

平台水环境法构建人类疾病动物模型的应用与思考

王若冲¹, 戴宁¹, 李儒婷¹, 孙硕¹, 贾妍¹, 李杰¹, 李峰^{1*}, 张炜悦^{2*}

(1. 北京中医药大学 中医学院, 北京 102488;

2. 北京中医药大学 护理学院, 北京 102488)

[摘要] 平台水环境法是利用啮齿类动物畏水的特点,强迫实验动物长时间站台而无法休息的一种造模方法。此方法可根据不同类型动物模型的需求,调整其应用的时间与节点进行模型构建。目前,平台水环境法的研究热点集中于睡眠剥夺、焦虑抑郁等精神类疾病及疲劳相关动物模型研究中。近年来,随着中医药现代化的发展,此方法也逐渐应用于以“心”“肝”“脾”为中心的中医证候模型与中医病证结合研究中。因为平台水环境法应用的广泛性与造模疾病的多样性,目前仍缺乏此方法的系统论述。本课题组系统归纳国内、外研究,从发展过程、应用现状及问题与发展3个维度探讨平台水环境法在人类疾病动物模型中的应用,并通过分析热点研究的睡眠剥夺、精神类疾病、疲劳、中医证候模型及中医病证结合模型等不同领域,有针对性的深入讨论平台水环境法在各动物模型建立中的构建思路与具体应用,以期为研究者提供有益参考,进而促进研究者对此进一步的探索与研究。

[关键词] 平台水环境法; 改良多平台水环境法; 病证结合; 疲劳; 睡眠剥夺; 抑郁症; 焦虑症; 狂躁症

[中图分类号] R242;R856.2;R749;R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0205-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222293

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220521.1730.002.html>

[网络出版日期] 2022-05-23 11:33

Application and Thinking of Platform Method in Construction of Animal Model of Human Disease

WANG Ruochong¹, DAI Ning¹, LI Ruting¹, SUN Shuo¹, JIA Yan¹, LI Jie¹,
LI Feng^{1*}, ZHANG Weiyue^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. School of Nursing, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] Platform method is a modeling method that forces experimental animals to stand on the platforms for a long time without rest by taking advantage of the rodent's fear of water. The application time and node of platform method in model construction can be adjusted according to the needs of different types of animal models. At present, the research hotspot of platform method focuses on constructing animal models of sleep deprivation, anxiety and depression and other mental diseases as well as fatigue. In recent years, with the development of the modernization of traditional Chinese medicine (TCM), this method has been gradually applied to the study of TCM syndrome model and TCM disease and syndrome combination model with "heart", "liver" and "spleen" as the centers. Due to the extensive application of platform method and the diversity of modeling diseases, there is still a lack of systematic discussion on this method as the core. This paper systematically summarized the research in China and abroad and explored the application of platform method in

[收稿日期] 2022-02-15

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82204978);北京中医药大学基本科研课题(2020-JYB-XJSJJ-032)

[第一作者] 王若冲,在读博士,从事中医病证结合研究,E-mail:wangruochong_bucm@163.com

[通信作者] *李峰,博士,主任医师,博士生导师,教授,从事中医病证结合研究,E-mail:lifeng95@vip.sina.com;

*张炜悦,博士,讲师,从事中医病证结合基础研究,E-mail:zhangweiyue@bucm.edu.cn

animal models of human diseases from three dimensions: its development process, current application and problems and future development. In addition, through the analysis of the research hotspots on sleep deprivation, mental diseases, fatigue, TCM syndrome model and TCM disease and syndrome combination model, the ideas and specific applications of platform method in construction of various animal models were discussed. This paper was expected to provide reference for researchers and promote further exploration and research of this modeling method.

[Keywords] platform technique; modified multiple platform method (MMPM); traditional Chinese medicine (TCM) disease and syndrome combination; fatigue; sleep deprivation; depression; anxiety; mania

平台水环境法,又称水面平台法、水环境小平台法,将实验动物放置在1个或多个狭窄的小平台上,平台设立在底部盛有水的箱子内,从而对实验动物进行强迫站立的一种造模方法^[1]。平台水环境法起初以猫为模型动物,后应用于啮齿类动物^[2]。此方法主要利用啮齿类动物畏水的生活习性,将其放入至少高于水面1 cm的平台中,大、小鼠可在平台上站立或进入非快速动眼睡眠(NREM),但当其进入快速动眼睡眠(REM)时,全身肌张力降低,引起节律性低头,甚则掉入水中,从而达到异相睡眠剥夺^[3]。平台水环境法经过半个多世纪的研究,已发展3代,即单平台水环境法(SP)、多平台水环境法(MP)、改良多平台水环境法(MMPM)。1965年COHEN等^[4]首次将平台水环境用于啮齿类动物睡眠剥夺的研究,实验将1只大鼠放置在一个倒扣的花盆上,花盆下方充满水从而睡眠剥夺,因为花盆

