



应激性抑郁动物模型评价方法研究进展^{*}

曲书苑 庞宝兴

(青岛大学附属医院, 青岛大学口腔医学院, 青岛 266003)

摘要:抑郁症是一种常见的心境障碍,可由各种原因引起,以显著而持久的心境低落为主要临床特征,且心境低落与其处境不相称,严重者可出现自杀念头和行为。抑郁动物模型的研究是抑郁症的机制研究和临床药物开发的基础。其中应激性模型由于模拟抑郁症发病的诱因较充分且造模方法简便,已成为最常用的抑郁动物模型,广泛用于抑郁症的基础研究。本文综述了评价应激性抑郁动物模型的主要方法,为抑郁动物模型造模提供了参考依据。

关键词:抑郁症;应激性动物模型;效度

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)06-0059-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.012

抑郁症是一种常见的心理障碍疾病,随着抑郁症发病率的逐年上升,抑郁症发病机制和治疗方法已成为研究热点,因而建立合理有效的抑郁动物模型是进行抑郁症研究必不可少的一环。抑郁动物模型按造模方法可分为应激性模型、药物诱导性模型和损伤模型,其中以应激性模型最为常用。应激抑郁动物模型包括强迫游泳实验模型、悬尾实验模型、习得性无助(LH)模型、慢性不可预知轻度应激(CUMS)模型等^[1]。本文将围绕表面效度,结构效度和预测效度^[2]三个方面对应激性抑郁动物模型常用的评价方法展开综述。

1 表面效度(Face validity)

表面效度为应激性抑郁动物模型与人类抑郁症现象学的相似程度。目前广泛认为,现象学的相似程度仅包括行为和/或认知方面,而不是生理和/或神经基础^[3],所以表面效度的评价常采用行为学测试的方法。研究表明各类应激性抑郁动物模型均具有良好的表面效度^[4]。

1.1 悬尾实验(Tail suspension test, TST)

悬尾实验既是一种应激性抑郁动物模型的造模方法,也是抑郁动物模型最常用的检测方法。用胶

带固定在小鼠尾末端2 cm左右,悬挂6 min,由摄像机记录行为,并由一名实验人员记录小鼠不动时间^[5],其中小鼠不动时间的长短反映了其绝望程度^[6]。

1.2 强迫游泳实验(forced swimming test, FST)

同悬尾实验一样,强迫游泳实验也是应激性抑郁动物模型的造模方法和最常用的检测方法^[7]。大鼠强迫游泳实验分为训练和测试两期。在训练期,令大鼠在一个狭窄的充满足够深度水的圆柱体中游泳15 min,保持温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,不能接触底部并保持头部高于水面,使大鼠习惯装置。在测试期,大鼠被迫在相同的装置中游泳5 min,记录大鼠游泳、攀爬和不动时间。此外,小鼠的强迫游泳试验装置与大鼠类似,实验持续6 min,前2 min用于小鼠适应装置,最后4 min进行行为记录^[8]。

1.3 旷场实验(open field test, FT)

旷场实验由Hall和Ballschey首先提出并使用,可用于评价各类应激性抑郁动物模型的自主运动行为、探究行为和紧张度,从而反映抑郁程度。旷场实验的具体操作方法为:将底面积为 $213.36\text{ cm} \times 213.36\text{ cm}$ 的敞箱均分为49个方形区,中央的25个方形区用圆形丝网屏障隔离,分别将食物放入中央区 and 边缘区,将啮齿类动物放入特定区域,观察其

收稿日期:2019-05-13

^{*} 基金项目:山东省自然科学基金项目(No.ZR2017BH034)

作者简介:曲书苑(1997—),女,本科,研究方向:口腔医学. E-mail:qushuyuan97@163.com

通信作者:庞宝兴(1982—),男,主治医师,博士,研究方向:口腔颌面外科. E-mail:pangbaoxing@126.com

行为^[9]。周波等应用 Matlab 程序设计软件结合数字图像处理方法对旷场实验行为学视频进行分析,检测啮齿类动物于旷场总体、中央、周边等不同部位的运动距离或时间^[10]。

