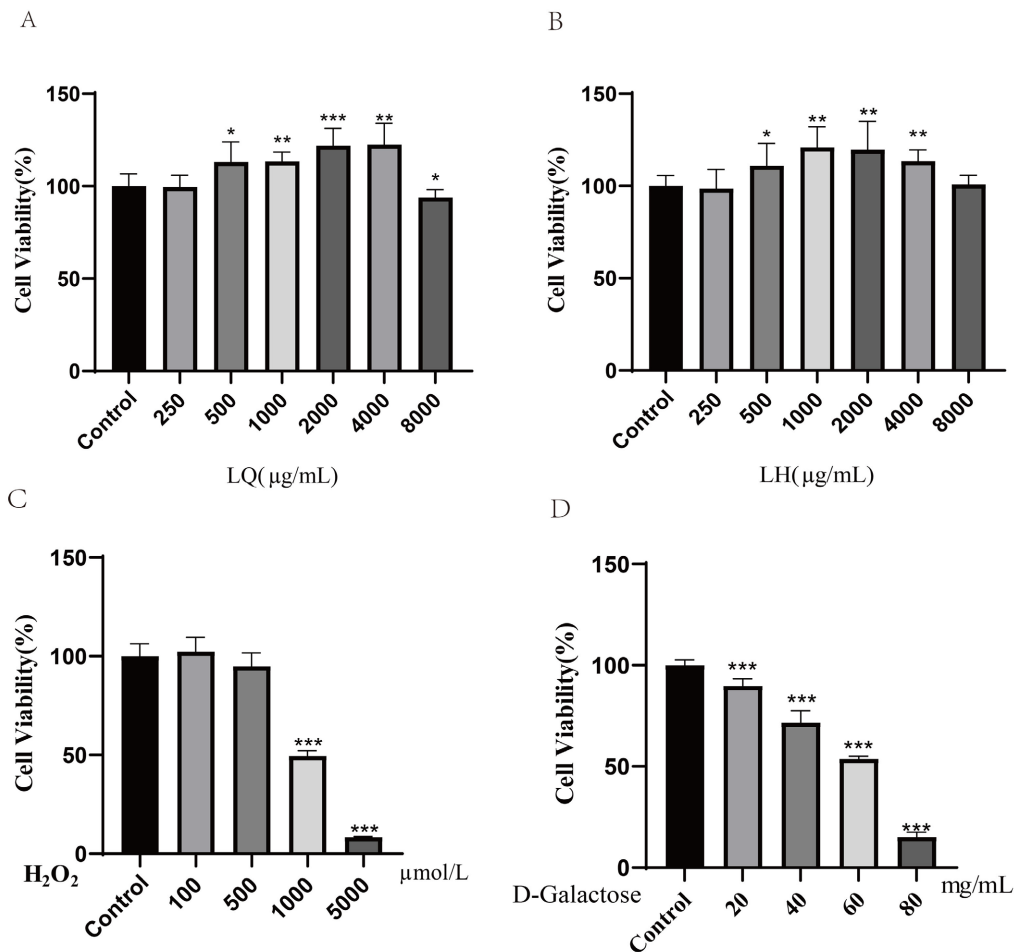


Figure 1. Establishment of the HUVEC aging model. (A) Effect of LQ on HUVEC cell viability (B) Effect of LH on HUVEC cell viability (C) Effect of H₂O₂ on HUVEC cell viability (D) Effect of D-galactose on HUVEC cell viability
图 1. HUVEC 衰老模型的建立。(A) LQ 对 HUVEC 细胞活力的影响 (B) LH 对 HUVEC 细胞活力的影响 (C) H₂O₂ 对 HUVEC 细胞活力的影响 (D) D-半乳糖对 HUVEC 细胞活力的影响

