

D-半乳糖大鼠衰老模型的评价[▲]

邱柏程 刘庆丰

(广西医科大学第一附属医院整形美容外科,南宁市 530021)

【摘要】 目的 对D-半乳糖衰老模型大鼠进行应激、智力、免疫以及皮肤结构的评价。**方法** 1月龄健康SD大白鼠50只用随机数字表法分为两组:衰老模型组25只;注射定量的D-半乳糖促使其衰老;年轻对照组25只;SD大鼠空白对照。分别测定两组应激、智力、耐缺氧、免疫以及真皮厚度等指标,并进行比较。**结果** 衰老模型组的抗疲劳能力低于年轻对照组($P < 0.001$),Y迷宫智力测验及跳台智力测验的错误反应率均高于年轻对照组($P < 0.001$),T淋巴细胞转化率和溶血素水平均低于年轻对照组($P < 0.001$),耐缺氧时间短于年轻对照组($P = 0.002$),真皮厚度低于年轻对照组($P < 0.001$)。**结论** D-半乳糖注射后的衰老模型大鼠,抗应激能力低下,免疫功能降低,学习记忆力衰退,真皮厚度变薄。

【关键词】 衰老模型;应激;智力;免疫;真皮厚度;大白鼠

【中图分类号】 R 965.1;R 339.38 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2009)08-0918-03

The Assessment of the D-galactose Rat Aging Model

QIU Bai-cheng, LIU Qing-feng

(Department of Plastic Surgery, the First Affiliated of Hospital Guangxi Medical University, Nanning 530001, China)

【Abstract】 Objective To assess the resistance various stresses, the intelligence, the immunity function and the dermal thickness in the rat aging model. **Methods** 50 SD rats of 30 day-old were divided into two groups at random. The aging model group included 25 rats by injection of quantitative D-galactose to establish aging model. The young group included 25 rats as controlled. The resistance against stress, the intelligence, the immunity and the dermal thickness were detected and compared. **Results** Compared to the young group, the resistance abilities of aging model to fatigue and the normal hypoxia tolerance decreased ($P < 0.001$); the wrong reactive rates of "Y" Maze and Step Down Test increased ($P < 0.001$); T lymphocyte transforming rate and the level of hemolysin decreased ($P < 0.001$); the dermal thickness of aging model decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** The aging model of rat establish by injection of D-galactose characterized by the decreased of abilities of resistance various stress, immunity, memory and the dermal thickness.

【Key words】 Aging model; Stress; Intelligence; Immune; Dermal thickness; Rat

目前D-半乳糖大鼠衰老模型的研究几乎停留在器官的生化指标的测量上,缺乏系统全面评价,所得结论不够科学。而本实验从应激、智力、免疫功能及真皮厚度四方面对大鼠衰老模型进行评价,为建立可靠的大鼠衰老模型提供更多的理论基础。

1 材料与方

1.1 材料 实验动物1月龄健康SD大白鼠50只,体重180~200g(广西医科大学实验中心提供)。动物分组:50只大鼠按1~50编号,指定随机数字表中的第2列,偶数者分入衰老模型组,奇数者分入年轻对照组。衰老模型组25只,以D-半乳糖 $0.125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续皮下注射40d,大鼠则表现出与自然衰老一致的变化,并且其衰老的程度与24月龄相似^[1];年轻对照组25只,以空白作对照。

1.2 实验仪器与试剂 Y型迷宫,跳台,吊环装置(自制);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司提供);QTM970全自动图像分析仪(Cambridge公司提供);D-半乳糖

(美国Sigma公司提供);钠石灰、刀豆蛋白A、噻唑蓝(中国医药集团上海化学试剂公司提供)。

1.3 方法

1.3.1 抗疲劳实验:将大鼠放于铁环上,于大鼠四爪均抓住铁环时开始计时。每只大鼠实验2次,取2次平均值。

1.3.2 跳台法智力实验:将大鼠放入反射箱内适应环境3min,然后立即通交流电。动物受到电击,其正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激。固定训练10次,记录正确和错误反应次数。24h后再电击10次,观察记忆能力,统计10次电击引起的错误反应率。

