

D-半乳糖诱导衰老相关认知功能障碍小鼠模型制备方法的优化

孙 茜¹, 孙伟伦¹, 王荟泮¹, 马文丽¹, 徐华丽¹, 付雯雯^{1,2}

(1. 吉林大学药学院药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学药学院药理实验中心, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 筛选适宜的D-半乳糖(D-gal)浓度和造模周期, 建立其诱导的小鼠衰老相关认知功能障碍模型, 并进行综合评价。**方法:** 50只C57BL/6J小鼠随机分为对照组和100、200、400及800 mg·kg⁻¹ D-gal组, 每组10只。各浓度D-gal组小鼠每日皮下注射相应浓度D-gal, 每日1次, 对照组小鼠注射等体积生理盐水。监测各组小鼠体质量及饮水量, 采用前肢抓力值测试和爬杆运动能力实验中小鼠爬杆时间评估各组小鼠运动协调能力, 通过新物体识别实验、Y迷宫实验及Morris水迷宫实验评价各组小鼠认知功能, HE染色和尼氏染色观察2组小鼠脑组织病理形态表现, 免疫组织化学法检测各组小鼠脑组织中 β -半乳糖苷酶(β -gal)蛋白表达情况, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测2组小鼠海马组织中白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-18和IL-4 mRNA表达水平, Western blotting法检测2组小鼠海马组织中 β -gal、p53和p16蛋白表达水平。**结果:** 对照组和各浓度D-gal组小鼠的体质量增长趋势一致, 差异无统计学意义($P>0.05$), 饮水量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。皮下注射D-gal第8周后, 与对照组比较, 200和400 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠前肢抓力值均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠爬杆时间明显延长($P<0.05$), 200和400 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠识别指数明显降低($P<0.01$), 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠自发交替率明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 逃避潜伏期明显增加($P<0.05$)。空间探索实验, 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠逃避潜伏期明显增加($P<0.05$)。HE染色和尼氏染色观察, 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织神经元排列紊乱、核浓染和核固缩明显、形态结构异常, 尼氏染色阳性细胞数量明显减少。免疫组织化学法检测, 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织CA1区、CA3区和皮层(Cortex)区 β -gal蛋白呈强阳性表达。RT-qPCR法检测, 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织中IL-1 β 、IL-18和TNF- α mRNA表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), IL-4 mRNA表达水平明显降低($P<0.01$)。Western blotting法检测, 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织中 β -gal、p53和p16蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** 每日给小鼠皮下注射200 mg·kg⁻¹ D-gal、持续8周可制备衰老相关认知功能障碍小鼠模型。

[关键词] 衰老; D-半乳糖; 认知功能障碍; 疾病模型; 小鼠; β -半乳糖苷酶

[中图分类号] R965.1; R331 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-06-24 **[录用日期]** 2025-07-18

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(32300821, 82003752); 吉林省科技厅国际科技合作项目(20240402038GH); 吉林大学实验技术项目(SYXM2025a012)

[作者简介] 孙 茜(2001—), 女, 山东省济宁市人, 在读硕士研究生, 主要从事神经药理方面的研究。

[通信作者] 付雯雯, 高级工程师(E-mail: fww@jlu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Optimization of preparation method for D-galactose-induced mouse model of aging-related cognitive dysfunction

SUN Han¹, SUN Weilun¹, WANG Huifeng¹, MA Wenli¹, XU Huali¹, FU Wenwen^{1,2}

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Pharmacology Laboratory Center, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the suitable concentration of D-galactose (D-gal) and modeling period, and establish its induced aging-related cognitive dysfunction model in the mice, and perform a comprehensive evaluation. **Methods:** Fifty C57BL/6J mice were randomly divided into control group and 100, 200, 400, and 800 mg·kg⁻¹ D-gal groups, with 10 mice in each group. The mice in various D-gal groups were subcutaneously injected with the corresponding concentration of D-gal once daily; the mice in control group were injected with an equal volume of normal saline. The body mass and water consumption of the mice in various groups were monitored; forelimb grip strength test and experiment on the ability of pole climbing sports were used to evaluate the motor coordination ability of the mice in various groups; novel object recognition test, Y maze test, and Morris water maze test were used to evaluate the cognitive function of the mice in various groups; HE staining and Nissl staining were used to observe the pathomorphology of brain tissue of the mice in various groups; immunohistochemistry method was used to detect the expression of β -galactosidase (β -gal) protein in brain tissue of the mice in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the mRNA expression levels of interleukin (*IL*)-1 β , tumor necrosis factor- α (*TNF*- α), *IL*-18, and *IL*-4 in hippocampus tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of β -gal, p53, and p16 proteins in hippocampus tissue of the mice in various groups. **Results:** The body mass growth trends of the mice in control group and various D-gal groups were consistent and there was no statistically significant difference ($P > 0.05$), and there was no statistically significant difference in water consumption ($P > 0.05$). After 8 weeks of subcutaneous injection of D-gal, compared with control group, the forelimb grip strength values of the mice in 200 and 400 mg·kg⁻¹ D-gal groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the pole-climbing time of the mice in 200 mg·kg⁻¹ D-gal group was significantly prolonged ($P < 0.05$); the recognition indexes of the mice in 200 and 400 mg·kg⁻¹ D-gal groups were significantly decreased ($P < 0.01$); the spontaneous alternation rate of the mice in 100, 200, 400, and 800 mg·kg⁻¹ D-gal group was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the escape latency was significantly increased ($P < 0.05$). Spatial probe test showed that compared with control group, the escape latency of the mice in 200 mg·kg⁻¹ D-gal group was significantly increased ($P < 0.05$). The HE staining and Nissl staining results showed that compared with control group, the hippocampus neurons of the mice in 200 mg·kg⁻¹ D-gal group were arranged disorderly, with obvious nuclear pyknosis, nuclear condensation, and abnormal morphology and structure, and the number of Nissl staining positive cells was significantly decreased. The immunohistochemistry results showed that compared with control group, the β -gal expressions in CA1 region, CA3 region, and cortex region of hippocampus tissue of the mice in 200 mg·kg⁻¹ D-gal group were strongly positive. The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of *IL*-1 β , *IL*-18, and *TNF*- α mRNA in hippocampus tissue of the mice in 200 mg·kg⁻¹ D-gal group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression level of *IL*-4 mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of β -gal, p53, and p16 proteins in hippocampus tissue of the mice in 200 mg·kg⁻¹ D-gal group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The aging-related cognitive dysfunction model in the mice can be established by

subcutaneous injection of 200 mg·kg⁻¹ D-gal daily for 8 weeks.

