

102638

抗衰老研究实验方法

主 编 陈 勤

副主编 刘 圣 颜传珍

编 委 (以姓氏笔划为序)

刘 圣 李 琴 陈 勤

陈家隆 赵文成 梁启勇

颜传珍

主 审 徐叔云 王钦茂

中 国 医 药 科 技 出 版 社

C0188244



登记证号 (京)075号

内 容 提 要

本书是一部专门介绍抗衰老研究实验方法的专著,详细地介绍了目前国内外各种常用的抗衰老实验方法。全书共分为十章,主要包括衰老动物模型的制作以及与衰老密切相关的神经、内分泌、免疫、自由基、血糖血脂代谢、核酸蛋白质代谢、微量元素、寿命试验、抗应激试验等方面,有关章节还附有应用实例,以便读者掌握运用。本书读者对象为:医药科研人员、大专院校师生、老年医学工作者、中西医结合研究人员以及药厂、保健品厂科技人员,尤其适用于从事抗衰老新药、保健品研究开发的研究人员使用。是一本很有实用价值的参考书。

抗衰老研究实验方法

陈 勤 主编

中国医药科技出版社 出版
(北京西直门外北礼士路甲38号)
(邮政编码 100810)

北京市卫顺印刷厂 印刷
全国各地新华书店 经销

开本787×1092mm^{1/32} 印张25^{1/2}

字数563千字 印数 1—1500

1996年2月第1版 1996年2月第1次印刷

ISBN 7-5067-1372-1/R·1212

定价: 35.00元

2406/15

前 言

延年益寿，是人类梦寐以求的愿望。有史以来，人们一直孜孜不倦地寻找种种有效的延缓衰老、永葆青春的方法，然而，古今中外大量的历史教训和研究事实告诫我们，人类的自然寿命是有一定极限的。根据现代生物学推算，寿命约为性成熟期的8~10倍（即100~150岁左右）；可见，当今人类的寿命还远远没有达到应享的自然寿命期限。那么，人类衰老的原因是什么，用什么方法来研究衰老的机制和抗衰老药物的作用机理呢，等等，这是当前人们所关注的热门话题，同时也是现代生命科学研究中的重要课题之一。

抗衰老研究实验方法，是近年来发展起来的一门实验性很强的边缘学科。它广泛地吸收和运用现代分子生物学、分子遗传学、细胞生物学、免疫学、生物化学、药理学和祖国医学等理论和技术，从器官组织水平、细胞水平和分子水平上来探讨衰老的起因和本质，因而它已成为生命科学研究中必不可少的一种有效手段，尤其近年来，各国学者在抗衰老的研究中，取得了许多突破性的进展，并相继提出了200余种衰老学说，其中著名的学说如遗传学说，自由基学说，神经内分泌学说，交联学说代谢学说，中医脾肾学说，衰老挟瘀学说，等等。这些理论从不同侧面、不同层次解释了衰老的部分成因或本质，同时，也为形成与完善抗衰老研究实验方法奠定了坚实的基础。可以相信，在不久的将来，人类一定能够揭开衰老的奥秘！

为了推动我国抗衰老研究事业的发展和加强国际间的抗

衰老研究的交流与合作，作者历时三年，从国内外大量的抗衰老文献中撷取其精华，结合作者从事抗衰老研究的实践体会，编写成一部《抗衰老研究实验方法》，希望能对从事抗衰老研究的科技人员有所帮助，有所启迪！

本书在编写过程中，曾得到了安徽省药物研究所领导的大力支持，著名药理学家徐叔云教授和王钦茂教授在繁忙的科研、教学之余，不辞劳苦，仔细审阅全书稿，并提出许多宝贵建议，在此一并致以由衷的感谢！

由于抗衰老的研究内容涉及面较广，许多方面的内容尚需进一步论证、充实，故在取材上可能不全面。再之编写人员专业水平有限，故书中谬误之处在所难免，热忱欢迎广大读者批评指正。

