



长期精神紧张建立抑郁症模型*

龚宇¹ 徐腾鹤¹ 钱婷婷¹ 罗颖¹ 陈浩¹ 赵丽君¹ 吴晓光²

(1.承德医学院,承德 067000)(2.承德医学院基础医学研究所,承德 067000)

摘要:目的 采用长期精神紧张刺激建立动物抑郁症模型。方法 选用C57BL/6 J雄性4周龄小鼠17只,体质量(11.05±1.65)g,随机分为对照组、长期精神紧张刺激(LTMS)组。LTMS组单笼饲养并连续21 d每天给予猫惊吓3 h和剥夺睡眠12 h。实验组通过测定摄食量变化和高架十字迷宫实验、旷场实验、强迫游泳行为学变化来判断建模是否成功。结果 与对照组相比,LTMS组摄食量明显降低($P<0.01$),强迫游泳不动时间显著延长($P<0.01$)。旷场试验中,LTMS组小鼠穿越格数和直立次数均明显少于对照组,差异具有极显著性($P<0.01$)。高架十字迷宫实验中,LTMS组小鼠闭合臂停留时间明显延长,差异具有极显著性($P<0.01$);进入开臂次数比例减少,差异具有显著性($P<0.05$)。结论 长期精神紧张模型表现出行为绝望、活动能力下降、兴趣丧失、焦虑与抑郁症临床表现相似的症状,可作为抑郁症模型。

关键词:抑郁症模型;长期精神紧张;C57BL/6 J小鼠

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)06-0023-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.005

近年来抑郁症的发病率逐年增高。据世界卫生组织最新统计,抑郁症影响到全球约20%的人群,预计到2020年,抑郁症将在医疗疾患排名中居第2位^[1]。抑郁症的发病机制十分复杂,目前的研究未能完全阐明疾病的病因,为特效药物研发和临床治疗造成了极大的难度^[2]。抑郁症动物模型制作若能相对简单方便、成熟稳定,对于研究其致病机制和开发抗抑郁药物具有重要的作用。目前关于抑郁症动物模型有许多种,如习得性无助、慢性不可预见性刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)、母婴分离、社会挫败等^[3],多采用长期不可预见、轻度的应激以模拟人在生活中经历的负性生活事件进行造模。许多临床调查表明^[4],长期经历负性事件是导致抑郁症的主要危险因素之一。现代人们在面对着逐步加快的生活节奏和日趋激烈的社会竞争时,长期的精神高度紧张成为常态,而这可能是抑郁症发病的重要原因之一。本模型采用长期惊吓和睡眠剥夺使小鼠长期处于精神紧张状态,

造模后进行抑郁行为学测试,探究长期精神紧张与抑郁症的关系,为开展有关抑郁症的发病机制及药物研发提供动物模型基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6 J雄鼠小鼠(4周龄)17只,SPF级,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2014-0004。饲养于清洁级环境,实验期间所有小鼠均可以自由饮水、摄食,明暗周期为12 h/12 h(8:00—20:00),室温21~23℃,湿度50%~55%。适应性饲养1周。

1.2 仪器

小动物运动轨迹跟踪系统(购自上海欣软信息科技有限公司)。旷场行为测试箱,自制(长×宽×高为50 cm×50 cm×30 cm)。睡眠剥夺箱,自制(长×宽×高为60 cm×40 cm×30 cm),中央固定一直径30 mm平台。

收稿日期:2019-06-10

* 基金项目:承德医学院大学生科研资助项目(No.2018032)

作者简介:龚宇(1998—),男,本科,研究方向:人类疾病动物模型.E-mail:1164389173@qq.com

通信作者:吴晓光(1975—),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型.E-mail:ewxg@qq.com

