•研究论文•

一种心脾两虚型抑郁症动物模型的建立及评价方法

宋永贵[1,2#], 张文豪[1#], 薛　冰[1], 梁慧慧[1], 李前民[1], 艾志福[1], 朱根华[1], 杨　明[1,3], 刘亚丽[1,4], 平欲晖[1], 苏　丹[1*]

(1. 江西中医药大学, 中药药效 (防治精神障碍脑疾病) 评价江西省中医药管理局重点研究室/抑郁症中医证候动物模型江西省中医药管理局重点研究室, 江西 南昌 330004;　2. 江西中医药大学, 南昌市实验动物病理研究重点实验室, 江西 南昌 330006;　3. 江西古香今韵大健康产业有限公司, 江西 南昌 330029;　4. 南昌医学院, 药效与安全性评价江西省卫生健康重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: 本研究通过一种复合诱导方法结合神经行为学以及中医证候评价, 建立并确证小鼠心脾两虚证抑郁模型。采用改良足底电击和负重游泳法进行构建, 并与慢性不可预知刺激诱导的小鼠抑郁症模型进行对比, 再经由方剂反证所建立模型的证候。抑郁症评价结果显示, 与空白组相比, 复合诱导模型小鼠表现为典型的抑郁样行为, 且脑与血清中五羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA) 含量明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 皮质酮 (corticosterone, Cor) 含量显著增加 ($P < 0.01$)。证候评价结果显示, 与空白组小鼠相比, 复合诱导模型小鼠精神倦怠、反应迟缓, 失眠且食欲明显下降 ($P < 0.01$); 舌象红色度显著降低 ($P < 0.01$); 心脑血管功能及消化道功能明显不足 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 脾脏指数明显降低 ($P < 0.01$)。验证实验显示, 帕罗西汀改善了复合诱导模型小鼠的抑郁样行为, 心脾两虚经典方归脾汤能显著回调其抑郁及相关证候各项指标。通过改良足底电击结合负重游泳法造模可成功制备心脾两虚型抑郁症动物模型。动物实验获得江西中医药大学动物伦理实验委员会的批准和监督 (伦理编号: 2023031303)。

关键词: 抑郁症; 动物模型; 心脾两虚; 归脾汤; 病症结合

中图分类号: R965.1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2025)07-2198-13

Establishment and systematic evaluation methods of a novel animal model for depression with heart-spleen deficiency syndrome

SONG Yong-gui[1,2#], ZHANG Wen-hao[1#], XUE Bing[1], LIANG Hui-hui[1], LI Qian-min[1], AI Zhi-fu[1], ZHU Gen-hua[1], YANG Ming[1,3], LIU Ya-li[1,4], PING Yu-hui[1], SU Dan[1*]

(*1. Key Research Laboratory for Chinese Medicine Efficacy Evaluation (Prevention and Treatment of Mental Disorders Brain Disease) of Jiangxi Traditional Chinese Medicine Administration/Key Research Laboratory for Depression Syndrome Animal Models of Jiangxi Traditional Chinese Medicine Administration, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;　2. Key Laboratory of Pathological Research on Experimental Animals, Nanchang, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;　3. Jiangxi Guxiang Jinyun Comprehensive Health Industry Co., Ltd., Nanchang 330029, China;　4. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation, Health Commission of Jiangxi Province, Nanchang Medicine College, Nanchang 330004, China*)

Abstract: The study aims to establish and validate a mouse model of depression with concurrent heart and

收稿日期: 2025-01-14;　修回日期: 2025-04-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82260764); 江西省自然科学基金重点项目 (20232ACB206056); 江西省杰青需求牵引计划 (20224ACB218008); 江西省重点研发计划重点项目 (20243BCC31009).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 18079131058, E-mail: sud94@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0045

spleen deficiency using a combined induction method involving neurobehavioral assessments and traditional Chinese medicine (TCM) syndrome evaluation. The model was constructed *via* modified electroshock and forced swimming protocols, and compared to a chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depression model. Syndrome validation was performed using TCM prescriptions. Depression assessments revealed that the mice in the combined induction model exhibited significant depressive-like behaviors compared to controls. Moreover, the 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine (DA) levels in the brain tissue and serum were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while corticosterone (Cor) levels were significantly increased ($P < 0.01$). TCM syndrome evaluation demonstrated symptoms including mental fatigue, delayed responses, insomnia, reduced appetite ($P < 0.01$), and diminished tongue color intensity ($P < 0.01$). Cardiovascular and digestive functions were impaired ($P < 0.01$, $P < 0.05$), with a decreased spleen index ($P < 0.01$). Validation experiments indicated that paroxetine alleviated the depressive-like behaviors, while the classic TCM formula Guipi Decoction significantly modulated depression-related biomarkers and syndrome indicators. A mouse model of depression with both heart and spleen deficiency can be successfully established using the modified electroshock combined with forced swimming method. Animal experiments were conducted with the approval and supervision of the Animal Ethics Committee of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (ethics number: 2023031303).

Key words: depression; animal model; heart blood deficiency combined with spleen Qi deficiency syndrome; Guipi Decoction; syndrome combination

抑郁症是一种常见的心理疾病, 即将成为全球最大的医疗负担[1]。抑郁症疾病动物模型是研究抑郁症的发病机制及开发抗抑郁新药的关键。因此, 近年来, 国内外开发了多种抑郁症动物模型, 如药物诱导模型、社会挫败应激模型、习得性无助模型和慢性不可预知刺激模型[2-5]。此外, 中医在抑郁症的辨证治疗方面具有独特优势, 因此, 与抑郁症辨证分型相关的研究逐渐受到重视[6], 多种抑郁症病症结合模型相继建立[7-9]。但对于中医临床多样的抑郁症分型, 目前的病证结合模型仍然匮乏。

中医临床抑郁症证型大体分为虚证和实证。目前已有肝郁气滞、肝阳上亢等实证模型, 以及肝郁脾虚、肾阳虚、肾阴虚等抑郁症虚证模型[10]。临床上抑郁患者常常存在心悸胆怯、失眠多梦的同时, 伴有食欲不振、消化不良等特点[11,12]。心脾两虚也是临床常见证候之一, 但其“病证结合”的动物模型却仍未建立。

临床上心脾两虚的患者常有心悸胆怯、多思善疑、失眠多梦、神疲体倦、食欲不振、舌淡等症状[13], 以益气补血、健脾养心为治疗原则, 常选用归脾汤等方剂进行治疗。在中医理论中, 心脾两虚是指心血不足与脾气虚弱并存, 心血不能濡养神气, 脾虚难以运化水谷精微, 进而引起一系列身心变化。心脾两虚的形成涉及多种原因, 通常与长期的身体劳累、精神压力、情绪波动等因素有关。足底电击使动物处于高度紧张惊恐的状态。中医认为, 惊则气乱, “惊”从外袭, 心先受之, 在精神情志方面, 心藏神, 惊扰心神可能导致气血运行不畅, 耗损心血[14]。负重游泳则通过反复的体力消耗, 导致动物过度疲劳。《景岳全书》中提到: “劳倦过度, 则脾气伤矣”, 过度的体力或脑力劳动会耗伤脾气, 导致脾失健运。同时, 足底电击与负重游泳均能诱发小鼠的抑郁样行为[15,16]。基于此, 本研究围绕中医病因病机, 在足底电击刺激的基础上, 再结合负重游泳法, 模拟处于惊恐压力之下的长期疲劳状态, 加速心脾两虚型抑郁症的病理过程, 建立了一种新型病证结合抑郁症动物模型。

材料与方法

实验动物与分组 本实验需重复2次, 共85只C57BL/6J雄性小鼠, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司 [许可证号: SCXK (苏) 2018-0008], 第一次分组: 空白组 (control)、慢性不可预知刺激模型组 (M1)、慢性不可预知刺激模型盐酸帕罗西汀给药验证组 (P1)、改良足底电击结合负重游泳法模型组 (M2)、改良足底电击结合负重游泳法盐酸帕罗西汀给药验证组 (P2), 每组9只小鼠。第二次分组: 空白组 (control)、心脾两虚模型组 (model)、心脾两虚归脾汤给药组 (Guipi Decoction) 及心脾两虚盐酸帕罗西汀给药组 (paroxetine)。动物实验均在屏障环境中进行, 温度22～25 ℃, 湿度45%～60%, 12 h昼夜循环。实验均获得江西中医药大学动物伦理实验委员会的批准和监督 (伦理编号: 2023031303)。

试剂与仪器 归脾汤组方: 黄芪20 g、人参15 g、酸枣仁15 g、龙眼肉15 g、茯神15 g、木香8 g、远志8g、当归12 g、炙甘草15 g、白术12 g、生姜6 g, 大枣15 g, 以上药材购自厦门本草真源生物医药科技有限公司。

