

田骄, 苏芮, 王婷婷, 等. 聚肌胞苷酸复合游泳诱导的慢性疲劳综合征模型小鼠行为学中品系及性别差异研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 24-33.

Tian J, Su R, Wang TT, et al. Strain and gender differences in behavioral models of chronic fatigue syndrome induced by polyinosinic-polycytidylic acid and swimming in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 24-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.004

聚肌胞苷酸复合游泳诱导的慢性疲劳综合征模型小鼠行为学中品系及性别差异研究

田 骄^{1#}, 苏 芮^{1#}, 王婷婷^{1,2}, 裴海鸾^{1,2}, 王 晶^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 北京 100071)

【摘要】 目的 比较 ICR 和 C57BL/6J 两个品系小鼠建立的慢性疲劳综合征模型行为学中品系及性别的差异, 为慢性疲劳综合征模型动物的选择提供实验依据。**方法** ICR 和 C57BL/6J 小鼠, 雌雄各半, 通过每隔 3 d 腹腔注射聚肌胞苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid, Poly I:C) 复合每天游泳, 连续造模 15 d, 造模期间测定小鼠体重、进食量并进行疲劳量表评分, 造模结束后进行行为学测定, 包括力竭游泳、悬尾、机械痛阈和高架十字迷宫。**结果** 与对照组相比, 两种品系模型组小鼠力竭游泳时间均显著缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 悬尾不动时间显著延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 机械痛阈显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 两品系雄性模型鼠高架十字迷宫进入开放臂时间及次数显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), C57BL/6J 雄性模型鼠体重显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ICR 雌性模型鼠体重显著降低 ($P < 0.05$) 后有所升高。C57BL/6J 对照组小鼠力竭游泳时间显著低于 ICR 对照组小鼠 ($P < 0.01$)。C57BL/6J 模型组小鼠悬尾不动时间显著高于 ICR 模型组小鼠 ($P < 0.01$)。**结论** 两品系小鼠在体重、疲劳程度及抑郁程度方面均有差异; 同品系小鼠的雌性与雄性之间存在差异, 雄性鼠焦虑程度重于雌性鼠。

【关键词】 慢性疲劳综合征; 聚肌胞苷酸; 病毒感染; 品系差异

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0024-10

Strain and gender differences in behavioral models of chronic fatigue syndrome induced by polyinosinic-polycytidylic acid and swimming in mice

TIAN Jiao^{1#}, SU Rui^{1#}, WANG Tingting^{1,2}, PEI Hailuan^{1,2}, WANG Jing^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China.

2. Beijing Tongrentang Technologies Co. Ltd Pharmaceutical Factory, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To compare strain and gender differences between ICR and C57BL/6J mouse chronic fatigue syndrome models and provide experimental evidence for the selection of model animals for chronic fatigue syndrome. **Methods** ICR and C57BL/6J mice (half male and half female) were injected intraperitoneally with polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C) every three days and forced to swim daily. The modeling was performed for 15 consecutive days, during which the weight and food intake of the mice were measured, and fatigue scores were assessed. After the modeling was completed, behavioral tests were carried out, including exhaustive swimming, tail suspension, mechanical pain threshold, and elevated plus maze. **Results** Compared with the control group, both strains of model mice had

【基金项目】 国家重点研发计划 (2019YFC1711400)。

【作者简介】 田骄 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经药理学。E-mail: tianjiao_324@163.com

苏芮 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经药理学。E-mail: surui080620@126.com [#]共同第一作者

【通信作者】 王晶 (1973—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 神经药理及消化药理。E-mail: wangj@bucm.edu.cn.

significantly decreased exhaustion times in the exhaustive swimming test ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significantly increased immobility time in the tail suspension test ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and a significantly decreased mechanical pain threshold ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and male model mice had significantly decreased open arm entry time and frequency in the elevated plus maze ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The weight of model male C57BL/6J mice significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The weight of model female ICR mice increased after a significant reduction ($P < 0.05$). The exhaustion time of control C57BL/6J mice was significantly lower than that of control ICR mice ($P < 0.01$). The immobility time of model C57BL/6J mice was significantly greater than that of model ICR mice ($P < 0.01$). **Conclusions** There were differences between the two strains of mice in terms of weight change, fatigue level, and depression. Within the same strain, there were differences between males and females, and the anxiety level of males was higher than that of females.

[Keywords] chronic fatigue syndrome; polyinosinic-polycytidylic acid; virus infection; strain difference

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome, CFS) 以严重疲劳症状为主要表现, 该疲劳症状持续时间大于 6 个月, 无法通过休息缓解, 同时可伴有咽痛、肌肉关节痛、急性呼吸道感染、抑郁、焦虑、睡眠障碍、注意力不集中等多种症状^[1-2]。近年来 CFS 引起了研究者的关注, 但其病理机制迄今并不明确。有研究显示, CFS 与病毒感染有密切关联^[3-9]。例如 1984 年在美国 Lake Tahoe 地区居民广泛发生继发于 EB 病毒感染后的疲劳症状^[10]。在本研究中我们采用腹腔注射 Poly I:C 复合游泳的方法来诱导小鼠出现疲劳症状, 复制了模拟病毒感染诱导的 CFS 小鼠模型。Poly I:C 是一种由肌苷酸和胞苷酸聚合而成的双链 RNA, 常被用于模拟病毒感染, 诱发机体炎症反应。注射 Poly I:C 可激活 T 细胞, 增强巨噬细胞吞噬作用^[11]。众多学者的研究表明, 注射 Poly I:C 可导致实验动物出现明显疲劳症状^[12-13]、抑郁、焦虑样行为^[14]、发热、睡眠/觉醒周期紊乱^[15]和厌食。本研究通过复合每日游泳造成小鼠体力疲劳, 连续造模 15 d 后通过行为学测试评估 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠免疫疲劳复合体力疲劳模型的品系差异及性别差异。

