

赵永智,张亦文,罗燕琴,等. 基于文献数据库的空瓶刺激应激诱导焦虑样行为的动物模型研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(3): 420-429.

ZHAO Y Z, ZHANG Y W, LUO Y Q, et al. Advances in research on an animal model of empty bottle stimulation stress anxiety [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(3): 420-429.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.010

# 基于文献数据库的空瓶刺激应激诱导焦虑样行为的动物模型研究

赵永智<sup>1,2</sup>, 张亦文<sup>2</sup>, 罗燕琴<sup>1,2</sup>, 陈芳<sup>2</sup>, 董梦晨<sup>2</sup>, 潘瑞乐<sup>2</sup>, 常琪<sup>2</sup>,  
姜宁<sup>2\*</sup>, 刘新民<sup>1,3\*</sup>

(1. 石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832003; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 3. 宁波大学新药技术研究院, 浙江 宁波 315211)

**【摘要】** 目的 本文系统综述空瓶刺激应激(empty bottle stimulation, EBS)焦虑模型的造模方法, 包括常采用的实验动物品系和性别、动物分组、造模程序、造模周期、主要的行为学评价方法和模型涉及的病理机制研究, 为EBS焦虑模型在焦虑障碍研究中的应用提供参考。**方法** 检索CNKI和PubMed等数据库, 收集所有与EBS焦虑模型相关的文献, 并对其进行归纳整理。**结果** (1)实验动物多选用雄性成年SD或Wistar大鼠; (2)最佳造模时长为2周; (3)行为学评价主要采用旷场实验、高架十字迷宫实验和明暗箱实验; (4)病理机制涉及海马、前额叶皮层和杏仁核等脑区神经递质代谢异常。**结论** EBS焦虑模型具有焦虑样行为表型和相关的神经生物学机制, 可作为研究焦虑障碍的动物模型, 但其标准化构建方案和模型机制的研究仍需进一步探索和完善。

**【关键词】** 空瓶刺激模型; 不确定性空瓶饮水刺激; 情绪应激; 焦虑障碍; 动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 03-0420-10

## Advances in research on an animal model of empty bottle stimulation stress anxiety

ZHAO Yongzhi<sup>1,2</sup>, ZHANG Yiwen<sup>2</sup>, LUO Yanqin<sup>1,2</sup>, CHEN Fang<sup>2</sup>, DONG Mengchen<sup>2</sup>,  
PAN Ruile<sup>2</sup>, CHANG Qi<sup>2</sup>, JIANG Ning<sup>2\*</sup>, LIU Xinmin<sup>1,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;  
3. Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Corresponding author: LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com; JIANG Ning. E-mail: jiangning0603@163.com

**【基金项目】** 中国医学科学院创新工程(2021-I2M-1-034), 基础加强计划重点基础研究项目(JWKJW220201), 自治区重大科技专项(2023A02010-3)。

Funded by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2021-I2M-1-034), the Key Basic Research of Basic Enhancement Project (JWKJW220201), Major Science and Technology Project in the Autonomous Region (2023A02010-3).

**【作者简介】** 赵永智, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理学。Email: zhaoyongzhi@163.com

**【通信作者】** 刘新民, 男, 博士, 教授, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理学。

Email: liuxinmin@hotmail.com;

姜宁, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理学。Email: jiangning0603@163.com。

\* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To provide a comprehensive review of the modeling method of the empty bottle stimulation (EBS) anxiety model, including commonly used experimental animal strains and genders, animal grouping, modeling procedures, modeling duration, primary behavioral evaluation method, and the underlying pathological mechanisms. This aims to offer a reference for the application of the EBS anxiety model in anxiety disorder research. **Methods** Searches were conducted in databases such as CNKI and PubMed to collect all literature related to the EBS anxiety model, which were then systematically summarized and organized. **Results** (1) Male adult SD or Wistar rats are predominantly used as experimental animals; (2) The optimal modeling period is 2 weeks; (3) Behavioral evaluations primarily utilize the open field test, elevated plus maze test, and light-dark box test; (4) Pathological mechanisms involve abnormal neurotransmitter metabolism in brain regions such as the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala. **Conclusions** The EBS anxiety model exhibits an anxiety-like behavioral phenotype and associated neurobiological mechanisms, validating its utility as an animal model for the study of anxiety disorders. However, further exploration and refinement are required for its standardized construction protocol and the understanding of its mechanistic underpinnings.

**【Keywords】** empty bottle stimulation model; uncertainty empty bottled water stimulation; emotional stress; anxiety disorder; animal model

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

2019 年首个覆盖全中国的精神障碍流行病学调查结果显示, 中国成人精神障碍终生患病率为 16.57%, 其中焦虑症患病率最高, 其终身患病率为 7.6%<sup>[1]</sup>。焦虑症是社会、心理和生物因素复杂相互作用的结果, 其常见表现为强烈、过度持续的担忧和恐惧, 伴随紧张不安以及睡眠问题等。焦虑症的发病机制复杂且尚未完全阐明, 其病理生理过程涉及多系统、多层次的复杂调控网络。目前临床常用的抗焦虑药物普遍存在起效缓慢、疗效不充分等问题, 这凸显了进一步深入研究焦虑症发病机制及治疗策略的必要性。在焦虑症研究中, 动物模型作为重要的研究工具, 在疾病病因探索、病理生理机制阐明以及新型治疗药物研发等方面发挥着不可替代的作用。空瓶刺激模型是由林文娟等<sup>[2]</sup>提出的一种慢性情绪应激模型, 相较于其他的应激模型如慢性束缚、饮水冲突等应激源大多是躯体性和综合性应激的作用, 空瓶刺激更偏向于心理应激、情绪应激的成分较大, 较符合人们在日常生活中产生焦虑而引起情绪的变化。本文对空瓶刺激模型的造模方法(动物品系、周期、性别)、评价方法, 病理机制进行概述, 期望能为焦虑症的基础研究和药物研发等提供动物模型设计的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

