

强萌,姜宁,黄红,等.昼夜节律对慢性束缚应激小鼠焦虑、抑郁及认知行为的影响[J].中国比较医学杂志,2025,35(2):45-57.

Qiang M, Jiang N, Huang H, et al. Effects of circadian rhythm on anxiety, depression, and cognitive behavior in mice with chronic restraint stress [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(2): 45-57.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.02.005

昼夜节律对慢性束缚应激小鼠焦虑、抑郁及认知行为的影响

强萌¹,姜宁²,黄红²,张亦文²,陈芳²,李召辉¹,刘新民^{3*},吕光华^{1*}

(1.成都中医药大学药学院,成都 611137;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 315000)

【摘要】目的 探讨白天和夜晚两个不同束缚时段的慢性束缚应激 28 d 对雌雄 ICR 小鼠情绪及认知行为的影响,为慢性束缚应激模型中实验动物性别和束缚时段的选择提供依据。**方法** 将 72 只雌雄各半的 ICR 小鼠分为 6 组:雄性空白组、雄性白天束缚组、雄性夜间束缚组、雌性空白组、雌性白天束缚组、雌性夜间束缚组。除空白组外,其余各组每天束缚 10 h,连续束缚 28 d 建立慢性束缚应激模型。通过旷场实验、Y 迷宫实验、新奇抑制摄食实验、高架十字迷宫实验、悬尾实验、强迫游泳实验和避暗实验等方法,观察不同时间段的束缚对雌雄 ICR 小鼠情绪和认知行为的影响。**结果** 将雌雄小鼠分组统计时,在悬尾实验中,雄性白天束缚组的不动时间与雄性空白组相比呈显著性增加($P<0.05$)。在强迫游泳实验中,雄性白天束缚组和夜间束缚组的不动时间与雄性空白组相比均显著性增加($P<0.05$)。在新奇抑制摄食实验中,与雌性空白组相比,雌性白天束缚组的摄食潜伏期无明显差异,夜间束缚组显著性延长($P<0.05$),且夜间与白天束缚组相比呈显著性延长($P<0.05$);在夜间束缚时雌性的摄食潜伏期与雄性相比呈显著性延长($P<0.05$)。旷场实验中,雌性空白组与雄性空白组相比,中央区时间、中央区/边缘区时间呈显著性降低($P<0.05$);雌性白天束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间与雌性空白组相比呈显著性降低($P<0.05$)。在高架十字迷宫实验和 Y 迷宫实验中,各组均无明显差异。避暗实验中,雄性白天束缚组的入暗潜伏期与雄性空白组相比无明显差异,夜间束缚组的入暗潜伏期与空白组相比显著性缩短($P<0.05$)。将雌雄小鼠合并统计时,在悬尾实验中,白天雌雄束缚组的不动时间呈显著性增加($P<0.05$);在强迫游泳实验中,白天和夜间雌雄束缚组的不动时间呈显著性增加($P<0.01, P<0.05$);在旷场实验中,白天雌雄束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间呈显著性缩短($P<0.05, P<0.01$),夜间雌雄束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间、白天和夜间雌雄束缚组的平均速度和总路程无明显差异。**结论** 白天时段慢性束缚应激 28 d 后雄性小鼠表现出抑郁情绪;慢性束缚应激 28 d 后雌性小鼠易致焦虑情绪;夜间时段慢性束缚应激 28 d 后雄性小鼠出现学习记忆损伤。

【关键词】 慢性束缚应激模型;抑郁症;焦虑症;认知障碍

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 02-0045-13

【基金项目】 四川省科技计划项目(2021YFYZ0012);中国医学科学院创新工程重大创新项目(2021-I2M-1-034);国家自然科学基金(82274056);新疆维吾尔自治区重大科技专项项目(2023A02010-3)。

【作者简介】 强萌(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药资源与鉴定。E-mail:1790415094@qq.com

【通信作者】 刘新民(1962—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药神经药理及实验方法。E-mail:liuxinmin@hotmail.com

吕光华(1965—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药鉴定及资源研究与利用。E-mail:lugh@cdutcm.edu.cn

* 共同通信作者

Effects of circadian rhythm on anxiety, depression, and cognitive behavior in mice with chronic restraint stress

QIANG Meng¹, JIANG Ning², HUANG Hong², ZHANG Yiwen², CHEN Fang², LI Zhaohui¹, LIU Xinmin^{3*}, LYU Guanghua^{1*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China.

2. Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking

Union Medical College, Beijing 100193. 3. Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University,

Ningbo 315000)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of chronic restraint stress for 28 days (day and night) on mood and cognitive-like behavior in male and female ICR mice, to provide a basis for the selection of sex and restraint period in chronic restraint stress model animals. **Methods** A total of 72 male and female (1 : 1) ICR mice were divided into six groups; male control, daytime restraint, and nighttime restraint groups, and female control, daytime restraint, and nighttime restraint groups. Mice in all but the control groups were bound for 10 h/d and restrained continuously for 28 days to establish a chronic restraint stress model. The emotional and cognitive behaviors induced by restraint in male and female mice at different times were observed by open field, Y maze, novel inhibition feeding, elevated cross maze, tail suspension, forced swimming, and dark-avoidance experiments. **Results** In the tail suspension experiment, the immobility time of male mice in the daytime restraint group was significantly increased compared with that in the control group ($P < 0.05$), and the immobility times of male mice in the daytime and nighttime restraint groups were also significantly increased in the forced swimming experiment, compared with those in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the female daytime restraint and female control groups in the novelty inhibition feeding experiment, but the feeding latency of the nighttime restraint group was significantly longer than that of the control group ($P < 0.05$) and the daytime restraint group ($P < 0.05$). The feeding latency of female mice was significantly longer than that of males during nighttime restraint ($P < 0.05$). In the open field test, compared with the male control group, the female control group showed a significant decrease in central area time and the ratio of central area time to peripheral area time ($P < 0.05$). Compared with the female control group, the female daytime restraint group exhibited a significant decrease in central area time and the ratio of central area time to peripheral area time ($P < 0.05$). There was no significant difference between the groups in the elevated cross maze and Y maze experiments. There was no significant difference in dark latency between the daytime restraint group and the control group, but darkness latency was significantly shorter in the nighttime restraint group compared with those in the control group ($P < 0.05$). When male and female mice were combined, the immobility time in the daytime restraint group was significantly increased in the tail suspension experiment ($P < 0.05$), the immobility times of mice in the daytime and nighttime restraint groups were significantly increased in the forced swimming experiment ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the central zone time and the ratio of central area time to peripheral area time of daytime restraint mice were significantly shorter compared with those in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant difference in the central zone time and the ratio of central area time to peripheral area time in the nighttime restraint groups, and no significant difference in average speed or total distance between the daytime and nighttime restraint groups. **Conclusions** Male mice exhibited depression after 28 d of chronic restraint stress during the daytime, while female mice were prone to anxiety after 28 d of chronic restraint stress. Male mice experienced learning and memory impairment after 28 d of chronic restraint stress during the night.

