

颜宏, 龚吕东, 钟承志, 等. 不同剂量多柔比星诱导衰老小鼠模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2026, 34(3): 371-381.

YAN H, GONG L D, ZHONG C Z, et al. Construction of an aging mouse model induced by different doses of doxorubicin [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2026, 34(3): 371-381.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2026.03.006

不同剂量多柔比星诱导衰老小鼠模型的构建

颜宏^{1,2,3}, 龚吕东^{1,2,3}, 钟承志^{1,2,3}, 资志达^{1,2,3}, 李婷^{1,2,3},
吴德松^{1,2,3}, 郭琰^{1,2,3*}

(1. 云南白药集团股份有限公司, 昆明 650500; 2. 云南省药物研究所, 昆明 650111;
3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111)

【摘要】 目的 通过不同剂量不同频次腹腔注射多柔比星(DOX)建立快速衰老小鼠和心脏衰老小鼠模型,优化模型评价指标,为抗衰老药物评价提供疾病模型支撑。**方法** (1)快速衰老小鼠模型:小鼠分为模型1组(5 mg/kg,每7 d 1次)、模型2组(8 mg/kg,每10 d 1次)、模型3组(8 mg/kg,每7 d 1次)、模型4组(10 mg/kg,每10 d 1次)和模型5组(10 mg/kg,每7 d 1次),腹腔注射3次,连续观察60 d,记录小鼠的生存率;(2)心脏衰老小鼠模型:小鼠分为对照组、模型-1组(2 mg/kg)、模型-2组(5 mg/kg)、模型-3组(8 mg/kg)和模型-4组(10 mg/kg),每10 d一次,共注射2次,连续造模30 d,结束后使用小动物高频超声成像技术(UBM)评价射血分数(EF)、缩短分数(FS)和最大血流速度;检测血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、白介素6(IL-6)和白介素1 β (IL-1 β)的水平;检测心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、琥珀酸脱氢酶(SDH)和过氧化氢酶(CAT)含量;检测心肌组织病理、纤维连接蛋白(FN)、 β -半乳糖苷酶染色(β -gal)和p16蛋白等心脏衰老相关指标。**结果** (1)快速衰老小鼠模型:实验期间各个模型组之间小鼠的体质量和存活率均呈显著下降趋势,且随着DOX造模剂量增加和造模间隔时间缩短,体质量和存活率下降愈发明显;(2)心脏衰老小鼠模型:与对照组比较,2、5、8和10 mg/kg DOX可以显著升高LDH含量($P < 0.01$),降低GSH-Px活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);5、8和10 mg/kg DOX可以显著降低小鼠体质量($P < 0.01$),同时小鼠的EF、FS和最大血流速度均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),血清中的IL-6含量显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SOD含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), β -半乳糖苷酶和p16蛋白表达显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),心肌组织出现水样和空泡变性;而8和10 mg/kg DOX还可以显著升高CK-MB水平($P < 0.01$)和增加心脏纤维化程度($P < 0.01$);此外,10 mg/kg DOX还可以增加IL-1 β 和MDA含量($P < 0.01$)。**结论** 腹腔注射10 mg/kg DOX,每10 d注射一次,共注射3次可以成功建立快速衰老小鼠模型;而腹腔注射5或8 mg/kg DOX,每10 d注射一次,共注射2次可成功建立心脏衰老小鼠模型,引起心功能、心肌酶、炎症、氧化应激、衰老标志物、心脏病理及纤维化的改变,符合心脏衰老的生理病理特点。

【关键词】 衰老;心脏衰老;小鼠;多柔比星;不同剂量

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2026) 03-0371-11

【基金项目】 云南省重点研发计划项目(202203AC100008),云南省基础研究专项(202401AT070155)。

Funded by the Key Research and Development Project of Yunnan Province (202203AC100008), Yunnan Fundamental Research Projects (202401AT070155).

【作者简介】 颜宏,男,学士,工程师,研究方向:中药药理与药效机制。Email:yanhong@ynby.cn

【通信作者】 郭琰,男,博士,正高级工程师,研究方向:中药、民族药药效活性研究和新药研发。Email:yaoxueguoyan@126.com

Construction of an aging mouse model induced by different doses of doxorubicin

YAN Hong^{1,2,3}, GONG Lyudong^{1,2,3}, ZHONG Chengzhi^{1,2,3}, ZI Zhida^{1,2,3}, LI Ting^{1,2,3},
WU Desong^{1,2,3}, GUO Yan^{1,2,3*}

(1. Yunnan Baiyao Group Co., Ltd., Kunming 650500, China; 2. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 3. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

Corresponding author: GUO Yan. E-mail: yaoxueguoyan@126.com

【Abstract】 Objective To establish rapid-aging and cardiac-aging mouse models by intraperitoneal injection of doxorubicin (DOX) at different doses and frequencies, to optimize model-evaluation indices, and provide disease-model support for anti-aging drug evaluation. **Methods** (1) For the rapid-aging model, mice were divided into model 1 (5 mg/kg, once every 7 d), model 2 (8 mg/kg, once every 10 d), model 3 (8 mg/kg, once every 7 d), model 4 (10 mg/kg, once every 10 d), and model 5 (10 mg/kg, once every 7 d) groups. DOX was administered by three intraperitoneal injections and mice were observed continuously for 60 d to record survival rate. (2) For the cardiac-aging model, mice were divided into control, model-1 (2 mg/kg), model-2 (5 mg/kg), model-3 (8 mg/kg), and model-4 (10 mg/kg) groups. Injections were given twice, once every 10 d, for 30 d. After completion, ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and peak blood flow velocity were evaluated by small animal high-frequency ultrasound imaging. Serum levels of creatine kinase-MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), interleukin (IL)-6, and IL-1 β , and myocardial-tissue levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), succinate dehydrogenase, and catalase were measured. Myocardial tissue pathology, fibronectin, β -galactosidase staining (β -gal), and p16 protein, along with other cardiac aging-related indicators, were assessed. **Results** (1) In the rapid-aging mouse model, body mass and survival rate showed significant downward trends in all modeling groups. Decreases in body mass and survival rate became more pronounced with increasing DOX dose and shortened modeling interval. (2) In the cardiac-aging model, compared with the control group, DOX 2, 5, 8, and 10 mg/kg significantly increased LDH levels ($P < 0.01$) and decreased GSH-Px activity ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and DOX 5, 8, and 10 mg/kg significantly decreased body mass ($P < 0.01$), EF, FS, and peak blood flow velocity ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Serum IL-6 levels were significantly increased, SOD content was significantly decreased, and β -galactosidase and p16 protein expression levels were significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Myocardial tissue showed hydropic and vacuolar degeneration. DOX 8 and 10 mg/kg also significantly increased CK-MB levels and cardiac fibrosis, and DOX 10 mg/kg increased IL-1 β and MDA contents ($P < 0.01$). **Conclusions** Intraperitoneal injection of DOX 10 mg/kg once every 10 d for three injections successfully established a rapid-aging mouse model, while intraperitoneal injection of DOX 5 or 8 mg/kg once every 10 d for two injections successfully established a cardiac-aging mouse model, which induced changes in cardiac function, myocardial enzymes, inflammation, oxidative stress, aging markers, cardiac pathology, and fibrosis consistent with physiological and pathological characteristics of cardiac aging.