倒扣后不易固定等原因,之后的研究则制作固定的小平台从而替代花盆。但该造模方法将个体与群体隔离,并限制了实验动物的活动,导致无法避免地增加了束缚等因素,易影响造模结果。因此,研究者在SP的基础上发展出了MP,将水平台的数量由1个增加至多个,但啮齿类动物的数量仍为1只。运用MP法,模型动物可在多个小平台间自由活动,从而减少活动受限因素的影响。但啮齿类动物为群居动物,实验结果或多或少会受到群体隔离的非必要因素影响,故研究者们又在MP的基础上改良并发展出了MMPM^[5],MMPM可减少群体隔离、束缚等压力因素的影响,又可满足多只动物同时进行实验的需求,因此MMPM已成为公认的睡眠剥夺方法之一,也在3种方法中应用最广泛,当大鼠为实验动物时,MMPM小平台常用直径为6.5 cm,当小鼠为实验动物时,小平台常用直径为3 cm^[6]。见表1。

表1 3种平台水环境法造模简介

Table 1 Introduction of three platform technique modeling methods

名称	造模方法	优点	缺点
SP	将1只大鼠/小鼠放入只有1个平台的小水箱内	利用啮齿类畏水特性,达到对实验动物异相睡眠剥夺的目的	空间较小,活动受限,会对实验动物产生束缚的影响
MP	将1只大鼠/小鼠放入含有5个小平台的水箱内	实验动物可自由在多个平台上活动,减少束缚方面的影响	将个体动物从整体中抽离,增加了与睡眠剥夺无关的社会群体隔离的因素
MMPM	将多只大鼠/小鼠(6只以上)放入含有12~15个平台的大水箱内	水箱改为大水箱,进一步消除束缚方面的问题;满足多只啮齿类动物同时实验的需求,减少了社会群体隔离因素的影响	啮齿类动物天生畏水,短时间的连续睡眠剥夺会有一定应激因素的影响

随着人们对平台水环境法的研究逐渐深入,其应用范围从最初的睡眠剥夺领域扩展到精神类疾病、疲劳、中医病证结合等不同领域。然而,针对不同领域运用平台水环境法的具体造模方式有所不同,而文献中针对造模方法的总结多以疾病为核心进行论述,尚缺乏以此造模方式为核心的系统总结与论述。因此,本文旨在概括平台水环境法在不同领域造模的应用并探讨其特色及未来的发展方向,以期研究者提供有益参考,促进此造模方式的

进一步探索。

1 睡眠剥夺

由于人体睡眠剥夺实验涉及诸多问题,近年来国际上已很少以人为受试者进行睡眠剥夺实验^[7],因此合适的睡眠剥夺动物模型在研究中显得尤为重要。平台水环境法的初始应用领域即为睡眠剥夺。国际上认为合格的动物模型应该符合表现效度、构建效度、预测效度3个方面,水环境平台法从这3个方面均被证实可有效剥夺啮齿类动物的

睡眠^[8-9]。研究表明,大鼠每日正常的睡眠时间为12.6 h,小鼠每日正常的睡眠时间为12.1 h^[10-11],为达到睡眠剥夺的效果,啮齿类动物单日睡眠剥夺时长多为14 h以上。研究者可根据研究目的不同,选择不同的睡眠剥夺的时间节点与时间长度进行模型构建。运用水环境平台法的睡眠剥夺可分为连续睡眠剥夺及间断睡眠剥夺(又名选择睡眠剥夺),连续睡眠剥夺常选用的时长为24~96 h,少数实验也可达到7 d^[12];间断睡眠剥夺的单日站台时间多选用

14~20 h,时间节点的跨度可从1周至3个月^[13]。

2 精神类疾病模型/不良情绪模型

睡眠具有重要的保持体内平衡的功能,睡眠剥夺则会对大脑及诸多身体系统产生影响。多项研究表明睡眠剥夺是精神类疾病及不良情绪发生的重要诱因^[14-15]。平台水环境法在精神类疾病的动物模型中以连续睡眠剥夺作为应激源进行造模,可用于抑郁症、躁狂症、焦虑症等精神类疾病的造模。见表2。

表2 平台水环境法建立精神类疾病模型的代表性研究

Table 2 Representative model methods of mental diseases through platform technique

模型	实验动物	水平台使用方法	连续睡眠剥夺时长/h
抑郁	Wistar大鼠	SP,1只/1个平台	96
	ICR小鼠	MMPM,10只/15个平台	168
焦虑	Swiss EPM-M1小鼠	MMPM,8只/12个平台	72
	Wistar大鼠	MMPM,10只/15个平台	96
狂躁	C57BL/6J小鼠	MMPM,7只/12个平台	24
	Swiss albino小鼠	MMPM,6只/12个平台	96

