

贾雨欣,邓晓红,孙磊峰,等. 基于非稳态负荷评估雄性SD大鼠衰老进展及左归丸的干预作用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(6): 753-761.

JIA Y X, DENG X H, SUN L F, et al. Using allostatic load as a tool for evaluating aging of male SD rats and the intervention effects of Zuogui Pill [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 753-761.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.06.008

基于非稳态负荷评估雄性SD大鼠衰老进展 及左归丸的干预作用

贾雨欣¹, 邓晓红¹, 孙磊峰¹, 陈丹丹¹, 孙贤俊¹, 段晓红¹, 严诗楷^{2*}, 黄建华^{1*}

(1. 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海 200040; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

【摘要】 **目的** 采用非稳态负荷(allostatic load, AL)的理论与方法评估衰老以及左归丸对自然衰老雄性SD大鼠模型的影响。**方法** 自然衰老雄性SD大鼠,分别在2、5、8、14、18、21月龄剪尾取血,其中18月龄时随机分为老年对照组、左归丸低剂量组和左归丸高剂量组。左归丸干预3个月后,取用血样以及肌肉、肝等组织样本。血样用流式细胞术检测T淋巴细胞数量和凋亡率,并检测血清生化指标,包括低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)、25羟维生素D(25 hydroxyvitamin D, 25-OH-D)、皮质酮(corticosterone, CORT)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)。将LDL-c、TC、HDL-c、FFA、TG、CORT、IL-6、CRP、25-OH-D、CD3⁺T淋巴细胞计数、CD3⁺T淋巴细胞凋亡率共11项指标用于AL评分。**结果** 大鼠血清LDL-c、TG、TC、25-OH-D、CRP、IL-6随增龄发生显著改变,但变化模式有所不同。CD3⁺T淋巴细胞计数随增龄显著降低($P < 0.01$),CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞凋亡率随增龄显著升高($P < 0.01$)。左归丸干预后,老年大鼠血清CORT水平显著提高($P < 0.01$)、CD8⁺T淋巴细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)。AL评分自5月龄开始升高,至18月龄到达峰值。**结论** 与单一指标比较,AL能更好地表征衰老过程。左归丸可以提高衰老大鼠的应激反应能力,延缓其免疫衰老。

【关键词】 非稳态负荷;衰老;左归丸;免疫衰老

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)06-0753-09

Using allostatic load as a tool for evaluating aging of male SD rats and the intervention effects of Zuogui Pill

JIA Yuxin¹, DENG Xiaohong¹, SUN Leifeng¹, CHEN Dandan¹, SUN Xianjun¹,
DUAN Xiaohong¹, YAN Shikai^{2*}, HUANG Jianhua^{1*}

(1. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Corresponding author: YAN Shikai. E-mail: shkyan@sjtu.edu.cn; HUANG Jianhua. E-mail: hjhzyj@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** Using the concept of allostatic load (AL) to evaluate aging of male SD rats and the effectiveness of Zuogui Pill in naturally aging rats. **Methods** Naturally aging male SD rats were tested at the ages of 2, 5, 8, 14, 18, and 21 months. They were divided into an elderly control group, low-dose Zuogui Pill group, and high-dose

【基金项目】 上海市扬帆计划(21YF1404000)。

Funded by Shanghai Sailing Program(21YF1404000)。

【作者简介】 贾雨欣,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合临床。Email:22211220074@m.fudan.edu.cn

【通信作者】 严诗楷,男,副教授,博士,研究方向:天然药物化学。Email:shkyan@sjtu.edu.cn;

黄建华,男,副研究员,博士,研究方向:中医证候基础研究。Email:hjhzyj@aliyun.com。

* 共同通信作者

Zuogui Pill group. Intervention with Zuogui Pill was trialed for 3 months. Blood samples were taken from the tails of rats each month, and the number of T lymphocytes and rate of apoptosis were measured by flow cytometry. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), free fatty acids (FFA), 25 hydroxyvitamin D (25-OH-D), corticosterone (CORT), C-reactive protein (CRP), and interleukin-6 (IL-6) were detected in rat sera. By identifying the collinearity between indicators and professional considerations, LDL-c, TC, HDL-c, FFA, TG, CORT, IL-6, CRP, 25-OH-D, CD3⁺ T cell count, and CD3⁺ T cell apoptosis rate were included in the AL scoring. The threshold for each indicator was established with data from 5-month-old rats, and the score was 1 point below or/and above the threshold. **Results** The serum levels of LDL-c, TG, TC, 25-OH-D, CRP, and IL-6 of rats showed significant changes with age, although the patterns of change differed. The CD3⁺ T lymphocyte count significantly decreased with age ($P < 0.01$), while the apoptosis rates of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes significantly increased with age ($P < 0.01$). Zuogui Pill significantly increased serum CORT levels in elderly rats ($P < 0.01$) and reduced the apoptosis rate of CD8⁺ T lymphocytes ($P < 0.05$). The AL score began to increase in rats at 5 months of age and reached its peak in those of 18 months of age. **Conclusions** AL can better characterize the aging process compared to a single indicator. Zuogui Pill can improve the stress response ability of aging rats and alleviate immunosenescence.