动物模型普遍用于药物开发的非临床研究阶段。与大鼠及其他常见模型动物相比, 小鼠具备易于操作、可重复性高且成本低的优点^[16]。然而需要注意的是, 不同品系的小鼠在多种行为学实验中的表现存在着显著差异^[17-20]。C57BL/6J 小鼠在蔗糖消耗程度、强迫游泳实验、高架十字迷宫实验中表现更好, 且体重降低、脾指数下降及运动活动降低的幅度远高于其他品系。不同品系小鼠对药物的易感性也存在差异, 例如, 在强迫游泳实验与悬尾实验中, 抗抑郁药的药效存在小鼠品系差异^[21-22]。因此, 当我们在进行 CFS 相关动物实验研究时, 对

于模型小鼠品系的选择就显得至关重要。研究显示, 不同性别的动物在药物代谢动力学方面存在差异。临床上, 女性体重总体较低, 肌肉含量较少, 脂肪占比多, 对于亲脂性药物的吸收率较高; 但女性胃酸含量较少, 胃排空较慢, 可能会影响药物的代谢和排泄^[23]。在动物实验中, 由于雌性鼠易受雌激素波动的影响, 不易成功复制实验模型, 部分实验者会偏好仅采用雄鼠进行研究。国家食品药品监督管理局印发的关于新药研发技术的文件中明确指出, 如无特殊情况, 受试动物应雌雄兼用。本实验使用双性别小鼠, 探讨性别差异对于 CFS 模型动物行为学的影响。

考虑到不同品系以及同品系不同性别小鼠对 Poly I:C 易感性及行为学实验可能存在差异, 在本研究中, 我们选择了雌雄各半的近交系 C57BL/6J 小鼠和远交系 ICR 小鼠通过腹腔注射 Poly I:C 复合游泳建立 CFS 模型, 通过一般情况观察、力竭游泳测试、悬尾实验、机械痛阈测试和高架十字迷宫实验来评估两种模型动物之间的行为学差异以及性别差异, 为后续 CFS 模型动物的选择以及相关机制研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司的 SPF 级 3 周龄 ICR 小鼠 28 只, 雌雄各半, 体重 16~18 g; 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司的 SPF 级 5 周龄 C57BL/6J 小鼠 28 只, 雌雄各半, 体重 16~18 g [SCXK (京) 2019-0010]。饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室 [SYXK (京) 2020-0033]。实验期间, 保持动物饲养室相对温度为 (23.0 ± 1.0) °C, 相对湿度为 55%~65%, 光照条件为 12 h/

12 h 明/暗交替。实验动物自由进食及饮水。该实验通过了北京中医药大学动物伦理委员会审查 (BUCM-4-2022070502-3008; BUCM-4-2022102301-4020), 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

聚肌胞苷酸(赛普锐思(北京)科技有限公司, 批号:RH298024)。Von-Frey 纤维毛触痛仪;Noldus EthoVision XT9 采集分析系统(荷兰 Noldus 公司);小鼠高架十字迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司,型号:ZH-DSG)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验试剂的配制

精密称取 Poly I:C 粉末 40 mg,倒入 20 mL 容量瓶中,量取 14 mL 生理盐水溶解,定容至 20 mL,充分溶解,使其浓度为 2 mg/mL,现用现配。

1.3.2 CFS 小鼠模型的复制

小鼠适应性饲养后,根据动物体重及状态进行初步筛选,按照随机数字表法将 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠各分出 12 只作为对照组,其余小鼠作为模型组参与造模。造模组第一天上午进行游泳测定,小鼠负重自身体重的 5%进行游泳,记录首次下沉时间及下沉 3 s 潜伏期作为初始值。力竭游泳 2 h 后腹腔注射 Poly I:C(20 mg/kg),注射 2 h 后进行第二轮游泳测定,以第二次的下沉 3 s 潜伏期低于初始值的 60%作为小鼠出现疲劳的标准。筛选出出现疲劳的 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠各 12

只。之后对照组小鼠每隔 3 d 腹腔注射生理盐水 (0.1 mL/10 g),模型组小鼠每隔 3 d 腹腔注射 Poly I:C (20 mg/kg,0.1 mL/10 g),同时每天上、下午负重游泳,造模共进行 15 d。

1.3.3 小鼠一般情况观察

造模期间观察各组小鼠精神状态、毛发、粪便、进食量、活跃程度及体重变化。体重隔天记录,进食量每 3 d 测定 1 次。造模期间根据一般情况半定量评分表隔天观察小鼠的精神状态、粪便、耳尾颜色、皮肤和毛发的色泽情况,并按照表 1 进行评分(可交叉得分)。

1.3.4 力竭游泳实验

小鼠负重自身体重的 6%,放入水桶中(水深超过小鼠体长,水温 21~23 ℃),记录小鼠首次下沉时间及力竭时间,以小鼠口鼻沉入水中 6 s 仍不能返回水面上作为力竭标准。

1.3.5 悬尾实验

将小鼠尾巴前 1/3 处用医用胶布粘在自制悬尾仪上,使小鼠头部距桌面大约 12~15 cm,绑好小鼠同时计时 6 min,记录后 4 min 内小鼠的不动时间,以小鼠四肢不剧烈挣扎作为不动的标准。