KEYWORDS Aging; D-galactose; Cognitive dysfunction; Disease models; Mouse; β -galactosidase

衰老是指机体生理和心理适应能力进行性衰退并趋向死亡的生命过程^[1]。从生物学角度来看,衰老是各种分子和细胞损伤持续累积的结果,导致机体功能衰退、疾病易感性升高及死亡风险增加^[2]。作为多种慢性疾病的核心理因,衰老可引发基因组稳定性丧失、端粒损耗、表观遗传紊乱、蛋白质稳态失衡及自噬功能障碍等改变,进而驱动炎症反应、氧化应激、DNA损伤和线粒体功能障碍等一系列不良后果^[3]。其中,中枢神经系统对衰老尤为敏感,其退行性病变常直接表现为认知功能减退。据世界卫生组织预测,至2050年全球60岁及以上人口将达到21亿^[4]。随着全球人口老龄化进程加速,阿尔茨海默病、帕金森病和路易体痴呆等神经退行性疾病已成为老年人残疾和死亡的主要原因之一^[5]。为探讨衰老机制,啮齿类动物衰老模型成为关键的研究工具,分为自然衰老模型和诱导衰老模型2类^[6]。自然衰老模型虽能真实反映生理性衰老进程^[7],但存在实验周期长和成本高等局限性。通过化学或物理方法诱导小鼠衰老模型可加速衰老进程,明显缩短实验周期^[1]。高剂量D-半乳糖(D-galactose, D-gal)在体内蓄积可诱导氧化应激和炎症级联反应^[8],可较好地模拟自然衰老过程中的核心病理特征。因此,D-gal诱导衰老模型是应用最为广泛的模型之一^[9-11]。尽管D-gal诱导小鼠衰老模型已被广泛应用,但尚未建立其标准化构建体系,存在给药剂量范围宽泛(50~500 mg·kg⁻¹)、干预周期差异较大(4~12周)及评价指标不完善等问题^[12]。因此,本研究通过设置D-gal浓度梯度,旨在确定最佳造模剂量和周期,为深入解析衰老相关机制及抗衰老药物筛选提供了更可靠和标准化的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 SPF级8周龄雄性C57BL/6J小鼠50只,体质量21~23 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK-(辽)2020-0001。动物饲养条件:环境干净,保持通风;规律光照/黑暗(12 h/12 h)交替,温度20℃~24℃,相对湿度65%~75%,定期更换垫料并进行环境消毒;饲料营养、健康,饮用水清洁,小鼠适应性饲养1周后进行实验。

D-gal(美国Sigma-Aldrich公司),蛋白酶抑制剂混合物、磷酸酶抑制剂、放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)完全裂解液和双吡啶卡宾酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白质浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),4×分离胶缓冲液和4×浓缩胶缓冲液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司),三色预染蛋白Marker(上海翌圣生物科技股份有限公司), β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)抗体和p16抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),p53抗体、GAPDH和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG(杭州华安生物技术有限公司)。动物行为学分析系统(VisuTrack,上海欣软信息科技有限公司),超低温冰箱(美国NBS公司),手持电动匀质仪(美国BioSpec公司),组织包埋机和病理切片机[徕卡生物科技(上海)有限公司],成像系统(日本Nikon公司),光学显微镜(日本OLYMPUS公司),实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)分析系统(美国Agilent公司)。

1.2 实验动物分组和模型制备 50只SPF级C57BL/6J小鼠,按体质量随机分为对照组和100、200、400及800 mg·kg⁻¹ D-gal组,每组10只。参考文献[13-15]。各浓度D-gal组小鼠每日皮下注射相应浓度D-gal溶液,给药体积10 mL·kg⁻¹,每日1次,连续8周;对照组小鼠注射等体积生理盐水。每日监测小鼠体质量和饮水量。给药后第4、6和8周分别进行系列行为学实验评估小鼠衰老情况,包括前肢抓力值测试、爬杆运动能力实验、新物体识别实验、Y迷宫实验及Morris水迷宫实验。连续8周监测各组小鼠体质量和饮水量。第8周行为学检测完成后,腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液15 mg·kg⁻¹麻醉小鼠,取小鼠脑组织用于后续实验相关指标检测。

1.3 各组小鼠前肢抓力值测试 抓力计预热并调零。将小鼠轻置于横杆附近,待其自然抓握后,缓慢水平向后牵拉尾部直至前爪脱离横杆,记录显示器峰值,用牛顿(Newton, N)表示。每只小鼠重复测试3次取平均力值,每次间隔 ≥ 30 s(防止动物疲劳)。

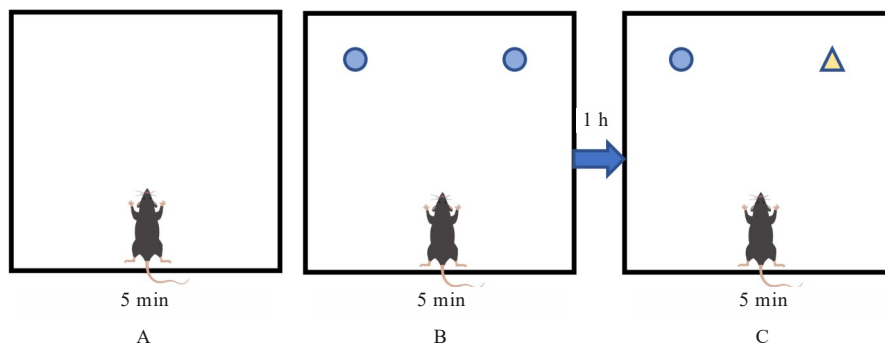
1.4 爬杆运动能力实验检测各组小鼠爬杆时间 正式测试前进行2 d适应性训练。测试装置为直径1 cm、长50 cm的垂直杆(表面缠绕防滑胶布),顶