本研究数据来源于国内外权威数据库, 主要

来源于中国知网(CNKI)和 PubMed 数据库。

### 1.2 文献检索与筛选方法

采用系统性文献检索, 检索中国知网(CNKI)和 PubMed 等数据库, 以关键词“空瓶刺激(empty bottle stimulation)”“不确定性空瓶饮水刺激(uncertainty empty bottle stimulation)”“空瓶饮水刺激法(empty bottle water stimulation method)”“限制饮水(restricting drinking water)”检索; 并使用高级检索,“(焦虑; anxiety) AND (空瓶刺激; empty bottle stimulation)”“(不确定性空瓶饮水刺激; uncertainty empty bottle stimulation) AND (焦虑; anxiety) 等检索式检索。文献纳入标准: (1) 所需数据明确的学术期刊; (2) 不包括学位论文、会议、专利等。

### 1.3 统计学分析

采用描述性统计方法对文献数据进行系统分析, 并使用 Microsoft 365 软件进行数据整理与分类。采用 GraphPad Prism 9.5 和 Microsoft 365 中 PowerPoint 软件进行数据分析与图表绘制。

## 2 结果

### 2.1 空瓶刺激应激焦虑模型相关文献发表情况

截止到 2024 年 7 月, 共检索到空瓶刺激应激焦虑模型相关文献 142 篇, 其中学术期刊 79 篇, 学位论文 50 篇, 英文期刊 13 篇。最后经过有效筛选后学术文献共计 88 篇, 其中包括中文文献 75 篇, 英文文献 13 篇, 其总体发文趋势见图 1。

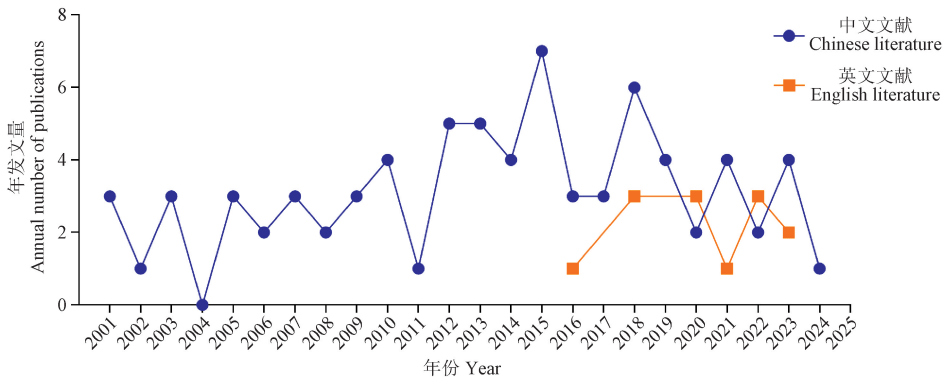


图 1 空瓶刺激模型总体发文的趋势分析

Figure 1 Trend analysis of the overall paper of empty bottle stimulation model

## 2.2 模型建立方法

### 2.2.1 动物品系的选择

空瓶刺激模型采用的动物较常见的大小鼠品系为 SD、Wistar、ICR、C57BL/6J、BALB/c。如图 2 所示,根据中英文数据库检索的结果显示,占比分别为 SD (54.65%)、Wistar (37.21%)、ICR (2.33%)、C57BL/6J (3.48%)、BALB/c (2.33%),可见采用 SD 或 Wistar 大鼠进行应激造模较为常

见,已有研究报道采用 C57BL/6J 雄性小鼠比较应激 1 ~ 3 周不确定性空瓶饮水刺激应激对小鼠产生的焦虑样行为的影响,结果显示应激 1 ~ 3 周小鼠均未出现焦虑样行为,结合大鼠 EBS 焦虑模型的应激周期来看,可能是小鼠对此应激方式敏感性和稳定性较差,也可能是该模型采用小鼠品系较少的原因<sup>[3]</sup>。

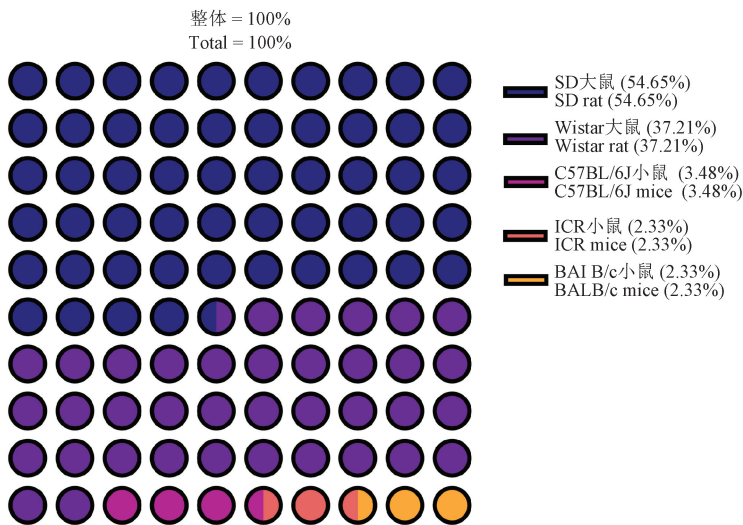


图 2 动物品系选择分析

Figure 2 Animal selection analysis

### 2.2.2 动物分组及造模程序

目前空瓶刺激的造模步骤及方法大都参考林文娟等<sup>[2]</sup>建立的方法,动物随机分为 3 组:空白组、生理应激组、空瓶刺激组。具体造模方法如下:动物适应期结束后进行造模,(1) 饮水训练期:在每天的 9 点和 21 点各给予动物 10 min 自由饮水,其余时间禁水不禁食,进行定时饮水训