1.3.3 Y型迷宫智力:实验参照文献^[2],方法有改动。Y型迷宫有三个等长的臂,I臂为起步区,II臂(右侧)为电击区,III臂(左侧)为安全区。训练时将大鼠放入起步区,操纵电击控制器训练大鼠,大鼠遭遇电击时直接逃避至左侧安全区为正确反应,反之则为错误反应。固定训练10次,记录正确和错误反应次数,24h后,再电击10次,观察记忆能力,统计10次电击引起的错误反应率。

▲基金项目:广西科学基金(桂科回0731015)

通讯作者:刘庆丰。E-mail:lqfgx@163.com

1.3.4 常压耐缺氧实验:将大鼠放入 500 ml 广口瓶中,加入 30 g 钠石灰,瓶盖周围涂凡士林以密闭,每瓶 1 鼠。以大鼠蹬腿、闭眼、身体倒下的濒死期为记录止点,记录时间。

1.3.5 T 淋巴细胞转化试验:处死大鼠,取脾脏,制成细胞悬液。在青、链霉素各 100 U/ml、刀豆蛋白 A(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和无菌的小牛血清组成的 2 ml 细胞培养液中加入脾脏细胞悬液 2 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 70 h,加入噻唑蓝(5 mg/ml) 0.1 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h。用离心机以 1 500 r/min 离心 7 min,7 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 12 h,最后加入盐酸-异丙醇 2 ml 于酶标仪上测 OD 值。转化值 = 实验组的平均 OD 值 - 对照组的平均 OD 值。

1.3.6 溶血素测定:每鼠腹腔注入 5% 浓缩红细胞的生理盐水悬液 0.2 ml 免疫,处死大鼠,分离血清,用生理盐水 1:100 稀释后,取 1 ml 与 5% 浓缩红细胞悬液 0.5 ml,再加 10% 补体 0.5 ml 混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,取上清液于分光光度计上 540 nm 比色,以不加补体的空白管作对照。

表 1 抗应激作用、智力测验、免疫能力测定结果的比较 ($n=25, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of results of stress resistance, intelligence test and immune function between two groups ($n=25, \bar{x} \pm s$)

组别	抗疲劳 悬吊时间(s)	耐缺氧时间 (s)	Y 迷宫 错误反应率(%)	智力测验 错误反应率(%)	T 淋巴细胞 转化率(%)	溶血素水平 (%)
年轻对照组	125.5 \pm 24.5	37.2 \pm 4.5	2.56 \pm 0.4	2.52 \pm 0.5	50.5 \pm 5.4	0.912 \pm 0.152
衰老模型组	52.8 \pm 19.6	22.8 \pm 3.6	40.62 \pm 3.6	32.45 \pm 1.61	40.62 \pm 3.6	0.832 \pm 0.112
<i>t</i> 值	3.745	3.467	3.658	3.614	2.987	2.876
<i>P</i> 值	0.001	0.002	0.001	0.001	0.005	0.005

2.2 真皮厚度的变化 注射 D-半乳糖前、后切取大鼠的背部皮肤测量真皮厚度分别为 (422.96 \pm 14.19) μm 、(391.45 \pm 18.44) μm 。注射 D-半乳糖后真皮厚度比 D-半乳糖前薄,差异有统计学意义 ($t=6.771, P=0.000$),说明注射 D-半乳糖后衰老模型鼠的真皮厚度变薄。

3 讨论

目前在国内建立不少衰老模型,但还没有一个得到公认、简单实用的模型。国内现在应用较多、较好的模型 D-半乳糖化模型,但是实验只局限于动物组织器官生化指标的检测,少有从应激、智力、免疫能力及皮肤结构全面的评价衰老模型。而本实验正是从以上四方面综合评价模型的衰老状态。

