

情绪异常大鼠模型的旷场行为实验在中医药领域的研究进展

张鹏横^{1,2,3}, 阮璐薇^{1,2,3}, 卓泽伟^{1,2,3}, 胡柳^{1,2,3}, 梁文娜^{1,2,3*}

(1. 福建中医药大学中医证研究基地, 福州 350122; 2. 福建省 2011 中医健康管理协同创新中心, 福州 350122;
3. 福建省中医健康状态辨识重点实验室, 福州 350122)

【摘要】 大鼠是较为常用的实验动物, 旷场行为实验是检测动物情绪行为的一种常用的经典实验方法。涉及大鼠旷场行为实验的研究是这些年的热点, 并呈上升趋势。旷场行为实验的条件会引起大鼠生理心理状态改变, 影响大鼠行为的解读, 从而影响疾病模型的判定。文章通过梳理近 5 年涉及大鼠旷场行为实验的研究文献, 为选择较为合适大鼠旷场行为实验的条件以及合理的行为解读和模型判定作一综述。

【关键词】 大鼠; 旷场; 行为实验; 焦虑; 抑郁

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0100-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 09. 018

A review of experimental studies on the behavior of rat models with abnormal emotion in Traditional Chinese Medicine

ZHANG Pengheng^{1, 2, 3}, RUAN Luwei^{1, 2, 3}, ZHUO Zewei^{1, 2, 3}, HU Liu^{1, 2, 3}, LIANG Wenna^{1, 2, 3*}

(1. Research Center of TCM Syndrome, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.

2. Collaborative Innovation Center of TCM Health Management, Fujian Province, Fuzhou 350122.

3. Key Laboratory of TCM Health Status Identification in Fujian Province, Fuzhou 350122)

【Abstract】 Rat is a commonly used experimental animal. The open-field behavior test is one of the most commonly used methods to detect emotional behavior in animals, particularly for rats in recent years. The conditions of the open-field behavior test can cause changes in the physiological and psychological state of rats, affecting the interpretation of rat behavior, and thus affecting the determination of the rat model of diseases. To select suitable experimental conditions and achieve reasonable interpretation of behavior and an appropriate model, this article presents a review of the research literature on the open-field behavior test of rats published in the last 5 years.

【Keywords】 rat; open field; behavioral experiment; anxiety; depression

大鼠是较为常用的实验动物, 旷场行为实验是检测动物情绪行为的一种常用的经典实验方法^[1]。大鼠旷场行为实验是指将大鼠放置在一个封闭的平面区域中, 该区域被分割成方块, 观察并记录大

鼠一定时间内的活动情况。旷场行为实验是判断大鼠疾病模型的重要指标之一, 旷场行为实验的条件会引起大鼠生理心理状态改变, 影响大鼠行为的解读, 从而影响疾病模型的判定。选择较适合大鼠

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81774209, 81673882); 福建中医药大学校管课题(编号:X2016019)。

【作者简介】 张鹏横(1987—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 内分泌及代谢疾病的中医证研究。E-mail: 251786294@qq.com

【通信作者】 梁文娜(1979—), 女, 硕士生导师, 研究方向: 内分泌及代谢疾病的中医证研究。E-mail: 105265301@qq.com

旷场实验条件,合理的行为解读,能为后续疾病动物模型的病理机制研究提供更为可靠的支持。

1 大鼠旷场行为实验的现状

大鼠旷场行为实验是近年的研究热点。通过检索主题为“大鼠与旷场”的近 5 年的文献,发现各类文献(包括学位论文、期刊论文、会议论文)总量 474 篇。其中,期刊文献 254 篇,发表于核心期刊的文献达 136 篇。通过知网可视化分析发于核心期刊的文献,发现涉及旷场实验的学科前四的有中药学、基础医学、精神病学、中医学;受到各种类基金支持,其中受到国家自然科学基金支持的文献达 80 篇;年度发表文献数量呈上升趋势。提示运用中医药对精神疾病在基础医学方面的研究越来越热门。这也间接证明了随着社会进步,经济发展,生活节奏加快,工作、家庭等各方面的压力增加,会产生身体不适感和疾病,容易使情绪发生变化,会导致原有的疾病加重或发生新的疾病。随着人民生活、收入水平的提高,对于精神健康越来越重视,渴望安全有效的治疗,也越来越迫切。