练,为期 1 周;(2) 造模期:空瓶刺激组在按照规定每天 2 次的饮水时间(10 min)中,随机给予 1 d 1 次或 2 d 2 次的空水瓶刺激;生理应激组在空瓶刺激组给予空水瓶的同时,既不给水也不放空水瓶(其目的是和空瓶刺激组保持一致的饮水量,排除单纯性缺水带来的影响)。注意的是生理应激组应该和模型组放在两个相同环境的房间,避

免空瓶刺激组动物的情绪影响到生理应激组,造成实验干扰。所有动物在实验期间自由摄食。

### 2.2.3 实验周期的选择

通过检索中英文数据库的结果显示,若空瓶刺激作为焦虑模型建立时,实验周期的选择大多为空瓶刺激 14 d(不包括饮水训练期)(77.8%)、空瓶刺激 21 d(16.9%)等,对于少于 14 d(或者更短造模周期)应激是否可以引起动物焦虑行为的研究报道较少,基于检索结果造模周期选择分析见图 3。

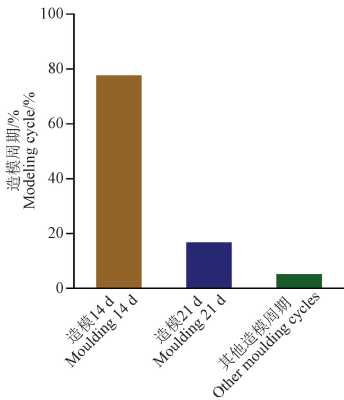


图 3 造模周期选择分析

Figure 3 Modeling cycle selection analysis

此外,复合造模时,空瓶刺激作为一种联合造模因素,具体的造模时长要根据具体情况而定,如 YE 等<sup>[4]</sup>通过小鼠卵巢切除加空瓶刺激来模拟更年期症状,空瓶刺激周期为 20 d;侯季秋等<sup>[5]</sup>采用不确定性空瓶刺激建立焦虑模型,冠状动脉左前降支结扎方法建立心肌梗死模型,即心梗合并焦虑模型来更好的模拟临床症状,空瓶刺激周期为 21 d。

### 2.2.4 性别的选择

空瓶刺激是一种慢性应激的情绪模型。根据数据库检索的结果整理发现雌雄比例(有 3 篇文献实验动物雌雄各半,分别在雌雄数量上都加 1),其中雄性占比为 85.39%、雌性占比 14.61%,见图 4。目前空瓶刺激模型的研究中主要是选择成年雄性动物,选择雌性是涉及性别相关的研究,如庞炜等<sup>[6]</sup>研究发现在妊娠期接受空瓶情绪应激可减低子代大鼠的学习记忆能力。

## 2.3 模型的评价指标

### 2.3.1 行为分析评分

根据林文娟等<sup>[2]</sup>提出的慢性情绪应激空瓶

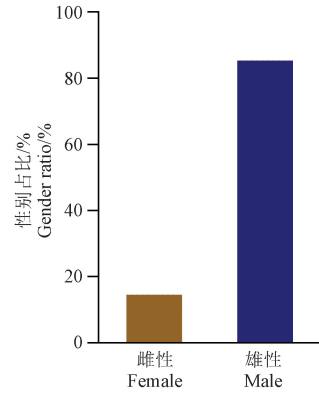


图 4 动物性别选择分析

Figure 4 Animal sex selection analysis

刺激模型,其评价模型建立成功的指标体现在行为分析上,包括攻击、探究、修饰行为。其中攻击行为是指动物在检测期间撕咬空水瓶或者笼子;探究行为是指动物在检测期间前后左右运动和观察水瓶位置;修饰行为是指动物在检测期间梳理自己的毛发和“洗脸”行为。每种行为强度以 0、1、2、3、4 算分。具体方法是:把造模的 10 min 分为 4 个时间段,在每个时间段统计每只检测动物出现的行为,行为出现即得 1 分,不出现为 0,10 min 内 4 次观察的总分为 0 ~ 4 之间,实验员采用盲法控制,取造模周期结束前 3 d 两位实验员得分的平均分用于最后统计学分析,通常模型组动物表现出攻击行为和探究行为增加,修饰行为减少。

### 2.3.2 旷场实验

旷场实验是评价啮齿类实验动物焦虑样行为的一种较常见的方法<sup>[7]</sup>,空瓶刺激模型作为焦虑模型亦可用该方法来评估。在检索结果中分析得到常见的评价指标包括以下两种:(1)水平运动和垂直运动;(2)中央区运动路程、中央区运动时间和中央区进入次数。其中最主要的指标是中央区运动路程和中央区运动时间,模型组动物会减少对中央区的探索。

### 2.3.3 高架十字迷宫实验

高架十字迷宫实验是经典的评价啮齿类动物焦虑状态的行为学检测方法之一<sup>[7]</sup>。在检索结果中统计用于空瓶刺激模型评价的主要指标是开臂次数百分比(open arm entries, OE%)和开臂时间百分比(open arm time spent, OT%),LIU 等<sup>[8]</sup>使用高架十字迷宫方法评价其建立的广泛

