神经病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001017

联合应激法建立单纯心理应激动物实验模型的研究

徐东宝，王 杰，于燕妮，汪元河，黄 江，戴佳琳，夏 冰
（贵州医科大学法医学系，贵阳 550004）

【摘 要】**目的**：应用联合应激法建立单纯心理应激小鼠实验模型。**方法**：雄性昆明小鼠 30 只，随机分为 2 组，分别为心理应激（psychological stress，PS）组和正常对照（normal control，NC）组。适应环境 1 周后，连续给予 PS 组小鼠隔离应激 30 d，并每天随机给予捕食应激或社会失败应激 1 次；NC 组群居饲养。末次应激后第 2 天进行旷场实验，断颈取血，通过酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immuno-sorbent assay，ELISA）检测血清中促肾上腺皮质激素释放激素（corticotropin releasing hormone，CRH）、促肾上腺皮质激素（adrenocorticotropic hormone，ACTH）、皮质醇（cortisol，CORT）水平，并与 NC 组进行比较。**结果**：PS 组经联合心理应激后，5 min 旷场活动明显减少（$P<0.01$）。PS 组与 NC 组比较，血清中 CRH、ACTH 及 CORT 水平均明显升高，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。**结论**：通过联合应激法，可建立一种可靠的单纯心理应激动物实验模型。

【关键词】心理应激；动物实验模型；捕食应激；社会失败应激；隔离应激
【中图分类号】R331 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-12-07

作者介绍：徐东宝，Email：908877686@qq.com，研究方向：法医病理学。
通信作者：王 杰，Email：wj6400@gmc.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81341130）；贵州省高校工程技术研究中心资助项目（编号：黔科合 KY 字[2013]114 号）；贵州省教育厅产学研基地资助项目（编号：黔教合 KY 字[2012]031 号）；贵州省科技攻关资助项目（编号：黔科合 NY 字[2010]3090）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160706.1635.018.html（2016-07-06）

此研究在细胞和分子 2 个层面阐明 MiR376a/c 靶向调控 TGFA 调控脑胶质瘤干细胞增殖机制。实验研究显示 MiR376a/c 靶向抑制 TGFA 降低 $CD133^+$ U251 增殖，这为肿瘤生物治疗提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Jazayeri SB，Rahimi-Movaghar V，Shokraneh F，et al. Epidemiology of primary CNS tumors in Iran：a systematic review[J]. Asian Pac J Cancer Prev，2013，14(6)：3979-3985.

[2] Choudhury Y，Tay FC，Lam DH，et al. Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells[J]. J Clin Invest，2012，122 (11)：4059-4076.

[3] Dufour C，Cadusseau J，Varlet P. Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation[J]. Stem Cells，2009，27(10)：2373-2382.

[4] Barrie S，Joseph C，Clinton J. Differential expression of microRNAs as predictors of glioblastoma phenotypes[J]. BMC Bioinformatics，2014，18(1)：15-21.

[5] 罗奇志，林 琳，王芙艳，等. MTT 方法的优化[J]. 激光生物学报，2014，23(3)：279-283.

[6] 殷 俊，陈 磊，翟国锁，等. MicroRNA-494 通过下调 Survivin 诱导神经胶质瘤细胞凋亡[J]. 重庆医科大学学报，2013，38(9)：984-989.

[7] 吕 娟，宋 鑫. miR130a/b 与肿瘤关系的研究进展[J]. 重庆医科大学学报，2014，39(4)：273-277.

[8] Andy C，Lee L，Denise Y. Study of transforming growth factor alpha for the maintenance of human embryonic stem cells[J]. Cell Tissue Res，2012，350(2)：289-303.

[9] Henriksen M，Johnsen KB，Andersen HH，et al. MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme-a systematic overview[J]. Mol Neurobiol，2014，50 (3)：896-913.

[10] Tivnan A，Mcdonald KL. Current progress for the use of MiRNAs in glioblastoma treatment[J]. Mol Neurobiol，2013，48(3)：757-768.

