·综 述·

D－半乳糖致衰老动物模型及其机制研究进展

刘建亚[1],冯文静[1],王仁萍[2*],毛拥军[1*]
(青岛大学附属医院:[1]老年医学科,[2]体检中心,青岛 266003)

【摘 要】 衰老是一种正常的生理现象,年龄相关性疾病与之有密切关系,目前关于衰老机制及抗衰老药物的探索已成为该领域研究热点。衰老模型制作多样复杂,耗资巨大,因此建立一个合适的衰老模型具有尤其重要的意义。D－半乳糖诱导的亚急性衰老动物模型以其成本低廉、简便易行、结果稳定可靠等优点,已被国内外学者广泛应用。本文拟对D－半乳糖所致各种衰老动物模型及其可能机制进行简要综述。

【关键词】 衰老;模型,动物;D－半乳糖;机制
【中图分类号】 R339.3+8 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.03.049

Research progress in D-galactose-induced aging animal model and its mechanisms

LIU Jian-Ya[1], FENG Wen-Jing[1], WANG Ren-Ping[2*], MAO Yong-Jun[1*]
([1]Department of Geriatrics, [2]Health Examination Center, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

【Abstract】 Aging is a normal physiological phenomenon, which is closely related to age-related diseases. In recent years, the mechanisms of aging and the development of anti-aging drugs have become the hotspot in scientific research. However, Establishing a suitable aging animal is complex and costly, so it is of great significance to make a suitable animal model. D-galactose-induced subacute aging animal model has been widely used by domestic and foreign scholars because of its advantages of low cost, simple and convenient operations, and stable and reliable results. In this review, we summarized the D-galactose-induced aging animal model and its possible mechanisms.

【Key words】 aging; model, animal; D-galactose; mechanism
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31571829, 31640050) *and the Natural Science Foundation of Shandong Province* (ZR2016HR23).

Corresponding author: *WANG Ren-Ping*, *E-mail*: *wangrenpingqd@gmail.com*; *MAO Yong-Jun*, *E-mail*: *mmc168@126.com*

目前,世界老年人口增长迅速,据世界卫生组织报道,到2050年世界>60岁老年人口将达22%[1]。随着年龄增加或衰老进程加快,衰老相关性疾病的发病率迅速增长,如阿尔兹海默病、高血压、冠心病等,其所带来的医疗负担也日益加重,因此研究衰老的机制,开发逆转或延缓衰老的药物迫在眉睫。而建立合适的衰老动物模型,对探讨衰老机制及筛选延缓衰老的药物、预防年龄相关的疾病尤其具有重要意义。目前研究所用的衰老动物模型主要有自然衰老模型、快速老化小鼠模型、D－半乳糖致衰老模型、臭氧损伤衰老模型、去胸腺衰老模型等[2]。我国学者提出D－半乳糖可诱导和加速衰老的进程,并开始将D－半乳糖所致的亚急性衰老动物模型应用于衰老的科学研究,本文主要就D－半乳糖所致各种衰老模型及其可能机制进行综述,为衰老模型的基础研究提供参考。

1 D－半乳糖所致衰老模型

1.1 神经衰老

神经衰老是与年龄密切相关的神经退行性病变,以记忆障碍、认知功能丧失、痴呆为主要症状的疾病,如阿尔兹海默病、帕金森病等[3],其中氧化应激和神经炎症在神经老化的过程中起着重要的作用,可导致神经元的丢失及各种神经变性疾病。D－半乳糖可引起神经系统出现变性、组织渗透压升高、氧化应激、炎症反应等,促进神经衰老的发生

收稿日期:2017－10－09;修回日期:2017－12－28
基金项目:国家自然科学基金(31571829,31640050);山东省自然科学基金(ZR2016HR23)
通信作者:王仁萍,E-mail:wangrenpingqd@gmail.com;毛拥军,E-mail:mmc168@126.com

和发展。有研究表明,连续8周颈背部皮下注射100 mg/(kg·d)D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠较正常小鼠学习、记忆及分辨能力明显下降,大脑组织中活性氧(reactive oxygen species,ROS)和炎症介质如环氧酶-2、一氧化氮合酶2、白细胞介素-1β(interleukin-1 beta,IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor alpha,TNF-α)等[4,5]明显升高。另有研究发现,D-半乳糖诱导的大鼠模型神经元出现线粒体功能障碍,细胞凋亡明显,加速大脑衰老和认知功能障碍[6],神经系统表现出明显衰老特征。

