DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251229003
引用格式: 刘晶晶, 赵寒雪, 郭文静, 等. *α*-酮戊二酸对 *D*-半乳糖诱导大鼠氧化应激损伤的保护作用及机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 36–45.
LIU JJ, ZHAO HX, GUO WJ, *et al*. Study on protective effects and mechanism of *α*-ketoglutarate on *D*-galactose-induced oxidative stress injury in rats [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 36–45. (in Chinese with English abstract).

α-酮戊二酸对 *D*-半乳糖诱导大鼠氧化应激损伤的保护作用及机制研究

刘晶晶[1], 赵寒雪[2], 郭文静[2], 李思琪[2], 徐蓓蕾[2*], 刘　静[1*]
(1. 中国食品药品检定研究院, 北京　100050; 2. 哈尔滨商业大学中药学院, 哈尔滨　150000)

摘　要: 目的　评估 *α*-酮戊二酸(*α*-ketoglutarate, AKG)对 *D*-半乳糖(*D*-galactose, *D*-gal)诱导的大鼠氧化应激损伤的保护作用, 并探讨其潜在作用机制。**方法**　本研究选用 SD 雄性大鼠作为研究对象, 通过腹腔注射 *D*-gal 溶液进行造模, 随机分为 5 组, 即空白组、模型组、AKG 低剂量组(AKG-L, 50 mg/kg)、AKG 中剂量组(AKG-M, 100 mg/kg)、AKG 高剂量组(AKG-H, 200 mg/kg), 大鼠每日接受一次相应给药, 持续 4 周。采用比色法检测大鼠血液和肝脏中脂质氧化产物标志物丙二醛(malondialdehyde, MDA), 蛋白质氧化产物标志物蛋白质羰基, 抗氧化物质和抗氧化酶标志物过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)的水平。通过组织病理学检查, 评估 AKG 对 *D*-gal 致大鼠氧化损伤的保护效果。采用 16S rRNA 测序和超高效液相-串联质谱法分析各组大鼠肠道菌群组成和短链脂肪酸含量, 以评估其潜在的抗氧化作用机制。**结果**　与模型组相比, 各给药组可不同程度地显著降低大鼠血液和肝脏的 MDA 和蛋白质羰基水平(P<0.01), 并部分增加 SOD、CAT 活性和 GSH 水平。此外, AKG 能调节肠道菌群结构, 增加毛螺菌群 NK4A136 类群、普雷沃氏菌、梭菌纲 vadinBB60 类群 3 种菌群的相对丰度。与空白组相比, 氧化损伤大鼠肠道中短链脂肪酸戊酸、丁酸和异丁酸的含量均显著下降(P<0.01), 经 AKG 干预后, 这 3 种短链脂肪酸含量均明显回升, 丁酸和异丁酸含量改善最为显著(P<0.01), 几乎接近正常水平。**结论**　AKG 给药对 *D*-gal 诱导的大鼠氧化损伤有显著保护作用, 其作用过程中伴随肠道菌群结构及短链脂肪酸水平的改善, 上述结果提示, 肠道菌群-短链脂肪酸轴与抗氧化效应可能共同参与 AKG 的保护作用。

关键词: *α*-酮戊二酸; 抗氧化; *D*-半乳糖; 短链脂肪酸

Study on protective effects and mechanism of *α*-ketoglutarate on *D*-galactose-induced oxidative stress injury in rats

LIU Jing-Jing[1], ZHAO Han-Xue[2], GUO Wen-Jing[2], LI Si-Qi[2], XU Bei-Lei[2*], LIU Jing[1*]

收稿日期: 2025-12-29
基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(PL2024H197); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金项目(2025A3)
第一作者: 刘晶晶(1988—), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为中药及食品质量控制。E-mail: 18911002859@126.com
***通信作者:** 徐蓓蕾(1983—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为食品及中药质量控制。E-mail: xubeilei2006@163.com
刘静(1982—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为中药质量控制。E-mail: liujing_zsm@126.com

(1. *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*; 2. *School of Pharmacy*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150000, *China*)

ABSTRACT: Objective To evaluate the protective effects of α-ketoglutarate (AKG) on oxidative damage induced by *D*-galactose (*D*-gal) in rats and explore its potential mechanisms. **Methods** Male SD rats were used as experimental subjects. Oxidative stress injury was induced by intraperitoneal injection of *D*-gal solution, and the animals were randomly divided into 5 groups: Control group, model group, low-dose AKG group (AKG-L, 50 mg/kg), medium-dose AKG group (AKG-M, 100 mg/kg) and high-dose AKG group (AKG-H, 200 mg/kg). Rats were administered the respective treatment once daily for 4 weeks. The levels of oxidative biomarkers, including malondialdehyde (MDA), protein carbonyls, as well as antioxidant indicators and enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH), were determined using colorimetric assays in plasma and liver tissues. Histopathological examinations were conducted to assess the protective effects of AKG against *D*-gal-induced oxidative damage. Furthermore, 16S rRNA sequencing and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry were performed to analyze gut microbiota composition and short-chain fatty acids levels in each group, in order to investigate the potential antioxidant mechanisms of AKG. **Results** Compared with the model group, AKG administration significantly reduced MDA and protein carbonyl levels in plasma and liver, while partially enhancing the activities of SOD and CAT as well as GSH levels. Additionally, AKG could modulate the structure of gut microbiota and increase the relative abundance of *Lachnospiraceae* NK4A136 group, *Prevotella* and Clostridia vadinBB60 group. Compared with the control group, the levels of the short-chain fatty acids valeric acid, butyric acid and isobutyric acid in the intestines of rats with oxidative damage were significantly reduced. Following AKG intervention, the levels of these 3 kinds of short-chain fatty acids were markedly increased, with butyric acid and isobutyric acid showing the most pronounced improvement (P<0.01), approaching those of the normal control group. **Conclusion** AKG exerts a significant protective effects against *D*-gal-induced oxidative damage in rats. This protective effect is accompanied by improvements in gut microbiota composition and short-chain fatty acid levels. These findings suggest that the gut microbiota-short-chain fatty acid axis and antioxidant effects may jointly contribute to the protective action of α-ketoglutarate.

