

· 学术探讨 ·

慢性疲劳综合征动物模型的构建与评价

李悦, 韩秀珍, 徐秋露, 商洪涛*
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] 慢性疲劳综合征(CFS)是一种多系统、多脏器功能失调的异质性疾病,其病因病机尚未完全阐明,治疗也缺乏特异性,建立符合CFS发病特点及内在机制的动物模型是对疾病开展研究的重要环节。现有CFS造模方法繁杂而不统一,笔者通过整理相关文献,从免疫模型、应激模型及病证结合中医模型3个方面对模型的构建方法、成模标准、机制及临床吻合度进行评价分析。其中免疫模型注重从病理生理角度进行构建,操作简便且研究广泛,能较好地模拟CFS病理特征,展开病机研究,但实验可重复性一般。应激造模是目前包括CFS在内多种神经精神疾病的常用造模方法,应激源种类广泛,可用于探究CFS的病因,但具有一定不可预测性。与前述2种西医模型相比,病证结合中医模型将现代医学与中医理论结合,临床吻合度高且实用价值大,但目前关于CFS的病证结合模型尚处于探索阶段,模型种类少,故仍有待进一步完善,以期建立科学合理、简便高效的动物模型,为探究CFS病因、发病机制和新的治疗思路等提供帮助。

[关键词] 慢性疲劳综合征; 动物模型; 免疫诱导; 应激; 病证结合; 模型评价

[中图分类号] R22;R-332;R775;R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0234-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230999

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221028.1320.012.html>

[网络出版日期] 2022-10-29 17:48:14

Establishment and Evaluation of Animal Models of Chronic Fatigue Syndrome

LI Yue, HAN Xiuzhen, XU Qiulu, SHANG Hongtao*

(The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Chronic fatigue syndrome (CFS) is a heterogeneous disease with dysfunction in multiple systems and multiple organs. Its etiology and pathogenesis have not been fully clarified, and its treatment also lacks specificity. The key to studying CFS is developing animal models that reflect the underlying mechanisms and etiology of CFS. The existing CFS modeling methods are complicated and not unified. By sorting out relevant literature, the present study evaluated the modeling methods, modeling standards, mechanisms, and clinical coincidence of the immune model, the stress model, and the disease-syndrome combination model in traditional Chinese medicine (TCM). The immune model is mainly constructed from the perspective of pathophysiology, with easy operation and wide investigation, which can simulate the pathological characteristics of CFS to ensure pathogenesis research, but the experimental repeatability is general. Stress modeling is a common method for a variety of neuropsychiatric diseases, including CFS. Many different stressors can be employed to investigate the etiology of CFS, but their effects are unpredictable. Compared with the two western medicine models mentioned above, the TCM disease-syndrome combination model integrates modern medicine with TCM theory, with high clinical coincidence and great practical value. However, the TCM disease-syndrome combination model of CFS is still in the exploratory stage with a few types of models, which needs to be further improved, aiming to establish scientific, reasonable, simple, and efficient animal models to provide support for

[收稿日期] 2022-04-12

[基金项目] 江苏省老年医学临床技术应用研究项目(LD2021004)

[第一作者] 李悦,在读硕士,从事中医脾胃病临床研究,E-mail:1771790051@qq.com

[通信作者] *商洪涛,博士,主任中医师,从事中医脾胃病临床研究和中医体质调理,E-mail:554053849@qq.com

exploring the etiology, pathogenesis, and new treatment ideas of CFS.

