

# 社交应激诱导 C57BL/6 小鼠抑郁样模型的建立及行为学评价

李密辉 吴 晓 魏 颖 董竞成

**摘要 目的** 采用社交应激方式诱导 C57BL/6 小鼠建立抑郁样模型,并采用多种行为学方法对模型进行评价,以验证模型可靠性。**方法** 将 20 只雄性 C57BL/6 (C57) 小鼠采用随机数字表法分为正常对照组 (正常组,10 只)和应激模型组(模型组,10 只)。另取 CD1(ICR)小鼠(10 只)用于社交应激。正常组未予干预措施,模型组每天给予社交应激,连续 10 天。采用社交接触实验、高架十字实验和悬尾实验对各组小鼠进行行为学评价;采用 ELISA 法检测小鼠血清皮质醇水平,评估模型可靠性。**结果** 社交接触实验显示,与本组 CD1 小鼠不存在时比较,正常组小鼠社交区停留时间延长,角落区停留时间缩短( $P < 0.05$ ),模型组社交区停留时间缩短,角落区停留时间延长( $P < 0.05$ );与正常组 CD1 小鼠存在时比较,模型组社交区停留时间减少,角落区停留时间增多( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组进入开放臂、闭合臂及高架十字总进入次数明显减少( $P < 0.05$ ),开放臂进入次数比例降低( $P < 0.05$ );模型组小鼠在悬尾实验中后 4 min 内不动时间延长( $P < 0.05$ );模型组血清皮质醇水平明显升高( $P < 0.01$ )。**结论** 社交应激诱导 C57 小鼠建立社交应激性抑郁样模型较为可靠,可能适用于中西医结合病证模型的研究。

**关键词** 社交应激;抑郁样动物模型;行为学评价

Establishment of Social Stress Induced Depression-like Animal Model in Mice of C57BL/6 Strain and Behavioral Assessments LI Mi-hui, WU Xiao, WEI Ying, and DONG Jing-cheng *Department of Integrative Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200400)*

**ABSTRACT Objective** To establish social stress induced depression-like model in mice of C57BL/6 strain, and to assess its reliability using different behavioral methods. **Methods** Totally 20 male mice of C57BL/6 strain were divided into the normal group and the stress model group by random digit table, 10 in each group. Another 10 CD1 mice were subjected to social stress. Mice in the normal control group received no stress, while those in the model group received social stress for 10 successive days. Behavioral assessment was performed using social interaction test (SIT), the elevated plus-maze (EPM) test, tail suspension test (TST), respectively. Serum cortisol level was detected by ELISA to assess the reliability of the model. **Results** In the social interaction test when the social target (CD1 mice) was in-existent, mice in the normal control group spent longer time in the social interaction zone and less time in the corner zone ( $P < 0.05$ ); mice in the model group spent less time in the social interaction zone and more time in the corner zone ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group when CD1 mice existed, mice in the model group spent less time in the social interaction zone and more time in the corner zone ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal control group, the total times for entry into open arms, close arms, and the maze were obviously reduced ( $P < 0.05$ ), and the proportion of entering open arms was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the model group. In TST, the motionless time within the last 4 min was prolonged in the model group ( $P < 0.05$ ). The serum cortisol level in the model group was obviously elevated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Social stress induced depression-like animal model in mice of C57BL/6

基金项目:国家“973”计划资助项目(No. 2009CB523001);国家自然科学基金资助项目(No. 81173390; No. 81102562);国家教育部博士点科研基金资助项目(No. 20110071120072)

作者单位:复旦大学附属华山医院中西医结合科(上海 200400)

通讯作者:董竞成, Tel: 021-52888301, E-mail: jcdong2004@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.02.0229

strain was quite reliable and possibly suitable to be used in integrative medicine research of combination of disease and syndrome model.