[Keywords] allostatic load; aging; Zuogui Pill; immunosenescence

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

衰老已被证明是人类大多数慢性疾病,如心血管疾病、癌症和神经变性等疾病的重要危险因素^[1]。迄今,已经提出了多种学说用于解释衰老的形成机制,如干细胞衰老、端粒缩短、炎症衰老、自由基损伤、免疫衰老等^[2-3]。但衰老的确切机制仍未明确,并且针对衰老尚无特异性的生物学表征,缺乏统一的评价标准和方法。

非稳态负荷(allostatic load, AL)是近年提出的用于解释某些健康问题的新理论架构。内外环境变化会触发机体启动多系统调节活动,传统生理学自稳态(homeostasis)概念强调内环境的动态平衡,暗含这些调节活动有一个确定的能够返回的(“home”)设定点和平衡点,维持稳态即目的,而非稳态理论认为机体的生理调节是为了应对变化,增加存活的机会,但反复以及不能有效地及时开启或关闭调节,会给机体带来多系统的、累积性的损伤,这些损伤是机体适应性调节过程中所付出的“成本”^[4]。非稳态理论目前已经发展了一种称为非稳态负荷评分的方法以定量描述该类损伤^[5]。20世纪90年代启动的一项临床研究首次使用了AL评分来评估健康老年人的死亡风险^[6-7],选用9种涵盖各系统的指标,这些指标均处于正常范围,依据是否位于该指标分布的上或下25%分位,给予“0”或“1”的评分,最后形成一个综合评分,结果发现具有高AL评分的老人,7年后全因死亡风险升高。2014年一项研究显示,AL评分每上升一个百分点,10年后全因死亡率升高20%,并且评分升高越快,

死亡率越高,进一步确认了如此构建的复合指数即AL评分是衰老相关死亡风险的重要预测因子^[8]。迄今,AL评分作为重要的健康评估工具,在衰老、精神分裂症、心血管疾病、焦虑、抑郁、痴呆、癌症等领域引起了广泛关注^[9]。

中医学理论认为,衰老与精气盛衰关系紧密。《素问·上古天真论》中提及,出生后男子、女子的精气逐渐充实,到男子四八、女子四七的年龄时,精气最为旺盛,之后逐渐衰减。左归丸是明代著名医家张景岳创制的补肾填精、滋养真阴经典方剂,以大补精血为特长。现代研究已表明,左归丸可以提高自然衰老大鼠的学习记忆能力^[10],在临床应用中还能延缓卵巢功能的衰退^[11]等。衰老和AL具有显著的相似性,均涉及多系统损伤、均在时间中逐渐积累,但尚未见到增龄和AL关系的相关研究报告^[12]。因此,本文拟采用大鼠年龄序列(2、5、8、14、18、21月龄),研究增龄和AL评分的关系;对老年大鼠采用左归丸干预,并基于AL评价左归丸是否具有延缓衰老作用,从整体出发,寻找左归丸延缓衰老的客观证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40只2月龄SPF级SD雄性大鼠,体重 200 ± 20 g,购于浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2019-0001】。环境温度 $22 \sim 24$ ℃,湿

度 $55\% \pm 10\%$, 12 h 昼夜节律, 自由饮水和摄食(标准饲料), 适应性喂养 15 d 后进行实验, 饲养于复旦大学附属浦东医院实验动物中心【SYXK(沪)2020-0005】。本实验通过复旦大学实验动物科学部实验伦理审核(202310020Z)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大鼠皮质酮(corticosterone, CORT) ELISA 试剂盒(LDN), 总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-c)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)测定试剂(南京建成生物工程研究所), 大鼠 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP) ELISA 试剂盒(联科生物), 25-羟维生素 D(25-hydroxyvitamin D, 25-OH-D)试剂盒(IDS), Rat CD3 APC 1F4, Rat CD4 BB700 OX-35R, Rat CD8A Horizon V450 OX-8, Apop Dtec Kit 1 (BD), 羧甲基纤维素钠(1000 ~ 1400 mpa, Aladdin), 左归丸(上海雷允上封浜制药有限公司)。

冷冻离心机(Eppendorf, 德国), 酶标仪(Eppendorf, 德国), 流式细胞仪(赛默飞, 美国), 洁净工作台(上海博讯实业医疗设备厂, 中国), 超低温冰箱(Heto Ultra Freeze, 丹麦)。

1.2 方法

1.2.1 分组与干预

自然衰老 SD 雄性大鼠, 分别在 2、5、8、14、18、21 月龄剪尾取血, 剪尾前将鼠尾置于 40 °C 水中 2 ~ 3 min 使血管扩张, 将鼠尾末端剪断 1 ~ 2 mm, 取血时使鼠尾处于最低位, 尽量避免挤压按摩以防发生溶血, 取血结束后在切口处涂抹 6% 火棉胶涂敷止血^[13]。肝素钠抗凝管取 300 μ L 全血用于流式细胞术检测 T 淋巴细胞数量、分类及凋亡, 另取全血 1 mL, 分离血清, 储存于 -80 °C 备用。大鼠于 18 月龄时随机分为老年对照组、左归丸低剂量组、左归丸高剂量组。给药剂量根据标准成人体重(70 kg)与大鼠表面积折算等效比率(0.018)换算, 大鼠左归丸干预低剂量为 2.43 g/kg, 高剂量为低剂量的 3 倍, 即 7.29 g/kg。左归丸干预组每天灌胃含药 0.5% 去甲基纤维素钠溶液 2 mL, 老年对照组给予 0.5% 去甲基纤维素钠溶液 2 mL, 持续给药 3 个月。