1.4 糖水偏好实验 (sucrose preference test, SPT)

糖水偏好实验是慢性应激性抑郁模型最常用的评价指标。动物模型中出现蔗糖偏好下降的现象,并非由运动或感觉缺陷引起,而是快感缺失的表现,这是抑郁症的一个核心症状^[11]。具体操作为:第一天动物可以自由饮用两瓶 1% 蔗糖水,第二天用普通蒸馏水代替一瓶蔗糖水,在第二天禁食 24 h 后给动物一瓶 1% 蔗糖水和一瓶蒸馏水 (100 mL),1 h 后称重瓶子计算消耗量。蔗糖偏好的计算公式为:蔗糖偏好 = 蔗糖消耗量 / (蔗糖消耗量 + 耗水量) × 100%^[12]。

1.5 新奇物体探索实验 (Novel object exploration test)

新奇物体探索实验反映动物在新奇环境中的探究能力,抑郁症动物模型在新奇事物实验中探索行为减少属于快感缺失的表现,多用于慢性应激性模型或 LH 模型的评价。新奇物体探索实验的具体方法为:将一个 2.5 cm × 2.5 cm × 4 cm 表面具有复杂花纹的新奇物体固定于底面积为 18 cm × 20 cm 塑料箱中心,保持光照强度为 5 lx,再将小鼠放入箱中,用摄像机记录 15 min 内小鼠行为,评估小鼠对新奇物体探索的时长^[13]。

1.6 喷溅实验 (splash test)

喷溅实验通过快感缺失和自我关心两种机制测量抑郁样行为,需要和其他行为测试合用来评价抑郁模型^[14]。该实验需要在鼠背上喷洒 10% 的蔗糖溶液两次,鼠毛被溶液弄脏后会触发以舔毛为特征的梳理行为,观察并记录在喷洒蔗糖溶液后 5 min 内梳理的频率和时间^[8]。

1.7 新奇抑制摄食实验 (novelty-suppressed feeding test, NSFT)

陌生环境会诱发动动物食物摄取的延迟,属于一种焦虑行为^[15]。由于临床上抑郁和焦虑常有共病现象,所以检测抑郁动物模型的焦虑程度可以在一定程度上反映模型的表面效度,但需要与其他行为学检测方法合用。新奇抑制摄食实验共分 2 d:第一天为适应期,给药后 1 h,将动物放入方形敞箱适应 10 min。动物禁食不禁水 48 h 后,在敞箱中心放置一食丸,将动物背对食丸放入,保持每次同一位

置、同一方向,观察并记录动物自放入笼中至首次摄取食物的时间,每次 5 min,以动物开始咬食食丸为摄食标准^[16]。

2 结构效度 (constructive validity)

结构效度是指抑郁动物模型与抑郁症患者需要具有相同的病理生理学基础和发病机制^[17],因此,结构效度的评价主要依赖于实验室检查。在应激性抑郁动物模型中,慢性应激模型尤其是 CUMS 模型具有良好的结构效度,而 FST 模型和 TST 模型的结构效度较差^[18]。

2.1 下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴)

HPA 轴功能亢进被广泛认为是抑郁症的发病机制之一,也是各类应激性抑郁动物模型最常用的检测指标。HPA 轴活动增高是抑郁症患者常见的神经生物学异常表现之一^[19]。应激引起大脑前额皮质和海马区域的神经细胞萎缩与凋亡,并导致 HPA 轴兴奋,促使皮质酮为主的糖皮质激素过度释放,糖皮质激素受体表达降低及功能失敏,不能正常进行其负反馈抑制,损伤海马组织等,引起学习记忆功能改变^[20]。地塞米松通过激活大鼠垂体的 I 型肾上腺类固醇受体而抑制 HPA 轴功能,用于评估 HPA 轴的亢进水平^[21]。1989 年,Greenberg 等应用地塞米松抑制实验 (DST) 对获得性无助模型进行评价。具体方法为:在对大鼠进行行为学测试后的第二天下午 4:00 用二氧化碳麻醉所有大鼠,经心脏穿刺取 2 mL 血液,皮下注射地塞米松 (100 μg/g),24 h 后重复采血测定,采用放射免疫分析法对血浆皮质酮浓度进行测定和分析^[22]。