【Keywords】 aging; cardiac aging; mice; doxorubicin; different doses

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

衰老是指随着年龄的增长,机体各器官功能和生理状态的下降。随着生活和医疗水平的不断进步,当代人类的平均寿命已经大大延长。据估算,至2050年,全球60岁以上老年人口或超20

亿^[1],且我国的老龄化更趋严重。如今人们在追求生命最大化的同时,更多的目光集中在如何提高老年生活的质量,实现健康衰老。为此,现在的衰老研究已经不仅仅局限在延长生命周期,更

多的集中在器官衰老。《中国心血管健康与疾病报告(2023)》指出,在城乡居民疾病死亡构成比中,心血管疾病仍居首位^[2]。急性心血管事件的发生也随年龄增长明显增加,心血管疾病致死人数中占 85 岁以上总死亡人数的 60%^[3]。心脏衰老是心血管疾病发生的重要基础,是导致多种心血管慢性疾病的元凶之一,而高血压、动脉粥样硬化、中风、糖尿病等病理性疾病诱导的心脏组织损伤同样可以促进心脏衰老的进程^[4],改善心脏衰老是预防心血管疾病发生的关键。就全球而言,如何延缓衰老,一直以来都是生命科学研究领域的重点,而构建稳定的衰老疾病动物模型对抗衰老评价的初步探讨至关重要。

多柔比星(doxorubicin, DOX),又名阿霉素,是临床上常用的高效广谱蒽环类肿瘤化疗药物^[5],作用机制主要是破坏 DNA 结构,亦可抑制 RNA 合成,属于细胞周期非特异性药物。此外,DOX 具有严重的心脏毒性^[6],常用于心力衰竭^[7]、心肌损伤^[8]等疾病模型的构建。近年研究发现,高剂量 DOX 可以诱导细胞凋亡,低剂量 DOX 可以促进细胞衰老,越来越多的研究者将 DOX 用于体内外衰老研究的诱导剂,主要集中在肿瘤衰老领域,在快速衰老和心脏衰老中报道不多^[9-10]。并值得注意的是,DOX 构建不同衰老模型时,使用的剂量、注射的频次、间隔的时间、评价的指标都不尽相同^[11-12]。为此,本研究通过考察不同剂量、不同造模频率的 DOX 在衰老模型中的应用,并结合心脏衰老病理生理特征,优化模型评价指标,旨在探讨 DOX 在构建快速衰老和心脏衰老小鼠模型中的最佳造模条件,为抗衰老药物评价提供精准疾病模型支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 ~ 10 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 120 只,全雄性,体质量 18 ~ 22 g,购自华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2024-0003】,饲养于云南省药物研究所动物饲养室【SYXK(滇)K2022-0002】,动物进食和饮水自由,湿度:40% ~ 70%,温度:20 ~ 26 °C,自动光照循环(昼 12 h/夜 12 h)。本实验经云南省药物研究所实验动物管

理与使用委员会审批(IACUC-2023-0024-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride for injection)(瀚晖制药有限公司,国药准字 H33021980);氯化钠注射液(昆明南疆制药有限公司,国药准字 H53020468);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所,货号分别为 A020-2-2、A001-3-2、A005-1-2、A003-1-2、A022-1-1 和 A007-2-1);白介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(均购自达科为生物有限公司,货号分别为 1210602 和 1210122);BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)染色试剂盒(碧云天生物技术,货号分别为 P0012 和 C0602);肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)(武汉华美,货号 CSB-E05140h);RIPA 裂解液(强)和一抗稀释液(碧云天生物技术,货号为 P0013B 和 P0256);PAGE 凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技,货号 PG112);p16 抗体(Santa Cruz Biotechnology,货号为 sc-1661);GAPDH 抗体(Abcam,货号 ab181602);纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体(Abclonal,货号 A12977);Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Abcam,货号 GR3366929-3);555-标记山羊抗兔 IgG (Abclonal,货号 AS058);DAPI 染色液(碧云天生物技术,货号 C1006)。小动物超声成像系统(云南珂纳科技有限公司,型号 SiliconWave 60),冰冻切片机(美国 Thermo,型号 CRYOSTAR NX50),电热恒温培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司,型号 BPX-52),连续波长酶标仪(美国 Thermo,型号 Multiskan GO Thermo),蛋白免疫印迹实验系统(美国伯乐,型号 Powerpac Basic),化学发光分析仪(北京六一,型号 WD-9423B),冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号 JXFSTPRP-CLN-48),倒置荧光显微镜(德国卡尔蔡司,型号 Axio Observer32.5)。

1.2 方法

1.2.1 DOX 致快速衰老小鼠模型的建立

取 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 60 只,按体质量随机分为模型 1 组(5 mg/kg, 每 7 d 一次)、模型 2 组(8 mg/kg, 每 10 d 一次)、模型 3 组(8 mg/kg, 每 7 d 一次)、模型 4 组(10 mg/kg, 每 10 d 一次)和模型 5 组(10 mg/kg, 每 7 d 一次),每组 12 只,腹腔注射 3 次,注射体积为 20 mL/kg,每 3 ~ 4 d 记录 1 次小鼠体质量,连续观察 60 d,绘制小鼠的生存曲线。

1.2.2 DOX 致心脏衰老小鼠模型的建立

取 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 60 只,按体质量随机分为对照组、模型-1 组(2 mg/kg)、模型-2 组(5 mg/kg)、模型-3 组(8 mg/kg)和模型-4 组(10 mg/kg),每组 12 只,每 10 d 一次,共注射 2 次,对照组注射氯化钠注射液,注射体积为 20 mL/kg,每 3 ~ 4 d 记录 1 次小鼠体质量,连续观察 30 d,第 29 天时用小动物超声成像系统(ultrasound biomicroscopy, UBM)对小鼠心功能进行检测,评价小鼠心脏射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)和最大血流速度。第 30 天小鼠取血并分离血清,取心脏去除血污, -80 °C 保存待测。