1.2.2 T 淋巴细胞数量及凋亡检测

取大鼠全血样本 100 μ L 至肝素钠抗凝管中, 加入鼠 CD3、CD4、CD8 抗体 2.5 μ L, 室温下避光 15

min 加入红细胞裂解液, 室温下避光 15 min。将管中液体转移至相应的 2 mL Ep 管中, 1477 r/min \times 5 min 离心, 弃去上清, 每管加入 PBS 1 ~ 2 mL, 移液枪轻轻吹打后转移至新的 2 mL Ep 管中, 1809 r/min \times 5 min 离心, 弃去上清。每管加入 100 μ L Binding buffer 重悬细胞, 再加入 Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L, 室温下避光 15 min。将所有 Ep 管置于冰上避光保存, 立即用流式细胞仪检测。用 FlowJo v10.8.1 软件处理相关数据。

1.2.3 血清生化指标检测

血清 TC、TG、LDL-c、HDL-c、FFA、25-OH-D、CORT、CRP、IL-6 水平检测按说明书操作, 使用酶标仪在相应波长进行检测。

1.2.4 AL 相关指标选择及评分规则

本研究共检测 15 个生化指标用于评估衰老, 通过计算各指标的方差膨胀因子(VIF)识别指标间共线性问题, 纳入 VIF < 10 的指标进行 AL 评分, 包括: LDL-c、TC、HDL-c、FFA、TG、CORT、IL-6、CRP、25-OH-D、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率。以 5 月龄大鼠数据分布为基线建立各项指标界值, LDL-c、TC、FFA、TG、IL-6 水平高于该指标分布 90% 分位数, 记 1 分; HDL-c、25-OH-D 水平低于该指标分布 10% 分位数, 记 1 分; CORT 水平高于该指标分布 90% 分位数, 或低于该指标分布 10% 分位数, 均记 1 分; CD3⁺ T 淋巴细胞计数低于 30%, CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率高于 30%, 记 1 分。

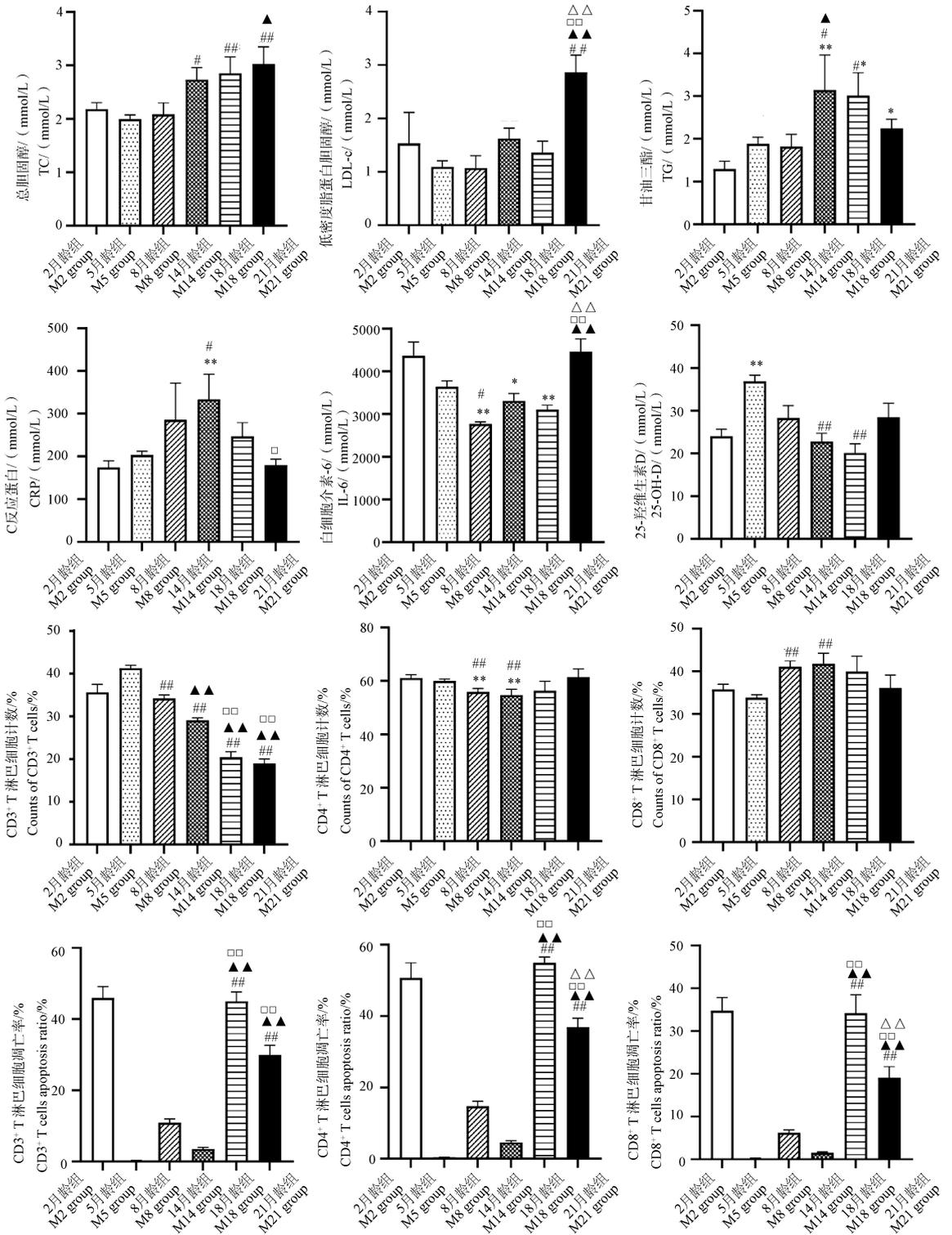
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.4.1 进行数据处理和图像绘制, 数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析; 两两组间比较, 正态分布数据采用独立样本 *t* 检验, 非正态分布数据采用 *F* 检验。 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 衰老过程中各生化指标呈现不同的变化趋势