【Keywords】 chronic restraint stress model; depression; anxiety disorders; cognitive impairment

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

慢性应激是指机体长期处于应激不协调状态而导致的内环境稳态失衡,研究表明,慢性应

激导致或恶化 90% 以上的疾病,包括影响脑的认知功能和精神疾病,严重降低了人们的工作效率

和生活质量^[1]。动物模型是慢性应激致神经精神损伤疾病研究领域的重要手段,是了解基本的发生发展与防治措施的开发的工具^[2]。动物的生理和行为反应通常受到昼夜节律的影响,动物的应激反应、荷尔蒙分泌(如皮质醇)等可能在白天和夜间不同,夜间通常是小鼠和大鼠的活动高峰期,因此它们可能对应激源的反应更加敏感^[3]。昼夜节律(白天和夜间)对小鼠暴露在应激环境中探索、抑郁行为也有不同影响^[4-5]。慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)作为一种非损伤性刺激,通过行为限制的方式,模拟人类社会中无法避免的拥挤、压力性空间及宇航员在太空中飞行时长期处于狭小空间作业等应激因素造成心理应激,是常见的慢性应激致抑郁焦虑及认知功能障碍模型^[6]。本实验室前期也进行了大量的研究,张宏霞^[7]采用将 ICR 小鼠每天束缚 6 h,并连续束缚 14 d 的方法,建立小鼠焦虑模型;张北月等^[8]采用将雌雄大鼠分别束缚 10 h 和 14 h,连续束缚 28 d,建立了大鼠抑郁模型;王逸等^[9]认为,每天束缚 10 h(22:00~次日 8:00),连续 28 d 能引起 SD 大鼠学习记忆障碍。然而目前针对昼夜束缚时间段对动物情绪认知行为的影响尚未有报道,本研究旨在比较昼夜两个不同束缚时间段对雌雄小鼠情绪和记忆的影响差异,以期更好地规范束缚模型造模因素,建立更稳定的模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠,体重 21~23 g,72 只,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2021-0006]。实验操作在中国医学科学院药用植物研究所进行[SYXK(京)2023-0049],供给标准饲料和清洁自来水,光照时间 12 h/12 h(光/暗),室温 22~25℃,湿度条件为(55±10)%。本实验遵循实验动物伦理 3R 原则,并经过中国医学科学院药用植物研究所实验伦理委员会审批(SLXD-20240430120)。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠行为束缚器(自制)、小鼠旷场实验测试箱、小鼠物体认知测试箱、小鼠强迫游泳分析仪、小鼠悬尾分析仪(均由中国医学科学院药用植物

研究所和中国航天员科研训练中心联合研发);小鼠穿梭五合一装置(药用植物研究所与安徽正华公司联合研发);小鼠 Y 迷宫 ANY-maze 5.14 动物行为分析系统(美国 Stoeling 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

ICR 小鼠(72 只)适应性饲养 3 d 后,随机分为 6 组,每组 12 只,各组动物分笼饲养。包括雌性空白(female control, FC)组、雄性空白(male control, MC)组、雌性白天束缚(female daytime restraint, FDR)组、雌性夜间束缚(female nighttime restraint, FNR)组、雄性白天束缚(male daytime restraint, MDR)组、雄性夜间束缚(male nighttime restraint, MNR)组;白天束缚时间段为 10:00~20:00,夜间束缚时间段为 22:00~次日 8:00。

1.3.2 模型建立方法

将动物放进本实验室自制小鼠束缚器中,束缚器顶部以及四周均有孔洞,来保持束缚器内空气流通,用束缚器底座将小鼠固定在束缚器中,保持头部可以活动但不能自由转身的状态即可,在束缚过程中及时观察小鼠的状态,避免死亡。

1.3.3 悬尾实验(tail suspension test, TST)

TST 时将小鼠的尾巴悬挂,此时小鼠头部向下成倒悬体位,起初小鼠会尝试挣扎来逃脱这一不适的状态,挣扎一段时间后发现逃跑无望就会表现出不动的“绝望”状态^[10]。悬尾测试时长为 6 min,一般记录 6 min 内后 4 min 的小鼠累计不动时间,作为抑郁判断指标^[11-12]。

1.3.4 强迫游泳实验(forced swim test, FST)

FST 时将小鼠放入一个受限的空间迫使其游泳,由于小鼠对水的厌恶起初会在水中拼命挣扎试图逃跑,在发现逃跑无望后则会停止挣扎表现出“绝望”的状态^[13],强迫游泳时长为 6 min,记录 6 min 内后 4 min 的小鼠累计不动时间,作为抑郁判断指标^[14-16]。

1.3.5 新奇抑制摄食实验(novelty suspended feeding test, NSFT)

实验小鼠在被禁食 24 h 后进行 NSFT^[17-18],测试前 30 min 将禁食小鼠放置实验房间适应,每个测试箱的中央放置同样大小的食物,测试开始时将禁食小鼠背对测试箱放入箱内,测试期为 5 min。记录禁食小鼠在该新奇环境中第一次抱

啃食物的时间,即为摄食潜伏期,作为评估小鼠焦虑的指标^[19]。

1.3.6 高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)实验

将小鼠置于 EPM 中央,头朝开臂方向,观察者应远离迷宫中心至少 1 m。测试开始,系统将分别记录小鼠进入开臂和闭臂的次数和在两臂滞留时间,测试期为 5 min,并计算小鼠进入开臂次数和在开臂滞留时间分别占总次数(进入开臂和闭臂次数之和)和总时间(在开臂与闭臂滞留时间之和)的百分比,以此作为评价焦虑的指标^[20]。

1.3.7 旷场实验(open field test, OFT)

OFT 仪器由 4 个箱子组成,每个箱子上都有光源,并且有摄像头对动物在箱子中的活动进行监测,将动物在实验房间适应 30 min 后,将其放进测试箱中央,通过仪器的自主活动软件分析得到动物 5 min 内的活动指标,如中央区时间、边缘区时间等数据作为评价焦虑的指标^[21]。

1.3.8 Y 迷宫(Y-maze)实验

Y 迷宫^[22]装置是由 3 个等长,且互为 120°角的臂组成的辐射式迷路箱,3 个臂随机设为 A、B、C,分别具有不同的识别图案作为小鼠辨别 3 个臂的标志。将小鼠在实验房间适应 30 min,测试开始时将小鼠放入 3 个臂中间的区域,让小鼠在迷宫中自由探索 8 min,过程中会有仪器摄像头跟踪记录小鼠的探索路径,并通过 ANY-maze 5.14 软件计算其自发交替百分比,定义自发交替为正确地进入 3 条不同的臂,即 ABC、ACB、BCA、BAC、CAB、CBA,计算公式为:自发交替百分比/% = 自发交替数/(进入臂的总数 - 2) × 100%^[23]。

1.3.9 避暗(step-through/dark-avoidance, ST)实验

ST 装置分为明室和暗室两个区域,明室与暗室中间有一通道可供小鼠自由穿梭,暗室区域可提供刺激电流 1.5 mA,刺激电压 30 V。本实验分为两个阶段:获得阶段和巩固阶段。获得阶段时将小鼠背朝通道从明室放入,自由活动 3 min 后,暗室开始通电,小鼠进入暗室就会遭受电击并逃回明室,持续 5 min 后获得阶段实验结束;24 h 后进行巩固阶段实验,装置的设置参数与前一天保