[Keywords] chronic fatigue syndrome (CFS); animal models; immune induction; stress; combination of disease and syndrome; model evaluation

慢性疲劳综合征(CFS)由美国疾病预防控制中心于1988年正式命名,是一类缺乏普遍公认的疾病定义、病因、诊断及治疗的疾病^[1]。该病的主要特点为经休息后无法缓解的长时间疲劳,并伴有劳累后不适、肌肉关节疼痛、认知障碍和自主神经功能失调等症状^[2]。在现代社会快节奏、高要求和多变的环境下,CFS的发病率逐年升高,据相关流行病学统计^[3],该病的全球患病率为0.4%~2.5%,20至40岁的职业女性更常见。因其病机尚未阐明,目前还没有可以治愈CFS的治疗方法或客观的诊断方法,非药物疗法及药物实验均显示缺乏明确的治愈效果^[4]。中医治疗相较于西医有整体调节作用,疗效突出且不良反应小,但普遍缺乏统一证候表现及辨证分型指导^[5]。为进一步研究其发病机制,寻找特异性治疗和疾病预防措施,构建合适的CFS动物模型具有重要意义。国外文献对CFS造模方法综述不多,国内文献对此有所论述但主要集中在西医模型,对中医证候模型研究不够深入,故本文创新性地从现代造模与中医造模两种角度进行总结,为相关研究中动物模型的选择和建立提供参考。

1 CFS的病因病机

1.1 现代病因病机 关于CFS的现代医学病因与发病机制一直处于探索阶段,包括病毒感染、免疫

功能紊乱、神经内分泌系统异常、线粒体或能量代谢障碍等^[6-8]。随着高通量测序技术在宏基因组学中的广泛应用,肠道微生物也被发现与CFS有一定关联性,肠道黏膜屏障破坏、菌群失调及微生物-脑-肠轴活动改变与CFS发病相关^[9]。但目前没有肯定的证据表明哪一种作用机制与CFS的发生有必然联系,尽管如此,大多学者认为该病不是单一因素致病,而是多种因素综合作用的结果。

1.2 中医病因病机 古籍无慢性疲劳综合征病名记载,但以疲劳为主证常被归属于“虚劳病”范畴^[10],此外,《金匱要略》中所描述的百合病、脏躁也与CFS的精神症状有部分相似之处^[11]。CFS发生与先天禀赋不足、后天饮食失养、情志因素或劳倦内伤等多种病因导致气血阴阳失衡,脏腑功能失调有关。其病位涉及五脏,与肝脾肾尤为密切,如《黄帝内经·素问·示从容论》曰:“肝虚、肾虚、脾虚皆令人体重烦冤”,病理性质以正虚为主,兼有虚实夹杂^[12]。

2 CFS西医诊断标准及中医辨证标准

2.1 CFS西医诊断标准 西医诊断标准参照1994年美国疾病预防控制中心(CDC)诊断标准^[13],2011年国际共识标准^[14],2021年英国国家卫生与临床优化研究所(NICE)指南^[15]拟定。诊断主要根据临床表现,同时排除其他疲劳相关性疾病。见表1。

表1 CFS西医诊断标准

Table 1 Diagnostic criteria of western medicine for CFS

分类	主要表现
核心症状	①虚弱性疲劳或劳力后不适、疲劳;②活动能力较前明显下降;③休息、睡眠和降低活动强度无法恢复的疲劳
伴随症状	①不能恢复精神的睡眠或睡眠障碍;②认知障碍(脑雾),如记忆力、注意力问题;③各种疼痛,如头痛、肌肉关节疼痛、淋巴结节痛;④神经肌肉症状,包括抽搐和肌阵挛;⑤直立不耐受和自主神经功能障碍;⑥免疫、胃肠道及生殖泌尿损害;⑦温度过敏,如大量出汗、寒战等;⑧对光、声、触觉、味觉和嗅觉的感觉敏感

动物模型与西医临床吻合度分析参照苗明三教授提出动物模型评价新方法^[16],将动物模型评价指标分为核心指标、直接相关指标、间接相关指标,依次占比60%、30%、10%。结合动物实际能表现的症状,核心指标为①虚弱性疲劳或活动后出现疲劳;②活动能力较前明显降低;③疲劳持续时间长,经休息后无法缓解。每一项赋值20%。直接相关指标为④不能恢复精神的睡眠或睡眠障碍;⑤认知障碍;⑥广泛的游走性疼痛;⑦神经肌肉症状。每一项赋值7.5%。间接相关指标为⑧自主神经功能

