

陈超杰,钟志凤,何嘉莉,等. 天敌声音应激对 SD 大鼠的焦虑样行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 1-9.
Chen CJ, Zhong ZF, He JL, et al. Effect of predatory sound stress on the anxiety-like behavior of Sprague-Dawley rats[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 1-9.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 001

天敌声音应激对 SD 大鼠的焦虑样行为的影响

陈超杰^{1,2}, 钟志凤^{2,3}, 何嘉莉¹, 张水华^{2*}

(1. 梧州学院, 化学工程与资源再利用学院, 广西 梧州 543002; 2. 福建医科大学, 福建省新药安全性评价中心, 福州 350122; 3. 陆军军医大学, 高原军事医学系高原作业医学教研室, 重庆 400038)

【摘要】 目的 观察天敌声音在不同时长和重复应激下对 SD 大鼠焦虑样行为的影响。**方法** 观察大鼠经单次或重复天敌声音应激后,在旷场试验(OFT)和高架十字迷宫(EPM)的行为变化。OFT 和 EPM 的平均速度作为大鼠整体活动水平的指标,OFT 中央区和 EPM 开闭区的路程比例和停留时间比例用于评价大鼠焦虑状态。**结果** 在单次应激前,各组大鼠整体活动水平一致,均处于低焦虑状态;应激后第 1(OFT)、3(OFT)和 7 天(EPM),与空白对照组相比,10 min 和 60 min 单次天敌声音应激均能显著降低大鼠在 OFT 中央区或 EPM 开臂区的路程比例和停留时间比例($P < 0.01$)。大鼠在重复天敌声音应激后第 1(EPM)、3(OFT)和 7 天(EPM),均可见 OFT 中央区或 EPM 开臂区的路程比例和停留时间比例较空白对照组显著下降($P < 0.01$);同时在重复应激后第 7 天,地西洋(1 mg/kg, i.p.)能有效逆转天敌声音应激大鼠的这种焦虑状态水平($P < 0.01$)。**结论** 天敌声音应激能增加大鼠的焦虑样行为,而且单次天敌声音应激在较短时间内(10 min)起效,作用持久(不少于 7 d),重复应激不耐受。

【关键词】 焦虑动物模型;天敌声音;SD 大鼠;旷场试验;高架十字迷宫测试

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 12-0001-09

Effect of predatory sound stress on the anxiety-like behavior of Sprague-Dawley rats

CHEN Chaojie^{1,2}, ZHONG Zhifeng^{2,3}, HE Jiali¹, ZHANG Shuihua^{2*}

(1. School of Chemical Engineering and Resource Recycling, Wuzhou University, Wuzhou 543002, China.
2. Fujian Center for Safety Evaluation of New Drug, Fujian Medical University, Fuzhou 350122.
3. Department of High Altitude Operational Medicine, College of High Altitude Military Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038)

【Abstract】 Objective To observe the effect of single and repeated predatory sound stresses on the anxiety-like behavior of Sprague-Dawley rats. **Methods** After single and repeated predatory sound stresses, the behaviors of rats were recorded by open-field test (OFT) and elevated plus-maze (EMP) test, respectively. The mean velocities of OFT and EPM were measured as an index of movement, and the percentages of distance traveled (D%) and persistent time spent (T%) in the center zone of OFT and open arms of the EMP, respectively, were determined as parameters of anxiety-like behavior and used to evaluate the anxiety of rats. **Results** Before a single stress, movement in each group of rats was similar, but

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81860736);福建省自然科学基金项目(2017J01443);广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198060);广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助项目[桂教人[2018]18号];福建省科技计划引导性项目(2018Y0023);广西高校大学生创新创业训练计划项目(201811354096)。

【作者简介】 陈超杰(1982—),男,副研究员,研究方向:药理毒理学。E-mail: chaojiechen@yahoo.com

【通信作者】 张水华(1977—),男,副研究员,研究方向:药理毒理学。E-mail: zshjxau@163.com

showed a lower baseline during anxiety. At days 1 (OFT), 3 (OFT) and 7 (EPM) after stress, 10 and 60 min treatments with a single predatory sound stress significantly decreased the D% and T% in the center zone of OFT or open arms of the EPM compared with control and white noise groups, respectively ($P < 0.01$). Similarly, rats at days 1 (EPM), 3 (OFT) and 7 (EPM) after repeated predatory sound stresses exhibited lower D% and T% in the center zone of OFT or open arms of the EPM compared with control and white noise groups, respectively ($P < 0.01$). At day 7 after repeated stresses, diazepam (1 mg/kg i.p.) reversed the levels of anxiety in predatory-sound-stressed rats ($P < 0.01$). **Conclusions** Predatory sound stress increases the anxiety-like behavior of rats. In addition, a single predatory sound stress over a short duration (10 min) induced stress that persisted for at least 7 days, with no tolerance to repeated stresses.