1.2 心脏老化

心血管疾病是引起老年人死亡的重要原因之一,其中心脏老化与心血管疾病的发生密不可分。在D-半乳糖150 mg/(kg·d)诱导的大鼠衰老模型中,心脏组织苏木精-伊红染色显示心肌细胞结构紊乱、肌纤维变小、心肌细胞核形态不规则,且细胞核减少、萎缩,细胞异常形状增多,心肌之间间盘减少且不清晰[7];另外,心脏组织TdT介导的dUTP切口末端标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)染色提示心肌细胞凋亡数量增加,超声心动图示左室射血分数下降,心脏功能下降[1]。Sun等[8]亦发现,D-半乳糖诱导的大鼠衰老模型可见心肌细胞钙超载、凋亡数量增加,心脏功能退化。上述文献表明,一定剂量的D-半乳糖可致心脏衰老动物模型。

1.3 免疫功能退化

老年人免疫功能退化,各种疾病发病率增加,其中,淋巴细胞增生不良可能在免疫功能中起着重要的作用。连续10周皮下注射100 mg/(kg·d)D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型,可见淋巴细胞增生降低,同时T淋巴细胞和B淋巴细胞有丝分裂减少,免疫调节因子IL-2降低[9],血清免疫球蛋白G(immunoglobulin,IgG)、IgM、IgA降低[10]。此外,皮下注射200 mg/(kg·d)D-半乳糖的衰老模型小鼠胸腺指数、脾脏指数也均见明显下降[11],电镜显示,与正常衰老模型相似,小鼠衰老模型淋巴细胞凋亡与坏死比例增加,凋亡小体形成[12],免疫功能受损,提示适当剂量的D-半乳糖可成功制作免疫功能衰老的动物模型。

1.4 肝脏功能退化

增龄可导致老年人肝功能减退并引起一系列代谢紊乱,对机体损害明显。连续8周皮下注射300 mg/(kg·d)D-半乳糖诱导的大鼠可见血清天冬氨酸转移酶、碱性磷酸酶、总胆红素、直接胆红素均升高;另外,D-半乳糖还可直接引起肝细胞复制性衰老,导致肝功能损伤,如肝脏结构破坏,肝窦扩张,肝巨噬细胞、凋亡细胞、坏死细胞增多,炎性细胞浸润,进而可引起肝功能减退[13]。

1.5 生殖功能退化

生殖功能随着年龄的增长逐渐退化,一部分成年人因生殖功能过早退化而不孕不育。有研究表明,与正常小鼠相比,皮下注射D-半乳糖250 mg/(kg·d)40 d的雌性小鼠异常卵母细胞数量、卵母细胞碎片数量、第一极体破坏程度、染色体变异比率均显著增加,且卵母细胞凋亡加剧,雌鼠产仔数量大量减少[14]。另有研究显示,与对照组比较,200 mg/(kg·d)D-半乳糖作用8周的雄性小鼠睾丸比率(睾丸质量/体质量)和精子数量下降,不运动精子和畸形精子数量增加[15],血清睾酮水平降低,促黄体生成素和卵泡刺激素水平升高[16],不孕不育率显著升高。由此可表明,D-半乳糖可以成功诱导生殖功能退化模型。

D-半乳糖所致的亚急性衰老动物模型在多种器官水平与自然衰老类似,并且与一些临床疾病密切相关,因此该模型被广泛应用于科学研究,但诱导衰老的机制尚不明确,目前存在多种学说。

2 D-半乳糖致衰老机制

D-半乳糖是一种还原单糖,大量存在于乳制品及其他非乳制品食物中(如水果、蔬菜等),在正常情况下可代谢葡萄糖,但过量时产生ROS和高级糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)[5],后者作用于高级糖基化终末产物受体,可导致氧化应激、线粒体功能障碍、细胞损伤和炎症反应;也有研究表明AGEs先引起ROS升高,进一步诱导机体氧化应激[17],促进衰老发生,兹分述于下。

2.1 氧化应激

自由基的产生可加速细胞衰老的进程,因此氧化应激致衰老理论已被广泛接受。研究表明,连续7周皮下注射D-半乳糖100mg/(kg·d)诱导的大鼠衰老模型大脑组织细胞中ROS水平升高,脂质过氧化作用标志物丙二醛水平升高[3],而机体内抗氧化酶(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶及谷胱甘肽转移酶)水平显著下降[18];另外,D-半乳糖还可通过诱导线粒体功能障碍,进一步诱导ROS产生,促进细胞和机体组织衰老。

