

· 综述 ·

D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展

赵凡凡^{1,2}, 周玉枝^{1*}, 高丽¹, 秦雪梅¹, 杜冠华^{1,3*}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: *D*-半乳糖 (*D*-galactose, *D*-gal) 致大鼠衰老模型目前已被广泛应用于抗衰老药物的药效学研究, 具有寿命缩短、学习记忆障碍和免疫力降低等多种衰老特征。该模型是通过给大鼠定时、定量注射一定时间的 *D*-半乳糖溶液, 使大鼠产生类自然衰老特征, 用于临床前抗衰老药物筛选、药理作用以及衰老机制的研究。但是该模型在模型的建立方面没有统一标准, 不同的实验室在造模剂量、时间等方面有较大差异。因此本文主要通过总结文献报道并结合本实验室的不断探索, 概述给予大鼠注射 *D*-半乳糖溶液所致的类自然衰老模型的作用机制、方法的建立、模型成功与否的评价指标及其研究进展, 并进行综合分析, 为今后衰老机制的研究、抗衰老药物的开发等提供理论依据和实验参考。

关键词: *D*-半乳糖; 衰老模型; 大鼠; 造模方法; 模型评价; 代谢组学

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0347-08

Advances in the study of the rat model of aging induced by *D*-galactose

ZHAO Fan-fan^{1,2}, ZHOU Yu-zhi^{1*}, GAO Li¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua^{1,3*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: *D*-galactose (*D*-gal)-induced aging model is widely used in the study of the pharmacodynamics of antiaging drugs. The model has a shorter life-span, disorders in learning and memory, reduced immune function and other aging characteristics. Regular and quantitative injection of *D*-gal solution to rats can produce symptoms of natural aging models that are used in screening of antiaging drugs, and their pharmacological activities. This paper provides a summary of the mechanism of rat model induced with *D*-gal solution. The methods of building and evaluation of the aging models are provided. The theoretical basis is included to facilitate the subsequent research and experiment in the mechanism study of aging and antiaging medicines.

Key words: *D*-galactose; aging model; rat; model establishment method; model evaluation; metabonomics

世界人口老龄化日益加重, 如何安全有效地延缓衰老已经成为人们日益关注的焦点, 因而衰老模

型建立、衰老机制探索以及抗衰老药物研究已成为当前一大研究热点。在衰老研究中人们遴选出了各种动物衰老模型, 如 *D*-半乳糖致亚急性衰老模型^[1]、 β -淀粉样蛋白(β -AP) 致衰老模型^[2,3]、去胸腺致衰老模型^[4]、快速老化模型^[5]、自然衰老模型^[6]、鱼类衰老动物模型^[7]、果蝇属衰老动物模型^[8]等, 都已广泛应用于抗衰老实验研究中。但是由于不同的模型都有其自身的局限性, 因此各模型都有不同程度的应用。

收稿日期: 2016-08-10; 修回日期: 2016-09-30.

基金项目: 山西省科技基础条件平台建设项目 (2014091022); 山西省科技攻关项目 (20140313008-14); 山西省应用基础研究项目 (201601D021164); 山西省高校科技创新项目 (2016120).

*通讯作者 Tel: 86-351-7019178, E-mail: zhoyuzhi@sxu.edu.cn;

Tel: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0696

根据文献检索结果显示, *D*-半乳糖致大鼠衰老模型的使用频率在逐渐增加。并且在实验过程中发现雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠相对于雌性大鼠更为敏感, 且 SD 大鼠神经系统与人类相似, 因此一般首选雄性 SD 大鼠作为动物来源; 也可选用昆明小鼠, 但是由于该模型的稳定性存在一定问题, 并不被国外学者所承认, 并且由于其体积小, 尿液、血清、组织等样本量少且难以收集, 因此其使用已经逐渐减少^[9]。

大量研究表明长期大量注射 *D*-半乳糖溶液能够产生过多的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 使各器官抗氧化酶的活性降低, 形成更多超氧阴离子及各种氧化产物等, 引起细胞的损害, 以致机体多器官、多系统的功能减退^[10,11]。此外, 此模型也与晚期糖基化终末产物的产生有关, 可增强氧化应激损伤和异常磷酸化并影响学习和记忆功能^[1,12]。*D*-半乳糖还可以造成类似自然衰老实验鼠齿状回区的神经元细胞损伤^[13], 且多项实验证实, *D*-半乳糖可使许多组织出现类似衰老的退行性改变, 如与自然衰老相似的生化改变、免疫功能低下、基因表达与调控异常、细胞生长繁殖能力下降及细胞退行性改变^[10,11,14], 退行性神经功能紊乱与人类衰老密切相关; 并且由于 *D*-半乳糖致大鼠衰老模型操作非常简单, 所需费用少, 实验结果明显且稳定, 经过不断地被研究、发展与完善, 因此得到了广泛的应用。然而, 由于不同的实验室在给药剂量、给药时间、给药方式以及衰老的衡量指标等方面的不统一, 导致造模剂量、造模时间、给药途径等方面都有较大差异, 且在不同的文献报道中的各种评价指标也不尽相同。因此本文就该模型的建立方法和机制进行综述, 以期对研究者评价和使用该模型提供参考。