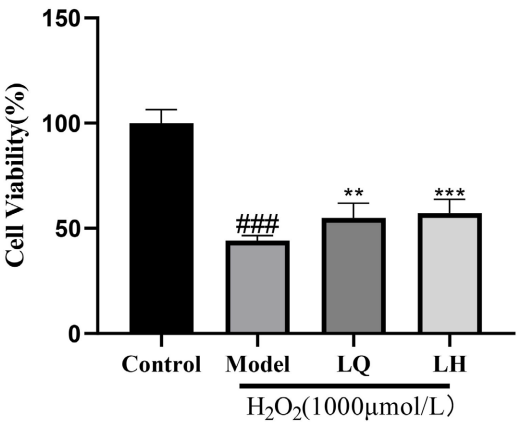


Figure 2. Effects of LQ and LH on the viability of H₂O₂-induced HUVEC cells
图 2. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞存活率的影响

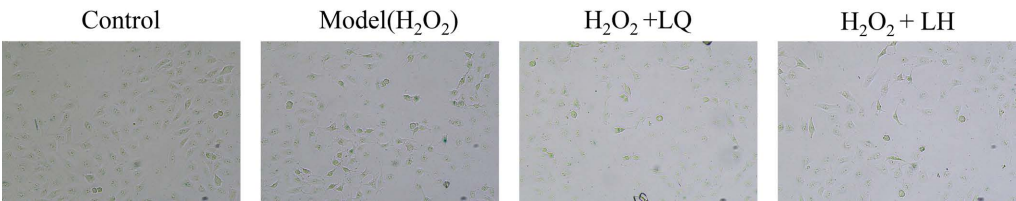


Figure 3. Effects of LQ and LH on SA-β-gal induced by H₂O₂ in HUVEC cells
图 3. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞 SA-β-gal 的影响

如表 1 所示, 与正常组相比, 模型组 SA-β-gal 细胞蓝染数显著上升; 与模型组相比, 经过 LQ 及 LH 给药后, 可使 HUVEC 细胞 SA-β-gal 蓝染数下降。

Table 1. Effects of LQ and LH on SA-β-gal induced by H₂O₂ in HUVEC cells
表 1. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞 SA-β-gal 的影响

Group	Positive rate of β-galactosidase staining (%)
Control	1.58 ± 1.47
Model (H ₂ O ₂)	8.58 ± 4.02 ^{###}
LQ	22.50 ± 3.90 ^{***}
LH	20.58 ± 3.76 ^{***}

^{###}代表模型组蓝染数量与空白组相比有显著差异, ^{***}代表给药组蓝染数量与模型组相比有显著差异。

3.4. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞活性氧 ROS 的影响

如图 4 所示, 与正常组相比, 模型组 ROS 荧光强度显著升高; 与模型组相比, LQ、LH 组 HUVEC 细胞内 ROS 荧光强度均显著降低。LH 组 ROS 荧光强度比 LQ 组更弱, 说明 LH 组能够显著降低 H₂O₂ 诱导的细胞过氧化损伤, 从而达到对细胞氧化损伤的保护作用。

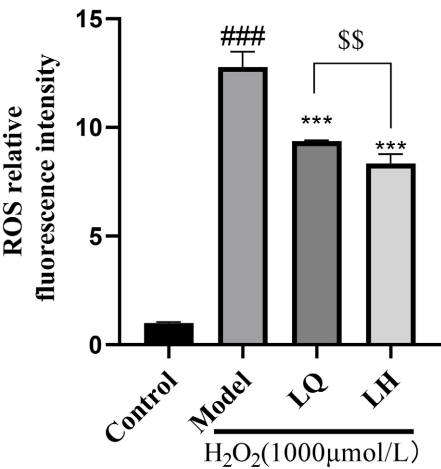


Figure 4. Effects of LQ and LH on ROS in H₂O₂-induced HUVEC cells
图 4. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞 ROS 的影响

3.5. LQ、LH 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 细胞线粒体膜电位 MMP 的影响

由图 5 可知, 对照组 HUVEC 细胞红色荧光/绿色荧光比值较高, H₂O₂ 组红色荧光/绿色荧光比值降

低, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{LQ}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{LH}$ 组 HUVEC 细胞红色荧光相对于模型组增强, 红色荧光/绿色荧光比值显著提高, 同等剂量下, LH 组红色荧光/绿色荧光比值比 LQ 组高, 提示 LH 组保护线粒体膜电位效果优于 LQ 组。