1.3.6 高架十字迷宫实验

将小鼠头部面向开放臂放入十字迷宫中,使用 Noldus EthoVision XT9 采集分析系统记录 5 min 内小鼠在开放臂和封闭臂的时间(OT/CT)以及进入开放臂和封闭臂的次数(OE/CE)。最后根据以下

表 1 一般情况半定量评分表
Table 1 General semi-quantitative scoring table

值 Score	精神状态 Mental state	粪便 Feces	皮毛色泽程度 Color of the fur	耳尾颜色 Color of the ear and tail
0	神态安静,时而活泼好动,眼睛有神 Demeanor is quiet, sometimes lively and active, and the eyes are bright	粪便干,成形 Drying and molding feces	皮肤与脂肪连接紧密,皮毛光滑整齐 Skin is tightly connected to fat, and the fur is smooth and neat	红润光泽 Ruddy and gloss
1	易激怒好争斗,自主活动减少 Irritable and aggressive, with reduced voluntary activity	粪便黏软有形 Soft and tangible feces	皮肤略松弛,毛发枯黄无光泽 Skin is slightly loose and hair is yellow and dull	淡红少泽 Pale red and not gloss
2	懒动倦怠,眼神黯淡无光,反应能力降低 Lazy and tired, dull eyes, and reduced reflexes	粪便不成形,但不稀溏 Feces are not formed, but not loose	皮肤松弛易抓取,毛发干枯或接穗打卷,无光泽 Skin is loose and easy to grasp, and hair is dry or curled with scion, and dull	淡白少泽 Pale white and not gloss
3	精神萎靡,缩肩拱背,攻击性、对抗性行为减少 Listlessness, shrinking shoulders and arching back, less aggressive and confrontational behavior	粪便稀溏,绿褐黏腻恶臭 Feces are loose, greenish-brown sticky and foul-smelling	皮肤松弛,皮下无脂肪,抓之触骨:全身毛发枯稿,稀疏脱落 Skin is loose, there is no fat under the skin, and scratch touches the bones: the hair on the whole body is withered and sparsely shed	苍白或透青色 Pale or translucent blue

公式计算在开放臂停留时间及进入次数的比值。

$OT/\% = OT / (OT + CT) \times 100\%$, $OE/\% = OE / (OE + CE) \times 100\%$ 。

1.3.7 机械性缩足反射阈值(MTW)实验

将小鼠提前放置于实验笼中,待小鼠充分适应笼内环境后开始测量。选用质量为 1.0、1.4、2、4、6、8、10 g 的 Von-Frey 纤维毛刺激小鼠足下肉垫较薄处,采用 up-and-down 法进行测量,具体操作方法为:用中间克数的纤维毛刺激小鼠足下,小鼠产生逃避、缩足、舔足等疼痛反应,则为阳性反应,记作○,下一次刺激需选用质量小一级的纤维毛;若小鼠无以上反应,则为阴性反应,记作×,下一次刺激需选用质量大一级的纤维毛进行测定,当发生质变反应(阳性变阴性或阴性变阳性)时,再测定 4 次,按照公式计算出 50%引起阳性反应量(ED₅₀)。

$ED_{50} = 10^{\log a + k \times b}$;其中 a 为最后一次测试所对应的纤毛对应值;b 为所使用纤毛的对数差的平均值;k 为对应参数值。

1.4 统计学方法

本研究使用 IBM SPSS Statistics 25 统计学软件对实验数据进行统计学分析。所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。两组数据均符合正态分布及方差齐时采用独立样本 t 检验进行分析,方差不齐采用非参检验。统一设定 95%的置信区间,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Poly I: C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠体重的影响

结果如图 1 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 5、8、11 和 14 天显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠体重造模前无显著差异,

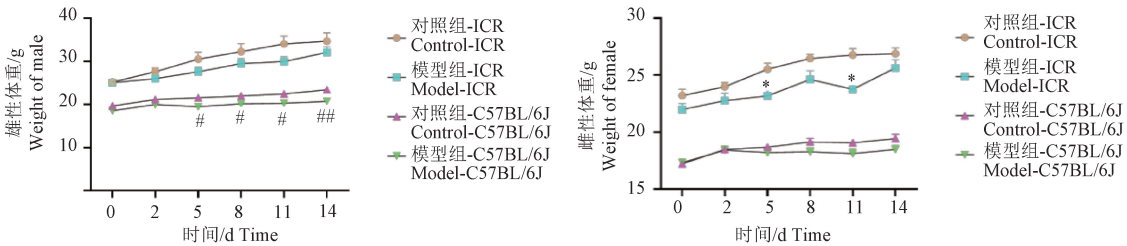
造模开始后第 8、11 和 14 天有降低的趋势,但无显著差异($P > 0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 5、8 和 11 天有降低的趋势,但无显著差异($P > 0.05$);ICR 模型组雌性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 5、8、11 和第 14 天有降低的趋势,其中第 5 天和第 11 天体重显著降低($P < 0.05$)。提示 Poly I: C 注射复合游泳可造成小鼠体重降低,C57BL/6J 雄性小鼠和 ICR 雌性小鼠体重下降更显著。

2.2 Poly I: C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠进食量的影响

结果如图 2 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠造模后第 11 天和第 15 天进食量有所降低;C57BL/6J 模型组雌性小鼠造模后第 3 天和第 15 天进食量有降低的趋势。ICR 模型组雄性小鼠造模后第 1、3 和 7 天进食量有所降低;ICR 模型组雌性小鼠造模后第 15 天进食量有所降低。提示 Poly I: C 注射复合游泳可造成小鼠食量下降,C57BL/6J 小鼠食量下降更明显。