（责任编辑：张辉洁）

Establishment of mice model of pure psychological stress by combined stimuli: an experimental study

Xu Dongbao, Wang Jie, Yu Yanni, Wang Yuanhe, Huang Jiang, Dai Jialin, Xia Bing

(*Department of Forensic Medicine, Guizhou Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To build the mice model of pure psychological stress based on combined stimuli. ***Methods***: Thirty male mice were randomized into 2 groups: psychological stress group (n=15) and control group (n=15). After one-week acclimation, the mice model of psychological stress was subjected to social isolation stress (30 days), and randomized to predator stress (1/day) or social defeat stress (1/day). Open-field test was performed at 24 h after the last psychological stress. Then, the average contents of corticotropin releasing hormone (CRH), adrenocorticotropic hormone (ACTH) and cortisol (CORT) detected by ELISA and were compared between two groups. ***Results***: The activity was significantly reduced in open-field test in psychological stress group (P<0.01). The average contents of CRH, ACTH and CORT were significantly higher in psychological stress group than in control group (P<0.01). ***Conclusion***: It is a credible method to establish animal model of pure psychological stress through combined stimuli.

【Key words】psychological stress; experimental animal model; predator stress; social defeat stress; social isolation stress

心理因素可诱导多种疾病的发生，如焦虑、恐惧、孤独等情绪改变，甚至可导致死亡。但是，心理-社会因素导致疾病发生的机制尚不清楚，给治疗造成诸多困难，然而社会医学伦理又限制对人体心理疾病的研究，动物模型的应用则避免了上述不利因素。本研究旨在通过动物应激状态对动物行为及内分泌的影响，以期获得一种成熟的心理应激动物模型的建立方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性昆明小鼠，体质量 28~32 g，家猫 1 只，购自贵州医科大学动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK（黔）2012-001；自由进食饮水，室温（23±2）℃，光照 12 h（06:00~18:00），黑暗 12 h（18:00~06:00），捕食应激或社会失败应激时间为 09:00~11:00。

1.2 试剂与仪器

促肾上腺皮质激素释放激素（corticotropin releasing hormone，CRH）、促肾上腺皮质激素（adrenocorticotropic hormone，ACTH）、皮质醇（cortisol，CORT）酶联免疫分析试剂盒购自北京诚林生物技术有限公司（批号：20140719、20140803、20140811），ELx800 通用型酶标仪（美国 Bio Tek 公司），佳能数码相机（型号：G12），旷场实验箱（自制）。

1.3 方法

1.3.1 隔离应激 30 只小鼠适应环境 1 周后，随机分为 PS 组（n=15）和 NC 组（n=15）。PS 组置于安静的房间进行单笼饲养，自由饮食饮水，尽量减少同外界事物的接触，连续应激 30 d；NC 组于安静的房间进行群居饲养，自由饮食饮水，连续饲养 30 d。

1.3.2 捕食应激 PS 组小鼠小心轻柔地放入小鼠笼内，连同饥饿 1 d 的猫一起关入猫笼内，使小鼠与猫可相互看到对方，并能嗅到对方的气味，但双方无躯体接触，利用捕食应激使小鼠产生恐惧、惊吓等心理应激，使小鼠出现惊恐性颤动及因惊吓所致呼吸急促而快速鼻翼煽动等。应激时间为出现鼻翼煽动 6~8 min（以保证相同的应激强度）。NC 组小鼠采用同样方法放入小鼠笼内后再放入空的猫笼内，同捕食应激小鼠周围环境相同，静置 6~8 min。

1.3.3 社会失败应激 每次随机将 2 只 PS 组小鼠放入同一小鼠笼内，5 s 内小鼠均可产生攻击、防御、逃避、顺从等行为，待小鼠出现这种行为变化立即用双层铁丝网将二者隔开以避免躯体性接触，并保证二者均能看到对方，听到对方的声音，嗅到对方的气味，如此持续应激 6~8 min。群居饲养的 NC 组小鼠随机每 2 只放入同一小鼠笼内，5 s 后用双层铁丝网将二者隔开，持续 6~8 min。