2.2 单胺类神经递质

单胺类递质假说也被认为是抑郁症发病机制之一。该假说认为脑内 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 等神经递质含量不足或功能低下可导致抑郁^[23]。几十年来,对 LH 模型的神经化学机制的研究一直集中在单胺类物质上,单胺类神经递质检测成为 LH 模型的主要评价方法^[24],也可以用于其他慢性应激性抑郁动物模型的评价。具体方法为:各组大鼠末次给药 30 min 后处死,冰上迅速剥离大脑皮层和海马部位,称重制备匀浆后离心,检测 5-HT、5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、DA、高香草酸 (HVA)、二羟基苯乙酸

(DOPAC)和NE浓度^[25]。

2.3 脑源性营养因子(BDNF)

抑郁症发病机制中,神经营养因子假说得到了越来越多证据的支持,许多抗抑郁药物通过调节脑内BDNF发挥作用^[26]。在多数抑郁症患者和抑郁动物模型中,BDNF的含量均低于正常水平,但也有些研究发现慢性应激模型中BDNF水平没有变化^[27],因此该指标较少用于评价其结构效度。BDNF水平测定的具体方法为:动物使用氯胺酮麻醉,取海马组织放在冰上,制备海马组织匀浆。然后进行匀浆离心,分离上清液,用ELISA试剂测定BDNF含量^[28]。

2.4 炎症因子

炎症和神经组织退化导致抑郁假说由Maes等提出。该假说认为抑郁症的神经变性和神经发生减少是由炎症、细胞介导的免疫激活及其长期后遗症引起的^[29]。应激导致中枢神经系统中促炎细胞因子的表达增加和各种炎症相关通路的激活,在慢性应激性抑郁动物模型中,可以检测到IL-1 β , IL-6 and TNF α 水平增加^[30],在LH模型中可以检测到IL1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-3, IL-10等水平增加^[31],故该指标多用于评价这两类模型。

2.5 氧化应激损伤

氧化应激产生的自由基造成蛋白质、核酸、膜脂质等氧化,从而导致细胞发生退变甚至死亡,被认为是抑郁症发病机制之一^[32]。通过常规生物化学方法测定动物模型大脑皮质丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力可以用于评价氧化应激水平^[33],多与其他指标联合评价应激性抑郁动物模型。

2.6 非单胺类神经递质

目前多项研究表明,非单胺类神经递质在抑郁症的发病机制中也起着重要作用。例如 γ -氨基丁酸(GABA)^[34]、谷氨酸^[35]、肽类^[36]和大麻素^[37]等,有望为应激性抑郁动物模型的结构效度的评价提供新的生化指标。

3 预测效度(perspective validity)

预测效度主要指抑郁动物模型能够很好地区分对抑郁的有效和无效治疗。除测试动物模型对经典的三环类抗抑郁药物、单胺氧化抑制剂之外,还应测试对电休克疗法以及一些非典型的或第二代抗抑郁

药的反应^[38]。一系列研究表明:应激性抑郁动物模型都具有较好的预测效度。其中FST、TST和习得性无助(LH)模型对急性抗抑郁治疗敏感,常用于抗抑郁药物初筛。慢性不可预知轻度应激(CUMS)模型对慢性抗抑郁治疗敏感,常用于抑郁症发病机制以及抗抑郁药物作用机制的研究^[39]。黄晓雪和张锦坤利用小鼠CUMS模型证明咖啡因对小鼠抑郁行为有改善作用,且该行为改善作用不是通过兴奋大脑皮层所致,提示咖啡因具有潜在的抗抑郁性^[40]。