【Keywords】 animal model of anxiety; predator sound stress; Sprague-Dawley rats; open-field test; elevated plus-maze test

焦虑症(anxiety disorders)是一类以发作性或持续性情绪焦虑,并伴有自主神经紊乱、肌肉紧张与运动不安等症状的精神性疾病。近年来,该病的发生率随着社会压力的增加而逐年上升,已经成为影响人们生活质量的主要精神疾病之一^[1]。焦虑症的病因仍不明确,而在临床中抗焦虑药因其不良反应较多受到限制^[2]。因此,焦虑症以及抗焦虑新药成为医药学研究的热点。焦虑症的动物模型是研究焦虑症和研发抗焦虑新药的重要载体,为该病的诊断、预防和治疗提供线索和理论指导。目前有关焦虑症的动物模型多达 30 种,大多经过临床有效的抗焦虑药物检验后建立起来的^[3-4]。但部分模型在维持动物焦虑状态和评价不同种类抗焦虑药等方面存在局限性^[5]。

防御行为焦虑模型最初是通过受试动物与天敌动物的接触,造成受试动物的焦虑状态,但这种方法易致使受试动物躯体创伤;随后,又发展为通过暴露天敌气味来引起受试动物焦虑样行为的动物模型^[6]。这类模型可称之为天敌焦虑模型,其优点是操作简便,对动物应激的时间短,而焦虑效应可持续 1 周以上,便于多个时间点和不同检测方法对动物模型进行综合研究^[7-9]。该类模型可用于评价包括苯二氮卓类和三环类等多种抗焦虑药,也可用于焦虑症机制的探索^[10]。因此它可能是一类较为全面地反映焦虑行为表现、作用机制及药物治疗等多方面的焦虑症动物模型,有利于焦虑症的发病机制研究和新药筛选。然而,在实际操作中,该类模型所需的天敌动物(猫)在微生物控制等级难以达到动物屏障系统的要求,使之在 SPF 级动物实验室中应用带来困难。而天敌气味的应用也存在诸多不足,包括不好控制气味的投放量,气味投放过程失当容易污染动物房,从而影响其他试验的进行等。

有研究者发现声音惊吓能诱导动物焦虑样行为的产生。Kaltwasser^[11]利用 10 kHz、110 dB 纯音对大鼠进行刺激,成功诱导出动物的焦虑状态。但该模型的缺点是声音强度太大,一般单调而高分贝的声音也可诱发啮齿类动物癫痫发作,提示这种方法还会引起中枢神经系统的其他神经精神性病变^[12]。有研究人员发现 83.9 dB 的雷鸣声能引起比格犬产生焦虑状态,提示在声音强度不大的情况下,利用惊吓声也能诱导出焦虑效应,为本文提供了很好的思路^[13]。结合天敌暴露和声音惊吓的特点,本课题组尝试利用适当声音强度的天敌声音(猫叫声)对大鼠建立焦虑症模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,体重 180~200 g,2 月龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。动物在福建医科大学新药安全性评价中心 SPF 屏蔽系统动物实验室[SYXK(闽)2013-0001]饲养和实验,实验开展前经过福建医科大学实验动物伦理委员会的审查批准(批准号:2017-14)。大鼠在标准饲养盒内喂养,每盒 5 只,每周换笼两次,人工照明,明暗各 12 h,室温 20℃~26℃,湿度 40%~70%。并严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂和仪器

地西洋注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 1201301);0.9%氯化钠注射液(福州海王福药制药有限公司,批号:150401B21);地西洋均用生理盐水配制到相应浓度的溶液进行腹腔注射给药。动物视频行为分析系统(Smart V2.5, Panlab 公司,西班牙);旷场试验箱(上海移数信息科技有限公司);大鼠高架十字迷宫(上海移数信息科技有限公司);

音响 (SPA 1312, 飞利浦, 荷兰); 数字声级计 TES1350A (泰仕电子工业股份有限公司, 计量鉴定号: 1212130252)。

1.3 实验方法

1.3.1 天敌声音应激

录制猫叫声音和白色噪音音频作为天敌刺激物和参照物, 两种声音的频率分别是 0~22 kHz (中心频率: 2.541 kHz) 和 0~8 kHz, 均在大鼠可接受的听力范围内^[14]。音频通过电脑控制音响循环播放, 音响距离应激动物笼具 1 m 远, 声音强度通过数字声级计控制在 (60.0 ± 5.0) dB。测试房间的背景声音强度为 51.2 dB。

1.3.2 旷场试验 (open-field test, OFT)

大鼠放置于方形敞口的旷场箱 (100 cm×100 cm×38 cm) 内, 通过动物视频监测系统观察和分析其在旷场箱内 5 min 的自主活动情况, 记录和分析的指标包括: 平均速度、中央区 (50 cm×50 cm) 路程比例和中央区停留时间比例。平均速度作为评价动物自主活动的指标。中央区的路程比例和停留时间比例则是反映动物焦虑行为的指标, 两者的数值越小则说明动物的焦虑状态越严重。每测试完一只动物需清洗旷场箱的底部和侧壁以使之清洁无异味, 测试均在上午九点到中午十二点之间进行。

1.3.3 高架十字迷宫测试 (evaluated-plus maze, EPM)

大鼠 EPM 是由两个开臂 (50 cm×10 cm) 和两个相对闭臂 (50 cm×10 cm×50 cm) 及中央平台区 (10 cm×10 cm) 连接而成, 装置离地面高度为 50 cm。放置大鼠于中央平台区, 头朝开臂, 通过动物视频监测系统观察和分析记录其在 5 min 内平均速度、开臂区路程比例和开臂停留时间比例。平均速度作为评价动物自主活动的指标。开臂区路程比例和停留时间的比例则是反映动物焦虑行为的指

标, 两者的数值越小则说明动物的焦虑状态越严重。每测试完一只动物需清洗实验装置以使之清洁无异味, 测试均在上午九点到中午十二点之间进行。

1.3.4 单次天敌声音应激

大鼠按体质量随机分为空白对照组 (CON)、白色噪音刺激 10 min (WN10) 和 60 min 处理组 (WN60)、天敌声音刺激 10 min (PS10) 和 60 min 处理组 (PS60), 每组 8 只。各组动物在应激前 (D0), 应激后第 1 (D1) 和第 3 天 (D3) 进行 OFT 测试, 以及第 7 天 (D7) 进行 EPM 测试, 行为学测试安排见图 1。

