

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.05.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221109.1626.008.html\(2022-11-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221109.1626.008.html(2022-11-10))

精神压力-应激动物模型的建立及行为学评价*

董星明^{1,2}, 陈 柯³, 善孝胜¹, 李庆亮⁴, 张兆元¹, 马茜钰¹, 张 锦^{5△}

(1. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000; 2. 山东省潍坊市人民医院心内二科 261000;
3. 潍坊医学院基础医学院, 山东潍坊 261000; 4. 甘肃中医药大学第一
临床医学院, 兰州 730000; 5. 兰州大学第一医院心内科, 兰州 730000)

[摘要] **目的** 建立精神压力-应激大鼠模型并进行行为学评价。**方法** 将 80 只雄性 SD 大鼠分为对照组和模型组, 模型组分别进行 2、4、8、12 周的每天 3 种不可预知性刺激, 通过观察一般状态, 测定体重变化率、糖水偏好率、旷场实验活动等, 对精神压力-应激大鼠模型进行评价。**结果** 与对照组比较, 模型组早期表现出易激惹, 随着建模时间的延长, 逐渐表现出反应迟钝、兴趣丧失等淡漠抑制状态; 自实验开始, 模型组体重变化率始终低于对照组 ($P < 0.05$); 实验后 2 周, 模型组糖水偏好率明显低于对照组 ($P < 0.05$); 实验后 4 周, 模型组旷场实验活动评分明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 采用每天 3 种不可预知刺激与孤养方法建立的精神压力-应激大鼠模型可以作为精神压力-应激相关性疾病研究的动物模型。

[关键词] 精神压力-应激; 行为学评价; 动物模型; 糖水偏好试验; 旷场实验

[中图分类号] R749.92 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)05-0648-05

Establishment and behavioral evaluation of mental pressure-stress animal model*

DONG Xingming^{1,2}, CHEN Ke³, SHAN Xiaosheng¹, LI Qingliang⁴,
ZHANG Zhaoyuan¹, MA Qianyu¹, ZHANG Jin^{5△}

(1. The First Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;
2. The Second Department of Cardiology, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261000,
China; 3. School of Basic Medical Science, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261000,
China; 4. The First School of Clinical Medicine, Gansu University of Chinese
Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China; 5. Department of Cardiology, the First
Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

[Abstract] **Objective** To establish the mental pressure-stress rat model and conduct behavioral evaluation. **Methods** A total of 80 male SD rats were randomly divided into the control group and the model group, and the model group was subjected to three kinds of unpredictable stress every day for 2, 4, 8 and 12 weeks respectively. The mental pressure-stress model was evaluated by observing the general state, the change rate of body weight, sucrose preference test, and the open field test activities. **Results** Compared with the control group, the model group showed irritability in the early stage, and gradually showed depression with the extension of modeling time. Since the modeling, the change rate of body weight in the model group was always lower than that in the control group ($P < 0.05$). After two weeks of modeling, sucrose preference in the model group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). After four weeks of modeling, the open field test activity score in the model group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The mental pressure-stress model established by using three kinds of unpredictable stress and solitary rearing can be used as animal model for the study of mental pressure-stress related diseases.

[Key words] mental pressure-stress; behavioral evaluation; animal model; sucrose preference test; open field test

随着当前社会生活节奏加快、社会竞争加剧, 长期的精神压力大、超负荷工作、生活作息紊乱等问题

* 基金项目: 甘肃省高等学校创新能力提升项目(2019B-005); 兰州大学第一医院 2018 年度院内基金(ldyyyn2018-39)。 作者简介: 董星明(1993-), 住院医师, 硕士, 主要从事应激与心肌损伤研究。 △ 通信作者, E-mail: chzhangjin@163.com。

越来越突出,共同构成了人们承受的不良应激因素,导致既往无心脑血管疾病史的人群猝死发生率明显增加。健康人群猝死现象成为医学界和法律学界关注的焦点。因此,笔者提出,上述这些因素均可作为应激源,刺激机体发生应激反应,从而引起机体损伤,故将上述过程称为精神压力-应激。