端固定直径 2.5 cm 橡胶球。测试时将小鼠头朝下置于球顶部, 记录其从球顶爬至杆底所需时间。每只小鼠重复测试 3 次取平均时长, 每次间隔 30 min。

1.5 新物体识别实验检测各组小鼠非空间记忆能力

实验分 3 个阶段进行。第 1 阶段为适应期, 小鼠置于实验装置中自由探索 5 min; 第 2 阶段为熟悉期, 装置对称位置放置 2 个完全相同物体, 小鼠从距物体等距离处放入实验装置内, 自由探索 5 min 后取出小鼠, 间隔 1 h 进行正式测试; 第 3 阶段为测

试期, 将其中一个物体替换为形状、颜色和材质均不同的新物体, 同样保持 2 个物体位置对称。小鼠背向物体并从距物体等距离处放入实验装置内自由探索 5 min。采用 VisuTrack 软件分析小鼠运动总距离、探索新物体时间和探索旧物体时间, 实验结果以识别指数表示。识别指数 = 探索新物体时间 / (探索新物体时间 + 探索旧物体时间) × 100%。每次测试结束后用 75% 乙醇擦拭实验装置以消除气味干扰。见图 1。



A: Diagram showing adaptation period for mice on day 1; B: Familiarization period diagram on day 2; C: Test period diagram on day 2.

图 1 新物体识别实验示意图

Fig. 1 Illustration of novel objection recognition experiment

1.6 Y 迷宫实验检测各组小鼠空间工作记忆能力和探索行为

Y 迷宫由 3 个完全相同的臂组成 (臂长 30 cm、宽 5 cm、高 15 cm), 3 个臂间呈 120° 夹角。测试时将小鼠置于 Y 迷宫中心区域, 记录 8 min 其总入臂次数及自发交替次数, 小鼠在连续 3 次选择中, 进入 3 个不同臂为 1 次自发交替, 计算自发交替率, 以代表小鼠的空间工作记忆能力和探索能力。自发交替率 = [(自发交替次数) / (总入臂次数 - 2)] × 100%^[16]。每次测试结束后用 75% 乙醇擦拭迷宫内部以消除气味残留。

1.7 Morris 水迷宫实验检测各组小鼠空间记忆能力

实验周期为 5 d, 分为定位航行实验 (第 1~4 天) 和空间探索实验 (第 5 天)。设置 4 个象限第 1、2、3 和 4 象限。定位航行实验将平台固定于第 3 象限, 并置于水面下 1 cm 处。小鼠每天训练 4 次, 每次从不同象限入水点放入小鼠, 记录逃避潜伏期。60 s 内未找到平台者, 则引导至平台并停留 15 s, 训练 4 d。空间探索实验 (第 5 天) 撤去平台, 将小鼠从平台对侧象限 (第 1 象限) 入水, 记录其 60 s 内逃避潜伏期及目标象限停留时间, 以代表小鼠的空间记忆能力。

1.8 HE 染色和尼氏染色观察 2 组小鼠脑组织病理形态表现

对照组和 200 mg·kg⁻¹ D-gal 组小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉, 分别用预冷生理盐水和 4% 多聚甲醛经左心室进行灌注固定, 取小鼠全脑置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 随后进行包埋、切片后分别进行 HE 染色和尼氏染色, 光学显微镜下观察 2 组小鼠脑组织 CA1 区、CA3 区、齿状回 (dentate gyrus, DG) 区和皮层 (Cortex) 区形态表现并拍照。

1.9 免疫组织化学法检测 2 组小鼠脑组织中 β-gal 蛋白表达情况

对照组和 200 mg·kg⁻¹ D-gal 组小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉, 分别用预冷生理盐水和 4% 多聚甲醛经左心室进行灌注固定 24 h, 取小鼠全脑置于 4% 多聚甲醛中固定, 随后对衰老标志物 β-gal 进行染色, 光学显微镜下观察 2 组小鼠脑组织 CA1 区、CA3 区和 Cortex 区 β-gal 蛋白表达情况并拍照。

1.10 RT-qPCR 法检测 2 组小鼠海马组织中白细胞介素 (interleukin, IL)-1β、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、IL-18 和 IL-4 mRNA 表达水平 取小鼠海马组织, TRIzol 法提取总 RNA,

测定RNA纯度及浓度后将RNA浓度调整为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 逆转录为cDNA, 按扩增体系进行目的基因扩增, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 、5 s, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 退火15 s, $75\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸10 s, 共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因表达水平。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列
Tab. 1 Primer sequences of PCR

Primer	Sequence(5'-3')
<i>IL-1β</i>	F: TGCCACCTTTTGACAGTGAT R: TGTGCTGCTGCGAGATTTGA
<i>IL-18</i>	F: CAACGATGATGCACTTGCAGA R: TGACTCCAGCTTATCTCTTGGT
<i>TNF-α</i>	F: AGGCACTCCCCAAAAGATG R: CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG
<i>IL-4</i>	F: GGGTTGCCAAGCCTTATCGG R: AGACACCTTGGTCTTGGAGCTTATT
<i>GAPDH</i>	F: GGAGAGTGTTCCTCGTCCC R: ATGAAGGGGTCGTTGATGGC

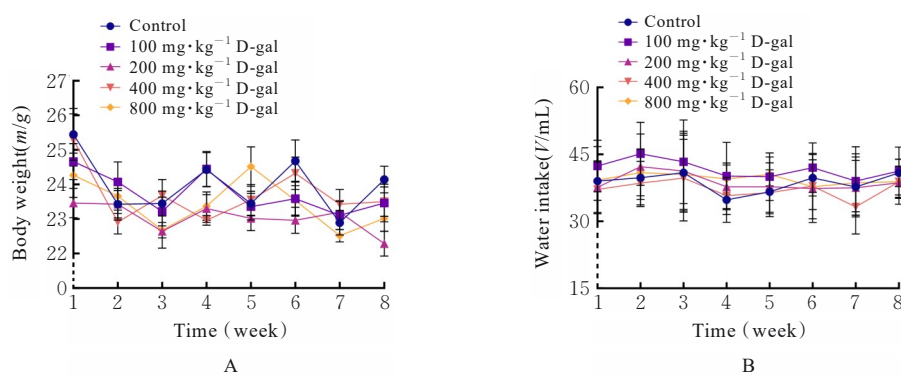
1.11 Western blotting法检测2组小鼠海马组织中 β -gal、p53和p16蛋白表达水平 取小鼠海马组织于含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液中制备组织匀浆, 样品于 $4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000\text{ g}$ 离心5 min, 取上清, 采用BCA蛋白质测定试剂盒测定样品蛋白浓度。在12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel

electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶上电泳分离等量的蛋白质, 将蛋白质转移至PVDF膜上, 并用5%脱脂牛奶密封膜1 h。将PVDF膜于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下一抗孵育过夜, β -gal (1:1 000)、p53 (1:1 000)和p16 (1:500), 用PBST溶液洗涤后, 将PVDF膜与HRP标记的羊抗兔IgG (1:5 000)室温孵育1 h。使用ECL化学发光试剂覆盖PVDF膜, 将其放入凝胶成像系统曝光并采集图像, 采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 以GAPDH为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.12 统计学分析 采用GraphPad Prism 10.1.2软件进行统计学分析。各组小鼠体质量和饮水量, 前肢抓力值、爬杆时间、识别指数、自发交替率和逃避潜伏期及目标象限中停留时间, 海马组织中 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 、 $TNF-\alpha$ 和 $IL-4$ mRNA表达水平及 β -gal、p53和p16蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量和饮水量 对照组与100、200、400和 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal组小鼠比较体质量增长趋势较为一致, 差异无统计学意义($P>0.05$), 饮水量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。



A: Body weight; B: Water intake.

图2 各组小鼠体质量和饮水量

Fig. 2 Body weights and water intakes of mice in various groups

2.2 各组小鼠前肢抓力值和爬杆时间 前肢抓力测试结果显示: 与对照组比较, 第4和6周时, 100、200、400和 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal组小鼠前肢抓力值均无明显变化($P>0.05$), 至第8周时,

200和 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal组小鼠前肢抓力值均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 100和 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal组小鼠前肢抓力值差异均无统计学意义($P>0.05$)。爬杆实验结果显示: 与对照组比较,

第4和6周时, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠爬杆时间无明显变化 ($P>0.05$), 至第8周时, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠爬杆时间明显延长 ($P<0.05$), 100、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠爬杆时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。

表2 各组小鼠前肢抓力值和爬杆时间

Tab. 2 Forelimb grip strengthes and pole-climbing time of mice in various groups

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	Grip strength (F/N)			Pole-climbing time (t/s)		
	(week) 4	6	8	(week) 4	6	8
Control	87.53±6.75	87.42±4.31	86.76±5.14	5.93±1.60	8.36±3.86	7.11±2.73
D-gal						
100 mg·kg ⁻¹	83.54±4.10	85.65±4.62	80.04±5.45	6.12±2.33	8.42±3.74	11.37±2.42
200 mg·kg ⁻¹	85.57±4.53	82.24±3.96	77.84±5.36**	6.96±2.28	10.82±7.76	14.05±4.41*
400 mg·kg ⁻¹	83.62±5.61	89.50±4.97	78.05±6.71*	5.32±1.27	7.30±4.73	10.56±6.15
800 mg·kg ⁻¹	86.33±3.43	85.56±2.98	81.57±5.26	5.41±2.42	8.08±3.22	9.78±8.34

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

2.3 各组小鼠运动总距离和识别指数 新物体识别实验结果显示: 与对照组比较, 第4、6和8周时, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠运动总距离差异无统计学意义 ($P>0.05$), 第4和

6周时, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠识别指数差异无统计学意义 ($P>0.05$), 第8周时, 200和400 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠识别指数均明显降低 ($P<0.01$)。见表3。

表3 各组小鼠新物体识别实验的运动总距离和识别指数

Tab. 3 Total distances and recognition indexes of mice in various groups in novel object recognition experiment

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	Total distance (l/cm)			Recognition index ($\eta/\%$)		
	(week) 4	6	8	(week) 4	6	8
Control	77.42±14.93	71.25±18.91	76.68±35.37	59.65±23.02	48.19±13.11	65.54±9.30
D-gal						
100	83.57±19.89	73.03±20.90	75.96±27.37	54.39±14.74	46.01±13.77	54.06±9.49
200 mg·kg ⁻¹	85.95±23.83	67.40±15.37	75.81±31.01	59.21±16.96	46.64±15.27	43.46±11.37*
400 mg·kg ⁻¹	84.51±16.15	76.07±17.35	75.35±40.42	58.67±16.45	46.76±18.49	44.19±10.36*
800 mg·kg ⁻¹	86.86±12.73	71.79±17.11	77.22±30.89	60.46±7.93	48.90±16.71	57.58±15.47

* $P<0.01$ compared with control group.

2.4 各组小鼠自发交替率 Y迷宫实验结果显示: 与对照组比较, 皮下注射D-gal第4和6周后, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠自发交替率无明显变化 ($P>0.05$), 第8周时, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠自发交替率均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表4。

2.5 各组小鼠逃避潜伏期和目標象限停留时间 定位航行实验结果显示: 与对照组比较, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠逃避潜伏期明显增加 ($P<0.01$)。见图3。空间探索实验显示:

与对照组比较, 100、200、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠目标象限中停留时间缩短, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠逃避潜伏期明显增加 ($P<0.05$), 100、400和800 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠逃避潜伏期增加但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图4和5。

2.6 2组小鼠脑组织病理形态表现 HE和尼氏染色结果显示: 对照组小鼠海马组织CA1区、CA3区、DG区及Cortex区神经元排列紧密整齐、界限清晰、核质明显、形态结构正常, 尼氏染色阳性细胞数量