性焦虑障碍模型,结果显示模型组的 OE% 和 OT% 显著低于空白组。

#### 2.3.4 明暗箱实验

明暗箱实验是经典评价焦虑样行为的评价方法,是由 CRAWLEY 等<sup>[9]</sup>提出建立的,其原理是基于啮齿类动物厌明喜暗的特性,实验动物对明室既有好奇探索的欲望,同时也害怕明室光线的矛盾心理从而表现出焦虑样状态。常用的指标是明室时间(测试开始到结束,实验动物在检测时间内处于明室的时间)和穿箱次数(实验动物在检测期间来回穿箱的次数),焦虑状态动物的明室时间和穿箱次数减少。

#### 2.3.5 其他指标

除了用上述行为学方法来评价空瓶刺激模型的建立,还可以对实验动物造模前后的一般生理状态变化来辅助评估动物的焦虑样状态,如观察动物在造模前后的毛发、色泽、身体姿态、精神状态、活动情况、耳廓色泽、粪便数等。

总的来说,空瓶刺激模型建立成功的评价指

标除了用传统行为分析(攻击行、探究行为、修饰行为)指标,还可以使用经典评价焦虑样行为的评价方法,如旷场实验(水平运动、垂直运动、中央区运动路程、中央区运动时间、进入中央区的次数),高架十字迷宫实验(OT%、OE%),明暗箱(明室时间、穿箱次数)等。实验人员可以根据自身实验室条件采用相应的行为学评价方法,通常采取两种及以上的行为检测方法进行评价模型。

#### 2.4 模型相关的病理机制

通常认为,焦虑症的发生与神经递质功能、神经内分泌功能或者免疫功能的改变有关。基于数据库检索的结果,有效筛选出单因素空瓶刺激致焦虑模型机制研究相关的文献,共 57 篇。其中空瓶刺激应诱导焦虑的机制研究主要涉及神经递质功能受损(38.6%)、神经内分泌功能异常(38.6%)、免疫功能紊乱(12.3%)、脑源性神经营养因子(3.5%)、脑神经颗粒素(3.5%)等,其中以神经递质受损和神经内分泌功能异常报道最多,见图 5。

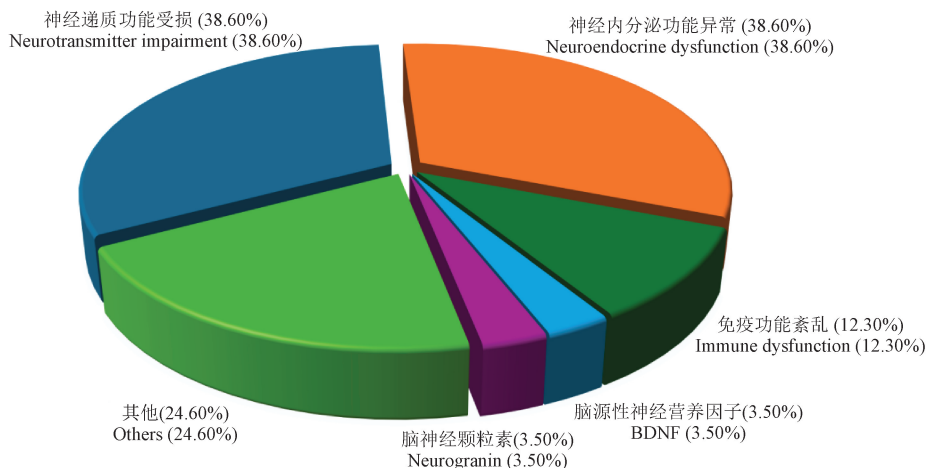


图 5 机制研究分析

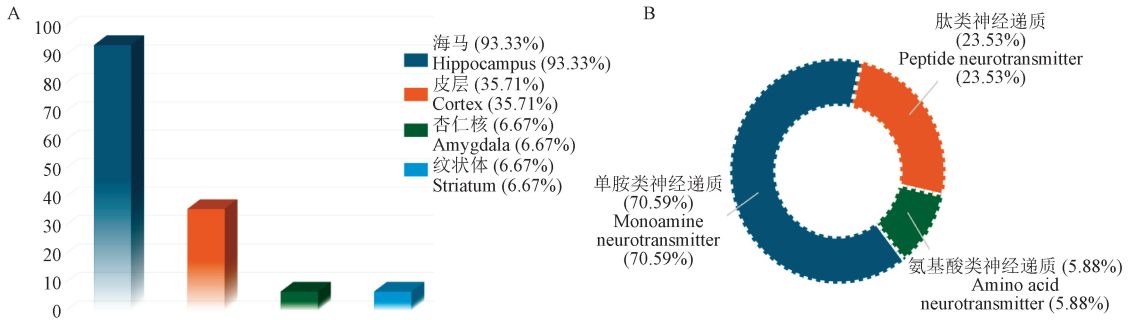
Figure 5 Mechanism research analysis

#### 2.4.1 神经递质功能受损

在中枢神经系统中,神经递质是神经末梢释放的一类具有生物活性的化学物质,作用于支配的神经元或者细胞膜受体上完成信息传递,突触传递是其信息传递最重要的方式,若神经递质功能障碍就会引发精神疾病如焦虑障碍<sup>[10]</sup>等。脑内的神经递质包括单胺类、氨基酸类、肽类等。根据数据库检索的结果来看,空瓶刺激模型主要

涉及到单胺类、氨基酸类、肽类神经递质的代谢异常,涉及的脑区包括海马、前额皮层,杏仁核和纹状体等,其中报道以海马区最多,其次是皮层区,具体占比见图 6A;以单胺类递质改变研究最多(70.59%),其次是肽类递质(23.53%)和氨基酸类(5.88%),见图 6B。

单胺类神经递质是最早发现的一类神经递质,其中包括:多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上



注:A:涉及的脑区相关分析;B:涉及的神经递质种类分析。

图6 涉及的相关脑区和神经递质种类分析

Note. A. Related brain area analysis. B. Related neurotransmitters types analysis.