如图 1 所示, 15 个检测指标中, 脂代谢指标(血清 LDL-c、TG、TC、25-OH-D)、炎症指标(血清 CRP、IL-6)、免疫指标(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量及凋亡率)共 12 项有统计学意义。与 5 月龄组相比, 14、18、21 月龄组大鼠血清 TC 水平显著升高(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 其中 21 月龄组又显著高于 8 月龄组(*P* < 0.05); 与 5、8、14、18 月龄组相比, 21 月龄组大鼠血清 LDL-c 水平显著升高(*P* < 0.01);



注:与 2 月龄组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5 月龄组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 8 月龄组相比, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$; 与 14 月龄组相比, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$; 与 18 月龄组相比, △ $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 各月龄大鼠衰老相关生化指标比较

Note. Compared with the M2 group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the M5 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the M8 group, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$. Compared with the M14 group, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$. Compared with the M18 group, △ $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Changes of biomarkers with increasing age in rats

与 2、5、8 月龄组相比, 14、18、21 月龄组大鼠血清 TG 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 2、5 月龄组相比, 14 月龄组大鼠血清 CRP 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与 14 月龄组相比, 21 月龄组大鼠血清 CRP 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 2、21 月龄组相比, 8、14、18 月龄组大鼠血清 IL-6 水平显著降低, 其中 8 月龄组又显著低于 5 月龄组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 2 月龄组相比, 6 月龄组大鼠血清 25-OH-D 水平显著升高, 与 5 月龄组相比, 14、18 月龄组大鼠血清 25-OH-D 水平显著降低 ($P < 0.01$); 各组大鼠 CD3⁺ T 淋巴细胞计数水平随月龄增加显著降低 ($P < 0.01$); 与 2、5 月龄组相比, 8、14 月龄组大鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞计数水平显著降低; 与 5 月龄组相比, 8、14 月龄组大鼠 CD8⁺ T 淋巴细胞计数水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 5、8、14 月龄组相比, 18、21 月龄组大鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡水平均显著升高, 其中 21 月龄组大鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡水平显著低于 18 月龄组 ($P < 0.01$)。

为了更清晰地显示各指标和年龄的关系, 将 6 个月龄分组进行整合, 2、5 月龄为青年组, 8、14 月龄为中年组, 18、21 月龄为老年组, 其中 T 淋巴细胞凋亡相关的 3 个指标以 5 月龄单独为青年组。如图 2 所示, 大鼠血清 TC、LDL-c、TG 水平及 T 淋巴细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 血清 25-OH-D 水平、CD3⁺ T 淋巴细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)。与青年组相比, 中年组 CD4⁺ T 淋巴细胞数量显著降低 ($P < 0.01$), 而 CD8⁺ T 淋巴细胞数量显著升高 ($P < 0.01$)。血清 CRP 水平随月龄呈现先升高再下降的趋势 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而血清 IL-6 水平呈现先下降再升高趋势 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.2 免疫、代谢与衰老过程显著相关

将原有 15 个指标中 VIF < 10 的指标作为自变量, 月龄为应变量, 拟合多元回归方程, 包括 LDL-c、HDL-c、TC、TG、FFA、25-OH-D、CORT、IL-6、CRP、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率, 见表 1。多元回归分析结果显示 LDL-c、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率的回归系数分别为 $P < 0.1$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ 。回归方程能解释 83.84% 的年龄变异。多元逐步回归分析显示仅纳入 LDL-c、CD3⁺ T 淋巴细胞计数、CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率即可解释 85.65% 的年龄变异。以上结果均显示免疫和代谢在衰老过程中变化明显。