1.3.4 旷场实验 将小鼠置于 50 cm×50 cm×50 cm 的旷场中心处，任其自由活动 5 min。实验全程使用摄像系统记录，记录小鼠 5 min 内的行为变化，包括垂直运动（两前爪腾空或攀附墙壁）、嗅探（连续嗅闻 2 s 以上）、水平运动（身体一半以上进入另一格）次数。每只小鼠实验完毕后均用清水对旷场实验箱进行擦拭并彻底干燥，避免残留气味对下一只小鼠的影响。实验完成后找 3 名对实验设计不熟悉的人员进行评分，求平均值。

1.3.5 ELISA 检测 所有动物旷场实验后断颈处死，取血，全血标本室温静置 2 h 后，离心，取上清，-80 ℃冻存。严格按照 ELISA 检测试剂盒说明进行操作，检测血清 CRH、ACTH、CORT 水平。

1.4 评价标准

比照 Nestler 等[1]所归纳的抑郁动物模型成功与否的判

断原则，心理应激可通过应激后能否出现相应的应激样行为表现，或出现神经内分泌系统功能失调引起的一系列相关激素的变化，来进行模型有效性的判断。具体为：①行为学评分，包括水平运动、垂直运动和嗅探次数，较 NC 组平均值明显降低。②下丘脑-垂体-肾上腺轴（hypothalamic-pituitary-adrenal axis，HPAA）明显激活，CRH、ACTH、CORT 较 NC 组平均水平明显升高。二者满足其一即可说明动物处于心理应激状态。

1.5 统计学方法

在行为学测试及血清中 CRH、ACTH、CORT 的含量分析中，实验数据运用SPSS 19.0 软件包进行两独立样本非参数 Mann-Whitney U 检验方法进行统计学分析，所得数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 小鼠行为学改变

心理应激组较正常组小鼠旷场行为活动（水平运动、垂直运动、嗅探）均明显降低，且符合上述纳入标准①的要求，差异具有统计学意义（P=0.000）（表 1）。

表 1 小鼠旷场实验结果（$\bar{x} \pm s$）

Tab.1 Results of the open field test in mice（$\bar{x} \pm s$）

分组	n	水平运动（次）	垂直运动（次）	嗅探（次）
NC组	15	185.20 ± 42.77	31.93 ± 10.33	14.27 ± 4.35
PS组	15	110.00 ± 42.30	14.93 ± 7.91	7.33 ± 3.42
Z 值		-4.231	-3.845	-3.794
P 值		0.000	0.000	0.000

2.2 血清中 CRH、ACTH、CORT 的变化

ELISA 检测结果显示，PS 组较 NC 组小鼠血清中 CRH、ACTH、CORT 水平均明显增高，差异具有统计学意义（P=0.000）（表 2）。提示心理应激组 HPAA 明显激活，满足上述纳入标准②，可说明心理应激组小鼠处于应激状态。

表 2 ELISA 检测小鼠血清中 CRH、ACTH、CORT 水平（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Levels of CRH, ACTH and CORT in mice detected by ELISA（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	CRH(ng/L)	ACTH(ng/L)	CORT(μg/L)
NC组	15	26.74 ± 3.66	39.02 ± 8.73	154.48 ± 23.22
PS组	15	39.97 ± 3.97	75.80 ± 6.63	209.16 ± 16.80
Z 值		-4.625	-4.666	-4.564
P 值		0.000	0.000	0.000