2.1 抑郁模型与焦虑模型 临床上焦虑症和抑郁症虽不是一种疾病,但焦虑与抑郁2种情绪常常共生,研究表明两者具有相关性^[16]。睡眠剥夺可导致焦虑与抑郁的发生^[17],因此应用水环境小平台法进行抑郁及焦虑造模的方法差异较小。如ANDERSEN等^[18]将大鼠放入SP中连续睡眠剥夺96 h后,发现大鼠出现蔗糖水摄入量减少,痛觉衰弱等抑郁表现;MOON等^[19]对小鼠进行168 h的睡眠剥夺,发现强迫游泳实验和悬尾实验中小鼠的静止潜伏期均因睡眠剥夺而增加,提示睡眠剥夺导致了小鼠抑郁行为;并认为小鼠的抑郁行为与促甲状腺激素、5-羟色胺和D₁多巴胺受体表达减少,促甲状腺激素表达增加有相关性。MA等^[20]将采用SP方法对大鼠进行168 h的连续睡眠剥夺,结果显示大鼠在强迫游泳实验及悬尾实验中表现出抑郁样行为,且通过大鼠炎症细胞因子水平升高和丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴过度激活,推测其抑郁机制可能与肠道微生物群及相关宿主代谢的改变有关。

SILVA等^[21]用MMPM法对小鼠分别进行为24 h及72 h的睡眠剥夺,发现睡眠剥夺72 h组暴露于高架十字迷宫的小鼠焦虑样行为增加。PIRES等^[22]对大鼠运用水环境小平台连续96 h睡眠剥夺方法,也成功诱导大鼠出现焦虑情绪,此外,该研究借鉴了大鼠修饰(梳理毛发)次数增多与焦虑情绪有关,从而进一步评估焦虑样行为与睡眠剥夺之间

的关系^[23]。XIE等^[24]用MMPM法对大鼠进行24 h的连续睡眠剥夺,发现大鼠在旷场实验和光暗箱实验中的焦虑样行为增加,且推测其机制可能与杏仁核神经肽S受体mRNA表达水平的上调有关。

2.2 狂躁模型 临床研究表明,睡眠减少或睡眠障碍会诱发和加重狂躁症的发作^[25-26]。2008年,BENEDETTI等^[27]运用水环境小平台法对小鼠进行6、12、24 h的强迫站立,发现12 h组小鼠开始出现暴躁情绪,24 h组小鼠最为明显,并认为此方法可用于小鼠狂躁模型的建立。VALVASSORI等^[28]复制Benedetti实验方法,并在此基础上加入赋形剂与特定药物以验证,结果表明经过24 h睡眠剥夺后的小鼠在旷场实验中自发活动明显增加,实验数据与先前实验显示高度一致性,进一步证明该方法建立狂躁模型的可行性。SAMIRA等^[29]运用MMPM对小鼠进行36 h睡眠剥夺,成功诱导小鼠多动症,这被认为是一种躁狂样行为。该研究认为狂躁是由于连续睡眠剥夺增加了脂质过氧化及DNA的氧化损伤,并导致小鼠额叶皮层,海马体和血清中抗氧化酶的改变。有研究应用MMPM分别对小鼠进行48、72、96 h的睡眠剥夺,结果发现,3组小鼠表现出不同程度的躁狂表现,其中96 h组最为明显^[8]。

3 疲劳

疲劳在生活中的身体感觉和疾病表现有很大程度的重合,因此其定义较为主观。目前尚无统一

的疲劳定义。疲劳可以根据不同的诱因及症状侧重点进行不同纬度的分组,如外周疲劳和中枢疲劳^[30]、躯体疲劳与心理疲劳^[31]等。疲劳的发病机制目前仍不明确,因此在疲劳的研究中建立合适的动物模型尤为重要,从诱因角度上看,平台水环境法

迫使实验动物长时间站立甚则睡眠剥夺可导致疲劳的产生。据报道,平台水环境法可作为主要因素进行不同类型疲劳的造模,如中枢疲劳、心理疲劳、长航疲劳等,平台水环境法建立不同类型疲劳的代表性方法见表3。

表3 平台水环境法建立不同类型疲劳的代表性模型方法

Table 3 Representative model methods of different kinds of fatigue through platform technique

疾病模型	模型动物	水平台使用方法	造模方法
中枢疲劳	Wistar大鼠	SP,1只/1个平台	每日20h站立,持续5d
	Wistar大鼠	MMPM,10只/15个平台	每日14h站立,持续21d
心理疲劳	Wistar大鼠	MMPM,15只/15个平台	连续睡眠剥夺72h
长航疲劳	Spargue-Dawley大鼠	MMPM,12只/15个平台	每日12h小平台站立联合水面晃动仪2h站立,持续21d