表 1 各指标多元回归分析结果

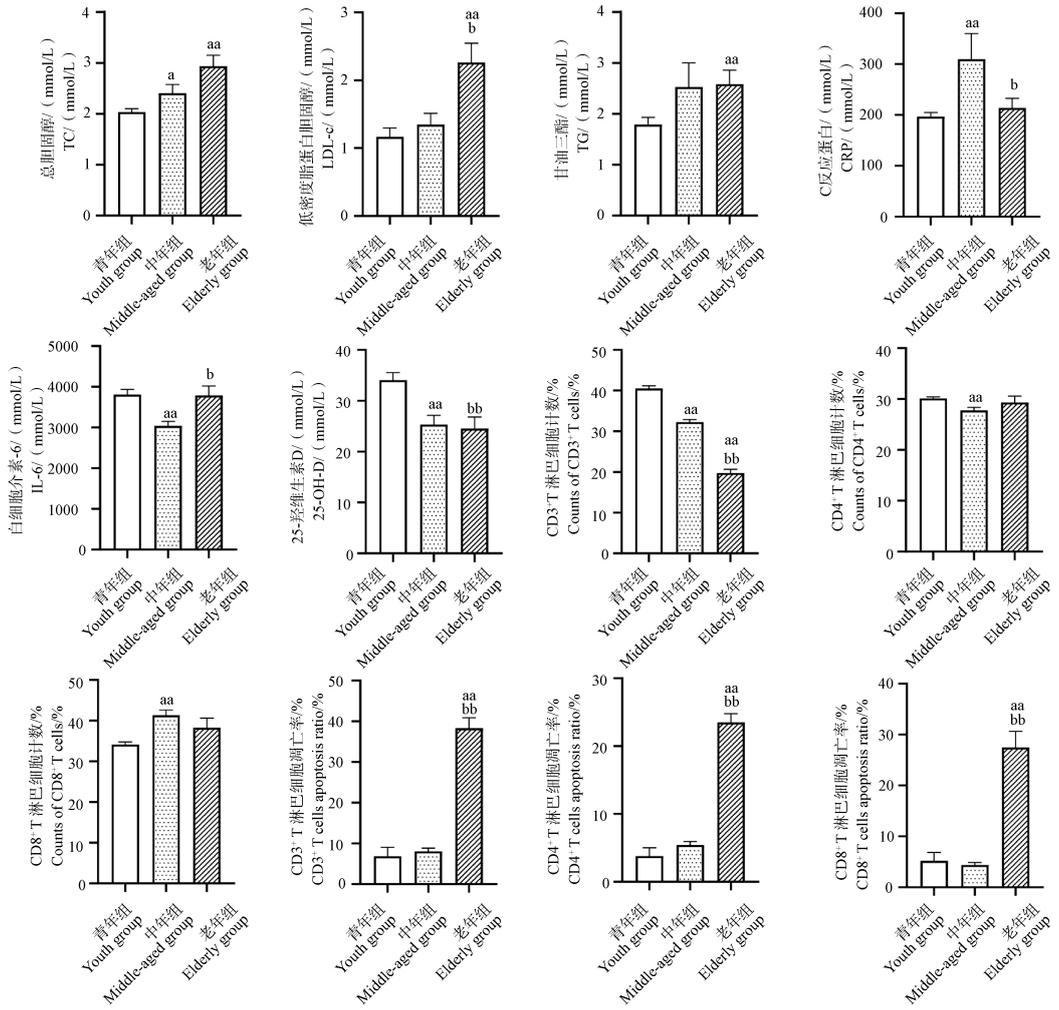
指标 Index	回归系数 Regression coefficient	P	方差膨胀 因子 VIF
截距 Intercept	38.811 136	1.59e-06	-
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-c	1.080 786	0.099 58	1.904 128
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-c	-0.933 752	0.328 03	2.800 977
总胆固醇 TC	0.726 710	0.546 87	4.109 963
甘油三酯 TG	-0.537 296	0.256 28	2.118 260
游离脂肪酸 FFA	2.684 240	0.302 88	1.495 319
25-羟维生素 D 25-OH-D	-0.054 647	0.496 74	2.123 081
皮质醇 CORT	0.002 662	0.946 90	1.502 549
白细胞介素-6 IL-6	-0.000 917	0.249 59	1.685 866
C 反应蛋白 CRP	0.001 407	0.779 89	1.278 384
CD3 ⁺ T 淋巴细胞计数 CD3 ⁺ T cells count	-0.711 768	1.03e-09	2.986 600
CD3 ⁺ T 淋巴细胞凋亡率 CD3 ⁺ T cells apoptosis ratio	-0.099 552	0.004 93	2.302 482

2.3 左归丸可提高大鼠血清 CORT 水平, 降低 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡率

与 21 月龄组相比, 高剂量组大鼠血清 CORT 水平显著升高 ($P < 0.01$)。将 2 月龄组、5 月龄组合并为青年组, 将 8 月龄组、14 月龄组合并为中年组, 将 18 月龄组、21 月龄组合并为老年组, 同时将高、低剂量组合并为左归丸组。与老年组相比, 左归丸组大鼠血清 CORT 水平显著提高 ($P < 0.01$)、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 具体见图 3。

2.4 AL 评分可有效评估衰老过程

5 月龄大鼠纳入 AL 评分各指标界值见表 2, 考虑到 T 淋巴细胞计数和凋亡数据方差较大, 指定 CD3⁺ T 淋巴细胞计数低于 30%, CD3⁺ T 淋巴细胞凋亡率高于 30%, 记 1 分。如图 4 所示, 与 5 月龄组、8 月龄组、14 月龄组相比, 18 月龄组、21 月龄组大鼠 AL 评分均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 整合后, 与青年、中年组相比, 老年组大鼠 AL 评分也显著升高 ($P < 0.01$)。左归丸干预后, 与 21 月龄组比较, 低剂量组大鼠 AL 评分降低, 高剂量组大鼠 AL 评分升高, 但均没有统计学意义。对不同月龄组

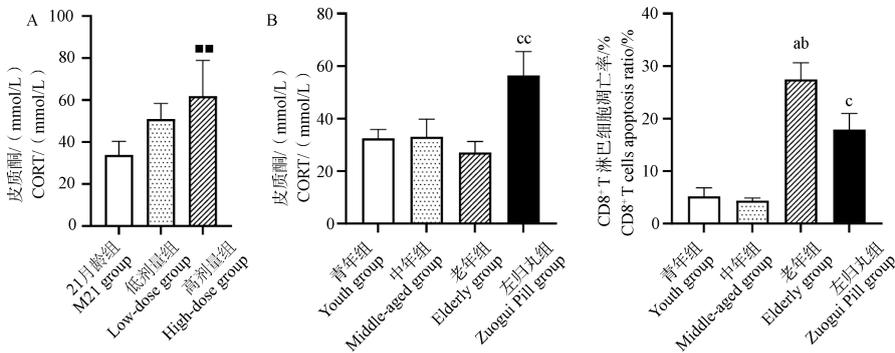


注:与青年组相比, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$;与中年组相比, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 2 青、中、老年大鼠各生化指标的变化