1.3.5 重复天敌声音应激

大鼠按体质量随机分为空白对照组 (CON)、白色噪音处理组 (RWN60)、天敌声音处理组 (RPS60) 和天敌声音+阳性对照处理组 (RPS60+DZP), 每组 8 只。动物经连续 5 d, 每天 1 次 60 min 的应激后, 分别于第 1 天 (D1) 和第 7 天 (D7) 进行 EPM 测试, 第 3 天 (D3) OFT 测试, 行为学测试安排见图 2。其中, RPS60+DZP 组的动物是在 D7 测试前 1 h 给予 1 mg/kg 的 DZP, 其余处理同 RPS60 组。

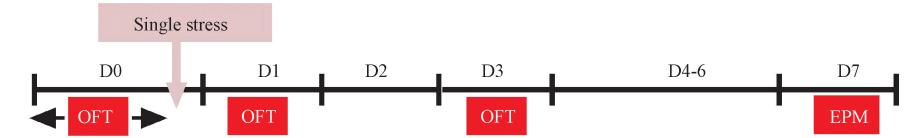
1.4 统计学分析

通过 Graph Pad Prism 7.0 软件, 采用单因素方差分析处理数据, 结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠单次天敌声音应激的行为学变化

在单次声音应激前的 OFT 结果 (图 3A) 提示, 各组大鼠在平均速度 (图 3B)、中央区的运动路程比例 (图 3C) 和停留时间比例 (图 3D) 均未见显著性差异 ($P > 0.05$)。由此可见, 各组大鼠的总体运动情况相似, 未见显著的焦虑样行为, 以此推断同

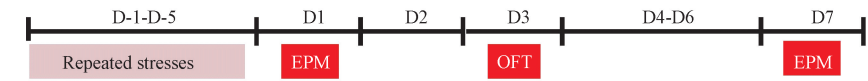


注: Single stress: 单次应激; OFT: 旷场试验; EPM: 高架十字迷宫测试; D0: 应激前; D1: 应激后第 1 天; D2: 应激后第 2 天; D3: 应激后第 3 天; D4~6: 应激后第 4~6 天; D7: 应激后第 7 天。

图 1 大鼠单次应激的行为学测试安排示意图

Note. OFT: open-field test. EPM: elevated-plus maze. D0: The day before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4~6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress.

Figure 1 Schematic diagram of behavior experimental procedures for rats by single stress

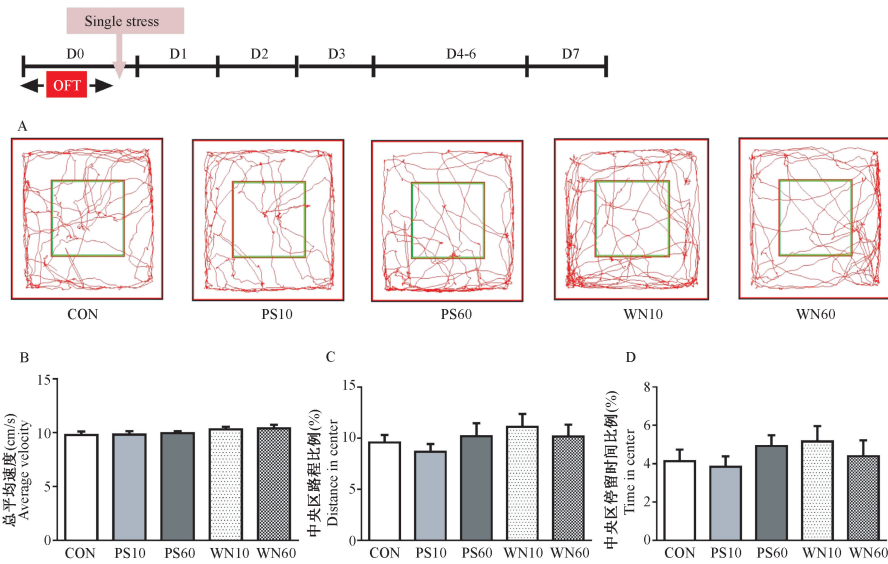


注: Repeated stresses: 重复应激; EPM: 高架十字迷宫测试; OFT: 旷场试验; D-1-D-5: 应激前 1 天到前 5 天; D1: 应激后第 1 天; D2: 应激后第 2 天; D3: 应激后第 3 天; D4-6: 应激后第 4-6 天; D7: 应激后第 7 天。

图 2 大鼠重复应激的行为学测试安排示意图

Note. EPM: Elevated-plus maze. OFT: Open-field test. D-1-D-5: The 1st to 5th days before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress.

Figure 2 Schematic diagram of behavior experimental procedures for rats by repeated stresses



注: (A) 大鼠在旷场试验 (OFT) 中的运动轨迹图, 轨迹内的正方形是中央区。在 OFT 中观察的指标包括: (B) 总平均速度、(C) 中央区的路程比例和 (D) 停留时间比例。Single stress: 单次应激; D0: 应激前; D1: 应激后第 1 天; D2: 应激后第 2 天; D3: 应激后第 3 天; D4-6: 应激后第 4~6 天; D7: 应激后第 7 天; CON: 空白对照组; PS10: 天敌声音应激 10 min 处理组; PS60: 天敌声音应激 60 min 处理组; WN10: 白色噪音应激 10 min 处理组; WN60: 白色噪音应激 60 min 处理组。n = 8。

图 3 单次应激前大鼠在 OFT 中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in open-field test (OFT). The center zone is the inner square. The index observed in OFT include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in center, and (D) the percentage of persistent time spent in center. D0: The day before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; PS10: predatory sound stress for 10 min group; PS60: predatory sound stress for 60 min group; WN10: white noise stress for 10 min group; WN60: white noise stress for 60 min group. n = 8.