2.2 线粒体功能障碍

线粒体是细胞的能量代谢工厂,对维持细胞的正常新陈代谢起着重要作用。较多证据表明,线粒

体功能与年龄相关疾病有紧密联系,线粒体脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)突变可诱导细胞产生大量自由基,促进细胞和组织衰老[19]。在 D-半乳糖诱导的大鼠衰老模型中,耳蜗神经腹侧核细胞中 H_2O_2 水平、还原性辅酶Ⅱ及其亚基 P22phox、P47phox、P67phox 表达量均升高,且线粒体 DNA 缺失增加,三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)水平下降,电子传递链复合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ水平均下降,线粒体膜电位下降,超微结构亦见异常等,提示线粒体功能明显受损[19,20],而线粒体功能障碍可导致多种年龄相关性疾病,如阿尔兹海默病、帕金森病、亨廷顿病等[6,18]。

2.3 免疫炎症

炎症对机体是一把双刃剑,当内源性或外源性病原体侵袭机体时,炎症应答激活对机体具有保护性作用;然而,系统性、低水平的慢性炎症与许多年龄相关性疾病或衰老有着密切关系[21],即炎性衰老。研究发现,100 mg/(kg·d)D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型免疫器官退化、免疫功能降低、促炎症因子(如 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 等)分泌增加、抗炎症因子(如 IL-10)分泌降低[4,5,13],机体转变成一种慢性炎症状态,从而促进细胞和机体老化。此外,D-半乳糖还可激活核转录因子-κB[13]、促分裂素原活化蛋白激酶[22]等炎症信号通路,促进炎症因子的释放,从而加速机体炎性状态形成,加速衰老。

2.4 端粒缩短

端粒位于真核细胞染色体末端,由端粒 DNA 和端粒蛋白组成,对染色体的稳定性有重要作用,端粒缩短可抑制细胞分裂和组织再生,在衰老及衰老相关性疾病中扮演着重要角色[23]。D-半乳糖诱导小鼠衰老模型发现,端粒长度和端粒酶活性显著降低,提示 D-半乳糖可能通过诱导端粒缩短促进衰老的发生和发展[24]。但有其他研究发现,D-半乳糖并不能使小鼠的卵巢端粒长度和端粒酶活性发生改变[14]。因此,D-半乳糖促进端粒缩短及抑制端粒酶活性是否可作为致衰老的机制还有待进一步证明。

2.5 代谢障碍

ATP 是机体细胞能量的主要来源,当能量代谢紊乱时,ATP 合成下降,细胞正常功能受到抑制,促进细胞衰老。皮下注射 150 mg/(kg·d) D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型研究发现,模型组能量代谢相关酶的活性发生明显变化,其中乳酸脱氢酶活性增加,谷胱甘肽转移酶、谷氨酰胺合成酶、肌酸激酶活性显著下降[25],提示 D-半乳糖可能通过影响代谢,促进衰老的发生发展。

3 小结

长寿与衰老是人类永恒的话题,人口老龄化已经成为人类面对的共同问题。人类对衰老的研究从未停止,通过对衰老的研究,提出了遗传基因学说、自由基学说、端粒缩短学说、DNA 损伤学说、代谢失调学说及免疫学说等一系列与衰老相关的理论,然而其具体的作用机制仍有待进一步深入研究。D-半乳糖诱导的亚急性衰老动物模型,在生理、生化等指标上可有效模拟自然衰老,成本低廉,结果稳定可靠,为衰老的机制研究及抗衰老药物的筛选提供了很好的平台,具有重要意义。

【参考文献】

[1] Chang YM, Chang HH, Kuo WW, *et al*. Anti-apoptotic and pro-survival effect of alpinate oxyphyllae fructus (AOF) in a D-galactose-induced aging heart[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 466. DOI: 10.3390/ijms17040466.

[2] 吴克芬, 胡予. D-半乳糖致衰老动物模型的建立及评价[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2012, 11(1): 74-78. DOI: 10.3724/SP.J.1264.2012.00018.
Wu KF, Hu Y. Establishment and evaluation of D-galactose induced aging animal model[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2012, 11(1): 74-78. DOI: 10.3724/SP.J.1264.2012.00018.

[3] Rehman SU, Shah SA, Ali T, *et al*. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(1): 255-271. DOI: 10.1007/s12035-015-9604-5.

[4] Ali T, Badshah H, Kim TH, *et al*. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration *via* RAGE/NF-κB/JNK signaling pathway in aging mouse model[J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 71-85. DOI: 10.1111/jpi.12194.

[5] Lu J, Wu DM, Zheng YL, *et al*. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF-κB pathway activation[J]. Cereb Cortex, 2010, 20(11): 2540-2548. DOI: 10.1093/cercor/bhq002.

[6] Banji OJ, Banji D, Ch K. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 74: 51-59. DOI: 10.1016/j.fct.2014.08.020.