**KEYWORDS** social stress; depression-like animal model; behavioral assessment

抑郁症是一种慢性反复发作性的精神疾病,其临床表现多种多样,如食欲低下、睡眠障碍、悲观失落甚至自杀倾向。据统计,全球约有 10% 的人患有抑郁症<sup>[1]</sup>。目前,抑郁症的发病机制尚未明确,因此探索模拟人类抑郁症心理及行为发病过程的动物模型对抑郁症发病机制的研究和抗抑郁药的研发具有重要意义。在过去的研究中多种慢性应激形式被用来诱导抑郁相关的行为表现,包括慢性不可预见性应激、束缚应激以及足底电击应激<sup>[2]</sup>。而目前在基础医学研究水平,社交应激模型被认为是应激诱导情绪相关疾病较为可靠的模型<sup>[3]</sup>。社交应激模型具有更高的表观效度、预测效度和行为学效度,使得该模型与人类抑郁症若干症状的行为学和神经生物学改变具有相似性<sup>[3,4]</sup>。中医学认为“百病皆生于气也”,此处所言“气”泛指情志失调。良好的情绪能使人体气机通畅,五脏协调,精神内守,阴阳平衡。抑郁症患者情志多属七情中的“悲”、“恐”等情绪,而“悲伤肺”、“恐伤肾”。因此,中医学认为抑郁与肺肾两脏关系密切,尤其与肾脏密切相关。本课题组根据中医学“恐伤肾”理论,建立了“恐伤肾”致肾虚小鼠模型,即通过攻击性较强的小鼠对较为温顺的小鼠进行攻击,被攻击者持续处于惊恐状态,造成肾虚疾病状态,表现为精神萎靡、蜷缩、小便增多等肾虚表现,下丘脑—垂体—肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴功能紊乱,内源性皮质醇分泌增多<sup>[5]</sup>。因此,本实验通过社交应激诱导抑郁样模型建立,进一步从多种行为学角度评价其可靠性,以期与肾虚证与抑郁症病证模型结合提供新思路。

## 材料与方法

1 动物 20 只 C57BL/6 (C57) 雄性小鼠, SPF 级, 7 周龄, 体重 20 ~ 24 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (沪) 2013 - 0016。CD1 雄性小鼠 10 只, SPF 级, 9 ~ 10 月龄退役种鼠, 由北京维通利华公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2012 - 0036。动物饲养于复旦大学药学院实验动物中心, 标准聚丙烯小鼠鼠笼, 自由进食饲料与水, 室温 20 ~ 25℃, 相对湿度 50% ~ 70%, 光暗周期 12 h。

2 实验设备与试剂 小鼠鼠笼带孔有机塑料挡板; 社交接触旷场(42 cm × 42 cm × 42 cm); 高架十

字迷宫, 由两条开臂(open arm)与闭臂(close arm)组成, 每条臂长 40 cm, 宽 5.5 cm, 闭臂有 20 cm 的围墙, 距地面 50 cm 高; 白色树脂玻璃小鼠悬尾箱(40 cm × 40 cm × 40 cm); Noldus 动物行为学视频跟踪系统(Ethovision XT8.5, 复旦大学上海医学院脑科研究院提供); 皮质醇试剂盒: 德国 LDN 公司产品。

3 动物分组及造模方法 小鼠适应性饲养 1 周后, 将 20 只 C57 小鼠随机分为正常对照组(正常组)和应激模型组(模型组), 每组 10 只。将 CD1 小鼠随机编号, 共 10 只。造模方法参考文献[6, 7], 将应激时间缩短至 3 ~ 5 min, 避免 C57 小鼠接受长时间攻击而导致外伤。正常组未给予干预措施。模型组给予社交应激, 首次社交应激开始前将 CD1 小鼠放置于鼠笼透明挡板一侧 24 h; 将 C57 小鼠置于 CD1 小鼠同侧接受应激 3 ~ 5 min, 之后将 C57 小鼠放于挡板另一侧, 与 CD1 小鼠相处 24 h, C57 小鼠可看到 CD1 小鼠并且嗅到对方的气味, 连续应激 10 天, 10 天之内 C57 小鼠不再遇到同一只 CD1 小鼠; 在 10 天应激过程中, CD1 小鼠位于固定的鼠笼不变, C57 小鼠则每天置于不同的鼠笼在社交应激过程中保持基本观察, 在敌对交互作用过程中。每分钟不少于一轮攻击, 每轮持续大约 5 ~ 10 s。最后一次社交应激实验结束后, 将 C57 小鼠置于标准鼠笼内单笼饲养, 24 h 后进行行为学评价。