2.3 Poly I: C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠疲劳量表评分的影响

结果如图 3 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4、8 和 12 天显著升高($P < 0.05$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4 天和第 8 天有升高的趋势,但无显著差异($P > 0.05$),第 12 天显著升高($P < 0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4 天和第 8 天显著升高($P < 0.05$),第 12 天有升高趋势($P > 0.05$);ICR 模型组雌性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4、8 和 12 天有升高的趋势,其中第 4 天和第 12 天显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示



注:与对照组-ICR 小鼠相比,* $P < 0.05$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 1 Poly I: C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠体重的影响

Note. Compared with control-ICR mice, * $P < 0.05$. Compared with control-C57BL/6J mice, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 1 Effects of Poly I: C injection combined swimming on body weight of ICR and C57BL/6J mice

Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠疲劳。

2.4 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠力竭游泳的影响

结果如图 4 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模

型组雄性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低 ($P<0.01$); C57BL/6J 模型组雌性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低 ($P<0.01$)。ICR 模型组雄性小鼠首次下沉时间及力竭时间与显著降低 ($P<$

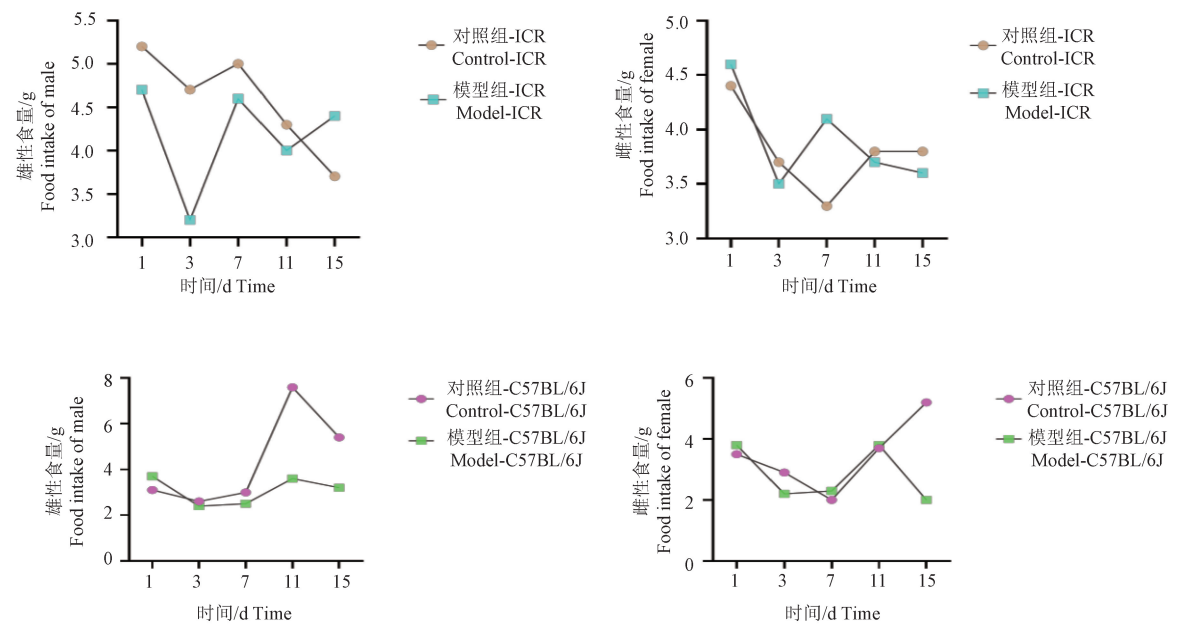
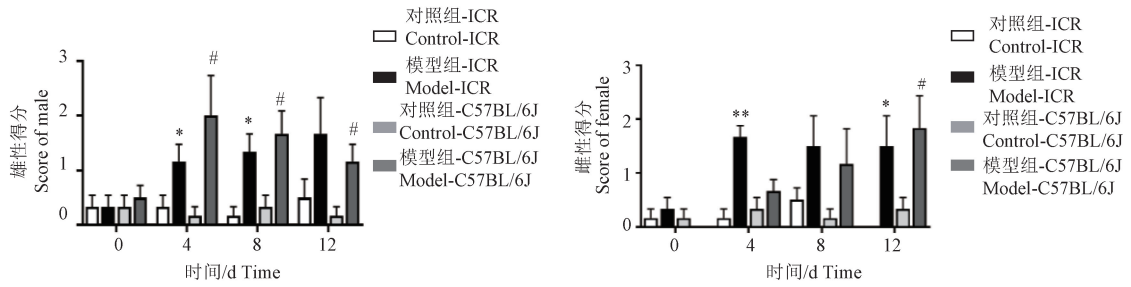


图 2 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠进食量的影响

Figure 2 Effects of Poly I:C injection combined swimming on food intake of ICR and C57BL/6J mice

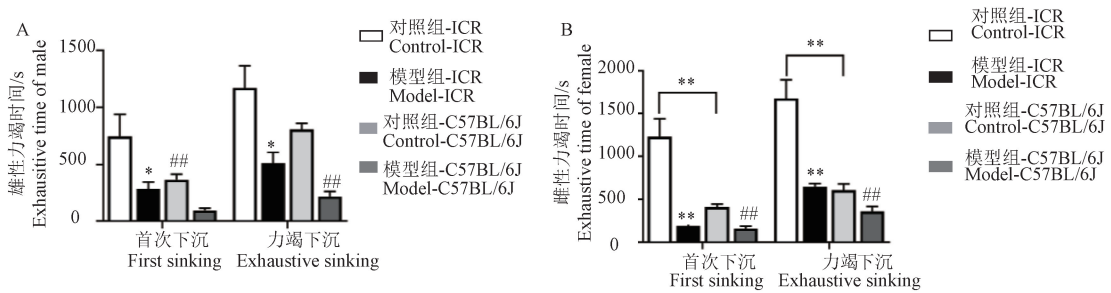


注:与对照组-ICR 小鼠相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比, $\#P<0.05$ 。

图 3 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠疲劳量表评分的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $*P<0.05$, $**P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, $\#P<0.05$.