1 *D*-半乳糖致大鼠衰老模型及其建立方法

1.1 *D*-半乳糖致大鼠亚急性衰老模型的建立方法

近来, 由于该模型广泛使用, 经过不同实验室的不断研究、探索与发展, 形成了较为成熟的造模条件: *D*-半乳糖溶液慢性用药的剂量为 50~500 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 持续时间为 4~10 周, 会引发氧化应激、神经炎症和神经退化以及线粒体损伤等导致神经元死亡, 进而导致认知和记忆功能紊乱^[15,16]。当然, 不同的实验室在模型的建立上还是有差异的。例如巴西圣卡塔琳娜州联邦大学的神经科学实验室采用给予 *D*-半乳糖 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 溶液, 分别持续 1、2、4、6 和 8 周, 研究在相对于皮下注射和腹腔注射损伤最小的情况下的最佳造模持续时间, 最终得出结论是在造模持续 4 周时, 可造成习惯性记忆损伤; 在持续 6

周时, 造成新颖性引起的自发性活动减弱, 但是对于新颖性的探索活性没有影响^[17]。天津市现代药品配送重点实验室的造模条件是皮下注射 *D*-半乳糖 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 连续 8 周, 通过水迷宫等行为学指标测定, 显示 8 周即可造成记忆损伤, 产生记忆障碍, 成功建立衰老模型^[18]。伊斯坦布尔大学医学院生物化学教研室的造模条件是皮下注射 *D*-半乳糖 (300 mg·kg⁻¹), 每周注射 5 天, 持续两个月时间, 就可造成脑、肝等机体组织加速衰老。脑组织中的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量均显著降低, 而丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、PC 水平 (蛋白质羰基化) 和乙酰胆碱酯酶活性均显著升高, 表明建立衰老模型^[19]。Jin 等^[11]则是持续皮下注射 *D*-半乳糖 (120 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 42 天后, 通过水迷宫实验、跳台实验和避暗实验来评价老鼠的认知功能, 最终结果显示可建立衰老模型。Ullah 等^[20]采用的造模条件是腹腔注射 *D*-半乳糖溶液 (120 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 持续 60 天, 即可造模成功; Ali 等^[21]的建模条件是持续腹腔注射 *D*-半乳糖 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 60 天后, 进行水迷宫实验和 Y 型迷宫实验, 结果显示模型组已造成认知障碍。Ling 等^[22]通过腹腔持续注射 *D*-半乳糖 (100 mg·kg⁻¹) 溶液 6 周, 行为学测试结果并没有显示出空间记忆障碍, 生化指标也没有显示出较高浓度的自由基; 当持续腹腔注射 *D*-半乳糖 (100 mg·kg⁻¹) 10 周时, 出现空间记忆障碍且自由基浓度显著增高。巴基斯坦的卡拉奇大学生物化学系化学与生化药理学实验室采用腹腔注射 *D*-半乳糖 (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 一周, 通过综合行为学指标、生物化学指标和神经化学指标评价即可建立类似于自然衰老的大鼠衰老模型^[1]。

1.2 模型建立的剂量与持续时间选择

该模型已被广泛使用, 但是在模型的建立方法与模型评价方面没有统一的标准, 因而不同的实验室所选用的造模剂量和造模时间有较大差异。当然影响剂量选择的因素有很多, 例如实验鼠的种类、体重、给药方式、给药时间、实验条件以及药物的不良反应等都会对造模剂量的选择产生较大的影响, 因此缺乏统一的标准。

本文通过统计文献, 在 Web of Science 主题检索 “*D*-gal, rats, aging”, 共检索到 169 篇文献, 从检索结果中选择前 60 篇文章中明确有造模时间、剂量和给药方式的文献, 统计其造模剂量、给药方式和造模持续时间, 作图 1~3。造模时间和造模剂量的具体统

计结果如图 1 和图 2 所示。

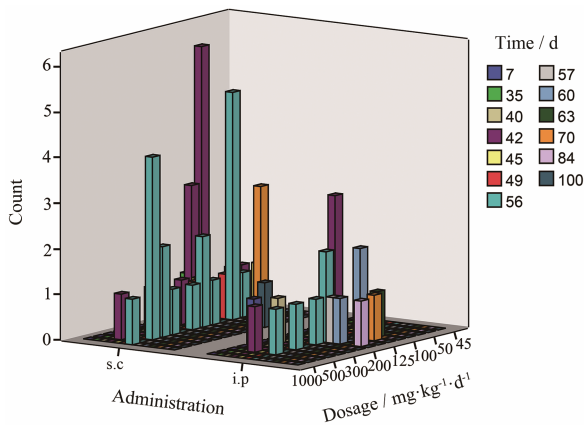


Figure 1 Different modeling in administration and dosage, commonly used time of model establishment in the literature