持一致,巩固阶段不用适应 3 min,将小鼠背朝通道从明室放入后,暗室即可通电,系统记录 5 min 内小鼠第 1 次从明室进入暗室的时间(即入暗潜伏期)等指标作为认知障碍评价指标^[24]。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析;结果表示为平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$), $P < 0.05$ 时表示具有显著性差异。实验中的结果用单因素方差分析(One-way ANOVA)组间差异,通过 LSD analysis 进行两两比较。若数据为非正态分布或者方差不齐,用非参数方差分析(Kruskal-Wallis test)检验,结果使用 GrapPad Prism 8.0 软件绘制图表。

2 结果

2.1 慢性束缚对小鼠抑郁行为的影响

2.1.1 慢性束缚对小鼠 TST 的影响

如图 1A 所示,在 TST 中,雄性白天束缚组小鼠的不动时间与雄性空白组相比显著增加($P < 0.05$),夜间束缚组与空白组相比无显著差异;雌性白天和夜间束缚组小鼠不动时间与雌性空白组相比均无显著性差异;白天和夜间束缚,雄性小鼠的不动时间与雌性小鼠均相比无显著性差异。如图 1B 所示,与雌雄各半空白组相比,雌雄各半白天束缚组小鼠的不动时间显著增加($P < 0.01$),雌雄各半夜间束缚组小鼠的不动时间无差异。

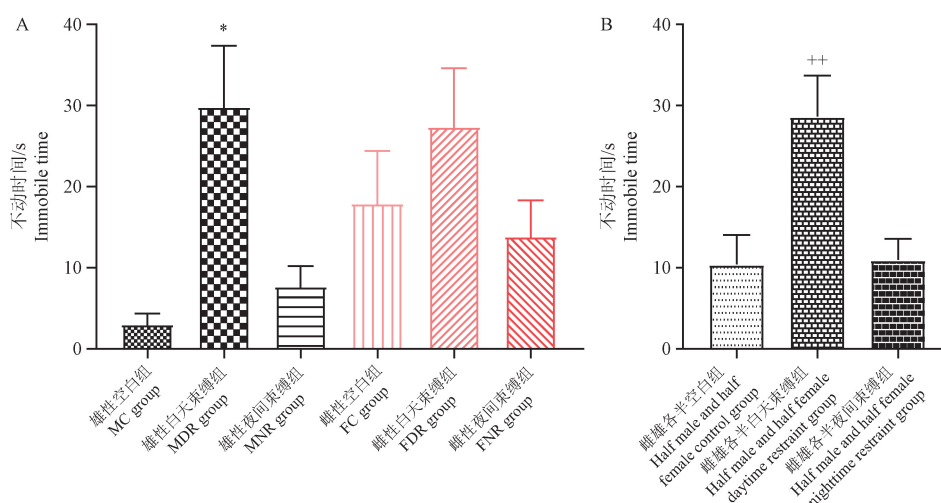
2.1.2 慢性束缚对小鼠 FST 的影响

如图 2A 所示,雄性白天和夜间束缚组小鼠的不动时间与雄性空白组相比均显著性增加($P < 0.05$);雌性白天和夜间束缚组的不动时间与雌性空白组相比无显著性差异;白天和夜间束缚组中,雄性小鼠的不动时间与雌性小鼠相比无显著性差异。如图 2B 所示,与雌雄各半空白组相比,雌雄各半白天束缚组小鼠的不动时间呈显著增加($P < 0.01$),雌雄各半夜间束缚组小鼠的不动时间显著增加($P < 0.05$)。

2.2 慢性束缚对小鼠焦虑行为的影响

2.2.1 慢性束缚对小鼠 NSFT 的影响

如图 3A 所示,雄性白天束缚组小鼠和夜间束缚组小鼠的摄食潜伏期与雄性空白组相比无显著性差异;雌性白天束缚组小鼠的摄食潜伏期

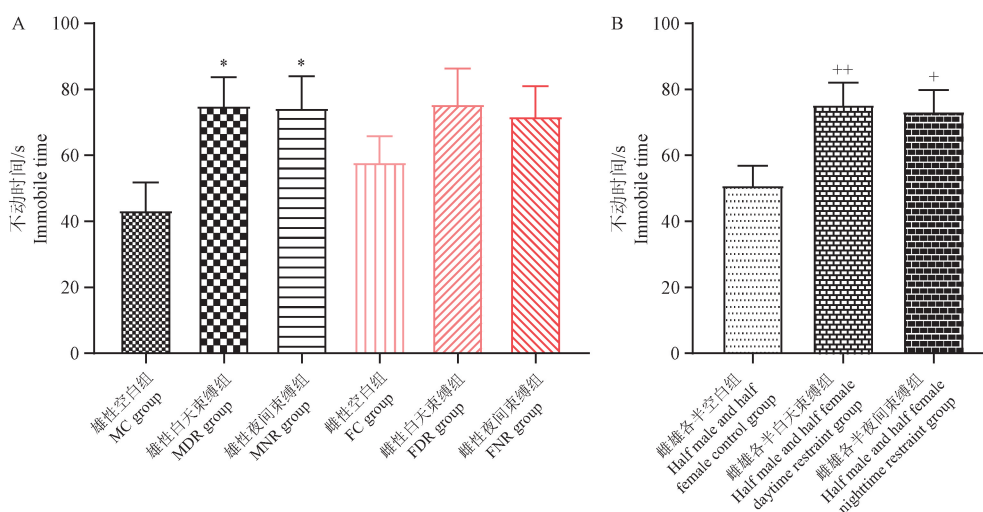


注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。与雄性空白组比较, * $P<0.05$;与雌雄各半空白组相比, ** $P<0.01$ 。

图1 慢性束缚对小鼠 TST 的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$). B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$). Compared with MC group, * $P<0.05$. Compared with the half male and half female control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Effect of chronic restraint on mouse TST



注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。与雄性空白组比较, * $P<0.05$;与雌雄各半空白组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 慢性束缚对小鼠 FST 的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$); B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$). Compared with MC group, * $P<0.05$. Compared with the half male and half female control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