Figure 3 Fatigue scale scores of ICR and C57BL/6J mice treated with combination of Poly I:C injections and swimming



注:与对照组-ICR 小鼠相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比, $\#\#P<0.01$ 。

图 4 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠力竭游泳的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $*P<0.05$, $**P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, $\#\#P<0.01$.

Figure 4 Effects of Poly I:C injection combined swimming shown by the exhaustive swimming test in ICR and C57BL/6J mice

0.05);ICR 模型组雌性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低($P<0.01$)。与 ICR 对照组雌性小鼠相比,C57BL/6J 对照组雌性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低($P<0.01$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠疲劳,C57BL/6J 雄性小鼠疲劳程度更显著。

2.5 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠悬尾不动时间的影响

结果如图 5 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.01$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.01$)。ICR 模型组雄性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.05$);ICR 模型组雌性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.05$)。与 ICR 模型组雄性小鼠相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠悬尾不动时间显著升

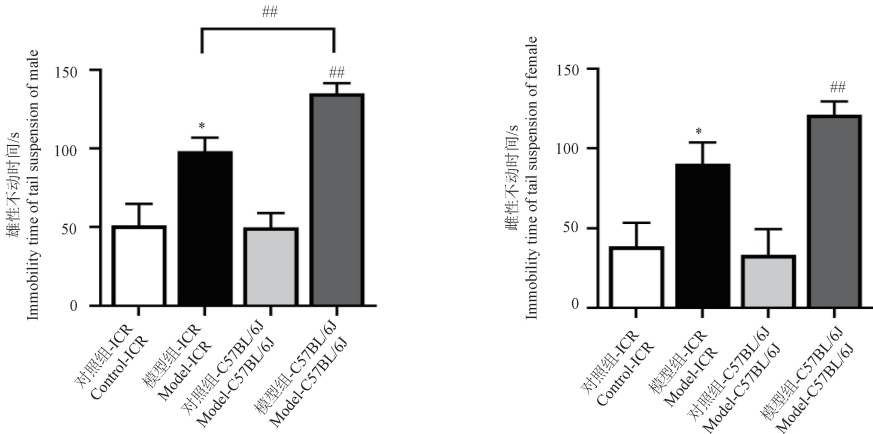
高($P<0.01$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可诱导小鼠出现抑郁情绪,C57BL/6J 小鼠抑郁情绪更显著。

2.6 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠机械痛阈的影响

结果如图 6 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.01$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.01$);ICR 模型组雌性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.01$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠痛觉降低。

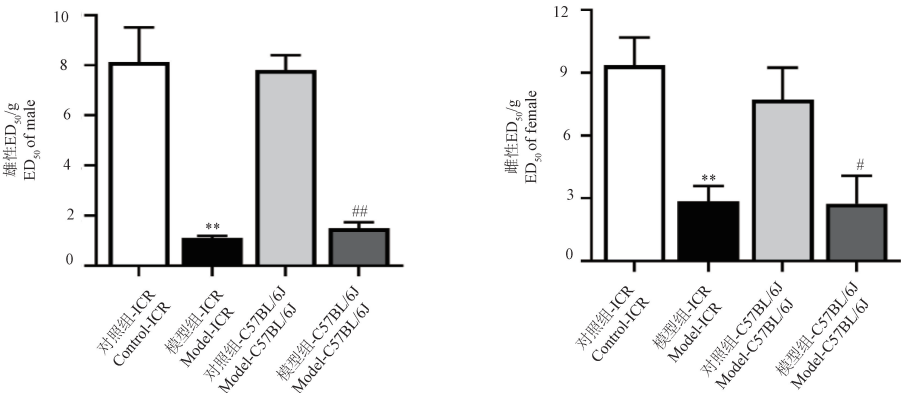
3.7 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠高架十字迷宫的影响

结果如图 7 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模



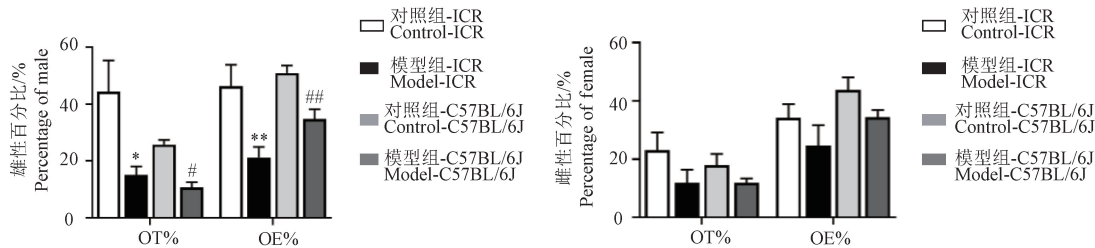
注:与对照组-ICR 小鼠相比, * $P<0.05$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比, ## $P<0.01$ 。
图 5 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠悬尾不动时间的影响
Note. Compared with control-ICR mice, * $P<0.05$. Compared with control-C57BL/6J mice, ## $P<0.01$.