Note. Compared with youth group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with middle-aged group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes of biomarkers in young, middle-aged, and elderly rats



注:A:不同剂量左归丸干预对相关指标的影响;B:整合后左归丸干预对相关指标的影响;与老年组相比, ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 左归丸干预对相关指标的影响

Note. A. Influence of different doses of Zuogui Pills on related indexes. B. Effects of Zuogui Pill intervention in integrated group on related indexes. Compared with elderly group, ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effects of Zuogui Pill intervention on related indexes

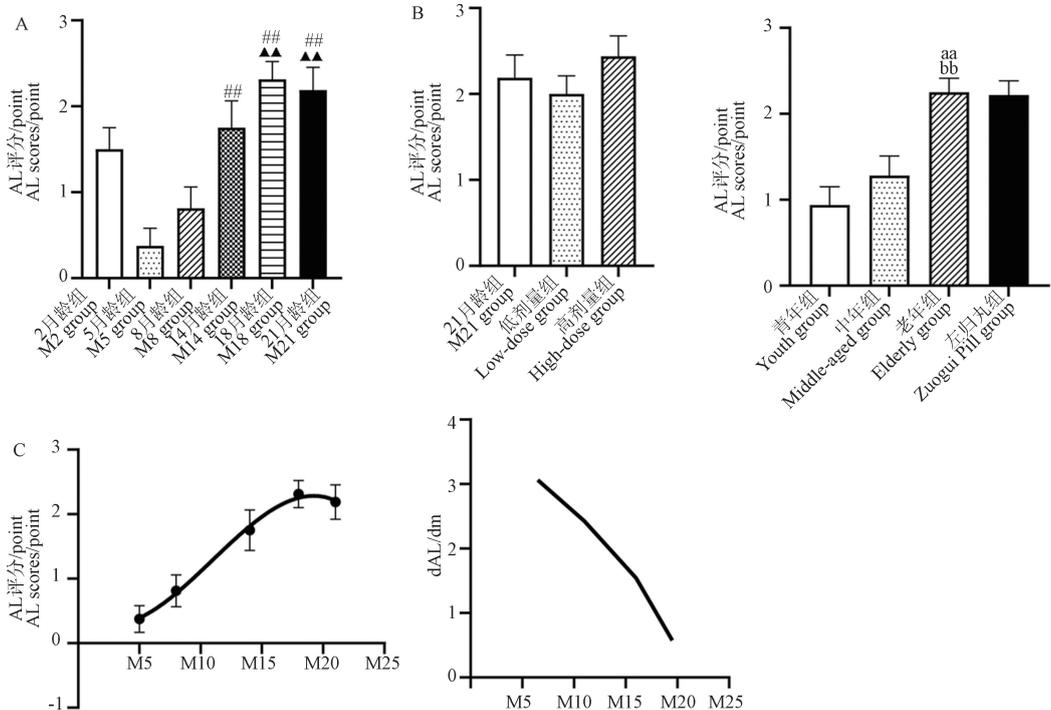
AL 评分、月龄进行函数拟合,发现可用 3 次多项式拟合两者之间的关系,对 AL 评分/月龄求导,发现

自 5 月龄后导数均下降,提示 AL 评分在 5 月龄升高得最快,该结果提示大鼠衰老可能在青中年时期

表 2 5 月龄大鼠各指标 AL 评分界值

Table 2 Cut point for AL scores of various indicators in 5-month-old rats

指标 Index	最小值 Minimum value	最大值 Maximum value	中位数 Median	第 10 分位数 10th percentiles	第 90 分位数 90th percentiles
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-c	0.44	3.89	1.41	0.62	1.63
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-c	1.34	4.52	2.92	1.85	3.60
总胆固醇 TC	1.25	4.15	2.34	1.48	2.44
甘油三酯 TG	0.80	7.91	1.94	1.02	2.79
游离脂肪酸 FFA	0.33	1.32	0.62	0.42	1.02
25-羟维生素 D 25-OH-D	12.71	45.02	27.50	27.36	45.20
皮质醇 CORT	3.51	123.55	25.56	7.93	59.13
白细胞介素-6 IL-6	2601.33	6469.67	3366.33	3028.67	4231.67
C-反应蛋白 CRP	104.10	623.10	206.60	153.59	248.31
CD3 ⁺ T 淋巴细胞计数 CD3 ⁺ T cells count	9.68	47.60	30.10	35.03	46.52
CD3 ⁺ T 淋巴细胞凋亡率 CD3 ⁺ T cells apoptosis ratio	0.09	57.50	12.65	0.06	12.65



注: A: 各组 AL 评分比较; B: 左归丸干预对 AL 评分的影响; C: 大鼠 AL 评分与月龄函数拟合结果。

Figure 4 各组 AL 评分比较及 AL 评分变化分析

Note. A. Comparison of AL scores in each group. B. Effect of Zuogui Pill intervention on AL score. C. Function fitting results of AL scores.