## 4 观察指标与检测方法

4.1 一般情况 包括小鼠精神状态, 自主活动, 毛发, 大小便等情况。

4.2 社交接触实验 用于评价动物的社交回避行为<sup>[3]</sup>, 末次社交应激结束 24 h 后进行社交接触实验。实验阶段分为两个 150 s, 第一个 150 s 期间 C57 小鼠可自由在社交接触旷场中穿行, 旷场一侧为透明有孔有机玻璃围墙(9 cm × 6 cm × 20 cm), 在第一个 150 s 内围墙空置; 中间间隔 30 s, 在 30 s 内将 C57 小鼠从旷场转移到饲养鼠笼内, 同时将未与该 C57 小鼠有社交应激接触的 CD1 小鼠放入到围墙内; 第二个 150 s 将 C57 再次放入到社交旷场内, 记录下 C57 小鼠的运动轨迹<sup>[6]</sup>。

4.3 高架十字实验 实验开始时将小鼠面向中央格放入迷宫, 记录 5 min 内的活动情况<sup>[8]</sup>。观察指

标包括:开放臂进入次数(必须有两只前爪进入臂内),闭合臂进入次数,高架十字迷宫中总进入次数,开放臂进入次数比例(开放臂进入次数与迷宫总进入次数比值)。实验完成后将小鼠取出,将两臂清理干净,喷洒酒精除去气味。

**4.4 悬尾试验** 用不粘胶将小鼠尾部远端 1/3 处固定于悬尾箱内,小鼠头部距地面约为 10 cm,记录 6 min 内后 4 min 不动时间总和,不动状态指动物放弃主动挣扎,躯体处于悬垂不扭动状态,反映小鼠处于无助绝望的行为状态<sup>[9]</sup>。

**4.5 血清皮质醇水平** 行为学检测结束后,所有小鼠眼眶动脉采血,4℃ 静置 2 h 后,3 000 r/min,4℃ 离心 15 min,上清液 -80℃ 保存,ELISA 方法检测血清中皮质醇水平,按照试剂盒说明书进行检测。

**5 统计学方法** 实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料  $\bar{x} \pm s$  表示,符合正态分布和方差齐性,采用成组 *t* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 两组小鼠一般情况比较** 正常组小鼠精神状态良好,饮水进食正常,毛发有光泽,大小便正常。模型组小鼠表现为精神萎靡,倦怠嗜睡,自主活动减少,毛发枯萎无光泽,小便增多等类似肾虚的表现。当 CD1 出现时,则立即逃往鼠笼角落或攀于笼盖上,呈现毛发直立,身体颤抖等惊恐状。

**2 两组社交接触实验结果比较(表 1)** 与本组 CD1 小鼠不存在时比较,正常组社交区停留时间延长,角落区停留时间缩短(*P* < 0.05),模型组社交区停留时间缩短,角落区停留时间延长(*P* < 0.05);与正常组 CD1 小鼠存在时比较,模型组社交区停留时间减少,角落区停留时间增多(*P* < 0.05)。两组小鼠在旷场内总的运动距离比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 两组社交接触实验结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	CD1	社交区停留时间 (s)	角落区停留时间 (s)	运动距离 (cm)
正常	10	不存在	58.70 ± 8.99	19.71 ± 2.48	2 015.43 ± 366.76
		存在	84.94 ± 9.52*	10.40 ± 3.09*	—
模型	10	不存在	47.45 ± 3.32	25.76 ± 2.67	2 002.58 ± 300.33
		存在	30.55 ± 3.58* <sup>△</sup>	36.82 ± 4.08* <sup>△</sup>	—

注:与本组 CD1 不存在时比较,\**P* < 0.05;与正常组比较,<sup>△</sup>*P* < 0.05

**3 两组高架十字实验结果比较(表 2)** 与正常组比较,模型组进入开放臂、闭合臂及高架十字总进入

次数均减少(*P* < 0.05);模型组开放臂进入次数比例降低(*P* < 0.05)。

表 2 两组高架十字实验结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	开放臂 (次)	闭合臂 (次)	高架迷宫 (次)	开放臂次数比 (%)
正常	10	13.10 ± 37.57	29.50 ± 3.39	42.66 ± 6.77	29.33 ± 12.71
模型	10	2.83 ± 2.71*	13.50 ± 2.66*	16.33 ± 4.50*	15.00 ± 12.61*

注:与正常组比较,\**P* < 0.05

**4 两组悬尾实验结果比较(表 3)** 与正常组比较,模型组小鼠在悬尾实验中后 4 min 内不动时间延长(*P* < 0.05)。

表 3 两组悬尾实验结果比较 (*s*,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	不动时间
正常	10	50.49 ± 30.12
模型	10	176.58 ± 44.18*