KEY WORDS: α-ketoglutarate; antioxidant; *D*-galactose; short-chain fatty acids

0　引　言

经典的自由基理论认为, 自由基是在细胞正常代谢过程中产生的活性分子, 其中包括羟基自由基和过氧自由基。这些自由基能够对细胞脂质、蛋白质及核酸等组分造成损伤, 而机体的抗氧化防御系统往往难以完全清除过量自由基, 从而导致氧化应激, 即活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成与清除之间的失衡[1–3]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)是人体内重要的抗氧化酶, 构成了机体抵御氧化应激损伤的主要防线, 而丙二醛(malondialdehyde, MDA)是脂质过氧化的终产物, 常被用作评估氧化应激程度的生物标志物[4–5]。然而, 当氧化应激过程持续时, 不仅会加速细胞衰老, 还与多种慢性疾病的发生密切相关, 例如心脑血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病及肝脏损伤等[6–8]。因此, 抗氧化应激已成为衰老及相关疾病研究中的关键环节, 开发安全有效的抗氧化干预策略具有重要意义。

α-酮戊二酸(α-ketoglutarate, AKG)是三羧酸循环的关键中间产物, 在细胞能量代谢、氨基酸脱氨及合成以及谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)代谢等过程中发挥重要作用。作为内源性代谢物, AKG 不仅参与能量转换, 也在氧化还原平衡中扮演核心角色。现代药理学研究表明, AKG 在维持线粒体功能稳态、调节炎症反应、促进细胞增殖与分化、抑制肿瘤发生发展以及抵御氧化应激等方面均发挥重要的生物学作用[9–11]。然而, 目前关于 AKG 抗氧化作用的研究多集中于细胞水平或单一生化指标, 系统评价其在整体动物水平上对蛋白质氧化损伤、抗氧化酶系统及其调控网络的研究仍较为有限, 其作用机制亦有待进一步阐明。此外, 肠道菌群-短链脂肪酸途径在人体疾病的治疗中逐渐受到重视, 肠道菌群的失衡与氧化应激等多种相关疾病发展均密切相关[12–13]。肠道菌群通过代谢产生乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸, 这些代谢产物不仅是结肠上皮细胞的重要能量来源, 还可作为信号分子参与调控宿主的代谢稳态和免疫功能[14–15]。除传统抗氧化剂外, 众多内源性代谢物及外源性活性成分均可通过调节肠道菌群结构及短链脂肪酸代谢, 从而参与机体氧化稳态和炎症反应的调

控。然而，作为三羧酸循环关键中间产物，其是否同样具有调控肠道微生态发挥系统性抗氧化保护作用，目前尚缺乏整体动物水平的实验证据。

因此，本研究通过构建 *D*-半乳糖(*D*-galactose, *D*-gal)诱导的大鼠氧化应激损伤模型，系统评价 AKG 对蛋白质氧化产物及抗氧化酶等指标的影响，以明确其抗氧化作用，并结合肠道菌群组成和短链脂肪酸水平的检测，初步探讨其潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

AKG(纯度 98%，批号: C592502501，精晶药业股份有限公司)；还原型 GSH 测定试剂盒(批号: 20250619)、蛋白质羰基含量测定试剂盒(批号: 20250625)、SOD 测定试剂盒(批号: 20250619)、MDA 测定试剂盒(批号: 20250620)、CAT 测定试剂盒(批号: 20250617)(南京建成生物科技研究所)；*D*-gal(纯度 98%，批号: C14971408，上海麦克林生化科技股份有限公司)；组织固定液(批号: 20250319)、多聚甲醛(批号: 202207017)、苏木素-伊红染液(批号: B1002)(武汉百仟度生物科技有限公司)；生理盐水(批号: L25021401)(四川科伦药业股份有限公司)；二甲苯(分析纯，批号: 10023418)、中性树胶(批号: 10004160)(国药集团化学试剂有限公司)；无水乙醇、乙酸乙酯(分析纯，北京化工厂有限责任公司)；1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC](纯度 99%)、O-苄基羟胺(O-benzylhydroxylamine, O-BHA)(纯度 98%)(上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用有限责任公司)；MultiSkan FC 酶标仪、Nanodrop 2000 超微量分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]；Synergy HT 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)；1-15PK 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)；KD-P 组织摊片机(浙江科迪仪器有限公司)；RM20116 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)；DS-U3 正置光学显微镜(日本尼康株式会社)；AB SCIEX Triple TOF 6600 三重四极杆高分辨飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)；LCMS-8050 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪(日本岛津公司)；Tanon 2500 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)；S1000 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 实验动物

SD 雄性大鼠，体质量约 230~250 g，SPF 级，购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[生产许可合格证号: SCXF(京)2019-0010]，大鼠饲养于昼夜节律光照条件下，自由进水进食，温度(25±2) ℃，相对湿度 50%~70%。

1.4 实验方法

1.4.1 灌胃溶液制备、动物分组与给药

大鼠适应性饲养一周后，除空白组外，其余大鼠每日腹腔注射 *D*-gal (200 mg/kg)连续造模 4 周，用于建立氧化损伤模型。造模结束后，采集血清测定 MDA 水平，并根据 MDA 结果进行随机分组，将 50 只大鼠分为 5 组(每组 10 只): 空白组(Control)、模型组(Model)、AKG 低剂量组(AKG-L, 50 mg/kg)、中剂量组(AKG-M, 100 mg/kg)和高剂量组(AKG-H, 200 mg/kg)。分组完成后，各组大鼠接受为期 4 周的干预处理。AKG 处理组每日灌胃相应剂量的药液，模型组与空白组灌胃等体积的 AKG 溶剂(无活性成分)；空白组每日腹腔注射等体积生理盐水，其余各组继续注射 *D*-gal (200 mg/kg)。所有处理均在每日同一时间进行，给药顺序为先造模，间隔 30 min 后给药。末次给药 24 h 后，麻醉大鼠，腹主动脉取血，迅速完整分离大鼠其他脏器，用于后续切片分析和指标检测。

1.4.2 AKG 对大鼠一般情况和脏器指数的影响

开始造模后，每日观察各组大鼠的一般状态(包括实验动物的活动、生存状态、毛发等)，实验结束后，分别收集大鼠脏器并称重，计算脏器指数，计算如公式(1)所示:

$$\text{脏器指数}/(\text{mg/g})=(\text{大鼠脏器质量}/\text{体重}) \quad (1)$$

1.4.3 AKG 对大鼠氧化应激水平的影响

参照试剂盒说明书，分别测定大鼠血清和肝脏中的 SOD、MDA、CAT、GSH 以及蛋白质羰基的水平。

1.4.4 苏木精-伊红染色法观察大鼠组织病理学变化

取出适量大鼠肝脏和肾脏组织后，立即使用 4%多聚甲醛固定并进行适度修剪，梯度脱水、包埋，脱蜡后，氨水返蓝，分别放入苏木素和伊红染色，依次放入无水乙醇、二甲苯中脱水透明后，中性树胶封片，光学显微镜下观察。

1.4.5 肠道菌群测序与短链脂肪酸测定

取各组大鼠粪便约 80 mg，采用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA，经琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 检测 DNA 完整性，使用特异性引物进行 PCR 扩增，纯化后构建文库，使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序。所得原始数据经质控、去噪和拼接后，使用 QIIME 2 软件进行生物信息学分析[16]。

短链脂肪酸定量检测采用超高效液相-串联质谱法，并在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下运行。取各组大鼠粪便适量，加入超纯水充分匀浆，离心收集上清液，加入含内标(D_7-丁酸)的乙腈溶液，随后加入 EDC 和 O-BHA 进行衍生化反应，再向样品中加入等体积超纯水，涡旋混匀后乙酸乙酯萃取，收集有机相并干燥，流动相复溶后测定。流动相分别为 0.1%甲酸水溶液(A)和甲醇(B)，流速为 0.3 mL/min，洗脱程序为: 0~1.0 min，5%~20% B；1.0~5.5 min，20%~50% B；5.5~5.7 min，50%~60% B；5.7~6.0 min，60%~80% B。丁酸、异丁酸和戊酸的母离子(*m*/*z*)分别为 194.1、194.1 和 208.1，子离子(*m*/*z*)