2 大鼠旷场行为实验的条件

大鼠旷场行为实验的条件包括:旷场箱的规格尺寸、实验时间、实验环境、人员操作这几方面。

2.1 旷场箱的规格尺寸

旷场箱的规格尺寸是指箱底长宽和边墙高度,影响旷场行为信息量的主要是箱底长宽。易丽莎等^[2]所用的旷场箱底边长为 40 cm × 40 cm;欧阳俊彦等^[3]、余庆等^[4]所用的旷场箱底边长为 50 cm × 50 cm 的规格;郑伟男等^[5]所用的旷场箱底边长为 80 cm × 80 cm;刘莹等^[6]所用的旷场箱底边长为 105 cm × 105 cm 的规格;多数所用的旷场箱底边长为 100 cm × 100 cm 的规格^[7-16]。成年大鼠的体长为 18 ~ 20 cm,旷场箱规格太小不能从大鼠的旷场行为上获得足够可靠的信息;旷场箱过大,实验拍摄和操作难度增加,困难因素增多,可能使大鼠产生急性应激。结合国内学者在国外杂志上发表的文献^[17-18],笔者认为,可以采用底边规格为 100 cm × 100 cm 的旷场箱对大鼠进行旷场行为学实验。

2.2 旷场行为的实验时间

旷场行为的实验时间是指大鼠在进行旷场行为实验检测所持续的时间。王慧霞等^[19]、胡海燕等^[20]选取的时间是 3 min,沙中玮等^[21]选取的时间是 10 min,多数人选取的检测时间为 5

min^[2-3,5-16,22-23]。实验时间方面,因不同实验的需要可以从几分钟到几小时不等,不能硬性规定。在实际操作中,一个研究项目使用到大鼠的量至少有几十只。因此,单只大鼠行为实验所用的时间越长,整个大鼠旷场行为实验的时间就越长。过长的实验时间对实验人员的考验和要求就更高;前后进行实验的大鼠产生时间间隔,可能导致一定影响或差异。而且大鼠具有较强的适应能力,结合文献中常选择使用的时间,可以根据实验需求,选择适合实验的时间。

2.3 实验环境与操作

实验环境与操作是指大鼠在进行旷场行为实验时灯光、噪音,以及实验人员操作的注意事项。这些在文献中提及较少,如欧阳俊彦等^[3]在旷场实验中提到灯光的瓦数 40 W;蒲蜀湘等^[9]在旷场实验中提到灯照天花板反射试验区,实验人员远离旷场箱,操作角度以看不到箱中的实验动物为准。实验常用的大鼠属白化大鼠,对光和噪声敏感,能使其神经内分泌系统发生变化。因此,实验操作时应当避免光和噪声的影响。

3 大鼠旷场行为解读

大鼠旷场行为解读是通过大鼠旷场行为实验单位获得的,如水平穿越格数或水平路程、垂直或站立次数、修饰或理毛次数、中央区停留时间、中央区穿越格数、平均速度等方面的数据进行整理、归纳、分析,判定大鼠疾病模型的一个过程。

3.1 大鼠焦虑抑郁的情绪模型

大鼠旷场行为实验涉及的疾病多以精神类疾病或症状为主,其中又以焦虑和抑郁较为多。通过不同的模型建立方法模拟人类不同疾病,最终都会涉及到焦虑和抑郁,说明疾病所产生的症状和不适,可对人的精神和神经内分泌造成不同程度的影响。