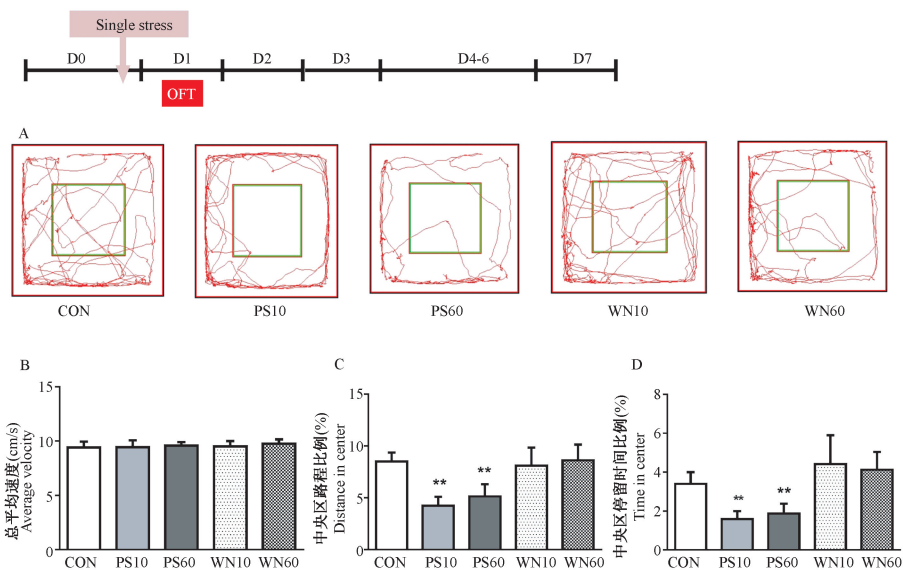
Figure 3 Activity of rats the before single stress in OFT

一批购进的 SD 大鼠在行为学上未见明显的个体差异。因为重复应激测试的动物与单次应激为同一批次, 因此重复应激试验未进行类似的验证。

经过单次声音应激 1 d 后 (图 4), 各组大鼠在旷场中的运动速度相似 ($P > 0.05$, 图 4B)。10 min 和 60 min 天敌声音应激的大鼠在中央区的运动路程比例和停留时间比例均显著低于空白对照组和白色噪音处理组 ($P < 0.01$, 图 4C、4D), 而这两组不

($P > 0.05$)。由此可见, 不同时长天敌声音刺激在不影响大鼠的总体运动情况下, 经过 1 d 后均能有效引起它们的焦虑样行为, 而相同时长的白色噪音则无焦虑样行为的变化。

经过单次声音应激 3 d 后 (图 5), 各组大鼠在旷场中的运动速度相近 ($P > 0.05$, 图 5B)。10 min 和 60 min 天敌声音应激的大鼠在中央区的运动路程比例和停留时间比例均显著低于空白对照组和白色噪音处理组 ($P < 0.01$, 图 5C、5D), 而这两组不



注：(A)大鼠在旷场试验(OFT)中的运动轨迹图，轨迹内的正方形是中央区。在OFT中观察的指标包括：(B)总平均速度、(C)中央区的路程比例和(D)停留时间比例。Single stress：单次应激；D0：应激前；D1：应激后第1天；D2：应激后第2天；D3：应激后第3天；D4-6：应激后第4~6天；D7：应激后第7天；CON：空白对照组，PS10：天敌声音应激10 min处理组；PS60：天敌声音应激60 min处理组；WN10：白色噪音应激10 min处理组；WN60：白色噪音应激60 min处理组。 $n=8$ 。与空白对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图4 单次应激后第1天(D1)大鼠在OFT中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in open-field test (OFT). The center zone is the inner square. The indexes observed in OFT include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in center, and (D) the percentage of persistent time spent in center. D0: The day before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; PS10: predatory sound stress for 10 min group; PS60: predatory sound stress for 60 min group; WN10: white noise stress for 10 min group; WN60: white noise stress for 60 min group. $n=8$. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Activity of the rats at day 1 (D1) after single stress in OFT

同时长天敌声音应激处理组之间则无统计学差异($P>0.05$)。由此可见，经过天敌声音刺激3 d后，大鼠仍处于焦虑状态。

经过单次声音应激7 d后(图6)，各组大鼠在EPM中的运动速度一致($P>0.05$ ，图6B)。10 min和60 min天敌声音应激的大鼠在开臂区的运动路程比例和停留时间比例均显著低于空白对照组和白色噪音处理组($P<0.01$ ，图6C、6D)，而这两组不同时长天敌声音应激处理组之间则无统计学差异($P>0.05$)。由此可见，经过单次天敌声音刺激的大鼠能持续焦虑状态不少于7 d。