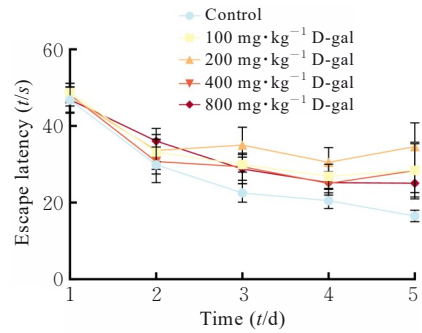
表4 各组小鼠Y迷宫实验的自发交替率

Tab. 4 Spontaneous alternation rates of mice in various groups in Y maze test ($n=10, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Spontaneous alternation rate		
	(week) 4	6	8
Control	63.84±9.81	64.76±4.90	68.78±3.60
D-gal			
100 mg·kg ⁻¹	61.51±7.80	60.35±4.11	60.23±7.25*
200 mg·kg ⁻¹	62.94±4.89	60.63±8.37	55.78±5.14**
400 mg·kg ⁻¹	64.98±9.70	64.74±6.74	60.89±5.25*
800 mg·kg ⁻¹	69.19±7.21	60.12±10.12	58.73±6.06**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

丰富; 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织神经元排列紊乱、核浓染和核固缩明显、

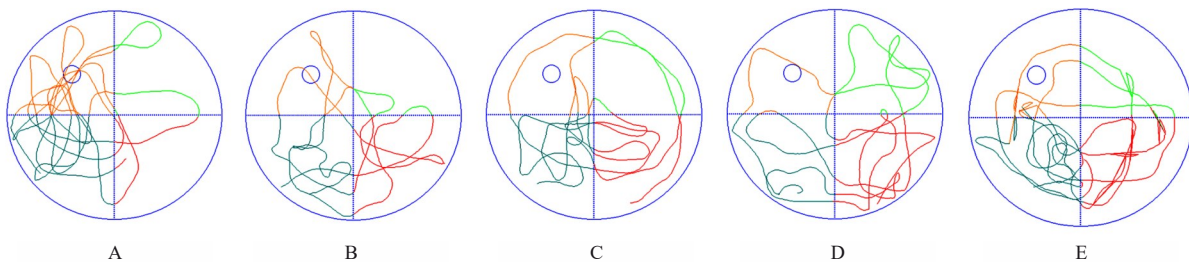


* $P<0.01$ compared with control group.

图3 各组小鼠训练期间逃避潜伏期

Fig. 3 Escape latencies of mice in various groups during training

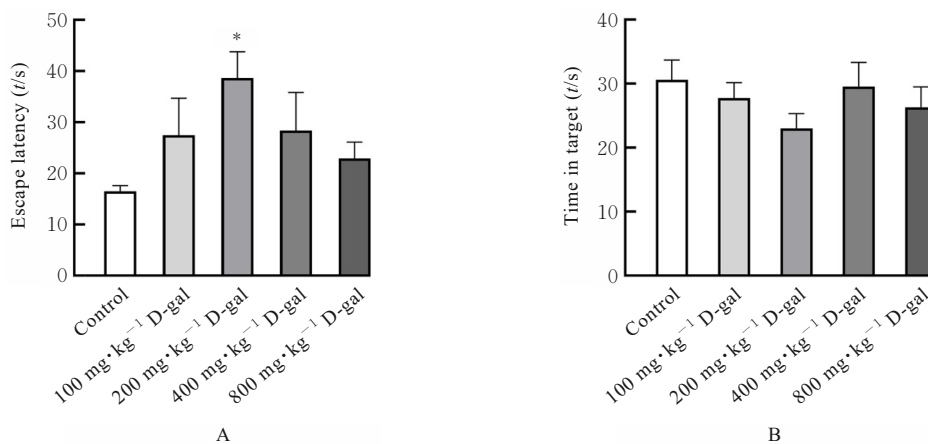
形态结构异常, 尼氏染色阳性细胞数量明显减少。见图6和7。



A: Control group; B: 100 mg·kg⁻¹ D-gal group; C: 200 mg·kg⁻¹ D-gal group; D: 400 mg·kg⁻¹ D-gal group; E: 800 mg·kg⁻¹ D-gal group.

图4 各组小鼠测试期间代表性运动轨迹

Fig. 4 Representative moving paths of mice in various groups during probe trial



A: Escape latency of mice during probe trial; B: Time spent in target quadrant of mice during probe trial. * $P<0.05$ compared with control group.

图5 各组小鼠测试期间逃避潜伏期和目標象限停留时间

Fig. 5 Escape latency and time spent in target quadrant of mice in various groups during probe trial

2.7 2组小鼠脑组织中β-gal蛋白表达情况 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织CA1区、CA3区和Cortex区β-gal蛋白呈强阳性表

达。见图8。

2.8 2组小鼠海马组织中IL-1β、IL-18、TNF-α和IL-4 mRNA表达水平 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹

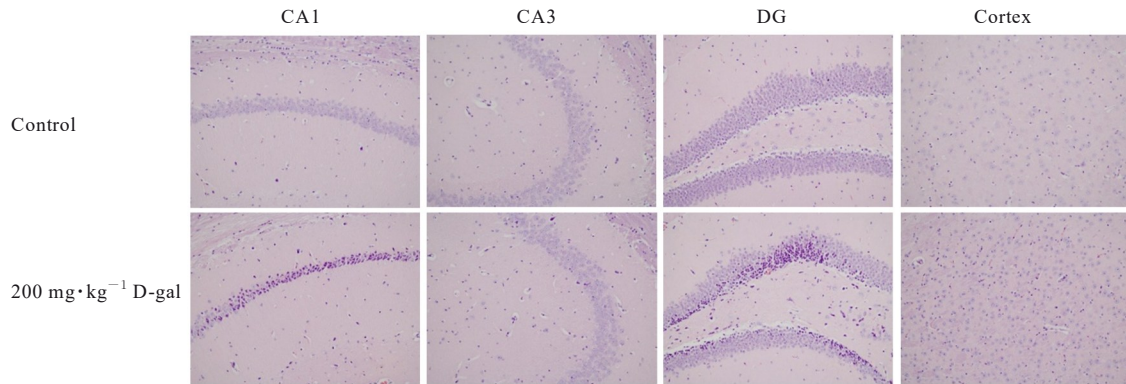


图6 HE染色观察2组小鼠脑组织病理形态表现(×200)

Fig. 6 Pathomorphology of brain tissue of mice in two groups detected by HE staining (×200)