盐酸帕罗西汀 (江西瑞威尔生物, 产品批号: RWE20231001)。超声耦合剂 (天津市西苑寺生产研

究所, 生产批号: 20210102); 异氟烷 (产品批号: 21091901)、旷场实验箱、强迫游泳圆筒、激光散斑脑血流成像系统 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 高速中药粉碎机 (瑞安市永历制药机械有限公司); 超高分辨率超声影像系统 (加拿大 Visual Sonics 公司, Vevo2100 型); SMART 3.0 动物行为学分析系统 (上海欣软信息科技有限公司); Agilent1290 QTRAP 4500 (Q-trap-MS, 美国 AB 公司), Waters UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)。胃泌素 (gastrin, GAS)、*D*-木糖 (*D*-xylose)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测试盒 (上海赫湃生物科技有限公司)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测试盒 (南京建成科技有限公司)。

模型的建立与治疗 造模方法是在改良 Haj-Mirzaian 等[15]的足底电击模式的基础上结合 Xu 等[16]所采用的负重游泳法, 通过多次预实验对实验的具体参数进行改良和确定的, 足底电击强度为 0.8 mA, 每次 20 s, 休息时间 5 s, 设定刺激频率为每天 600 次, 同时, 每天在足底电击的基础上结合负重游泳疲劳刺激, 将小鼠尾部绑铅块 (每只 1 g) 使其负重游泳, 当小鼠的整个身体沉入水面超过 3 s 或/和头部出现连续没入水面以下 3 次时, 停止负重游泳刺激。造模时间共为 30 天, 行为学评估及样本采集造模后第二天开始, 并在 1 周内完成。

慢性不可预知刺激造模共计 30 天, 每天随机选择一种造模方式, 笼子 45°倾斜, 空笼, 禁食, 禁水, 湿垫料, 光照均为 1 天, 4 ℃冷水浴 5 min, 鼠笼摇晃 30 min, 50 mL 离心管中 6 h。

小鼠造模前适应 1 周, 共造模 30 天, 在造模的第 17 天开始边造模边给药, 共给药 14 天, 结束后开始行为学分析及取材。帕罗西汀给药组验证: 帕罗西汀给药组小鼠腹腔注射帕罗西汀 10 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, 模型组给予同等剂量的生理盐水。以方测证: 归脾汤组小鼠连续 14 天灌胃归脾汤 2.5 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$。

抑郁症疾病模型的评价

一般状态观察 每天上午 9:00 加食物与水, 记录食物的重量及水的体积, 次日 9:00 记录剩余量, 计算小鼠 24 h 进食量和饮水量。每日称量体重。

蔗糖偏好实验 (sucrose preference test, SPT) 小鼠单笼饲养, 准备期: 第一天, 给予小鼠 2 瓶 1% 蔗糖水; 第二天, 1 瓶 1% 蔗糖水, 1 瓶纯水; 第三天, 禁食禁水。测试期: 每只鼠给予等量的纯水和 1% 蔗糖水, 12 h 更换一次水瓶位置, 记录 1 天的蔗糖水和纯水消耗量。糖水偏好 (%) = 蔗糖水的消耗量 / (水的消耗量 + 蔗糖水的消耗量) × 100%。

开放旷场实验 (open field test, OFT) 在一个敞口的正方形白色箱子 (50 cm× 50 cm× 50 cm) 中进行, 箱子底部中间 1/4 的区域 (25 cm× 25 cm) 被定义为中心区域, 顶部安装摄像机记录小鼠运动轨迹。实验开始前, 将旷场放置在一个安静的环境中, 并用酒精消除旷场内气味对小鼠的影响。实验开始时, 将小鼠放入旷场箱中, 拍摄 6 min。每只小鼠记录完清扫粪便、尿液, 消除气味。分析小鼠在箱内后 4 min 的运动轨迹、运动距离、进入中心的时间及次数。

悬尾实验 (tail suspension test, TST) 用胶带粘住鼠尾 1/3 处, 将小鼠粘于距离地面 25 cm 的高处, 在小鼠正前方摆设摄像装置, 拍摄 6 min, 分析小鼠后 4 min 的活动情况, 统计小鼠静止不动的时间。

强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 在一个圆柱形透明玻璃桶 (直径 15 cm) 进行, 向桶中注入 23～25 ℃的纯水, 水深至小鼠尾尖无法触及桶底即可 (约 16 cm)。玻璃桶正前方放置摄像装置, 拍摄 6 min, 分析小鼠后 4 min 的挣扎情况, 统计小鼠静止不动的时间。

神经递质的检测 通过超高效液相色谱−三重四级杆串联质谱法 (UHPLC-Q-triple-MS/MS) 技术分析小鼠脑组织及血清中的五羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA) 及谷氨酸 (glutamate, Glu) 等内源性神经递质的含量变化。

样品的制备 将小鼠先进行麻醉, 解剖取脑、摘眼球后取血。脑组织和血清保存在−80 ℃冰箱。① 将小鼠脑组织从−80 ℃的冰箱迅速取出, 待脑组织样品解冻后, 使用滤纸吸干净组织表面水分, 称量, 加入 2 倍体积预冷生理盐水, 随后加入 2 粒锆珠, 匀浆 2 min。② 将血清从−80 ℃的冰箱迅速取出, 待样品解冻后取 100 μL 于 EP 管中。将脑组织匀浆液和血清在 4 ℃下离心 (3 500 $r\cdot min^{-1}$) 15 min, 结束后取上清。加入 380 μL 乙腈和 20 μL 内标标准液。在 4 ℃冰箱中静置 30 min, 随后在 4 ℃下离心 (16 000 $r\cdot min^{-1}$) 15 min, 离心结束后取上清液装于进样小瓶中, 暂存于 4 ℃冰箱中保存直至分析。

UHPLC-MS/MS 分析条件 质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI); 离子源温度: 550 ℃; 离子源气体 1: 45 psi; 离子源气体 2: 40 psi; 气帘气 35 psi; 多反应离子监测 (MRM); 入口电压 10 V; 碰撞室出口电压 14 V; 碰撞气 7 psi。Q1、Q3、去簇电压 (declustering potential, DP) 及碰撞能量 (collision energy, CE) 如表 1。

色谱条件: 流动相: A: 0.01% 甲酸水; B: 乙腈, 进样量: 2 μL, 柱温: 40 ℃。梯度如表 2。

心脾两虚证候的检测和客观性评价

舌色分析 造模结束后, 对小鼠的舌头拍照, 对小鼠的舌象图片使用 Image J 软件进行 RGB 分析, 并进

Table 1 Compound mass spectrometry optimization MRM parameters. 5-HT: 5-Hydroxytryptamine; DA: Dopamine; Cor: Corticosterone; APAP: Acetaminophen

Compound	Q1	Q3	Transition	DP/V	CE/eV
5-HT	177.100	160.100	177.100→160.100	70.000	17.000
DA	154.100	137.100	154.100→137.100	60.000	14.000
Cor	374.100	329.400	347.100→329.400	85.00	30.00
APAP	152.000	123.000	152.000→123.000	31.000	14.000

Table 2 Linear gradient elution procedure. A: 0.01% Formic acid-water; B: Acetonitrile

Step	Total time/min	Flow rate/μL·min^{-1}	A/%	B/%
0	0.00	300	70.0	30.0
1	1.50	300	30.0	70.0
2	3.50	300	5.0	95.0
3	4.50	300	5.0	95.0
4	4.60	300	70.0	30.0
5	7.00	300	70.0	30.0

行红色度 r 值计算, $r = R/(R+G+B)$。

小鼠睡眠时象监测　在睡眠检测实验中, 麻醉小鼠后, 减去小鼠头皮, 然后使用颅骨钉将小鼠脑电图 (electroencephalogram, EEG) 电极固定于小鼠头部, 并将两个小鼠肌电 (electromyogram, EMG) 电极插进小鼠两侧颈部肌肉中, 将所有电极连接于监测器上对小鼠的睡眠活动进行监测。根据统一设定的标准扫描记录的信号, 自动判别出wake期、非快速眼动睡眠 (non-rapid eye movement, NREM) 期、快速眼动睡眠 (rapid eye movement, REM) 期, 计算出各自所占时间比。

多普勒超声成像　在行为学实验结束后, 对各组小鼠进行多普勒超声成像。实验前, 先用异氟烷将小鼠麻醉, 然后使用脱毛膏脱去小鼠颈部毛发, 再将小鼠以仰卧姿势固定到超声检查台上, 用棉签均匀地在小鼠颈部抹上耦合剂, 最后用型号为MS-550D的探头寻找颈动脉, 在找到标志性的颈动脉分叉后, 记录叉口前的颈动脉血管直径和平均血流量。