(1)血清心肌酶、炎症因子及心肌组织氧化应激水平检测:血清复溶,采用比色法检测血清中的 LDH 水平,采用 ELISA 法检测血清中 CK-MB、IL-6 和 IL-1 β 的含量;心肌组织按 1 : 9 加入生理盐水,制备心脏匀浆液,离心取上清,采用比色法检测心肌中的 SOD、GSH-Px、MDA、SDH 和 CAT 活力,所有检测按试剂盒说明书进行操作。

(2)心肌组织病理学及纤维化程度检测:取小鼠心脏组织,进行固定、石蜡包埋,切片行苏木素-伊红(HE)染色,使用光学显微镜对心肌病理学改变进行观察。心脏组织进行冰冻切片制备,丙酮固定,山羊血清封闭 1 h,滴加 FN(1 : 100)一抗,放置湿盒中 4 °C 避光过夜,滴加 555-山羊抗兔 IgG 荧光二抗(1 : 1000),于 37 °C 避光孵育 30 min,再滴加 DAPI 染色液避光孵育 5 min,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察并采集图像。

(3)心脏衰老标志物检测:使用心脏组织的冰冻切片,采用比色法检测心肌组织的 β -gal,根据试剂盒说明书进行染色,其中 β -gal 着色显示

为蓝色。采用 Western Blot 检测心脏组织中的 p16 蛋白表达,心脏组织加入同体积的裂解液用冷冻研磨仪进行研磨,离心后提取上清液,BCA 测定蛋白浓度。蛋白样品进行电泳、转膜、封闭,加入一抗 GAPDH(1 : 1000)和 p16(1 : 1000),4 °C 孵育过夜,加二抗(1 : 8000)继续孵育 1.5 h 后,化学发光分析仪采集图像。

1.3 统计学分析

使用 Graphad Prism 9.0 软件对数据进行分析 and 绘图。数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。免疫荧光结果用荧光显微镜自带的 ZEN 3.8 软件分析平均荧光强度;Western Blot 实验结果用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析灰度值。

2 结果

2.1 DOX 致小鼠快速衰老模型的建立

2.1.1 对小鼠生存周期的影响

观察腹腔注射不同剂量 DOX、不同造模频次(每 7 d 一次和每 10 d 一次)对小鼠生存周期的影响。在 60 d 的实验周期内,模型 1 组小鼠未见小鼠死亡;模型 2 组第 38 天出现死亡,最终存活率为 80%;模型 3 组小鼠第 37 天出现死亡,最终存活率为 40%;模型 4 组小鼠第 37 天出现死亡,最终存活率为 10%;模型 5 组小鼠第 17 天出现死亡,第 36 天时存活率为 0。见图 1。

2.1.2 对小鼠体质量变化的影响

实验期间各造模组小鼠的体质量均呈显著下降趋势,且随着造模剂量和造模频次的增加,体质量下降愈发明显。见图 2。

2.2 DOX 致小鼠心脏衰老模型的建立

2.2.1 对小鼠体质量的影响

对照组小鼠行为能力和状态正常,毛发柔顺光亮。随着 DOX 造模剂量增加,造模组小鼠出现活动量减少,精神萎靡,炸毛,失去光泽,体质量下降。实验期间对照组和模型-1 组小鼠的体质量呈上升趋势,模型-2 组小鼠体质量上升缓慢,模型-3 组和模型-4 组小鼠体质量呈下降趋势,且个体差异较大,从造模第 10 天开始,与对照组比较,模型-2 组、模型-3 组和模型-4 组小鼠体质量均有显著性差异($P < 0.01$)。见图 3。

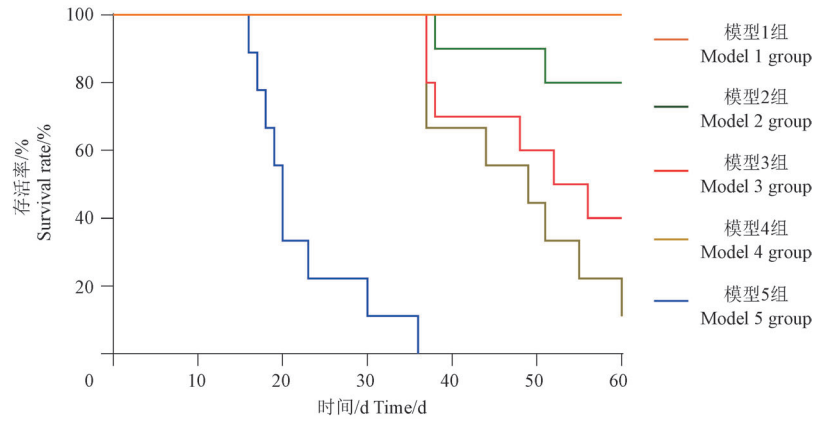


图 1 DOX 对小鼠生存周期的影响($n = 12$)

Figure 1 Effects of DOX on the survival cycle in mice($n = 12$)

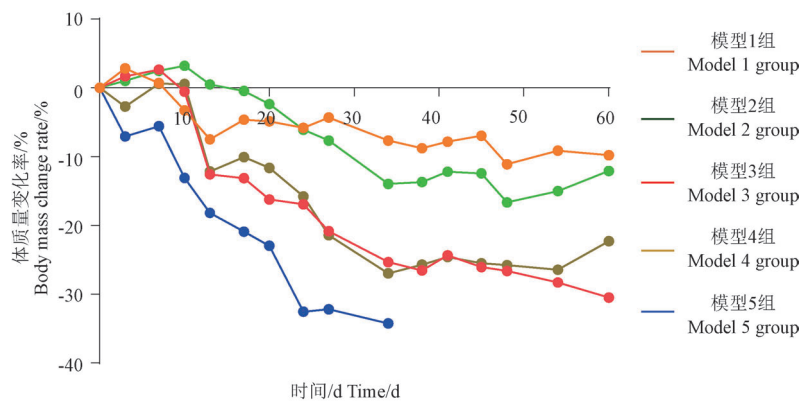
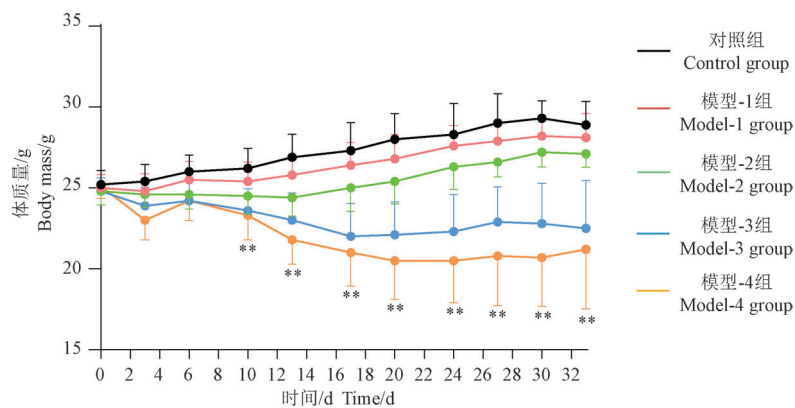