均为 91.0, 对应的碰撞电压分别为 20、20、15 V。

1.5　数据处理

统计分析及图表绘制均采用 GraphPad Prism 9.0 软件完成, 结果以平均值±标准偏差进行表示, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行差异分析, $P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　AKG 对大鼠一般生理情况以及脏器指数的影响

在空白组中, 大鼠的体重呈现出稳定的增长趋势, 其自然反应、行为活动、生存状态以及毛发等方面均未出现任何异常情况。然而, 随着造模时间的延长, 在模型组中, 与空白组大鼠相比, 其毛发逐渐呈现出变黄且容易脱落的现象, 活动范围也有所缩小, 体重增长速度缓慢。相比之下, 在各给药组中, 上述情况均得到显著改善。结果表明, *D*-gal 造模可显著影响大鼠的一般生理状态和生长发育, 而各剂量给药处理能够在一定程度上恢复其对行为学表型等的不良影响, 提示给药具有明显的整体保护作用。

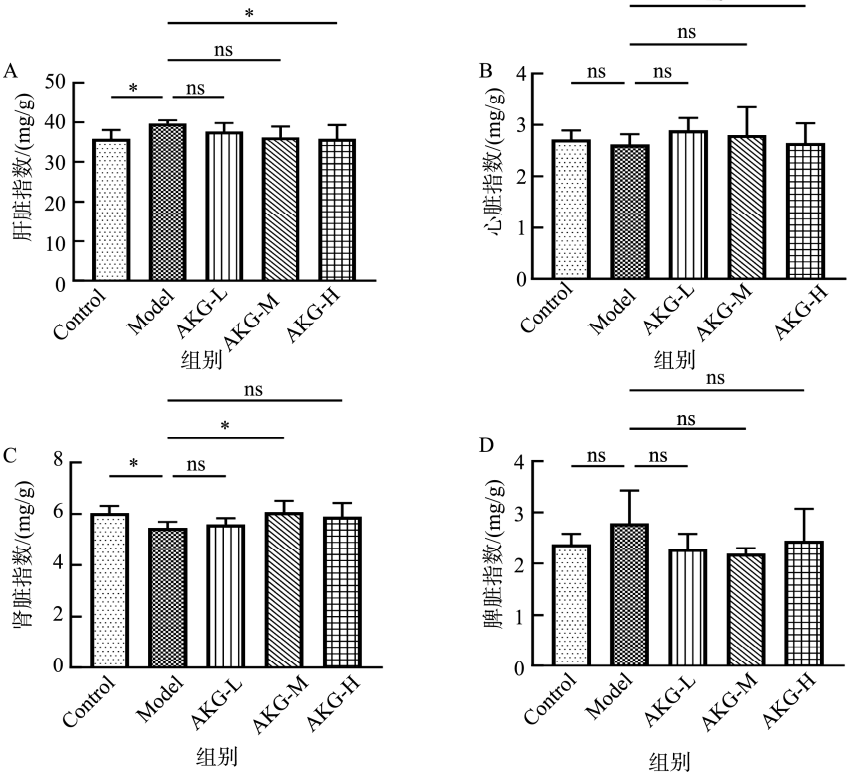
如图 1 所示, 与空白组大鼠相比, 模型组大鼠肾脏指数显著降低($P<0.05$), 肝脏指数显著升高($P<0.05$), 心脏、脾脏指数未见显著性差异; 与模型组相比, 中剂量组大鼠肾脏指数显著升高($P<0.05$), 高剂量组肝脏指数均显著降低($P<0.05$); 上述结果表明, AKG 给药对 *D*-gal 引起脏器影响有一定恢复作用。

2.2　AKG 对大鼠脂质氧化产物的影响

如图 2 所示, 实验动物经 *D*-gal 诱导后, 与空白组相比, 模型组大鼠血液、肝脏 MDA 水平均极显著升高($P<0.001$), 表明大鼠经造模后体内氧化应激水平异常; 经 AKG 给药后, 与模型组相比, 各个剂量组大鼠血液和肝脏 MDA 水平均极显著降低($P<0.001$), 差异有统计学意义。MDA 水平的显著升高反映了脂质过氧化反应的增强, 是机体发生氧化应激损伤的重要标志。上述结果表明, *D*-gal 可显著诱导机体及肝脏氧化应激损伤, 而 AKG 干预能够有效降低 MDA 水平, 显著减轻氧化应激程度, 提示其具有明确的抗氧化保护作用。

2.3　AKG 对大鼠蛋白质氧化产物的影响

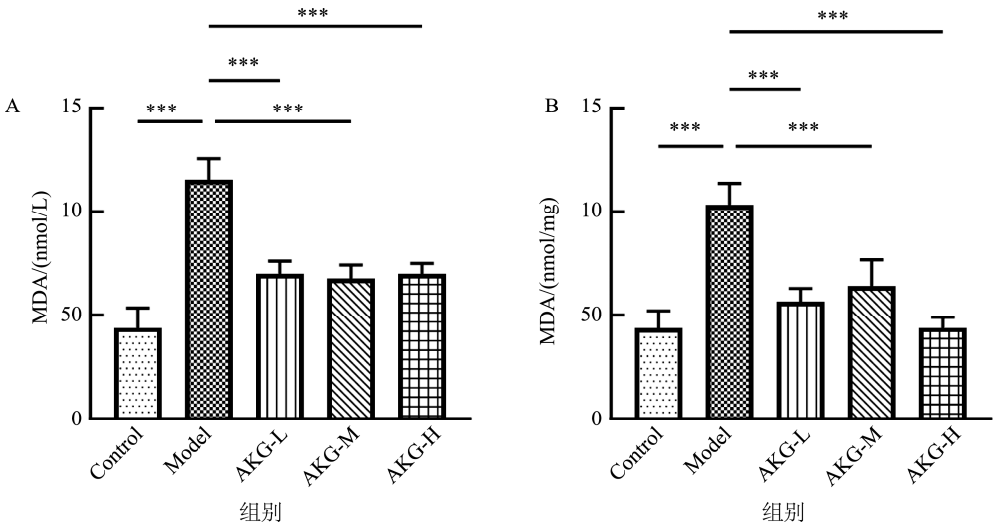
如图 3 所示, 实验动物经 *D*-gal 诱导后, 与空白组相比, 模型组大鼠血液、肝脏蛋白质羰基水平均极显著升高($P<0.001$), 表明大鼠经造模后体内氧化应激水平异常; 经 AKG 给药后, 与模型组相比, 各个剂量组大鼠血液和肝脏蛋白质羰基水平均显著降低($P<0.05$), 差异有统计学意义。蛋白质羰基是蛋白质在 ROS 作用下发生氧化修饰后形成的稳定产物, 由于其化学性质稳定、在体内不易被进一步代谢清除, 故被广泛认为是评价蛋白质氧化损伤程度和机体氧化应激水平的经典生物标志物, 常用于反映组织和血液中氧化应激相关的病理变化。上述结果进一步表明, *D*-gal 可显著诱导机体蛋白质氧化损伤, 而 AKG 处理能够