3.1 中枢疲劳 中枢疲劳是由于中枢神经系统发生退行性病变或其他不良反应,进而导致躯体、神经、心理一系类的疲劳状态反应^[32]。中枢疲劳的诱因十分复杂,不仅可由过度躯体运动及脑力活动所引起,还可因长期压力、失眠等因素引起。而MMPM包含体力活动、压力、失眠及等因素,因此可诱发啮齿类动物产生中枢疲劳。YAMASHITA等^[33]采用SP对大鼠进行连续5d,每日20h的睡眠剥夺,建立了中枢疲劳大鼠模型,造模后大鼠在跑步机测试中显示出较差的跑步表现,在社交互动测试中表现出了较差的社交互动;此外中枢疲劳模型大鼠下丘脑及海马中的色氨酸和犬尿喹啉酸水平与空白组相比显著提高,因此研究者认为大脑中色氨酸及犬尿喹啉酸浓度的增加可能对中枢疲劳产生放大效应。HAN等^[34]采用MMPM分别对大鼠进行连续5、14和21d每日14h的间断睡眠剥夺,结果显示,5d组、14d组大鼠产生了高应激状态表现,21d组则诱发负面情绪及认知障碍,经电镜检验发现大鼠海马形态线粒体出现退化性改变,由此认为21d间断睡眠剥夺是可用于建立符合人类疾病状态的中枢疲劳大鼠模型。ZHANG等^[7]对大鼠进行每日14h的MMPM睡眠剥夺21d后,发现大鼠模型在高架十字迷宫中体现出不良情绪、旷场实验中表现出空间认知障碍和自主活动下降,在负重力竭游泳实验中肌肉活动能力下降,进一步证实了大鼠采用MMPM进行21d间断睡眠剥夺后可建立中枢疲劳模型。

3.2 心理疲劳 心理疲劳是指高强度、高压力的工作在对人体造成的心理疲乏感和耗竭感,心理疲劳在心理和行为上的标志分别为对努力的感知高于正常水平及对体力工作的耐力表现下降^[35]。郭思

媛^[36]对既往心理疲劳的动物模型进行了文献研究,发现纳入的30篇文献中,14篇应用水环境小平台法作为心理疲劳的造模方式,且多采用72、96h的连续睡眠剥夺方式,其占比达到71.4%。因此,郭思媛通过文献研究数据选用MMPM对大鼠进行造模,分为睡眠剥夺72h组、96h组、120h组、144h组、168h组,实验结束后对模型进行评价,最终研究表明72h连续睡眠剥夺与心理疲劳的表现最为相近。于姣姣等^[37-38]也证实了该结论,当大鼠接受72h的MMPM剥夺后在旷场实验,抓握力实验和高架十字迷宫实验中均出现心理疲劳表现,并以抗疲劳的精油治疗对模型进行了药物反证。

3.3 长航疲劳 长航疲劳是在海上长期航行过程中由于生活单调、工作强度高、休息时间少,睡眠质量低等原因引起的官兵普遍存在的身心疲劳现象^[39]。在长航疲劳的造模中水环境小平台是重要诱因之一。2017年,陈斗^[40]首次运用自主研发的水面晃动站台仪与MMPM结合从病因角度对大鼠进行长航疲劳模型构建。在每日进行12h小平台站立的基础上联合水面晃动仪站立2h共持续21d,此方法在MMPM建立疲劳的基础上充分考虑了长航的特殊环境,21d造模后发现,与空白组相比模型组大鼠体重减轻,血中乳酸、肌酸激酶、尿素含量明显增高,力竭游泳时间降低等数据均表明大鼠疲劳表现。模型组大鼠还在旷场实验及悬尾实验中反映了一定的抑郁情绪,此外血清的肾上腺皮质激素、血清皮质酮的提高及五羟色胺含量的降低也进一步的证实了大鼠的抑郁情绪的产生,表明了长航疲劳模型大鼠不仅具有疲劳的表现,还均有情绪抑郁等不良情绪的表现倾向,这较为符合临床上长航疲劳的特征与表现。

4 中医病证模型

“证”是中医学特有的诊断概念,是对疾病当前阶段的病位、病性等所作的结论^[41]。辨病是从病的发展全过程上了解病的本质,重视疾病的基本矛盾,辨证则重在从疾病当前的症状中判断病变的位置和性质。因此病证结合是中医诊断特点之一,而病证结合动物模型是开展中医药基础研究的有效工具。研究表明,多种中医证候动物模型及中医病

证结合动物模型均采用平台水环境法,其证候病位多与“心”“肝”“脾”相关,病性多以“虚”“瘀”相关,其中心系证候模型及病证结合模型主要采用平台水环境法进行连续睡眠剥夺,肝系证候模型或病证结合模型主要集中在5~14 d的间断睡眠剥夺或平台站立,脾系证候模型或病证结合模型主要集中在2周以上的间断睡眠剥夺或平台站台,利用平台水环境法建立证候模型及病证结合模型代表性方法见表4。

表4 平台水环境法建立证候模型与病证结合模型的代表性研究

Table 4 Representative study on establishing syndrome model and disease syndrome combination model by platform water environment law

证候模型/病证结合模型	模型动物	水平台使用方法	造模方法
心气虚证	SD大鼠	未提及	连续睡眠剥夺192 h
心肌缺血心气阴两虚证	Wistar大鼠	SP, 1只/1个平台	连续睡眠剥夺96 h,联合垂体后叶素摄入
脾虚证	Wistar大鼠	MMPM, 12只/15个平台	每日20 h站立,持续14 d
功能性腹泻脾虚证	Wistar大鼠	MMPM, 15只/15个平台	每日14 h平台站立联合高乳糖饮食,持续14 d
肝郁模型	Wistar大鼠	MMPM, 8只/未提及	隔日完全睡眠剥夺24 h,重复7次
肝郁脾虚证	SD大鼠	MMPM, 10只/15个平台	每日14 h站立,持续14 d
中枢疲劳肝郁脾虚证	Wistar大鼠	MMPM, 10只/15个平台	每日14 h站立,持续21 d