编 者

1994年9月于合肥

目 录

第 1 章 衰老动物模型.....	(1)
1.1 肾虚衰老模型	(2)
1.2 脾虚衰老模型	(7)
1.3 阴虚衰老模型	(18)
1.4 阳虚衰老模型	(23)
1.5 血虚衰老模型	(34)
1.6 血瘀衰老模型	(38)
1.7 亚急性衰老模型	(46)
1.8 O ₃ 损伤衰老模型	(47)
1.9 去胸腺衰老模型	(50)
1.10 自然衰老模型.....	(52)
第 2 章 寿命试验研究方法.....	(59)
2.1 果蝇寿命试验法	(59)
2.2 家蝇寿命试验法	(66)
2.3 家蚕寿命试验法	(69)
2.4 隆腺蚤寿命试验法	(71)
2.5 小鼠寿命试验法	(73)
2.6 大鼠寿命试验法	(75)
2.7 人二倍体培养细胞寿命试验法	(76)
第 3 章 神经衰老研究方法.....	(85)
3.1 学习记忆实验方法	(86)
3.2 胆碱能神经递质测定方法	(97)
3.3 γ -氨基丁酸能神经递质测定方法.....	(113)

3.4	单胺类神经递质测定方法	(119)
3.5	儿茶酚胺的合成与分解酶活性测定方法...	(142)
3.6	中枢递质受体的测定方法	(153)
3.7	内啡肽的含量测定方法	(178)
第4章	内分泌衰老研究方法	(190)
4.1	性激素功能实验方法	(191)
4.2	垂体激素的测定方法	(197)
4.3	性激素的测定方法	(220)
4.4	甲状腺激素的测定方法	(239)
4.5	肾上腺皮质激素的测定方法	(249)
4.6	胰岛素的测定方法	(271)
	RIA 法	(271)
4.7	胰高糖素的测定方法	(273)
	RIA法	(273)
4.8	肾上腺重量法	(275)
4.9	肾上腺内抗坏血酸含量的测定方法	(276)
	2,4-二硝基苯肼比色法	(276)
	高效液相色谱法	(277)
4.10	激素受体的测定方法	(279)
第5章	免疫衰老研究方法	(304)
5.1	免疫功能低下模型的制备法	(304)
5.2	非特异免疫功能测定方法	(306)
5.3	体液免疫功能测定方法	(335)
5.4	细胞免疫功能测定方法	(369)
5.5	红细胞免疫功能的测定方法	(427)
	红细胞C ₃ b受体花环试验法	(428)
	红细胞免疫复合物花环试验法	(428)

第 6 章	自由基与衰老研究方法	(434)
6.1	超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定	
	方法	(435)
	化学发光法	(435)
	碱性二甲基亚砷-鲁米诺化学发光法	(438)
	甲臍比色法	(441)
	肾上腺素法	(444)
	NBT 还原法	(445)
	邻苯三酚法	(448)
6.2	超氧化物歧化酶同工酶活性的测定方法	(451)
	亚硝酸盐法 (CuZn-SOD、Mn-SOD)	(451)
	化学发光免疫法 (CuZn-SOD)	(452)
6.3	过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定方法	(454)
	极谱氧电极法	(455)
	化学发光法	(457)
	铬酸醋酸钾比色法	(458)
	紫外分光光度法	(459)
	过硼酸盐滴定法	(460)
6.4	过氧化物酶 (POD) 活性的测定方法	(461)
	愈创木酚比色法 (I 法)	(462)
	愈创木酚比色法 (II 法)	(463)
	DAB 比色法	(464)
6.5	谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性	
	的测定方法	(466)
	DTNB 直接比色法	(466)
	NADPH 比色法	(470)
	RP-HPLC 法	(473)

6.6	谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性的测定	
	方法	(474)
6.7	总谷胱甘肽含量的测定方法	(476)
	循环法	(476)
	荧光法	(479)
6.8	氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量测定方法	(481)
	DTNB比色法	(481)
6.9	还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量测定方法	(483)
	荧光法	(483)
6.10	过氧化脂质 (LPO) 含量测定方法	(485)
	TBA 荧光法 (I 法)	(485)
	TBA 荧光法 (II 法)	(487)
	TBA 比色法	(489)
	组织匀浆MDA比色法(体外法)	(490)
	反相离子对色谱法	(491)
6.11	血清脂质过氧化氢含量测定方法	(493)
	比色法	(493)
6.12	脂褐素 (L_F) 含量测定方法	(494)
	荧光法	(495)
	组织化学法	(496)
6.13	自由基浓度的测定方法	(497)
	电子自旋共振法	(497)
	高效液相电化学检测法	(499)
	化学发光法	(500)
第 7 章	血糖血脂代谢与衰老研究方法	(504)
7.1	血糖测定方法	(504)
	邻甲苯胺法	(505)