1.3 模型建立

将 17 只雄性小鼠随机分为对照组 7 只、长期精神紧张刺激 (LTMS) 组 10 只。LTMS 组单笼饲养。对照组 7 只一笼饲养, 正常饲养, 每周测定摄食量, 刺激实验之后进行行为学实验。对 LTMS 组小鼠采用每天随机时间进行猫惊吓 3 h、睡眠剥夺 12 h 两种刺激, 连续 21 d。睡眠剥夺箱使用 60 cm×40 cm×30 cm 水箱, 水面深度足够淹没小鼠, 在中央放置直径 30 mm 圆台并高出水面 0.5 cm, 在水箱上方放置有鼠粮的铁网, 以确保小鼠的食物供给。猫吓操作在直径 1.2 米的旷场中, 将装有单只小鼠的铁笼放在中央, 吸引猫对小鼠惊吓, 为确保猫在长期实验中的兴趣, 实验前禁食并不定期给予活鼠奖励。

1.4 行为学评价

1.4.1 摄食量测定:参考汤球等^[5]操作方法, 分别于刺激的第 0 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天早上 8:00 给小鼠添加食物 50 g, 次日早上 8:00 称取每只小鼠的食物残余量, 计算其 24 h 摄食量。同时对小鼠称质量, 以 24 h 内消耗食物量 (mg)/体质量 (g) 作为食物消耗量。同笼的小鼠要分开孤笼测量。

1.4.2 旷场实验:用旷场实验 (open field test, OFT) 检测小鼠活动度和对陌生环境探索的行为程度, 水平和垂直运动的次数是旷场实验主要观察指标^[6]。刺激造模 21 d 之后在安静、适宜小鼠的环境中, 将小鼠放置于旷场敞箱 (50 cm×50 cm×30 cm) 底面中心, 箱壁四周及底面为白色。底面划分为 9 个等边方格。旷场观察实验时间为 5 min。将小鼠放入中心方格内, 摄像记录 5 min 内穿越格数 (以重心越过为准), 记录小鼠在旷场中的运动路程、穿越格数 (水平活动得分) 和前肢均离地或攀壁的直立次数 (垂直活动得分)。每次实验后用 75% 酒精对旷场装置进行清理, 消除异味。

1.4.3 高架十字迷宫实验:高架十字迷宫由开放臂 (30 cm×5 cm)、闭合臂 (30 cm×5 cm×15 cm) 和两臂汇合的中央区 (5 cm×5 cm) 组成, 距地面 50 cm。根据实验^[7], 于模型刺激 21 d 测试, 将小鼠放在中央区, 面对开臂方向, 观察动物在开臂和闭臂中的活动情况^[8], 实验在暗光、安静下进行, 观察 5 min, 记录小鼠进入开放臂次数、开放臂停留时间、进入闭合臂次数和闭合臂停留时间。

1.4.4 强迫游泳实验:强迫游泳实验主要记录小鼠在水中放弃挣扎不动的时间, 可以较好反映其低落情绪和绝望状态^[6]。参考 Porsolt 等^[9]的操作方法并根据具体条件稍作修改, 于模型刺激 21 d 测试, 实验前为减少小鼠紧张感, 提前 1 h 将小鼠移至安静的实验室。实验时将小鼠置于直径 15 cm 的上方开口的透明圆柱形容容器之中, 水深 15 cm, 水温 (23±2) °C, 持续 6 min, 全程通过摄像机记录, 统计后 5 min 内小鼠不动的总时间。每只小鼠实验后换水并清洗侧壁以防止残留气味影响实验。小鼠在水中确保头部浮起并停止挣扎或偶尔滑动并保持漂浮判断为不动状态^[10]。

1.5 统计学方法

所有实验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 摄食量变化

结果见表 1。与对照组相比, 第 1 周摄食量上升, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。第 14 天摄食量下降, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 第 21 天摄食量明显下降, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。

表 1 两组小鼠食物消耗量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Two groups of mice food consumption ($\bar{x} \pm s$)

组别 group	<i>n</i>	应激前 Before the stress	应激第 7 天 Stress 7 th	应激第 14 天 Stress 14 th	应激第 21 天 Stress 21 th
LTMS 组 LTMS group	10	218.85±64.75	244.28±85.26	223.71±38.30	209.00±34.78*
对照组 The control group	7	219.14±23.92	214.71±26.76	242.14±29.12	243.42±28.78