激光散斑脑血流成像　在完成多普勒超声成像实验后, 用脱毛膏将麻醉小鼠头顶部的毛发脱去, 然后将小鼠头部固定在仪器上, 用小剪刀完整地剪去小鼠头皮, 使颅骨完全暴露, 用沾有生理盐水的棉签仔细除去露骨表面附着的组织, 并保持露骨表面湿润。将激光散斑脑血流成像仪置于小鼠头顶部, 记录小鼠脑血流量。

脾脏指数检测　先将小鼠称重, 随后取出脾脏进行称重, 脾脏指数 = 脾脏重量 (mg) / 小鼠体重 (g)。

试剂盒检测　所有试剂盒均按照说明书进行操作。

统计学分析　所有数据均使用GraphPad Prism 8.0.2软件进行分析, 并以mean ± SEM表示, 组间比较采用单因素或双因素方差分析后使用邓尼特的多重比较, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结果

1　改良足底电击结合负重游泳法建立的抑郁症模型的评价

1.1　宏观表征观察

结果如图1A～C显示, 与control组相比, M1和M2组小鼠体重及摄食增幅均降低, 且分别在造模第18天, M2组小鼠与空白组小鼠体重增幅和摄食增幅开始出现显著性差异 ($P < 0.05$), 并未发现各组小鼠饮水量具有明显改变。

1.2　行为学测试

1.2.1　蔗糖偏好实验

结果如图1D所示, 与control组相比, M1和M2组小鼠糖水偏好降低 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀治疗后, 小鼠糖水偏好指数显著上升 ($P < 0.05$)。

1.2.2　悬尾与强迫游泳实验

结果如图1E、F所示, 与control组相比, M1及M2组小鼠悬尾及强迫游泳的不动时间升高 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 帕罗西汀治疗后, 两组小鼠的不动时间回调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

1.2.3　开放旷场实验

结果如图1G～J所示, 造模及给药前后, 各组小鼠运动的总距离无明显变化, 而与control组相比, M1和M2组小鼠进入中心的时间和次数都显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 给予帕罗西汀后, P1和P2组小鼠进入中心的时间和次数都显著回调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

1.3　神经递质的检测

结果如图2所示, 与control组相比, M1和M2组小鼠脑和血清中的5-HT和DA含量下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 给予帕罗西汀后P1和P2组小鼠脑和血清中的5-HT和DA含量回调 ($P < 0.05$), 而M1和M2组小鼠脑及血清中Cor含量上升 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 帕罗西汀治疗后Cor含量下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2　改良足底电击结合负重游泳法建立的抑郁症模型心脾两虚证候的评价

2.1　舌象 r 值

结果如图3A、B所示, 与control组小鼠相比, M2组小鼠的舌象红色度相比于空白组小鼠显著降低 ($P < 0.05$), M1组小鼠的舌象红色度无明显变化, 经过帕罗西汀腹腔注射给药后, P2组小鼠舌象红色度有所提升, 但无显著性。

2.2　小鼠睡眠时相监测结果

结果如图3C～E所示, 与control组相比, M1及M2组小鼠的wake期所占百分比显著上升 ($P < 0.05$), 而REM及NREM期所占百分比都显著下降 ($P < 0.05$),

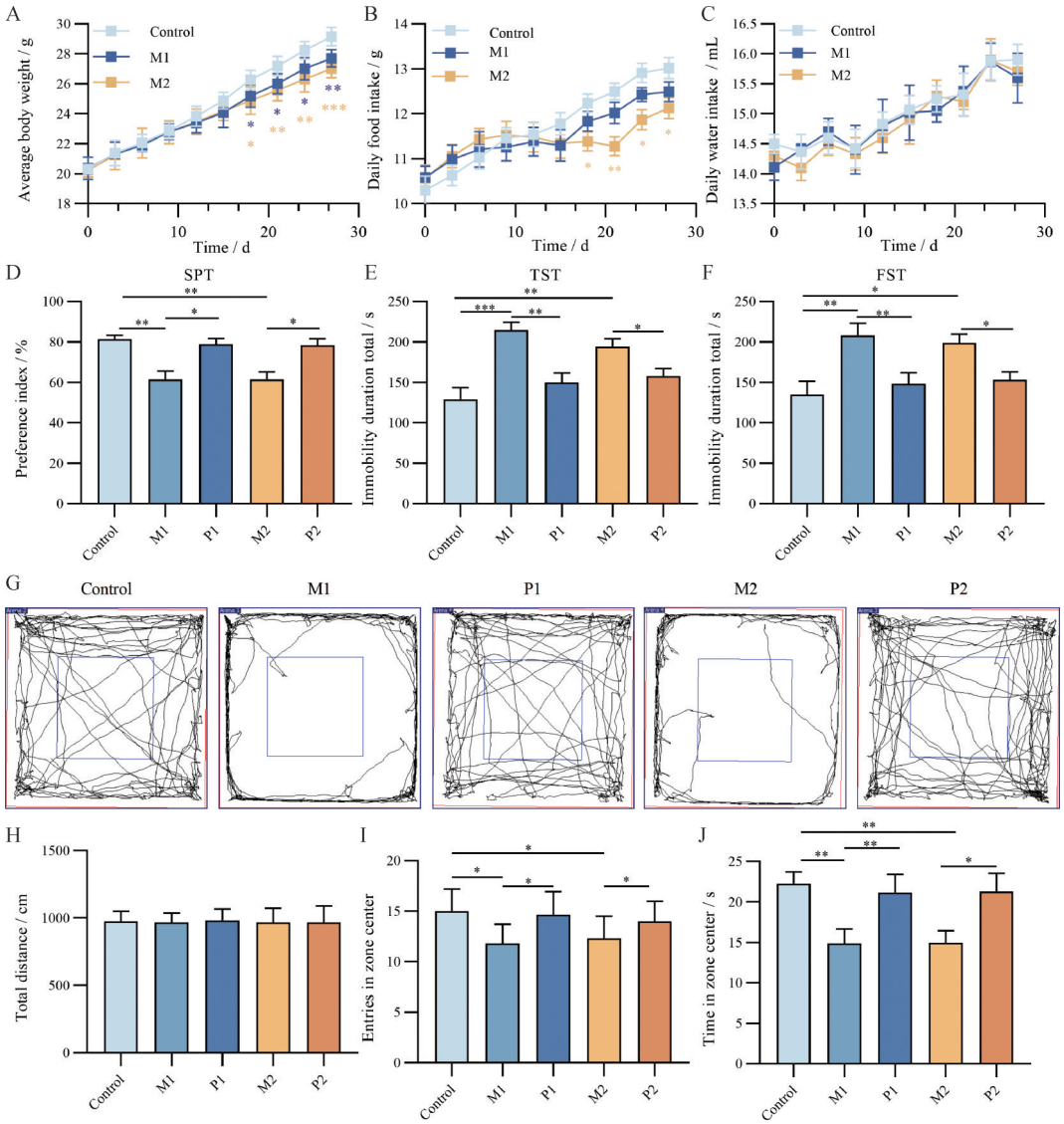


Figure 1 General condition observation and behavioral results of mouse. A: Dynamic recording of mouse body weight; B: Dynamic recording of mouse food intake; C: Dynamic recording of mouse water intake. n = 9, mean ± SEM (ANOVA is two-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control; D: Mouse sucrose preference test (SPT); E: Tail suspension test (TST) immobility time; F: Forced swimming test (FST) immobility time; G: Open field test (OFT) mouse trajectory heat map; H: Total distance traveled by mice in the OFT; I: Number of entries into the center by mice in the OFT; J: Time spent in the center by mice in the OFT. M1: Chronic unpredictable mild stress; M2: Electic foot-shock combined with weight-loaded swimming; P1: Chronic unpredictable mild stress with with paroxetine treatment; P2: Electic foot-shock combined with weight-loaded swimming with paroxetine treatment. n = 9, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

而经过帕罗西汀治疗后, 小鼠各个睡眠时期所占百分比都有不同程度的回调。

2.3 血流动力学结果

2.3.1 颈动脉超声

结果如图4A～D显示, 与control组相比, M1和M2组小鼠颈动脉平均血流速度、收缩期及舒张期血管径均显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 经帕罗西汀治疗后小鼠颈动脉平均血流速度、收缩期及舒张期血管径均显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3.2 心脏超声

结果如图4E、F, 与control组小鼠相比, M1、M2组小鼠左心室射血分数减少 ($P < 0.05$), 且M2组更明显 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀治疗后, 两组小鼠左心室射血分数均得到提高 ($P < 0.05$)。

2.3.3 激光散斑脑血流成像结果

结果如图4G、H所示, 与control组相比, M1、M2组小鼠脑血流速度降低 ($P < 0.05$), 且M2组更明显 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀治疗后, 小鼠脑血流均值得到