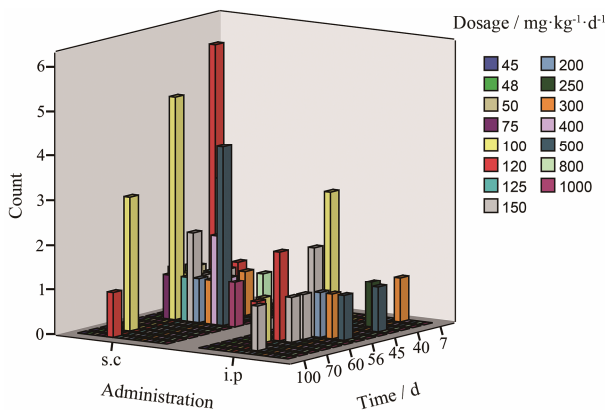


Figure 2 Different modeling in administration and time, commonly used dosage of model establishment in the literature

1.3 造模时给药方式的选择

D-半乳糖溶液的常用给药方式主要有颈背部皮下注射给药和腹腔注射给药。皮下注射 *D*-半乳糖则是将 *D*-半乳糖推入皮下结缔组织, *D*-半乳糖经皮下结缔组织间的毛细血管、淋巴管吸收进入血液循环, 因而对皮肤组织和羟脯氨酸含量的影响更大。适用于需迅速达到药效、不能或不宜经口服给药时采用。腹腔注射 *D*-半乳糖是将 *D*-半乳糖注入胃肠道浆膜以外, 腹膜以内。腹腔有较强的吸收力, 腹膜表面积大, 密布血管和淋巴管, 吸收能力特强, 每小时可吸收占动物体重 3%~8.5% 的液体, 仅次于静脉注射, 尤其当心脏衰弱, 静脉注射困难时, 通过腹腔注射甚好, 安全适用, 省时省力, 只要不违反操作规程, 一般对实验用大鼠不会造成危害^[23]。两种不同的注射方法导致大鼠机体对 *D*-半乳糖的药代动力学差异, 而药代动力学上的差异是导致两种衰老大鼠模型之间差异的主要原因。因此不同的给药方式会对造模时间产生

显著性影响。按照上述检索方式, 统计不同的给药方式下对造模时间和剂量的影响, 具体文献统计结果如图 3 所示。

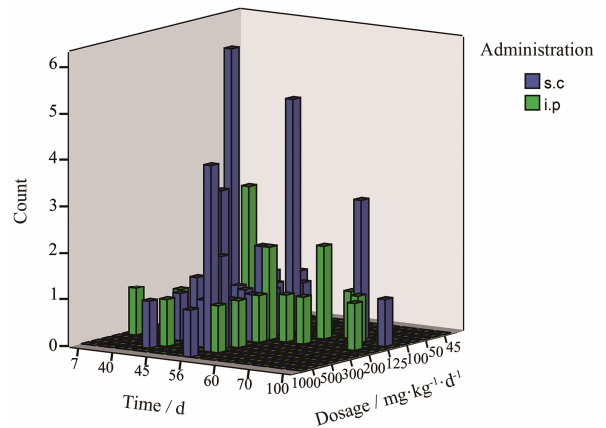


Figure 3 Different modeling in time and dosage, commonly used administration of model establishment in the literature

2 模型的评价

通过注射一定时间的 *D*-半乳糖溶液建立大鼠类自然衰老模型, 模型的评价初步通过观察实验鼠在实验过程中毛的色泽和光滑程度、精神状态、皮肤弹性、活跃度、进食量、形体消瘦程度、行动的灵活度等直观的外在表现并结合行为学来判定, 将实验鼠处死后, 收集血样和组织样本, 进行生化指标测试。如果各种指标都显示模型已经建立成功, 则确保了后续实验样本的可靠性, 可以进行下一步实验^[24]。

2.1 行为学评价

目前常用的行为学指标主要分为 3 大类: 自主活动度检测、运动协调性检测和学习记忆能力检测, 在文献中以学习记忆能力检测主要作为评价模型成功与否的一个重要指标, 运动协调性检测和自主活动度检测则作为辅助性的判断。

2.1.1 自主活动度检测 旷场实验是用于观察大鼠在新环境中的自发性探索运动活性和焦虑行为, 主要反映动物的主动行为、探索行为以及抑郁或警觉等情绪。旷场实验可以在同一时段、相同环境条件下比较不同组动物的活动状态, 客观定量地反映活动量及自主活动能力^[25]。

避暗实验 (passive avoidance test, PAT) 利用大鼠具有趋暗避明的习性和对刺激的厌恶所设计的一种实验方法, 通过观察在明箱和暗箱之间的穿梭次数、潜伏期、明箱活动时间、明箱活动时间百分比、暗箱活动时间、暗箱活动时间百分比、总路程、明箱活动路程和暗箱活动路程等指标来评价大鼠的学习