大量研究发现,长期在应激状态下会影响身心健康、生活质量和工作效率,严重时引起精神心理性疾病或心脑血管等躯体性疾病,甚至发生猝死^[1-3]。有研究探讨每周工作时间和轮班工作与慢性疾病之间的关系,发现在患慢性疾病的工人中,每周工作时间超过 40 h 和轮班工作与血糖、血压、血脂等临床测定指标呈负相关^[4]。CHANG 等^[5]发现,压力性生活事件,尤其是那些产生慢性压力的事件,可能会使原本健康的个体更易患致命性心律失常,而导致猝死的发生。还有研究显示,2008—2018 年,中国共有 107 位医生因过度劳累而猝死在工作岗位上,平均年龄(39.67±9.46)岁,其中男性占比 88.57%^[6]。中青年人群中猝死现象的高发成为社会关注的焦点。应激不仅是多种疾病的促发因素,还是引起器官损伤的重要原因,其中,心、脑和血管是应激的主要靶器官。由应激导致的猝死可能与精神压力-应激密切相关,但其机制尚不清楚。因此,本研究拟通过建立精神压力-应激大鼠模型,探讨精神压力-应激相关性疾病发病机制,为防治精神压力-应激引起的心肌损伤及猝死发生提供参考,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

80 只无特殊病原体(SPF)级健康成年雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,购于兰州大学医学院实验动物中心,许可证号:SYXK(甘)2013-003,饲养于兰州大学医学院 SPF 级动物实验室。动物饲养温度(23±3)℃,相对湿度 40%~70%,光照时间 07:00—19:00。本研究经兰州大学第一医院伦理委员会批准,操作符合医学实验动物的保护原则。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

适应性饲养 1 周后,对大鼠进行称重,并进行糖水偏好实验和旷场实验测定,将 80 只大鼠分为对照组(2、4、8、12 周)和模型组(2、4、8、12 周),每组各 10 只。

1.2.2 动物模型建立

精神压力-应激动物模型的构建参考文献^[7]并加以改进,对照组 5 只/笼正常饲养,模型组采用单笼饲养结合每天 3 种不可预知性刺激的方法建立动物模型,共 13 种不可预知性刺激,模型组分别接受的应激

时长为 2、4、8、12 周,具体方案如下:(1)禁食 24 h;(2)禁水 24 h;(3)昼夜颠倒各 12 h;(4)夹尾 2 min;(5)潮湿垫料 24 h;(6)空笼 24 h;(7)4℃冰水游泳 7 min;(8)束缚 2 h;(9)闪光 2 h;(10)空水瓶暴露 2 h;(11)倾斜 45° 12 h;(12)彻夜光照 12 h;(13)25℃水强迫游泳 20 min。

1.2.3 一般情况观察

每天观察大鼠的一般状态,包括精神状态、毛发情况、运动状态、抓取时挣扎程度、对刺激反应情况及大小便情况等。

1.2.4 体重变化测定

相同时间段内对实验前后大鼠进行称重,监测实验期间模型组和对照组体重变化并记录每周末的体重,以实验前体重作为基线水平,计算分析大鼠体重变化情况。体重变化率(%)=(建模期体重-基线体重)/基线体重×100%。

1.2.5 糖水偏好实验

参考文献^[8]进行操作,测定 2 h 内大鼠对 1%蔗糖水的消耗百分比。具体方法如下:所有大鼠单笼饲养,自由饮用两瓶 1%蔗糖水 24 h,随后自由饮用 1%蔗糖水和纯水 24 h,禁食水 24 h 后给予 1 瓶 1%蔗糖水和 1 瓶纯水,期间调换 2 瓶水的位置,饮用 2 h 后撤掉瓶子。称量并记录蔗糖水和纯水的消耗量,计算糖水偏好率。糖水偏好率(%)=(糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量))×100%。

1.2.6 旷场实验

参考文献^[9]并进行测定。实验开始时将大鼠放在长宽高为 60 cm×60 cm×40 cm 的正方形旷场箱中,箱底由 9 个 20 cm×20 cm 等大的方格组成,中央上方安置摄像头,记录大鼠 5 min 内的活动情况。观察和分析指标包括:(1)水平运动评分,即穿越方格数,以四爪完全进入下一格为标准,每穿越 1 格计 1 分;(2)垂直运动评分,即站立次数,以大鼠前肢同时腾空>1 cm 或攀附箱壁为标准,每次站立计 1 分。旷场实验评分=水平运动评分+垂直运动评分。

1.3 统计学处理

使用 Graphpad Prism8.0 软件进行制图。采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察

实验前,两组大鼠性格温顺,皮肤毛发柔顺有光泽,体型正常,进食饮水正常,睡眠质量好。实验后 2 周,模型组大鼠表现为易惊醒、浅睡眠、烦躁不安、警

觉性增加、攻击性增强等易激惹状态,随着精神压力-应激时间的增加,逐渐出现反应迟钝、兴趣丧失等淡漠抑制状态,伴有皮肤毛发暗淡无光、进食饮水减少、运动减少、腹型肥胖、体型瘦小等表现。