注:与正常组比较,\**P* < 0.05

**5 两组血清皮质醇水平比较(表 4)** 与正常组比较,模型组血清皮质醇水平明显升高(*P* < 0.01)。

表 4 血清皮质醇水平比较 ( $\mu\text{g/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	皮质醇水平
正常	10	175.9 ± 68.1
模型	10	579.0 ± 79.1*

注:与正常组比较,\**P* < 0.01

## 讨 论

应激是导致抑郁发生的重要原因之一,许多对于应激作用的研究模型是基于强有力的物理应激源刺激,如电击应激和束缚应激等,然而这些模型与人类日常生活中所遭受的应激并不相同<sup>[7]</sup>。在大多情况下诱发人类心理问题的应激源多属于社会性应激,因此,采用社会性应激能更好地模拟人类抑郁症的发生方式。本实验通过慢性社交应激 10 天诱导 C57 小鼠建立社交应激抑郁样模型,通过社交接触实验、高架十字及悬尾实验对其进行行为学评价,结果表明遭受社交应激与孤立的 C57 小鼠表现出抑郁及焦虑样行为表现<sup>[10,11]</sup>。在社交接触实验中,模型组小鼠表现出社交回避行为,具体表现为:同正常组小鼠相比在社交区停留时间短,而在角落区停留时间长;而当 CD1 小鼠出现在社交区后,正常组小鼠表现出更为活跃的社交行为,模型组小鼠则表现出社交回避。在多种哺乳类动物中,社交应激能够影响情感行为反应,重复性暴露于社交失败应激因素之下,会导致强烈的抑郁样表型,表现为快感缺乏、焦虑、社交回避行为,抗抑郁药氟西

汀在一定程度上能够逆转社交应激所造成的行为学改变<sup>[12,13]</sup>。

在精神疾病患者身上,常可见到抑郁与焦虑相伴发生<sup>[14]</sup>。高架十字迷宫是评价啮齿类动物焦虑反应的实验方法,本实验中模型组小鼠开放臂进入次数、高架十字迷宫总进入次数及开放臂进入次数比值明显低于正常组,表明模型组小鼠焦虑水平明显高于正常组小鼠。有研究显示在儿童及青少年中有 25%~50% 抑郁障碍患者合并焦虑<sup>[14]</sup>。而本实验中社交失败应激诱导的抑郁样模型也印证了这一现象,即抑郁与焦虑常相伴发生。

悬尾实验是抗抑郁药物评价模型的经典方法,广泛应用于精神神经药理学的基础研究<sup>[9]</sup>。在悬尾实验中,不动状态持续时间反映了实验动物的抑郁样绝望状态。本实验中,模型组小鼠后 4 min 持续不动时间明显长于正常组,表明慢性社交应激能够影响动物的行为积极性,并会导致绝望行为<sup>[11]</sup>。实验结果证实慢性社交应激诱导 C57 小鼠产生了一系列的行为学改变,这些行为学改变与人类抑郁症状具有共性。表明慢性社交应激诱导抑郁样模型可能是模拟人类抑郁症状较为可靠的模型<sup>[10]</sup>。

社交应激失败及 CD1 小鼠在环境中的持续存在使得 C57 小鼠一直处于一种惊恐的状态之中,模型组小鼠较正常组小鼠血清皮质醇明显升高,反映了社交失败应激使得小鼠体内 HPA 轴被激活,而 HPA 轴的激活与啮齿类动物情绪相关反应密切相关<sup>[11,15]</sup>。在中医学中惊恐情绪与肾脏密切相关,有“恐伤肾”、“恐则气下”等经典理论,本课题组前期研究发现通过“恐伤肾”可造成小鼠肾虚模型。该研究与之前研究结果较为一致,即社交应激小鼠表现为体内皮质醇水平呈升高状态,结合小鼠相关行为学表现,该模型小鼠证型偏向于肾阳虚,这也与部分临床及实验研究具有一致性,即肾阳虚证表现为血清皮质醇水平升高<sup>[16,17]</sup>。本课题组前期研究发现淫羊藿主要成分淫羊藿素和淫羊藿苷能够逆转社交应激小鼠抑郁样行为并改善 HPA 轴功能<sup>[18,19]</sup>。补肾中药成分能够改善社交应激导致的行为异常,说明社交应激可导致小鼠肾虚状态。该模型属中医病因造模,即利用中医学“恐伤肾”原理造成了小鼠抑郁状态,即社交应激直接造成了小鼠的肾虚抑郁状态。