Figure 5 Effects of Poly I:C injection combined swimming on immobility time in the tail suspension of ICR and C57BL/6J mice



注:与对照组-ICR 小鼠相比, ** $P<0.01$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 6 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠机械痛阈的影响
Note. Compared with control-ICR mice, ** $P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 6 Effects of Poly I:C injection combined swimming on mechanical pain threshold of ICR mice and C57BL/6J mice



注:与对照组-ICR 小鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 7 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠高架十字迷宫行为的影响

Note. Compared with control-ICR mice, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 7 Effects of Poly I:C injection combined swimming on the performance shown by the elevated plus maze in ICR and C57BL/6J mice

型组雌性小鼠 OT%及 OE%显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠 OT%及 OE%有降低的趋势 ($P>0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠 OT%及 OE%显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);ICR 模型组雌性小鼠 OT%及 OE%有降低的趋势 ($P>0.05$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可诱导小鼠出现焦虑情绪,雄性小鼠焦虑情绪更显著。

3 讨论

CFS 是于 1988 年由 Holmes 等^[24]首次提出,是一种特发性、异质性疾病,涉及多个器官系统的体内平衡失调。1994 年美国疾病控制与预防中心 (centers for disease control and prevention, CDC) 公布的 CFS 的诊断标准^[2]直至今日仍被广泛使用。该标准认为 CFS 是以持续长时间疲劳为主要特点的慢性全身性综合性症候群,疲劳超过 6 个月,且伴有以下 4 种及以上症状,包括短期记忆或注意力损害、喉咙痛、颈部或腋窝淋巴结触痛、肌肉酸痛、多发性非关节炎性关节疼痛、头痛、睡眠后精力不能恢复、体力或脑力劳动后 24 h 内持续不舒服及休息后也不能缓解其疲劳状态。后续研究发现 CFS 伴有其他并发症,如焦虑样、抑郁样、睡眠障碍等多种精神上的症状^[1]。CFS 涉及身体多个系统的内稳态失调,严重影响患者的生活、精神状态及工作效率。

CFS 的症状与大部分急性病毒感染有很多的相似之处,近年来对于病毒感染与 CFS 的相关性研究日益增多。系统分析结果显示,CFS 合并病毒感染类型主要有 EB 病毒^[5]、肠道病毒^[3,7-8]以及人类疱疹病毒^[4,6]等。

Poly I:C 是一种人工合成的病毒双链 RNA 类似物,为 toll 样受体-3 (toll-like receptor-3, TLR3) 激

动剂,可引发机体的固有免疫应答,出现与系统性病毒感染相当的炎症反应。作为目前被广泛应用的病毒感染模型,腹腔注射 Poly I:C 能够激活机体免疫系统,引起若干中枢和全身反应。有研究显示,外周注射 Poly I:C 后会引起大鼠疲劳,表现为跑步机活动时间及自发转轮活动时间持续减少 1 周以上^[25]。本研究采用每隔 3 d 腹腔注射 Poly I:C 复合每天 2 次负重游泳,导致 C57BL/6J 和 ICR 小鼠力竭游泳时间显著降低,悬尾不动时间显著增长,机械痛阈显著降低,高架十字迷宫中更倾向于进入闭合臂,表明该造模方式引起了小鼠体力及精神方面的疲劳。

有研究表明,啮齿动物长期以来被用于模拟情感和免疫缺陷及其相互作用研究^[26]。有研究表明小鼠似乎比大鼠更适合用于神经炎症诱导的抑郁症等精神异常模型,具有更好的敏感性和可信度^[26]。C57BL/6 小鼠是抑郁模型中使用频率最高的品系,其次是 ICR 小鼠^[26]。ICR 小鼠毛色白化,适应性强,体格健壮,繁殖力强,生长速度快,实验重复性较好,是国际通用的封闭群小鼠;然而作为远交系小鼠,ICR 小鼠同时具有遗传可变性的缺点^[27]。C57BL/6J 小鼠属于近交系小鼠,是 C57 小鼠亚系之一,毛发黑色,是实验动物小鼠中使用最广泛的品系之一,具有基因组序列全部清楚、寿命长等优点,适用于多种模型建造,例如 II 型糖尿病模型、肥胖模型及代谢综合征模型等。然而,关于 CFS 模型小鼠不同品系的行为学差异研究非常有限,这不利于 CFS 相关药物开发的深入研究。

我们的研究结果表明两种品系小鼠雌性与雄性之间存在行为学上的差异。由于雌性鼠受雌激素、动情周期以及生殖影响,部分指标可能会出现

波动,一般情况下,研究者更加倾向于使用雄性鼠,但临床数据表明,CFS 患者女性占比较大^[28],在进行动物实验及机制研究时不应只使用单一雄性鼠。实验结果显示,C57BL/6J 雄性鼠在高架十字迷宫进入开放臂的时间及次数上显著降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$),而雌性鼠降低不显著;雄性鼠机械痛阈值($P<0.01$)较雌性鼠($P<0.05$)降低更为显著。ICR 雄性鼠在高架十字迷宫进入开放臂的时间及次数上显著降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$),而雌性鼠降低不显著。因此,不论是进行新药研发、药物增加适应症或是研究药物作用机制均不应单独使用雄性。美国国立卫生研究院也发表了应考虑到性别差异,对雌性动物展开研究的文章^[29]。故建议在实验研究时应使用雌雄双性别动物。