障碍表现;⑨免疫、胃肠道及生殖泌尿损害;⑩温度过敏;⑪感觉敏感。每一项赋值2.5%。总分值100%。

2.2 CFS中医辨证标准 中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[17]及历代医家^[18]提出的辨证分型,主要证型分为内虚外感证、肝郁脾虚证、脾虚湿困证、湿热内蕴证、中气不足证、心脾两虚证、脾肾阳虚证、肝肾不足证。具体中医辨证见表2。参照苗明三教授提出动物模型评价新方法^[16],中医模型诊断标准分为主证、次证,分别占比60%、40%。对同时具备主证、次证中1项及

以上的动物模型予临床吻合度计算。各证型的主证、次证进行归纳总结,主证包括①精神疲倦;②四肢困重,倦怠无力;③活动后加重。每1项赋值

20%。次证包括④困倦嗜睡或寐浅易醒;⑤记忆力、注意力下降;⑥头痛及周身疼痛;⑦情绪不宁或急躁易怒;⑧纳差便溏。每1项赋值8%。总分值100%。

表2 CFS中医辨证分型

Table 2 Traditional Chinese medicine(TCM) syndrome differentiation of CFS

分型	主证	次证	舌脉
内虚外感证	神疲乏力,醒后不解乏	恶寒发热,头痛咽痛,肌肉关节酸痛,淋巴结肿痛,记忆力下降	苔薄或腻,脉浮或濡或缓或濡数,重取无力
肝郁脾虚证	神疲乏力,四肢倦怠	周身窜痛不适,抑郁寡欢或急躁易怒,胸胁胀满,注意力不集中,记忆力减退,寐浅,纳食不香,便溏或干稀不调	舌胖,苔白,脉弦缓无力
脾虚湿困证	神疲乏力,四肢困重,酸痛不适	头重如蒙,困倦多寐,胸脘痞满,纳呆溏薄	舌胖,苔白腻,脉濡细
湿热内蕴证	神疲乏力,四肢困重,酸痛不适	头重如蒙,低热缠绵不解,淋巴结肿痛	舌胖,苔黄腻,脉濡数
中气不足证	神疲乏力,气短懒言,劳则加重	头晕健忘,自汗,食后困倦多寐,食少便溏	舌淡苔薄白,脉细弱
心脾两虚证	神疲乏力,劳则加重	头晕头痛,身痛肢麻,神情忧郁,心悸健忘,注意力不集中,多梦易醒,食欲不振	舌质淡,脉细弱
脾肾阳虚证	精神萎靡,肢软无力,懒言易汗	腰膝冷痛,面色苍白,畏寒肢冷,困倦嗜睡,食少便溏	舌淡胖有齿痕,苔白,脉沉迟无力
肝肾不足证	神疲乏力,形体虚弱	头晕头痛,腰膝酸痛,潮热盗汗,耳鸣眼涩,心烦易怒,失眠健忘,淋巴结肿痛,大便干结	舌红,少苔,脉弦细数

3 动物模型的建立及分析

3.1 免疫模型

3.1.1 细菌诱导 雌性 C57BL/6 小鼠采用腹腔注射 3 mg·kg⁻¹ 脂多糖(LPS)联合负重(体质量的5%)游泳 20 min 的造模方法,以行为和生化参数说明模型特征。与正常组比较,模型小鼠的运动活性降低,间脑 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、胱天蛋白酶(Caspase)-1 和前白介素-1β(IL-1β)mRNA 水平显著升高,而 NLRP3 基因敲除小鼠在相同造模条件下运动活动增加,脑中的 IL-1β 水平显著降低,提示 LPS 诱导疲劳行为的机制可能与小鼠间脑中 NLRP3 蛋白表达,导致 Caspase-1 活化并调节 IL-1β 产生相关^[19]。此外,重度抑郁症(MDD)与 CFS 之间具有很强的共存性,而该机制也被证明在 MDD 中发挥作用,佐证该激活的免疫炎症通路可能支持 MDD 和 CFS 之间的共病^[20]。上述造模小鼠在一定程度上反映了 CFS 的临床症状如运动能力下降及病理特征变化,此种免疫诱导的疲劳与神经内分泌免疫相互作用有关,可继续展开相关研究,寻找特异性作用靶点,为抗疲劳治疗提供思路。但 LPS 诱导 CFS 的致病机制目前尚未被证实,注射剂量、时间及实验设计等都会对实验结果产生影响,即模型的可复制性一般,仍有待完善。