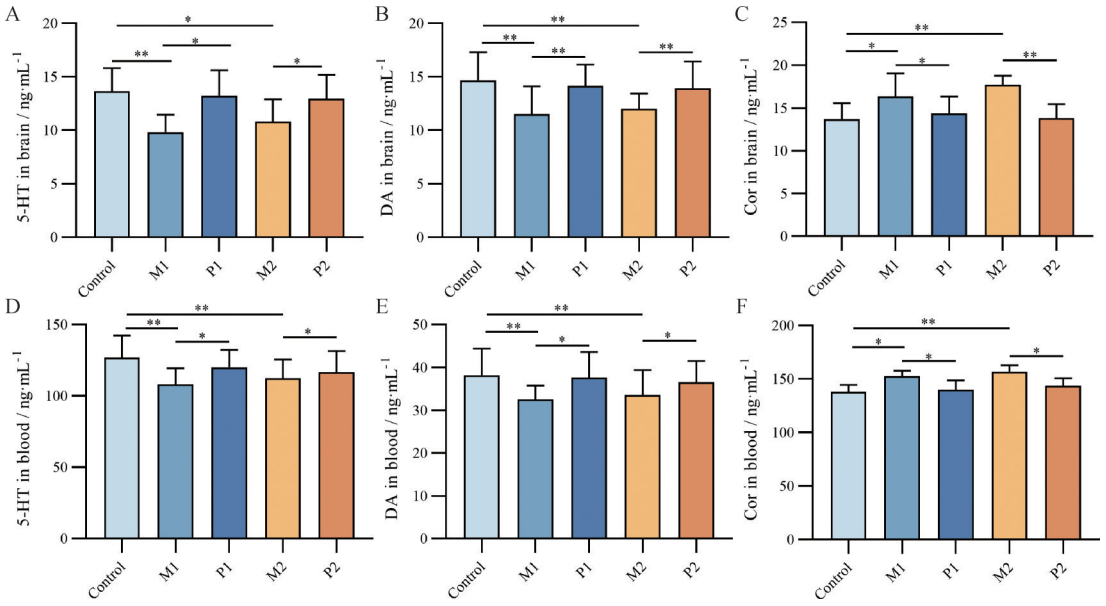


Figure 2 Detection of neurotransmitters in mouse brain tissue and serum. A: 5-HT levels in mouse brain tissue; B: DA levels in mouse brain tissue; C: Cor levels in mouse brain tissue; D: 5-HT levels in mouse serum; E: DA levels in mouse serum; F: Cor levels in mouse serum. n = 9, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

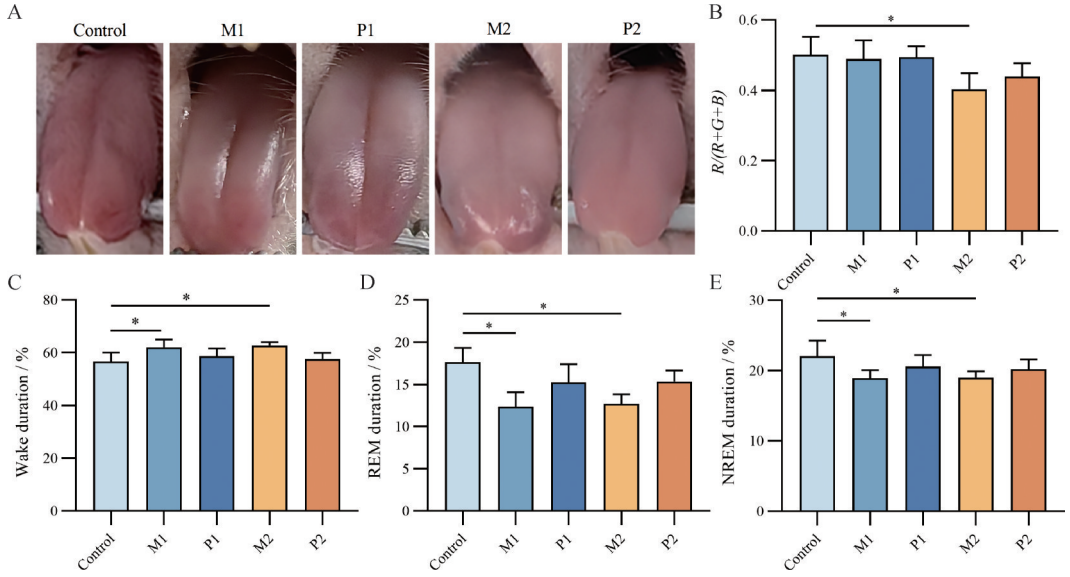


Figure 3 Tongue manifestation and sleep phase detection results of mouse. A: Tongue image of mouse; B: Quantitative results of the red intensity of the tongue manifestation in mouse; C: Time spent in the wake phase of mouse; D: Time spent in the rapid eye movement (REM) phase of mouse; E: Time spent in the non-rapid eye movement (NREM) phase of mouse. n = 9, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$

改善 ($P < 0.05$)。

2.4 脾脏指数

结果如图5A所示, 与control组相比, M2组小鼠脾脏指数降低 ($P < 0.05$), 经帕罗西汀治疗后, P2组小鼠脾脏指数有升高趋势, 但未出现显著性差异。

2.5 心肌组织的氧化应激

结果如图5B、C所示, 与control组相比, M1和M2组小鼠心肌中的SOD含量下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而MDA含量上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且M2组均更明显。经过帕罗西汀给药后, P1和P2组小鼠SOD、MDA含量得到明显改善 ($P < 0.05$)。

2.6 *D*-Xylose吸收实验及血清GAS含量测定

结果如图5D、E所示, 与control组相比, M2组小鼠血清中*D*-xylose及GAS含量降低 ($P < 0.05$), 而M1组小鼠无明显变化。且经阳性药帕罗西汀治疗后, P2组小鼠血清中*D*-xylose及GAS含量仅有回调趋势, 但

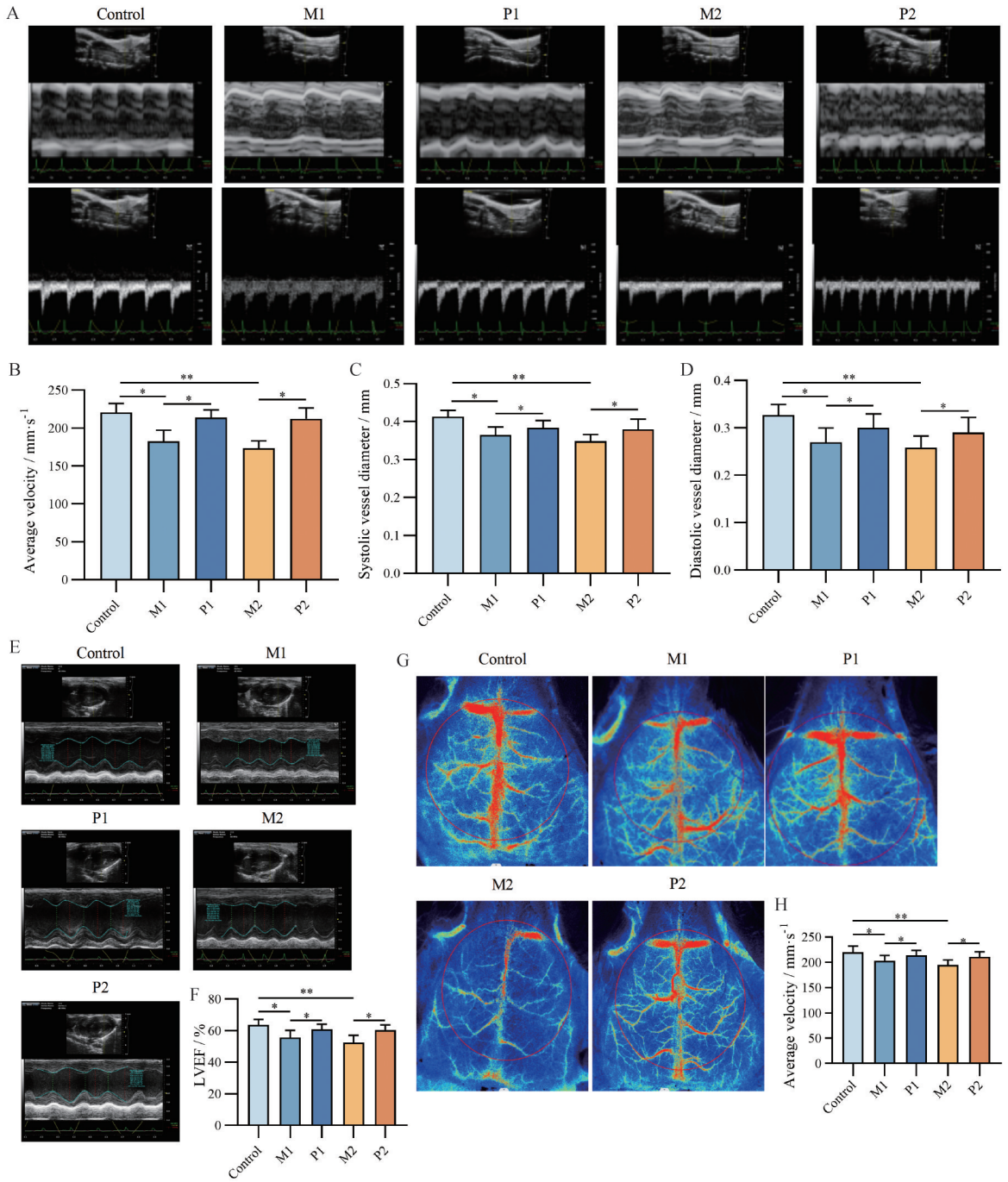


Figure 4 Hemodynamic results in mouse. A: Ultrasound imaging of mouse carotid artery; B: Average blood flow velocity in mouse carotid artery; C: Systolic vascular diameter of mouse carotid artery; D: Diastolic vascular diameter of mouse carotid artery; E: Ultrasound imaging of mouse heart; F: Left ventricular ejection fraction (LVEF) in mouse heart; G: Laser speckle brain blood flow imaging of mice in each group; H: Average brain blood flow velocity in mice. n = 9, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