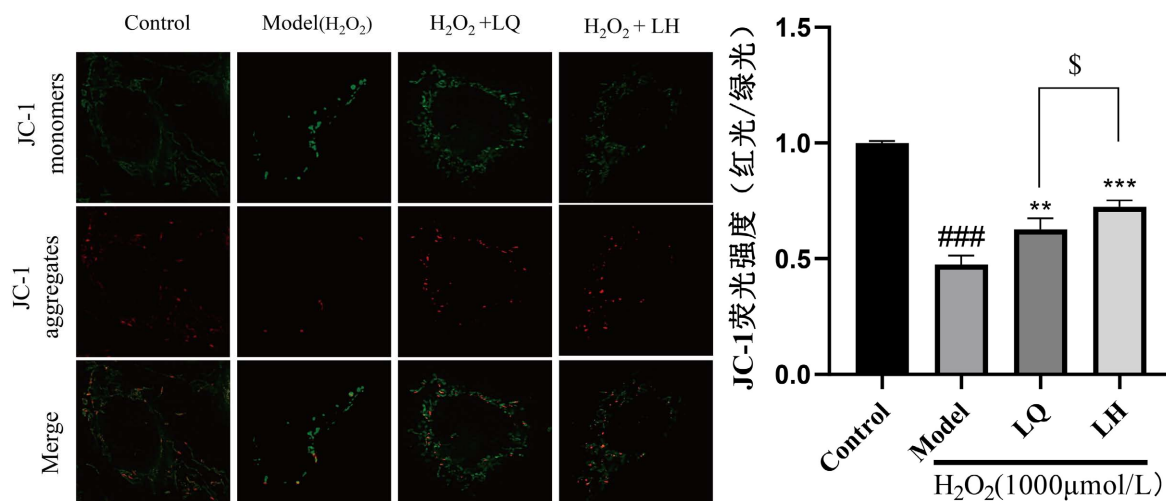


Figure 5. Effects of LQ and LH on the mitochondrial membrane potential induced by H_2O_2 in HUVEC cells

图 5. LQ、LH 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 细胞线粒体膜电位的影响

3.6. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞存活率的影响

如图 6 所示, 与空白组相比, 模型组可显著降低细胞存活率, 与模型组相比, LQ、LH 均可以使细胞存活率显著提高, 同浓度下, LH 组细胞存活率更高, 提示 LH 对细胞的保护作用更好。

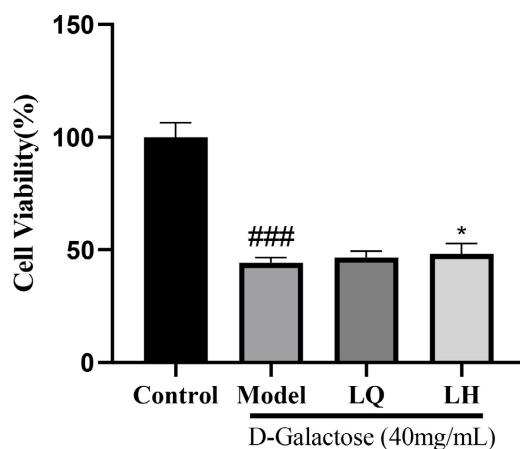


Figure 6. Effects of LQ and LH on the survival rate of D-galactose-induced HUVEC cells

图 6. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞存活率的影响

3.7. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞 SA- β -gal 的影响

如图 7 所示, 与正常组相比, 模型组 SA- β -gal 阳性率显著上升; 与模型组相比, 经过 LQ 及 LH 给药后, 可使 HUVEC 细胞 SA- β -gal 阳性率下降; 与 LQ 组相比, 同浓度下, LH 组阳性率较少, 说明 LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞保护作用更好。

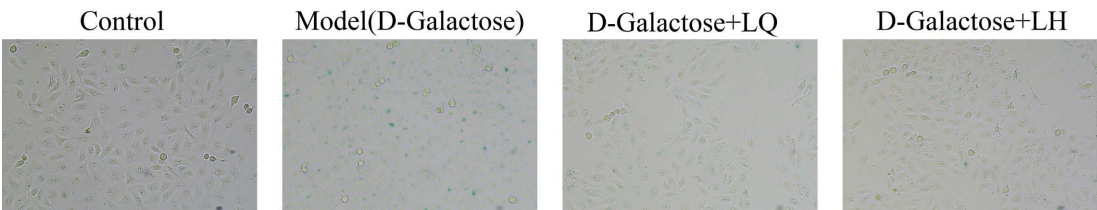


Figure 7. Effects of LQ and LH on D-galactose-induced SA-β-gal in HUVEC cells
图 7. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞 SA-β-gal 的影响