注: 与对照组比较 * $P < 0.01$

Note. compared with the control group * $P < 0.01$

2.2 行为学各项指标变化

见表 2。与对照组相比,LTMS 组强迫游泳实验中不动时间明显延长,差异具有极显著性($P < 0.01$)。旷场试验中,LTMS 组小鼠穿越格数和直立

次数均明显少于对照组,差异具有极显著性($P < 0.01$)。高架十字迷宫实验中,LTMS 组小鼠闭合臂停留时间明显延长,差异具有极显著性($P < 0.01$),开臂进入次数占比次数减少,差异具有显著性($P < 0.05$)。

表 2 两组小鼠行为学指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 two groups of mice behavior index comparison($\bar{x} \pm s$)

组别 group	n	强迫游泳/s Forced swimming/s	旷场实验 Open field experiment		高架十字迷宫实验 Viaduct cross maze experiment	
			穿越格数 Through the number	直立次数 Number of vertical	闭合臂停留时间/s Dwell time of closed arm/s	进入开放臂次数比例/% Ratio of times of entering open arm/%
LTMS 组 LTMS group	10	263.91±15.27*	51.42±35.88*	24.14±14.30*	280.77±17.13*	0.07±0.08 [#]
对照组 The control group	7	107.74±27.07	97.57±19.79	54.57±16.29	136.66±37.81	0.56±0.38

注:与对照组比* $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$

Note. compared with the control group,* $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$

3 讨论

抑郁症是一类以思维迟缓、情绪低落、主动性下降和兴趣减低等精神运动性迟滞症状为主要表现的心境障碍综合征^[11]。一个符合临床表现且稳定的抑郁模型是研究致病机制和抗抑郁药物的重要前提,目前建模的方法很多,如应激模型、损伤模型、化学药物诱导和基因型改变等。以慢性不可预见性刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)最常用^[12],但是通过 CUMS 最后所得的抑郁症动物模型实际操作过程的工作量较大,难以复制。动物模型的衡量标准为表面效度、结构效度和预测效度,表面效度指模型具有相似的临床表现,结构效度则是具有相应的病理生理学的改变,而模型的疾病表现可被有效的药物逆转为预测效度^[13]。本研究通过研究长期精神紧张刺激建立模型,通过模拟长期精神打击来提高实验结果的可信度。参照孙秀萍等^[14]提出的旷场试验、强迫游泳和高架十字迷宫等抑郁行为实验方法,观察动物模型在长期应激作用时是否出现快感缺失、行为绝望和获得性无助等情绪表现。从而判断长期恐惧所造成的精神紧张在抑郁症发病中的作用。

本实验通过利用小鼠对于猫的恐惧结合睡眠剥夺刺激造模,模拟出抑郁症患者长期精神紧张表现。猫作为小鼠的天敌,在恐吓实验中会造成鼠神经行为学功能退化、单胺类神经递质含量下降等表

现^[15]。高江晖等^[16]报道,C57BL/6 小鼠在睡眠干扰环境中会产生类抑郁样行为学改变,且随干扰时间延长,抑郁症表现程度也相应加重。姚丽华等^[17]研究认为在抑郁模型中孤养比群居更具有长期稳定性,本研究结合猫吓鼠、剥夺睡眠和孤养造模,相对于慢性不可预见性刺激模型的造模时间长、劳动量大、结果不稳定和难以重复的缺点^[18],具有造模方法简单、易操作的优点,同时又模拟了更贴切实际的精神紧张刺激来提高模型可信度。

本实验造模前期,小鼠易激惹、焦躁,反抗性强,造模后期精神萎靡,被毛杂乱无光泽,反应迟钝。对比对照组,LTMS 组小鼠应激前摄食量差异无显著性,在第 7 天摄食量增加,除了与小鼠处于快速生长期有关,前期的精神紧张刺激可能加剧了小鼠摄食量,LTMS 组小鼠在第 14 天之后摄食量减少,在第 21 天摄食量明显减少并有显著性差异。同时小鼠体质量增长也缓慢,提示长期的猫吓和睡眠剥夺影响了小鼠进食欲望,并导致其生长迟缓。第 28 天时,模型组小鼠被毛暗淡,活动性差且外物刺激时反应迟钝。造模期间 3 只小鼠死于刺激,死亡率为 30%。强迫游泳实验中将小鼠放在盛水的圆柱容器内,最初在水中表现出剧烈挣扎并试图逃脱,但当发现无法逃脱时便停止挣扎,头部露出水面保持一种在水中漂浮不动的状态,此状态称为“行为绝望”^[15]。本实验中,LTMS 组小鼠不动时间显著性延长,表现出了行为绝望状态。旷场试验中,小鼠穿越水平格数和站立次数可以反映活动度和探究行

