

· 基础研究 ·

昆布多糖对大鼠心肌缺血/再灌注模型葡萄糖调节蛋白-78 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 12 蛋白表达含量的影响

党淼, 李铁成*

(锦州医科大学附属第三医院麻醉科, 辽宁 锦州 121000)

【摘要】目的 研究昆布多糖(Lam)对大鼠心肌缺血/再灌注(MI/RI)模型中葡萄糖调节蛋白-78(GRP-78)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 12(Caspase 12)蛋白表达含量的影响,探讨其对大鼠心肌是否有保护作用。**方法** 选取 32 只雄性 SD 大鼠,随机分为 4 组:假手术组(sham 组)、MI/RI 组、Lam 低剂量组、Lam 高剂量组。采用左冠状动脉结扎法制作大鼠 MI/RI 模型。酶联免疫吸附试验(ELISA)测定肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB),比色法测定髓过氧化物酶(MPO)的表达量。应用蛋白质免疫印迹(Western blotting)检测各组中大鼠心肌 GRP-78、Caspase 12、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(Bcl-2)蛋白的表达情况。光镜下观察心肌组织的病理形态学改变。伊文思蓝(Evans)、氯化三苯基四氮唑红(TTC)双染色法测定心肌梗死面积。采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。**结果** 与 MI/RI 组相比,低、高剂量组的 CK-MB[(93.74±5.37)和(72.71±5.63)和(59.79±9.67) U/L]、MPO[(72.66±3.40)和(58.92±4.88)和(46.06±5.74) U/L]、GRP-78[(1.13±0.02)和(0.81±0.01)和(0.66±0.01)]、Caspase 12[(1.45±0.10)和(0.82±0.06)和(0.62±0.02)]表达显著减少($P<0.01$),Bcl-2[(1.01±0.04)和(1.19±1.10)和(1.41±0.02)]表达显著升高($P<0.01$)。与 MI/RI 组相比,Lam 各处理组的心肌组织损伤有不同程度的减轻。与 MI/RI 组比较,Lam 各处理组心肌梗死面积显著减少[(55.36±2.47)%和(46.63±2.10)%和(38.40±2.07)%, $P<0.05$]。**结论** Lam 能减轻大鼠 MI/RI,对 MI/RI 的心肌有保护作用。其机制可能是 Lam 抑制 GRP-78 的过度表达,减轻了由内质网应激介导细胞凋亡途径的激活,下调 Caspase 12 凋亡通路,增强 Bcl-2 的表达,从而抑制心肌细胞凋亡。

【关键词】 昆布多糖;心肌缺血再灌注损伤;内质网应激;细胞凋亡

【中图分类号】 R541.4

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.10.180

Effect of laminarin on GRP78 and Caspase 12 expression in rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury

DANG Miao, LI Tie-Cheng*

(Department of Anesthesiology, Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of laminarin (Lam) on the protein expression of glucose regulated protein-78 (GRP-78) and cysteine-dependent aspartate-specific proteases 12 (Caspase12) in rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI) and whether it has protective effect on rat myocardium. **Methods** Thirty-two male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group, MI/RI group, low- and high-dose Lam treatment groups. The rat MI/RI model was established by left coronary artery ligation. The serum content of creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the content of myeloperoxidase (MPO) in the myocardial tissue was measured by colorimetric assay, and the protein expression levels of GRP78, Caspase 12, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in myocardium was detected by Western blotting. The pathomorphological changes of myocardial tissue were observed by light microscopy. Myocardial infarction area was measured by Evans Blue and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) double staining. SPSS statistics 21.0 was used to perform the statistical analysis. **Results**

The low- and high-dose Lam treatment groups had significantly decreased serum level of CK-MB [(72.71±5.63) vs (59.79±9.67) vs (93.74±5.37) U/L], myocardial content of MPO [(58.92±4.88) vs (46.06±5.74) vs (72.66±3.40) U/L] and protein levels of GRP-78 [(0.81±0.01) vs (0.66±0.01) vs (1.13±0.02)] and Caspase 12 [(0.82±0.06) vs (0.62±0.02) vs (1.45±0.10)], but obviously enhanced expression of Bcl-2 [(1.19±1.10) vs (1.41±0.02) vs (1.01±0.04)] when compared with the MI/RI group (all $P<0.01$). The myocardial tissue damage in the Lam treatment groups was alleviated to different extents than that in the MI/RI group. And