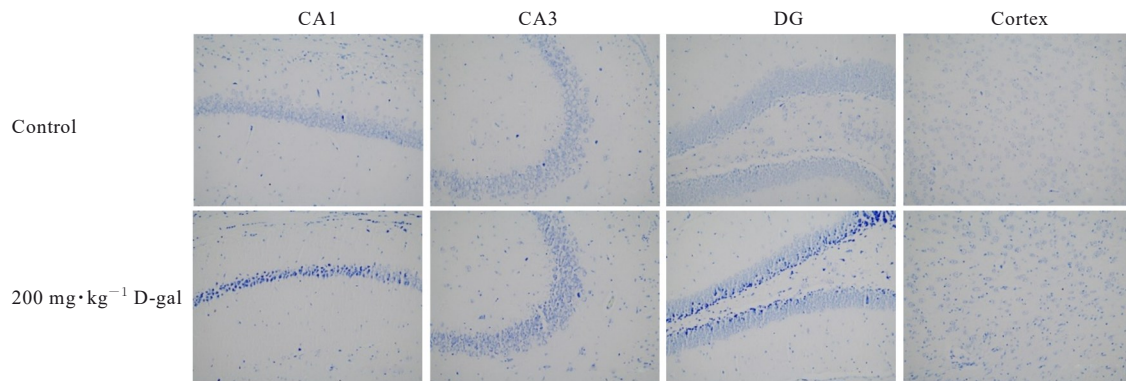


图7 尼氏染色观察2组小鼠脑组织病理形态表现(×200)

Fig. 7 Pathomorphology of brain tissue of mice in two groups detected by Nissl staining (×200)

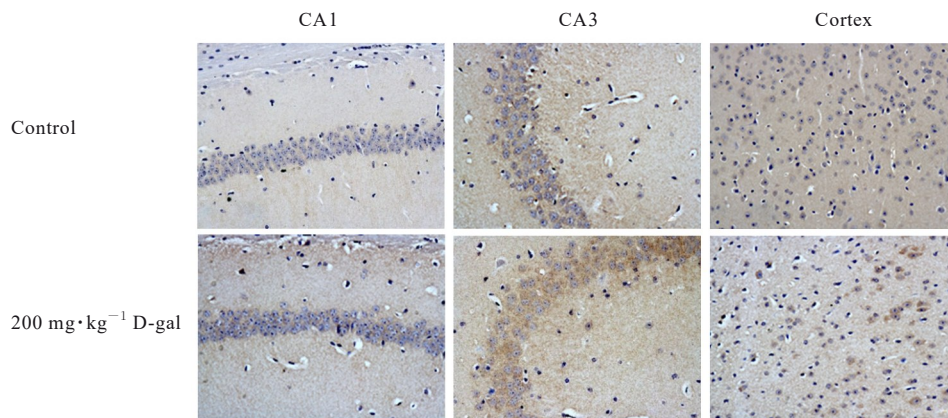


图8 2组小鼠脑组织衰老标志物β-gal蛋白表达情况(免疫组织化学,×400)

Fig. 8 Expression of aging marker of β-gal protein in brain tissue of mice in two groups (Immunohistochemistry, ×400)

D-gal组小鼠海马组织中 *IL-1β*、*IL-18* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *IL-4* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。见表5。

2.9 2组小鼠海马组织中β-gal、p53和p16蛋白表达水平 与对照组比较, 200 mg·kg⁻¹ D-gal组小鼠海马组织中β-gal、p53和p16蛋白表达水平均明显

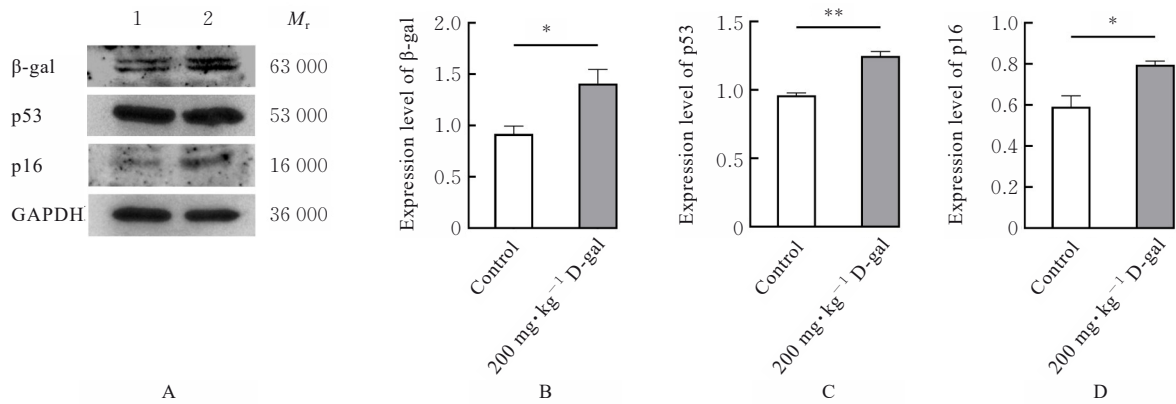
升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图9。

3 讨论

衰老是指机体器官功能随年龄增长而逐渐减退的生理过程。其中, 大脑功能退化作为衰老最为显著的特征之一, 常表现为学习记忆能力下降, 甚至

表5 2组小鼠脑组织中IL-1 β 、IL-18、TNF- α 和IL-4 mRNA表达水平Tab. 5 Expression levels of IL-1 β , IL-18, TNF- α and IL-4 mRNA in brain tissue of mice in two groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	IL-1 β	IL-18	TNF- α	IL-4
Control	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
200 mg \cdot kg $^{-1}$ D-gal	3.20 \pm 0.44**	2.53 \pm 0.46*	2.16 \pm 0.57**	0.60 \pm 0.05**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.Lane 1: Control group; Lane 2: 200 mg \cdot kg $^{-1}$ D-gal group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.图9 2组小鼠海马组织中 β -gal、p53和p16蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)Fig. 9 Electrophoregram (A) and histograms (B~D) of expressions of β -gal, p53, and p16 proteins in hippocampus tissue of mice in two groups

