

孤养对单次延长应激建立的创伤后应激障碍模型大鼠行为学的影响

方锦颖[#], 陈光耀[#], 李龙梅, 郑思思, 毛 萌^{*}

(北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的 通过单次延长应激(SPS)建立创伤后应激障碍(PTSD)模型,观察孤养对SPS模型大鼠的影响。**方法** 将36只大鼠随机分为正常组、SPS模型组及SPS联合孤养组,SPS模型组、SPS联合孤养组给予SPS造模,SPS联合孤养组造模后进行单独饲养。造模7 d后检测大鼠体重增长数,旷场实验中运动总距离、穿格次数以及单次最大运动距离,僵立行为测试中僵立行为次数及时间。**结果** 与正常组大鼠进行比较,SPS模型组大鼠体重增长数、单次最大运动距离明显减少($P < 0.01$),运动总距离、穿格次数减少($P < 0.05$),僵立行为测试僵立行为次数及时间明显增加($P < 0.01$);SPS联合孤养组大鼠体重增长数减少($P < 0.05$),僵立行为测试僵立行为次数及时间增加($P < 0.05$)。与SPS模型组比较,SPS联合孤养组旷场实验中运动总距离、穿格次数以及单次最大运动距离增加($P < 0.05$)。**结论** 本实验成功通过单次延长应激复制了创伤后应激障碍大鼠模型,7 d孤养使得SPS模型焦虑状态得到改善。

【关键词】 创伤后应激障碍;孤养;单次延长应激;行为学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.006

Effect of social isolation on the behavior of rat models of post-traumatic stress disorder established by single-prolonged stress

FANG Jinying[#], CHEN Guangyao[#], LI Longmei, ZHENG Sisi, MAO Meng^{*}

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of post-traumatic stress disorder (PTSD) through single-prolonged stress (SPS) and to observe the effect of social isolation on the behavior of the SPS model rats. **Methods** A total of 36 rats were randomly divided into the normal group, SPS model group and SPS combined with social isolation group. The rats in both SPS model group and SPS combined with social isolation group were modeled by single-prolonged stress, and the rats in the SPS combined with social isolation group were raised separately after modelling. The weight gaining, the total movement distance in open field test, the frequency of grid crossing, the single maximum movement distance, and the freezing frequency and time durations in the freezing behavior test were measured after 7 days of modeling. **Results** Compared with the normal group, the weight gaining and the single maximum movement distance of the rats in the SPS model group were significantly decreased ($P < 0.01$), as well as the total movement distance and the frequency of grid crossing ($P < 0.05$), while the

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81403498);国家级大学生创新创业训练项目(编号:2017100126008)。

[作者简介] 方锦颖(1995—),女,八年制本科阶段,专业:中医学,E-mail: fangjinying1@163.com;

陈光耀(1994—),男,研究生在读,专业:中医内科学,E-mail: chenguangyao1994@163.com。 [#]共同第一作者

[通信作者] 毛萌(1985—),女,助理研究员,医学博士,研究方向:神经精神疾病病证结合研究。E-mail: mmccior@163.com

freezing frequency and time in the freezing behavior test were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the weight gaining and crossing times of the rats in the SPS combined with social isolation group was decreased ($P < 0.05$), and the freezing frequency and time durations in the freezing behavior test were increased ($P < 0.05$). In addition, compared with the SPS model group, the total movement distance in the open field test, the frequency of grid crossing and the single maximum movement of the rats in the SPS combined with social isolation group were increased ($P < 0.05$).

Conclusions The rat model of post-traumatic stress disorder is successfully established by single-prolonged stress, and 7 days of social isolation may alleviate the anxiety state of SPS model rats.

【Key words】 post-traumatic stress disorder, PTSD; social isolation; single-prolonged stress, SPS; behavior

创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)指在经历或目睹重大灾难性应激事件后延迟出现并长期存在的一种精神疾病^[1]。作为焦虑障碍的一种,其核心症状包括:反复出现创伤体验,持续回避创伤事件,警觉性的高度提高和心理的消极变化^[2]。单次延长应激(single-prolonged stress, SPS)作为通过以疲劳为环境条件建立的敏感化动物模型的一种,较好地模拟了 PTSD 临床患者应激过程及发病后的症状。较之于其他 PTSD 动物模型,SPS 模型重复性良好,且该模型能够被抗抑郁及抗焦虑药物所改善,逐渐成为当今研究 PTSD 最为常用的国际公认动物模型之一^[3]。