超微量邻甲苯胺法	(506)
葡萄糖氧化酶法	(506)
福林 (Folin)-吴氏法	(509)
化学发光法	(511)
蒽酮法	(512)
TBA比色法	(513)
7.2 血脂测定方法	(514)
第8章 核酸蛋白质代谢与衰老研究方法	(552)
8.1 核酸与蛋白质合成代谢的放射性前体物	
质掺入测定方法	(553)
放射性同位素掺入法	(553)
显微放射自显影法	(555)
8.2 DNA、RNA含量测定方法	(557)
二苯胺法	(557)
苔黑酚法	(559)
定磷法	(560)
双波长分光光度法	(562)
8.3 RNA聚合酶体外转录活性的测定方法	(564)
^3H -UTP掺入法	
8.4 DNA损伤与修复功能的测定方法	(567)
^3H -MNU 掺入法	(568)
FADU法	(570)
^3H -TdR 掺入法	(572)
^3H 、 ^{14}C 双标记法	(575)
8.5 姊妹染色单体互换 (SCE)的测定方法	(578)
姬姆萨染色法	(578)
8.6 环核苷酸的测定方法	(581)

8.7	钠、钾-三磷酸腺苷酶(Na^+ 、 K^+ -ATP酶)	
	活性的测定	(597)
	定磷法	(598)
	化学发光法	(601)
8.8	蛋白质含量测定方法	(604)
	Lowry法	(604)
	双缩脲法	(605)
	Coomassie亮蓝法	(606)
8.9	结缔组织中胶原蛋白的测定方法	(607)
8.10	铜蓝蛋白(CP)的测定方法	(614)
	联大茴香胺法	(614)
	TMB比色法	(615)
	RIA法	(616)
第9章	微量元素与衰老研究方法	(621)
9.1	锌的含量测定方法	(622)
	吡啶偶氮酚类比色法	(622)
	电位溶出法	(623)
	火焰原子吸收光谱法	(625)
9.2	硒的含量测定方法	(627)
	荧光法	(627)
	石墨炉原子吸收光谱法	(631)
	气相色谱法	(632)
	新极谱法	(633)
9.3	铜的含量测定方法	(635)
	TMPYP比色法	(636)
	二乙基二硫代氨基甲酸钠比色法	(638)
	DiBr-PAESA比色法	(639)

	荧光法	(640)
	石墨炉原子吸收光谱法	(641)
9.4	铁的含量测定方法	(642)
	氨基安替吡啉比色法	(643)
	吡啶偶氮酚类比色法	(644)
	亚铁噻法	(646)
	石墨炉原子吸收光谱法	(648)
9.5	铬的含量测定方法	(649)
	石墨炉原子吸收光谱法	(649)
	二苯碳酰二肼比色法	(651)
	阳极溶出伏安法	(652)
9.6	锰的含量测定方法	(654)
	石墨炉原子吸收光谱法	(654)
	甲醛肟比色法	(656)
	水杨醛肟比色法	(658)
	火焰原子吸收光谱法	(659)
9.7	钙的含量测定方法	(660)
	邻甲酚酞络合酮比色法	(661)
	甲基麝香草酚蓝比色法	(662)
	火焰原子吸收光谱法	(663)
9.8	磷的含量测定方法	(664)
	氯化亚锡磷钼蓝比色法	(665)
	紫外分光光度法	(666)
9.9	镁的含量测定方法	(667)
	甲基麝香草酚蓝比色法	(667)
	钛黄比色法	(669)
	荧光法	(670)

9.10	碘的含量测定方法	(671)
	硫氰酸钾比色法	(673)
	湿消化法	(673)
	气相色谱法	(675)
9.11	氟的含量测定方法	(676)
	格式作图法	(677)
9.12	钒的含量测定方法	(679)
	极谱催化法	(679)
	分光光度法	(680)
9.13	镍的含量测定方法	(681)
	α -糠偶酰二肼比色法	(682)
	示波极谱法	(683)
9.14	钴的含量测定方法	(685)
	吡啶偶氮酚类比色法	(685)
9.15	钼的含量测定方法	(687)
	冷消化硫氰酸盐比色法	(687)
9.16	铝的含量测定方法	(689)
	铬天青 S 比色法	(689)
	铬天青 B 比色法	(690)
9.17	铅的含量测定方法	(691)
	极谱催化法	(692)
	原子吸收光谱法	(693)
9.18	镉的含量测定方法	(695)
	阳极溶出伏安法	(695)
	石墨炉原子吸收光谱法	(698)
9.19	砷的含量测定方法	(699)
	孔雀绿比色法	(699)