图 2 DOX 对小鼠体质量变化率的影响($n = 12$)

Figure 2 Effect of DOX on body mass change rate in mice($n = 12$)



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 3 DOX 对心脏衰老模型小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

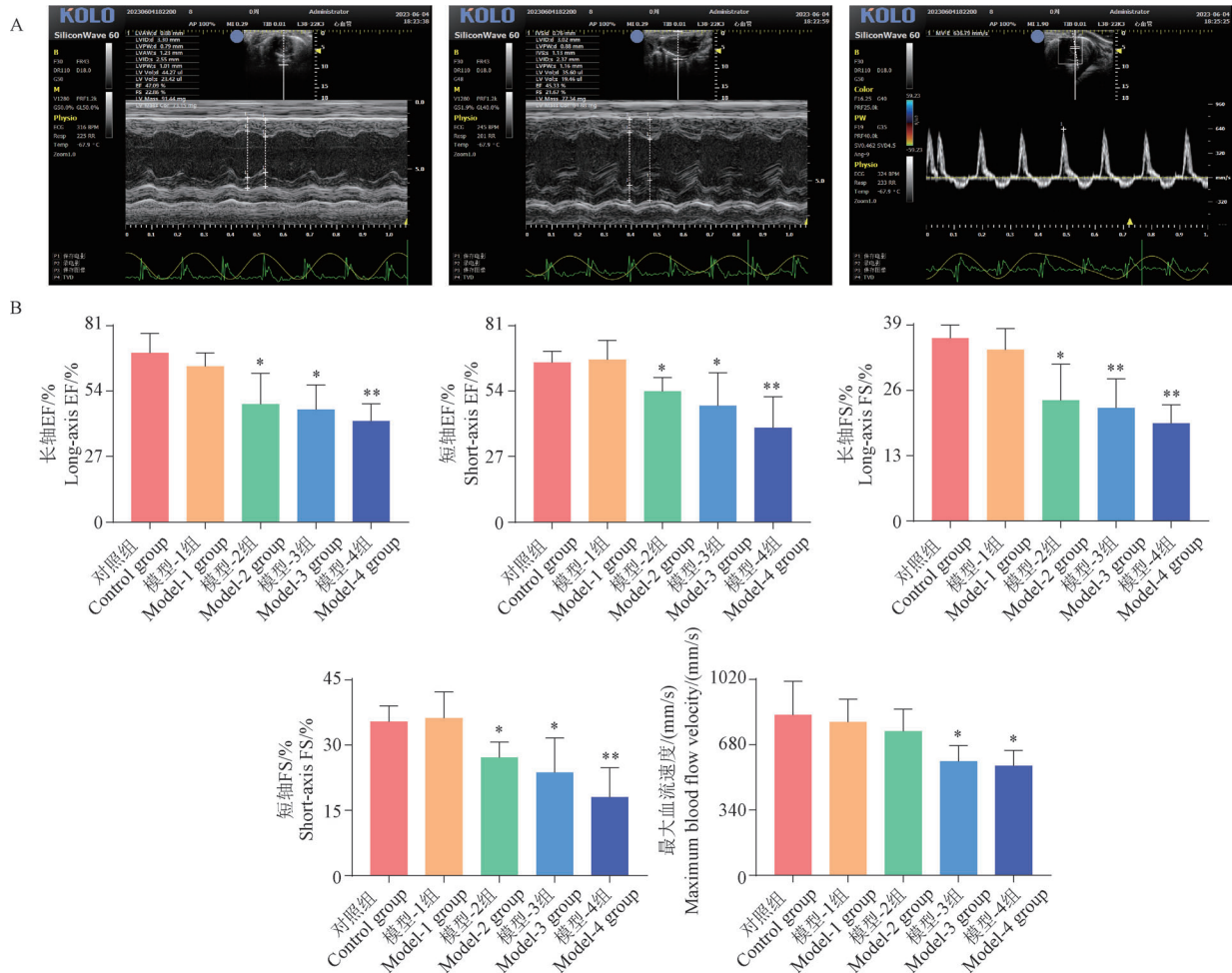
Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effects of DOX on body mass in cardiac aging mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

2.2.2 对小鼠心脏超声的影响

采用UBM的B-mode和PW Doppler Mode模式进行各组小鼠心脏功能检测,与对照组比较,模型-2组、模型-3组和模型-4组可以显著降低小

鼠的EF和FS($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),模型-3组和模型-4组可以显著降低小鼠心脏最大血流速度($P < 0.05$)。表明DOX造模剂量 $> 5 \text{ mg/kg}$ 可出现心脏衰老相关功能表现。见图4。



注:A:B-Mode 和 PW Doppler Mode 检测模式;B:长、短轴 EF,长、短轴 FS 和最大血流量的检测结果;与对照组相比,* $P < 0.05$ 。(下同)

图 4 DOX 对心脏衰老模型小鼠心脏超声的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. B-Mode and PW Doppler Mode detection modes. B. Long and short-axis EF, long and short-axis FS and maximal blood flow results. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Effect of DOX on cardiac ultrasound in cardiac aging mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2.3 对小鼠血清心肌酶及炎症因子的影响

采用比色法检测血清中的 LDH,采用 ELISA 法检测血清中的 CK-MB、IL-6 和 IL-1 β 。与对照组比较,模型-1 组、模型-2 组、模型-3 组和模型-4 组小鼠的 LDH 水平显著升高($P < 0.01$),模型-2 组、模型-3 组和模型-4 组小鼠的 IL-6 含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),模型-3 组和模型-4 组小鼠的 CK-MB 含量显著升高,模型-4 组小鼠的 IL-1 β 含量显著升高($P < 0.01$)。见图 5。

2.2.4 对小鼠心肌组织氧化应激水平的影响

采用比色法检测心肌组织中的 SOD、MDA、GSH-Px、SDH 和 CAT。与对照组比较,模型-1 组、模型-2 组、模型-3 组和模型-4 组小鼠的 GSH-Px

活力显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),模型-2 组和模型-4 组小鼠的 SOD 活力显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),模型-4 组的 MDA 含量显著升高($P < 0.01$),各模型组小鼠 SDH 和 CAT 含量未见显著性差异。见图 6。

2.2.5 对小鼠病理学的影响

采用 HE 染色进行小鼠病理检测。对照组小鼠心脏组织心内膜及心外膜结构清晰,心壁及心腔未见明显病变;心肌纤维着色均匀,胞核位于心肌细胞一侧,间质未见异常,且未见明显的炎性细胞浸润。与对照组比较,注射 DOX 后,小鼠心脏可见心肌细胞水肿,少量心肌细胞的空泡变性(黑色箭头);且随造模浓度的提高,水肿和空