注: *表示差异显著($P<0.05$), 图 3、5、11~12 同; ns 表示无显著性差异, 图 5~6 同。

图 1　AKG 给药对大鼠脏器指数的影响

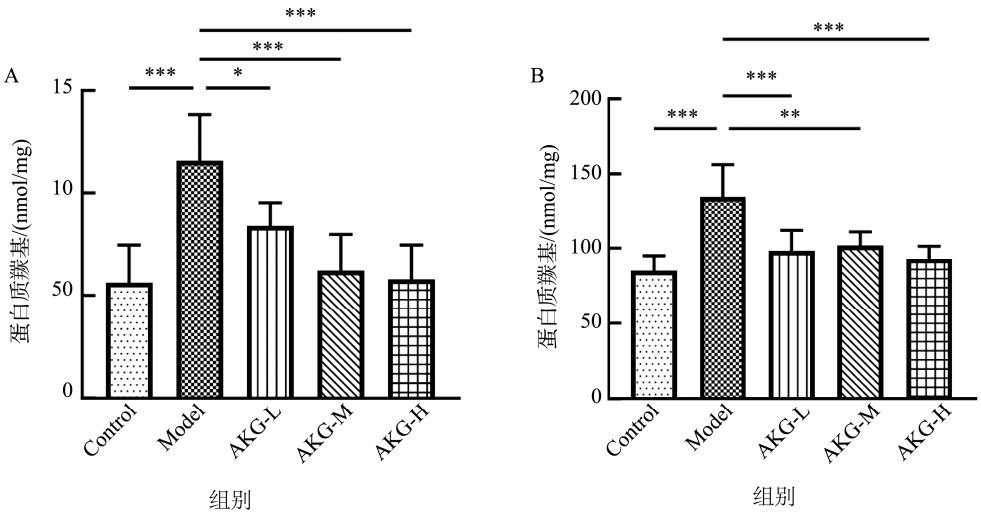
Fig.1　Effects of AKG administration on organ indices of rat



注: A. 血液; B. 肝脏, 图 3~6 同; ***表示差异强极显著(P<0.001), 图 3~6、9、11~12 同。

图 2 AKG 给药对大鼠 MDA 的影响

Fig.2 Effects of AKG administration on MDA in rat



注: **表示差异极显著(P<0.01), 图 6、9、11~12 同。

图 3 AKG 给药对大鼠蛋白质羰基的影响

Fig.3 Effects of AKG administration on protein carbonyl in rat

有效降低蛋白质羰基水平, 减轻蛋白氧化程度, 从而对氧化应激损伤发挥保护作用。

2.4 AKG 对大鼠抗氧化酶和抗氧化物质的影响

如图 4 所示, 实验动物经 *D*-gal 诱导后, 与空白组相比, 模型组大鼠血液和肝脏 SOD 水平均显著降低(P<0.001), 表明大鼠经造模后体内氧化应激水平异常; 经 AKG 给药后, 与模型组相比, 各个剂量组大鼠血液和肝脏 SOD 水平均显著升高(P<0.01), 差异有统计学意义。

如图 5 所示, 实验动物经 *D*-gal 诱导后, 与空白组相比, 模型组大鼠血液和肝脏CAT水平均显著降低(P<0.001), 表明大鼠经造模后体内氧化应激水平异常; 经 AKG 给药后, 与模型组相比, 中、高剂量组大鼠血液和肝脏 CAT 水平均显著升高(P<0.05), 差异有统计学意义。

如图 6 所示, 实验动物经 *D*-gal 诱导后, 与空白组相比, 模型组大鼠血液和肝脏 GSH 水平均显著降低(P<0.001), 表明大鼠经造模后体内氧化应激水平异常; 经 AKG 给药后, 与模型组相比, 各剂量组大鼠血液 GSH 水平均显著升高(P<0.01), 中剂量组大鼠肝脏 GSH 水平均显著升高(P<0.01), 差异有统计学意义。

SOD 是细胞内抗氧化防御系统的关键限速酶, 负责将超氧阴离子自由基转化为过氧化氢, 从而阻断ROS级联反应的初始步骤; CAT 可高效催化过氧化氢分解为水和氧, 防止其积累并进一步生成羟自由基; GSH 通过直接清除自由基及作为GSH过氧化物酶的底物参与过氧化物还原反应, 在抵御氧化应激损伤中发挥核心作用。上述结果表明, *D*-gal 造模显著降低机体抗氧化防御体系, 而 AKG干预可不同程度恢复抗氧化酶活性及还原型 GSH 水平, 从而增强机体清除 ROS 的能力并缓解氧化应激损伤。