Figure 4 Comparison of AL score and analysis of AL score change in each group

即开始,提前药物干预,延缓衰老效果可能更佳。本研究中,左归丸作用后,低剂量组 AL 评分有降低趋势,但与 21 月龄组或老年组比较,均无统计学意义,结合上述发现,左归丸在 5 ~ 8 月龄干预,可能延缓衰老作用更佳。

3 讨论

研究表明脂代谢在衰老过程中有显著改变^[14-15]。雌性和雄性衰老大鼠血清 TG 水平均显著升高, TG 清除率显著降低^[16]。本研究中大鼠血清 TG、LDL-c、TC、25-OH-D 水平随增龄均发生显著变化。血清 FFA 水平未见到显著增龄性改变,但左归丸干预后,低剂量组大鼠血清 FFA 水平显著降低。

在健康衰老人群和衰老大鼠的研究发现,血清 CRP 水平平均年龄依赖性增长^[17-18]。本研究大鼠血清 CRP 水平在中年达到高峰,之后下降。大鼠血清 IL-6 水平在青年时期较高,中年降低,而老年升高,其原因需进一步研究。左归丸干预对炎症因子没有显著影响。

糖皮质激素是 AL 的主要介导体之一^[4]。研究报告,老年人傍晚和晨间皮质醇浓度升高,晨间皮质醇浓度峰值提前、日内皮质醇振幅降低、皮质醇分泌模式不规则^[19-20]。与年轻小鼠相比,中年小鼠皮质酮水平升高,老年则不明显^[21]。本研究未发现大鼠血清皮质酮水平的增龄性变化。但左归丸干预后,与老年组比较皮质酮水平显著升高,与沈自尹等^[22]的报道相一致。但本研究通过剪尾取血,皮质酮水平的升高可能由于取血过程导致大鼠产生应激反应,该结果提示,左归丸能提高衰老大鼠面对损伤的应激反应能力。

免疫衰老是目前衰老机制的研究热点,免疫功能受损与衰老可能相互促进。胸腺退化是免疫衰老的特征之一,研究发现,衰老时先天免疫细胞处于持续激活状态^[23]。衰老适应性免疫系统的主要变化发生在 T 细胞亚群,随着胸腺逐渐退化,幼稚 T 细胞减少,导致 T 细胞多样性受损,此外衰老人群的记忆 T 细胞免疫应答能力严重下调,不能产生和维持保护性免疫应答反应^[24]。衰老人群的研究发现,CD3⁺ T 淋巴细胞数量随着年龄的增长而减少^[25],与本研究相一致。本研究还观察了 T 淋巴细胞凋亡,老年大鼠(18、21 月龄)CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡比例均显著高于青年(5 月龄)与中年(8、14 月龄)大鼠。多元回归分析显示,免疫指标与

衰老之间关系密切。郑振等^[26]就在临床中发现补肾中药能显著地降低老年人 T 淋巴细胞凋亡的升高,本研究也发现左归丸对老年大鼠过度的 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡有降低作用。免疫衰老可能是中药干预衰老及老年相关疾病的重要切入点。

关于 AL 损伤机体的具体机制,McEwen 提出了“三阶段、四类型”和“能量模型”的学说,即神经内分泌和自主神经系统失调,分泌的物质为“primary mediators”。这些中介物会引起靶组织细胞的生化变化,产生“primary effects”。多种原初中介物和原初效应的综合作用,产生“secondary outcomes”,常见的胆固醇、低密度脂蛋白、血压、纤维蛋白原升高等都属于该范围。进一步发展,则到达第三阶段,产生具体疾病或者严重的功能失调,被称为“tertiary outcomes”。从发生机制上,将 AL 分为重复应激导致的、缺乏适应导致的、应激反应不消退和应激反应不充分^[4]4 种类型。AL 长期积累,最终还将导致能量失调^[27]。AL 评分作为一个综合的累积性损伤的评价工具,在评价衰老及药物干预衰老的效果方面似乎有独特的价值。本研究发现,自 5 月龄起,AL 评分随月龄的增长逐渐升高,到 18 月龄以后达到高峰,并且在青、中年时期大鼠 AL 评分升高最快,提示衰老过程可能在青中年时期启动,因而在青、中年时期就开始衰老干预是否有更好的效果,是值得进一步研究的问题。此外,本研究中 2 月龄大鼠 AL 评分,与 5 月龄相比,异常升高,主要是该月龄组大鼠 T 淋巴细胞凋亡比例显著高于 5 月龄大鼠,2 月龄大鼠 T 淋巴细胞过度凋亡的原因亦需进一步研究。

中医证候描述的领域与 AL 描述的领域大致相当,中医证候描述了 AL 的类型,现代医学对 AL 进行评分,但仅是评价 AL 量的变化,没有意识到 AL 分类、分型的问题^[28-30]。在中医学中,自然衰老常被认为是肾虚模型,本研究结果显示 AL 评分和增龄相关,提示 AL 在肾虚证程度及补肾药物效果的评估中可能具有一定的价值。AL 和其他中医证候及药物疗效评估的关系也值得深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] LARSEN P D. Geroscience: the intersection of basic aging biology, chronic disease, and health [J]. Rehabil Nurs, 2019, 44(4): 187-188.
- [2] FRANCESCHI C, SALVIOLI S, GARAGNANI P, et al. Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: a focus on inflammation and trained immunity [J]. Front Immunol, 2017, 8: 982.