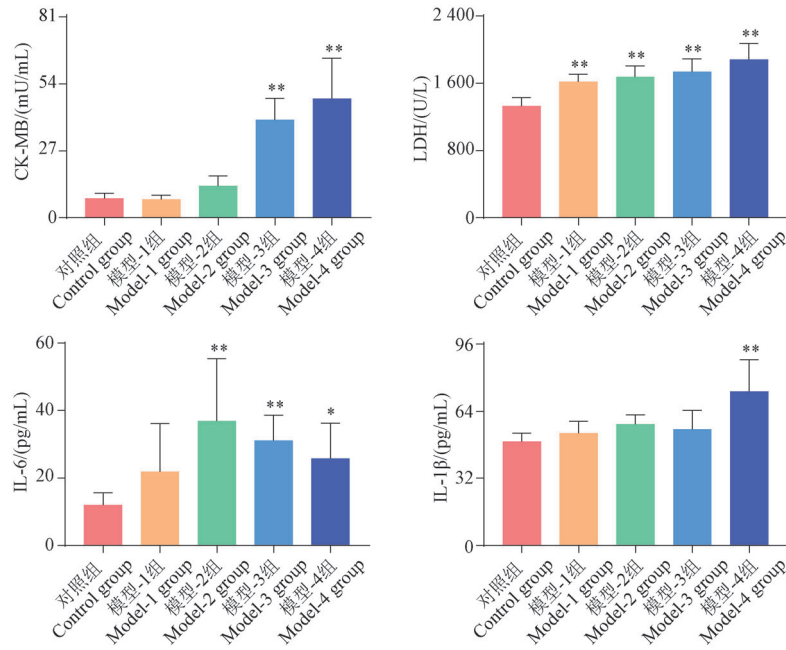


图 5 DOX 对心脏衰老模型小鼠心肌酶及炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Figure 5 Effect of DOX on myocardial enzymes and inflammatory factors in cardiac aging mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

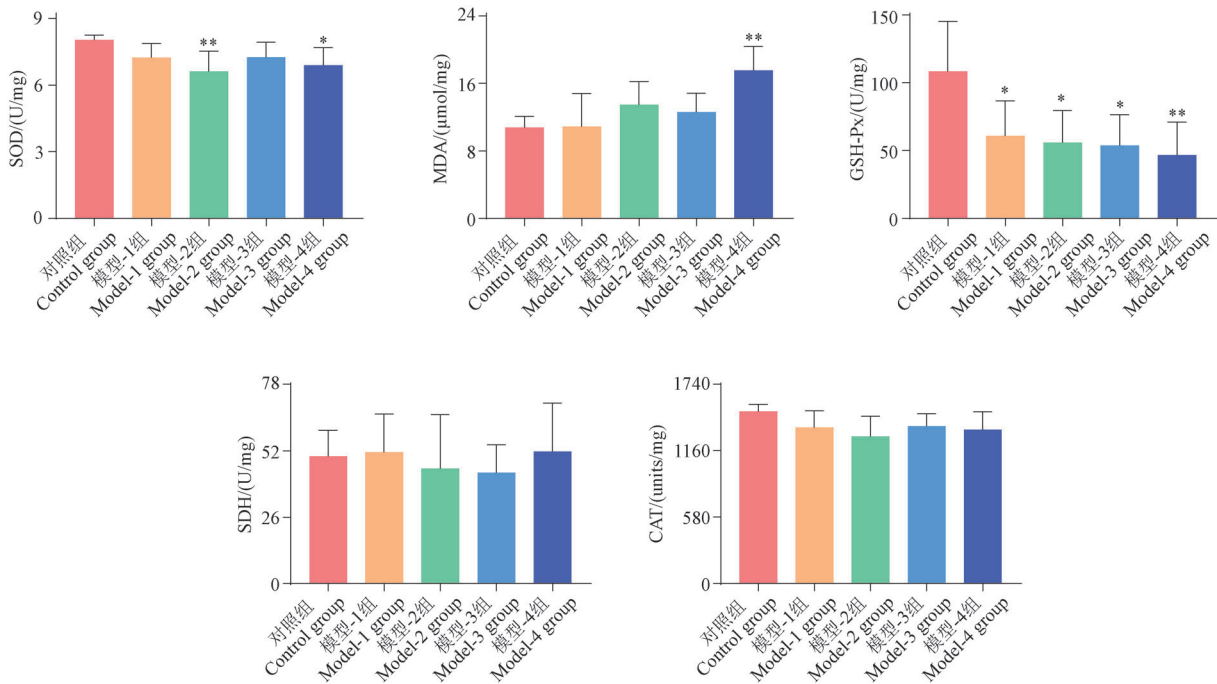


图 6 DOX 对心脏衰老模型小鼠氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 6 Effect of DOX on oxidative stress in cardiac aging mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

泡变性越严重。但造模各组均未见明显的心肌细胞坏死、结缔组织增生及炎性细胞浸润等其他异常,提示 DOX 诱导的小鼠心脏未发生实质性病变,这也与心脏衰老进程表现一致。见图 7。

2.2.6 对小鼠心肌纤维化的影响

采用免疫荧光染色对小鼠心肌组织中的 FN

进行染色, FN 是心肌纤维化早期应答和基质沉积的核心分子。经平均荧光强度分析后发现,与对照组比较,模型-3 组和模型-4 组小鼠心脏组织中的 FN 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),而模型-1 组和模型-2 组有升高趋势,但无显著性差异($P > 0.05$)。表明 DOX 造模剂量 $> 8 \text{ mg/kg}$ 可