Figure 6 Related brain area and neurotransmitters types analysis

腺素 (norepinephrine, NE)、肾上腺素 (adrenaline, A)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 又称血清素, 其平衡对于焦虑情绪调节有着重要的作用<sup>[11]</sup>。在空瓶刺激模型研究中发现模型组动物神经递质代谢发生了异常, 空瓶刺激大鼠焦虑模型海马中 5-HT、DA、NE 水平显著上升, 这和多篇研究报道的结果一致<sup>[12-15]</sup>。正常情况下, 大脑内的谷氨酸 (glutamate, Glu) 和  $\gamma$  氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 趋于 (兴奋/抑制) 平衡状态, 若这种平衡被打破, 如 GABA 兴奋性过度激活, 会引起神经传递障碍和焦虑样行为。ZHANG 等<sup>[16]</sup> 在研究中检测到模型组大鼠右侧海马  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型受体 (gamma aminobutyric acid type A receptor, GABAAR) 表达量增加相一致。此外, 中神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 作为一种内源性神经肽, 在中枢神经系统中有着大量的表达, 涉及焦虑障碍等多种神经精神障碍的发生<sup>[17]</sup>。在空瓶刺激致焦虑的研究中, 王静等<sup>[18]</sup> 发现空瓶刺激应激后模型组大鼠中发现模型组血清中的 NPY 含量显著高于空白对照组, 这也与刘纪猛等<sup>[19]</sup> 发现空瓶刺激应激后模型组大鼠前额叶皮层、海马 CA3 区和纹状体的 NPY 表达水平升高相符。

#### 2.4.2 神经内分泌功能异常

应激性事件的发生与多种精神疾病有着重要的联系, 应激会影响多个脑区包括海马神经元的丢失<sup>[20]</sup>。当机体受到外界应激时, 会引起神经内分泌系统功能异常, 而长时间的压力反应也会引发焦虑样行为<sup>[21]</sup>, 常涉及到下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)、

下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamic pituitary gonadal axis, HPG) 和交感神经系统的激活。在空瓶刺激模型的研究报道中, 模型组大鼠血清中促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质酮 (corticosterone, CORT) 异常升高<sup>[22]</sup>。丰广魁等<sup>[23]</sup> 在对空瓶刺激大鼠皮质激素受体的影响研究中发现, 经过空瓶刺激造模后, 模型组大鼠相较于空白组, 脑内盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 基因表达显著升高, 糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 基因表达降低。程湘等<sup>[24]</sup> 对空瓶刺激对雌性大鼠卵巢功能影响的研究中发现, 模型组雌鼠血清中雌二醇 (estradiol, E2)、卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 含量显著低于空白组, 表明空瓶刺激应激会影响到 HPG 轴调节性腺类固醇的分泌。

#### 2.4.3 免疫功能紊乱

免疫功能紊乱在应激诱导的心理疾病 (焦虑症、抑郁症) 中的重要作用<sup>[25]</sup>。焦虑症的临床状态与免疫应答的异常相关联, 细胞因子干预或抗炎药物治疗均可以改善啮齿动物的焦虑样行为<sup>[26]</sup>。曲森等<sup>[27]</sup> 通过建立 3 种焦虑模型 (空瓶刺激模型、环境相关恐惧模型和天敌暴露饮水冲突) 研究对模型组大鼠的胸腺和脾的脏器指数和血清中白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的影响, 发现 3 种焦虑模型组大鼠胸腺指数降低, 血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量显著升高。此外, 在关于空瓶刺激应激焦虑的研究中研究者以不同周期空瓶刺激, 以特异性抗原鸡卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 的抗

体水平和脾指数为指标,发现动物经过抗原免疫后,周期性的空瓶刺激后能显著抑制原发性体液免疫功能<sup>[28]</sup>。

#### 2.4.4 脑源性神经营养因子

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是大脑内分布最广泛且充分表征的神经营养因子, BDNF 通过结合并激活酪氨酸激酶受体 TrkB 来调节大脑功能发育和许多生理过程,如神经元生长、发育、分化以及增加突触可塑性等<sup>[29]</sup>,研究已证实 BDNF 基因的多态性与焦虑障碍的易感性相关<sup>[30]</sup>。沙中玮等<sup>[31]</sup>探究空瓶刺激对焦虑大鼠血清中 BDNF 水平的影响时,结果显示模型组大鼠血清中的 BDNF 水平显著低于空白组。同样 MA 等<sup>[22]</sup>的研究结果显示,接受空瓶刺激的焦虑大鼠海马中 BDNF 的表达也降低,这也和以往报道研究一致<sup>[20]</sup>。

#### 2.4.5 脑神经颗粒素

脑神经颗粒素 (neurogranin, Ng) 是一种新发现的脑特异性蛋白,主要分布在大脑皮层、海马、嗅球、杏仁核等脑区的神经突触后<sup>[32]</sup>, Ng 已经被证明与钙和钙调蛋白信号通路介导的突触可塑性,突触再生和长期增强相关,在学习、记忆、神经系统发育等起着重要作用,在多种神经退行性疾病中均有报道<sup>[33-36]</sup>。李欢欢等<sup>[37]</sup>在空瓶刺激诱发情绪应激对脑神经颗粒素的影响中发现模型组大鼠前额皮层和海马的 Ng 含量下降,其磷酸化水平升高,这表明 Ng 也参与焦虑障碍的发生,具体机制还有待进一步验证。