记忆能力^[12]。

2.1.2 运动协调性检测 转棒试验可以用来观察实验鼠的共济协调性、抗疲劳特性和耐力,衰老的实验鼠通常会表现出各种能力下降。当衰老模型建立以后,将实验鼠放在转棒上,适应一定时间后,让主轴转动,使其按旋转方向相反的方向运动,记录实验鼠在主轴上的停留时间。转棒实验主要是用来衡量药物的抗疲劳特性和实验鼠的运动协调性^[26]。

2.1.3 学习与记忆能力检测 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM) 实验是一种强迫实验动物在固定的水箱内游泳,学习寻找隐藏在水中的平台,记录其初次找到水面下平台的时间、目标象限停留时间、目标象限运动路程以及运动轨迹,来分析和推断动物的学习记忆能力。实验目的是用于测试实验动物对空间位置感和方向感的学习记忆能力^[27]。

新物体识别实验 (object recognition test, ORT) 是一种评价实验动物的非空间和空间学习记忆能力与衰老的关系。该实验的优点是让实验大鼠在自由的状态下自由地进行学习记忆能力测试,可以减少许多外界因素的影响,更好地模拟灵长类动物的学习记忆行为^[28]。

Y-型迷宫 (Y-maze test, YMT) 是利用大鼠趋暗避明的特性,在阴暗区给予电击刺激,使其逃离阴暗区从而能够避开伤害,趋向安全区域即光亮区。使大鼠产生应激反应,进而影响其学习记忆活动。根据其学习记忆能力的变化来评价建模是否成功或药物的疗效^[29]。

本文通过 Web of Science 主题搜索,将各行为学方法分别进行检索,对各行为学的使用次数进行统计,统计结果显示 Morris 水迷宫实验使用频率最高,接下来依次顺序是旷场实验、避暗实验、新物体识别实验和 Y-型迷宫。Y-型迷宫由于电刺激时的刺激强度很难确定,对实验鼠产生的损伤较大,因此一般实验室很少采用。当然不同的行为学实验都有其不同的侧重点,在选择行为学实验时要根据实验本身的特点进行针对性选择,只有正确的行为学实验才能够反映实验的实际情况。

2.2 生化指标

大量的实验研究表明衰老与氧化应激有密切的关系,因此实验研究中生化指标测定一般主要集中在氧化应激相关酶的活性测定。一般主要有超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶 (hydrogen peroxidase) 又称触酶 (catalase, CAT)、丙二醛、GSH、氧化型谷胱甘肽 (glutathione (oxidized), GSSG) 和过

氧化脂质 (lipid peroxidation, LPO) 以及谷胱甘肽巯基转移酶。

超氧化物歧化酶,谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶在活性氧的代谢过程中发挥主要作用^[30–33]。体内丙二醛含量则可间接反映体内自由基对机体的损伤程度^[30,34]。谷胱甘肽也可以加速自由基代谢,但其自身则被氧化成氧化型谷胱甘肽^[33],因此测定谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽也可以反映机体的抗氧化状态。体内的过氧化脂质则是细胞膜结构中的不饱和脂肪酸在氧自由基的作用下形成的过氧化物。膜脂质过氧化使膜的结构发生变化,从而使细胞功能发生改变,引起多种相关疾病,例如神经元损伤导致认知损伤^[1]。谷胱甘肽巯基转移酶也具有抗氧化作用,但是其在体内发挥作用主要是通过催化某些内源性和外来的有毒物质与还原性谷胱甘肽结合,形成更容易溶解、没有毒性的衍生物,以使其排出体外或者被 III 相代谢酶分解。其解毒和抗氧化功能使得生物体免受损伤^[35]。

2.3 神经化学指标

衰老的一个主要特征就是学习记忆功能下降,因此脑内与学习记忆相关的一些神经递质和相关的酶也备受关注。例如磷脂酰胆碱 (phosphatidyl cholines, PC)、乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AChE)、乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA) 和去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA),许多学者经常使用这些指标作为衰老模型和抗衰老药物的药效评价指标之一。

磷脂酰胆碱在体内能释放出乙酰胆碱,而脑内细胞外乙酰胆碱含量的变化能反映胆碱能神经元的活性,且主流观点也认为脑内胆碱能递质系统活动和乙酰胆碱含量与认知过程有显著的相关性^[19,36,37]。乙酰胆碱酯酶则能够促进神经元发育和再生,也有研究认为乙酰胆碱酯酶能够促进淀粉样蛋白聚集的作用可能是神经系统退行性疾病发生的一个原因,在 D-半乳糖致衰老模型研究中也发现有 A β 蛋白沉积^[18,37]。而 A β 蛋白可以减少大脑皮层和海马内多巴胺的浓度,并且能够增加单胺氧化酶 B 的活性;多巴胺的酶解是在单胺氧化酶 B (MAO-B) 作用下分解的,且其酶解和自氧化都会产生活性氧,进而损伤患者的学习与记忆能力。因此,DA 也作为一种学习记忆能力的评价指标常被研究测定^[1,38]。去甲肾上腺素则是由交感节后神经元和脑内神经末梢合成,并由脑内神经末梢分泌的主要递质,在记忆保持方面也具有重要作用,因此有的学者在 D-半乳糖致衰老模型中也关