应激是 Salye 于 20 世纪 30 年代提出的一种因外界环境的剧变刺激,机体出现的综合应答状态。随着年龄的增长,老年人对各种应激因子的适应能力明显减退,从而加速衰老的进程^[3],使机体出现学习记忆障碍、应激性精神紊乱、痴呆、抑郁症、免疫力低下等多系统疾患^[4]。本实验结果显示衰老模型鼠在抗疲劳能力和常压耐缺氧能力方面显著低于年轻对照组 ($P<0.05$)。说明老年机体由于活动及适应能力下降,因此其抗应激能力降低。现代医学认为,记忆的形成和贮存与胆碱系统密切相关,乙酰胆碱是经典的神经递质之一,它的作用是兴奋为主,亦有抑制作用。在中枢,乙酰胆碱在学习记忆尤其是近期记忆有重要作用^[5],而突触前乙酰胆碱的活性和高亲和力的胆碱摄取都有随增龄而降低的趋势。我们用 Y 型迷宫

1.3.7 真皮厚度测量:分别切取 D-半乳糖注射前和注射后的 SD 大鼠的全层皮肤,用图像分析仪测量真皮厚度,比较真皮厚度的变化。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用随机设计的 *t* 检验,组内比较配对 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组抗应激作用、智力测验、免疫能力的比较 衰老模型组的抗疲劳悬吊时间、耐缺氧时间、Y 迷宫错误反应率、智力测验错误反应率、T 淋巴细胞转化率、溶血素水平与年轻对照组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$),表明衰老模型鼠的抗应激能力、智力水平、免疫能力均低于年轻对照鼠,见表 1。

实验和跳台实验证明了衰老大鼠与年轻大鼠在智力方面有明显差异 ($P<0.05$),与老年医学临床观察人体记忆衰老的改变一致,能较好地反映自然衰老的记忆特征。随着年龄的增长,机体的免疫系统发生生理性的衰退变化,机体在衰老过程中免疫系统的中心器官-胸腺萎缩,60 岁左右萎缩至最小。胸腺能够产生胸腺细胞,并分化成 T 细胞和多种亚型,胸腺细胞可以分泌胸腺素;随着年龄的增长,胸腺细胞减少,胸腺素分泌也减少,T 细胞的分化成熟受到抑制,则吞噬及分泌干扰素的能力降低^[6],因此,免疫功能随之下降。此外,老年机体产生 IL-2 的能力、IL-2 受体表达能力及自身混合淋巴细胞反应能力均降低,也是 T 细胞分裂能力降低的主要原因^[7]。本实验测定衰老模型大鼠的 T 淋巴细胞的转化率,以反映细胞免疫功能,测定溶血素水平以反映体液免疫功能,结果显示衰老模型鼠的 T 淋巴细胞转化率及溶血素水平均显著低于年轻对照组 ($P<0.05$),说明老年机体的细胞免疫功能及体液免疫功能均显著降低。人体皮肤老化从 30 岁即开始出现,随着年龄的增长日趋明显,其中包括皮肤真皮厚度的变薄^[8]。本实验通过连续向 SD 大鼠皮下注射 D-半乳糖促使其衰老,并测量注射 D-半乳糖前后大鼠真皮厚度,数据显示衰老模型的真皮厚度变薄 ($P<0.05$)。以上实验结果表明以 D-半乳糖 0.125 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 连续皮下注射 40 d,可以获得可靠的大鼠衰老模型,方法简单实用。

参 考 文 献

[1] 徐 智,吴国明,钱桂生,等. 大鼠衰老模型的初步建立[J]. 第三军医大学学报,2003,25(4):312-314.

- [2] 郭蓉晓,易明绢,李 绢,等. 灵智健脑液的药效学研究[J]. 成都中医药大学学报,1997,20(2):41-42.
- [3] 钟 毅,孙 立,朱秉匡,等. 益寿调脂片对大鼠抗应激能力的影响及毒性试验的研究[J]. 深圳中西医结合杂志,2000,10(3):104-105.
- [4] 李云峰. 应激诱发抑郁症机制的研究进展[J]. 生命科学进展,2002,33(2):142-144.
- [5] 殷 越,冯 涛,周大果. 地黄饮子对半乳糖所致脑衰老大鼠学习记忆行为的影响[J]. 中医药学报,2002,30(6):55-56.
- [6] 曹序茂. 免疫功能与衰老[J]. 解放军健康,2000,(3):20-21.
- [7] 严 详,贺学强,刘永铭. 复方参七汤对半乳糖致衰老大鼠免疫学的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2002,11(1):19-20.
- [8] 陈建军. A 型肉毒素在面颈部祛皱的应用[J]. 广西医学,2008,30(9):1408-1409.