现代社会中,人类在一个无时无刻不与周围互动的环境中,尤其是人际关系的处理对个体心理活动有着重要的影响。因此,人类环境中社交挫折等社会性应激因素容易诱发抑郁等精神疾病。有研究发现“恐

伤肾”是心身疾病的主要病理机制之一,该理论对心身疾病辨证治疗有重要意义<sup>[20]</sup>。因此认为中医肾虚证与抑郁症有着密切的联系。本课题组前期研究发现支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病及非小细胞癌患者合并抑郁时,中医辨证为肾阳虚的可能性更大,反之,上述患者辨证为肾阳虚,其伴抑郁的可能性也更大<sup>[21]</sup>。目前,肾虚证动物模型大多通过药物诱导,这与人类肾虚证形成有着较大的差异<sup>[22]</sup>。本实验通过社交应激诱导 C57 小鼠形成抑郁样动物模型,并发现此模型具有肾虚表现,因此,采用社交应激方式建立的小鼠模型可能为肾虚证与抑郁症结合的较为理想的动物模型,但是肾虚证具体分型可能需要进一步结合多项指标进行验证。

## 参 考 文 献

- [1] Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(2): 137-151.
- [2] Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(10): 1161-1169.
- [3] Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress [J]. *Science*, 2006, 311(5762): 864-868.
- [4] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression [J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 894-902.
- [5] 厉蓓. 补肾益气方药治疗肺肾气(阳)虚型哮喘的现代临床及实验研究[D]. 上海:复旦大学, 2014:1-113.
- [6] Golden SA, Convington HE, Berton O, et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(8): 1183-1191.
- [7] 吴晓, 吴金峰, 董竞成. 社交应激动物模型的建立及其效果评价 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(6): 800-804.
- [8] 张燕, 郑伟, 丁莹, 等. BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠高架十字迷宫焦虑表现行为比较 [J]. *疾病预防控制通报*, 2012, 27(3): 18-20.
- [9] 孙世光, 刘健, 鹿岩, 等. 昆明小鼠强迫游泳实验与悬尾试验抑郁模型相关性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(1): 107-112.
- [10] Rygula R, Abumaria N, Flugge G, et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 162(1): 127-134.

- [11] Iniguez SD, Riqqs LM, Nieto SJ, et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male C57BL/6 mice [J]. *Stress*, 2014, 17(4): 247-255.
- [12] Dryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6 strain [J]. 1991, 38(2): 315-320.
- [13] Rygula R, Abumaria N, Domenici E, et al. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 174(1): 188-192.
- [14] Axelson DA, Birmaher B. Relation between anxiety and depressive disorders in childhood and adolescence [J]. *Depress Anxiety*, 2001, 14(2): 67-78.
- [15] Krishnan V, Han MH, Graham DL, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions [J]. *Cell*, 131(2): 391-404.
- [16] 朱辟疆, 刘永平, 解冰. 慢性肾衰阳虚、阴虚证血浆皮质醇的改变 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 1995, 5(3): 1-2.
- [17] 陈晓阳, 李晟, 邹志, 等. 忧虑康液对肾阴虚抑郁模型大鼠血浆促肾上腺皮质激素、皮质醇及下丘脑形态学的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(8): 1080-1083.
- [18] Wu X, Wu J, Xia S, et al. Icaritin oppose the development of social aversion after defeat stress via increase of GR mRNA and BDNF mRNA in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 256: 602-608.
- [19] 吴金峰. 社交应激性抑郁对小鼠肺癌的影响及淫羊藿苷干预的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2009: 1-77.
- [20] 谷忠悦, 关怀玉. “恐伤肾”在心身疾病演变过程中的意义 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 13(6): 113-114.
- [21] 杜懿杰. 若干同证疾病(伴或不伴抑郁)部分炎症及HPA轴相关指标的对照研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2014: 1-103.
- [22] 薛昶, 金兰. 关于肾虚证动物模型建立方法的思考 [J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(2): 403-404.

(收稿: 2014-10-01 修回: 2015-12-07)

## 中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