注其含量的变化^[39]。5-羟色胺参与学习记忆、情绪等的调节,能够增强学习记忆能力和保护神经免受“兴奋神经毒素”的损伤,而5-羟吲哚乙酸是5-羟色胺的无活性代谢产物,测定5-羟吲哚乙酸的含量能够间接反映5-羟色胺的含量^[1]。D-半乳糖致衰老模型会导致学习记忆与认知功能损伤,因此5-羟色胺作为一种评价学习记忆能力的生化指标常被测定。

本文通过 Web of Science 分别主题搜索“SOD, 大鼠, 衰老”(SOD, rats, aging), 将各生化指标和神经化学指标分别进行检索, 并进行统计, 具体结果如图4所示。检索的生化指标有 SOD、MDA、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)、CAT、LPO、GSH 和 GST 并结合关键词大鼠和衰老 (rats, aging) 分别进行检索。神经化学指标有乙酰胆碱酯酶, 乙酰胆碱 (acetylcholine), 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine), 5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid), 多巴胺 (dopamine), 去甲肾上腺素 (noradrenaline) 并结合关键词大鼠和衰老 (rats, aging) 分别进行检索, 具体统计结果如图4所示。

3 衰老研究中的相关信号通路

在衰老机制研究过程中, 人们发现多种细胞信号传导通路和生物活性物质都与衰老的分子机制密切相关。但是由于生物系统的复杂性, 衰老的生物学机制仍不能被完全阐明。

3.1 NF- κ B (nuclear factor kappa-B) 信号通路

NF- κ B 蛋白家族是一组重要的转录因子, 在细胞损伤、氧化应激和炎症方面起着极其重要的作用, 与机体多种生理过程都有密切相关的联系, 可以与多种启动子部位的 κ B 位点发生特异性结合从而发生转录和表达。当 NF- κ B 受到氧化应激、炎症因子等因素的刺激后活化表达, 又能够进一步产生炎症因子, 打破原有的微循环, 使机体长期处于过炎症状态导致细胞损伤, 甚至凋亡。有研究学者认为自由基和炎症是引起衰老的主要原因, 因此提出了炎症衰老学

说, 而 NF- κ B 信号通路则是主要的炎症信号通路^[40]。

3.2 胰岛素信号通路 (insulin/IGF-1 signaling pathway, IIS)

胰岛素发挥功能主要是通过调控代谢程度和生物合成过程中营养供给而调节有机体的生长。最新研究表明, 如果这个信号转导通路中某一部位出现突变则会对生物体的寿命产生影响。胰岛素信号传导的信号分子必须通过相应的受体才可以传递下去, 因此胰岛素受体或者胰岛素样因子受体突变也会对生物体的衰老过程产生影响。有实验研究表明如果阻断受体介导的胰岛素信号转导可以延缓衰老, 延长受试体的寿命。也有学者认为通过饮食限制而延长寿命是通过胰岛素信号传导通路实现的, 但是后续的研究表明其可能并不是简单地通过这个机制来实现的^[41, 42]。

3.3 腺苷酸活化蛋白激酶信号通路 (adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway, AMPK)

腺苷酸活化蛋白激酶是生物能量代谢调节的一个重要分子。当细胞腺苷三磷酸 (ATP) 合成受阻或应激提高了 ATP 的消耗, 导致细胞处于能量枯竭状态, 腺苷一磷酸/腺苷三磷酸 (AMP/ATP) 上调, AMPK 被激活。当 AMPK 被激活后, 继而能够调节上述底物酶, 从而改变脂类和糖类代谢, 使其能够抑制 ATP 的消耗、促进 ATP 的生成, 使 AMP/ATP 下调, 细胞能量得到迅速恢复。有研究发现热应激、缺氧、运动和禁食等多种应激都能够使 ATP 含量下降和 AMP 浓度上升, 进而激活 AMPK。研究表明 AMPK 主要是通过两种途径来调节能量代谢, 即主要是通过抑制 ATP 的消耗和促进 ATP 的产生, 因此 AMPK 也被称为“细胞能量调节器”^[43, 44]。

3.4 哺乳动物雷帕霉素信号通路 (mammalian target of rapamycin, mTOR)