无明显差异。

3 方剂反证

3.1 归脾汤治疗后的宏观表征观察

结果如图6A～C所示, 与control组相比, model组小鼠体重及摄食增幅均降低, 且分别在造模第18和21天, 摄食量增幅和体重增幅开始出现明显降低 ($P < 0.05$), 小鼠饮水量无明显变化。经过归脾汤治疗后, 小鼠体重及摄食增幅在造模第21天出现明显回调 ($P < 0.05$), 而帕罗西汀给药后的小鼠体重在第21天出现明显回调 ($P < 0.05$), 摄食增幅相比于model组只有回调趋势, 没有统计学意义。

3.2 归脾汤治疗后的行为学测试

3.2.1 归脾汤治疗后的蔗糖偏好实验

结果如图6D所示, 与control组相比, model组小

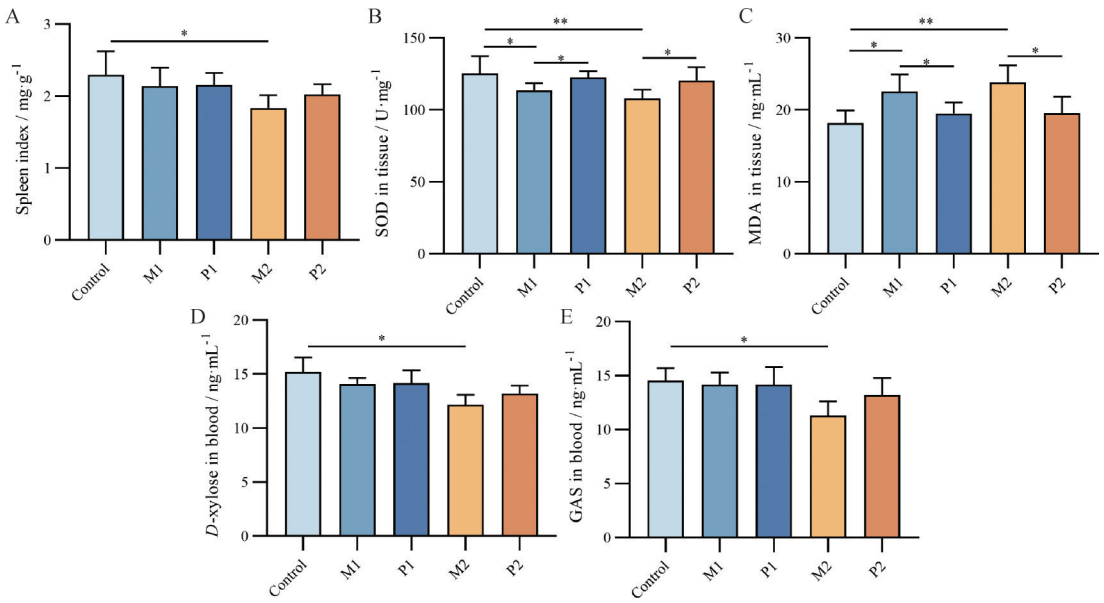


Figure 5 Spleen index (A), superoxide dismutase (SOD, B) and malondialdehyde (MDA, C) levels in myocardial tissue, and *D*-xylose (D) and gastrin (GAS, E) levels in serum of mice. $n = 9$, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

鼠糖水偏好显著下降 ($P < 0.01$), 经阳性药和归脾汤治疗后, 小鼠糖水偏好显著回调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.2.2 归脾汤治疗后的悬尾实验与强迫游泳实验

结果如图6E、F所示, 与control组相比, model组小鼠强迫游泳和悬尾的不动时间显著升高 ($P < 0.01$), 经阳性药和归脾汤治疗后, 小鼠强迫游泳和悬尾的不动时间显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.2.3 归脾汤治疗后的开放旷场实验

结果如图6G～J所示, 造模及给药前后, 各组小鼠运动的总距离无明显变化, 而与control组相比, model组小鼠进入中心的时间和次数都下降 ($P < 0.001$, $P < 0.01$), 经阳性药和归脾汤治疗后, 小鼠进入中心的时间和次数都明显回调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.3 归脾汤治疗后的神经递质的检测

结果如图7所示, 与control组相比, model组小鼠脑组织和血清中的5-HT和DA含量显著下降 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀和归脾汤治疗后, 小鼠脑组织和血清中的5-HT和DA含量显著上升 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。同时, model组小鼠脑组织及血清中Cor含量显著上升 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀和归脾汤治疗后Cor含量显著下降, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.4 归脾汤治疗后的心脾两虚证候评价

3.4.1 归脾汤治疗后的舌象*r*值

结果如图8A、B所示, 通过对各组小鼠舌象对比实验结果可以发现, 经过改良足底电击结合负重游泳法刺激后, model组小鼠的舌象红色度相比于control组小鼠显著降低 ($P < 0.01$), 经过归脾汤治疗后, 小鼠舌象红色度有所改善 ($P < 0.05$), 而帕罗西汀给药后的小鼠舌象红色度相比于model组只有上升趋势, 没有统计学意义。

3.4.2 归脾汤治疗后的睡眠时相监测结果

结果如图8C～E所示, 与control组相比, model组小鼠的wake期所占百分比都显著上升 ($P < 0.01$), REM及NREM期所占百分比都显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而经过帕罗西汀和归脾汤给药后小鼠各个睡眠时期所占百分比都有不同程度的回调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且归脾汤对wake期回调效果更好。

3.4.3 归脾汤治疗后的血流动力学结果

3.4.3.1 归脾汤治疗后的颈动脉超声 结果如图9A～D所示, 与control组相比, model组鼠收缩期和舒张期血管径均出现显著降低 ($P < 0.01$), 同时平均血流速度明显降低 ($P < 0.01$); 经帕罗西汀和归脾汤治疗后, 小鼠收缩期、舒张期血管径和平均血流速度均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且归脾汤效果更好。

3.4.3.2 归脾汤治疗后的心脏超声 结果如图9E、F显示, 与control组相比, model组小鼠射血分数减少 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀和归脾汤治疗后, 小鼠射血分数升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且归脾汤效果更好。

3.4.3.3 归脾汤治疗后的激光散斑脑血流成像 结果如图9G、H所示, 与control组相比, model组小鼠脑血流均值显著降低 ($P < 0.01$), 经帕罗西汀和归脾汤治疗后, 小鼠脑血流均值得到改善 ($P < 0.05$)。