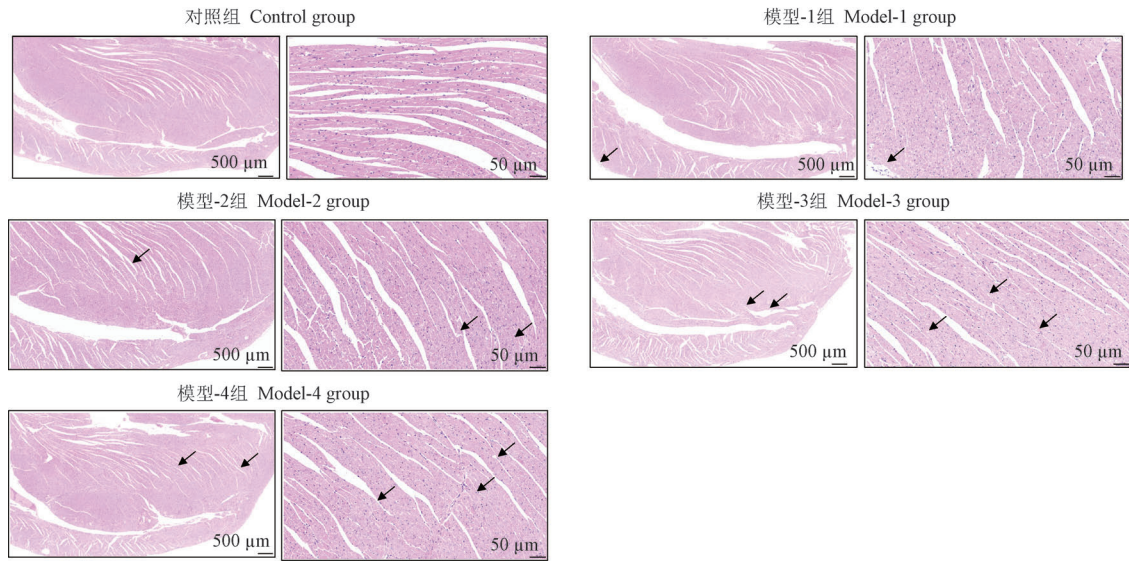


图 7 DOX 对心脏衰老模型小鼠病理学的影响($n = 6$)

Figure 7 Effect of DOX on the pathology of cardiac aging mice($n = 6$)

以出现心脏衰老纤维化表现。见图 8。

2.2.7 对小鼠心脏衰老标志物的影响

采用比色法进行心肌组织 β -gal 染色, β -gal 是常用于细胞衰老的检测指标之一。与对照组比较, 模型-2 组、模型-3 组和模型-4 组小鼠心肌组织中的蓝染(β -gal 着色)细胞数明显增多, 且随造模剂量的增加, 蓝染细胞数逐渐增加。

采用 Western Blot 进行心肌组织 p16 蛋白检测, p16 常作为衰老标志物。与对照组比较, 模型-2 组、模型-3 组和模型-4 组小鼠心肌组织中 p16 蛋白的表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。表明 DOX 造模剂量 $> 5 \text{ mg/kg}$ 可以出现衰老标志物 β -gal 和 p16 蛋白的表达增加, 呈现心脏衰老状态。见图 9, 图 10。

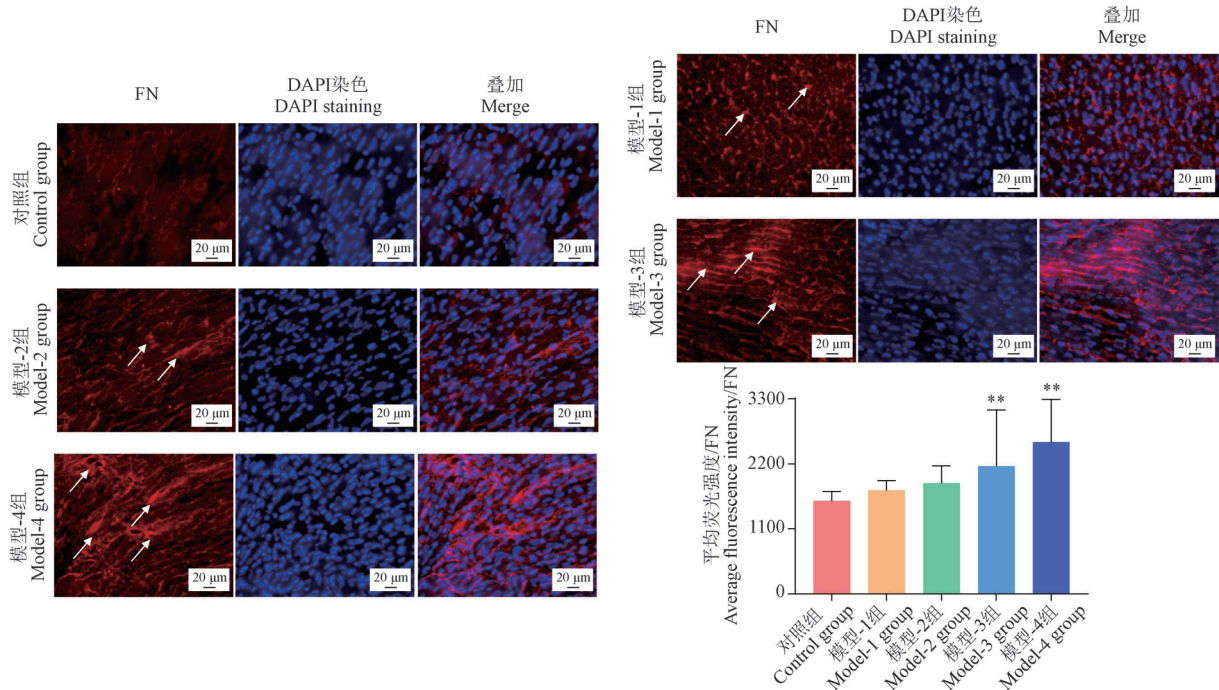


图 8 DOX 对心脏衰老模型小鼠心肌组织 FN 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 8 Effect of DOX on FN in myocardial tissue of cardiac aging mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

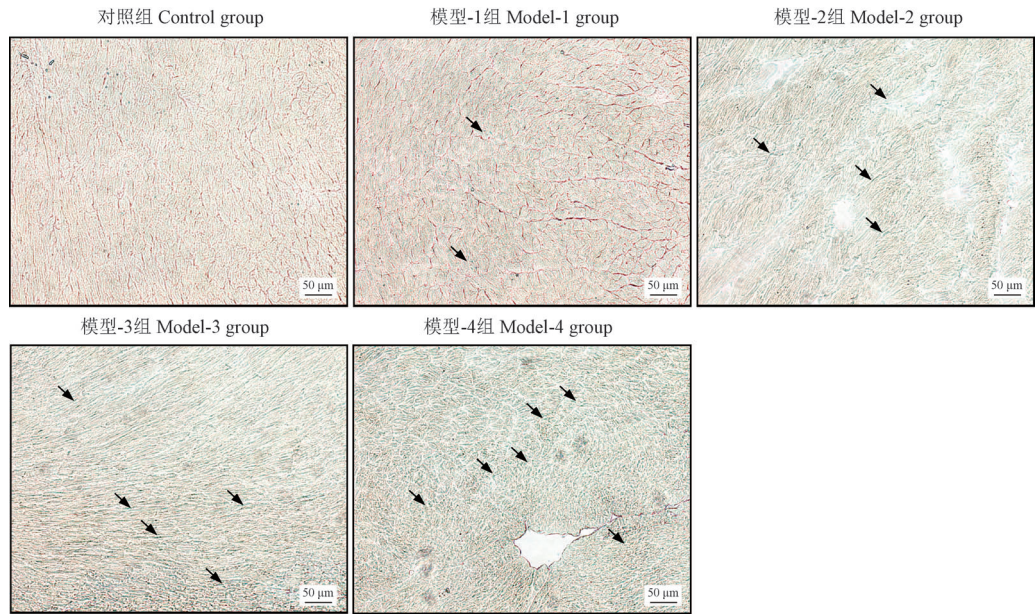


图 9 DOX 对心脏衰老模型小鼠心肌组织 β -gal 的影响($n = 6$)