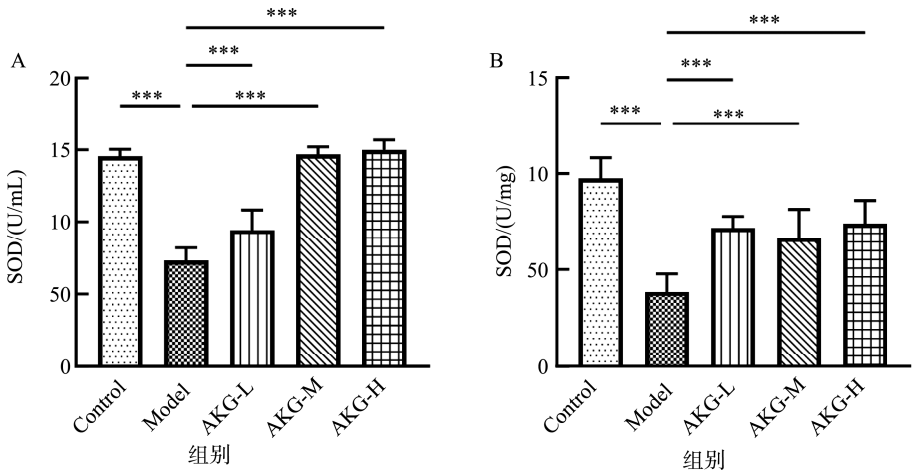


图 4　AKG 给药对大鼠 SOD 的影响

Fig.4　Effects of AKG administration on SOD in rat

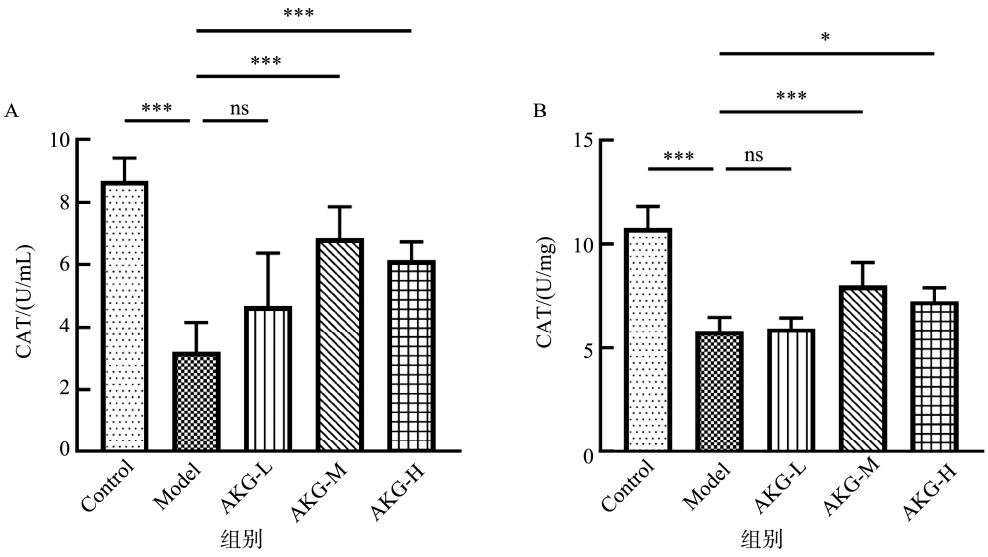


图 5　AKG 给药对大鼠 CAT 的影响

Fig.5　Effects of AKG administration on CAT in rat

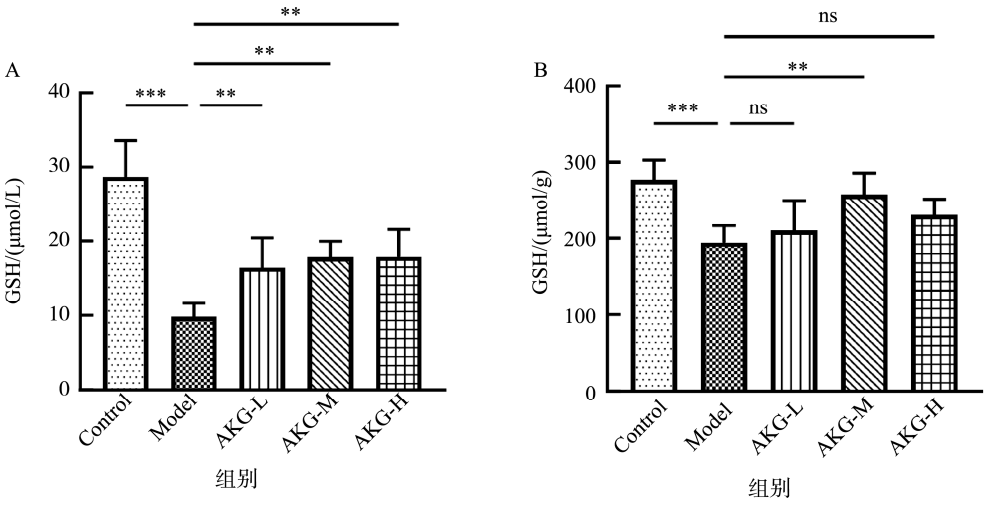
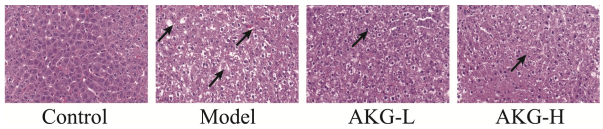


图 6　AKG 给药对大鼠 GSH 的影响

Fig.6　Effects of AKG administration on GSH in rat

2.5 AKG 对大鼠组织病理学的影响

如图 7 所示，大鼠肝脏的苏木精-伊红染色法结果表明，空白组大鼠肝脏组织结构完整，肝细胞居中，排列紧密，核大而圆，未见明显病理学改变。相比之下，模型组大鼠肝脏出现水肿变性和部分充血,脂肪空泡，细胞核固缩等病理现象；而经 AKG 给药后，这些损伤情况显著减轻，脂肪空泡和坏死现象明显减少，表明 AKG 对 *D*-gal 诱导的大鼠氧化损伤具有保护作用。

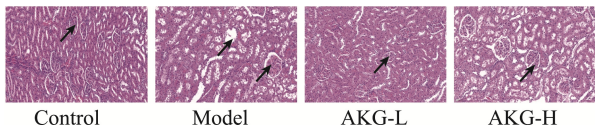


注：箭头依次表示脂肪空泡、水肿变性与充血。

图 7 AKG 给药对大鼠肝脏组织病理学的影响

Fig.7 Effects of AKG administration on histopathological features of rat liver tissue

如图 8 所示，大鼠肾脏的苏木精-伊红染色法结果表明，空白组大鼠肾小球结构保持完整且清晰可辨，肾小管排列规整，管腔未出现显著扩张，也未观察到明显的炎性细胞浸润。相比之下，模型组大鼠的肾小球数量明显减少，肾小管排列紊乱，部分上皮细胞出现脱落现象。而经 AKG 给药后，这些损伤情况得到了显著改善，表明 AKG 对 *D*-gal 诱导的大鼠氧化损伤具有保护作用。



注：箭头表示肾小球处病变。

图 8 AKG 给药对大鼠肾脏组织病理学的影响

Fig.8 Effects of AKG administration on histopathological features of rat kidney tissue

2.6 AKG 对大鼠肠道菌群和短链脂肪酸的影响

2.6.1 肠道菌群 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析是一种生态学方法，可用于从多个维度评估样本内部物种的多样性程度，如图 9 所示，与空白组相比，模型组在多样性指数上均表现出显著降低(P<0.01)。具体而言，模型组的 Observed species、Simpson、PD whole tree、Chao1 与 Shannon 指数降低，表明肠道微生物群落中物种数量的减少；与模型组相比，给予 AKG 处理的实验组在上述多样性指数上均表现出显著升高(P<0.01)，表明 AKG 处理能够显著增加模型大鼠肠道菌群的多样性与丰富性，这种变化可能与 AKG 对肠道微生物群落结构的调节作用有关，进而可能对动物的健康状态产生积极影响。