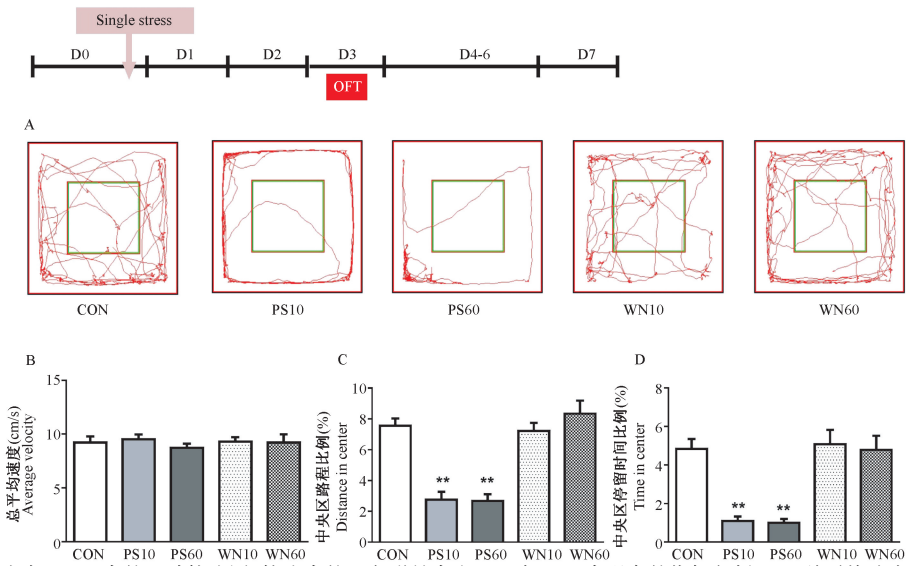
2.2 大鼠重复天敌声音应激的行为学变化

单次天敌声音应激能使大鼠持续呈现焦虑样行为，但重复刺激是否仍能保持这种效应？反复应激是否会使大鼠对天敌声音产生耐受呢？由图7的结果可见，经过重复声音应激1 d后，各组大鼠在EPM中的运动速度类似($P>0.05$ ，图7B)。重复天敌声音应激的大鼠在开臂区的运动路程比例和停留时间比例均显著低于空白对照组和白色噪音处

理组($P<0.01$ ，图7C、7D)。由此可见，重复天敌声音刺激在不影响大鼠的总体运动情况下，经过1 d后能有效引起它们的焦虑样行为。同样条件下的白色噪音则无焦虑样行为的改变。

经过重复声音应激3 d后(图8)，各组大鼠在旷场中的运动速度相似($P>0.05$ ，图8B)。重复天敌声音应激的大鼠在中央区的运动路程比例和停留时间比例均显著低于空白对照组和白色噪音处理组($P<0.01$ ，图8C、8D)。由此可见，经过重复天敌声音刺激3 d后，大鼠仍处于焦虑状态。

经过重复声音应激7 d后(图9)，各组大鼠在EPM中的运动速度保持一致($P>0.05$ ，图9B)。重复天敌声音应激的大鼠在开臂区的运动路程比例和停留时间比例均显著低于空白对照组和白色噪音处理组($P<0.01$)，而1 mg/kg地西洋能显著提高天敌声音应激大鼠在开臂区的运动路程比例和停留时间比例($P<0.01$ ，图9C、9D)。由此可见，重复天敌声音刺激仍能引起大鼠持续的焦虑样行为，而且大鼠不会对此声音产生耐受。

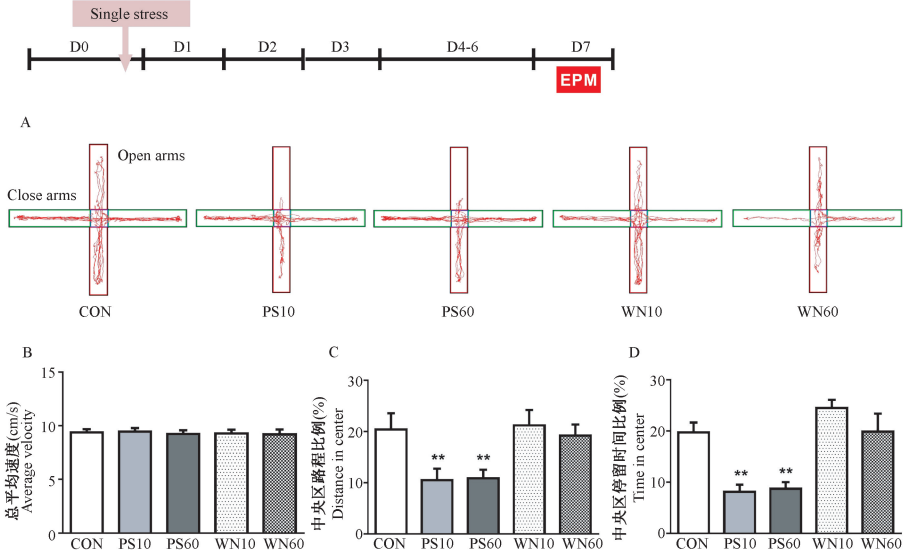


注: (A)大鼠在旷场试验(OFT)中的运动轨迹图,轨迹内的正方形是中央区。在OFT中观察的指标包括:(B)总平均速度、(C)中央区的路程比例和(D)停留时间比例。Single stress:单次应激;OFT:旷场试验;D0:应激前;D1:应激后第1天;D2:应激后第2天;D3:应激后第3天;D4-6:应激后第4~6天;D7:应激后第7天;CON:空白对照组;PS10:天敌声音应激10 min处理组;PS60:天敌声音应激60 min处理组;WN10:白色噪音应激10 min处理组;WN60:白色噪音应激60 min处理组。 $n=8$ 。与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图5 单次应激后第3天(D3)大鼠在OFT中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in open-field test (OFT). The center zone is the inner square. The indexes observed in OFT include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in center, and (D) the percentage of persistent time spent in center. D0: The day before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; PS10: predatory sound stress for 10 min group; PS60: predatory sound stress for 60 min group; WN10: white noise stress for 10 min group; WN60: white noise stress for 60 min group. $n=8$. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Activity of the rats at day 3 (D3) after single stress in OFT