3.4.4 归脾汤治疗后的脾脏指数

结果如图10A所示, 经过改良足底电击结合负重

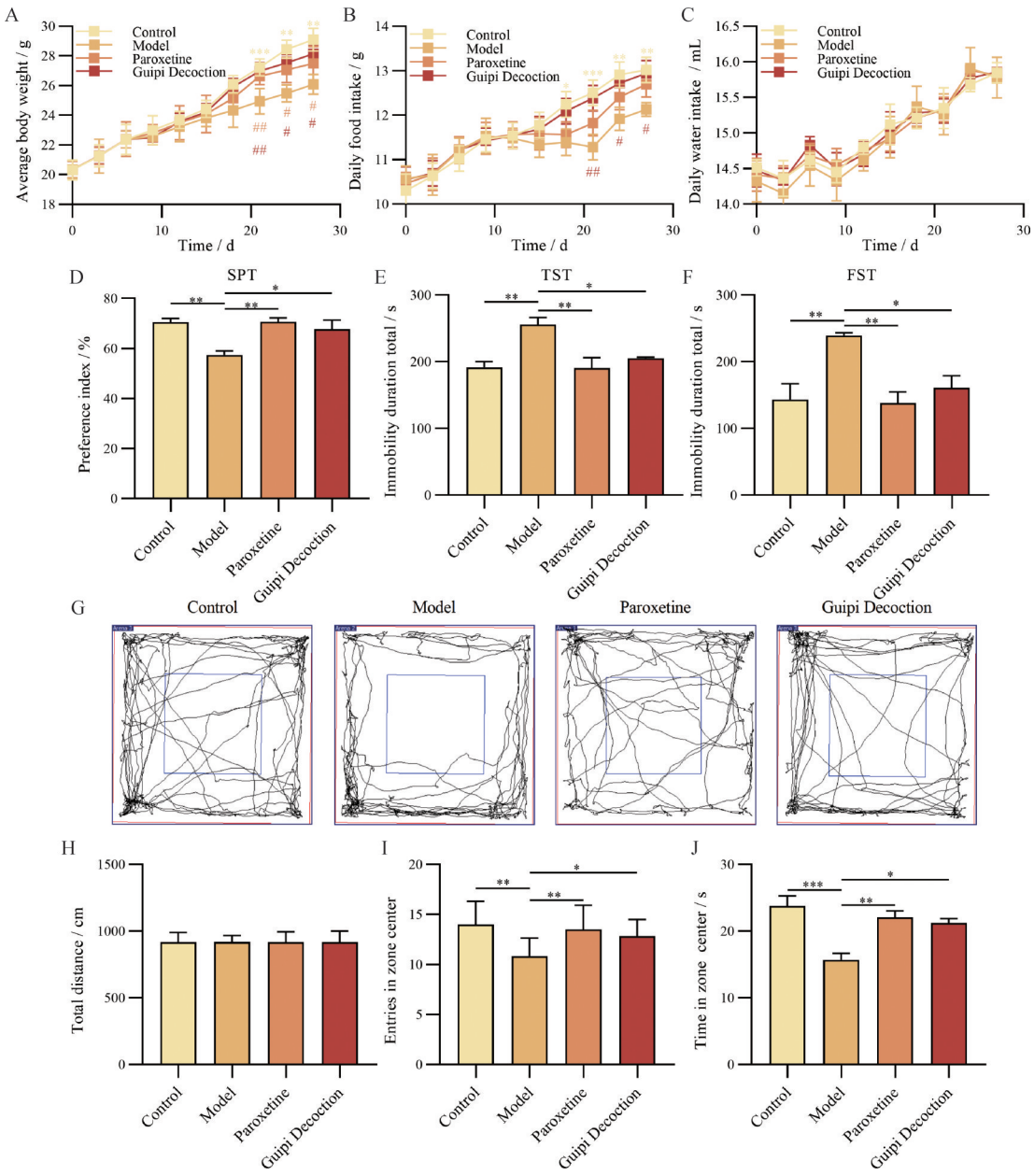


Figure 6 General condition observation and behavioral results of mouse after Guipi Decoction administration. A: Dynamic recording of mouse body weight; B: Dynamic recording of mouse food intake; C: Dynamic recording of mouse water intake. n = 10, mean ± SEM (ANOVA is two-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* model; D: Mouse SPT; E: TST immobility time; F: FST immobility time; G: OFT mouse trajectory heat map; H: Total distance traveled by mice in the OFT; I: Number of entries into the center by mice in the OFT; J: Time spent in the center by mice in the OFT. n = 10, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

游泳法造模刺激后, model组小鼠脾脏指数低于control组小鼠, 具有统计学差异 ($P < 0.01$), 经归脾汤治疗后, 小鼠脾脏指数显著提高 ($P < 0.05$), 而帕罗西汀治疗后的小鼠未出现显著性差异。

3.4.5 归脾汤治疗后的心肌组织的氧化应激

结果如图10B、C显示, 与control组小鼠相比, model组小鼠心肌中的SOD含量下降 ($P < 0.05$), 而MDA含量上升 ($P < 0.01$), 经过帕罗西汀和归脾汤治疗后, 小鼠SOD、MDA含量得到明显改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.4.6 归脾汤治疗后的 *D*-xylose 及 GAS 试剂盒检测结果

结果如图10D、E所示, 与control组小鼠相比, model组小鼠血清中*D*-xylose及GAS含量降低 ($P < 0.01$), 经归脾汤治疗后, 小鼠血清中*D*-xylose及GAS含量显著升高 ($P < 0.05$), 而帕罗西汀治疗的小鼠只有升高趋势没有统计学意义。

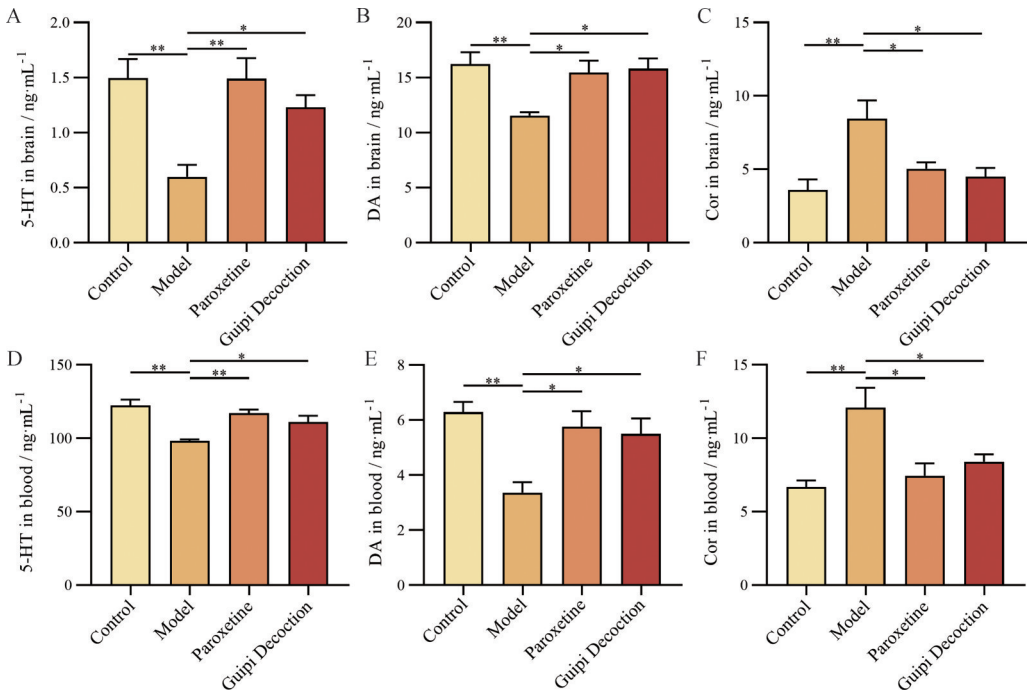


Figure 7 Detection of neurotransmitters in mouse brain tissue and serum after Guipi Decoction administration. A: 5-HT levels in mouse brain tissue; B: DA levels in mouse brain tissue; C: Cor levels in mouse brain tissue; D: 5-HT levels in mouse serum; E: DA levels in mouse serum; F: Cor levels in mouse serum. n = 10, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

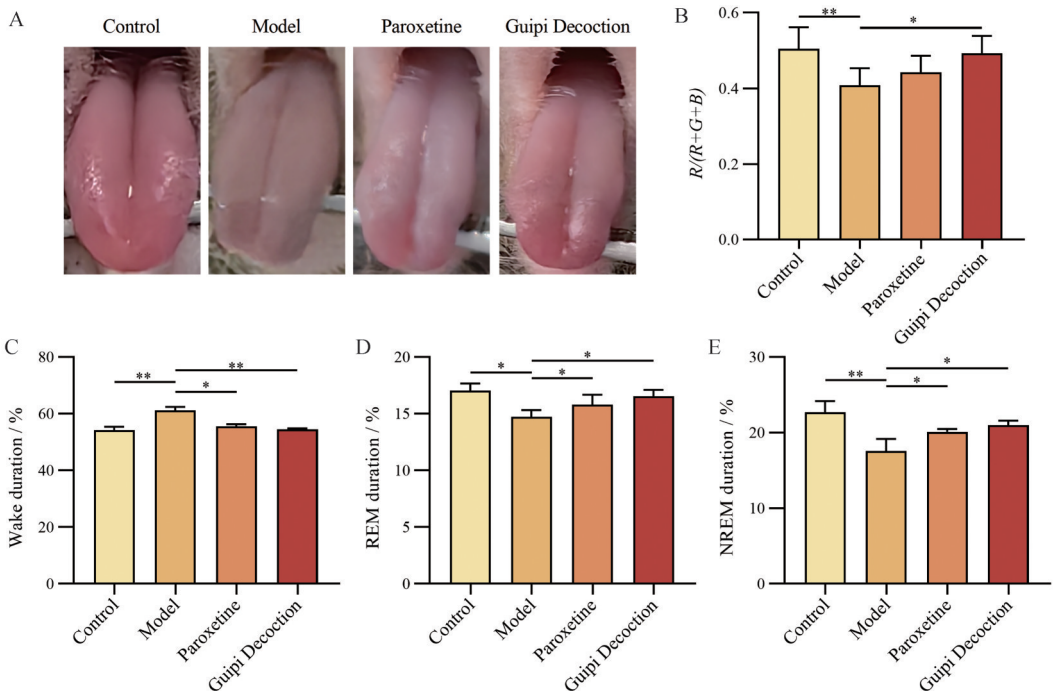


Figure 8 Tongue manifestation and sleep phase detection results of mouse after Guipi Decoction administration. A: Tongue image of mouse; B: Quantitative results of the red intensity of the tongue manifestation in mouse; C: Time spent in the wake phase of mouse; D: Time spent in the REM phase of mouse; E: Time spent in the NREM phase of mouse. n = 10, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