综上所述,由于目前应用的应激性动物模型很难同时具有较高的表面效度、结构效度和预测效度,造模时应合理选择动物模型,并结合多种评价方法综合评价,用以满足实验目的和实验需要。目前,对抑郁症相关的脑内生物标记物研究力度正在加强^[41],为应激性抑郁动物模型的结构效度评价提供了新思路。随着抑郁症临床治疗和基础研究的紧密结合发展,一方面将对抑郁症的发病机制得到更深的认识,开发出新的抑郁药物作用靶点;另一方面将进一步完善抑郁动物模型的评价标准,开发出较为完美的抑郁动物模型。

参考文献

- [1] Willner P. Animal models of depression: An overview [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1990, **45**(3): 425-455.
- [2] Willner P. The validity of animal models of depression [J]. *Psychopharmacology*, 1984, **83**(1): 1-16.
- [3] Geyer M A, Markou A. Animal models of psychiatric disorders. In: Bloom F E, Kupfer D (eds) *Psychopharmacology: fourth generation of progress*. American college of Neuropsychopharmacology, Nashville, 1995.
- [4] Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, *et al.* Animal models of major depression and their clinical implications [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2016, **64**: 293-310.
- [5] Wingo A P, Velasco E R, Florido A, *et al.* Expression of the PPM1F Gene Is Regulated by Stress and Associated With Anxiety and Depression [J]. *Biological Psychiatry*, 2018, **83**(3): 284-295.
- [6] Cryan J F, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice [J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2005, **29**(4): 571-625.
- [7] Porsolt R D, Anton G, Blavet N, *et al.* Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1978, **47**(4): 379-391.

- [8] Valvassori S S, Varela R B, Quevedo J. Chapter 38-Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression A2-Conn, P. Michael [M]. Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition). Academic Press. 2017: 991-1001.
- [9] Hall C, Ballachey E L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology [J]. University of California Publications in Psychology, 1932, **6**:1-12.
- [10] 周波, 文敏, 李宏伟, 等. Matlab 在旷场实验行为视频分析中的运用 [J]. 贵阳医学院学报, 2013, (2): 164-165+168.
- [11] Nestler E J, Hyman S E. Animal models of neuropsychiatric disorders [J]. Nature Neuroscience, 2010, **13**(10):1161-1169.
- [12] Song W, Guo Y, Jiang S, *et al.* Antidepressant Effects of the Ginsenoside Metabolite Compound K, Assessed by Behavioral Despair Test and Chronic Unpredictable Mild Stress Model [J]. Neurochemical Research, 2018, **43**(7):1371-1382.
- [13] Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, *et al.* Stress-Induced Anhedonia in Mice is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration [J]. Neuropsychopharmacology, 2004, **29**:2007-2017.
- [14] Ducottet C, Belzung C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice [J]. Physiology & Behavior, 2004, **81**(3): 417-426.
- [15] Dulawa S C, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2005, **29**(4): 771-783.
- [16] 姜宁, 范琳犀, 杨玉洁, 等. 金钗石斛提取物对慢性不可预见应激模型小鼠的抗抑郁作用 [J]. 生理学报, 2017, (2): 159-166.
- [17] Abela H M, Reus G Z, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression [J]. Revista Brasileira de Psiquiatria, 2013, **35**(supplement 2):S112-S120.
- [18] Willner P, Mitchell P J. The validity of animal models of predisposition to depression [J]. Behavioural Pharmacology, 2002, **13**(3): 169-188.
- [19] Pariante C M, Lightman S L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments [J]. Trends in Neurosciences, 2008, **31**(9): 464-468.
- [20] 罕园园, 代解杰. 抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展 [J]. 中国实验动物学报, 2016, **24** (3):321-326
- [21] Miller A H, Spencer R L, Pulera M, *et al.* Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: Implications for the dexamethasone suppression test [J]. Biological Psychiatry, 1992, **32**(10): 850-869.
- [22] Greenberg L, Edwards E, Henn F A. Dexamethasone suppression test in helpless rats [J]. Biological Psychiatry, 1989, **26**(5): 530-532.
- [23] Holmes A, Heilig M, Rupniak N M J, *et al.* Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2003, **24** (11): 580-588.
- [24] Ménard C, Hodes G E, Russo S J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies [J]. Neuroscience, 2016, **321**:138-162.
- [25] 张荣, 董世芬, 倪博然, 等. 白金胶囊对 CUMS 诱导的抑郁症大鼠模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, **25**(7): 46-52.
- [26] Schmidt H D, Duman R S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior [J]. Behavioural Pharmacology, 2007, **18**(5-6): 391-418.
- [27] Kuroda Y, McEwen B S. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus [J]. Molecular Brain Research, 1998, **59** (1): 35-39.
- [28] Yousefian Z, Khaleghian A, Parsaei H, *et al.* Effect of Vitamin D on Hippocampus Brain-Derived Neurotrophic Factor Level in Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats [J]. Middle East J Rehabil Health Stud, 2018, **5**(2): e63901.
- [29] Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, *et al.* The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression [J]. Metabolic Brain Disease, 2009, **24**(1): 27-53.
- [30] Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, *et al.* In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011, **35**(3): 744-759.
- [31] Hodes G E, Kana V, Menard C, *et al.* Neuroimmune mechanisms of depression [J]. Nature Neuroscience, 2015, **18** (10):1386-1393.
- [32] Yager S, Forlenza M J, Miller G E. Depression and oxidative damage to lipids [J]. Psychoneuroendocrinology, 2010, **35**(9): 1356-1362.
- [33] 刘任, 邱红梅, 姚欣凯, 等. 丙戊酸钠抗抑郁作用涉及改善氧化应激平衡和提升脑源性神经营养因子表达 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, (5): 481-485.
- [34] Boldizsár C, Kalangyáné V Z K, Kim H, *et al.* Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences [J]. Hippocampus, 2015, **25**(3): 393-405.
- [35] Veeraiha P, Noronha J M, Maitra S, *et al.* Dysfunctional Glutamatergic and γ -Aminobutyric Acidergic Activities in Prefrontal Cortex of Mice in Social Defeat Model of Depression [J]. Biological Psychiatry, 2014, **76**(3): 231-238.
- [36] Shao W H, Chen J J, Fan S H, *et al.* Combined Metabolomics and Proteomics Analysis of Major Depression in an Animal Model: Perturbed Energy Metabolism in the Chronic Mild Stressed Rat Cerebellum [J]. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2015, **19**(7): 383-392.