收稿日期: 2019-12-03; 接受日期: 2020-02-03

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20170540372)

通信作者: 李铁成, E-mail: litiecheng777@163.com

the area of myocardial infarction was remarkably reduced in the low- and high-dose Lam treatment groups than the MI/RI group [(55.36 $\pm$ 2.47)% vs (46.63 $\pm$ 2.10)% vs (38.40 $\pm$ 2.07)%, $P<0.05$]. **Conclusion** Lam can alleviate MI/RI and exerts protective effect on the injury in rats. The mechanism may be that Lam can inhibit the overexpression of GRP-78, reduce the activation of apoptosis pathway mediated by endoplasmic reticulum stress, down-regulate the apoptosis pathway of Caspase 12 and enhance the expression of Bcl-2, and thus inhibit the apoptosis of cardiomyocytes.

【Key words】 laminarin; myocardial ischemia-reperfusion injury; endoplasmic reticulum stress; cell apoptosis

This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (20170540372).

Corresponding author: LI Tie-Cheng, E-mail: litiecheng777@163.com

由于我国心血管疾病城乡发病率越来越高和逐渐低龄化,经皮冠状动脉介入治疗等冠状动脉再通恢复冠状动脉血流的技术愈趋成熟,心肌缺血再灌注损伤缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/RI)作为影响心血管疾病预后的重要因素,得到了广泛关注^[1]。近年研究表明^[2],内质网应激参与了 MI/RI 的发生发展,并与氧自由基生成过多、钙超载等机制相互作用。在病理因素如缺血、缺氧、炎症的作用下,内质网蛋白质的合成运输障碍,腔内堆积大量的未折叠或错误折叠的蛋白,激活葡萄糖调节蛋白-78(glucose regulated protein-78, GRP-78),启动内质网应激。当损伤持续存在时,内质网应激启动凋亡信号通路 GRP-78/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 12(cysteine-dependent aspartate-specific proteases 12, Caspase 12)等途径诱导细胞凋亡^[3]。因此,内质网应激在 MI/RI 的病理生理环节中具有重要作用^[4]。

昆布多糖(Laminarin, Lam)是存在于昆布中的大分子多糖物质。国内外研究表明,Lam 具有抑菌、抗肿瘤、调节免疫功能、调节血脂、抗氧化、降血糖等广泛的生物学活性^[5],具有重要的研究与开发价值。本研究建立大鼠 MI/RI 模型,观察大鼠血清中肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)、髓过氧化物(myeloperoxidase, MPO)的含量,以及心肌组织中 GRP-78、Caspase 12、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的蛋白表达情况,根据心肌组织损伤程度进一步探讨 Lam 对大鼠心肌是否有保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lam(北京索莱宝生物科技有限公司,中国北京);CK-MB 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,中国上海);MPO 试剂盒(南京建成生物工程中心,中国南京);兔抗鼠 GRP-78、Bcl-2 多克隆抗体(美国 Santa cruz 公司,美国);内参兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 Ig G(北京博奥森生物技术有限公司,中国北京);蛋白提取裂解液、聚丙烯

酰胺凝胶电泳凝胶配置试剂盒、BCA(bicinchoninic acid)蛋白浓度检测试剂盒、电化学发光试剂盒(海门市碧云天生物技术研究,中国海门);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠 Ig G(圣克鲁斯生物技术有限公司,中国上海);其它由锦州医科大学动物实验科研中心的实验室提供。

1.2 实验动物与分组

清洁健康的雄性 SD 大鼠 32 只,体质量(200 $\pm$ 20)g,由锦州医科大学动物实验科研中心提供,随机数表法分为 4 组,每组 8 只。(1)假手术组(sham 组):普通饲料及饮用水喂养 2 周,开胸后冠状动脉穿线不结扎;(2)MI/RI 组:开胸后冠状动脉穿线,结扎 45 min,再灌注 180 min;(3)低剂量组:术前 Lam 50 mg/kg 灌胃 2 周,开胸后穿线,结扎 45 min,再灌注 180 min;(4)高剂量组:术前 Lam 100 mg/kg 灌胃 2 周,开胸后穿线,结扎 45 min,再灌注 180 min。