(收稿日期:2009-05-26 修回日期:2009-06-11)

蚊香对小鼠血清 ALT、AST、TBIL 及肝组织的影响[▲]

刘承武 潘尚领 黄龄瑾 李忠清 韦丽宁 郭广威 毛志锋

(广西医科大学病理生理学教研室,南宁市 530021)

【摘要】 目的 观察蚊香对小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)及肝组织的影响。方法 将60只小鼠随机分为4组,每组15只。慢性吸入组每天熏蚊香8h,连续6d;急性吸入组急熏蚊香3h;联合吸入组在慢性吸入的基础上再急熏3h;空白组不作处理。各组小鼠处理后立刻检测血清中ALT、AST和TBIL的含量并观察肝组织的病理切片。结果 联合吸入组的血清ALT和AST均明显高于其他组($P < 0.01$),慢性吸入组的血清ALT和AST亦明显高于急性吸入组和空白对照组($P < 0.01$);联合吸入组、慢性吸入组的血清TBIL明显高于急性吸入组和对照组($P < 0.01$)。病理切片显示联合吸入组、慢性吸入组、急性吸入组的肝组织均有不同程度的水变性和肝窦充血。结论 蚊香对小鼠肝脏具有损害作用。

【关键词】 丙氨酸氨基转移酶;天门冬氨酸氨基转移酶;总胆红素;肝病理改变;小鼠;蚊香

【中图分类号】 R 363.13 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2009)07-0920-03

Effect of Mosquito-repellent Incense on Serum ALT, AST, TBIL and Liver Tissues of Mice

LIU Cheng-wu, PAN Shang-ling, HUANG Lin-gjin, LI Zhong-qing, WEI Lin-ing, GUO Guang-wei, MAO Zhi-feng

(Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL) and liver tissue on mice by mosquito-repellent incense. **Methods** 60 mice were divided randomly into 4 groups with each group of 15 mice. Mice in chronic inhalation group were smoked 8 hours everyday by mosquito-repellent incense for 6 days; mice in acute inhalation group were smoked by mosquito-repellent incense for 3 hours; the operation of joint inhalation group were combined the operation of chronic inhalation group and acute inhalation group; no operation was given to mice in blank group. Every mouse was detected the serum content of ALT, AST and TBIL right after operation and observed the pathological changes of liver tissues. **Results** The serum contents of ALT and AST in joint inhalation group were higher than those other groups ($P < 0.01$). The serum content of ALT and AST in chronic inhalation group were higher than of acute inhalation group and the blank group ($P < 0.01$); the serum content of TBIL in joint inhalation group and chronic inhalation group were higher than those of acute inhalation group and the blank group ($P < 0.01$); the pathological changes of liver tissues showed that there was varying degrees hydropic degeneration of liver and hyperaemia in hepatic sinus. **Conclusion** Mosquito-repellent incense is harmful to the liver in mice.

【Key words】 Alanine aminotransferase; Aspartate aminotransferase; Total bilirubin; Mosquito-repellent incense

蚊香具有驱赶杀灭蚊虫的良好作用,又因价格低廉、使用方便,迄今仍广泛使用于人们的日常生活中。大多数蚊香的有效成分是拟除虫菊脂类杀虫剂^[1]。为了了解蚊香烟雾对动物体的影响,我们给小鼠吸入蚊香烟雾,观察小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、胆红素(TBIL)的含量变化及对肝组织的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 健康昆明种小鼠60只,体重22~25g,雌雄不限,由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品和材料 锦江牌大盘微烟蚊香,由福建省锦江日用化工有限公司生产。ALT试剂盒:南京建成生物工程研究所生产,批号20030106;AST试剂盒:南京建成生物工程研究所,

▲基金项目:广西科学基金(桂科青0447029)

通讯作者:潘尚领(1965~),男,籍贯:广西平果县,壮族,博士,教授,研究方向:人类长寿和衰老的分子遗传学机理。E-mail: shanglingpan@hotmail.com