



足底电击应激时程对大鼠焦虑样行为的影响

耿婷婷, 汪婷婷, 姜劲峰, 徐旺芳, 荣长保

(南京中医药大学, 南京 210029)

【摘要】 目的 观察足底电击应激时程对大鼠高架十字迷宫及开场实验焦虑样行为的影响。**方法** 选取成年雄性 SD 大鼠按照体重分层随机分为对照组和足底电击组, 每组 12 只。足底电击组予以不可逃避性足底电击 (0.8 mA, 电击 10 s, 休息 20 s, 共 5 min, 1 次/d) 结合孤养建立大鼠焦虑模型。分别在足底电击 7 d 及 14 d 后测高架十字迷宫和开场实验, 评估大鼠的焦虑行为。**结果** 7 d 及 14 d 足底电击后, 足底电击组焦虑样行为增加, 差异具有显著意义 ($P < 0.01$), 入臂总次数明显低于对照组, 运动活性降低。开场实验足底电击组进入中心区次数及中心区逗留时间低于对照组 ($P < 0.01$), 运动总距离、直立次数及理毛次数足底电击组均明显低于对照组 ($P < 0.01$), 运动探索活性降低。比较 7 天及 14 天足底电击组行为学结果, 可见随着造模天数的增加, 大鼠闭臂时间比及闭臂次数比呈现下降趋势 ($P < 0.05$), 焦虑程度降低。开场实验运动总距离、直立次数及理毛次数 14 d 低于 7 d, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 提示大鼠运动探索行为进一步减少, 自我关注度降低, 抑郁样行为增加。**结论** 不同时程的足底电击应激导致大鼠焦虑样行为, 影响大鼠运动探索活性。随着造模天数的增加, 大鼠行为可能从焦虑样向抑郁样改变。足底电击应激焦虑模型造模时程的选择 7 d 优于 14 d。

【关键词】 焦虑; 动物模型; 足底电击; 行为学

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0069-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.001.013

The influence of footshock stress duration on anxiety-like behavior in rats

GENG Ting-ting, WANG Ting-ting, JIANG Jin-feng, XU Wang-fang, RONG Chang-bao

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective To study the influence of footshock (FS) -stress duration on anxiety-like behavior in the elevated plus-maze and open-field tests. **Methods** Rats (24) were randomly divided into 2 groups: the control group and the FS group. In the FS group, the anxiety model of rat was produced by inevitability footshock (5 minutes in total, once a day; 0.8mA, lasted for 10 seconds, 20 seconds interval) combined with separation. Anxiety-like behavior was evaluated by elevated plus maze and open-field tests after 7 and 14 days of FS-stress. **Results** After 7 days and 14 days of FS-stress, FS group showed significantly enhanced anxiety-like behavior and reduced locomotion indicated by total entries as compared to the control group ($P < 0.01$). In the open field test, the entrance times and the retention time in the central zone, the total movement distance, the numbers of rears and grooming in rats in the FS group were lower than those in the control group, which showed lower locomotion and exploratory activity in the FS groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared to 7 days of FS-stress, both CT% (the percentage of time spent in the close arm) and CE% (the percentage of entries to the close arm) were reduced after 14 days of FS-stress showing the decreasing anxiety ($P < 0.05$), as well as the total movement distance and the numbers of rears and grooming ($P < 0.05$). The reduced locomotion and exploratory activity

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373747)。

[作者简介] 耿婷婷(1990-), 女, 硕士生。研究方向: 针灸效应规律及其机制研究。

[通讯作者] 姜劲峰(1967-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 针灸效应规律及其机制研究。

and self-regarding in the FS group demonstrated the enhanced depression-like behavior in rats. **Conclusions** Chronic FS-stress contributes to lower locomotion and exploratory activity in rats and leads to anxiety-like behavior in rats. The increased duration of chronic FS-stress may lead to the behavior change from anxiety-like behavior to depression-like behavior, and 7-days is better than 14-days in making the anxiety model in rats.