1.3 方法

1.3.1 建立大鼠 MI/RI 模型 术前 12 h 禁食不禁水。20%乌拉坦(6 ml/kg)腹腔注射进行麻醉。仰卧位并将四肢固定于实验台上,针形电极插入大鼠四肢皮下,连接心电图机,气管插管接人工呼吸机(频率 55 次/min,潮气量 15 ml/kg)。沿胸骨左侧旁行切口,剪开皮肤。用止血钳钝性分离肌肉,充分暴露第 2、3 根肋骨,剪断肋骨,充分暴露心包,小心剪开心包膜,充分暴露心脏。除 sham 组穿线不结扎外,各组均在肺动脉圆锥和左心耳之间左前降支冠状动脉处穿一缝合线,穿过一个有活口的硅胶管,系紧结扎线,45 min 后剪掉带有活口的硅胶管的结扎线,使心肌血流恢复,随后保持 180 min 再灌注。结扎冠状动脉后见心电图 ST 段立即抬高;再灌注时抬高的 ST 段回落 50%以上为造模成功的标志。

1.3.2 酶联免疫吸附试验和比色法测定 CK-MB 和 MPO (1)CK-MB:取离心后的血浆上清液,加样,用封板膜封板后置 37℃ 温育 60 min,洗涤 5 次,拍干,加入显色剂,37℃ 避光显色 15 min,加终止液终止反应,测定吸光度(A_{492})。(2)MPO:称取心尖组织 100 mg 制作成样本,通过供氢体邻连茴香胺供氢

后生成黄色化合物,比色法测定产物的生成量,推算 MPO 含量。

1.3.3 Western blotting 检测 GRP-78、Caspase 12 和 Bcl-2 取 40 mg 大鼠心脏组织加入裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白定量。行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜,5%脱脂奶的 TBST 液封闭 1 h,洗涤 3 次,兔抗鼠 GRP-78 多克隆抗体及兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体(1:1 000 稀释)孵育,4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 Ig G (1:5 000 稀释),化学发光法进行成像。Image Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值,以 β -actin 作为内参蛋白,计算目的蛋白和 β -actin 比值作为目标蛋白的相对表达量。Caspase 12、Bcl-2 抗体方法同上。

1.3.4 心肌组织的病理形态学改变 将大鼠心室肌组织放置于 4%多聚甲醛溶液中固定。乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,进行 HE (hematoxylin-eosin) 染色,光学显微镜观察心肌组织病理形态学的变化。

1.3.5 心肌梗死面积测定 实验结束前,经冠状动脉逆行灌注 1% Evans Blue 2 ml,将非缺血区蓝染,未被染色区域为危险区 (area at risk, AAR)。迅速取出心脏,置于生理盐水中,分离左心室。-20℃冰箱冷冻 1 h 后,沿心尖至基底部剪成 5 个 2 mm 的切片,放入 1%氯化三苯基四氮唑红 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 的磷酸缓冲液中,37℃水浴 30 min。染色后梗死区呈灰白色,缺血区呈砖红色。应用 Image Pro Plus 6.0 软件测量心肌缺血范围和心肌梗死范围。心肌缺血范围 = AAR/左室面积 (left ventricle, LV) × 100%;心肌梗死范围 = 梗死区面积 (infarction size, IS)/AAR × 100%。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采用单因素方差分析,方差齐的两两比较采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CK-MB、MPO 的含量比较

与 sham 组比较,MI/RI 组 CK-MB、MPO 表达水平显著升高 ($P < 0.01$),与 MI/RI 组比较,低剂量组和高剂量组 CK-MB、MPO 的表达水平均显著降低 ($P < 0.01$),与低剂量组比较,高剂量组降低更显著 ($P < 0.01$;表 1)。

表 1 各组 CK-MB、MPO 表达量的比较

Table 1 Comparison of CK-MB and MPO expression among groups ($n = 8$, U/L, $\bar{x} \pm s$)

Group	CK-MB	MPO
Sham	39.89±4.43	27.59±2.54
MI/RI	93.74±5.37 [*]	72.66±3.40 [*]
Low dose	72.71±5.63 [#]	58.92±4.88 [#]
High dose	59.79±9.67 ^{#△}	46.06±5.74 ^{#△}

MI/RI: myocardial ischemia reperfusion injury; CK-MB: creatine kinase isoenzyme MB; MPO: myeloperoxidase. Compared with sham group, ^{*} $P < 0.01$; compared with MI/RI group, [#] $P < 0.01$; compared with low dose group, [△] $P < 0.01$.