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于磷

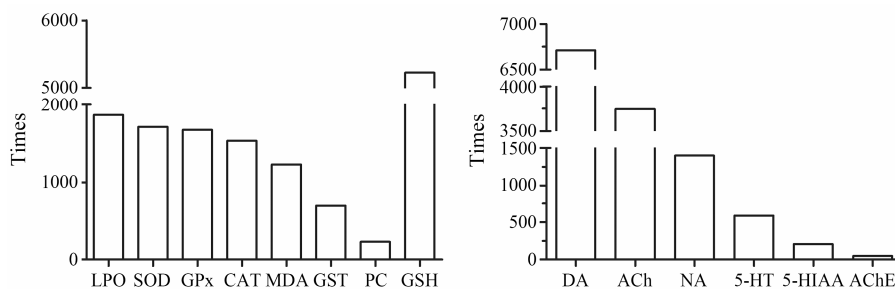


Figure 4 The application frequency of biochemical and neurochemical index in senescence study. LPO: Lipid peroxidation; SOD: Superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CAT: Catalase; MDA: Malondialdehyde; GST: Glutathione S-transferase; PC: Phosphatidyl choline; GSH: Glutathione; DA: dopamine; ACh: Acetylcholine; NA: Noradrenaline; 5-HT: 5-Hydroxytryptamine; 5-HIAA: 5-Hydroxyindole acetic acid; AChE: Acetyl cholinesterase

脂酰肌醇激酶相关激酶家族, 在细胞内具有两种复合体 mTORC1 和 mTORC2。mTOR 通过多种信号通路来调控细胞的各种生命活动, 在生物体的生命活动中起着极为重要的作用。mTORC1 主要是受能量、生长因子、应激和营养素的调节, 能够促进蛋白质合成、脂肪生成和能量代谢, 并能够抑制自噬和溶酶体的形成; mTORC2 对能量和营养的刺激并不敏感, 而在肌细胞骨架、细胞存活和代谢方面发挥主要作用。并且 mTOR 在维持线粒体在细胞能量稳态中发挥重要的作用, 而线粒体功能紊乱导致氧自由基增加是目前重要的衰老学说之一。总之, mTOR 信号通路与衰老有密切相关的联系, 但其具体作用机制仍需进一步研究^[42, 45]。

3.5 沉默信息调控因子 2 相关酶 1 (silent information regulator 2 homologue 1, sirtuins 1)

沉默信息调控因子 2 相关酶 1 是一种依赖 NAD^+ 的去乙酰化酶, 沉默信息调节因子 2 (silent information regulator 2, Sir2) 的同源物。Sirtuins 1 主要在细胞分化、代谢、细胞周期和细胞凋亡等过程中起着十分重要的作用。研究表明 sirtuins 1 可以调控 p53 信号通路和调节细胞应激反应, 并可以将 NF- κ B 的 p65 亚基中第 310 位的赖氨酸残基去乙酰化, 进而抑制 NF- κ B 途径, 以达到抑制小型胶质细胞依赖 A β 毒素。Sirtuins 1 的过表达可减少 A β 和 A β 斑块的生成, 当敲除 sirtuins 1 区域后 A β 含量会显著上升。Sirtuins 1 表达量的高低与活性的调节均与衰老有密切相关的联系。随着研究的深入, sirtuins 1 有可能是将来治疗衰老相关疾病的新热点^[42, 46]。

本文通过 Web of Science 分别主题搜索“NF- κ B, rats, aging”, 并将各信号通路分别进行检索, 进行统计, 具体结果如图 5 所示。检索的指标有 NF- κ B、insulin/IGF-1、AMPK、mTOR 和 sirtuins 1, 并结合关键词大鼠和衰老 (rats, aging) 分别进行检索, 具体统计结果如下所示。

4 结语

近年来, 随着代谢组学技术的飞速发展, 代谢组学在抗衰老研究中的应用也越来越广泛^[8, 24, 47]。代谢组学是研究机体受到外界刺激时所产生的代谢产物变化的一种新方法, 研究代谢物在体内过程中的动态变化, 并反映生物体系整体功能或状态的最终结果或表现。通过利用高通量、高灵敏度与高精度的现代分析技术, 动态跟踪有机体代谢物的整体组成, 借助多变量统计方法, 来辨识和解析被研究对象的生理、病理状态及其与环境因子、基因组成等的关系。

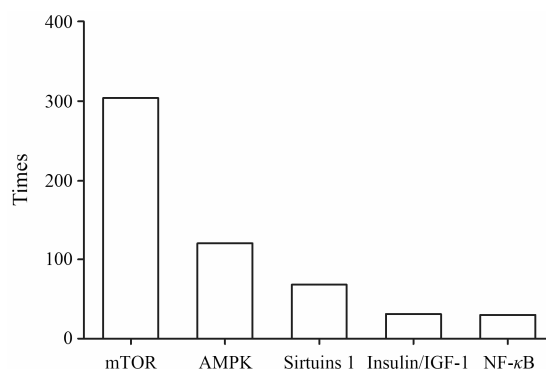


Figure 5 The application frequency of each signaling pathway in senescence study. mTOR: Mammalian target of rapamycin; AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway; Sirtuins 1: Silent information regulator 2 homologue 1; IGF-1: insulin-like growth factor-1; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B kinase