Figure 9 Effect of DOX on β -gal in myocardial tissue of cardiac aging mice($n = 6$)

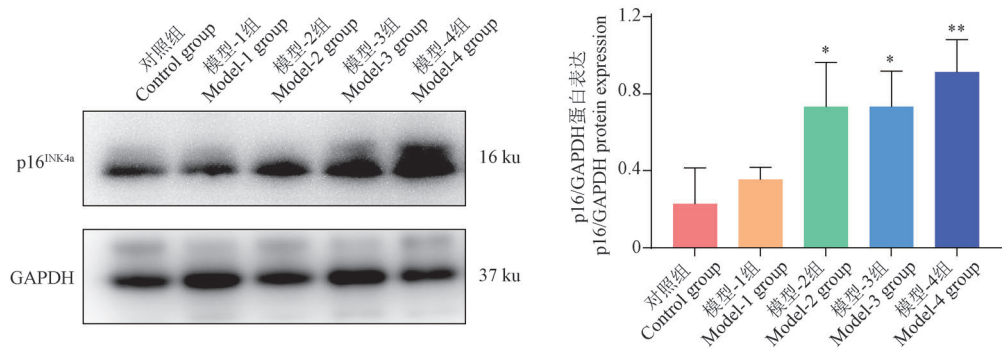


图 10 DOX 对心脏衰老模型小鼠心肌组织 p16 蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 10 Effect of DOX on p16 protein in myocardial tissue of cardiac aging mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

人口老龄化已成为世界各国面临的严重社会问题。衰老作为一种重要的风险因素,是指随着年龄增长,细胞、组织和器官发生系统性病变,从而导致衰老相关疾病和寿命终结的现象。不仅严重威胁老年人的生命健康,也给世界带来沉重的医疗和经济负担^[13]。心血管疾病在老年群体中处于高发状态,而心脏衰老是心血管疾病发生的主要因素^[14],其典型特征包括心脏收缩和舒张功能下降,左心室壁肥厚,心肌肥大,间质纤维化增加,代谢重塑,线粒体功能异常等^[15]。延缓衰老是亘古不变的研究课题,而提升老年群体的生活质量,促进健康老龄化是当前的热点领域。

选用具有类人类表型的衰老动物模型在衰老机制及抗衰老药物评价中至关重要^[16]。目前常用的衰老模式生物包括酵母细胞、线虫、果蝇、小鼠和猴等。其中小鼠在各实验室中广泛使用,研究最多的是 SAMP8 小鼠^[17]和 D-半乳糖诱导衰老模型小鼠^[18]。DOX 作为常用抗肿瘤药物,因其对细胞周期的抑制和 DNA 的破坏在衰老研究中应用越来越多^[19],且相较于传统衰老模型小鼠的构建,腹腔注射 DOX 具有成本低和操作简便等优势^[9]。研究发现,DOX 在快速衰老、细胞衰老、器质性衰老中均有应用^[20-22],可见采用不同剂量和造模频次注射 DOX 可以构建不同的衰老模型,这也是 DOX 在衰老疾病模型构建中的另一优势。

在本研究中,通过腹腔注射不同剂量(5,8 和

10 mg/kg)、不同造模频次(每 7 d 一次和每 10 d 一次)DOX 探讨构建快速衰老模型小鼠最佳条件。结果发现,5 mg/kg DOX 每 7 d 注射一次不会引起小鼠的死亡,而 8 和 10 mg/kg DOX 都可以引起小鼠的死亡,且发现随着造模时间间隔的缩短,小鼠死亡的速度加快。最严重的为 10 mg/kg DOX 每 7 d 注射一次,小鼠在造模后 36 d 全部死亡,而 8 mg/kg DOX 的各模型组存活率较高,同样也不适用生存周期的检测。因此,在本实验中,10 mg/kg DOX 每 10 d 注射一次,共注射 3 次,在 60 d 的观察期内可以显著降低 90% 的小鼠存活率,较为适合快速衰老模型的建立,也便于抗衰老药物的功效评价。

DOX 可以促进细胞衰老,并结合其心脏毒性方面的副作用,特别适合用于心脏衰老模型的建立。然而目前关于 DOX 在心脏衰老方面的研究不多,对其造模使用的剂量、频次和评价指标等均缺乏系统地研究。本研究结合心脏衰老的相关病理生理特征,通过腹腔注射不同剂量(2, 5, 8 和 10 mg/kg)DOX 探讨构建心脏衰老模型小鼠的最佳条件和评价指标。心脏衰老由于收缩舒张功能及左心室壁厚等原因可以导致心脏功能障碍,在本实验中,UBM 结果显示 5、8 和 10 mg/kg DOX 可以降低小鼠的 EF、FS 和最大血流速度,引起心功能障碍。其次,心脏衰老伴随着心肌损伤,可以引起炎症、氧化应激、心肌酶的改变^[23],在本实验中,心肌酶 LDH 较 CK-MB 更加敏感,2 mg/kg DOX 即可引起心肌酶 LDH 的升高,而 8 和 10 mg/kg 可以引起 CK-MB 水平大幅升高;炎症因子 IL-6 较 IL-1 β 和 TNF- α (因检测含量较低,未展示结果)更加敏感,5、8 和 10 mg/kg DOX 即可升高 IL-6 水平;氧化应激因子 GSH-Px 活力降低最明显,其次是 SOD 和 MDA,而 SDH 和 CAT 在本模型中未显示出显著性差异,提示二者可能在 DOX 诱导的心脏衰老模型中不敏感。此外,造模后心肌组织出现水样空泡样变性,但未出现明显的病理学改变,这也符合心脏衰老的病理特征,而 FN 是心肌纤维化进展的生物标志物^[24],结果发现 5、8 和 10 mg/kg DOX 可以显著提高心肌组织的 FN 蛋白表达,提示 DOX 可以提高心肌组织的纤维化程度。最后, β -gal 是溶酶体内的水解酶,在衰老细胞中活性显著升高^[25],p16 蛋白可