对 SPS 模型的尝试改进以增加该模型的表现、预测和结构效度与临床的吻合度为当今研究的热点。如 Keller 等人^[4]依据临床 PTSD 发病率女性高于男性的特点,研究发现 SPS 雌性大鼠模型较之于雄性模型大鼠行为学条件恐惧行为增加;赵中兴、陈旺等人^[5-6]采用在大鼠束缚过程中增加不可逃避足底电刺激建立复合应激模型,行为学研究发现复合应激组较之于单纯 SPS 组行为学出现焦虑样症状增加、活动性降低、空间记忆受损等特点。孤养作为一种应激手段,被应用于新生期孤养、慢性不可预见应激等大鼠模型的建立^[7-8]。本文拟通过将 SPS 模型与 SPS 联合孤养模型进行对比,探究孤养对单次延长应激 (SPS) 建立的创伤后应激障碍 (PTSD) 模型大鼠的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 190 ~ 210 g,6 周龄,实验动物购自北京维通利华实验动物科技有限公司[SCXK(京)2016-0011],在北京中医药大学 SPF 级实验动物室[SYXK(京)2016-0038]饲养,饲养条件:温度(23 ± 2)℃,湿度(65 ± 5)%,光照 12 h,每天更换垫料、饲料及水瓶,自由饮水及进食,造模前一周购入进行适应性饲养。

1.2 主要试剂与仪器

75% 乙醇,安徽太和县光明酒精分装厂,批号:160606;无水乙醚,北京化工厂,批号:20170417。圆桶状透明塑料大鼠固定器:长 25 cm,筒口外径 7 cm,内径 5 cm,由北京中医药大学方剂学教研室提供;旷场箱:底部 100 cm × 100 cm 正方形、高 45 cm,材料为灰色木质,箱底部用黑线划分出 25 个正方形格(20 cm × 20 cm),摄像头位于旷场箱正中格上方;造模及强迫游泳使用水箱:底部 65 cm × 100 cm、高 80 cm 的立方体红色塑料水箱;行为学观察及自动分析系统:Nodule 公司生产,包括计算机、摄像监控系统、Observer 及 Ethovision 行为学分析软件。旷场箱、水箱和行为学观察及自动分析系统由北京中医药大学诊断系神经免疫实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及造模

将大鼠适应性喂养后,随机分为 3 组,即正常组、SPS 模型组、SPS 联合孤养组,每组各 12 只,经检测各组大鼠体重在同一基线水平上。正常组不予处理,SPS 模型组与 SPS 联合孤养组进行 SPS 造模,流程如下:使用束缚桶将大鼠进行 2 h 束缚,随后置于水深 45 cm、水温 25℃ 的水箱中进行 20 min 的游泳,游泳结束 15 min 后将大鼠置于密闭玻璃容器中使用乙醚进行麻醉,失去意识后置于笼子中放置在通风处,待意识恢复后进行静养^[9]。造模后正常组、SPS 模型组每笼 6 只进行饲养,孤养组每笼 1 只,大鼠均放置于普通饲养笼中进行饲养。除更换垫料、饲料及饮水外,避免打扰大鼠,连续饲养 7 d 后进行行为学检测。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.3.2 实验指标检测

(1)大鼠体重增长数:在造模前及行为学实验结束后分别使用电子秤测量大鼠体重,后一次体重减去前一次体重即为大鼠体重增长数。

(2)旷场实验^[10-11]:实验者穿着纯黑色衣服(避

免软件分析时实验者身体某些浅色部位被识别为大鼠)将动物放入箱内的正中格,迅速将进入旷场区域的手撤出,开始进行录像 5 min,录像过程中实验人员应远离旷场箱以避免对动物造成干扰。每只动物测试结束后用蘸有酒精的毛巾擦拭旷场箱内部,以避免对下只动物的测试造成影响。录像结束后采用软件对录像进行分析,测得每组大鼠 5 min 内运动总距离、穿格次数以及单次最大运动距离。

(3) 僵立行为测试^[12]