【Key words】 Anxiety; Animal model; Footshock; Behavior

焦虑障碍在现今社会非常普遍,病程缓慢,与众多负面结果相关,如自杀风险更大,合并内科病,并且当与抑郁共病缓解率低^[1]。焦虑障碍的研究需要动物模型的支持。虽然啮齿类动物焦虑样行为与人类临床焦虑定义有所区别,二者相似的受累脑区,以及人类抗焦虑药物对啮齿类动物行为学的改善,说明啮齿类动物焦虑样行为的研究可以对人类的焦虑问题研究提供线索^[2]。

应激在神经变性疾病和精神疾病相关的众多病理生理过程中扮演重要角色^[3]。过度的应激反应与焦虑相关^[4]。已有研究显示短期的慢性应激可导致大鼠焦虑样行为^[5]。足底电击应激是经典应激方式的一种,广泛地应用于条件恐惧相关研究^[6-7]。焦虑与恐惧关系密切^[8],已有不少研究采用不可避免足底电击应激制造焦虑抑郁动物模型^[9-10]。但目前缺少不同时程的足底电击应激对大鼠焦虑样行为影响的研究。我们将成年 SD 大鼠足底电击不同时程后,观察不同程度的慢性应激刺激对大鼠高架十字迷宫及开场实验所示焦虑样行为的影响,目的是寻找到足底电击焦虑模型的最佳造模时间节点,为研究典型焦虑样行为提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组

SPF 级 SD 雄性大鼠 24 只,体重为 200 ~ 220 g, 6 周龄,由上海实验动物资源中心(西普尔-必凯)提供【SCXK(沪)2013-0016】。动物饲养在大鼠通风鼠笼中,环境温度控制在 21 ~ 23℃,湿度为 50% 左右,食水自由。实验于南京中医药大学实验动物中心【SYXK(苏)2014-0001】内进行。实验过程中对动物的处置严格遵守我国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。动物适应饲养一周后,按体重分层随机分为对照组(control group, 12 只)、足底电击组(footshock group, FS, 12 只)。

1.1.2 仪器与设备

实验器材:足底电击箱(SLY-SRC 刺激记录控制器,北京硕林苑科技有限公司);大鼠通风鼠笼(EVC,苏州猴皇动物实验设备科技有限公司);动物行为录像及分析采用 TopScan-动物行为智能分析

系统(Cleversys, America)。

1.2 方法

1.2.1 实验方案

为避免大鼠间气息交流影响情绪状态,本实验足底电击组均采用孤养,大鼠通风鼠笼设备可避免大鼠间气息交流。对照组群养,每日抚摸数分钟,余不作任何处理。足底电击组每日接受一次足底电击,电击参数:0.8 mA,电击 10 s,休息 20 s,共 5 min。在足底电击 7 d 及 14 d 后测高架十字实验(10:00 ~ 12:30)、开场实验(14:00 ~ 15:00),评估大鼠的焦虑行为。

1.2.2 高架迷宫实验

高架十字迷宫(Elevated plus maze, EPM)装置(TopScan-动物行为智能分析系统, Cleversys, America)由两条相对开放臂(50 cm × 10 cm)和两条相对闭合臂(50 cm × 10 cm × 40 cm)及中央区(10 cm × 10 cm)连接而成,距离地面 50 cm。实验前将大鼠搬至实验室适应环境 1 h 以上,保持室内安静,暗光。实验开始时将大鼠从中央格面向闭合臂放入迷宫,记录 5 min 内的活动情况。观察大鼠进入开臂和闭臂的次数及停留时间。每只大鼠实验结束后取出,将各臂清理干净,并用 75% 的酒精去除气味。行为学结果(1)闭臂时间比 = 闭臂时间 / (开臂时间 + 闭臂时间);(2)闭臂次数比 = 闭臂次数 / (开臂次数 + 闭臂次数);(3)入臂总次数 = 闭臂次数 + 开臂次数。行为学结果应用 SPSS 软件箱式图法剔除离群值。