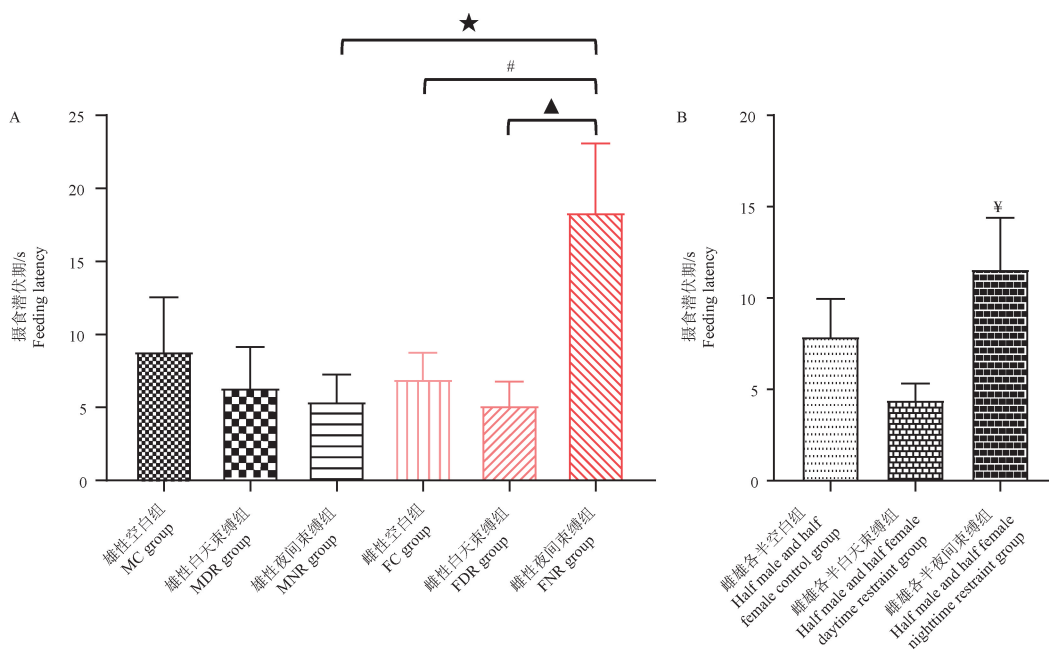
Figure 2 Effect of chronic restraint on FST in mice

与雌性空白组相比无明显差异,雌性夜间束缚组与雌性空白组相比呈显著性延长($P<0.05$),且与雌性白天束缚组相比呈显著性延长($P<0.05$);在白天束缚时,雄性小鼠和雌性小鼠相比摄食潜伏期无明显差异;在夜间束缚时雌性小鼠的摄食潜伏期与雄性相比显著延长($P<0.05$)。如图3B所示,与雌雄各半白天束缚组相比,雌雄各半夜间

束缚组小鼠的摄食潜伏期显著性延长($P<0.05$)。

2.2.2 慢性束缚对小鼠 OFT 的影响

如图4A所示及图5的小鼠空场轨迹图显示,雌性空白组与雄性空白组相比,中央区时间、中央区/边缘区时间呈显著性增加($P<0.05$);雄性白天和夜间束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间、平均速度及路程与雄性空白组相比无



注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。与雌性空白组比较, $^{\#}P<0.05$;与雌性白天束缚组比较, $^{\Delta}P<0.05$;与雌性夜间束缚组相比, $^{\star}P<0.05$;与雌雄各半白天束缚组相比, $^{\text{¥}}P<0.05$ 。

图3 慢性束缚对小鼠摄食潜伏期的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$); B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$). Compared with FC group, $^{\#}P<0.05$. Compared with FDR group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with the MNR group, $^{\star}P<0.05$. Compared with the half male and half female daytime restraint group, $^{\text{¥}}P<0.05$.

Figure 3 Effect of chronic restraint on feeding latency of mice

显著性差异;雌性白天束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间与雌性空白组相比呈显著性降低($P<0.05$),平均速度与路程无明显变化;雌性空白组的中央区时间、中央区/边缘区时间与雄性空白组相比呈显著性增加($P<0.05$);白天和夜间束缚组中,雄性小鼠的中央区时间、中央区/边缘区时间、平均速度及路程与雌性小鼠相比无明显差异。如图4B所示,与雌雄各半空白组相比,雌雄各半白天束缚组的中央区时间、中央区比边缘区时间呈显著性减少($P<0.05$, $P<0.01$);雌雄各半夜间束缚组的中央区时间、中央区比边缘区时间无明显差异;白天和夜间雌雄束缚组小鼠的平均速度、总路程无明显差异。

2.2.3 慢性束缚对小鼠 EPM 的影响

如图6A所示,白天和夜间束缚组的雌性和雄性小鼠与对应空白组相比,开臂时间百分比、开臂次数百分比均无显著性差异。如图6B所示,与雌雄各半空白组相比,雌雄各半白天和夜间束缚组开臂时间百分比和开臂次数百分比无显著差异。

2.3 慢性束缚对小鼠认知障碍行为的影响

2.3.1 慢性束缚对小鼠 Y 迷宫实验的影响

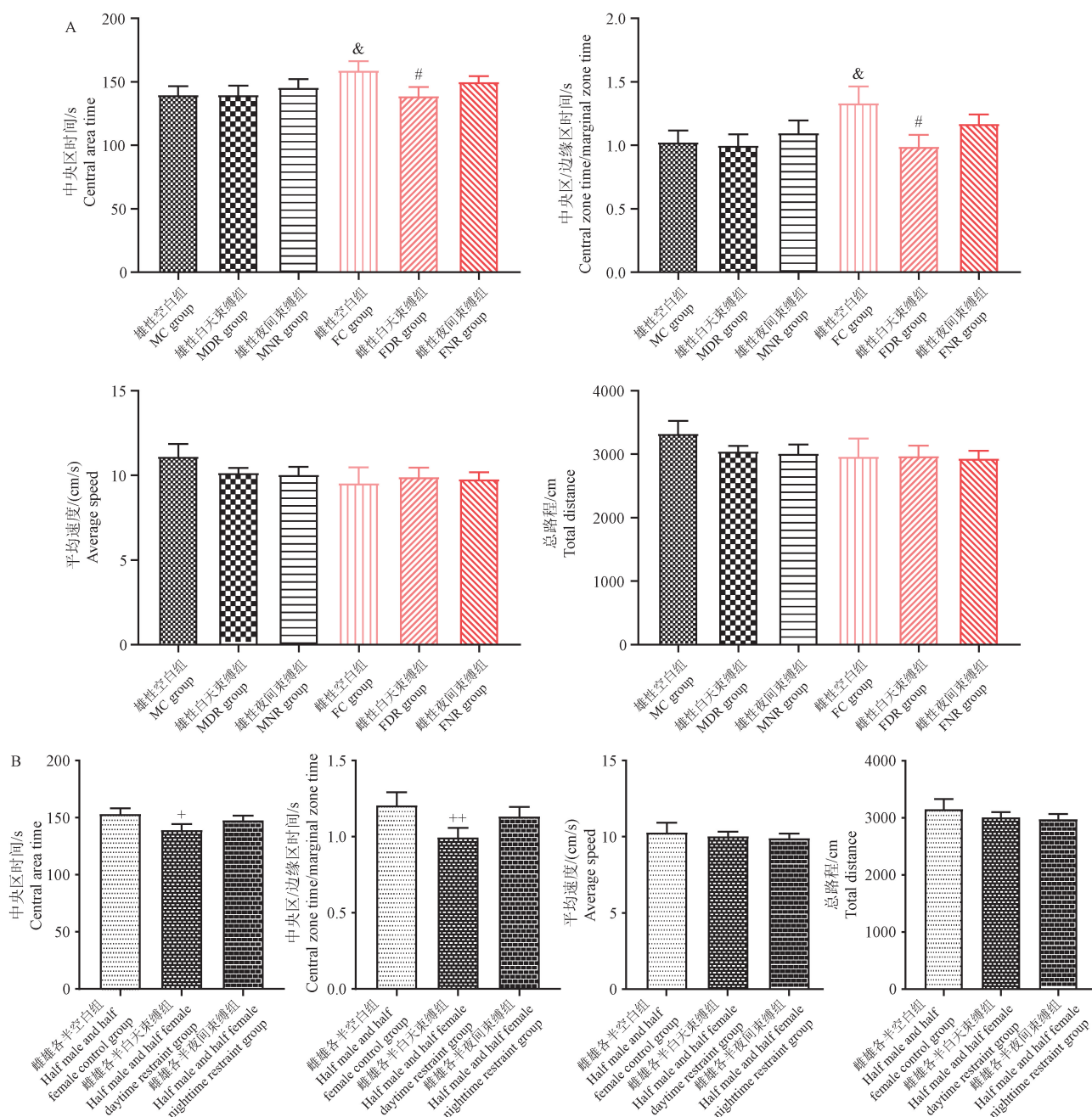
如图7A所示,白天和夜间束缚的雌性和雄性小鼠的自发交替百分比与对应空白组相比无显著性差异。如图7B所示,与雌雄各半空白对照组相比,雌雄各半白天和夜间束缚组小鼠的自发交替百分比无显著性差异。