2.2 体重变化测定

实验前,两组体重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验后,两组体重均有不同程度增加,模型组体重始终低于对照组($P < 0.05$),且随着建模时间的延长,这种差异越来越明显;自实验后4周,模型组体重在一定范围内波动,不再出现明显的增减,见表1、图1。

表1 两组大鼠体重比较($n=10, \bar{x} \pm s, g$)

时间	实验前		实验后	
	对照组	模型组	对照组	模型组
2周	278.58±17.19	278.61±12.10	353.65±21.83	290.50±12.42 ^a
4周	290.19±8.47	290.94±9.51	399.36±20.86	317.88±12.09 ^a
8周	287.27±16.03	288.76±15.90	450.14±19.84	321.73±17.79 ^a
12周	282.00±19.42	285.18±14.47	480.85±25.83	317.85±14.17 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

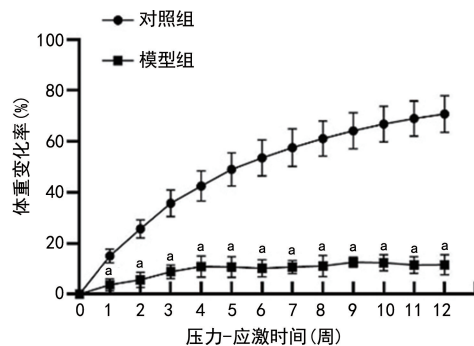
2.3 糖水偏好率

实验后2周,与对照组比较,模型组糖水偏好率降低($P < 0.05$),且这种差异在整个实验期间持续存在,随着精神压力-应激时间的延长,模型组糖水偏好率逐渐降低,而对照组糖水偏好率无明显变化,见图2。

2.4 旷场实验活动评分

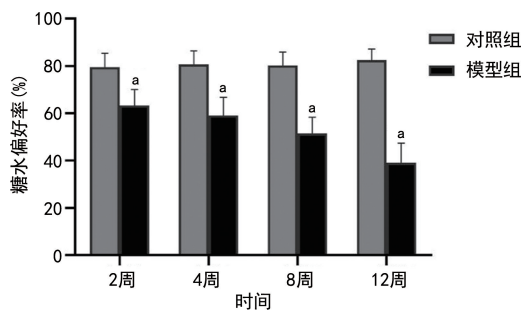
实验后2周,模型组水平运动评分、垂直运动评分及旷场实验活动评分降低,但两组旷场实验行为学

表现比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验后4、8周,模型组水平运动评分、垂直运动评分及旷场实验活动评分明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着实验时间延长至12周时,模型组大鼠活动进一步减少,水平运动评分、垂直运动评分及旷场实验活动评分降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图3。



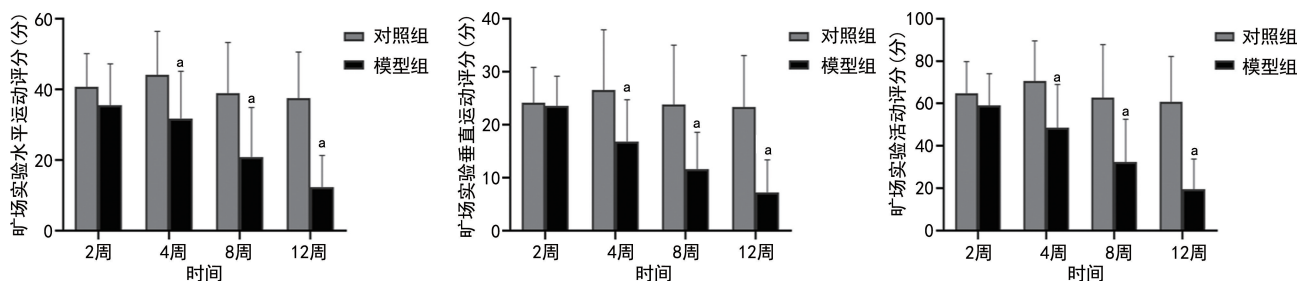
^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图1 大鼠体重变化情况



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图2 糖水偏好率



A: 水平运动评分; B: 垂直运动评分; C: 旷场实验活动评分; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图3 旷场实验结果