#### 2.4.6 其他

空瓶刺激造模研究还涉及交感神经系统的激活、氧化应激、线粒体功能异常、凋亡等。邵枫等<sup>[38]</sup>通过建立空瓶刺激模型分析 CORT、NE、Adr 与体液免疫功能之间的相关性并采用  $\beta$ -肾上腺素能受体拮抗剂,发现可以逆转情绪应激产生的体液免疫抑制作用,证明了交感神经系统在空瓶刺激应激中的调节作用。唐有利等<sup>[39]</sup>使用空瓶刺激建立心理应激模型时,发现模型组大鼠血浆过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、NADPH 氧化酶 1 (NADPH oxidase-1, NOX1)、黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 的水平显著升高,超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX)、过

氧化氢酶 (catalase, CAT) 的水平降低。还有在建立的空瓶刺激焦虑大鼠研究中发现模型组大鼠杏仁核和内侧前额叶皮质中线粒体呼吸链复合物 I ~ IV 均显著降低,三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量下降<sup>[40-41]</sup>。相信随着对模型的深入研究,空瓶刺激应激焦虑模型的发病机制将被更清晰地做出解释。

### 3 讨论

当前全球焦虑症患者剧增,为社会造成了巨大的经济负担。一个稳定的模型为疾病研究提供了便利的条件。空瓶刺激是慢性情绪应激,属于心理应激,对动物损伤小、更符合 3R 原则,也较好的模拟了焦虑症患者情绪的变化。空瓶刺激诱导的慢性情绪应激焦虑模型,不仅为研究焦虑障碍提供了一种情绪应激的焦虑模型,还可采用联合造模方式<sup>[42-43]</sup>,更优的模拟临床患者患病的焦虑情绪,为疾病的研究提供了非常大的帮助。

综上所述,空瓶刺激模型研究一般采用刚成年的雄性 SD 或 Wistar 大鼠为主,造模周期是以 14 d 为主,由于此应激方式的强度有限,长时间的应激可能会存在一定程度的适应情况,目前对于建立模型时焦虑样行为出现的最短周期和焦虑样行为消失最长周期的研究尚未见报道。关于该模型采用小鼠应激造模存在不稳定和敏感性不同的情况,建议可通过调整每天的应激时间和应激次数来改善造模的强度。模型的评价方法包括传统行为分析、旷场实验、高架十字迷宫实验、明暗箱等,通常采取两种及以上的行为检测方法进行评价模型,但通过文献分析可知,对于该模型的检测方法还不够统一规范。空瓶刺激模型病理机制的研究主要涉及神经递质功能受损、神经内分泌功能异常、免疫功能紊乱、脑源性神经营养因子、脑神经颗粒素等,随着前沿科技手段的应用,可以将目光转到一些焦虑症新的潜在病理机制如杏仁核线粒体自噬、神经环路协同损伤等,通过联用多种技术和学科交叉,从分子、细胞、整体水平上对空瓶刺激焦虑模型进行研究和评估,可以深入探究模型机制并完善模型,为焦虑症发病机制研究提供稳定的模型参考。