3 讨 论

目前，较常用的应激动物模型构建方法有束缚应激、强迫游泳、悬吊刺激、创伤应激等，但均对躯体因素的影响较大[2]。本研究选用对躯体因素影响较小的联合应激法构建应激动物模型，最大限度地降低了躯体因素的影响。据相关文献报道[3-6]，每种应激方法单一或其中两种相结合均有明显的心理应激效果，如活动减少、焦虑、抑郁、社会逃避、探索活动降低等行为表现以及 HPAA 出现不同程度的激活，但存在不同的缺点，如长期捕食应激过程中 CORT 水平呈先升高后降低的双向变化，可能为对应激的适应所致；隔离应激所需的建模时间较长（3~6 月），过长又可对应激效果产生影响；隔离应激和社会失败应激早期应激效果明显，但随着时间的延长逐渐降低，可能为对刺激的适应或应激抗性所致。

本研究通过对国内常用昆明种小鼠单纯心理应激实验动物模型的构建进行研究分析，参照国内外已报道的应激动物模型[2,7]，选用隔离应激，并每天随机给予捕食应激或社会失败应激，这种联合应激的方法可有效避免实验动物因适应而对应激效果产生影响，最大限度地保证了每天所给予的应激强度，明显地缩短了单一应激方法所需的建模时间，亦可避免单一因素缺乏模拟应激客观性的缺点，使建模成功率明显高于应用单一心理应激的方法。如本实验 15 只小鼠经单纯心理应激后均有明显的行为学改变或 HPAA 的激活，均处于心理应激状态。其中，行为学评分较 NC 组平均值降低40%以上者 9 只，HPAA 中 2 种及 2 种以上激素水平较 NC组平均值升高 40%以上者 11 只，同时满足以上 2 种条件者达7 只。从以上结果可以看出行为学评分方便、快速，应激激素水平的监测准确度较高，二者同时运用可以更好地监测实验动物的应激状态。有研究报道[8]，主要通过运用应激后动物生理、行为变化（如应激激素水平增高、抑郁样行为增多等）、神经生物学的变化（如海马和内侧前额叶皮质体积和细胞增殖降低、树突伏核形态结构的变化）、抑郁样行为能否被抗抑郁药物逆转进行心理状态的评价。但神经生物学评价方法在临床应用中存在较大的困难，尤其是脑组织标本的采集即不符合伦理的要求，同时采集较困难；抗抑郁药物的作用机制至今尚未完全阐明，不能排除其对脑及其它器官组织的结构和功能产生影响。因此，本研究通过行为学和神经内分泌的方法对实验动物应激后的心理状态进行评价，成本低、操作简便，并且可减小不同个体应激易感性和遗传因素差异的影响，同时引用实验室的

检查指标相对客观、准确。

根据达尔文的生物进化理论，人和动物在相同的心理状态下表现出相同的行为反映，因此心理应激动物模型的行为学评估具有重要的价值，并且对心理应激致人类疾病的研究具有重要的作用。旷场实验是一个较成熟的行为学评估方法，可以很好地监测实验动物的心理状态[9-10]。如水平运动可反映动物运动活性，代表其兴奋性状态；垂直运动和嗅探可反映动物探索活性，代表其认知能力。本实验心理应激 30 d 后，小鼠的运动探索行为明显降低，水平运动降低 40.5%，垂直运动降低 53.2%，嗅探降低 48.6%，总行为评分（三者之和）降低 42.8%，表现出抑郁、焦虑、恐惧及对周围事物兴趣性降低等行为学特征，与长期慢性心理应激后实验动物心理行为学表现结果一致[11]，可说明本实验小鼠联合应激后处于应激状态。