为^[19]。LTMS 组小鼠穿越格子数(水平运动)和直立次数(垂直运动)较对照组明显减少,反映了小鼠的活动度降低和对新鲜环境的探索欲望降低。高架十字迷宫实验中,小鼠在与外界环境相通的开臂中会有一些的新奇性和探索欲望,小鼠由于嗜暗性会倾向于在闭臂中活动,但出于好奇心和探究性又会在开臂中活动^[20]。焦虑抑郁水平高的小鼠会退缩到闭臂中,反之对开臂的探究次数则增多^[21]。本研究结果显示,LTMS 组小鼠进入开臂的次数比例显著下降,且在闭臂时间显著增加,提示产生焦虑行为。

综上所述,长期精神紧张刺激模型表现出的行为绝望、活动能力下降、兴趣丧失和焦虑与抑郁症临床表现相似,且结合孤养模拟了抑郁症发病的常见因素,成功地建立了符合表面效度的小鼠抑郁模型。

参 考 文 献

[1] Dennis C L, Brown H K, Morrell J. Interventions (other than psychosocial, psychological and pharmacological) for preventing postpartum depression [M]. The Cochrane Library. John Wiley & Sons, Ltd, 2016.

[2] Vieta E, Valenti M. Pharmacological management of bipolar depression: acute treatment, maintenance, and prophylaxis [J]. CNS Drugs, 2013, **27**(7):515-529

[3] 孙楠楠,沙龙泽,许琪. C57BL/6J 小鼠慢性束缚应激抑郁模型模型的建立 [J]. 中国医学科学院学报, 2015, **37**(1):8-11.

[4] 庞从妃,朱碧仪,蓝雪丹,等.慢性应激大鼠抑郁模型模型的建立 [J]. 右江民族医学院学报, 2016, **38**(4):355-358.

[5] 汤球,刘志学,崔淑芳,等.大鼠抑郁症模型的建立与评价 [J]. 实验动物科学, 2011, **28**(1):6-9.

[6] 丁少杰,鲁海,张春红.电针对抑郁模型鼠行为学影响的研究 [J]. 西部中医药, 2018, **31**(9):143-146.

[7] Colla A R, Rosa J M, Cunha M P, et al. Anxiolytic-like effects of

ursolic acid in mice. [J]. European journal of pharmacology, 2015, **758**:171-176.

[8] 孙秀萍,张楠,高杰,等.慢性束缚应激模型致焦虑和抑郁共病的行为学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, **25**(6):18-22.

[9] Porsolt R D, Bertin A, Jalfer M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, **229**(2):327-336.

[10] 杨茜,王静,裴双义.文拉法辛对抑郁模型大鼠认知功能及海马神经元凋亡的作用研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, **34**(11):1643-1648.

[11] Brhlikova P, Pollock A M, Manners R. Global Burden of Disease estimates of depression—how reliable is the epidemiological evidence [J]. J R Soc Med, 2011, **104**(1):25-34.

[12] 张磊阳,贺敏,李玥,等.抑郁症动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, **27**(9):92-97.

[13] Abelaira H M, Reus G Z, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression [J]. Revista Brasil Psiquiatria, 2013, **35**(Suppl 2):112-120.

[14] 孙秀萍,王琼,石哲,等.动物行为实验方法学研究的回顾与展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, **28**(3):1-7.

[15] 孙瑜嫣,李涛,孙理军.复合型肾虚体质大鼠神经行为及递质变化的实验研究 [J]. 中医药信息, 2016, **33**(1):42-45.