讨论

劳倦过度、压力过大等因素往往是现代人产生焦虑、抑郁等情绪的重要因素, 同时, 心脾两虚证是抑郁症的常见证型之一。因此, 本研究采用足底电击法结合负重游泳作为造模方式, 以足底电击为压力源, 伤心气及心血, 对造模小鼠产生身体和心理的双重作用, 并

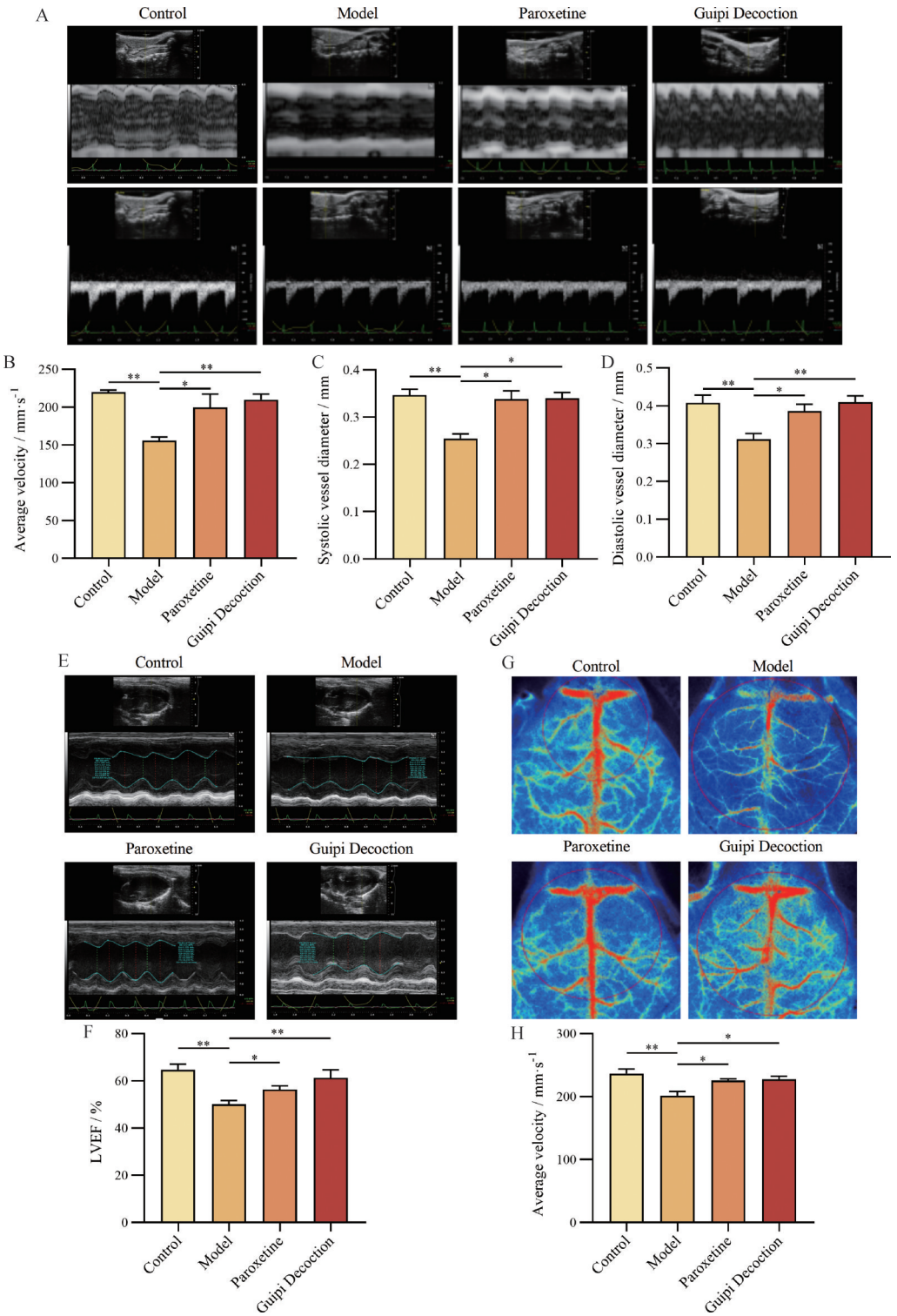


Figure 9 Hemodynamic results in mouse after Guipi Decoction administration. A: Ultrasound imaging of mouse carotid artery; B: Average blood flow velocity in mouse carotid artery; C: Systolic vascular diameter of mouse carotid artery; D: Diastolic vascular diameter of mouse carotid artery; E: Ultrasound imaging of mouse heart; F: LVEF in mouse heart; G: Laser speckle brain blood flow imaging; H: Average brain blood flow velocity in mice. n = 10, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

在此基础上, 结合劳心伤脾的负重游泳的复合方式进行造模, 这种多因素复合的造模方式模拟了疾病发生的病理过程。此外, 单一的补气或补血方剂往往是针对某一特定方面进行干预, 很难全面反映心脾两虚证候的复杂性。归脾汤体现了气血互根互用原则, 更符合该模型证候的验证。因此, 本研究采用归脾汤作为反向验证心脾两虚证候模型的阳性对照。

本研究从抑郁症相关指标及心脾两虚证候等两个

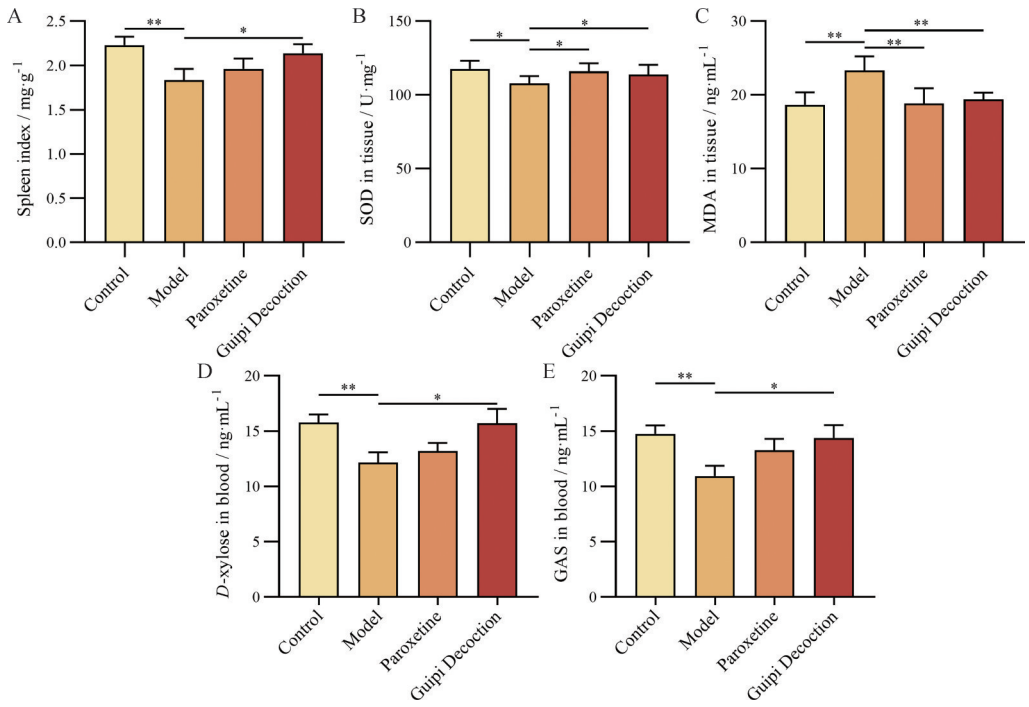


Figure 10 Spleen index (A), SOD (B) and MDA (C) levels in myocardial tissue, and *D*-xylose (D) and GAS (E) levels in serum of mice after Guipi Decoction administration. n = 10, mean ± SEM (ANOVA is one-way analysis of variance). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