主成分分析是一种常用的多变量统计技术，它通过将高维数据映射到低维空间来揭示数据集中的模式。在本研究中，主成分分析被应用于评估 3 组大鼠肠道菌群结构的

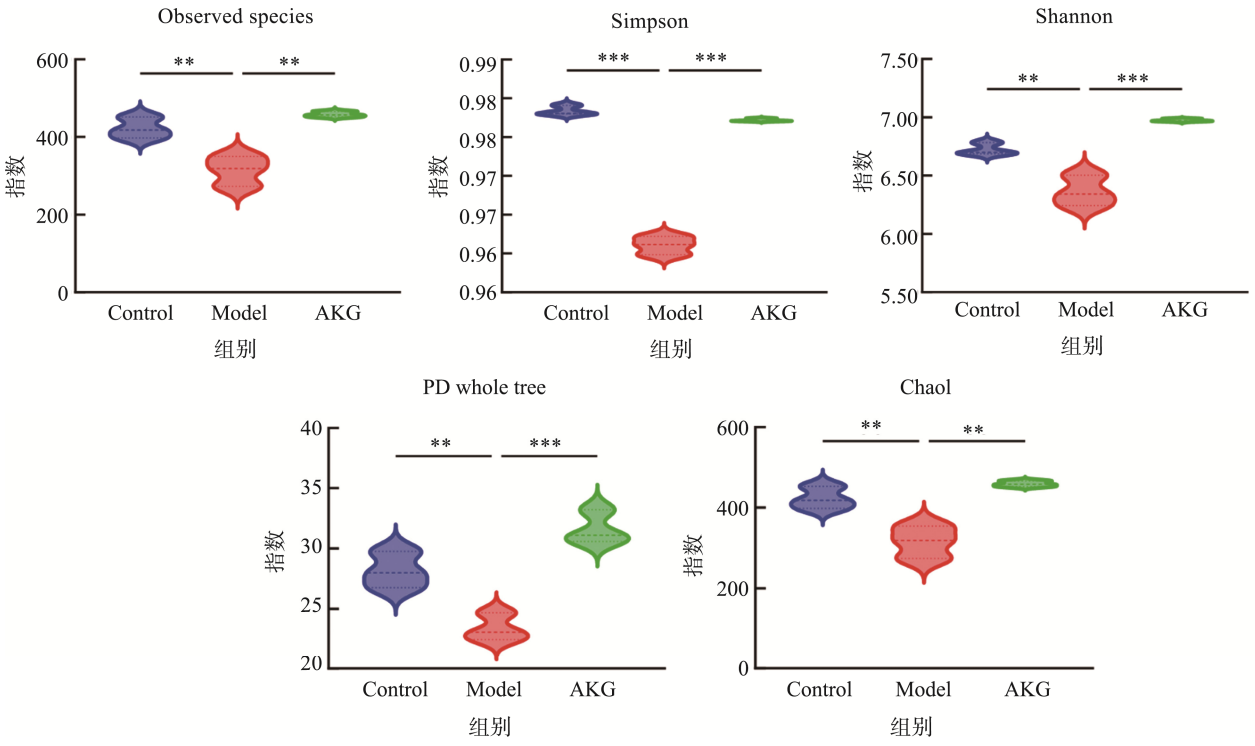


图 9 大鼠肠道菌群 Alpha 多样性分析

Fig.9 Alpha diversity analysis of the gut microbiota in rats

差异。如图 10 所示，3 组大鼠的肠道菌群结构在统计学上呈现出显著的分离，这表明不同处理组之间存在明显的菌群组成差异。此外，AKG 处理组显示出菌群结构向对照组趋近的趋势，表明 AKG 处理可能对模型组肠道菌群结构产生了调节作用，使其部分恢复到更接近正常状态的菌群组成。

2.6.2　肠道菌群与短链脂肪酸差异分析

如图 11 所示，与空白组相比，模型组 3 种肠道菌属毛螺菌 NK4A136 类群(*Lachnospiraceae* NK4A136 group)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、梭菌纲 vadinBB60 类群(Clostridia vadinBB60 group)的相对丰度降低，差异有统计学意义(P<0.01)；经 AKG 给药后，3 种肠道菌属的相对丰度具显著升高，差异有统计学意义(P<0.05)。上述结果表明，AKG 通过增加 3 种肠道菌的相对丰度，显示出其在调节肠道菌群平衡方面的潜力，这种调节作用可能有助于改善大鼠的氧化应激状态，从而对维持整体健康产生积极影响。

短链脂肪酸是肠道微生物发酵膳食纤维的主要产物，对宿主的肠道健康和代谢功能具有重要作用，因此对大鼠粪便中各短链脂肪酸含量进行测定。结果如图 12 所示，相较于空白组，模型组中丁酸、异丁酸和戊酸的含量均显著下降(P<0.01)；经 AKG 给药后，与模型组相比，各短链脂肪酸水平均得到不同程度恢复(P<0.05)，其中丁酸和异丁酸含量改善最为显著(P<0.01)。结合药效研究与肠道菌群的实验结果，这一结果表明，AKG 可能通过肠道菌群-短链脂肪酸途径促进肠道菌属的生长和活性，从而增加了短链脂肪酸的产生，进而有助于改善肠道环境，增强肠道屏障功能，改善模型大鼠的氧化应激状态。