#### 参 考 文 献 (References)

[1] HUANG Y, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of

- mental disorders in China; a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224.
- [2] 林文娟, 王玮雯, 邵枫. 慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响: 一个新的情绪应激模型 [J]. *科学通报*, 2003, 48(9): 926-929.  
LIN W J, WANG W W, SHAO F. Effects of chronic emotional stress on rat behavior, neuroendocrine and immune response: a new model of emotional stress [J]. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(9): 926-929.
- [3] 朱明好, 蒋宁, 周文霞. 不确定性空瓶饮水刺激法和束缚应激法建立小鼠焦虑模型及比较 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(2): 102-108.  
ZHU M H, JIANG N, ZHOU W X. Establishment and comparison of anxiety models in mice by uncertain empty water bottle stimulation and restraint stress [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2019, 33(2): 102-108.
- [4] YE Y, ZHANG B, LI Y, et al. Yin Huo Tang, a traditional Chinese herbal formula, relives ovariectomy and empty bottle stimulation-induced menopause-like symptoms in mice [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 994642.
- [5] 侯季秋, 陈雅丽, 马迪, 等. 从 CXCL12/CXCR4 轴探析空瓶诱导的慢性情绪应激对急性心肌梗死大鼠炎症因子的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(5): 624-631.  
HOU J Q, CHEN Y L, MA D, et al. Effect of chronic emotional stress induced by empty bottle stimulation on inflammatory factors in rats with acute myocardial infarction: analysis of the CXCL12/CXCR4 axis [J]. *J South Med Univ*, 2020, 40(5): 624-631.
- [6] 庞炜, 蒋马莉, 谢雯, 等. 妊娠期接受应激刺激可降低大鼠学习记忆能力 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2002, 23(3): 318-319.  
PANG W, JIANG M L, XIE W, et al. Stress stimulation during pregnancy reduces learning and memory in rats [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2002, 23(3): 318-319.
- [7] 姜宁, 姚彩虹, 叶帆, 等. 大小鼠焦虑行为实验方法概述 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(5): 698-704.  
JIANG N, YAO C H, YE F, et al. Overview of animal behavioral tests of anxiety [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(5): 698-704.
- [8] LIU C, YING Z, LI Z, et al. Danzhi Xiaoyao Powder promotes neuronal regeneration by downregulating Notch signaling pathway in the treatment of generalized anxiety disorder [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 772576.
- [9] CRAWLEY J, GOODWIN F K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1980, 13(2): 167-170.
- [10] SAHOO S, KHARKAR P S, SAHU N U, et al. Anxiolytic activity of *Psidium guajava* in mice subjected to chronic restraint stress and effect on neurotransmitters in brain [J]. *Phyther Res*, 2021, 35(3): 1399-1415.
- [11] YU X D, ZHU Y, SUN Q X, et al. Distinct serotonergic pathways to the amygdala underlie separate behavioral features of anxiety [J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(12): 1651-1663.
- [12] FENG G K, MA X J, CHEN Y Y, et al. Effects of chailong Jieyu pill on behavior, monoamine neurotransmitters, and corticosteroid receptors in a rat model of anxiety disorder [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5489215.
- [13] WANG S N, DING Y S, MA X J, et al. Identification of bioactive chemical markers in Zhi Zhu Xiang improving anxiety in rat by fingerprint-efficacy study [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2329.
- [14] ZHAO F Y, YAN H X, ZHAO Y X, et al. Effects of electroacupuncture on the behaviors and expressions of hippocampal neurotransmitters and Bax/Bcl-2 proteins in rat models of anxiety disorder [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2020, 18(2): 83-89.
- [15] 刘小河, 杨忠奇, 冼绍祥, 等. 温胆片对焦虑模型大鼠行为学和单胺类神经递质的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(6): 674-678.  
LIU X H, YANG Z Q, XIAN S X, et al. Effect of Wendan Tablets on behaviors and monoamine neurotransmitters in rat model of anxiety [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2012, 29(6): 674-678.
- [16] ZHANG W, ZHAO R, LI X, et al. Effect of Yi-Nao-Jie-yu decoction on  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor in the hippocampus and serum inflammatory factors in a rat model of poststroke anxiety [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016, 12: 2827-2837.
- [17] CORDER K M, LI Q, CORTES M A, et al. Overexpression of neuropeptide Y decreases responsiveness to neuropeptide Y [J]. *Neuropeptides*, 2020, 79: 101979.
- [18] 王静, 陈利平, 王发渭, 等. 舒郁宁心汤对焦虑大鼠行为及血清神经肽和皮质酮水平的影响 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(9): 1459-1460, 1463.  
WANG J, CHEN L P, WANG F W, et al. The effect of shuyuningxin decoction on the behavior and serum levels of neuropeptide Y and corticosterone of anxiety rats [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2013, 22(9): 1459-1460, 1463.
- [19] 刘纪猛, 李恒芬, 谢正. 急慢性应激对大鼠中枢神经肽 Y 腺苷酸环化酶表达的影响 [J]. *临床心身疾病杂志*, 2008, 14(3): 193-197, 289.  
LIU J M, LI H F, XIE Z. The effects of acute, chronic stress on the expression of central nerve neuropeptide Y and