3 讨论

由于社会发展转型,每个人扮演着多重身份和角色,压力或应激充斥在每个人的生活和工作中。然而在强烈、长期的压力或应激状态下,人们的行为会产生病理性改变,对机体产生不利影响。除了吸烟、饮酒、糖尿病、高血压等心脑血管传统危险因素外,焦虑抑郁等精神心理压力和社会生活压力等也可作为应

激原的重要组成部分参与高血压、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心律失常等心血管疾病的发生^[10-11]。既往的研究发现,在长期应激状态下,交感神经系统(sympathetic nervous system, SNS)、下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)等会过度激活,一方面可以引起血液中儿茶酚胺水平的增加,对心脑血管产生持续激动作用,从而导致血压升

高、心率增快,且产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS),造成血管内皮损伤^[12];另一方面,还可以引起糖皮质激素的大量释放,使脂肪分解增多,诱发高脂血症。此外,糖皮质激素还可以增加血管对儿茶酚胺的反应性,进一步加剧血管内皮的损伤^[13-14]。基于上述研究理论,为了最大程度模拟人们在生活中遇到的各种不良精神压力、生活习惯,使其更符合研究者所提出的精神压力-应激概念,从而建立精神压力-应激大鼠模型。

SD 大鼠是生物行为和药理学研究中使用最广泛的品系,由于其神经系统与人类相似,垂体-肾上腺系统功能发达,被广泛应用于认知记忆、奖赏机制等高级神经活动的研究^[15]。此外,此种属还有获取方便、重复性好、模拟性好等特点。故本实验选择 SD 大鼠作为研究对象。

当前,研究应激的模型包括慢性不可预知性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)、社会失败应激(social defeat stress, SDS)、早期应激(early life stress, ELS)、给药等多种方式^[16]。在本实验模型研究中,为最大程度模拟当今社会高竞争、超时工作、生活作息紊乱、焦虑抑郁等精神压力-应激状态,通过适当增加建模时间与刺激种类,对目前存在的动物模型进行改良,建立精神压力-应激大鼠模型。观察大鼠一般状态,发现在建模的早期(2 周),模型组表现出攻击性增强、烦躁不安等激惹状态,随着建模时间的增加,逐渐出现反应迟钝、兴趣丧失等淡漠抑制状态,这与 MATISZ 等^[17]研究结果类似。模型组状态的变化可能与血浆中激素变化有关,早期儿茶酚胺水平升高,对机体产生兴奋作用,随着应激时间的延长,长期高浓度的儿茶酚胺对心肌产生损伤^[18]。此外 ROSTAMKHANI 等^[19]发现在急性应激状态下,应激组血浆皮质醇水平明显增加,在慢性应激下,应激组皮质醇水平明显低于对照组。

从体重变化来看,各组体重均有一定的增加,模型组增加程度明显低于对照组,从建模 4 周开始,模型组体重不再出现明显的变化。有研究发现,大鼠的体重变化与刺激的强度、类型、持续时间等有关^[19]。LÓPEZ 等^[20]发现在给予大鼠不同刺激 40 d 后,实验组大鼠出现体重的明显减低,并推测可能与扰乱大鼠碳水化合物、脂质及激素的代谢过程相关。精神压力-应激状态影响糖脂代谢导致体重增加缓慢,另一方面可以使交感神经过度兴奋,能量消耗增加、摄入减少导致体重增长受到抑制。

糖水偏好率可以反映动物对愉快感的体验程度和奖赏性事件的反应程度。本实验采用双瓶水来测定,预先进行蔗糖水适应,结合测定前禁食禁水状态,

可以明显地比较出不同状态下快感的缺乏程度^[21]。本研究发现,自建模 2 周开始,模型组糖水偏好率明显降低($P < 0.05$),且随着建模时间的延长,与对照组相比降低更加明显。在旷场实验中,水平运动距离反映大鼠活动度的情况,垂直活动反映对新环境的好奇程度。通过评估旷场实验活动情况,能够测定出大鼠在新环境中的自主行为、探究行为与紧张度^[22]。在本研究中,重点测定了水平运动格数和垂直站立次数,发现建模 2 周时,旷场实验活动评分无明显差异,自建模 4 周开始,模型组旷场实验活动评分明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着建模时间的延长,这种差异更加的明显。说明随着应激时间的延长,自发运动能力在环境压力超过其承受能力时才出现明显的减弱。

综上所述,在精神压力-应激概念的基础上,本研究采用每天给予大鼠 3 种不可预知刺激与孤养的方法建立精神压力-应激大鼠模型,发现模型组大鼠在体重、行为学等方面与对照组相比出现了差异性改变,表明本研究建立的精神压力-应激大鼠模型是成功的,可以作为研究精神压力-应激相关性疾病的动物模型。