在焦虑模型方面,大鼠的旷场行为结果有升高或个别项目升高,有降低或个别项目降低,从而产生不同的行为学解释。如欧阳俊彦等^[3]的旷场实验结果中央区域的停留时间明显减少,总运动距离和直立次数差异均无显著性,作者认为焦虑水平高的动物倾向于停留在周边区域,反之,中央区域的探究次数和时间越多,焦虑水平则越低;而沙中玮等^[21]的旷场实验结果总路程减少,中央活动路程升高。宗绍波等^[22]、刘莹等^[6]各自实验中旷场行为总路程的升高,表明大鼠模型较好模拟了病证患者精神亢奋、急躁易怒样临床表现,具有明显的焦虑样

行为;魏盛等^[24]认为,旷场行为得分上升,是一种“怒”的表现,其中包括愤怒和郁怒。肝主疏泄,其志在怒。中医理论认为,怒是肝失疏泄、气机不畅的肝郁表现。因此,肝郁与焦虑存在一定的联系。方锦颖等^[14]、余庆等^[4]的旷场实验结果显示模型组较正常组相比,旷场行为均降低,认为焦虑模型成功。笔者较为同意易丽莎等^[2]的观点,焦虑的旷场行为可能受造模时间的影响,短时间应激刺激可使大鼠出现焦虑样症状,并认为焦虑与怒之间存在密切联系。随着应激天数的增加,逐渐出现兴奋性下降,从而出现抑郁样的行为。

在抑郁模型方面,大鼠的旷场行为结果较为一致,均呈现下降趋势。水平穿越格总数、总平均速度减少反映了动物的活动度降低,中央区时间和中央区格数减少反映了大鼠对新鲜环境的好奇程度降低。胡海燕等^[20]在其结果中表明慢性应激时间越长对大鼠造成的损害越发增加。这一点也印证了易丽莎等^[2]的实验。但也有实验结果显示模型组大鼠旷场实验水平得分、垂直得分及总分下降,中央格停留时间增加,并认为该模型方法降低大鼠的兴奋性和探究趋势及认知功能^[19]。在认知功能方面,中央格停留时间增加或减少具有一定的讨论价值。

3.2 大鼠肝郁脾虚的证模型

在中医病证研究中,大鼠旷场行为实验常应用于肝郁证、脾虚证和肝郁脾虚证等大鼠模型。刘旭东等^[23]的脾气虚证大鼠旷场实验结果显示运动距离、速度和垂直次数都降低,中心活动时间增加。作者认为是大鼠对外界关注度、好奇度降低,反应迟钝,提示脾气虚证的“神疲乏力”主要是中枢结构损伤,肌肉失养。赵荣华等^[16]的大鼠旷场实验结果再次说明旷场行为受造模时间的影响。作者发现,造模 2 周时,在水平穿越格数、总路程数及垂直站立次数上,肝郁证和脾虚证大鼠均明显升高,而肝郁脾虚证大鼠降低;在中央区时间上,肝郁证和肝郁脾虚证大鼠升高,脾虚证大鼠降低;在修饰上,肝郁证和肝郁脾虚证大鼠减少,脾虚证大鼠增加。造模 4 周时,在水平穿越格数和总路程数上,三个不同证模型的大鼠均减少;在垂直站立次数和修饰上,肝郁证和肝郁脾虚证模型大鼠均降低,脾虚证大鼠升高;在中央区时间上,肝郁证和肝郁脾虚证模型大鼠升高,脾虚证大鼠减少。作者认为,从 2 周和 4 周的旷场行为的前后变化分别来看,肝郁证和脾虚模型的大鼠早期存在一定的活动探究性的加强,呈现一种应激后焦虑的状态;而肝郁脾虚证模型的大鼠

活动减少,开始表现出抑郁状态。但随着造模时间的增加,三个不同证模型的大鼠均出现降低,肝郁证和脾虚证模型的大鼠呈现出兴奋性由强转弱的特点,最终表现为抑郁的状态;肝郁脾虚证早期活动度降低,并随着建立模型的时间延长从而进一步降低,呈现出抑郁状态渐进加重的趋势。