2.3.2 慢性束缚对小鼠 ST 的影响

如图8A所示,雄性白天束缚组的入暗潜伏期与雄性空白组相比无明显差异,夜间束缚组的入暗潜伏期与空白组相比显著缩短($P<0.05$),夜间束缚组与白天束缚组相比入暗潜伏期显著缩短($P<0.05$);白天和夜间束缚组的雌性小鼠与雌性空白组相比无显著差异;与雄性空白组相比,雄性白天束缚组入暗潜伏期无显著差异,雄性夜间束缚组入暗潜伏期显著缩短($P<0.05$)。如图8B所示,与雌雄各半白天束缚组相比,雌雄各半夜间束缚组小鼠的入暗潜伏期显著缩短($P<0.05$)。

2.4 行为学结果

将雌雄小鼠分组统计时,如表1所示,雄性白



注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。与雄性空白组比较, $^{\&}P<0.05$;与雌性空白组比较, $^{\#}P<0.05$;与雌雄各半空白组相比, $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$ 。

图4 慢性束缚对小鼠旷场实验的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$); B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$). Compared with MC group, $^{\&}P<0.05$. Compared with FC group, $^{\#}P<0.05$. Compared with the half male and half female control group, $^{+}P<0.05$, $^{++}P<0.01$.

Figure 4 Effect of chronic restraint on mice in open field experiment

天束缚组的FST不动时间、悬尾不动时间显著增加($P<0.05$, $P<0.05$), 雄性夜间束缚组的悬尾不动时间显著增加($P<0.05$), 雌性白天和夜间束缚组的FST不动时间、悬尾不动时间有增加趋势;

雌性夜间束缚组的抑制摄食潜伏期显著增加($P<0.05$)。雌性白天束缚组的旷场中央区时间、中央区/边缘区时间显著减少, 雌性夜间束缚组有减少趋势。雄性夜间束缚组的入暗潜伏期显著

缩短 ($P<0.05$)。

将雌雄小鼠合并统计时,如表 2 所示,白天和夜间束缚组的 FST 不动时间显著增加 ($P<0.01$, $P<0.05$),白天束缚组的悬尾不动时间显著增加 ($P<0.01$),夜间束缚组的抑制摄食潜伏期显著增加 ($P<0.05$),白天和夜间束缚组的旷场中央区时间、中央区/边缘区时间显著减少 ($P<0.05$),夜间束缚组的入暗潜伏期显著缩短 ($P<0.05$)。

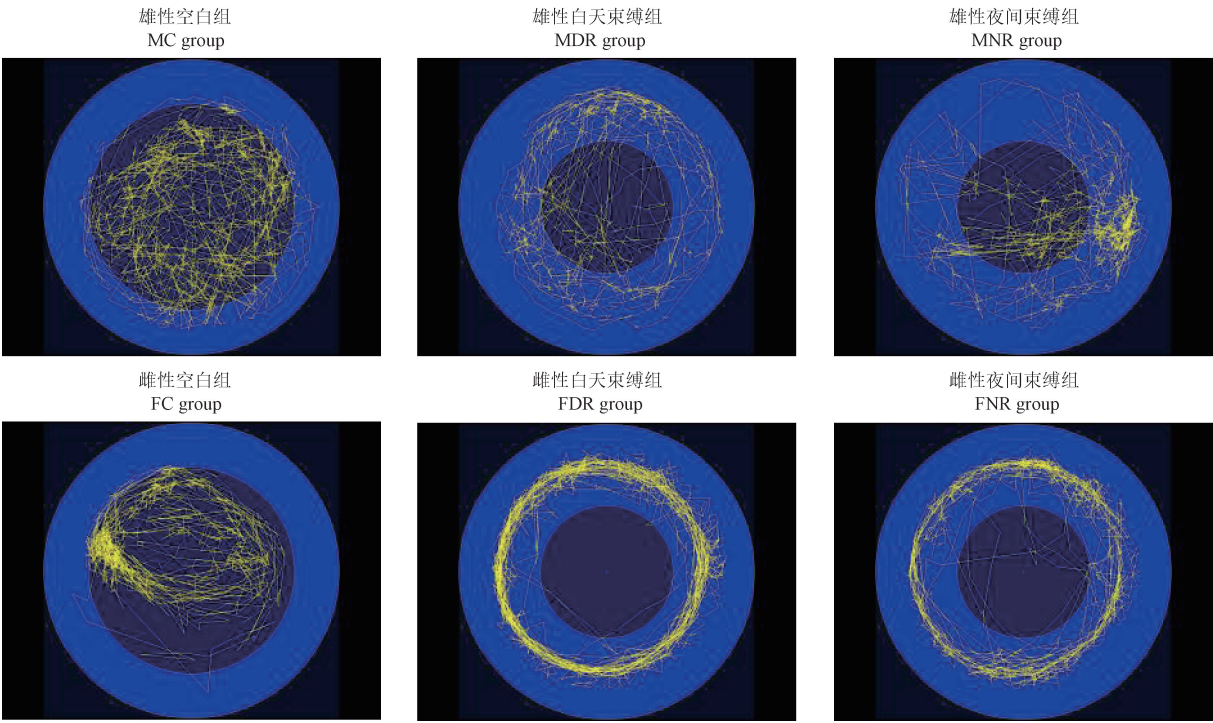
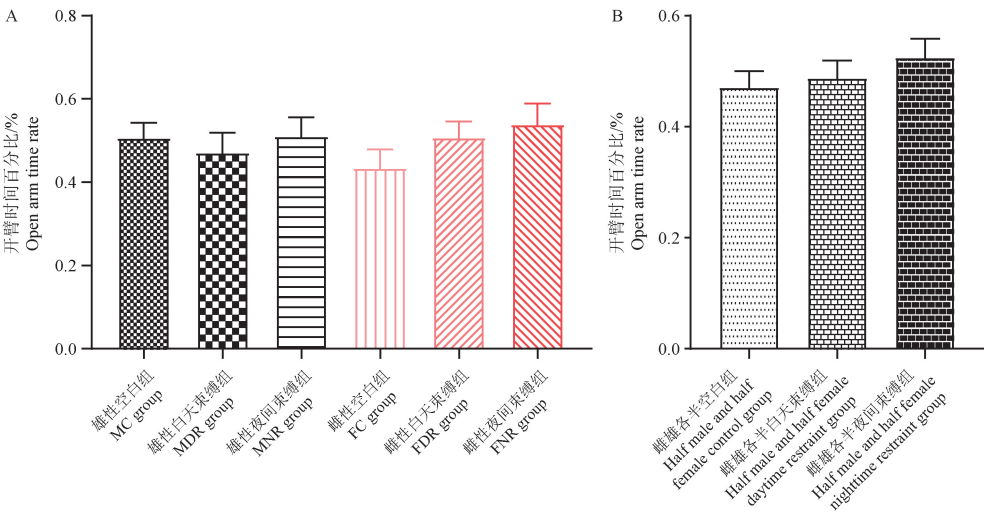