1.2.3 开场实验

本实验敞箱长 × 宽 × 高为:100 cm × 100 cm × 40 cm,内面及底面均为蓝色,中央区正上方安置摄像头。实验第 8 天及第 15 天时,每组大鼠分别进行旷场实验,实验前把动物提前 1 h 搬进测试室适应环境,实验开始后,将大鼠放到中央区固定位置,每次放置头部固定朝向一侧。每只大鼠测量 5 min,测量指标包括运动总距离、中央区停留时间、中央区进入次数、直立次数及理毛次数,随后用 75% 酒精清洁箱内环境,等酒精挥发无味后,再进行下 1 只。

1.3 数据分析

采用 SPSS 统计软件处理所得数据,以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高架十字迷宫行为学结果比较

足底电击组闭臂次数比、闭臂时间比均较对照组明显增加,入臂总次数低于对照组($P < 0.01$),显示足底电击致大鼠焦虑样行为,导致大鼠运动活性下降。14 d 与 7 d 比较时发现,足底电击组 14 d 闭臂次数比及闭臂时间比较 7 d 降低($P < 0.05$),对照组两时间点无差异。

表 1 不同足底电击时程大鼠高架十字迷宫行为学比较($\bar{x} \pm s$, 每组 $n = 10$)

Tab. 1 Comparison of rats' behavior in the elevated plus maze of different footshock-stress duration

时程 Duration	闭臂次数比 CE% (the percentage of entries to the close arm)	闭臂时间比 CT% (the percentage of time spent in the close arm)	入臂总次数 Total entries
FS 7 d 7days (FS group)	0.85 $\pm$ 0.13 **	0.95 $\pm$ 0.05 **	10.11 $\pm$ 5.82 **
对照组 7 d 7days (control group)	0.52 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.13	28.5 $\pm$ 5.01
FS 14 d 14days (FS group)	0.68 $\pm$ 0.10 ** #	0.81 $\pm$ 0.14 ** #	14 $\pm$ 8.17 *
对照组 14 d 14days (control group)	0.51 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.13	32.4 $\pm$ 9.79

注:与对照组相应时程相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与足底电击 7 d 相比, # $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the corresponding duration (control group); # $P < 0.05$, compared with 7 days (FS group).

表 2 不同足底电击时程大鼠开场行为学比较($\bar{x} \pm s$, 每组 $n = 10$)

Tab. 2 Comparison of rats' behavior in the open-field test of different footshock-stress duration

时程 Duration	运动总 距离 (cm) Total movement distance	中央区进入次数 Entrance times to the central zone	中央区停留时间 (s) Retention time in the central zone	直立次数 Numbers of rears	理毛次数 Numbers of grooming
FS 7 d 7days (FS group)	374.75 $\pm$ 210.62 *	1.87 $\pm$ 1.64 **	2.94 $\pm$ 2.84 **	8.8 $\pm$ 5.07 **	2.75 $\pm$ 1.83 **
对照组 7 d 7days (control group)	640.55 $\pm$ 216.52	6.89 $\pm$ 2.57	14.1 $\pm$ 3.53	17.2 $\pm$ 2.86	10 $\pm$ 2.24
FS 14 d 14days (FS group)	220.44 $\pm$ 191.31 * #	1.25 $\pm$ 1.04 **	2.49 $\pm$ 2.35 **	4.5 $\pm$ 3.17 ** #	1.2 $\pm$ 1.03 ** #
对照组 14 d 14days (control group)	579.69 $\pm$ 381.19	5.78 $\pm$ 2.22	10.33 $\pm$ 4.71	19.86 $\pm$ 3.80	3.86 $\pm$ 1.57

注:与对照组相应时程相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与足底电击 7 d 相比, # $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the corresponding duration (control group); # $P < 0.05$, compared with 7 days (FS group).