如表 2 所示, 与正常组相比, 模型组 SA-β-gal 细胞蓝染数显著上升; 与模型组相比, 经过 LQ 及 LH 给药后, 可使 HUVEC 细胞 SA-β-gal 蓝染数下降。

Table 2. Effects of LQ and LH on D-galactose-induced SA-β-gal in HUVEC cells
表 2. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞 SA-β-gal 的影响

Group	Positive rate of β-galactosidase staining (%)
Control	1.08 ± 0.89
Model (H ₂ O ₂)	35.58 ± 4.92 ^{###}
LQ	15.75 ± 4.09 ^{***}
LH	14.50 ± 3.74 ^{***}

^{###}代表模型组蓝染数量与空白组相比有显著差异, ^{***}代表给药组蓝染数量与模型组相比有显著差异。

3.8. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞活性氧 ROS 的影响

如图 8 所示, 与正常组相比, 模型组 ROS 荧光强度显著升高; 与模型组相比, LQ、LH 组 HUVEC 细胞内 ROS 荧光强度均显著降低。LH 组 ROS 荧光强度比 LQ 组更弱, 说明 LH 组能够显著降低 D-半乳糖诱导的细胞过氧化损伤, 从而达到对细胞氧化损伤的保护作用。

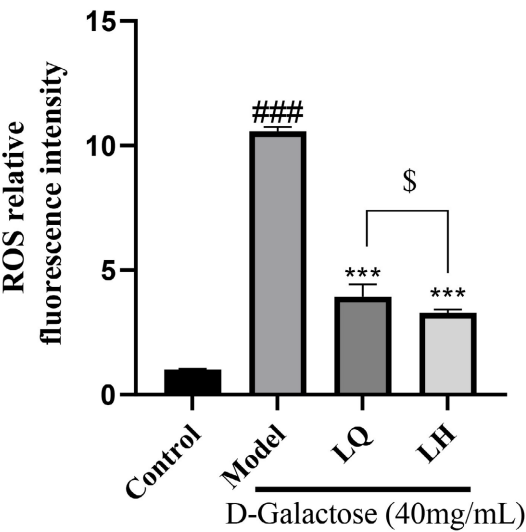


Figure 8. Effects of LQ and LH on D-galactose-induced ROS in HUVEC cells
图 8. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞 ROS 的影响

3.9. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 线粒体膜电位 MMP 的影响

由图 9 可知, 对照组 HUVEC 细胞红色荧光/绿色荧光比值较高, D-半乳糖组红色荧光/绿色荧光比值降低, D-半乳糖 + LQ、D-半乳糖 + LH 组 HUVEC 细胞红色荧光相对于模型组增强, 红色荧光/绿色荧光比值显著提高, 同等剂量下, LH 组红色荧光/绿色荧光比值比 LQ 组高, 提示 LH 组保护线粒体膜电位效果优于 LQ 组。