本实验中探索了近交系的 C57BL/6J 小鼠和远交系的 ICR 小鼠对于注射 Poly I:C 复合游泳后是否具有差异。我们的实验结果显示,与对照组相比较,ICR 模型组雌性小鼠在第 5 天及第 11 天的体重显著下降($P<0.05$),ICR 模型组雄性小鼠体重有下降的趋势但无显著差异,而 C57BL/6J 模型组雄性小鼠在第 5、8、11 和 14 天均显著下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$),C57BL/6J 模型组雌性小鼠体重有下降的趋势但无显著性差异。总体看来,C57BL/6J 模型组小鼠体重增长较 ICR 小鼠缓慢,但 C57BL/6J 模型组小鼠进食量受造模影响较大,C57BL/6J 模型组小鼠进食量降低,体重下降较 ICR 模型组小鼠更为显著。

力竭游泳实验结果显示,C57BL/6J 模型组雄性小鼠力竭时间显著降低($P<0.01$),降低幅度远高于 ICR 模型组雄性小鼠($P<0.05$)。且 C57BL/6J 对照组小鼠力竭时间明显较 ICR 对照组小鼠更短,C57BL/6J 对照组雌性小鼠与 ICR 对照组雌性小鼠具有显著差异($P<0.01$)。实验期间,为尽量排除小鼠品系以及性别差异以外的干扰因素,其他实验变量保持一致,包括力竭游泳容器、水温、水量以及实验时间等。实验结果表明,在初始体重相同的情况下,C57BL/6J 小鼠生长较缓慢、体力较低、初始疲劳值要高于 ICR 小鼠。结合疲劳量表评分,C57BL/6J 模型组小鼠在实验后期仍有较高的疲劳值,而 ICR 模型组雄性小鼠第 12 天疲劳评分已不具有显著差异。

有研究表明,在悬尾实验中,与其他品系小鼠

相比 C57BL/6J 小鼠不动时间更长^[22]。悬尾实验中小鼠的不动行为称为行为绝望,CFS 模型小鼠更加倾向于表现出不动时间的增长,即更明显的行为绝望。我们的实验结果显示,与对照组相比较,ICR 模型组小鼠不动时间虽然与对照组比较具有显著的差异($P<0.05$),但 C57BL/6J 模型组小鼠均表现出更长的不动时间($P<0.01$),C57BL/6J 模型组雄性小鼠比 ICR 模型组雄性小鼠不动时间显著增长($P<0.01$),这与 Ripoll 等^[22]的实验结果一致,提示 C57BL/6J 小鼠在悬尾不动实验中表现出的抑郁倾向更加严重。

高架十字迷宫结果显示,C57BL/6J 模型组雄性小鼠和 ICR 模型组雄性小鼠表现出进入开放臂时间显著降低($P<0.05$)以及进入开放臂次数显著减少($P<0.01$),而 C57BL/6J 雌性鼠和 ICR 雌性鼠则无显著差异。同时 Nesher 等^[20]提出 C57BL/6J 小鼠较 ICR 小鼠表现出更多的焦虑样行为,我们的实验结果也表明 C57BL/6J 对照组小鼠较 ICR 对照组小鼠进入开放臂的时间大大减少($P>0.05$),C57BL/6J 对照组小鼠更加的焦虑。这一结果表明 C57BL/6J 小鼠本身焦虑样行为较 ICR 小鼠更为严重,Poly I:C 复合游泳诱导的模型组 C57BL/6J 小鼠焦虑样行为更为严重。

近年来,CFS 已成为影响我国国民健康的重要问题,但目前 CFS 的病理生理机制尚不明确,亦无明确的生物学标记物。目前,关于其发生机制的主要假说涵盖了基因易感性、能量代谢异常、氧化应激、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能障碍、内分泌系统失调、感染及免疫系统功能紊乱等诸多方面。本研究成功复制了两种品系小鼠 CFS 动物模型,结果表明两种品系、同品系不同性别小鼠在行为学实验方面存在差异(见表 2)。本实验结果可为 CFS 的药物开发研究提供动物模型选择的参考依据。众所周知,与 C57BL/6J 小鼠相比,ICR 小鼠更具有价格优势,通常 ICR 小鼠价格约为 C57BL/6J 小鼠的 1/4~1/3。除了成本优势,ICR 小鼠快速增长的体重有利于实验的操作,并可收获更多的血液和组织样本用于进一步的机制研究。然而 C57BL/6J 小鼠具有遗传稳定,异质性低,对 Poly I:C 易感性强的显著优点,因此本课题组更推荐使用 C57BL/6J 小鼠进行 CFS 模型动物的相关研究。

表 2 两种品系小鼠指标比较

Table 2 Comparison of indicators between the two strains of mice

实验指标 Experiment	模型组-ICR 雌性与对照 组-ICR 雌性 Model-ICR mice of female vs control-ICR mice of female	模型组-ICR 雄性与对照 组-ICR 雄性 Model-ICR mice of male vs control-ICR mice of male	模型组-C57BL/6J 雌性 与对照组-C57BL/6J 雌性 Model-C57BL/6J mice of female vs control-C57BL/ 6J mice of female	模型组-C57BL/6J 雄性与 对照组-C57BL/6J 雄性 Model-C57BL/6J mice of male vs control-C57BL/6J mice of male
力竭游泳 Exhaustive swimming	**	*	##	##
悬尾实验 Tail suspension	*	*	##	##
机械痛阈 Mechanical pain threshold	**	**	#	##
高架十字迷宫 OT% OT% of the elevated plus maze	/	*	/	#
高架十字迷宫 OE% OE% of the elevated plus maze	/	**	/	##

注：与对照组-ICR 相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与对照组-C57BL/6J 相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
Note. Compared with control-ICR, * $P<0.05$ ，** $P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J, # $P<0.05$ ，## $P<0.01$.

参考文献：

[1]

HICKIE I, LLOYD A, WAKEFIELD D, et al. The psychiatric status of patients with the chronic fatigue syndrome [J]. Br J Psychiatry, 1990, 156: 534–540.