- [3] FERRUCCI L, FABBRIO E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(9): 505-522.
- [4] MCEWEN B S. Protective and damaging effects of stress mediators [J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(3): 171-179.
- [5] GALLO L C, FORTMANN A L, MATTEI J. Allostatic load and the assessment of cumulative biological risk in biobehavioral medicine: challenges and opportunities [J]. *Psychosom Med*, 2014, 76(7): 478-480.
- [6] SEEMAN T E, SINGER B H, ROWE J W, et al. Price of adaptation-allostatic load and its health consequences. *MacArthur studies of successful aging* [J]. *Arch Intern Med*, 1997, 157(19): 2259-2268.
- [7] SEEMAN T E, MCEWEN B S, ROWE J W, et al. Allostatic load as a marker of cumulative biological risk; *MacArthur studies of successful aging* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(8): 4770-4775.
- [8] HWANG A C, PENG L N, WEN Y W, et al. Predicting all-cause and cause-specific mortality by static and dynamic measurements of allostatic load; a 10-year population-based cohort study in Taiwan [J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2014, 15(7): 490-496.
- [9] PARKER H W, ABREU A M, SULLIVAN M C, et al. Allostatic load and mortality: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Prev Med*, 2022, 63(1): 131-140.
- [10] 赵新永, 李晓婷, 周飞. 左归丸改善自然衰老大鼠学习能力的中枢神经线粒体机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(15): 3722-3725.
ZHAO X Y, LI X T, ZHOU F. Zuoguiwan improves the learning ability of aging rats by neuron's mitochondria pathway [J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(15): 3722-3725.
- [11] 高志莹. 左归丸治疗排卵障碍性不孕阴虚证的随机对照研究 [J]. *中国处方药*, 2022, 20(4): 116-117.
GAO Z Y. A randomized controlled study on Zuogui pill in the treatment of anovulatory infertility with Yin deficiency syndrome [J]. *J Chin Prescr Drug*, 2022, 20(4): 116-117.
- [12] SEELEY K E, PROUDFOOT K L, EDES A N. The application of allostasis and allostatic load in animal species: a scoping review [J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0273838.
- [13] 田顺亮, 钱学华. 大鼠断尾取血固定装置的设计及取血的方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(7): 419-421.
TIAN S L, QIAN X H. Devices and skills used in blood collection by cutting rats' tails [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(7): 419-421.
- [14] JOHNSON A A, STOLZING A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13048.
- [15] MUTLU A S, DUFFY J, WANG M C. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(10): 1394-1407.
- [16] SPITLER K M, DAVIES B S J. Aging and plasma triglyceride metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(8): 1161-1167.
- [17] GORDON C J, ROWSEY P J, BISHOP B L, et al. Serum biomarkers of aging in the Brown Norway rat [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(11): 953-957.
- [18] SKOBLOW H F, PROULX C M. C-reactive protein, subjective aging, and incident cardiovascular disease: a mediation model [J]. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, 2022, 77(9): 1654-1658.
- [19] VAN DEN BELD A W, KAUFMAN J M, ZILLIKENS M C, et al. The physiology of endocrine systems with ageing [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(8): 647-658.
- [20] GUPTA D, MORLEY J E. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging [J]. *Compr Physiol*, 2014, 4(4): 1495-1510.
- [21] DALM S, ENTHOVEN L, MEIJER O C, et al. Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice [J]. *Neuroendocrinology*, 2005, 81(6): 372-380.
- [22] 沈自尹, 王文健, 王惠, 等. 补肾药改善老年肾上腺皮质功能的临床与实验研究 [J]. *中西医结合杂志*, 1989, 9(9): 518-521, 514.
SHEN Z Y, WANG W J, WANG H, et al. Therapeutic research of the kidney-tonifying herbs on the aged adrenocortical function [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1989, 9(9): 518-521, 514.
- [23] KLEINNIJENHUIS J, QUINTIN J, PREIJERS F, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17537-17542.
- [24] TU W, RAO S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: aging and cytomegalovirus infection [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 2111.
- [25] QIN L, JING X, QIU Z, et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults [J]. *Aging*, 2016, 8(5): 848-859.
- [26] 郑振, 沈自尹, 黄辉. 补肾与活血复方调节老年鼠 T 细胞凋亡的对比研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(10): 610-612.
ZHENG Z, SHEN Z Y, HUANG H. Comparative study of the regulation of kidney tonic and promoting blood circulation recipe on apoptosis in T cells of old rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1999, 19(10): 610-612.
- [27] MCEWEN B S, WINGFIELD J C. The concept of allostasis in biology and biomedicine [J]. *Horm Behav*, 2003, 43(1): 2-15.
- [28] 黄建华. 中医“证”描述了非稳态负荷的类型——兼论病证关系(上) [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(2): 11-16.
HUANG J H. Syndrome of traditional Chinese medicine describes the pattern of allostatic load [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(2): 11-16.
- [29] 黄建华. 中医“证”描述了非稳态负荷的类型——兼论病证关系(中) [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(3): 13-17, 25.
HUANG J H. Syndrome of traditional Chinese medicine describes the pattern of allostatic load [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(3): 13-17, 25.
- [30] 黄建华. 中医“证”描述了非稳态负荷的类型——兼论病证关系(下) [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(4): 16-22.
HUANG J H. Syndrome of traditional Chinese medicine describes the pattern of allostatic load [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2017, 51(4): 16-22.