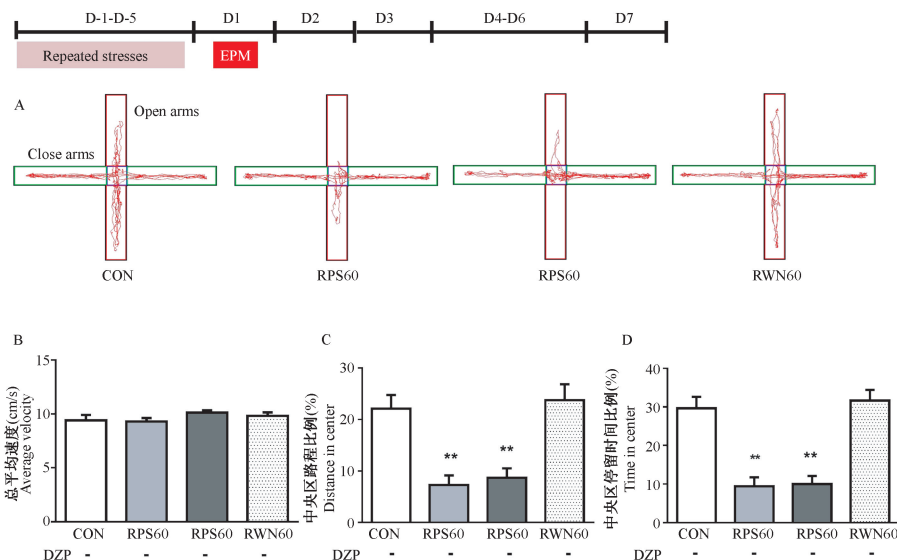


注: (A)大鼠在高架十字迷宫测试(EPM)中的运动轨迹图。在EPM中观察的指标包括:(B)总平均速度、(C)开臂区的路程比例和(D)停留时间比例。Single stress:单次应激;D0:应激前;D1:应激后第1天;D2:应激后第2天;D3:应激后第3天;D4-6:应激后第4~6天;D7:应激后第7天;Open arms:开臂区;Close arms:闭臂区;CON:空白对照组;PS10:天敌声音应激10 min处理组;PS60:天敌声音应激60 min处理组;WN10:白色噪音应激10 min处理组;WN60:白色噪音应激60 min处理组。 $n=8$ 。与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图6 单次应激后第7天(D7)大鼠在EPM中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in elevated-plus maze (EPM). The index observed in EPM include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in open arms, and (D) the percentage of persistent time spent in open arms. D0: The day before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; PS10: predatory sound stress for 10 min group; PS60: predatory sound stress for 60 min group; WN10: white noise stress for 10 min group; WN60: white noise stress for 60 min group. $n=8$. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Activity of the rats at day 7 (D7) after single stress in EPM

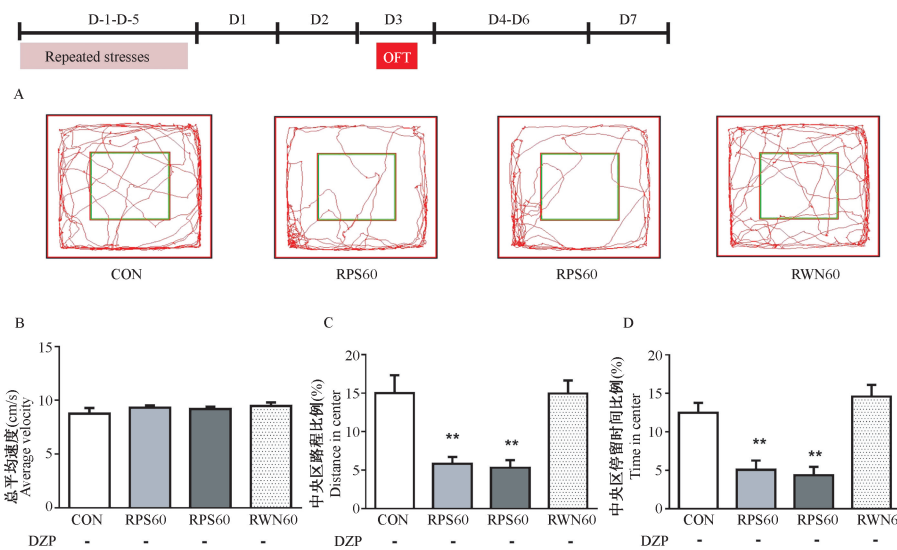


注：(A)大鼠在高架十字迷宫测试(EPM)中的运动轨迹图。在EPM中观察的指标包括：(B)总平均速度、(C)开臂区的路程比例和(D)停留时间比例。Repeated stresses:重复应激;D-1-D-5:应激前1 d到前5 d;D1:应激后第1天;D2:应激后第2天;D3:应激后第3天;D4-6:应激后第4~6天;D7:应激后第7天;Open arms:开臂区;Close arms:闭臂区;CON:空白对照组;RPS60:重复天敌声音应激60 min处理组;RWN10:重复白色噪音应激60 min处理组;DZP:地西洋(1 mg/kg, i.p.)。n=8。与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01。

图7 重复应激后第1天大鼠在EPM中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in elevated-plus maze (EPM). The index observed in EPM include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in open arms, and (D) the percentage of persistent time spent in open arms. D-1-D-5: The 1st to 5th days before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; RPS60: repeated predatory sound stress for 10 min group; RWN60: repeated white noise stress for 60 min group; DZP: diazepam (1 mg/kg, i.p.). n=8. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