[37]

Segev A, Rubin A S, Abush H, *et al.* Cannabinoid Receptor Activation Prevents the Effects of Chronic Mild Stress on Emotional Learning and LTP in a Rat Model of Depression [J]. Neuropsychopharmacology, 2014, **39**:919-933.

[38]

Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm case [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 1986, **10**(6): 677-690.

[39]

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation [J]. Psychopharmacology, 1997, **134**(4): 319-329.

[40]

黄晓雪, 张锦坤. 咖啡因对 CUMS 抑郁模型小鼠行为的影响 [J]. 实验动物科学, 2014, **31**(3): 15-20.

[41]

苑杰, 严辞, 刘昊, 等. 抑郁症生物标志物研究进展 [J]. 国际精神病学杂志, 2015, (2): 103-107

Research Progress on Evaluation Methods of Stress Depression Animal Models

QU Shuyuan, PANG Baoxing

(The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao University School of Stomatology, Qingdao 266003, China)

Abstract: Depression is a common mood disorders caused by a variety of reasons, with significant and lasting low mood as the main clinical features, and the low mood don't match the situation. Some serious patients can appear suicidal thoughts and behaviors. The study of animal models of depression is the basis of the mechanism study of depression and the development of clinical drugs. Among them, stress model has become the most commonly used animal model of depression, which is widely used in basic research of depression, because the inducement that simulates depressive illness is quite sufficient and the modeling method is simple. In this paper, the main method to evaluate stress animal models are summarized, which provides a reference for the modeling of stress depression animal models.

Key words: Depression; Stress animal model; validity