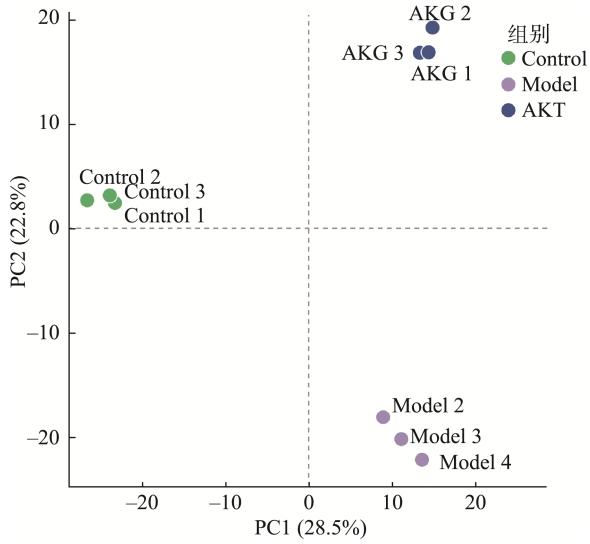


图 10　主成分分析

Fig.10　Principal component analysis

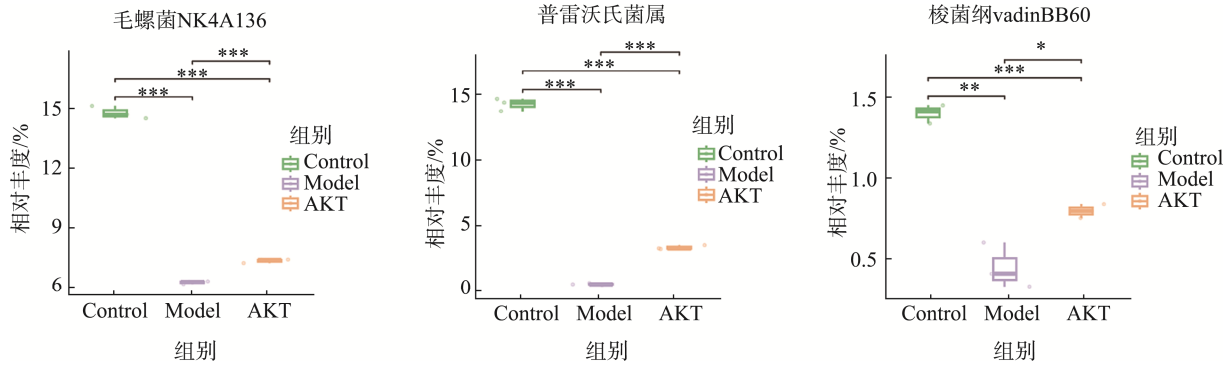


图 11　肠道菌群相对丰度变化

Fig.11　Changes in the relative abundance of gut microbiota

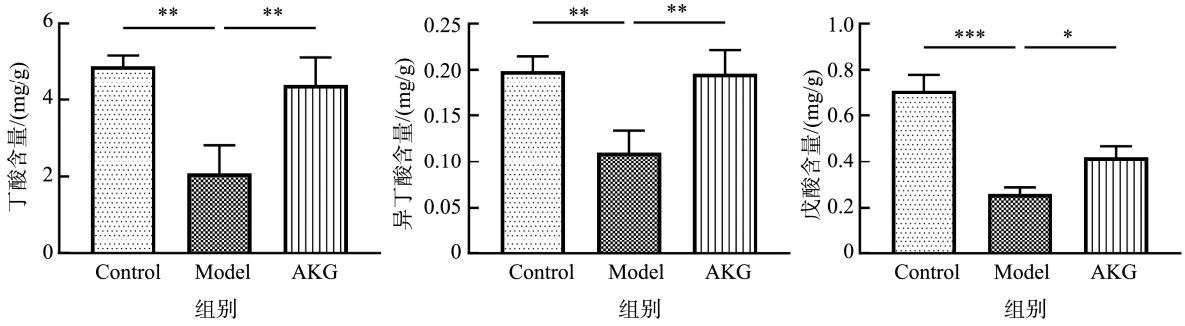


图 12　短链脂肪酸含量测定

Fig.12　Determination of short-chain fatty acid content

3 讨论与结论

D-gal 诱导的氧化应激损伤模型是目前衰老相关研究中应用最广泛、最成熟的动物模型之一，其机制与自由基学说高度契合。自由基理论认为机体在有氧代谢过程中不可避免地产生 ROS 等自由基，当自由基过量生成而清除不足时，会导致细胞功能障碍和组织退行性改变。大量研究表明，ROS 过量积累不仅是细胞氧化损伤的诱因，也是机体衰老发生和发展的关键。在此基础上，*D*-gal 通过促进 ROS 异常生成、抑制抗氧化系统活性以及高级糖基化终产物的形成，加剧体内的氧化应激水平，这种作用能够在较短时间内诱导出与自然衰老过程中类似的分子及组织学改变[17–18]。因此，*D*-gal 诱导模型不仅能够重现自由基积累和抗氧化能力下降的典型特征，也能在分子水平上高度模拟机体的衰老过程，因而被认为是一种稳定且重复性良好的实验模型。此外，在本研究中，组织病理学作为终点评估方法，主要用于验证生化指标的改善是否反映在组织结构层面。因此，本研究仅选择低剂量和高剂量组以直观展示剂量区间两端的组织学变化。肠道菌群测序和短链脂肪酸分析属于高维度的系统生物学实验，鉴于研究阶段的探索性特点，主要目标是初步探索药物机制。因此，本研究重点关注高剂量下的生物学效应，未来研究将扩大样本量并引入多剂量梯度，进一步优化和验证剂量与组织学变化及肠道菌群响应之间的关系。

AKG 作为三羧酸循环的重要中间产物，在能量代谢、氨基酸代谢以及氧化还原平衡中发挥核心作用。因此，本研究首先测定了 AKG 对模型动物氧化应激水平的影响。SOD、CAT 及 MDA 是机体抗氧化防御体系中的关键组成部分，共同参与维持细胞抵御氧化应激的能力[19–20]。其中，SOD 和 CAT 作为主要的抗氧化酶，在维持 ROS 清除与抗氧化物质平衡方面发挥核心作用；而 MDA 则是不饱和脂肪酸在受到 ROS 影响后形成的典型终产物，常被视为评价氧化损伤水平的重要指标[21]。研究结果显示，给予 AKG 干预后，与模型组相比，各给药组均能在不同程度上显著降低血液和肝脏中 MDA 及蛋白质羰基水平(P<0.01)，同时部分提升 SOD、CAT 活性和 GSH 含量。组织病理学的研究结果显示，与空白组相比，模型组大鼠的肝脏出现水肿变性、脂肪空泡以及核固缩等现象；肾脏中主要出现肾小球数量明显减少和肾小管排列紊乱等。经 AKG 干预后，上述的部分病理变化均有了较为显著的改善，这些结果均表明，AKG 具有显著的抗氧化作用，并展现出潜在的抗衰老研究价值。此外，在脏器指数研究方面，AKG 给药对 *D*-gal 引起肾脏指数与肝脏指数异常有一定恢复作用。其中，肝脏作为机体的主要代谢器官，随年龄增长，肝脏会发生特定的功能改变，如血流量减少和代谢功能减弱等，这些变化均会增加炎症细胞浸润和氧化脂滴的积累[22–24]。因此，推测 AKG 在发挥抗氧化作用的同时，亦可能对肝脏脂质代谢具有调节潜能，未来研究可进一步从脂质组学水平探索 AKG 对肝脏脂质稳态的影响[25]。

肠道菌群的研究结果显示，AKG 能够显著恢复 *D*-gal 诱导模型大鼠的肠道菌群组成及短链脂肪酸水平。具体而言，模型组中毛螺菌 NK4A136 类群、普雷沃氏菌属、梭菌纲 vadinBB60 类群的相对丰度显著下降(P<0.01)，而给药后上述菌群丰度显著上升(P<0.05)，这些菌属普遍被认为与短链脂肪酸的合成密切相关，尤其是丁酸和戊酸[26–28]。丁酸不仅是肠上皮细胞的重要能量来源，还能够通过提高氧化酶的活力发挥抗氧化应激作用；戊酸则可通过改善肠道屏障功能和调节免疫反应，并减少炎症和氧化应激标志物，进而对肠道屏障完整性具有保护作用[29–31]。本研究的结果进一步证实，模型组中短链脂肪酸水平显著下降，而 AKG 干预后显著恢复，提示其可能通过促进肠道菌群恢复和短链脂肪酸生成，从而发挥抗氧化应激作用。

综上所述，本研究探讨了 AKG 对 *D*-gal 诱导氧化应激损伤大鼠模型的保护作用，实验结果表明，AKG 能够显著降低氧化损伤水平，改善抗氧化防御功能，并可能通过调控肠道菌群、促进短链脂肪酸生成而发挥作用。本研究为阐明 AKG 的抗氧化及抗衰老作用提供了实验依据，也为其在衰老相关疾病防治中的潜在应用奠定了基础。

参考文献

[1] HARRAAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry [J]. Journal of Gerontology, 1956, 11(3): 298–300.

[2] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR SY, *et al*. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging [J]. Archives of Toxicology, 2023, 97(10): 2499–2574.

[3] VORONKOVA YS, VORONKOVA OS, GORBAN VA, *et al*. Oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants: A review [J]. Ecology and Noospherology, 2018, 29(1): 52–55.

[4] LUBOS E, LOSCALZO J, HANDY DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(7): 1957–1997.

[5] ZHANG J, CHEN K, ZHOU Y, *et al*. Evaluating the effects of mitochondrial autophagy flux on ginsenoside Rg2 for delaying *D*-galactose induced brain aging in mice [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154341.

[6] AMPONSAH-OFFEH M, DIABA-NUHOHO P, SPEIER S, *et al*. Oxidative stress, antioxidants and hypertension [J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 281.

[7] BHAT A, CHAUDHARY S, YADAV G, *et al*. Aspirin induces autophagy and alleviates liver fibrosis by reducing oxidative stress and inflammation in mice model of chronic liver injury [J]. Journal of Hepatology, 2020, 73: S527.