中医的肝郁证包含焦虑或抑郁样症状。建立肝郁证模型的方法多以慢性不可预见性刺激和慢性束缚应激,这两种造模方式常用于抑郁模型的建立。陈锦锋等^[25]认为在临床上,肝郁证的诊断必有情绪低落症状和肝经循行部位症状,而情绪低落症状对应抑郁状态。而从旷场行为实验的结果来看,抑郁模型较焦虑模型更为一致、稳定。因此,抑郁模型建立方法建立肝郁证模型可以更好更明显地体现大鼠肝郁状态。

根据中医学理论,肝为将军之官,谋虑出焉,喜调达,调畅气机,在体合筋;脾主思,思者,神识之妙用也,又为后天之本,主运化,在体合肉。对于事物的认识与肝脾有着密切的关系,并所产生的反应行为有赖于筋肉的协调运动。气机调畅,有助于脾之运化,水谷精微有源,人体四肢百骸、肌肉筋骨、脏腑经络、精髓元神皆受所养。肝脾功能皆正常,则神识清灵,动作矫健;单一肝郁证,程度未伤及脾,或单一脾虚证,未使气机受阻,则可以通过相应的调理,得到神识恢复;肝脾功能皆失常,神识受损则神识混沌,反应迟钝,即使经过调理,活动度得到恢复,但神识不易恢复。因此,对于赵荣华等^[16]的旷场实验中肝郁脾虚组和肝郁脾虚干预组的中央停留时间一直居高不下,可以从肝脾病理状态对脑功能影响来解释。

综合文献,笔者认为,旷场行为水平格数或总路程可以反应大鼠的活动度,垂直站立次数可以反应大鼠探究行为,中央区时间可以反应大鼠认知行为,修饰可反应大鼠的警觉性。而焦虑样行为和抑郁样行为存在着应激程度和应激时间上的差异,是一个前后过程,并不存在矛盾。

4 大鼠旷场行为实验的不足与展望

旷场行为实验是检测动物情绪行为的一种常用的经典实验方法^[1]。当前,大鼠旷场行为实验在医学基础研究上的应用十分频繁,但也存在一些混乱的现象。首先,用于大鼠行为实验的旷场箱没有一个统一的规格。其次,在大鼠旷场行为实验的检测持续时间没有统一的标准。第三,未明确实验条件和实验操作规范。虽然大鼠旷场行为实验已经

进入使用自动化仪器和软件时代,减少人为因素带来的影响,但未达到无人化的全自动程度,仍需实验人员参与整个过程,一些影响因素需要注意避免。最后,对于大鼠疾病模型的应用和行为解读,有着不同的理解和看法。尤其是焦虑模型在判读上,其原因可能是模型建立的方法多且不同,导致旷场行为实验不能很好的准确的反应出大鼠肝郁状态的情绪行为;或者是大鼠焦虑行为的稳定性存在一定探讨空间。

西医的疾病名称和中医的病证名称存在着不同,原因是对疾病症状认识、分析的理论体系不同,导致最终的治疗、防治的方法和措施也存在差异。但对于客观存在的症状体征是不会因理论、认识的不同而改变的。因此,西医和中医存在一定的桥梁和联系。可以通过对西医疾病症状的还原,获取中医的病证;运用西医建立和判定动物疾病模型的方法,确定中医病证动物模型的建立和判定。中医病证的动物模型建立,有利于中医理论在情绪与脑功能等方面研究的应用和开展;可以验证中医药的有效性,通过疾病机理的阐释,证明中医药防治情绪方面疾病的科学性;有助于中医药的发展进步和走出国门,为世界所接受,为治疗、预防疾病贡献出中医的力量。

参考文献:

[1] Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats [J]. *Physiol Behav*, 1994, 55(3): 433–439.

[2] 易丽莎,陈莹,孙会会,等. 精神应激致内脏高敏感大鼠的心理行为学变化 [J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(35): 1–6.

[3] 欧阳俊彦,胡卓炎,褚玥,等. γ -氨基丁酸对情绪应激大鼠额叶皮质一氧化氮合酶和一氧化氮水平的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(5): 385–389.