图 5 慢性束缚对小鼠旷场活动轨迹图

Figure 5 Vacant field activity track of mice subjected to chronic confinement

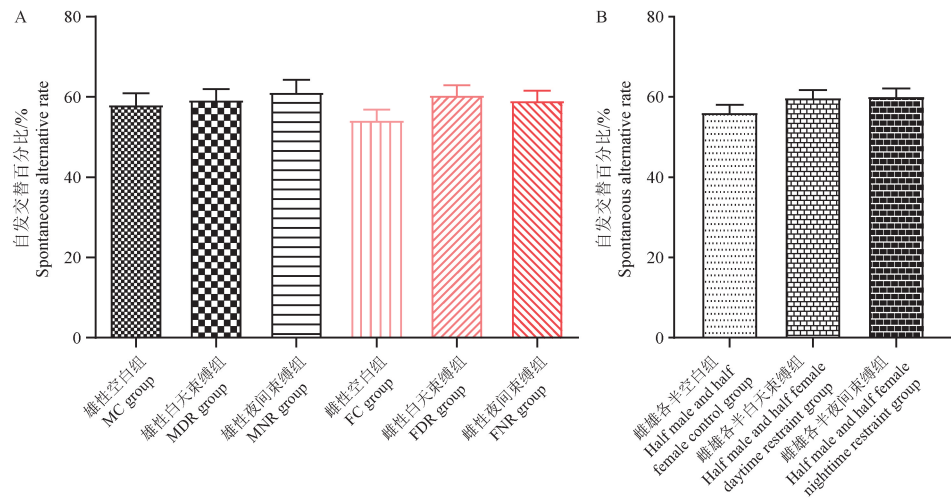


注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。

图 6 慢性束缚对小鼠高架十字迷宫实验的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$). B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$).

Figure 6 Effect of chronic restraint on elevated cross maze experiment in mice



注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。

图 7 慢性束缚对小鼠 Y 迷宫实验的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$). B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$).

Figure 7 Effect of chronic restraint on Y maze experiment in mice

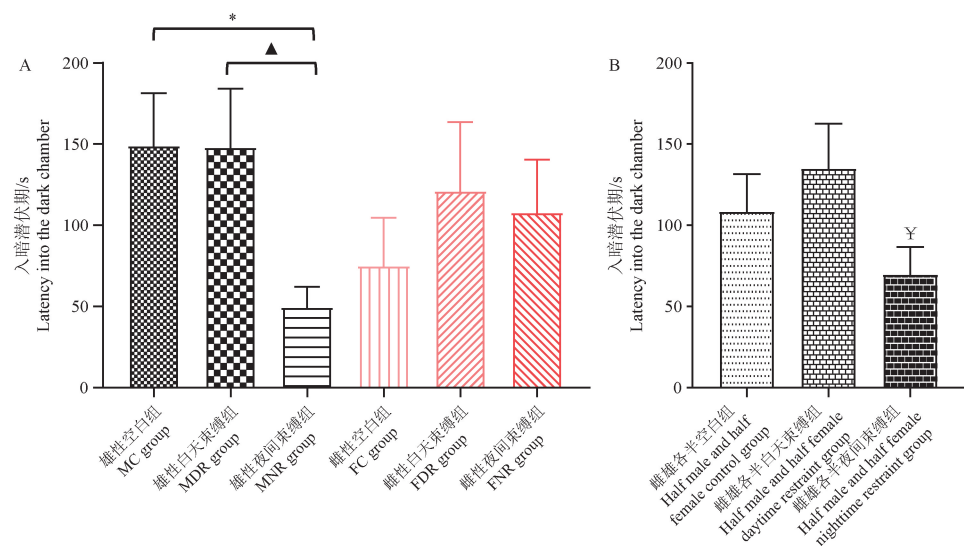
表 1 慢性束缚对雌雄小鼠分组的焦虑、抑郁及认知行为学检测汇总

Table 1 Summary of anxiety, depression and cognitive-behavioral tests of chronic restraint in male and female mice

组别 Groups		雄性白天束缚组 MDR group	雄性夜间束缚组 MNR group	雌性白天束缚组 FDR group	雌性夜间束缚组 FNR group
抑郁行为检测方法 Depressive behavior detection method	强迫游泳不动时间 FST-immobility time	↑ *	/	↑	↑
	悬尾不动时间 TST-immobility time	↑ *	↑ *	↑	↑
	抑制摄食潜伏期 NFST-latent period	/	/	/	↑ #; ↑ *; ↑ ▲
焦虑行为检测方法 Anxious behavior detection method	十字迷宫开臂/% EPM-open arm	/	/	/	/
	空场中央区时间 OFT-central area time	/	/	↓ #	↓
	空场中央区/边缘区时间 OFT-central area/ marginal area time	/	/	↓ #	↓
认知行为检测方法 Cognitive behavior detection method	Y 迷宫自发交替率 Y-maze-spontanence alternative rate	/	/	/	/
	避暗入暗潜伏期 ST-latency into the dark chamber	/	↓ *; ↓ ▲	/	/

注:与对应空白组相比,↑表示有增加趋势,↓表示有下降趋势;与雄性空白组相比,* $P<0.05$;与雌性空白组相比,# $P<0.05$;与雄性白天束缚组相比,▲ $P<0.05$;与雄性夜间束缚组相比,* $P<0.05$ 。

Note. Compared with the corresponding control group, ↑ indicates an increasing trend, ↓ indicates a downward trend. Compared with MC group, * $P<0.05$. Compared with FC group, # $P<0.05$. Compared with MDR group, ▲ $P<0.05$. Compared with the MNR group, * $P<0.05$.



注:A:雌雄分组统计($n=10\sim12$);B:雌雄同组统计($n=22\sim24$)。与雄性空白组相比, $*P<0.05$;与雄性白天束缚组比较, $^{\wedge}P<0.05$;与雌雄各半白天束缚组相比, $^{\text{¥}}P<0.05$ 。

图8 慢性束缚对小鼠避暗实验的影响

Note. A, Male and female mice were counted in groups ($n=10\sim12$). B, Male and female mice were counted in the same group ($n=22\sim24$). Compared with MC group, $*P<0.05$. Compared with MDR group, $^{\wedge}P<0.05$. Compared with the half male and half female daytime restraint group, $^{\text{¥}}P<0.05$.