2.2 各组 GRP-78、Caspase 12、Bcl-2 蛋白表达比较

与 sham 组比较,MI/RI 组 GRP-78、Caspase 12 水平显著升高 ($P < 0.01$),Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 MI/RI 组比较,低剂量组和高剂量组 GRP-78、Caspase 12 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$),Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.01$),与低剂量组比较,高剂量组各蛋白改善水平更为显著 ($P < 0.01$;图 1,表 2)。

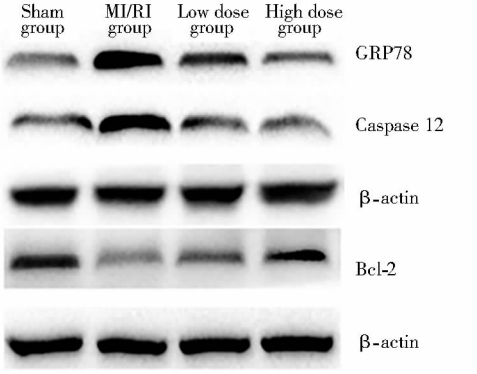


图 1 各组 GRP-78、Caspase 12、Bcl-2 表达情况比较

Figure 1 Comparison of GRP-78, Caspase 12, Bcl-2 expression among groups

MI/RI: myocardial ischemia reperfusion injury; GRP-78: glucose regulated protein 78; Caspase 12: cysteine-dependent aspartate-specific proteases 12; Bcl-2: B-cell lymphoma-2.

表 2 各组 GRP-78、Caspase 12、Bcl-2 蛋白的表达量

Table 2 Expression of GRP-78, Caspase 12, Bcl-2 protein among groups ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Group	GRP-78	Caspase 12	Bcl-2
Sham	0.50±0.02	0.37±0.05	1.71±0.08
MI/RI	1.13±0.02 [*]	1.45±0.10 [*]	1.01±0.04 [*]
Low dose	0.81±0.01 [#]	0.82±0.06 [#]	1.19±1.10 [#]
High dose	0.66±0.01 ^{#△}	0.62±0.02 ^{#△}	1.41±0.02 ^{#△}

MI/RI: ischemia reperfusion injury; GRP-78: glucose regulated protein 78; Caspase 12:cysteine-dependent aspartate-specific proteases 12; Bcl-2: B-cell lymphoma-2. Compared with sham group, ^{*} $P < 0.01$; compared with MI/RI group, [#] $P < 0.01$; compared with low dose group, [△] $P < 0.01$.

2.3 各组心肌组织的病理形态学改变

光镜下 sham 组心肌细胞肌纤维排列整齐紧密, 细胞形态结构正常, 细胞核清晰可见; MI/RI 组多数细胞肿胀, 肌纤维断裂、缺损, 细胞间质大量水肿并伴有大面积出血; 低剂量组细胞出现轻微肿胀, 胞内空泡增多, 伴少量出血, 但细胞核清晰可见, 细胞膜完整; 高剂量组肌纤维排列基本完整, 细胞间质少量水肿肿胀, 未见血管扩张, 细胞结构相对完整 (图 2)。

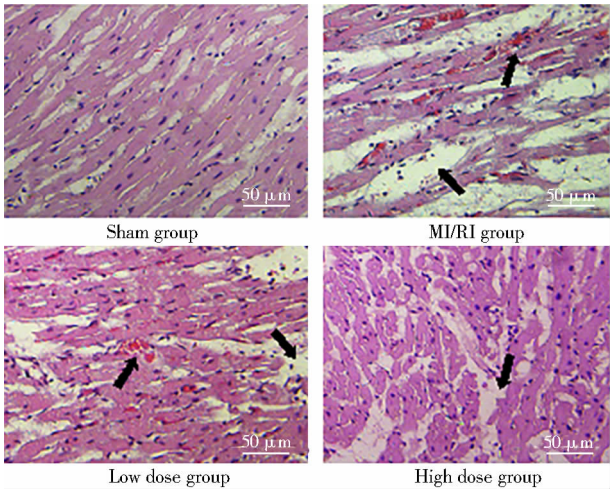


图 2 光镜下各组心肌病理学变化
Figure 2 Myocardial pathological changes among groups under light microscope (×200)
MI/RI: myocardial ischemia/reperfusion injury.