9.20	汞的含量测定方法.....	(701)
	冷消化法.....	(701)
9.21	样品中多种微量元素的连续测定方法...	(703)
	示波极谱法.....	(703)
	荧光-原子吸收光谱法	(705)
第10章	抗应激试验及其他.....	(710)
10.1	抗应激试验方法.....	(710)
10.2	体重增长试验法.....	(722)
10.3	前列腺素及其代谢产物的测定方法.....	(723)
10.4	血液流变学实验方法.....	(741)
10.5	抗凝血实验方法.....	(763)
10.6	微循环实验方法.....	(770)
附录一	抗衰老药物的药效学研究规范.....	(789)
附录二	抗衰老药物临床研究指导原则.....	(791)
附录三	新药(中药)治疗老年病临床研究指导 原则.....	(797)

第1章 衰老动物模型

衰老是生物体全身各组织、器官的退行性变化，是诸多病理、生理过程综合作用的结果。而抗衰老药是一类改善人类体质，提高生命效率，并能使生命在遗传特性决定的限度内延长寿限的药物。在进行抗衰老药物的药理学研究时，通常需要依据某一公认的衰老学说，造成最接近临床衰老症状的动物模型，以用于抗衰老药物的筛选和研究。因此，建立成功的衰老动物模型，对于揭示衰老机制和研究抗衰老药物作用机理，有着十分重要的意义。

目前，国内外学者设计抗衰老动物模型，大致上是依据以下两种思路进行。一是在中医长寿理论的指导下，设计符合中医临床衰老症状的动物模型。中医关于衰老的学说很多，其中以肾虚衰老学说、脾虚衰老学说、阴阳失调衰老学说、气血失和衰老学说、气虚血瘀衰老学说最为著名。据此，可用物理的或化学的方法设计出肾虚衰老模型、脾虚衰老模型、阳虚衰老模型、阴虚衰老模型、血虚衰老模型、血瘀衰老模型等。二是根据现代衰老学说而设计的衰老动物模型，如根据衰老的自由基理论而设计的O₂损伤衰老模型；以衰老的免疫学说而设计的去胸腺衰老模型；以衰老的代谢学说为指导，采用大剂量D-半乳糖所致的亚急性衰老模型；此外，还可以直接采用老龄动物（如大、小鼠）作自然衰老模型和选用SAM-P₁系小鼠快速衰老模型等。总之，不论采用哪种理论、何种方法制作的衰老动物模型，大多数只是反映衰老

的某一进程或某一方面，与人类全身各组织器官的全面退行性改变尚存在一定的差异，因此，我们在进行抗衰老实验时，应从整体、离体以及细胞分子水平上选用多项指标，综合考察抗衰老药物的药理作用。唯有如此，才能较客观地评价药物的抗衰老作用^{〔1~3〕}。

1.1 肾虚衰老模型

祖国医学很早以前就提出，肾虚是衰老的根本原因。如《素问·上古天真论》云：“女子七岁，肾气盛，齿更发长。二七而天癸至，……三七肾气平均，……七七任脉虚，太冲脉衰少，天癸竭”。“丈夫八岁，肾气实，发长齿更，二八肾气盛……三八肾气平均，……五八肾气衰，……八八……天癸竭、精少、肾脏衰”。认为人体的发育是随着肾气的逐渐旺盛而成长，继而又随着肾气的逐渐衰微而转为衰老直至死亡，这突出地反映了肾的精气主宰着人类的生长发育和衰老死亡的生命过程。因此古代医家提出“肾气盛则寿延，肾气衰则寿夭”的古训。强调延年益寿当以补肾保精为第一旨要。年老之人肾精日趋减少，更应护肾节精。若房事不节，耗竭肾精，久之肾亦虚，衰老加速。现代研究证明，肾虚与内分泌、神经、免疫系统功能低下有关，补肾药不仅可以改善老年人T细胞功能和大脑智能老化，延缓下丘脑—垂体—靶腺（肾上腺皮质、甲状腺、性腺）轴存在的未老先衰，还具有提高机体内抗氧化酶活性、清除自由基的作用，表明补肾是延缓衰老的主要途径之一^{〔4,5〕}。