[16] 高江晖,卜兰兰,石哲,等.不同时间睡眠干扰所致小鼠的类抑郁样行为 [J]. 中国实验动物学报, 2011, **19**(5):405-409.

[17] 姚丽华,陈建新,王晓萍,等.慢性应激联合孤养 C57 小鼠抑郁模型的研究 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2014, **23**(1):23-24.

[18] 薛涛,郭丽莎,刘新民,等.抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, **23**(3):321-326.

[19] 张鹏横,阮璐薇,卓泽伟,等.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 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, **28**(9):100-103.

[20] 牛晨旭,郝瀚,张海林.啮齿类动物抑郁症模型的行为学检测方法 [J]. 河北医科大学学报, 2015, **36**(3):370-372.

[21] 信欣,韦彩川,毕文鹏,等.慢性束缚应激模型致焦虑和抑郁共病的行为学研究 [J]. 延边大学学报, 2017, **40**(2):92-96.

(下转至第 32 页)

Determination of Growth Curves and Hematological Parameters of SPF Hartley Guinea pigs core population

WU Weiguo, FAN Tao, WANG Hong, WANG Xuewen, LIU Zuomin, LIU Quanming

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective Measured the growth weight and blood physiological & blood biochemical parameters in SPF Hartley guinea pig core population. Compare with the hematological parameters of clean guinea pig. **Method** 10 guinea pigs of each sex in the population were selected, and the body weight of 0~8 weeks old was recorded by weighing. Guinea pigs were collected blood, and all physiological and biochemical indexes were detected by automatic blood cell counting instrument and automatic blood biochemical analyzer. **Results** The WBC、NEUT、EOS have significant difference ($P < 0.05$), the PCT、MPV、LYM、LYM%、NEUT%、EOS%、BAS% have very significant difference ($P < 0.01$) between SPF male and female in blood physiological parameters. The ALP has significant difference ($P < 0.05$), the 3 indexes as BUN、CREA、CHO have very significant difference ($P < 0.01$) between SPF male and female in blood biochemical parameters. The results of comparison with CL guinea pigs show that WBC between SPF and CL of both sex, MCV、PLT between SPF and CL of female have no significant difference ($P > 0.05$), other indexes have very significant difference ($P < 0.01$) between SPF and CL guinea pigs. **Conclusion** The growth curve of SPF guinea pig was plotted. The hematological parameters of SPF guinea pigs are significantly different from sex and have very significant difference between SPF and clean guinea pigs.

Key words: Guinea pig; SPF; growth curve; blood physiological parameters; blood biochemical parameters

(上接第 26 页)

Depression Model for Chronic Mental Stress

GONG Yu¹, XU Tenghe¹, QIAN Tingting¹, LUO Ying¹, CHEN Hao¹, ZHAO Lijun¹, WU Xiaoguang²

(1. Chengde medical college, Chengde 067000, China) (2. Institute of Basic Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

Abstract: Objective Depression model was established with long-term mental stress stimulation. **Method** Seventeen male C57BL/6 J mice aged 4 weeks body weight (11.05 ± 1.65) g were randomly divided into control group and LTMS group. In the LTMS group, the cats were kept in a single cage for 21 consecutive days and were given shock for 3 h and sleep deprivation for 12 h. The experimental group judged whether the modeling was successful or not by measuring the change of food intake, the overhead cross maze experiment, the open field experiment and the change of forced swimming behavior. **Result** Compared with the control group, the food intake of LTMS group was significantly reduced ($P < 0.01$), and the forced swimming time was significantly prolonged ($P < 0.01$). In the open-field experiment, the number of traversal and the number of upright position of LTMS group mice were significantly less than that of the control group, and the difference was extremely significant ($P < 0.01$). In the overhead cross maze experiment, the residence time of the closed arm of LTMS group mice was significantly prolonged, and the difference was extremely significant ($P < 0.01$), and the proportion of the times of entering the open arm was reduced, and the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The long-term mental stress model can be used as the depression model because it shows the similar symptoms of behavior despair, decreased activity ability, loss of interest, anxiety and clinical manifestations of depression.

Key words: Depression model; Chronic mental stress; C57BL/6 J mice