2.4 各组心肌梗死面积比较

sham 组未见明显缺血区, 其余 3 组间心肌缺血范围差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 MI/RI 组比较, 低剂量和高剂量组的心肌梗死范围显著减少 ($P<0.01$), 与低剂量组比较, 高剂量组心肌梗死范围减少更显著 ($P<0.05$; 表 3, 图 3)。

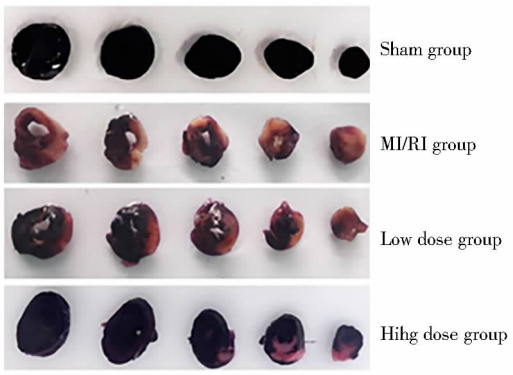


图 3 各组心肌梗死面积的比较
Figure 3 Comparison of myocardial infarction size among groups
MI/RI: myocardial ischemia reperfusion injury.

表 3 各组心肌梗死面积的比较

Group	Table 3 Comparison of myocardial infarction size among groups (n=5, %, $\bar{x}\pm s$)	
	AAR/LV	IS/AAR
MI/RI	63.10±3.88	55.36±2.47
Low dose	57.28±1.87	46.63±2.10*
High dose	54.46±4.17	38.40±2.07**

AAR/LV; area at risk/left ventricle; IS/AAR; infarction size/area at risk. Compared with MI/RI group, * $P<0.01$; compared with low dose group, ** $P<0.05$.

3 讨论

GRP-78 是内质网应激的标志性启动蛋白^[6]。GRP-78 在行使“代偿性”内质网应激保护作用的同时, 其表达量会随内质网应激时间延长而减少。这可能是由于持续的内质网应激不仅使 GRP-78 表达增加, 也激活了 CHOP、JNK 和 Caspase 12 等多个凋亡通路信号^[7]。Caspase 12 的激活是内质网应激唯一不依赖于其他通路独立诱导细胞凋亡的通路^[8,9]。有实验表明, 在输尿管梗阻早期, Lam 可能通过上调内质网应激分子伴侣 GRP-78、GRP-94 蛋白表达, 阻断内质网应激信号传导通路, 从而减轻早期肾间质纤维化的发生和发展^[10]。昆布多糖硫酸酯不仅能显著降低受损心肌细胞内氧自由基含量^[11], 还能有效地清除氧自由基, 减轻氧化损伤和治疗肺纤维化^[12]。GRP-78 的表达量反映 MI/RI 时内质网应激的程度, Caspase 12、Bcl-2 的表达量反映心肌细胞凋亡的程度。本研究结果表明, 与 sham 组比较, MI/RI 组 GRP-78、Caspase 12 的表达增加, 凋亡基因 Bcl-2 的表达减少, 表明在 MI/RI 期间可能发生了由内质网应激介导的 Caspase 12 相关凋亡途径, 并诱导了细胞凋亡; 与 MI/RI 组比较, Lam 低、高剂量组 GRP-78、Caspase 12 蛋白的表达减少, Bcl-2 表达增加, 可能与 Lam 预处理抑制内质网应激诱导的细胞凋亡、产生心肌保护作用有关。

HE 染色和心肌梗死面积双染的观察能直接反映心肌组织损伤的程度。本实验结果表明, Lam 处理组明显减轻心肌组织的损伤, 高剂量组更显著, 提示 Lam 预处理具有心肌保护作用, 可能机制为 Lam 抑制 GRP-78 的过度表达, 抑制了由内质网应激介导细胞凋亡途径的激活, 下调了 Caspase 12 凋亡通路, 增强了 Bcl-2 的表达, 从而减轻了心肌细胞凋亡。