使用造模时水箱,将水注入箱中(调节使水深 45 cm、水温 25℃),将大鼠小心放置于水箱中。僵立时间的记录标准为大鼠在水中静止不动,但可以有轻度摇摆,除保持呼吸运动外其他的肌肉活动均消失。记录 5 min 内大鼠僵立时间及次数。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 对所得数据进行统计学处理。在各项指标中,计量资料中正态分布资料,采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计学描述,并且采用单因素方差分析进行检验;如果为偏态分布,使用四分位数进行描述,采用非参数检验(秩和检验)。

2 结果

2.1 大鼠体重增长数

SPS 模型组大鼠体重增长数(28.3 ± 4.9)g 较正常组(34.8 ± 4.8)g 降低,差异有显著性($P < 0.01$),SPS 联合孤养组(30.0 ± 4.8)g 较之于正常组大鼠体重增长数降低,差异有显著性($P < 0.05$),SPS 联合孤养组较之于 SPS 模型组差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 大鼠旷场实验运动总距离、穿格次数、单次最大运动距离

SPS 模型组较正常组运动总距离、穿格次数减少,差异有显著性($P < 0.05$),单次最大运动距离减少,差异有显著性($P < 0.01$);SPS 联合孤养组较

之于正常组运动总距离、穿格次数、单次最大运动距离差异无显著性($P > 0.05$);SPS 联合孤养组较之于 SPS 模型组运动总距离、穿格次数、单次最大运动距离增加,差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 大鼠僵立行为次数及时间

SPS 模型组较正常组僵立行为次数、僵立时间增加,差异有显著性($P < 0.01$);SPS 联合孤养组较之于正常组僵立行为次数、僵立时间增加,差异有显著性($P < 0.05$);SPS 联合孤养组较之于 SPS 模型组僵立行为次数、僵立时间差异无显著性($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

应激能够造成实验动物内分泌系统及消化系统功能紊乱,从而出现体重增长速度较前减少^[13]。旷场实验通过观察实验动物在新异环境中的自主行为、探究行为与紧张度,从而反映出大鼠的焦虑水平^[14]。僵立行为测试将大鼠重新置于造模时场景,当大鼠重新受到负性刺激后表现出的恐惧反应,是检测 SPS 模型是否成功复制的重要指标。造模 7 d 后 SPS 模型组较之于正常组,大鼠体重增长数减少,旷场实验运动总距离、穿格次数、单次最大运动距离均减少,僵立行为测试僵立次数及时间增加,与之前文献记载相符,提示对 SPS 模型进行了成功复制^[15]。

在精神类疾病动物模型的制作中,孤养作为一种负性情绪刺激被作为应激源广泛应用。在本次实验设计中,预期将孤养作为一种额外应激刺激附加于 SPS 模型,从而使 SPS 模型更加稳定以及 PTSD 相关表现更加明显。但本实验结果发现,SPS 联合孤养组造模 7 d 后较之于 SPS 模型组旷场实验运动总距离、穿格次数、单次最大运动距离增加,提示 SPS 联合孤养组较之于 SPS 模型组焦虑水平降低。结果表明 7 d 孤养使得 SPS 模型焦虑状态得到改善,与预期结论截然相反。

表 1 各组大鼠旷场实验运动总距离、穿格次数、单次最大运动距离($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab.1 Total movement distance, frequency of grid crossing and single maximum movement distance of the rats in each group during the open field test

组别 Groups	运动总距离 (cm) Total movement distance	穿格次数 Frequency of grid crossing	单次最大运动距离 (cm) Single maximum movement distance
正常组 Normal group	2202.9 ± 534.9	86.2 ± 29.0	11.3 ± 3.6
SPS 模型组 SPS model group	1509.9 ± 751.4 ^a	54.7 ± 36.8 ^a	7.3 ± 2.4 ^b
SPS 联合孤养组 SPS combined with social isolation group	2406.6 ± 747.5 ^{c d}	95.8 ± 34.2 ^{c d}	10.5 ± 2.9 ^{c d}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P > 0.05$;与 SPS 模型组比较,^d $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P > 0.05$. Compared with the SPS model group, ^d $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠僵立行为次数及时间($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Tab.2 Freezing frequency and time of the rats in each group

组别 Groups	僵立次数 Freezing times	僵立时间(s) Freezing time duration
正常组 Normal group	0. 83 ± 1. 11	0. 75 ± 1. 01
SPS 模型组 SPS model group	7. 75 ± 7. 42 ^a	6. 52 ± 5. 30 ^a
SPS 联合孤养组 SPS combined with social isolate group	4. 42 ± 4. 38 ^{b c}	3. 51 ± 3. 69 ^{b c}

注:与正常组比较,^a $P < 0. 01$,^b $P < 0. 05$;与 SPS 模型组比较,^c $P > 0. 05$ 。
Note. Compared with the normal group,^a $P < 0. 01$,^b $P < 0. 05$. Compared with the SPS model group,^c $P > 0. 05$.