[7] 李屹, 马越娇, 张晔, 等. 五味子对衰老大鼠心肌抗氧化能力及形态学改变的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 11(35): 2944-2945. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.11.028.
Li Y, Ma YJ, Zhang Y, *et al*. Effects of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. on myocardial antioxidant capacity and morphological changes in aged rats[J]. Chin J Gerontol, 2015, 11(35): 2944-2945. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.11.028.

[8] Sun SL, Guo L, Ren YC, *et al*. Anti-apoptosis effect of poly-

saccharide isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam. on cardiomyocytes in aging rats[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(9): 6117-6124. DOI: 10.1007/s11033-014-3490-1.

[9] Li WJ, Nie SP, Peng XP, *et al*. Ganoderma atrum polysaccharide improves age-related oxidative stress and immune impairment in mice[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(6): 1413-1418. DOI: 10.1021/jf204748a.

[10] 李梦云, 欧阳五庆, 吴小利, 等. 激动素对衰老大鼠免疫功能及其脾淋巴细胞体外增殖的影响[J]. 生理学报, 2014, 66(5): 605-611. DOI: 10.13294/j.aps.2014.0071.
Li MY, Ouyang WQ, Wu XL, *et al*. Effects of kinetin on immunity and splenic lymphocyte *in vitro* in D-galactose-induced aging rats[J]. Acta Physiol Sin, 2014, 66(5): 605-611. DOI: 10.13294/j.aps.2014.0071.

[11] Doan VM, Chen C, Lin X, *et al*. Yulangsan polysaccharide improves redox homeostasis and immune impairment in D-galactose-induced mimetic aging[J]. Food Funct, 2015, 6(5): 1712-1718. DOI: 10.1039/c5fo00238a.

[12] 侯茜, 郭美, 张帆. 党参水煎剂对D-半乳糖致免疫衰老小鼠胸腺功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(1): 55-57.
Hou Q, Guo M, Zhang F. Effect of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. Decoction on thymus function of D-galactose induced immune aging mice[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(1): 55-57.

[13] Ruan Q, Liu F, 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(3-4): 89-97. DOI: 10.1016/j.mad.2012.12.005.

[14] Li YJ, Han Z, Ge L, *et al*. C-phycocyanin protects against low fertility by inhibiting reactive oxygen species in aging mice[J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 17393-17409. DOI: 10.18632/oncotarget.8165.

[15] Liao CH, Chen BH, Chiang HS, *et al*. Optimizing a male reproductive aging mouse model by D-galactose injection[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): E98. DOI: 10.3390/ijms17010098.

[16] Ahangarpour A, Oroojan AA, Heidari H. Effects of exendin-4 on male reproductive parameters of D-galactose induced aging mouse model[J]. World J Mens Health, 2014, 32(3): 176-183. DOI: 10.5534/wjmh.2014.32.3.176.

[17] Yu Y, Bai F, Wang W, *et al*. Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging *via* suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2015, 133: 122-131. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.03.020.

[18] Kumar A, Prakash A, Dogra S. Naringin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactose in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(2): 626-632. DOI: 10.1016/j.fct.2009.11.043.

[19] Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG. Mammalian mitochondria and aging: an update[J]. Cell Metab, 2017, 25(1): 57-71. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.09.017.

[20] Du Z, Yang Q, Liu L, *et al*. NADPH oxidase 2-dependent oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the ventral cochlear nucleus of D-galactose-induced aging rats [J]. Neuroscience, 2015, 286: 281-292. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.061.

[21] Jurk D, Wilson C, Passos JF, *et al*. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice[J]. Nat Commun, 2014, 2: 4172. DOI: 10.1038/ncomms5172.

[22] Lu J, Wu DM, Zheng YL, *et al*. Purple sweet potato color alleviates D-galactose-induced brain aging in old mice by promoting survival of neurons *via* PI3K pathway and inhibiting cytochrome C-mediated apoptosis[J]. Brain Pathol, 2010, 20(3): 598-612. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2009.00339.x.

[23] Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection[J]. Science, 2015, 350(6265): 1193-1198. DOI: 10.1126/science.aab3389.

[24] Chen J, Wei Y, Chen X, *et al*. Polyunsaturated fatty acids ameliorate aging *via* redox-telomere-antioncogene axis[J]. Oncotarget, 2017, 8(5): 7301-7314. DOI: 10.18632/oncotarget.14236.

[25] Zhang X, An L, Bao Y, *et al*. D-galactose administration induces memory loss and energy metabolism disturbance in mice: protective effects of catalpol[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(8): 2888-2894. DOI: 10.1016/j.fct.2008.05.032.

(编辑: 张美)