进展为阿尔茨海默病等神经退行性疾病, 给社会及家庭带来沉重负担^[17]。机体氧化应激和炎症水平升高不仅是衰老的核心生物标志物, 更是驱动其进程的关键病理机制^[18]。在中枢神经系统内, 氧化应激和炎症损伤可损害海马组织这一与学习记忆功能密切相关的脑区, 进而诱发认知障碍^[19]。在正常衰老过程中, 认知功能衰退始于成年早期, 并伴随灰质体积减少、蛋白质错误折叠及神经元兴奋性异常等变化^[20]。衰老相关的神经炎症被认为是老年谵妄和阿尔茨海默病的重要病因之一, 其通过持续释放促炎因子(如IL-1 β 和TNF- α)、趋化因子[如趋化因子配体2 (c-cntofliganel 2, CCL2)]及自由基介质, 加速认知功能损伤进程^[21-22]。因此, 抑制海马神经元氧化和炎症反应, 对延缓阿尔茨海默病发生发展及减轻衰老相关的认知衰退具有重要意义^[23-24]。

鉴于自然衰老模型存在周期长、成本高等局限, 建立高效可靠的化学诱导衰老模型至关重要。D-gal是一种具有还原性的小分子醛己糖, 作为D-葡萄糖的同分异构体, 广泛存在于人体内, 也可通过膳食摄取。作为一种重要的生理性营养成分, 在正常生理浓度下, D-gal可被机体有效代谢^[25]。

然而, 当机体长期暴露于高水平D-gal环境时, 可引发一系列病理生理改变: 一方面, 过量的D-gal在醛糖还原酶作用下被还原为半乳糖醇, 由于该代谢产物难以被进一步代谢, 可导致细胞内渗透压失衡, 引起细胞肿胀和代谢紊乱, 进而消耗并破坏机体的抗氧化防御系统^[26]; 另一方面, D-gal在体内半乳糖氧化酶的作用下被氧化生成醛糖和过氧化氢, 后者可转化为活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基^[27], 过量积累的ROS会引发氧化应激反应, 导致线粒体功能障碍^[28]和自噬异常, 并诱发神经炎症和细胞凋亡等病理过程^[29]。因此, D-gal诱导的衰老模型能够较好地模拟自然衰老过程中的核心病理特征, 且与自然衰老模型比较, 该模型实验周期更短, 成本更低。

本研究旨在优化D-gal诱导小鼠衰老相关认知功能障碍模型的制备方法, 通过设置100、200、400和800 mg \cdot kg $^{-1}$ D-gal组^[13-15], 并分别于给药后第4、6和8周分别进行系列行为学实验, 以筛选出适宜的造模剂量和周期。行为学评估涵盖了运动协调能力(前肢抓力值测试和爬杆运动能力实验)、非空间记忆能力(新物体识别实验)及空间学习记忆能力(Y迷宫和Morris水迷宫实验)^[30]。其中,

Y 迷宫实验用于评估小鼠短期记忆能力, Morris 水迷宫实验用于评估小鼠的长期学习记忆能力, 2 种迷宫实验均可用于评价小鼠的空间学习记忆能力。以上检测指标可综合反映小鼠的认知功能状态。本研究结果显示: 连续皮下注射 D-gal 至第 4 和 6 周后, 各浓度 D-gal 组小鼠的行为学指标虽呈部分损伤趋势, 但无统计学差异。至第 8 周时, $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal 组小鼠前肢抓力值明显降低, 爬杆时间明显延长, 表明该浓度和造模时间可明显加剧小鼠运动能力的衰退。与此同时, 该浓度组小鼠在新物体识别实验中探索新物体的时间明显减少, Y 迷宫和 Morris 水迷宫实验结果均显示小鼠的短期及长期空间学习记忆能力出现严重障碍。上述行为学改变提示, 每日小鼠皮下注射 $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal、持续 8 周可成功诱导小鼠出现与衰老相关的认知功能损伤。

此外, 海马组织在空间学习记忆中扮演关键角色^[31]。本研究结果显示: $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal 组小鼠海马组织 CA1 区、CA3 区和 Cortex 区出现了明显的组织病理学损伤。研究^[32-33]表明: β -gal 在衰老细胞中高表达, 其主要与细胞周期调控相关。本研究采用免疫组织化学法检测小鼠海马组织中 β -gal 蛋白表达情况, 结果显示: 小鼠海马组织中 β -gal 蛋白表达明显上调。此外, 衰老细胞常伴随其分泌组的显著变化, 即衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP)。SASP 包括多种促炎细胞因子、趋化因子及基质金属蛋白酶等^[34]。本研究结果显示: 皮下注射 $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal 8 周后, 小鼠海马组织中促炎因子 *IL-1 β* 、*IL-18* 和 *TNF- α* mRNA 表达水平明显升高, 抗炎因子 *IL-4* mRNA 表达水平明显降低, 表明小鼠海马组织发生了炎症反应的激活, 是 SASP 的典型特征。细胞衰老的核心标志物包括 p53 和 p16, 同时 p53 作为经典的抑癌基因, 通过调控 DNA 修复、诱导细胞周期阻滞或凋亡来维持基因组稳定, 其激活会导致细胞周期停滞^[35]; p16 同样能诱导细胞周期停滞^[36], 是细胞衰老的重要标志。本研究结果显示: $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ D-gal 组小鼠海马组织中 p53 和 p16 蛋白表达水平明显升高。相关衰老相关蛋白的表达上调, 进一步佐证了海马组织中细胞衰老的发生。

综上所述, 本研究通过梯度剂量筛选和行为学监测, 明确 D-gal 诱导小鼠衰老相关认知功能障碍

模型的适宜浓度为 $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 持续时间为 8 周。该造模方法操作相对简便, 对动物的系统性损伤较小, 且具有良好的可重复性, 为深入解析衰老相关机制及抗衰老药物筛选提供了关键的实验基础。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

孙菡参与实验设计、实验操作和论文撰写, 孙伟伦、王荟洋、马文丽和徐华丽参与数据采集及分析, 付雯雯参与实验设计和论文审阅。

[参考文献]