- adenylcyclase in rats [J]. *J Clin Psychosom Dis*, 2008, 14(3): 193–197, 289.
- [20] MARTINOWICH K, MANJI H, LU B. New insights into BDNF function in depression and anxiety [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(9): 1089–1093.
- [21] ZHAO H, ZHOU M, LIU Y, et al. Recent advances in anxiety disorders; focus on animal models and pathological mechanisms [J]. *Anim Model Exp Med*, 2023, 6(6): 559–572.
- [22] MA M, QUAN H, CHEN S, et al. The anxiolytic effect of polysaccharides from *stellariae radix* through monoamine neurotransmitters, HPA axis, and ECS/ERK/CREB/BDNF signaling pathway in stress-induced male rats [J]. *Brain Res Bull*, 2023, 203: 110768.
- [23] 丰广魁, 马先军, 陈隐漪, 等. “柴龙解郁丹”对焦虑模型大鼠行为学及皮质激素受体的影响研究 [J]. *江苏中医药*, 2017, 49(10): 79–82.
- FENG G K, MA X J, CHEN Y Y, et al. Effects of Chailong Jieyu Dan on behavioural and corticosteroid receptors in rats with anxiety model [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2017, 49(10): 79–82.
- [24] 程湘, 徐辉, 艾国平, 等. 慢性情绪应激对大鼠卵巢功能影响的初步观察 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(14): 1368–1370.
- CHENG X, XU H, AI G P, et al. Ovarian function in rat model of chronic emotional stress [J]. *Acta Acad Med Mil Tertiae*, 2007, 29(14): 1368–1370.
- [25] FAN K Q, LI Y Y, WANG H L, et al. Stress-induced metabolic disorder in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells leads to anxiety-like behavior [J]. *Cell*, 2019, 179(4): 864–879.
- [26] HUANG S, DONG W, LIN X, et al. Disruption of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-purinergic P2X7 receptor complex in microglia promotes stress-induced anxiety [J]. *Immunity*, 2024, 57(3): 495–512.
- [27] 曲淼, 赵瑞珍, 唐启盛. 基于 3 种不同广泛性焦虑大鼠模型观察安神解虑方对脏器指数及炎症细胞因子的影响 [J]. *北京中医药*, 2018, 37(2): 118–121.
- QU M, ZHAO R Z, TANG Q S. Influence of Anshen Jieyu Formula on organ index and inflammatory cytokines by observing three kinds of model rats with generalized anxiety [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2018, 37(2): 118–121.
- [28] 邵枫, 林文娟. 情绪应激体液免疫调节作用的影响因素 [J]. *心理学报*, 2001, 33(6): 543–547.
- SHAO F, LIN W J. Two kinds of conditions influence the humoral immunomodulation induced by emotional stress [J]. *J Chin Psychol Acta Psychol Sin*, 2001, 33(6): 543–547.
- [29] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7777.
- [30] SOLIMAN F, GLATT C E, BATH K G, et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human [J]. *Science*, 2010, 327(5967): 863–866.
- [31] 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.
- SHA Z W, WANG G H, LI Z M, et al. Effect of Xiangxuan decomposition square on blood list amine neurotransmitter and bdnf levels in anxious rats [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2018, 40(1): 191–194.
- [32] 李洪燕, 李俊发, 吕国蔚. 神经颗粒素: 一种脑特异性蛋白质 [J]. *生理科学进展*, 2003, 34(2): 111–115.
- LI H Y, LI J F, LU G W. Neurogranin: a brain-specific protein [J]. *Prog Physiol Sci*, 2003, 34(2): 111–115.
- [33] BYRNE L M, RODRIGUES F B, JOHNSON E B, et al. Cerebrospinal fluid neurogranin and TREM2 in Huntington's disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4260.
- [34] LISTA S, HAMPEL H. Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease [J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(1): 47–57.
- [35] HALL S, JANELIDZE S, ZETTERBERG H, et al. Cerebrospinal fluid levels of neurogranin in Parkinsonian disorders [J]. *Mov Disord*, 2020, 35(3): 513–518.
- [36] FYFE I. Neurogranin in CSF identifies creutzfeldt-Jakob disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(8): 434–435.
- [37] 李欢欢, 林文娟, 李俊发. 急性情绪应激对大鼠行为和脑神经颗粒素磷酸化水平的影响 [J]. *心理学报*, 2006, 38(4): 576–582.
- LI H H, LIN W J, LI J F. The effects of acute emotional stressor on behavior and phosphorylation levels of neurogranin in rats [J]. *Acta Psychol Sin*, 2006, 38(4): 576–582.
- [38] 邵枫, 林文娟. 外周交感神经系统在情绪应激体液免疫调节中的作用 [J]. *中国行为医学科学*, 2001, 10(5): 401–404.
- SHAO F, LIN W J. The sympathetic nervous system involved in the humoral immuno-modulation induced by emotional stress [J]. *Chin J Behav Med Sci*, 2001, 10(5): 401–404.
- [39] 唐有利, 李艳丽, 谢露. 美托洛尔对心理应激大鼠抗氧化功能的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(12): 1418–1422.
- TANG Y L, LI Y L, XIE L. Effect of metoprolol on antioxidant function of rats under psychological stress [J]. *Chin J New Drugs*, 2015, 24(12): 1418–1422.
- [40] 赵安然, 王思琪, 赵振武, 等. 丹栀逍遥散对焦虑模型大

- 鼠行为学及线粒体形态和功能的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5584-5590.
- ZHAO A R, WANG S Q, ZHAO Z W, et al. Effect of Danzhi Xiaoyao Powder on behavior and mitochondrial morphology and function of anxiety model rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2022, 47(20): 5584-5590.
- [41] ZHAO A R, LI J, WANG S Q, et al. Stress can affect mitochondrial energy metabolism and AMPK/SIRT1 signaling pathway in rats [J]. Brain Res Bull, 2023, 203: 110770.
- [42] SHI J, HOU J, SUN Y, et al. Chaihuajianggumulitang shows psycho-cardiology therapeutic effect on acute myocardial infarction with comorbid anxiety by the activation of Nrf2/HO-1 pathway and suppression of oxidative stress and apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113437.
- [43] YE Y, LIU C Z, WANG R, et al. A new animal model for menopausal transition: combination of ovariectomy and empty bottle stimulation [J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(10): 840-844.
- [收稿日期] 2024-08-08

## 长爪沙鼠脑缺血再灌注模型标准化体系的建立

长爪沙鼠因存在先天的 Willis 变异缺失特性成为制备脑缺血模型的理想实验动物。但因其 Willis 环变异缺失类型多样,导致成模率低且症状不稳定,尤其是脑缺血再灌注(I/R)模型还缺乏标准化评价体系,桎梏了该模型动物的推广应用。本研究利用脑缺血高发长爪沙鼠近交系,通过单侧颈总动脉结扎引发半脑缺血,再通过活结的方式实现即时再灌注;同时总结了 I/R 后动物症状变化,拟定了详细的评分标准,首次建立了以症状为导向的再灌注模型制备方法。我们在模型动物再灌注不同时间,通过转棒实验、抓力评分来评估运动能力变化, TTC 染色判定梗死灶大小;苏木素-伊红(HE)和 Nissl 染色评估组织病理学变化和神经元死亡情况。结果表明,以该方法试验的 57 只长爪沙鼠中,32 只产生脑缺血再灌注损伤典型的特征,模型成功率达 56%,并且雄性长爪沙鼠模型死亡率显著高于雌性长爪沙鼠。该方法制备的 I/R 长爪沙鼠在再灌注后 1 d 后出现运动能力和抓力显著降低,形成明显梗死灶,出现组织水肿、神经元萎缩死亡、空泡化结构等典型病理特征,并随着再灌注时间的延长而逐渐恢复。本研究对长爪沙鼠单侧颈总动脉结扎 I/R 模型总结了完整的方法论,建立了长爪沙鼠的 I/R 模型的标准化体系,为其应用提供了新的可能性和实践意义。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2024, 7(1): 48-55. doi: 10.1002/ame2.12378)。