3 讨论

关于如何建立起较为合理的焦虑动物模型,目前应用的造模方法有很多种,包括:高架十字迷宫、空瓶刺激、天敌暴露、饮水冲突等等,但是仍然存在很多不确定因素和干扰因素^[5]。应激是精神疾病的重要基础,与焦虑抑郁密切相关^[3],慢性应激焦虑模型可作为焦虑模型的一种^[5]。

应激的不同时程影响动物行为,急性应激时,动物的活动增加,但是随应激时间的延长,动物的行为活动逐渐减少,表现为由兴奋焦虑状态过渡到压抑抑郁状态^[11]。应激发生的不同时期(新生期或成熟期)以及不同时程对脑结构功能、行为、认知产生不同的效应^[12],这种影响与应激所致机体神经内分泌改变相关^[13]。分别于强迫游泳应激第 1, 3, 7, 14 和 28 天观察应激对大鼠海马谷氨酸、天冬氨酸

2.2 开场行为学结果

足底电击 7 d 和 14 d 与对照组相应时程对比,中央区进入次数、中央区停留时间及运动总距离显著低于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。足底电击 14 d 与足底电击 7 d 相比,运动总距离进一步下降,大鼠直立次数及理毛次数显著减少($P < 0.05$),而中央区停留时间及进入次数两电击天数之间的差异不大。对照组两时间点比较,除理毛次数外,其余开场行为学结果未见明显差异。

及 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 含量的影响,结果显示第 3 天开始海马兴奋性氨基酸天冬氨酸和谷氨酸含量持续增高,兴奋性氨基酸拮抗剂 GABA 含量在急性应激时降低,于 14 d 后开始增高^[14]。金玉祥等^[15]的研究发现在不同足底电击应激时程,大鼠脑内一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 表达呈现动态变化:应激早期 (1 ~ 6 d) NOS 阳性神经元的核团数目增多, NOS 活性增加;随着应激时程延长,阳性核团数目逐渐减少, 15 d 时众多脑区的 NOS 表达较前明显下降。基于以上,慢性应激焦虑模型需要把握应激时程。焦虑与抑郁往往伴发出现,焦虑反应和抑郁反应之间可能仅仅存在一个时间跨度,短期的刺激可以导致焦虑,而在此基础上的延长刺激则可导致抑郁发生^[5]。比较大鼠 7 d、14 d 以及 21 d 行为学表现,发现 14 d 慢性束缚应激大鼠主要表现为焦虑状态,而

21 d 大鼠则主要以抑郁为主^[16]。综合之前的各项研究,我们选择 7 d 及 14 d 这两个时间节点观察足底电击应激时程对大鼠焦虑样行为的影响。

本实验采用高架十字迷宫及开场实验评价足底电击应激所致大鼠焦虑样行为,基于引起焦虑因素,例如未受保护的、升高的区域或一个开放区域,焦虑水平被表达为进入厌恶区域的次数及逗留时间^[17]。除此以外,高架十字迷宫的入臂总次数,开场的运动总距离及直立次数可以表征大鼠运动活性及探索欲望^[18],理毛次数反映大鼠对自己的关注度,大鼠运动探索及自我关注的下降,一定程度上反映大鼠抑郁样行为^[19-20]。已有研究表明间隔一周的两次高架及开场实验主要指标在初测及复测实验中均呈较好相关性^[21-22],可以认为大鼠对高架十字迷宫及开场实验的适应和记忆效应并未太大影响实验结果。本研究足底电击组在高架十字迷宫及开场实验中均显示出对开放区域的回避,表现为闭臂停留时间及进入次数的增多,开场中心区探索时间及进入次数的减少,焦虑样行为显著。与此同时,入臂总次数、开场运动总距离、直立及自我修饰次数较对照组也显著降低,显示明显抑郁样行为。比较不同造模时间,我们还观察到随着足底电击应激时程的增加,大鼠焦虑样行为减轻,抑郁程度加重。