- [1] BO-HTAY C, SHWE T, HIGGINS L, et al. Aging induced by D-galactose aggravates cardiac dysfunction via exacerbating mitochondrial dysfunction in obese insulin-resistant rats[J]. *Geroscience*, 2020, 42(1): 233-249.
- [2] 魏孟伶, 贺绘宇, 王 娟, 等. 中老年人生物学衰老与认知功能的关系研究[J]. *现代预防医学*, 2025, 52(2): 342-348.
- [3] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. Hallmarks of aging: an expanding universe [J]. *Cell*, 2023, 186(2): 243-278.
- [4] SUN W W, ZHU J H, QIN G Y, et al. Lonicera Japonica polysaccharides alleviate D-galactose-induced oxidative stress and restore gut microbiota in ICR mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 245: 125517.
- [5] JALBERT J J, DAIELLO L A, LAPANE K L. Dementia of the Alzheimer type [J]. *Epidemiol Rev*, 2008, 30: 15-34.
- [6] 吴 薇. D-半乳糖致小鼠脑衰老早期阶段星形胶质细胞的活化及其作用机制[D]. 南京: 南京医科大学, 2010.
- [7] 赵凡凡, 周玉枝, 高 丽, 等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展[J]. *药学报*, 2017, 52(3): 347-354.
- [8] 马佳丽, 宋莉艳, 李观纬, 等. D-gal 诱导小鼠衰老模型建立的适宜浓度探索与模型评价[J]. *健康之路*, 2016, 15(11): 5.
- [9] AZMAN K F, SAFDAR A, ZAKARIA R. D-galactose-induced liver aging model: Its underlying mechanisms and potential therapeutic interventions [J]. *Exp Gerontol*, 2021, 150: 111372.
- [10] SUN K Y, YANG P Y, ZHAO R, et al. Matrine attenuates D-galactose-induced aging-related behavior in mice via inhibition of cellular senescence and oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7108604.
- [11] KUMAR H, BHARDWAJ K, VALKO M, et al.

- Antioxidative potential of *Lactobacillus* sp. in ameliorating D-galactose-induced aging [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(13): 4831-4843.
- [12] GONZALES M M, GARBARINO V R, POLLET E, et al. Biological aging processes underlying cognitive decline and neurodegenerative disease[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e158453.
- [13] WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation[J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 180-186.
- [14] LI M Q, ZHU M Z, QUAN W, et al. Acteoside palliates d-galactose induced cognitive impairment by regulating intestinal homeostasis[J]. *Food Chem*, 2023, 421: 135978.
- [15] ZHANG J J, HU R Y, CHEN K C, et al. 20(S)-protopanaxatriol inhibited D-galactose-induced brain aging in mice *via* promoting mitochondrial autophagy flow[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(7): 2827-2840.
- [16] HE W, SONG H, YANG Z B, et al. Beneficial effect of GABA-rich fermented milk whey on nervous system and intestinal microenvironment of aging mice induced by D-galactose[J]. *Microbiol Res*, 2024, 278: 127547.
- [17] 仝佳祥, 陈 杨, 李 璇, 等. 枸杞叶改善D-半乳糖致亚急性衰老小鼠学习与记忆能力的效应部位与作用机制研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 26(1): 48-60.
- [18] AN J R, LIU J T, GAO X M, et al. Effects of liraglutide on astrocyte polarization and neuroinflammation in db/db mice: focus on iron overload and oxidative stress[J]. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1136070.
- [19] CHEN Y X, YANG H, WANG D S, et al. Gastrodin relieves cognitive impairment by regulating autophagy *via* PI3K/AKT signaling pathway in vascular dementia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 671: 246-254.
- [20] 吴志悦, 薛晓帆, 曾景蓉, 等. 端粒-端粒酶在神经退行性疾病中的研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2024, 41(2): 169-174.
- [21] SIMONE M J, TAN Z S. The role of inflammation in the pathogenesis of delirium and dementia in older adults: a review[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2011, 17(5): 506-513.
- [22] CHU Z X, HAN S, LUO Y, et al. Targeting gut-brain axis by dietary flavonoids ameliorate aging-related cognition decline: Evidences and mechanisms [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(28): 10281-10302.
- [23] JESSEN F, AMARIGLIO R E, BUCKLEY R F, et al. The characterisation of subjective cognitive decline[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(3): 271-278.
- [24] LIU H, SHEN L K, SUN Z Z, et al. Downregulated phosphoglycerate kinase 1 attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by reversing neuroinflammation and oxidative stress through the nuclear factor erythroid 2 related factor 2/ARE pathway[J]. *Neuroscience*, 2023, 524: 94-107.
- [25] 叶 蕾, 舒 姝, 徐 运, 等. 衰老中小胶质细胞对认知功能减退调控的研究进展[J]. *临床神经病学杂志*, 2024, 37(1): 65-68.
- [26] YAO Y Q, LUO Y S, LIANG X M, et al. The role of oxidative stress-mediated fibro-adipogenic progenitor senescence in skeletal muscle regeneration and repair[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 104.
- [27] IMAI S I, GUARENTE L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(8): 464-471.
- [28] 邢秋娟, 施 杞, 王拥军. D-半乳糖诱导衰老动物模型的机制及其在中医药方面的应用[J]. *上海中医药大学学报*, 2010, 24(3): 93-98.
- [29] OPRESKO P L, SANFORD S L, DE ROSA M. Oxidative stress and DNA damage at telomeres[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2025, 17(6): a041707.
- [30] BARUCH K, DECZKOWSKA A, DAVID E, et al. Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function [J]. *Science*, 2014, 346(6205): 89-93.
- [31] STERN Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(11): 1006-1012.
- [32] UYAR B, PALMER D, KOWALD A, et al. Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101156.
- [33] KROEMER G, MAIER A B, CUERVO A M, et al. From geroscience to precision geromedicine: Understanding and managing aging[J]. *Cell*, 2025, 188(8): 2043-2062.
- [34] MAUS M, LÓPEZ-POLO V, MATEO L, et al. Iron accumulation drives fibrosis, senescence and the senescence-associated secretory phenotype [J]. *Nat Metab*, 2023, 5(12): 2111-2130.
- [35] VADDAVALLI P L, SCHUMACHER B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging[J]. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 598-612.
- [36] GROSSE L, WAGNER N, EMELYANOV A, et al. Defined p16(high) senescent cell types are indispensable for mouse healthspan[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 87-99.