昆布在食物及药材中广泛存在, 但 Lam 提取、

分离、提纯等过程尤为复杂且成本较高,目前如何提取 Lam 仍是食品生物工程等学科的研究热点。本实验表明,Lam 可通过抑制由内质网应激介导的心肌细胞凋亡途径,对心肌产生保护作用。但由于 MI/RI 的发病机制由多个通路共同作用,相互联系,具体机制目前尚无明确定论。本实验仅从内质网应激角度出发,探讨 Lam 是否与细胞凋亡有关,因而相对具有局限性,具体机制还有待进一步实验验证讨论。

【参考文献】

- [1] Surendran A, Aliani M, Ravandi A. Metabolomic characterization of myocardial ischemia-reperfusion injury in ST-segment elevation myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11742-11754. DOI: 10.1038/s41598-019-48227-9.
- [2] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 184-190. DOI: 10.1038/ncb0311-184.
- [3] Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 143-149. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.11.003.
- [4] 朱平均, 周浩, 胡舜英, 等. 内质网应激参与调节心肌缺血/再灌注损伤研究的新进展[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2017, 16(3): 225-229. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.052.
Zhu PJ, Zhou H, Hu SY, *et al.* Research progress of endoplasmic reticulum stress in myocardium ischemia reperfusion injury [J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2017, 16(3): 225-229. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.052.
- [5] 张利平, 孟燕, 元小冬, 等. 内质网应激及介导细胞凋亡信号转导研究进展[J]. *生物医学工程与临床*, 2018, 22(2): 214-220. DOI: 10.13339/j.cnki.sglc.20180313.021.
Zhang LP, Meng Y, Yuan XD, *et al.* Research progress of endoplasmic reticulum stress and apoptosis mediated signal transduction[J]. *Biomed Engineer Clin Med*, 2018, 22(2): 214-220. DOI: 10.13339/j.cnki.sglc.20180313.021.
- [6] Elif G, Sefa A, Ozlem GK, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 792-816. DOI: 10.3390/ijms18040792.
- [7] 麻庆乐, 卢德赵. 葡萄糖调节蛋白 78 的研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(4): 331-335. DOI: 10.13376/j.cbbs/2017043.
Ma QL, Lu DZ. Research progress of glucose regulated protein 78[J]. *Chin Bullet Life Sci*, 2017, 29(4): 331-335. DOI: 10.13376/j.cbbs/2017043.
- [8] Dalal S, Zha Q, Daniels CR, *et al.* Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac myocytes *via* the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway and endoplasmic reticulum stress[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(8): H1182-H1191. DOI: 10.1152/ajpheart.00954.2013.
- [9] Omura T, Kaneko M, Okuma Y, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 10(1): 1-7. DOI: 155/2013/239854.
- [10] 韦淑娟, 任志涛, 杨信怡, 等. 昆布多糖硫酸酯 H₂O₂ 诱导小鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. *中国海洋药物*, 2015, 34(2): 39-44. DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2015.02.007.
Wei SJ, Ren ZT, Yang XY, *et al.* Protective effects of laminaria polysaccharide sulfate 5 on cardiomyocytes of neonatal rats injured by hydrogen peroxide (H₂O₂) [J]. *Chin J Marine Drugs*, 2015, 34(2): 39-44. DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2015.02.007.
- [11] 张翠, 关宇飞, 张兰, 等. 昆布多糖对肾纤维化大鼠肾组织内质网应激的保护作用[J]. *中国海洋药物*, 2012, 31(4): 34-38. DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2012.04.006.
Zhang C, Guan YF, Zhang L, *et al.* Protection of Kelp polysaccharides on endoplasmic reticulum stress of rats with renal interstitial fibrosis[J]. *Chin J Marine Drugs*, 2012, 31(4): 34-38. DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2012.04.006.
- [12] Liu X, Liu H, Zhai Y, *et al.* Laminarin protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in MRC-5 cells possibly *via* regulating NRF2 [J]. *Peer J*, 2017, 10(5): e3642-e3659. DOI: 10.7717/peerj.3642.

(编辑: 吕青远)