在应激反应中 HPAA 是研究较广泛的一个关键系统[12]，应激时被激活，从而发挥其调节作用。因此，HPAA 的功能状态可以间接反映机体的应激状态。有研究表明[13]，长期的心理及躯体应激对人体健康的损害程度同 HPAA 功能的持续亢进有密切的关系。众所周知，当动物遇到对机体有威胁的信号时，HPAA 激活使机体对应激产生抵抗或逃避反应，但当应激长期持续存在时导致 HPAA 功能持续亢进，即可产生不良后果，使应激激素的负效应增强，如极度疲劳以及失眠、焦虑等抑郁症的表现。目前，对 HPAA 功能状态的评估方法主要有以下几种[14]：内分泌激素水平监测、行为学变化、觉醒状态以及药理学研究等。CRH、ACTH 及 CORT 作为 HPAA 中 3 种重要的激素，被认为是研究应激状态的最经典、最重要的指标之一[15]。因此，本实验研究通过血清中 CRH、ACTH、CORT 3 种内分泌激素水平变化监测 HPAA 的功能状态，发现应激模型组心理应激后 3 种激素浓度均明显高于正常对照组，差异具有统计学意义（均为 $P<0.01$），3 种激素浓度分别升高49.5%、94.3%、35.4%（表 2，ELISA 检测），表明HPAA 被激活，可间接说明实验动物处于应激状态，这同国内外大多数报道相一致[15-16]。

因此，本实验的研究分析表明，通过联合应激的方法成功地建立了单纯心理应激小鼠模型，旷场活动及血清中 CRH、ACTH、CORT 水平变化能有效反映动物的应激状态，是一种可靠的评价应激动物模型的方法。

参 考 文 献

[1] Nestler EJ, Barrot M, Dileone RJ, et al. Neurobiology of depression [J]. Neuron, 2002, 34(1): 13-25.

[2] 娜 琴，程 飚，陈阿梅. 应激动物模型构建方法及效果评价的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011，15(11)：2051-2054.

[3] 王庆松，王伟文，吴渝宪，等. 捕食应激致大鼠持续性情绪唤醒障碍时血浆皮质酮及海马皮质类固醇受体表达变化[J]. 中华精神科杂志，2008，41(1)：49-52.

[4] Das SK, Barhwal K, Hota SK, et al. Disrupting monotony during social isolation stress prevents early development of anxiety and depression like traits in male rats[J]. BMC Neurosci, 2015(16): 2.

[5] 董红心，曾俊伟，陈 倩，等. 隔离应激加速 SAMP8 小鼠记忆功能减退（英文）[J]. 遵义医学院学报，2014，37(1)：26-38.

[6] 张飞龙，徐志伟，范礼斌，等. 社会失败应激致抑郁样行为动物模型的研究[J]. 军事医学，2011，35(3)：193-196.

[7] Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, et al. Animal models of anxiety disorders and stress[J]. Rev Bras Psiquiatr, 2013, 35 (Suppl 2): S101-S111.

[8] Hollis F, Kabbaj M. Social defeat as an animal model for depression[J]. ILAR J, 2014, 55(2): 221-232.

[9] Wei S, Ji XW, Wu CL, et al. Resident intruder paradigm-induced aggression relieves depressive-like behaviors in male rats subjected to chronic mild stress[J]. Med Sci Monit, 2014(20): 945-952.

[10] 孙世光，李自发，孙 鹏，等. 昆明小鼠旷场实验评价方法的三维结构[J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2011，20(10)：875-877.

[11] 陈永丽. 慢性心理应激对大鼠心理行为和神经内分泌免疫的影响[D]. 山西：山西医科大学，2010.

[12] Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, et al. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender[J]. J Neurobiol, 1999, 40(3): 302-315.

[13] Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, et al. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats[J]. Psychoneuroendocrinology, 2001, 26(5): 443-459.

[14] Dedovic K, Ngiam J. The cortisol awakening response and major depression: examining the evidence[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015 (11): 1181-1189.

[15] 董秋安，刘晓伟. 恐惧应激大鼠血 ACTH、CORT、IL-2、IL-8 的含量变化[J]. 分子诊断与治疗杂志，2013，5(3)：173-176.

[16] Maghsoudi N, Ghasemi R, Ghaempanah Z, et al. Effect of chronic restraint stress on HPA axis activity and expression of BDNF and Trkb in the hippocampus of pregnant rats: possible contribution in depression during pregnancy and postpartum period[J]. Basic Clin Neurosci, 2014, 5(2): 131-137.

（责任编辑：张辉洁）