Figure 7 Activity of the rats at D1 after repeated stresses in EPM

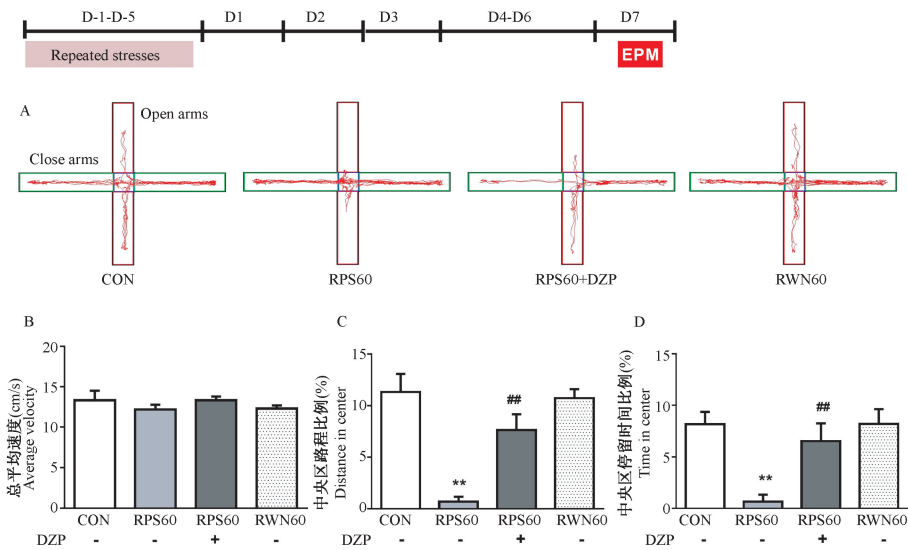


注：(A)大鼠在旷场试验(OFT)中的运动轨迹图。在OFT中观察的指标包括：(B)总平均速度、(C)中央区的路程比例和(D)停留时间比例。Repeated stresses:重复应激;D-1-D-5:应激前1 d到前5 d;D1:应激后第1天;D2:应激后第2天;D3:应激后第3天;D4-6:应激后第4~6天;D7:应激后第7天;CON:空白对照组;RPS60:重复天敌声音应激60 min处理组;RWN10:重复白色噪音应激60 min处理组;DZP:地西洋(1 mg/kg, i.p.)。n=8。与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01。

图8 重复应激后第3天大鼠在OFT中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in open-field test (OFT). The indexes observed in OFT include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in center, and (D) the percentage of persistent time spent in center. D-1-D-5: The 1st to 5th days before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; RPS60: repeated predatory sound stress for 10 min group; RWN60: repeated white noise stress for 60 min group; DZP: diazepam (1 mg/kg, i.p.). n=8. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

Figure 8 Activity of the rats at D3 after repeated stresses in OFT



注：(A)大鼠在高架十字迷宫测试(EPM)中的运动轨迹图。在EPM中观察的指标包括：(B)总平均速度、(C)开臂区的路程比例和(D)停留时间比例。Repeated stresses:重复应激;D-1-D-5:应激前1d到前5d;D1:应激后第1天;D2:应激后第2天;D3:应激后第3天;D4-6:应激后第4~6天;D7:应激后第7天;Open arms:开臂区;Close arms:闭臂区;CON:空白对照组;RPS60:重复天敌声音应激60 min处理组;RWN10:重复白色噪音应激60 min处理组;DZP:地西洋(1 mg/kg, i.p.)。n=8。与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与RPS60组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图9 重复应激后第7天大鼠在EPM中的活动情况

Note. (A) The movement tracks of both rats in elevated-plus maze (EPM). The index observed in EPM include: (B) total average velocity, (C) the percentage of distance travelled in open arms, and (D) the percentage of persistent time spent in open arms. D-1-D-5: The 1st to 5th days before stress. D1: The 1st day after stress. D2: The 2nd day after stress. D3: The 3rd day after stress. D4-6: The 4th to 6th days after stress. D7: The 7th day after stress. CON: control group; RPS60: repeated predatory sound stress for 10 min group; RWN60: repeated white noise stress for 60 min group; DZP: diazepam (1 mg/kg, i.p.). n=8. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 9 Activity of the rats at D1 after repeated stresses in EPM

3 讨论

OFT和EPM是评价动物焦虑情绪的经典测试方法^[15]。OFT是由Hall于1934年最先提出用于实验动物行为学评价,后经发展为评价动物自主行为和焦虑行为的经典方法^[16]。啮齿类动物单独进入旷场后,由于脱离了以往的群居生活,而且旷场面积要比饲养环境更为宽广,从而导致动物产生恐惧,尤其是在旷场的中间区域相比外周区域更容易受到威胁或攻击;鉴于啮齿类动物对旷场中间区域的好奇探索特性与其顾虑情绪的矛盾冲突,从而使其产生焦虑样行为,通过记录动物在旷场中央区的行为变化,可以作为动物焦虑情绪的评价指标^[17]。EPM源于高架Y字型迷宫(elevated Y maze),经改进后正式用于焦虑研究^[14]。EPM用于动物焦虑评价的原理是,EPM装置距离地面的高度能使啮齿类动物在开臂区产生畏惧情绪,基于啮齿类动物对高架十字迷宫开臂区的好奇探索和开臂区的危险意识而产生恐惧逃避的心理冲突,而产生焦虑行为的改变,通过记录动物在EPM开臂区的行为变化,可以作为动物焦虑情绪的评价指标^[18]。需要明确指出的是,这两种测试方法有时会被误以

为“焦虑动物模型”,但它们仅能在测试过程中反映动物自身的焦虑行为变化,不能使动物表现出持续性的焦虑状态,也不能造成相应的病理改变,即焦虑症的发生。因此OFT和EPM可用于监测动物的焦虑行为变化或评价药物的抗焦虑效果,但并不能作为探究焦虑症的发病机制和针对焦虑症治疗药物评价的动物模型^[5]。焦虑症动物模型应该是在一定外界刺激条件下产生持续性的焦虑情绪、相关的行为学指征和生化指标的变化,而且能被抗焦虑药所验证。本课题组前期研究发现,60 dB天敌声音刺激能引起SD大鼠的焦虑样行为的增加和血浆中ACTH和皮质酮水平的升高,由此提示天敌声音诱导动物焦虑症模型的可行性^[19]。然而这个模型还有很多影响因素有待进一步探索,例如天敌声音的刺激时长和反复刺激是如何影响该模型的焦虑样行为变化等。故本课题组对此进行了探索。