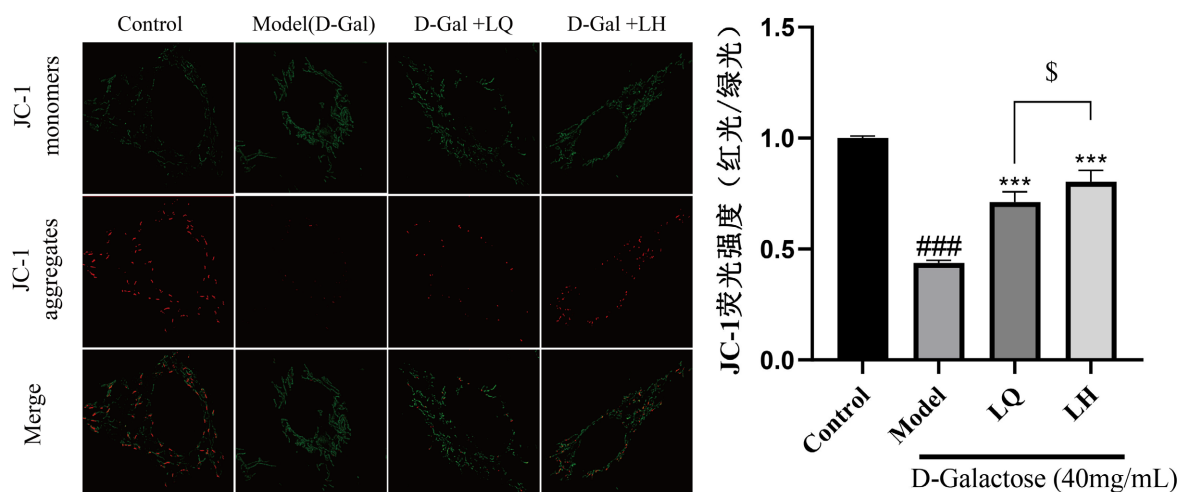


Figure 9. Effects of LQ and LH on the mitochondrial membrane potential of D-galactose-induced HUVEC

图 9. LQ、LH 对 D-半乳糖诱导 HUVEC 细胞线粒体膜电位的影响

4. 讨论

天然植物蛋白是一种具有高质量、高开发价值的可再生优质蛋白资源。制备生物活性肽的第一步通常是从原料中提取出蛋白质, 这样可以提高后续酶解的效率。常见的蛋白质提取方法是碱提酸沉法、盐析法、发酵法。碱提酸沉法提取效率比较高, 有利于蛋白的沉降[11], 本文选用此方法提取罗布麻蛋白。已有研究表明, D-Gal 可以引起类似于衰老的生理状态改变[12]。D-Gal 诱导衰老模型应用广泛, 具有操作方便, 副作用少, 细胞生存率较高等优势, 被认为是衰老研究的有效工具[13]。H₂O₂ 也可以诱导内皮细胞衰老[14]。

罗布麻从古至今都有抗衰老记载, 据我国著名中医文献学家马继兴等考证, 罗布麻又名泽漆, 记载于《三国志·华佗列传》, 华佗曾遗留一个能延年益寿的方剂“漆叶青粘散”, 此方剂能有“久服去三虫, 利五脏、轻体, 使人头不白”之功效[15]。现代临床研究发现罗布麻叶浸膏片可改善夜尿等部分衰老症状[16]; 可提高老年人自然杀伤细胞活性及红细胞超氧化物歧化酶含量, 有一定延缓衰老的作用[17]; 在动物模型中, 罗布麻提取物可延长果蝇寿命, 降低大鼠血清过氧化脂质水平[18]。但是其抗衰老的活性成分尚不明晰。

本研究首次制备了罗布麻蛋白多肽部位, 确证了其抗衰老药效。衰老机制复杂, 其中线粒体功能障碍是关键机制之一。线粒体是细胞能量工厂和信号传输中心, 当线粒体结构受损时, 会导致线粒体功能障碍, 包括线粒体膜电位的降低和 ROS 产生的增加, 最终加剧细胞损伤并引发衰老[19]。本研究明确罗布麻蛋白及多肽部位可改善由于衰老导致的内皮细胞膜电位降低, 提示罗布麻抗衰老可能通过维持线粒体稳态、抑制应激有关氧化。本课题首次明确罗布麻蛋白及肽类成分是其抗衰老的活性部位之一, 可为未来罗布麻抗衰老成分的开发发掘奠定基础。