Figure 8 Effects of chronic restraint on dark avoidance experiments in mice

表2 慢性束缚对雌雄小鼠同组的焦虑、抑郁及认知行为学检测汇总

Table 2 Summary of anxiety, depression and cognitive-behavioral tests of chronic restraint in the same group of male and female mice

组别 Groups		白天束缚组 Daytime restraint group	夜间束缚组 Night restraint group
抑郁行为检测方法 Depressive behavior detection method	强迫游泳不动时间 FST-immobility time	↑ ⁺⁺	↑ ⁺
	悬尾不动时间 TST-immobility time	↑ ⁺⁺	/
	抑制摄食潜伏期 NFST-latent period	/	↑ [¥]
焦虑行为检测方法 Anxious behavior detection method	十字迷宫开臂/% EPM-open arm	/	/
	空场中央区时间 OFT-central area time	↓ ⁺	/
	空场中央区/边缘区时间 OFT-central area/ marginal area time	↓ ⁺	/
认知行为检测方法 Cognitive behavior detection method	Y 迷宫自发交替率 Y-maze-spontanence alternative rate	/	/
	避暗入暗潜伏期 ST-latency into the dark chamber	/	↓ [¥]

注:与对应空白组相比,↑表示有增加趋势,↓表示有下降趋势;与雌雄各半空白对照组相比, $*P<0.05$, $^{++}P<0.01$;与雌雄各半白天束缚组相比, $^{\text{¥}}P<0.05$ 。

Note. Compared with the corresponding control group, ↑ indicates an increasing trend, ↓ indicates a downward trend. Compared with the half male and half female control group, $*P<0.05$, $^{++}P<0.01$. Compared with the half male and half female daytime restraint group, $^{\text{¥}}P<0.05$.

3 讨论

束缚是一种将动物置于狭小空间,使其不能自由活动的一种造模方法,可用来模拟人类长期在空间狭小、活动受限的状态下生存而造成的生理以及心理上的损伤,从而产生一些神经精神疾病,如抑郁、焦虑、认知障碍损伤等。目前也是一种较为广泛的模型,对研究神经精神类疾病具有重大意义^[25]。虽然有大量动物束缚的文献研究,但是对于束缚的时段以及束缚动物的性别并没有一个规范的研究。因此,规范的束缚模型对于后期研究动物神经精神类疾病有着至关重要的作用。

TST 是一种测试小鼠绝望状态的方法,作为评价动物绝望行为的指标,通常抑郁的小鼠会出现不动时间增加的现象^[26-27]。本研究中雄性小鼠的白天束缚组的不动时间呈显著性增加,雌性小鼠呈现相同的趋势。FST 是检测模型动物是否出现抑郁样的常用检测方法,该实验以游泳的不动时间为主要指标,检测其绝望行为,通常抑郁的动物会表现出不动时间增加的现象^[28]。本研究中,雄性小鼠的白天束缚组与夜间束缚组的不动时间均呈现显著性增加,雌性小鼠也有相同的趋势。综上结果表明在白天束缚雄性小鼠更易造成抑郁行为。

NSFT 是用于检测验证小鼠焦虑样行为的实验,当对新环境的恐惧情绪大于饥饿状态对小鼠的影响时,其摄食潜伏期会出现延长的现象^[29]。本研究中雌性小鼠夜间束缚组的摄食潜伏期与雌性空白组和雌性白天束缚组相比显著延长;这表明在夜间束缚雌性小鼠更易造成动物焦虑行为;旷场实验中,雌性小鼠白天束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间与雌性空白组相比呈显著性降低,雌性小鼠空白组的中央区时间、中央区/边缘区时间与雄性小鼠空白组相比呈显著性增加。以上结果表明,束缚雌性小鼠比束缚雄性小鼠更易产生焦虑行为。

Y 迷宫是基于啮齿类动物自发探索的行为设计的,是一种评价“工作记忆”的行为实验方法,认知正常的小鼠会记住刚探索过的臂,下一步会倾向于探索新的臂,出现认知障碍的小鼠通常无法学会交替选择,使得正确的交替率降低^[30-31],

本研究中雌雄各束缚组无显著性差异。避暗实验是利用啮齿类动物嗜暗习性设计的,认知功能受损严重的小鼠会快速地进入暗室,则入暗潜伏期会缩短^[32]。本研究中雄性小鼠夜间束缚组的入暗潜伏期与雄性空白组相比显著缩短,且较雄性白天束缚组呈现显著性缩短,而雌性小鼠并没有此现象;这表明束缚雄性小鼠比束缚雌性小鼠更易造成记忆损失,尤其是夜间束缚,记忆损失更加明显。

在实际应用中,雌雄各半的设计同样具有意义,不同性别的动物对同一药物的敏感程度是有差异的。因此将雌雄小鼠合并进行统计发现,在悬尾实验中,白天束缚组的不动时间显著增加;在强迫游泳实验中,白天和夜间束缚组小鼠的不动时间明显增加,表明白天和夜间造模四周均可使小鼠产生抑郁样行为,且白天束缚小鼠比夜间束缚小鼠更易产生抑郁行为。在旷场实验中,白天束缚组的中央区时间、中央区/边缘区时间较空白组呈现显著性减少,表明白天束缚小鼠出现焦虑样行为。

综上,本研究进行不同时段束缚 ICR 雌雄小鼠 28 d,通过比较三大行为学检测结果可得出初步结论,在抑郁行为检测中,TST 和 FST 均表现出雄性小鼠在白天束缚时更易造成抑郁情绪。因此,在选择抑郁模型时可以选择在白天束缚雄性小鼠;在焦虑行为检测中,OFT 和 NSFT 均表现出束缚雌性小鼠更易造成焦虑情绪。因此,在选择抑郁模型性别时可选择雌性;在记忆行为检测中,惩罚性记忆实验可以看出雄性在夜间束缚会更容易产生记忆损失,因此,在选择记忆损伤模型时可选择在夜间束缚雄性小鼠。

参考文献:

- [1] MCEWEN B S. Neurobiological and systemic effects of chronic stress [J]. *Chronic Stress*, 2017, 1: 24705470176 92328.
- [2] DOMÍNGUEZ-OLIVA A, HERNÁNDEZ-ÁVALOS I, MARTÍNEZ-BURNES J, et al. The importance of animal models in biomedical research: current insights and applications [J]. *Animals*, 2023, 13(7): 1223.
- [3] BAILEY M, SILVER R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2014, 35(1): 111-139.