[4] 余庆,蒋雪,李琴. 焦虑模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴高反应性与糖皮质激素受体蛋白表达降低相关 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(14): 1464–1468.

[5] 郑伟男,赵建军,胡志英,等. 创伤后应激障碍海马 Beclin-1/Bcl-2 自噬标记变化 [J]. *解剖学杂志*, 2015, 38(5): 560–563.

[6] 刘莹,赵宏艳,于峥,等. 补肝益肾法对更年期模型大鼠行为变化的调节作用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(4): 397–399.

[7] 吴天添,朱江,毛翔宇,等. 亮氨酸对肠道术后大鼠中枢神经递质和外周炎性因子的影响 [J]. *肠外与肠内营养*, 2014, 21(3): 167–171.

[8] 王雯龙,唐启盛,赵瑞珍,等. 丹栀逍遥散对饮水冲突天敌暴露模型大鼠行为学影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(7): 486–489.

[9] 蒲蜀湘,吴培基,饶从磊,等. 丰富环境对局灶性脑梗死大鼠旷场和水迷宫行为学及 Nogo-A 蛋白表达的影响 [J]. *广东医学*, 2013, 34(16): 2437–2440.

[10] 杨丽萍,李改,万海娇,等. 恐伤孕鼠对其 21 日龄子代情绪的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 62–64.

[11] 李力卓,何松柏. 大鼠创伤性脑损伤后精神障碍的精神行为学改变 [J]. *中国医科大学学报*, 2016, 45(8): 708–710, 714.

[12] 朱孝苍,黄荟杰,韩秋琴,等. 电针不同穴位对慢性应激抑郁大鼠的抗抑郁作用及对血浆胃饥饿素的影响 [J]. *针刺研究*, 2015, 40(4): 283–289.

[13] 吴媛媛,蒋永亮,邵晓梅,等. 痛抑郁二联征模型大鼠中缝背核不同水平 5 羟色胺表达差异 [J]. *解剖学报*, 2015, 46(2): 170–174.

[14] 方锦颖,陈光耀,李龙梅,等. 孤养对单次延长应激建立的创伤后应激障碍模型大鼠行为学的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 32–35.

[15] 费鹏鸿,赵琳,任慧聪,等. 重复经颅磁刺激对抑郁模型大鼠行为学及海马 BDNF 表达的影响 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2016, 42(10): 591–595.

[16] 赵荣华,谢鸣,刘进娜,等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠行为学变化及柴疏四君子汤对其作用的比较 [J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(8): 515–518, 528.

[17] Luo J, Wang T, Liang S, et al. Experimental gastritis leads to anxiety- and depression-like behaviors in female but not male rats [J]. *Behav Brain Funct*, 2013, 9: 46.

[18] Bai M, Zhu X, Zhang Y, et al. Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46921.

[19] 王慧霞,詹向红,李伟,等. 负性情绪应激大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15): 4140–4142.

[20] 胡海燕,徐志伟,敖海清,等. 四逆散影响慢性应激抑郁模型大鼠行为学研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(1): 271–274.

[21] 沙中玮,王国华,李志敏,等. 香薷解郁方对焦虑大鼠血清单胺类神经递质及 BDNF 水平的影响 [J]. *中成药*, 2018, 40(1): 191–194.

[22] 宗绍波,朱德豪,魏盛. 白香丹胶囊对经前期综合征肝气逆证模型大鼠学习记忆功能的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2): 284–289.

[23] 刘旭东,刘文俊,孙大宇,等. 脾气虚证模型大鼠神疲乏力的客观化评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3): 699–701.

[24] 魏盛,宗绍波,乔明琦. 愤怒、郁怒反应模型大鼠不同脑区 5-羟色胺含量分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1423–1426.

[25] 陈锦锋,王爱成,王玉来,等. 肝气郁结证诊断的必备症状以及与抑郁状态的关系探讨 [J]. *辽宁中医杂志*, 2005, 32(1): 19–22.