因此, 可通过代谢组学技术研究衰老的过程及衰老对机体整体代谢物的影响^[24], 并可与基因组学及蛋白质组学联合应用来研究衰老的机制和抗衰老药物的作用机制。*D*-半乳糖致急性衰老模型的实验鼠不仅在行为学和形态学上与人类自然衰老有很大的相似性, 而且在分子生物学水平上也有其一致性, 因此, 其应用日趋广泛。但是不同的实验室在实验用剂量、持续时间、给药方式、模型成功与否评价指标等方面都具有较大差异, 实验可重复性差。因此本文主要是将各实验室的造模条件加以总结, 以便后续研究者能够更快地了解, 从实际出发选择合乎实际的造模条件, 用于衰老模型的评价以及抗衰老药物和保健品的综合开发, 为今后衰老模型的建立和机制的研究、抗衰老药物的开发等提供理论依据和实验参考。

综上所述并结合本实验室不断探索, 对给药方式、给药剂量和建立 *D*-半乳糖致大鼠类自然衰老模型所需要的时间进行了总结。通常皮下注射 *D*-半乳糖 ($125 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 需要持续造模 6~10 周才能够建立稳定、可靠的衰老模型; 而腹腔注射 *D*-半乳糖 ($100 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 则需要持续造模 4~7 周较为可靠。行为学判断指标首先采用旷场对整个实验过程进行动态监测, 若模型成立, 然后采用水迷宫并结合新物体识别或避暗实验再次进行模型评价, 也可用代谢组学技术进行模型评价, 若显示模型成立, 则将实验鼠处死, 收集样本, 便可进行后续实验研究。

References

- [1] Haider S, Liaquat L, Shahzad S, et al. A high dose of short term exogenous *D*-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process [J].

- Life Sci, 2015, 124: 110–119.
- [2] Gang W, Ling C, Pan X, et al. The effect of resveratrol on beta amyloid-induced memory impairment involves inhibition of phosphodiesterase-4 related signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 17380–17392.
- [3] Liu L, Zhao YH, Zeng CQ, et al. Research progress in pharmacological effects of *Uncaria Hook* on Alzheimer disease models [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016: 536–542.
- [4] Novoseletskaia AV, Kiseleva NM, Zimina IV, et al. Thymus polypeptide preparation tactivin restores learning and memory in thymectomied rats [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2015, 159: 623–625.
- [5] Sasaki K, Han J, Shimozono H, et al. Caffeoylquinic acid-rich purple sweet potato extract, with or without anthocyanin, imparts neuroprotection and contributes to the improvement of spatial learning and memory of SAMP8 mouse [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 5037–5045.
- [6] Salazar C, Valdivia G, Ardiles AO, et al. Genetic variants associated with neurodegenerative Alzheimer disease in natural models [J]. *Biol Res*, 2016, 49: 14.
- [7] Bailey JM, Oliveri AN, Levin ED. Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 139: 103–111.
- [8] Yan ML, Zhou YZ, Li MH, et al. Metabonomic study of alcohol extract from *Scutellariae Radix* in prolonging lifespan of *Drosophila melanogaster* based on ¹HNMR [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2016, 47: 1714–1722.
- [9] Wu KF, Hu Y. Establishment and evaluation of *D*-galactose induced aging animal model [J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly (中华老年多器官疾病)*, 2012, 11: 74–78.
- [10] Qu Z, Zhang J, Yang H, et al. Protective effect of tetrahydropalmatine against *D*-galactose induced memory impairment in rat [J]. *Physiol Behav*, 2016, 154: 114–125.
- [11] Jin G, He H, Jiang W, et al. Salidroside ameliorates cognitive impairment in a *D*-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 293: 27–33.
- [12] Gong Y, Liu L, Xie B, et al. Ameliorative effects of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive deficits and oxidative damage in senescence-accelerated mice [J]. *Behav Brain Res*, 2008, 194: 100–107.
- [13] Lu J, Wu D M, Hu B, et al. NGF-Dependent activation of TrkA pathway: a mechanism for the neuroprotective effect of troxerutin in *D*-galactose-treated mice [J]. *Brain Pathol*, 2010, 20: 952–965.
- [14] Gong YS, Guo J, Hu K, et al. Ameliorative effect of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive impairment and brain aging induced by *D*-galactose [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 74: 21–28.
- [15] Xian YF, Lin ZX, Zhao M, et al. *Uncaria rhynchophylla* ameliorates cognitive deficits induced by *D*-galactose in mice [J]. *Planta Med*, 2011, 77: 1977–1983.
- [16] Shan Q, Lu J, Zheng YL, et al. Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by *D*-galactose [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 2009: 55–58.
- [17] Budni J, Pacheco R, da Silva S. Oral administration of *D*-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 302: 35–43.
- [18] Qu Z, Zhang J, Yang H, et al. Protective effect of tetrahydropalmatine against *D*-galactose induced memory impairment in rat [J]. *Physiol Behav*, 2016, 154: 114–125.
- [19] Aydın AF, Çoban J, Doğan-Ekici I, et al. Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in *D*-galactose aging model [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31: 337–345.
- [20] Ullah F, Ali T, Ullah N, et al. Caffeine prevents *D*-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain [J]. *Neurochem Int*, 2015, 90: 114–124.
- [21] Ali T, Badshah H, Kim TH, et al. Melatonin attenuates *D*-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- κ B/JNK signaling pathway in aging mouse model [J]. *J Pineal Res*, 2015, 58: 71–85.
- [22] Ling H, Huang H, Gao J, et al. The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by *D*-galactose in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 571: 45–49.
- [23] Huang S. Study of *D*-Galactose Induced Aging Model in Mice: Effects of Doses and Routes of Administration (*D*-半乳糖致小鼠衰老模型剂量和给药方式探讨) [D]. Nanning: Guangxi Medical University (广西医科大学), 2014.
- [24] Chang YF, Gong WX, Zheng YH, et al. Urinary metabolomics study of the effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi ethanol extract on *D*-galactose-induced rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 86–92.
- [25] Tian Y, Zou B, Yang L, et al. High molecular weight persimmon tannin ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by *D*-galactose [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49: 1728–1736.
- [26] Ma KS, Wu AQ, Yang TW, et al. Progressive impairment of motor skill learning in a *D*-galactose-induced aging mouse model [J]. *Pakistan J Zool*, 2014, 46: 215–221.
- [27] Ting W, Guo J, Yang L, et al. Saponins from *Panax japonicus*, attenuate *D*-galactose-induced cognitive impairment through