- [4] 张辉, 邢博, 师建国, 等. 研究昼夜节律对不同性别、品系小鼠悬尾实验的影响 [A]. 中华医学会精神病学分会第九次全国学术会议论文集 [C]. 2011.
ZHANG H, XING B, SHI J G, et al. To study the effect of circadian rhythm on tail suspension experiment of different sex and strain mice [A]. Proceedings of the ninth National Academic Conference of the Psychiatry Branch of the Chinese Medical Association [C]. 2011.
- [5] 刘友平, 刘田, 毕航, 等. 品系、性别和生物节律对小鼠旷场实验的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2014, 35(5): 634-638.
LIU Y P, LIU T, BI H, et al. Effects of strain, sex and circadian rhythm on open field test on mice [J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2014, 35(5): 634-638.
- [6] JIANG N, LV J W, WANG H X, et al. Antidepressant-like effects of ginsenoside Rg1 in the chronic restraint stress-induced rat model [J]. Digit Chin Med, 2019, 2(4): 207-218.
- [7] 张宏霞. 基于明暗箱抗焦虑中药药效评价方法及荷叶黄酮抗焦虑作用的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
ZHANG H X. Based on the evaluation method of anti-anxiety traditional Chinese medicine and the anti-anxiety effect of lotus leaf flavonoids [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2018.
- [8] 张北月, 卢聪, 董黎明, 等. 不同时长的束缚应激致雌雄大鼠的抑郁样行为改变 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 18-23.
ZHANG B Y, LU C, DONG L M, et al. Depressive-like behavior of male and female rats induced by restraint stress with different restraint duration [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(11): 18-23.
- [9] 王逸, 卢聪, 宋广青, 等. 慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 40-44.
WANG Y, LU C, SONG G Q, et al. Effects of chronic restraint stress on learning and memory in SD and Wistar rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(2): 40-44.
- [10] CAN A, DAO D T, TERRILLION C E, et al. The tail suspension test [J]. J Vis Exp. 2012, 59: e3769.
- [11] 李腾飞, 孙秀萍, 石哲, 等. 不同品系小鼠在三种常见抑郁检测方法中的行为学表现 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 20-23.
LI T F, SUN X P, SHI Z, et al. Different behavioral activities of different mouse strains detected by three common tests for depression [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(8): 20-23.
- [12] AN L, LI J, YU S T, et al. Effects of the total flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang on depression-like behavior induced by lipopolysaccharide and proinflammatory cytokine levels in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 163: 83-87.
- [13] PETIT-DEMOULIERE B, CHENU F, BOURIN M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity [J]. Psychopharmacology (Berl), 2005, 177(3): 245-255.
- [14] YANKELEVITCH-YAHAV R, FRANKO M, HULY A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior [J]. J Vis Exp, 2015, 97: 52587.
- [15] ALAMRI H S, MUFTI R, SABIR D K, et al. Forced swimming-induced depressive-like behavior and anxiety are reduced by chlorpheniramine *via* suppression of oxidative and inflammatory mediators and activating the Nrf2-BDNF signaling pathway [J]. Curr Issues Mol Biol, 2023, 45(8): 6449-6465.
- [16] SHI Z M, JING J J, XUE Z J, et al. Stellate ganglion block ameliorated central post-stroke pain with comorbid anxiety and depression through inhibiting HIF-1 α /NLRP3 signaling following thalamic hemorrhagic stroke [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 82.
- [17] 叶帆. 慢性束缚应激诱导的小鼠焦虑和焦虑-抑郁模型及黄秋葵种子的调控作用 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2023.
YE F. Model of anxiety and anxiety-depression induced by chronic restraint stress in mice and the regulatory effect of okra seeds [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2023.
- [18] 张瑛毓, 韦震, 任梓溢, 等. 雌马酚(S-equal, Eq)对慢性不可预知温和刺激小鼠抑郁样行为的改善作用 [J]. 大豆科学, 2022, 41(6): 726-732.
ZHANG Y Y, WEI Z, REN Z Y, et al. Protective effects of S-equal on depressive-like behavior induced by chronic unpredictable mild stress in mice [J]. Soybean Sci, 2022, 41(6): 726-732.
- [19] 贝雪怡, 姜宁, 姚彩虹, 等. 人参皂苷 Rg1 和 Rb1 改善慢性不可预测应激致大鼠抑郁、焦虑样行为的作用比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 68-78.
BEI X Y, JIANG N, YAO C H, et al. Effects and comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 in depression-And anxiety-like behaviors induced by chronic unpredictable stress in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 68-78.
- [20] 柴青, 张宏斌, 吴立东, 等. 基于 1H NMR 代谢组学与网络药理学的复方宁神精油抗失眠组分物质基础及作用机制研究 [J]. 药学报, 2024, 59(8): 2313-2325.
CHAI Q, ZHANG H B, WU L D, et al. Study on the material basis and mechanism of anti-insomnia mechanism of Ning Shen Essential Oil based on 1H NMR metabolomics and network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(8): 2313-2325.

- [21] BIAN L H, WANG S Q, LI W J, et al. Cryptotanshinone regulates gut microbiota and PI3K-AKT pathway in rats to alleviate CUMS induced depressive symptoms [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 169: 115921.
- [22] CLEAL M, FONTANA B D, RANSON D C, et al. The free-movement pattern Y-maze: a cross-species measure of working memory and executive function [J]. Behav Res Methods, 2021, 53(2): 536–557.
- [23] 姜宁, 张亦文, 黄红, 等. 大小鼠学习记忆行为实验方法分类概述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 839–845.
- JIANG N, ZHANG Y W, HUANG H, et al. Overview of animal behavioral tests of learning and memory [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 839–845.
- [24] 魏山山, 王孟迪, 姜宁, 等. 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg¹⁺Rb1 改善东莨菪碱致小鼠认知障碍的作用比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 94–101.
- WEI S S, WANG M D, JIANG N, et al. Comparison of the effects among ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg¹⁺Rb1 on scopolamine-induced cognitive impairment in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 94–101.
- [25] LIU L, ZHOU X, ZHANG Y, et al. The identification of metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the chronic restraint stress rat model of depression [J]. Behav Brain Res, 2016, 305: 148–156.
- [26] STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. Psychopharmacology (Berl), 1985, 85(3): 367–370.
- [27] 孙秀萍, 张晓萌, 卢聪, 等. 悬尾实验实时检测分析处理系统的研制及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(5): 66–71.
- SUN X P, ZHANG X M, LU C, et al. Development and application of computer-auto-controlling and analysis system for tail suspension [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(5): 66–71.
- [28] PORSOLT R D, BERTIN A, JALFRE M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229(2): 327–336.
- [29] BRITTON D R, BRITTON K T. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1981, 15(4): 577–582.
- [30] 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.
- [31] 黄红, 陈碧清, 姜宁, 等. 鲜天麻对睡眠干扰诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2509–2516.
- HUANG H, CHEN B Q, JIANG N, et al. Fresh *Gastrodia elata* ameliorates learning and memory impairments in sleep interruption induced mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(9): 2509–2516.
- [32] 黄红, 姜宁, 张亦文, 等. 鲜天麻对慢性束缚应激诱导小鼠学习记忆损伤的改善作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 653–654.
- HUANG H, JIANG N, ZHANG Y W, et al. Effect of fresh *Gastrodia elata* on learning and memory impairment induced by chronic restraint stress in mice [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(9): 653–654.

[收稿日期]2024-11-22