以阻断 CDK 与 cyclin D 的结合,抑制 Rb 蛋白磷酸化,导致 G1/S 期停滞^[26],二者是公认的衰老标志物及检测指标,结果发现 5、8 和 10 mg/kg DOX 即可引起 β -gal 和 p16 蛋白的显著上调。综合研究结果发现,DOX 可以引起类似心脏衰老病理生理指标的改变,可以用于构建心脏衰老模型,且随着剂量的增加,心脏衰老的程度越明显。结合小鼠行为能力和体质量的变化,使用 5 或 8 mg/kg DOX 即可引起心脏衰老相关指标的改变,5 mg/kg DOX 引起的指标变化不如 8 mg/kg 多,但其在体质量上的影响要优于 8 mg/kg,因此,推荐常规心脏衰老功效评价选择 5 mg/kg,心脏衰老深层机制评价选择 8 mg/kg。

综上所述,改变 DOX 的造模剂量、间隔时间和造模次数可以区别用于构建快速衰老和心脏衰老小鼠模型。腹腔注射 10 mg/kg DOX,每 10 d 注射一次,共注射 3 次可以成功建立快速衰老小鼠模型;而腹腔注射 5 或 8 mg/kg DOX,每 10 d 注射一次,共注射 2 次可成功建立心脏衰老小鼠模型,引起与心脏衰老类似生理病理相关的心功能、心肌酶、炎症、氧化应激、衰老标志物、心脏病理及纤维化的改变。后续可结合自身研究需求选择合适造模方法用于抗衰老功效评价。

参 考 文 献 (References)

- [1] WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 180-186.
- [2] 刘明波,何新叶,杨晓红,等.《中国心血管健康与疾病报告 2023》要点解读 [J]. *中国心血管杂志*, 2024, 29(4): 305-324.
LIU M B, HE X Y, YANG X H, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2023 [J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2024, 29(4): 305-324.
- [3] CAO Q, WU J, WANG X, et al. Noncoding RNAs in vascular aging [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7914957.
- [4] QIU Z, LI Y, FU Y, et al. Research progress of AMP-activated protein kinase and cardiac aging [J]. *Open Life Sci*, 2023, 18(1): 20220710.
- [5] 李璐瑶,李小芬,秦安全,等.阿霉素致心脏毒性模型的研究进展 [J]. *毒理学杂志*, 2024, 38(1): 67-70.
LI L Y, LI X F, QIN A Q, et al. Research progress on the cardiotoxicity model of doxorubicin [J]. *J Toxicol*, 2024, 38(1): 67-70.
- [6] MAEJIMA Y, ADACHI S, ITO H, et al. Induction of

- premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage [J]. *Aging Cell*, 2008, 7(2): 125–136.
- [7] 黄剑, 马晓彤, 张亚杰, 等. 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌细胞保护的自噬机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(8): 49–56.
- HUANG J, MA X T, ZHANG Y J, et al. Autophagy mechanism of Zhenwu decoction in myocardial cell protection of rats with heart-kidney and Yang deficiency [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(8): 49–56.
- [8] 郭红, 王少玮, 谢文静, 等. 槲皮素通过 Pink1/Parkin 信号通路减轻阿霉素心肌损伤的作用机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(7): 1–9.
- GUO H, WANG S W, XIE W J, et al. Protective role of Quercetin on Pink1/Parkin-dependent mitophagy against doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(7): 1–9.
- [9] SUN T, ZHANG L, FENG J, et al. Characterization of cellular senescence in doxorubicin-induced aging mice [J]. *Exp Gerontol*, 2022, 163: 111800.
- [10] DANG Y, AN Y, HE J, et al. Berberine ameliorates cellular senescence and extends the lifespan of mice via regulating p16 and cyclin protein expression [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(1): e13060.
- [11] SHEN E, WU Y, YE W, et al. The FGF13-caveolin-1 axis: a key player in the pathogenesis of doxorubicin- and D-galactose-induced premature cardiac aging [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(25): 2501055.
- [12] LI C, JIANG S, WANG H, et al. Berberine exerts protective effects on cardiac senescence by regulating the Klotho/SIRT1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113097.
- [13] GONZALEZ-FREIRE M, DIAZ-RUIZ A, HAUSER D, et al. The road ahead for health and lifespan interventions [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 59: 101037.
- [14] QIAN M, LIU B. Pharmaceutical intervention of aging [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1086: 235–254.
- [15] NAKANISHI K, DAIMON M. Aging and myocardial strain [J]. *J Med Ultrason*, 2022, 49(1): 53–60.
- [16] LU H, MA L, ZHANG Y, et al. Current animal model systems for ovarian aging research [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(4): 1183–1195.
- [17] ZENG Y, YANG S, XIE Z, et al. Tianqi Yizhi Granule alleviates cognitive dysfunction and neurodegeneration in SAMP8 mice via the PKC/ERK pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156542.
- [18] YIN Z, TIAN L, KOU W, et al. Xiyangshen Sanqi Danshen granules attenuated D-gal-induced C57BL/6J mouse aging through the AMPK/SIRT1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156213.
- [19] ABBASNEZHAD A, SALAMI F, MOHEBBATI R. A review: systematic research approach on toxicity model of liver and kidney in laboratory animals [J]. *Anim Models Exp Med*, 2022, 5(5): 436–444.
- [20] HUANG C, ZHANG X, WANG S, et al. PARP-2 mediates cardiomyocyte aging and damage induced by doxorubicin through SIRT1 Inhibition [J]. *Apoptosis*, 2024, 29(5/6): 816–834.
- [21] HOU J, YUN Y, XUE J, et al. Doxorubicin-induced normal breast epithelial cellular aging and its related breast cancer growth through mitochondrial autophagy and oxidative stress mitigated by ginsenoside Rh₂ [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(7): 1659–1669.
- [22] BRANDÃO S R, REIS-MENDES A, DOMINGUES P, et al. Exploring the aging effect of the anticancer drugs doxorubicin and mitoxantrone on cardiac mitochondrial proteome using a murine model [J]. *Toxicology*, 2021, 459: 152852.
- [23] LI J, XIN Y, WANG Z, et al. The role of cardiac resident macrophage in cardiac aging [J]. *Aging Cell*, 2023, 22(12): e14008.
- [24] ZHANG X, DONG W S, LI K, et al. FNDC4 prevents aging-related cardiac dysfunction; by restoring AMPK α /PPAR α -dependent mitochondrial function [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2025, 10(7): 101222.
- [25] ZHAN W, CHEN L, LIU H, et al. Pcsk6 deficiency promotes cardiomyocyte senescence by modulating Ddit3-mediated ER stress [J]. *Genes*, 2022, 13(4): 711.
- [26] CIANFLONE E, TORELLA M, BIAMONTE F, et al. Targeting cardiac stem cell senescence to treat cardiac aging and disease [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1558.

[收稿日期] 2025-09-03