4.1 心气虚模型 1987年,平台水环境法首次应用于中医证候模型的构建,中国科学院生物研究所的孙福立与心理研究所的李德明认为水环境小平台法可模拟“惊”与“劳”的病因,因此应用平台水环境法对大鼠进行连续96 h的睡眠剥夺,根据实验中大鼠的血压、平均心率及心率变异功率进行分析,实验结果表明,实验大鼠符合心气虚的证候表现,并且运用平台水环境法建立的心气虚模型比单纯使用药物或手术的方法,更能符合中医“证”的概念,以此立足提出相关展望——通过改变睡眠剥夺的时间,探索建立心阴虚或心气阴两虚证的动物模型的构想^[42]。此后研究者多采用平台水环境法建立心气虚模型,于成瑶等^[43]在此基础上将大鼠的睡眠剥夺时间提升至192 h,并根据中国中西医结合学会所发布的虚证辨证标准,从心率、呼吸、血压等7个方面进行检测。实验数据结果表明,平台水环境法适用于心气虚证动物模型的构建,其病因与“心主神明”功能紊乱密切相关。

4.2 心气阴两虚模型 章忱等^[44]采用SP对大鼠进行连续96 h的睡眠剥夺后联合垂体后叶素摄入构建了大鼠心肌缺血心气阴两虚证,并分别给予丹参滴丸、半夏薤白瓜蒌汤、生脉饮、苏合香丸、左归丸、右归丸共六种方剂进行药物证候反证,其中生脉饮组大鼠心电图及新功能指标明显改善,结果表明睡眠

剥夺连续96 h联合垂体后叶素摄入可建立心肌缺血心气阴两虚证大鼠模型。杨鸣等^[45]先施加“病因”,对小鼠进行连续30 d的异丙肾上腺素注射建立心力衰竭模型,再应用MMPM对小鼠进行48 h连续睡眠剥夺作为“证因”。通过小鼠宏观指标、图像处理分析及动物行为实验评价模型,结果表明睡眠剥夺后的小鼠比单纯注射异丙肾上腺素组的气阴两虚程度更明显,此方法可适用于构建心衰病心气阴两虚小鼠病证结合模型。

4.3 脾气虚模型 《脾胃论·脾胃胜衰论》曰:“劳倦伤脾”,劳倦过度是脾虚证的重要病因之一,劳倦不仅指形体劳倦,睡眠剥夺导致其忧思与劳神亦为劳倦。平台水环境兼备此2种因素。杨茜等^[46]采用MMPM对大鼠进行7、14、21 d的小平台站台,在各天数的基础上又分别设置了4、12、20 h的站台时间组,以大鼠脾虚证表现的主、次症设立证候判断权重,并结合旷场实验及负重力竭游泳实验等行为学实验及血清D-木糖、乳酸等指标进行模型评价,发现对大鼠进行每日20 h持续21 d的结果更符合脾虚证候。白世敬等^[47]采用MMPM对大鼠连续14 d睡眠剥夺14 h并联合高乳糖饲养,分别设立MMPM组与高乳糖组作为对照,发现站台联合高乳糖组大鼠出现便溏乏力、毛发疏松不泽,体质量增加,血清淀粉酶活性降低等特征,因此,他们认为

MMPM联合高乳糖的造模方法是最符合用于建立功能性腹泻脾虚证动物模型。刘艳阳等^[48]将大鼠放置于MMPM中,进行每日10 h共14 d的水平站立,并以碘乙酰胺灌胃。实验结果表明大鼠血清D-木糖排泄率、胃动素含量低于对照组,乳酸值高于对照组,且大鼠出现食少、纳呆、腹胀、毛发疏松不泽、神疲乏力等脾虚症状,表明功能性消化不良脾虚证模型成功建立。何青璿等^[49]借鉴刘艳阳造模的思路,首先对大鼠灌胃碘乙酰胺6 d后,将大鼠放置于MMPM中,进行14 d每日14 h的水平站立,成功建立功能性消化不良大鼠。

4.4 肝郁模型 临床与实验研究均证实睡眠剥夺后会产生烦躁、易怒、暴躁等不良情绪。中医认为此种不良情绪与肝主疏泄关系密切。卢岩等^[50]对大鼠进行隔日完全睡眠剥夺,每次睡眠剥夺24 h后休息1 d,隔日再次进行24 h睡眠剥夺,重复7次。实验结束后大鼠出现睡眠时间减少、兴奋性提高,警觉性、进攻等行为提高,易被激惹、精神萎靡、毛发无光泽且杂乱等肝郁证特征。与正常组比较,模型组大鼠的皮质、下丘脑内的5-羟色胺、5-羟基吲哚乙酸、 γ -氨基丁酸含量显著降低,去甲肾上腺素、多巴胺含量上升。并以“疏肝调神”针法进行干预后,上述指标均有改善,进一步从预测效度证明了肝郁模型的建立。