维度来综合评价此实验动物模型。神经行为学结果显示, 复合诱导模型组小鼠糖水偏好指数、悬尾及游泳不动时间明显下降, 出现明显的抑郁样症状。而旷场实验显示, 模型小鼠进入中心的时间和次数明显减少, 说明小鼠有明显的抑郁伴焦虑样行为。此外, 脑与血清中与情绪相关的5-HT[17]和DA[18]含量降低, 反映压力水平的Cor[19]含量增加。通过行为学结果结合神经递质的变化可以说明, 改良足底电击结合负重游泳成功构建了小鼠抑郁模型。

中医学认为, 心主血脉, 脾主运化。因此, 本研究不仅通过小鼠心脏超声和脾脏指数来评估心脾两虚证候, 还引入了心肌氧化应激以及评估消化道吸收功能的*D*-xylose和GAS等量化指标[20,21]。研究显示, 足底电击会通过影响机体HPA轴功能及氧化应激导致心气耗损[22,23], 而负重游泳则会导致脾失健运表现为*D*-xylose及GAS含量的下降[24]。结果显示, 复合诱导模型小鼠心脑血管及消化道功能明显下降。此外, 通过“四诊合参”将辨病与辨证相结合来评估模型的证候[25], 采用前期优化的方法[26]将小鼠舌色进行量化, 模型组舌象r值均显著低于空白组, 舌色变淡, 为气血不足[27], 脾虚之相, 且模型组小鼠食欲大幅下降, 精神疲惫、反应迟钝且有失眠的症状。根据《中医病证诊断疗效标准》郁病的分型标准, 与心脾两虚证心悸失眠、舌质淡、倦怠、食欲不振和情志抑郁的表型相符[28], 说明两种复合诱导方式造成了小鼠心脾两虚。

在验证实验中, 通过评估抗抑郁药物帕罗西汀逆转小鼠的抑郁状态验证了抑郁模型的构建; 此外, 采用治疗心脾两虚证的经典方剂归脾汤反证, 经过归脾汤的治疗后, 不仅小鼠的抑郁伴焦虑样行为得到明显改善, 且小鼠心脾两虚证候指标均有明显回调, 确证了心脾两虚型抑郁症模型小鼠的建立。

综上所述, 本研究通过改良足底电击结合负重游泳法造模成功制备心脾两虚型抑郁症动物模型, 并从两个维度提供了系统的评价方法, 为研究心脾两虚型抑郁症提供了新的选择。与常用CUMS抑郁模型相比, 这是一种病症结合的模型, 有助于为今后研究心脾两虚型抑郁症的发病机制和开发更具针对性的防治药物, 而该模型成模时间较CUMS模型长。尽管具有局限性, 本模型也为今后病证结合动物模型的开发与建立提供了借鉴和参考。

作者贡献: 宋永贵负责实验总体设计及稿件修改; 张文豪、薛冰负责实验操作和文章撰写及修改; 朱根华、杨明提供了方法理论建议; 李前民、梁慧慧、刘亚丽提出了修改建议及负责部分实验操作; 艾志福、平欲晖、苏丹指导了部分实验、提供了方法理论建议。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Park HS, Kim J, Ahn SH, et al. Epigenetic targeting of histone deacetylases in diagnostics and treatment of depression [J]. Int J

Mol Sci, 2021, 22: 5398.

[2] Ikram H, Haleem DJ. Repeated treatment with reserpine as a progressive animal model of depression [J]. Pak J Pharm Sci, 2017, 30: 897-902.

[3] Brachman RA, McGowan JC, Perusini JN, et al. Ketamine as a prophylactic against stress-induced depressive-like behavior [J]. Biol Psychiatry, 2016, 79: 776-786.

[4] Wang W, Liu W, Duan D, et al. Chronic social defeat stress mouse model: current view on its behavioral deficits and modifications [J]. Behav Neurosci, 2021, 135: 326-335.

[5] Song Y, Lai M, Liao Z, et al. Saikosaponin antidepressant mechanism: improving the sphingolipid metabolism in the cortex *via* apolipoprotein E and triggering neurovascular coupling [J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155829.

[6] Meng YL, Hu LL, Zhang YH, et al. Study on early intervention of insomnia in depression treated by TCM syndrome differentiation treatment [J]. China Mod Doct (中国现代医生), 2024, 62: 16-20.

[7] Hong J, Cai XJ, Li SY, et al. Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Decoction on sEH expression in liver of rats with liver depression and Qi stagnation syndrome of depression [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2024, 26: 12-17.

[8] Huang Q, Dai L, Li P, et al. Clinical effect of modified Tianma-Gouteng Decoction in the treatment of hypertension with hyperthyroidism of liver Yang combined with anxiety and depression [J]. China Mod Med (中国当代医药), 2023, 30: 135-138.

[9] Su D, Li J, Zhu GH, et al. Establishment and evaluation methods of a novel animal model of liver depression transforming into fire syndrome-related depression [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 1680-1690.

[10] Ding FM, Chen JX, Zou XJ, et al. Research progress on traditional Chinese medicine syndrome animal models of depression [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2019, 34: 245-247.

[11] McIntyre RS, Jain R. Glutamatergic modulators for major depression from theory to clinical use [J]. CNS Drugs, 2024, 38: 869-890.

[12] Xie Z, Xie H, Peng X, et al. The antidepressant-like effects of Danzhi Xiaoyao San and its active ingredients [J]. Phytomedicine, 2023, 119: 155015.

[13] Qian RR, Zhu YF. Clinical study on the treatment of chronic fatigue syndrome with insomnia and deficiency of both heart and spleen using Gui Pi Decoction [J]. Guangming J Chin Med (光明中医), 2024, 39: 2975-2978.

[14] Chen MT, Huang RL, Ou LJ, et al. An analysis of the impact of anxiety on patients with coronary heart disease and diagnostic and treatment approaches based on the concept of "when frightened, Qi becomes disordered" in the Huangdi Neijing (The Yellow Emperor's Inner Canon) [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2017, 44: 1146-1147.

[15] Haj-Mirzaian A, Ostadhadi S, Kordjazy N, et al. Opioid/NMDA receptors blockade reversesthe depressant-like behavior of foot shock stress in the mice forced swimming test [J]. Eur Jpharmacol, 2014, 735: 26-31.

[16] Xu L, Song WT, Han B, et al. Study on Qi-supplementing and mind-tranquilizing efficacy of Ling-Qi-Jia Oral Solution on heart-spleen deficiency mouse [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术−中医药现代化), 2015, 17: 1361-1366.

[17] Jauhar S, Cowen PJ, Browning M. Fifty years on: serotonin and depression [J]. J Psychopharmacol, 2023, 37: 237-241.

[18] Speranza L, di Porzio U, Viggiano D, et al. Dopamine: the neuromodulator of long-term synaptic plasticity, reward and movement control [J]. Cells, 2021, 10: 735.

[19] Hellhammer DH, Wust S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research [J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34: 163-171.

[20] Mansoori B, Rogiewicz A, Slominski BA. The effect of canola meal tannins on the intestinal absorption capacity of broilers using a *D*-xylose test [J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2015, 99: 1084-1093.

[21] Moshal MG, Broitman SA, Zamcheck N. Gastrin and absorption. A review [J]. Am J Clin Nutr, 1970, 23: 336-342.

[22] Wu Q, Xu Z, Song S, et al. Gut microbiota modulates stress-induced hypertension through the HPA axis [J]. Brain Res Bull, 2020, 162: 49-58.

[23] Nisar R, Batool Z, Haider S. Electric foot-shock induces neurobehavioral aberrations due to imbalance in oxidative status, stress hormone, neurochemical profile, and irregular cortical-beta wave pattern in rats: a validated animal model of anxiety [J]. Life Sci, 2023, 323: 121707.

[24] Li H, Zhang D, Wang T, et al. Screening the effective components in treating dampness stagnancy due to spleen deficiency syndrome and elucidating the potential mechanism of Poria water extract [J]. Chin J Nat Med, 2023, 21: 83-98.

[25] Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Thoughts and methods of syndrome differentiation on rats and mice [J]. Chin J Comp Med (中国比较医学杂志), 2009, 19: 53-59, 85.

[26] He HW. Study on the Antidepressant Effect of Yueju Pill based on Qi and Blood Circulation (基于气血运行探讨越鞠丸抗抑郁作用研究) [D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine, 2023.

[27] Yao XY, Liang R, Chen DN, et al. Relationship between brightness of tongue color and peripheral red blood cell parameters: a study of 972 cases [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2015, 38: 176-181.

[28] Lin C, Wang GJ, Dai N, et al. Curative effect of Guipi Decoction in adjuvant treatment of heart and spleen deficiency-related depression and its influence on cognitive function of patients [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med (浙江中西医结合杂志), 2023, 33: 617-620.