[2]

FUKUDA K, STRAUS S E, HICKIE I, et al. The chronic fatigue syndrome; a comprehensive approach to its definition and study [J]. Ann Intern Med, 1994, 121(12): 953–959.

[3]

CHIA J K, CHIA A Y. Chronic fatigue syndrome is associated with chronic enterovirus infection of the stomach [J]. J Clin Pathol, 2008, 61(1): 43–48.

[4]

URISMAN A, MOLINARO R J, FISCHER N, et al. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant [J]. PLoS Pathog, 2006, 2(3): e25.

[5]

LOEBEL M, STROHSCHIEIN K, GIANNINI C, et al. Deficient EBV-specific B- and T-cell response in patients with chronic fatigue syndrome [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85387.

[6]

LOMBARDI V C, RUSCETTI F W, DAS GUPTA J, et al. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome [J]. Science, 2009, 326(5952): 585–589.

[7]

LANE R J, SOTERIOU B A, ZHANG H, et al. Enterovirus related metabolic myopathy: a postviral fatigue syndrome [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003, 74(10): 1382–1386.

[8]

OBERSTE M S, PALLANSCH M A. Establishing evidence for enterovirus infection in chronic disease [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1005: 23–31.

[9]

VERNON S D, SHUKLA S K, CONRADT J, et al. Analysis of 16S rRNA gene sequences and circulating cell-free DNA from plasma of chronic fatigue syndrome and non-fatigued subjects [J]. BMC Microbiol, 2002, 2: 39.

[10]

SHEE C D. Phantom lymphadenopathy. An association with chronic fatigue syndrome [J]. Postgrad Med J, 2003, 79(927): 59–60.

[11]

SAJADIAN A, TABARRAEI A, SOLEIMANJAH I, et al. Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine [J]. Arch Virol, 2014, 159(8): 1951–1960.

[12]

KATAFUCHI T, KONDO T, TAKE S, et al. Brain cytokines and the 5-HT system during poly I: C-induced fatigue [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1088: 230–237.

[13]

CUNNINGHAM C, CAMPION S, TEELING J, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I: C) [J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(4): 490–502.

[14]

GIBNEY S M, MCGUINNESS B, PRENDERGAST C, et al. Poly I: C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression [J]. Brain Behav Immun, 2013, 28: 170–181.

[15]

TRAYNOR T R, MAJDE J A, BOHNET S G, et al. Sleep and body temperature responses in an acute viral infection model are altered in interferon type I receptor-deficient mice [J]. Brain Behav Immun, 2006, 20(3): 290–299.

[16]

CHATUPHONPRASERT W, RERMRAKSAKUL P, UDOMSUK L, et al. Different profiles of hepatic alkoxyresorufin O-dealkylase activities in small rodents [J]. J Appl Toxicol, 2012,

32(12): 1002–1007.

[17] POTHION S, BIZOT J C, TROVERO F, et al. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress [J]. Behav Brain Res, 2004, 155(1): 135–146.

[18] SUGIMOTO Y, KAJIWARA Y, HIRANO K, et al. Mouse strain differences in immobility and sensitivity to fluvoxamine and desipramine in the forced swimming test: analysis of serotonin and noradrenaline transporter binding [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 592(1/2/3): 116–122.

[19] WANG Q, WU H, ZHOU J, et al. Involvement of the central hypothalamic-pituitary-adrenal axis in hair growth and melanogenesis among different mouse strains [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0202955.

[20] NESHER E, PESKOV V, RYLOVA A, et al. Comparative analysis of the behavioral and biomolecular parameters of four mouse strains [J]. J Mol Neurosci, 2012, 46(2): 276–284.

[21] DAVID D J, RENARD C E, JOLLIET P, et al. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test [J]. Psychopharmacology, 2003, 166(4): 373–382.

[22] RIPOLL N, DAVID D J, DAILLY E, et al. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test [J]. Behav Brain Res, 2003, 143(2): 193–200.

[23] SCHMID Y, NAVARINI A, THOMAS Z M, et al. Sex differences in the pharmacology of itch therapies-a narrative review [J]. Curr Opin Pharmacol, 2019, 46: 122–142.

[24] HOLMES G P, KAPLAN J E, GANTZ N M, et al. Chronic fatigue syndrome: a working case definition [J]. Ann Intern Med, 1988, 108(3): 387–389.

[25] KATAFUCHI T, KONDO T, YASAKA T, et al. Prolonged effects of polyriboinosinic: polyribocytidylic acid on spontaneous running wheel activity and brain interferon-alpha mRNA in rats: a model for immunologically induced fatigue [J]. Neuroscience, 2003, 120(3): 837–845.

[26] YIN R, ZHANG K, LI Y, et al. Lipopolysaccharide-induced depression-like model in mice: meta-analysis and systematic evaluation [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1181973.

[27] YILMAZER-HANKE D M. Morphological correlates of emotional and cognitive behaviour: insights from studies on inbred and outbred rodent strains and their crosses [J]. Behav Pharmacol, 2008, 19(5/6): 403–434.

[28] ROLLNIK J D. Chronic fatigue syndrome: a critical review [J]. Fortschr Neurol Psychiatr, 2017, 85(2): 79–85.

[29] CLAYTON J A, COLLINS F S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies [J]. Nature, 2014, 509(7500): 282–283.

[收稿日期]2024-03-15

《中国比较医学杂志》2024 年征订启事

《中国比较医学杂志》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。开设栏目:研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,180 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行
帐号:11220201040003764
单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。