4.5 肝郁脾虚模型 马捷等^[51]采用MMPM对大鼠进行每日14 h连续14 d的部分睡眠剥夺,发现大鼠具有肝郁脾虚的证候表现,并以具有疏肝健脾功效的四逆散进行反证,验证了模型可靠性。韩晨霞^[52]从理论角度探讨了MMPM建立肝郁脾虚型中枢疲劳的可能性,并对大鼠进行了21 d每日14 h的睡眠剥夺,发现大鼠具有郁郁寡欢、喜静少动、粪便稀溏、进食减少等表现,且在行为学实验中表现出负面情绪,躯体耐受力下降的表现,由此认为其在表现效度上与肝郁脾虚证高度相似。并使用具有疏肝健脾功效的体复康、四逆散加减进行干预,发现可明显改善肝郁脾虚证的相应特征^[53]。

5 讨论

5.1 平台水环境法应用中的不足与思考 如今,平台水环境法已从最初的SP发展到MMPM,其应用范围也从最初的睡眠剥夺研究,扩展到多种不同领域的研究。但是在蓬勃的发展背后,研究者对其应用仍然存在问题。首先,对睡眠剥夺概念的混淆,啮齿类动物每日睡眠时间为12~13 h,因此当以睡眠剥夺为造模因素时应保证啮齿类动物的站台时间

在14 h以上。但部分研究,将站台时间设置为12 h以下,却称其为睡眠剥夺,如研究慢性睡眠剥夺对小鼠神经的改变,却将小鼠每日的站立时间设立为8 h,此不仅无法达到睡眠剥夺的效果,更无法称其为睡眠剥夺模型,就会导致实验结果与实验目的背离^[54]。其次,平台水环境法对实验动物进行的睡眠剥夺为异相睡眠剥夺^[55],即剥夺REM,而并非完全睡眠剥夺,即连续剥夺睡眠也无法剥夺实验动物的NREM,但现多有学者将连续睡眠剥夺与完全睡眠剥夺概念混淆,常有文章论述平台水环境法可完全剥夺睡眠^[6,56],概念上的误区会从底层设计影响实验;最后,一个合格的证候模型或病证结合模型应同时满足以下4点,①研究者对实验动物施加证因或(和)病因;②通过动物的证候表现进行正证;③通过干预如“以方测证”等方式作为反证;④通过客观指标等进行佐证^[57-58]。但在运用平台水环境法进行中医病证结合造模的实际应用中常有构建模型不能同时满足以上4点。如应用MMPM进行心肾不交大鼠模型构建中,用交泰丸作为反证,但研究却缺少动物证候表现的评价^[59];运用MMPM建立的脾气虚模型,但缺少药物反证^[49]等。

5.2 平台水环境法应用的展望 如上所述,平台水环境在精神类疾病或不良情绪的动物模型中,多采用3~5 d的连续睡眠剥夺,在疲劳相关模型构建中多采用14 d以上的间断睡眠剥夺。其他研究表明,运用MMPM进行长期部分睡眠剥夺可导致大鼠的免疫能力下降^[60]。这说明调整平台水环境造模的时间节点及长度能够达到不同疾病造模的目的,这也为平台水环境法指明了新的发展方向。研究者可在已有基础上继续研究,通过调整这2个因素进行新疾病模型的探索或对已有疾病模型进行验证。

平台水环境法在中医相关动物模型研究中,其证候核心为“心”“肝”“脾”,暂无湿证相关报道。但水环境小平台下方1 cm均由水注满,实验动物长期处于“外湿”环境、甚至意外落水,因此平台水环境也应该有“湿邪”的因素。研究表明,将啮齿类动物饲养于高湿度的环境中,是建立湿证的重要造模因素与方法^[61-62],因此平台水环境在应用于湿证的研究已有一定的理论基础,例如脾虚湿盛证,平台水环境既可满足“劳倦伤脾”的因素,又可满足“外湿侵袭”的因素;脾虚又易生湿,湿邪又易困脾,未来的病证结合模型或可从湿证的方向进行探索。其次应用平台水环境法时应规范证候评价体系,辨证规范化即是动物证候模型研究的关键也是难点,