参考文献

- [1] POWELL-WILEY T M, DEY A K, RIVERS J P, et al. Chronic stress-related neural activity associates with subclinical cardiovascular disease in a community-based cohort; data from the Washington D. C. Cardiovascular Health And Needs Assessment [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 599341.
- [2] OSBORNE M T, SHIN L M, MEHTA N N, et al. Disentangling the links between psychosocial stress and cardiovascular disease [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(8): e010931.
- [3] BATELAAN N M, SELDENRIJK A, VAN DE NHEUVEL O A, et al. Anxiety, mental stress, and sudden cardiac arrest: epidemiology, possible mechanisms and future research [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 813518.
- [4] KANG E. Differences in clinical indicators of diabetes, hypertension, and dyslipidemia among workers who worked long hours and shift work [J]. *Workplace Health Saf*, 2021, 69(6): 268-276.
- [5] CHANG LIU M, TESTER M A, FRANCIOSI S, et al. Potential role of life stress in unexplained sudden cardiac arrest [J]. *CJC Open*, 2021, 3(3):

- 285-291.
- [6] YANG C, CHEN Z, CHEN L. Overwork-induced sudden death; a sword of damocles hanging over chinese medical staff[J]. *Iran J Public Health*, 2020, 49(2): 392-393.
- [7] GAO L N, YAN M, ZHOU L, et al. Puerarin alleviates depression-like behavior induced by high-fat diet combined with chronic unpredictable mild stress via repairing tlr4-induced inflammatory damages and phospholipid metabolism disorders[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 767333.
- [8] DING F, WU J, LIU C, et al. Effect of xiaoyaosan on colon morphology and intestinal permeability in rats with chronic unpredictable mild stress [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1069.
- [9] YAN L, XU X, HE Z, et al. Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of coadministration of Chaihu Shugan San and fluoxetine; dependent on the BDNF-ERK-CREB signaling pathway in the hippocampus and frontal cortex [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 2794263.
- [10] HAGSTRÖM E, NORLUND F, STEBBINS A, et al. Psychosocial stress and major cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease[J]. *J Intern Med*, 2018, 283(1): 83-92.
- [11] FU Y, SHEN X, HUANG W. Association between depression and risk of triggering ventricular arrhythmias; a meta-analysis[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2019, 57(6): 306-314.
- [12] DU Y, DEMILLARD L J, REN J. Catecholamine-induced cardiotoxicity; a critical element in the pathophysiology of stroke-induced heart injury [J]. *Life Sci*, 2021, 287: 120106.
- [13] SHER L D, GEDDIE H, OLIVIER L, et al. Chronic stress and endothelial dysfunction; mechanisms, experimental challenges, and the way ahead[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319(2): H488-506.
- [14] ZUO W, GUO W S, YU H C, et al. Role of junction-mediating and regulatory protein in the pathogenesis of glucocorticoid-induced endothelial cell lesions[J]. *Orthop Surg*, 2020, 12(3): 964-973.
- [15] LOVELOCK D F, DEAK T. Acute stress imposed during adolescence yields heightened anxiety in Sprague Dawley rats that persists into adulthood; sex differences and potential involvement of the medial amygdala [J]. *Brain Res*, 2019, 1723: 146392.
- [16] PLANCHEZ B, SURGET A, BELZUNG C. Animal models of major depression; drawbacks and challenges[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2019, 126(11): 1383-1408.
- [17] MATISZ C E, BADENHORST C A, GRUBER A J. Chronic unpredictable stress shifts rat behavior from exploration to exploitation [J]. *Stress*, 2021, 24(5): 635-644.
- [18] HERING D, LACHOWSKA K, SCHLAICH M. Role of the sympathetic nervous system in stress-mediated cardiovascular disease [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2015, 17(10): 80.
- [19] ROSTAMKHANI F, ZARDOOZ H, ZAHEDI-ASL S, et al. Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(11): 904-912.
- [20] LÓPEZ A L, ESCOBAR VILLANUEVA M C, BRIANZA PADILLA M, et al. Chronic unpredictable mild stress progressively disturbs glucose metabolism and appetite hormones in rats [J]. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 2018, 14(1): 16-23.
- [21] HUANG X, FEI G Q, LIU W J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect against CMS-induced depression-like behaviors in mice via regulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- κ B signaling pathways[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(5): 612-619.
- [22] SARKAR D. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects[J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2020, 18(3): 341-351.