综上所述,足底电击结合孤养可致大鼠焦虑样行为,可作为慢性应激焦虑模型的一种。14 d 大鼠的焦虑程度较 7 d 有所下降,然而大鼠运动探索活性及自我关注度进一步降低,抑郁样行为增加。可以认为足底电击应激焦虑模型造模时程的选择,7 d 较 14 d 更优。我们的实验结果从行为学角度进一步支持应激时程影响动物焦虑抑郁样行为的观点,研究应激相关精神疾病应重视应激的时程、强度以及应激类型的差别,这与临床实际情况更加接近,并且时程影响背后的机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Etkin A. Neurobiology of anxiety: from neural circuits to novel solutions? [J]. *Depression and anxiety*, 2012, 29 (5): 355 - 358.
- [2] Adhikari A. Distributed circuits underlying anxiety[J]. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2014, 8(112):1 - 5.
- [3] Esch T, Stefano G B, Fricchione G L, *et al.* The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders [J]. *Neuroendocrinology Letters*, 2002, 23(3): 199 - 208.
- [4] Habib K E, Gold P W, Chrousos G P. Neuroendocrinology of stress [J]. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 2001, 30(3): 695 - 728.
- [5] 赵宏波,白晓晖,李晓娟,等. 逍遥散治疗慢性束缚应激焦虑模型大鼠行为学评价[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29 (5): 1669 - 1673.
- [6] Milad M R, Pitman R K, Ellis C B, *et al.* Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder [J]. *Biological psychiatry*, 2009, 66 (12): 1075 - 1082.
- [7] Lisboa S F, Gomes F V, Silva A L, *et al.* Increased contextual fear conditioning in iNOS knockout mice: additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system [J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2015: pyv005.
- [8] Weinberger D R. Anxiety at the frontier of molecular medicine [J]. *New England Journal of Medicine*, 2001, 344(16): 1247 - 1249.
- [9] Musazzi L, Milanese M, Farisello P, *et al.* Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants [J]. *PloS one*, 2010, 5(1): e8566.
- [10] Mallei A, Giambelli R, Gass P, *et al.* Synaptoproteomics of learned helpless rats involve energy metabolism and cellular remodeling pathways in depressive-like behavior and antidepressant response[J]. *Neuropharmacology*, 2011, 60(7): 1243 - 1253.
- [11] Beck K D, Luine V N. Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids[J]. *Brain research*, 1999, 830(1): 56 - 71.
- [12] Lupien S J, McEwen B S, Gunnar M R, *et al.* Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10(6): 434 - 445.
- [13] De Kloet E R, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6(6): 463 - 475.
- [14] 吴东辉,杨权,许崇涛. 应激对大鼠海马谷氨酸、天冬氨酸和 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. *中华精神科杂志*, 2003, 36 (2): 98 - 100.
- [15] 金玉祥,陈嘉峰. 应激性防御反应过程中脑内一氧化氮合酶阳性神经元分布的变化[J]. *神经解剖学杂志*, 2000, 16 (1): 29 - 32.
- [16] 姜幼明. 逍遥散对慢性束缚应激焦虑模型大鼠杏仁核 CRF1 型受体及受体后信号通路的调节作用[D]. 北京:北京中医药大学,2012
- [17] Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice [J]. *Behavioural brain research*, 2002, 134(1): 49 - 57.
- [18] 王丽娜,郭小兵,马金芳,等. 青年与老龄昆明小鼠焦虑动物模型结构维度比较[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2013, 22(6): 514 - 516.
- [19] 许晶,李晚秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. *中国行为医学科学*, 2003, 12(1): 14 - 17.
- [20] 王丹. 抑郁症动物模型及行为学评价[J]. *西安文理学院学报:自然科学版*, 2012, 15(2): 51 - 53.
- [21] 宗绍波,魏盛,苏云祥,等. 焦虑大鼠模型高架十字迷宫实验的复测信度检验及参数相关性分析[J]. *中国医药导报*, 2011, 8(30): 5 - 7.
- [22] 孙世光,王婧婧,李自发,等. 旷场实验:昆明小鼠行为学评价方法的重测信度检验[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2010 (12): 1093 - 1095.

[修回日期] 2015-12-25