研究者们应该勇于创新并谨慎论证。如魏盛等^[63]提出完善动物模型证候量表考核体系,方肇勤等^[64]建设大小鼠四诊工作站,此均为研究者提供了新方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] VAN HULZEN Z J, COENEN A M. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats[J]. *Physiol Behav*, 1981, 27(4): 741-744.
- [2] DEMENT W C. Recent studies on the biological role of rapid eye movement sleep[J]. *Am J Psychiatry*, 1965, 122(4): 404-408.
- [3] MACHADO R B, HIPÓLIDE D C, BENEDITO-SILVA A A, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: Quantification of sleep loss and recovery[J]. *Brain Res*, 2004, 1004(1/2): 45-51.
- [4] COHEN H B, DEMENT W C. Sleep: Changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase[J]. *Science*, 1965, 150(3701): 1318-1319.
- [5] 郭兴道, 李炜, 张葵荣, 等. 睡眠剥夺对学习记忆及中枢神经系统相关分子的影响[J]. *神经药理学报*, 2014, 4(1): 34-51.
- [6] 魏砚君, 卞宏生, 叶晓楠, 等. 睡眠剥夺动物模型及其在中医药改善睡眠研究中的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(10): 227-234.
- [7] ZHANG W Y, ZHANG W, DAI N, et al. A rat model of central fatigue using a modified multiple platform method[J]. *J Vis Exp*, 2018, doi: 10.3791/57362.
- [8] LEDOUX M. *Animal models of movement disorders* [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005: 55-71.
- [9] JOEL D. Current animal models of obsessive compulsive disorder: A critical review [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006, 30(3): 374-388.
- [10] LANCEL M, KERKHOF G A. Effects of repeated sleep deprivation in the dark- or light-period on sleep in rats[J]. *Physiol Behav*, 1989, 45(2): 289-297.
- [11] TANG X, YANG L, SANFORD L D. Individual variation in sleep and motor activity in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2007, 180(1): 62-68.
- [12] SHARMA B, SENGUPTA T, CHANDRA VISHWAKARMA L, et al. Muscle temperature is least altered during total sleep deprivation in rats [J]. *J Therm Biol*, 2021, 98: 102910.
- [13] WANG L, SONG Y, LI F, et al. Effects of Wen Dan Tang on insomnia-related anxiety and levels of the brain-gut peptide Ghrelin[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(2): 205-212.
- [14] BECKER M, PINHASOV A, ORNOY A. Animal models of depression: What can they teach us about the human disease? [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(1): 123.
- [15] RIEMANN D, KRONE L B, WULFF K, et al. Sleep, insomnia, and depression[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(1): 74-89.
- [16] PENNING B, EIKELENBOOM M, GILTAY E J, et al. Cohort profile of the longitudinal Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA) on etiology, course and consequences of depressive and anxiety disorders[J]. *J Affect Disord*, 2021, 287: 69-77.
- [17] ANTYPA N, VOGELZANGS N, MEESTERS Y, et al. Chronotype associations with depression and anxiety disorders in a large cohort study[J]. *Depress Anxiety*, 2016, 33(1): 75-83.
- [18] ANDERSEN M L, HOSHINO K, TUFIK S. Increased susceptibility to development of anhedonia in rats with chronic peripheral nerve injury: Involvement of sleep deprivation? [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(6): 960-966.
- [19] MOON E J, KO I G, KIM S E, et al. Dexmedetomidine ameliorates sleep deprivation-induced depressive behaviors in mice[J]. *Int Neurol J*, 2018, 22(Suppl 3): S139-S146.
- [20] MA W, SONG J, WANG H, et al. Chronic paradoxical sleep deprivation-induced depression-like behavior, energy metabolism and microbial changes in rats[J]. *Life Sci*, 2019, 225: 88-97.
- [21] SILVA R H, KAMEDA S R, CARVALHO R C, et al. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004, 176(2): 115-122.
- [22] PIRES G N, TUFIK S, ANDERSEN M L. Grooming analysis algorithm: Use in the relationship between sleep deprivation and anxiety-like behavior [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 41: 6-10.
- [23] KALUEFF A V, TUOHIMAA P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: Potential utility for neurobehavioural stress research [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 143(2): 169-177.
- [24] XIE J F, SHAO Y F, WANG H L, et al. Neuropeptide