参考文献

- [1] Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R. and Kumar, V. (2019) A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **26**, 139-150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- [2] Zhou, H., Ma, J., Shan, Y., Qi, X., Wang, H. and Jia, L. (2019) A Combination of Chicken Embryo Extract and a Nutritional Supplement Protect a Rat Model of Aging Against d-Galactose-Induced Dysfunction of Mitochondria and Autophagy. *Food & Function*, **10**, 2774-2784. <https://doi.org/10.1039/c8fo01734d>
- [3] Azman, K.F., Safdar, A. and Zakaria, R. (2021) D-galactose-Induced Liver Aging Model: Its Underlying Mechanisms and Potential Therapeutic Interventions. *Experimental Gerontology*, **150**, Article ID: 111372. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111372>
- [4] Guo, K., Su, L., Wang, Y., Liu, H., Lin, J., Cheng, P., et al. (2020) Antioxidant and Anti-Aging Effects of a Sea Cucumber Protein Hydrolyzate and Bioinformatic Characterization of Its Composing Peptides. *Food & Function*, **11**, 5004-5016. <https://doi.org/10.1039/d0fo00560f>
- [5] 王飞, 李祥婷, 徐莉莉, 等. 罗布麻的抗衰老作用机制研究[J]. 中国临床医学, 2022, 29(4): 596-602.
- [6] Xie, W., Li, F., Ding, X., Xu, Z., Cui, Y., Fu, X., et al. (2025) Ethnomedical Uses, Phytochemistry and Pharmacology of *Apocynum venetum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **337**, Article ID: 118967. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118967>
- [7] Chen, Y., Li, T., Jiang, L., Huang, Z., Zhang, W. and Luo, Y. (2024) The Composition, Extraction, Functional Property, Quality, and Health Benefits of Coconut Protein: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **280**, Article ID: 135905. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135905>
- [8] 隗亚军, 贾永倩, 吴倩, 等. 野生和人工栽培罗布麻叶饲用和药用价值评价[J]. 饲料研究, 2024, 47(19): 124-128.
- [9] Pimentel, F.B., Cermeño, M., Kleekayai, T., Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J., Alves, R.C., et al. (2020) Effect of *in Vitro* Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antioxidant Activity of the Red Seaweed *Porphyra dioica*. *Food Research International*, **136**, Article ID: 109309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109309>
- [10] Gani, A., Ul Ashraf, Z., Noor, N. and Ahmed Wani, I. (2022) Ultrasonication as an Innovative Approach to Tailor the Apple Seed Proteins into Nanosize: Effect on Protein Structural and Functional Properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, **86**, Article ID: 106010. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106010>
- [11] 李超, 马航, 吴冉, 等. 植物蛋白提取技术研究进展[J]. 现代食品, 2023, 29(11): 12-19.
- [12] Liu, B., Tu, Y., He, W., Liu, Y., Wu, W., Fang, Q., et al. (2018) Hyperoside Attenuates Renal Aging and Injury Induced by D-Galactose via Inhibiting AMPK-ULK1 Signaling-Mediated Autophagy. *Aging*, **10**, 4197-4212. <https://doi.org/10.18632/aging.101723>
- [13] Azman, K.F. and Zakaria, R. (2019) D-Galactose-Induced Accelerated Aging Model: An Overview. *Biogerontology*, **20**, 763-782. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09837-y>
- [14] Ruan, Y., Wu, S., Zhang, L., Chen, G. and Lai, W. (2014) Retarding the Senescence of Human Vascular Endothelial Cells Induced by Hydrogen Peroxide: Effects of 17 β -Estradiol (E2) Mediated Mitochondria Protection. *Biogerontology*, **15**, 367-375. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9507-2>
- [15] 钱学射, 张卫明, 金久宁, 等. 罗布麻的民族植物学与资源开发利用VII: 罗布麻(红麻)叶保健茶的功能与应用[C]//第八届中国民族植物学学术研讨会暨第七届亚太民族植物学论坛. 南京: 南京野生植物综合利用研究院, 2016: 1.
- [16] 江苏省罗布麻抗衰老临床协作组. 罗布麻浸膏片双盲法抗衰老的临床研究[J]. 中药通报, 1988(2): 46-49, 64.
- [17] 马永兴, 杨震球, 竺越, 等. 罗布麻茶抗衰老、高血压及高血脂作用的观察[J]. 中西医结合杂志, 1989(6): 335-337, 323.
- [18] 钱曾年, 顾振纶, 方几希, 等. 大花罗布麻叶的药理学研究——II大花罗布麻叶延缓衰老作用的实验观察[J]. 中成药, 1990(3): 28-30.
- [19] Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E. and von Zglinicki, T. (2022) Mitochondrial Dysfunction in Cell Senescence and Aging. *Journal of Clinical Investigation*, **132**, e158447. <https://doi.org/10.1172/jci158447>