创伤后应激障碍(PTSD)患者在遭受巨大应激过后,当再次出现与应激相关联或类似的事件、情景或其他线索时,常表现出强烈的心理与生理反应。为避免这种反应的出现,患者往往出现持续回避的系列症状,包括与他人避免接触及独自生活于安静的环境中,提示回避可能是 PTSD 患者的一种自我保护性反应,将大鼠单独进行饲养从一定程度上满足了 PTSD 大鼠进行回避的需求^[16]。在实验过程中亦发现在经历巨大应激过后,大鼠常处于易激惹状态,在群居过程中更容易出现打斗,因此群居饲养可能会对大鼠造成额外的应激。在动物模型的制作中,将孤养作为应激源进行造模多采用较长时间的干预,本研究仅仅对 SPS 造模后孤养 7 d 的大鼠进行观察,造模 7 d 后 SPS 联合孤养组焦虑水平较之于 SPS 模型组降低,提示在 SPS 造模后进行 7 d 孤养可能作为一种保护机制作用于模型大鼠,而进一步延长孤养时间是否会对 SPS 模型造成负性机制尚不得而知。因此,课题组进一步将对 SPS 联合孤养模型多个时间点的行为学改变进行观察,以明确孤养对 SPS 模型影响的具体时间点,并进一步探究其相关病理及分子机制。

参考文献:

[1] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, DSM-5 [M]. 5th edition. American Psychiatric Association, 2013.

[2] Gupta MA. Review of somatic symptoms in post-traumatic stress disorder [J]. Int Rev Psychiatry, 2013, 25(1): 86 - 99.

[3] Shafia S, Vafaei AA, Samaei SA, et al. Effects of moderate treadmill exercise and fluoxetine on behavioural and cognitive deficits, hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and alternations in hippocampal BDNF and mRNA expression of apoptosis-related proteins in a rat model of post-traumatic stress disorder [J]. Neurobiol Learn Mem, 2017, 139: 165 - 178.

[4] Keller SM, Schreiber WB, Staib JM, et al. Sex differences in the single prolonged stress model [J]. Behav Brain Res, 2015, 286: 29 - 32.

[5] 赵中兴, 伍亚民. 一种新的大鼠创伤后应激障碍模型的建立及其行为学检测 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(10): 928 - 932.

[6] 陈旺, 李陈成, 李森, 等. 复合刺激创伤后应激障碍模型大鼠重要脑区的病理变化 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 87 - 91.

[7] 江雪花, 张敏, 陆大祥, 等. 新生期孤养对成年大鼠行为与 5-羟色胺转运体表达的影响 [J]. 中国临床心理学杂志, 2010, 18(4): 411 - 414.

[8] 高杰, 张楠, 宋铭晶, 等. 慢性束缚应激模型对小鼠社交行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(3): 9 - 12.

[9] Kohda K, Harada K, Kato K, et al. Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model [J]. Neuroscience, 2007, 148(1): 22 - 33.

[10] Kuniishi H, Ichisaka S, Yamamoto M, et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats [J]. Neurosci Res, 2017, 123: 27 - 35.

[11] 赵洪庆, 韩远山, 杜青, 等. 不同时间点不同应激方法致大鼠焦虑样行为的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 22 - 26.

[12] Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(9): 775 - 790.

[13] Iniguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice [J]. Stress, 2014, 17(3): 247 - 255.

[14] Sudakov SK, Nazarova GA, Alekseeva EV, et al. Estimation of the level of anxiety in rats: differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel's conflict test [J]. Bull Exp Biol Med, 2013, 155(3): 295 - 297.

[15] Wu Z, Tian Q, Li F, et al. Behavioral changes over time in post-traumatic stress disorder: insights from a rat model of single prolonged stress [J]. Behav Processes, 2016, 124: 123 - 129.

[16] Badour CL, Blonigen DM, Boden MT, et al. A longitudinal test of the bi-directional relations between avoidance coping and PTSD severity during and after PTSD treatment [J]. Behav Res Ther, 2012, 50(10): 610 - 616.