- its anti-oxidative and anti-apoptotic effects in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67: 1284–1296.
- [28] Ma D SS, Lenz B, Rotter A, et al. Neurokinin3 receptor as a target to predict and improve learning and memory in the aged organism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 15097–15102.
- [29] Wang W, Li S, Dong HP, et al. Differential impairment of spatial and nonspatial cognition in a mouse model of brain aging [J]. *Life Sci*, 2009, 85: 127–135.
- [30] Mladenov M, Gokik M, Hadzi-Petrushev N, et al. The relationship between antioxidant enzymes and lipid peroxidation in senescent rat erythrocytes [J]. *Physiol Res*, 2015, 64: 891–896.
- [31] Zhu J, Mu X, Zeng J, et al. Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of *D*-galactose-induced aging [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e101291.
- [32] Xian YF, Su ZR, Chen JN, et al. Isorhynchophylline improves learning and memory impairments induced by *D*-galactose in mice [J]. *Neurochem Int*, 2014, 76: 42–49.
- [33] Li WJ, Nie SP, Xie MY, et al. Ganoderma atrum polysaccharide attenuates oxidative stress induced by *D*-galactose in mouse brain [J]. *Life Sci*, 2011, 88: 713–718.
- [34] Lan Z, Liu J, Chen L, et al. Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in *D*-galactose-induced senescent mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141: 386–395.
- [35] Zhang ZF, Lu J, Zheng YL, et al. Purple sweet potato color protects mouse liver against *D*-galactose-induced apoptosis *via* inhibiting caspase-3 activation and enhancing PI3K/Akt pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48: 2500–2507.
- [36] Qu MH, Yang X, Wang Y, et al. Docosahexaenoic acid-phosphatidylcholine improves cognitive deficits in an $A\beta_{23-35}$ -induced Alzheimer's Disease Rat Model [J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 558–564.
- [37] Ruan Q, Fang L, Gao Z, et al. The anti-inflamm-aging and hepatoprotective effects of huperzine A in *D*-galactose-treated rats [J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134: 89–97.
- [38] Sarubbo F, Ramis MR, Aparicio S, et al. Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats [J]. *Age (Dordr)*, 2015, 37: 9777.
- [39] Wang HM. Forsythiaside on Quasi AD Animal Models of Learning Memory Effect and its Mechanism (连翘酯苷对拟AD 动物模型学习记忆的改善作用及其机制的研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tsinghua University School of medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, 2012.
- [40] Tan X, Gu J, Zhao B, et al. Ginseng improves cognitive deficit *via* the RAGE/NF- κ B pathway in advanced glycation end product-induced rats [J]. *J Ginseng Res*, 2015, 39: 116–124.
- [41] Yin F, Jiang T, Cadenas E. Metabolic triad in brain aging: mitochondria, insulin/IGF-1 signalling and JNK signaling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41: 101–105.
- [42] Mazucanti CH, Cabralcosta JV, Vasconcelos AR, et al. Longevity pathways (mTOR, SIRT, insulin/IGF-1) as key modulatory targets on aging and neurodegeneration [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15: 2116–2138.
- [43] Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease associated $A\beta$ oligomers [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 1339–1353.
- [44] Chae CH, Jung SS. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2009, 164: 1665–1673.
- [45] Zhou Z, Chen S, Zhao H, et al. Probucol inhibits neural cell apoptosis *via* inhibition of mTOR signaling pathway after spinal cord injury [J]. *Neuroscience*, 2016, 329: 193–200.
- [46] Li P, Zhang L, Zhou C, et al. Sirt 1 activator inhibits the AGE-induced apoptosis and p53 acetylation in human vascular endothelial cells [J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40: 615–624.
- [47] Chun WF, Tie JW, Yang W, et al. Metabonomics study of the protective effects of green tea polyphenols on aging rats induced by *D*-galactose [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55: 1067–1074.