- S counteracts paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and sleep disturbances[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:64.
- [25] ROUBALOVÁ L, VOŠAHLÍKOVÁ M, SLANINOVÁ J, et al. Tissue-specific protective properties of lithium: Comparison of rat kidney, erythrocytes and brain [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(5):955-965.
- [26] KANAZAWA L, VECCHIA D D, WENDLER E M, et al. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99:79-86.
- [27] BENEDETTI F, FRESI F, MACCIONI P, et al. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 187(2):221-227.
- [28] ARMANI F, ANDERSEN M L, ANDREATINI R, et al. Successful combined therapy with tamoxifen and lithium in a paradoxical sleep deprivation-induced mania model [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(2):119-125.
- [29] VALVASSORI S S, RESENDE W R, DAL-PONT G, et al. Lithium ameliorates sleep deprivation-induced mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice[J]. *Bipolar Disord*, 2017, 19(4):246-258.
- [30] TWOMEY R, ABOODARDA S J, KRUGER R, et al. Neuromuscular fatigue during exercise: Methodological considerations, etiology and potential role in chronic fatigue[J]. *Neurophysiol Clin*, 2017, 47(2):95-110.
- [31] ENOKA R M, DUCHATEAU J. Translating fatigue to human performance[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2016, 48(11):2228-2238.
- [32] HAN C X, LI F, MA J, et al. Review of CENTRAL FATIGUE[J]. *Prog Mod Biomed*, 2016, 16(20):3908, 3986-3988.
- [33] YAMASHITA M, YAMAMOTO T. Tryptophan and kynurenic acid may produce an amplified effect in central fatigue induced by chronic sleep disorder [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2014, 7:9-14.
- [34] HAN C, LI F, MA J, et al. Distinct behavioral and brain changes after different durations of the modified multiple platform method on rats: An animal model of central fatigue[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0176850.
- [35] VAN CUTSEM J, MARCORA S, DE PAUW K, et al. The Effects of mental fatigue on physical performance: A systematic review [J]. *Sports Med*, 2017, 47(8):1569-1588.
- [36] 郭思媛. 体复康加减方对心理疲劳模型大鼠认知功能影响的机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [37] 于姣姣. 薰衣草精油干预心理疲劳大鼠的疗效观察和生物学基础研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2020.
- [38] 于姣姣, 郭理想, 戴宁, 等. 薰衣草精油对睡眠剥夺大鼠行为学及血清中胃饥饿素、瘦素含量的影响[J]. *现代中医临床*, 2020, 27(3):49-55.
- [39] 关羽茜, 吴晓青. 综合疗养措施对长航海勤人员疲劳状况的干预效果[J]. *实用医药杂志*, 2020, 37(6):575-576.
- [40] 陈斗. 基于动物实验的长航疲劳中医证候研究及相关负面情绪探讨[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [41] 李灿东, 吴承玉. 中医诊断学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:8.
- [42] 孙福立, 李德明. 试用睡眠剥夺方法建立心虚证的动物模型[J]. *中西医结合杂志*, 1987(1):6, 35-37.
- [43] 于成瑶, 赵明镜, 王硕仁, 等. 水环境站台睡眠剥夺心虚证大鼠模型的再研究[J]. *山东中医杂志*, 2005, 24(5):297-300.
- [44] 章忱, 盛学仕, 吕嵘, 等. 动物心肌缺血中医证型规范化标准化研究(二)[J]. *上海中医药杂志*, 2003, 37(3):42-45.
- [45] 杨鸣, 王达洋, 龚媛媛, 等. 气阴两虚型心衰证结合小鼠模型的构建与评价[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(12):2076-2078, 2092.
- [46] 杨茜, 李峰, 马捷, 等. 水环境小平台建立脾虚证大鼠模型及其评价[J]. *山东中医杂志*, 2016, 35(5):452-457.
- [47] 白世敬, 李峰, 唐旭东, 等. 功能性腹泻脾虚证动物模型制作方法[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(1):86-88.
- [48] 刘艳阳, 李峰, 刘晶, 等. 内脏敏感增高型功能性消化不良脾虚证动物模型的建立[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(11):2218-2220.
- [49] 何青鋈, 戴宁, 马捷, 等. 脾虚1号方对功能性消化不良大鼠 CGRP、CCK 和 VIP 的影响[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(2):298-301.
- [50] 卢岩, 刘振华, 于晓华, 等. 疏肝调神针法针刺对睡眠剥夺模型大鼠神经递质的影响[J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(4):322-325.
- [51] 马捷, 刘晶, 刘燕, 等. 四逆散对水环境小平台站立大鼠模型的影响[J]. *中医学报*, 2015, 30(6):843-845.

- [52] 韩晨霞. 基于线粒体生物合成探讨中枢疲劳的中医证候及生物学机制[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [53] HAN C, LI F, LIU Y, et al. Modified Si-Ni-San Decoction ameliorates central fatigue by improving mitochondrial biogenesis in the rat hippocampus [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 9452127.
- [54] ARORA S, DHARAVATH R N, BANSAL Y, et al. Neurobehavioral alterations in a mouse model of chronic partial sleep deprivation [J]. Metab Brain Dis, 2021, 36(6):1315-1330.
- [55] 常静, 陈畅, 陈婷, 等. 丙泊酚对异相睡眠剥夺小鼠结肠能量代谢的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(11):1345-1348.
- [56] 王帆, 张媛, 陈钊, 等. 完全睡眠剥夺对大鼠糖代谢的影响及其机制研究 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2015, 23(5):354-356.
- [57] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. 病证结合动物模型研究思路述评 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 141-144.
- [58] 彭丹虹, 王燕萍, 刘晓琪, 等. 中医病证结合动物模型评价体系的现状分析 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8):2027-2030.
- [59] 全世建, 焦蒙蒙, 黑赏艳, 等. 交泰丸对睡眠剥夺大鼠下丘脑 Orexin A 及 γ -氨基丁酸的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(1):103-105.
- [60] ZAGER A, ANDERSEN M L, RUIZ F S, et al. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293(1):R504-R509.
- [61] 王欢. 高湿度环境对大鼠体能的影响 [D]. 武汉:武汉体育学院, 2021.
- [62] 徐霞, 王玮玮, 张文彤, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠造模及参苓白术散给药不同阶段的血浆代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15):111-119.
- [63] 魏盛, 孙鹏, 张惠云. 证候动物模型质量考核的思路与方法 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10):2607-2610.
- [64] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠/小鼠是证候研究的主要模式生物 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(5):352-353.

[责任编辑 王鑫]