1.1.1 房劳型肾虚模型^{〔6〕}

【原理】 中医认为，肾为先天之本，肾中精气具有促进生

长生殖、发育、抗衰老的作用。节欲保精是延年益寿的重要措施之一。若房事过劳则耗精伤肾,导致早衰。据此,将雄性啮齿类动物在一小时内与一动情期雌性动物交配数次,当出现呆滞疲劳状态时,投入另一只新的动情期雌性动物,又可立即兴奋起来而进行交配,此现象称为 Coolidge 效应。本模型即利用雄性大鼠的这一效应,使之与雌性大鼠尽量交配,连续数月,即可出现类似肾虚的表现。

【操作方法】

(1) 选择 2~3 月龄、体重 200~280 g 的 Wistar 雄性大鼠为造模对象,另取 140~200 g 雌性大鼠作为交配对象。实验开始前,所有动物均用 1% 精制敌百虫及 0.1% 新洁尔灭混合剂洗浴,雄性大鼠口服土霉素,每天 0.5 g /只,连续三天。雌性大鼠每只皮下注射长效避孕针剂 0.2ml (每 ml 含炔诺酮庚酸酯 50mg 及戊酸雌二醇 5mg), 2~3 天后,大鼠阴道涂片可见角化细胞,说明雌性大鼠处于动情期。将预处理的每只雄性大鼠与另一只动情期雌性大鼠共笼。次日,将鼠笼垫盘中有阴道栓的雄性大鼠选出待用。无栓者,将雌性大鼠随机交换。将三天内有栓的雄性大鼠随机分成对照与交配两组。

(2) 大鼠饲养于塑料笼盒中,室内面积约 14cm²,用 2 支 40W 日光灯照明,12h 光照,12h 黑暗,室温 18℃~28℃。动物自由取食饮水,对照组为 3~4 只雄性大鼠共笼,交配组则每笼一雌一雄。

(3) 交配组的大鼠,每笼一雌一雄。每天将雌性大鼠随机交换,三天换一批。换下的雌性大鼠休息 7~10 天,再经处理,循环使用,每鼠仅用 3~4 次。如此饲养 100 天左右,在此期间,每天上午检查交配组各笼中的阴道栓并计数;每

隔 10 天称雄性大鼠体重一次。

【观察指标】

(1) 外观特征 肾虚动物一般可见精神萎靡、少动、跨跨、交配时间缩短或减少、瘦弱、毛色干枯乏泽、食量减少等症状。

(2) 生殖腺重量指数测定 实验结束后处死动物，取睾丸、精囊腺、前列腺、包皮腺、提肛肌及肾上腺称重，计算脏器重量指数。

(3) 全血淋巴细胞转化试验 以 ^3H -TdR 掺入法测定淋巴细胞转化率，反映肾虚动物免疫状态。

(4) 血浆睾酮及皮质醇含量测定 借以反映肾虚动物内分泌功能状态。

(5) 其他 根据实验目的要求加以选择，如 SOD、LPO、MAO-B 等指标。

1.1.2 慢性悬吊应激型肾虚模型^[7~9]

【原理】 性功能低下是肾虚的重要特征之一。正常成年小鼠长期处于应激状态下，可引起神经内分泌系统功能性紊乱，再加上频繁交配，久之可出现类似肾虚的表现。

【操作方法】 取 2~3 月龄的 IVCS 种或 NIH 纯系雄性小鼠，随机分为空白对照组、吊应激对照组及吊应激药物组。药物组每日每鼠给予一定剂量的药液，对照组则同途径给予等体积生理盐水，连续给药 10 天，实验开始时，将小鼠悬吊于水槽壁上端（临近水面），下为 16℃~22℃ 水池，使小鼠始终处于强迫性抬头、挣扎状态。每日悬吊 30min，连续 10 天。于每次悬吊应激前，将小鼠按雌：雄=2：1 合笼 15