[8] SILVA DF, EMPADINHAS N, CARDOSO SM, *et al*. Neurodegenerative microbially-shaped diseases: Oxidative stress meets neuroinflammation [J]. Antioxidants, 2022, 11(11): 2141.

[9] AN D, ZENG Q, ZHANG P, *et al*. Alpha-ketoglutarate ameliorates pressure overload-induced chronic cardiac dysfunction in mice [J]. Redox Biology, 2021, 46: 102088.

[10] LIU L, ZHANG W, LIU T, *et al*. The physiological metabolite α-ketoglutarate ameliorates osteoarthritis by regulating mitophagy and oxidative stress [J]. Redox Biology, 2023, 62: 102663.

[11] SONG J, MA D, XING Y, *et al*. α-ketoglutarate promotes pancreatic progenitor-like cell proliferation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 943.

[12] MUKHOPADHYA I, LOUIS P. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and their role in human health and disease [J]. Nature Reviews Microbiology, 2025, 23: 635–651.

[13] SUI Y, JIANG R, NIIMI M, *et al*. Gut bacteria exacerbates TNBS-induced colitis and kidney injury through oxidative stress [J]. Redox Biology, 2024, 72: 103140.

[14] WANG X, PAN L, NIU D, *et al*. Jingfang Granules alleviates the lipid peroxidation induced ferroptosis in rheumatoid arthritis rats by regulating gut microbiota and metabolism of short chain fatty acids [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 339: 119160.

[15] 林达淮, 叶向丽, 严国鸿, 等. 鼠曲草醇提物对慢性阻塞性肺病大鼠氧化应激和肠道菌群的影响[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(15): 4110–4119.
LIN DH, YE XL, YAN GH, *et al*. Effects of alcoholic extract of *Gnaphalium affine* on oxidative stress and intestinal flora in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2025, 50(15): 4110–4119.

[16] CALLAHAN BJ, MCMURDIE PJ, ROSEN MJ, *et al*. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. Nature methods, 2016, 13(7): 581–583.

[17] 尤佳伟, 韩如意, 陈希民, 等. 蒲公英红枣汁对 D-半乳糖致衰老模型雌性大鼠抗氧化抗炎作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(8): 290–297.
YOU JW, HAN RY, CHEN XM, *et al*. Study on the effects of dandelion jujube juice on antioxidant and anti-inflammation in aging model female rat induced by *D*-galactose [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(8): 290–297.

[18] 李思晓, 苑广信, 马月, 等. 归脾丸对 D-半乳糖致衰老小鼠的免疫调节作用研究[J]. 中国药房, 2023, 34 (12): 1426–1430.
LI SX, YUAN GX, MA Y, *et al*. Study on immunomodulatory effect of Guipi pills on *D*-galactose-induced aging mice [J]. China Pharmacy, 2023, 34(12): 1426–1430.

[19] MARTINS MCDCE, OLIVEIRA ASDSS, DA-SILVA LAA, *et al*. Biological indicators of oxidative stress [malondialdehyde, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase] and their application in nutrition [M]. Cham: Springer International Publishing, 2022.

[20] 梁海梅, 张玲秋, 万宛若, 等. 木鳖子醇提物调控Nrf2/Keap1信号通路缓解过氧化氢诱导的神经细胞氧化损伤[J]. 中草药, 2025, 56(16): 5826–5836.
LIANG HM, ZHANG LQ, WAN WR, *et al*. Ethanol extract of *Momordica cochinchinensis* alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells by regulating Nrf2/Keap1 signaling pathway [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2025, 56(16): 5826–5836.

[21] 薄文卿, 格桑德吉, 张翌晨, 等. 基于 Keap1-Nrf2/ARE 通路探讨黑醋栗对 D-半乳糖诱导氧化损伤小鼠的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2026, 47(8): 250–258.
BO WQ, GESANG JD, ZHANG YC, *et al*. Blackcurrant attenuates *D*-galactose-induced oxidative damage in mice through regulating the Keap1-Nrf2/ARE pathway [J]. Food Science, 2026, 47(8): 250–258.

[22] HUNT NJ, KANG SWS, LOCKWOOD GP, *et al*. Hallmarks of aging in the liver [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019, 17: 1151–1161.

[23] 葛阳, 岳晓蕾, 王恩行, 等. 从与肠道菌群关联性探讨非酒精性脂肪肝病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(12): 103–107.
GE Y, YUE XL, WANG ENX, *et al*. Research progress of non-alcoholic fatty liver disease in relation to intestinal flora [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2024, 26(12): 103–107.

[24] YANG S, LIU C, JIANG M, *et al*. A single-nucleus transcriptomic atlas of primate liver aging uncovers the pro-senescence role of SREBP2 in hepatocytes [J]. Protein & Cell, 2024, 15(2): 98–120.

[25] 刘壮, 马泽炜, 彭文桐, 等. 饮水中添加α-酮戊二酸对黄羽肉鸡生长性能和肝脏脂质代谢的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(8): 80–86, 148.
LIU Z, MA ZW, PENG WT, *et al*. Effects of α-ketoglutaric acid added in drinking water on growth performance and lipid metabolism of yellow-feathered broilers [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(8): 80–86, 148.

[26] 李蕊, 沙立云, 衡友官, 等. 运动调控肠道菌群及代谢物改善代谢相关脂肪性肝病的研究进展[J/OL]. 生命科学, 1–14. [2025-12-29]. https://link.cnki.net/urlid/31.1600.q.20250918.1937.002
LI R, SHA LY, HENG YY, *et al*. Research Progress on exercise regulation of gut microbiota and metabolites in improving metabolic-associated fatty liver disease [J/OL]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 1–14. [2025-12-29]. https://link.cnki.net/urlid/31.1600.q.20250918.1937.002

[27] ZHAI S, GAO Y, JIANG Y, *et al*. *Weizmannia coagulans* BC99 affects valeric acid production via regulating gut microbiota to ameliorate inflammation and oxidative stress responses in *Helicobacter pylori* mice [J]. Journal of Food Science, 2024, 89(12): 9985–10002.

[28] 任民红. 广西河池特征膳食纤维和长寿老人源益生菌抗衰老作用及其成效机制研究[D]. 南宁: 广西大学, 2022.
REN MH. Studies on anti-aging effect and mechanism of dietary fibers and probiotics from the longevity elderly in hechi, guangxi [D]. Nanning: Guangxi University, 2022.

[29] LI S, HENG X, GUO L, *et al*. SCFAs improve disease resistance via modulate gut microbiota, enhance immune response and increase antioxidative capacity in the host [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 120: 560–568.

[30] 于智瑶. 短链脂肪酸丁酸盐通过肠-脑轴对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制探究[D]. 武汉: 武汉大学, 2022.
YU ZY. The protective effect and mechanisms of short-chain fatty acid butyrate on myocardial ischemia-reperfusion injury through the gut-brain axis [D]. Wuhan: Wuhan University, 2022.

[31] 方静. 膳食纤维产戊酸及其肠道益生作用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2024.
FANG J. Studies on the production of valeric acid from dietary fiber and its intestinal probiotic effects [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2024.

(责任编辑: 安香玉　韩晓红)