本研究的结果提示,大鼠在单次天敌声音刺激后,能维持较高的焦虑效应至少7 d,而且10 min和60 min的刺激时长引起的焦虑效应无差异,从实验人员便捷省时的角度来看,天敌声音10 min刺激的造模条件似乎更佳。相同条件下的白色噪音则无法增加大鼠的焦虑样行为。此外,为了考察天敌声

音刺激的次数和每次刺激的时长两方面对模型的影响,本研究进一步通过每天天敌声音 60 min 刺激,持续 5 d 的造模条件,观察大鼠对刺激源的耐受性。在重复天敌声音刺激 5 d 后,大鼠仍能产生焦虑样行为,其效应可持续至少 7 d,相同条件下的白色噪音则无此效应。地西洋作为经典的抗焦虑药,可用于验证焦虑动物模型^[20]。本研究发现,地西洋能有效抑制重复天敌声音应激 7 d 后大鼠的焦虑效应,进一步证明天敌声音大鼠模型的有效性,并提示该模型可用于抗焦虑药疗效和机制探索的可能性。

由此可见,天敌声音的强度仅在 60 dB、应激 10 min 内即可起焦虑样行为,其效应能持续至少 7 d,而且重复应激不耐受。因此,天敌声音诱导的大鼠焦虑模型具有以下优势:(1)操作简便。天敌声音可以直接在笼具旁或测试的动物房内播放,避免天敌动物及其气味进入动物房造成污染,可同时对多只动物进行应激。(2)天敌声音应激的指标可控性强。包括天敌声音的强度和频率均可检测,其强度和播放时长亦易于人为控制。(3)对操作者和动物的损害较小。高分贝噪音长时间的刺激会对机体造成损伤,尤其是实验动物可能会有癫痫、耳聋等的损害^[12,21];而因天敌声音的声响低和播放的时长较短,不会引起操作者的不适,对动物产生器质性病变的风险也能有所降低。鉴于以上,本课题组利用天敌声音诱导建立了一种便捷可靠的大鼠焦虑模型,可能为焦虑症的认识和抗焦虑新药筛选提供便利有效的模型工具。

参考文献:

[1] Stein DJ, Scott KM, De Jonge P, et al. Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2017, 19(2): 127-136.

[2] Yoon H, Oh DJ, Suh HS, et al. Korean Guidelines for the Pharmacological Treatment of Social Anxiety Disorder: Initial Treatment Strategies [J]. *Psychiatry Investig*, 2018, 15(2): 147-155.

[3] Thibaut F. Anxiety disorders: a review of current literature [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2017, 19(2): 87-88.

[4] Harro J. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 352: 81-93.

[5] Cryan JF, Sweeney FF. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(4): 1129-1161.

[6] Zoladz PR, Diamond DM. Predator-based psychosocial stress animal model of PTSD: Preclinical assessment of traumatic stress at cognitive, hormonal, pharmacological, cardiovascular and

epigenetic levels of analysis [J]. *Exp Neurol*, 2016, 284 (Pt B): 211-219.

[7] Campos AC, Ferreira FR, Da Silva WA Jr, et al. Predator threat stress promotes long lasting anxiety-like behaviors and modulates synaptophysin and CB1 receptors expression in brain areas associated with PTSD symptoms [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 533: 34-38.

[8] Janitzky K, D' Hanis W, Kröber A, et al. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress [J]. *Brain Res*, 2015, 1599: 1-8.

[9] Lau C, Hebert M, Vani MA, et al. Absence of neurogenic response following robust predator-induced stress response [J]. *Neuroscience*, 2016, 339: 276-286.

[10] 魏伟,吴希美,李元建.药理学实验方法学[M].第4版.北京:人民卫生出版社;2010.

[11] Kaltwasser MT. Acoustic startle induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel animal model of anxiety? [J]. *Behav Brain Res*, 1991, 43(2): 133-137.

[12] Castro GP, Medeiros DC, Guarnieri LO, et al. Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility [J]. *Epilepsy Behav*, 2017, 71(Pt B): 243-249.

[13] Landsberg GM, Beck A, Lopez A, et al. Dog-appeasing pheromone collars reduce sound-induced fear and anxiety in beagle dogs: a placebo-controlled study [J]. *Vet Rec*, 2015, 177(10): 260.

[14] Kraeuter AK, Guest PC, Saranyai Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 69-74.

[15] 赵洪庆,韩远山,杜青,等.不同时间点不同应激方法致大鼠焦虑样行为的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(1): 22-26.

[16] Kraeuter AK, Guest PC, Saranyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 99-103.

[17] Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015, 96: e52434.

[18] Hazim AI, Ramanathan S, Parthasarathy S, et al. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats [J]. *J Physiol Sci*, 2014, 64(3): 161-169.

[19] Chen CJ, Zhong ZF, Xin ZM, et al. A new stress model by predatory sound produces persistent anxiety-like behaviours in male SD rats but not ICR mice [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2019, DOI:10.1016/j.applanim.2019.220.104843.

[20] Kuniishi H, Ichisaka S, Yamamoto M, et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats [J]. *Neurosci Res*, 2017, 123: 27-35.

[21] Lauer AM, Larkin G, Jones A, et al. Behavioral animal model of the emotional response to tinnitus and hearing loss [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2018, 19(1): 67-81.