HE 等^[21]对雌性 BALB/c 小鼠每 2 周腹膜内重复注射 6 次 BA 抗原溶液(每只小鼠 0.2 mL),共 12 周。活动能力测试持续至注射结束后第 6 周。研究结束后测定小鼠皮质和海马中细胞因子 IL-1β、

IL-6 水平和氧化应激标志物 3-硝基酪氨酸(3-NT)、4-羟基壬烯醛(4-HNE)水平。结果发现与正常组比较,模型组小鼠的运动能力显著下降,皮质和海马中 IL-1β、IL-6、3-NT 和 4-HNE 的水平均升高。该造模方法构建时间长,可以延长模拟人类 CFS 真正慢性过程的疲劳持续时间,造模后小鼠的临床表现及生化改变,肯定了神经炎症及氧化应激在 CFS 发病中的作用^[22]。但该方法对实验剂量要求严格,动物死亡率高,在模拟 CFS 的神经精神症状上尚有欠缺。

3.1.2 Poly I:C 诱导 Poly I:C 作为一种合成双链 RNA 与病毒基因组相似,可被体内 Toll 样受体 3(TLR3)识别,诱导炎症信号通路的激活^[23]。鉴于此,一些学者将 Poly I:C 运用于模拟病原体感染相关免疫系统激活的动物模型。慢性疲劳综合征作为一种原因不明的复杂疾病,被认为与多种病毒[如人疱疹病毒 6 型(HHV6)、EB 病毒(EBV) 1 型单纯疱疹病毒(HSV1)]感染后诱发免疫系统激活有关^[24]。雌性 C57BL/6 小鼠提供低或高异黄酮的食物 2 周后,腹腔注射 20 mg·kg⁻¹ Poly I:C,结果 Poly I:C 注射的小鼠在 24 h 内运动活动降低,血清中与疲劳相关炎症介质水平升高及大脑和皮肤相关基因表达增加,而这些作用可被异黄酮逆转^[25]。LEE 等^[26]对雄性 ICR 小鼠腹内注射 20 mg·kg⁻¹ Poly I:C 后,对其运动、焦虑行为、肌肉力量、疼痛敏感性 & 生化指标进行检测,发现小鼠表现出典型的抑郁样表现,如 5-羟色胺(5-HT)及其合成酶的低活性,5-HT 转运蛋白和 5-HT_{1A} 受体的过度活跃,但运动

活动、肌肉力量和疼痛敏感性变化不大。Poly I:C 诱导的模型小鼠具有CFS的临床特征如劳力后不适、精神障碍或认知异常等,其生化指标如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、5-HT等改变也在CFS患者中得到体现^[27-28]。但也有研究表明,Poly I:C 诱导的疲劳模型最终表现为降低5-HT_{1A}受体的激活,实验结果出现差异不排除动物品系、取材部位及检测方法等影响,如不同种系的实验动物有不同遗传背景,在模拟人的生理功能、代谢和疾病特点上趋向性不同,但具体原因还需要进一步研究,故此模型尚存在争议^[29]。

3.1.3 肾上腺切除(ADX)模型 CFS作为人类压力相关疾病,与下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能异常有关^[30]。在急性炎症和压力刺激下HPA轴激活,促进战斗-逃跑反应同时消除疲劳,但在慢性刺激下,该轴的持续激活使其发展为功能低下、脱敏的状态,并导致慢性疲劳^[31]。肾上腺作为HPA轴的组成部分,是机体十分重要的内分泌腺体。有学者建立ADX小鼠模型,8周龄的雄性ICR小鼠在氯胺酮麻醉下行双侧肾上腺切除术,术后立即置于加热室中,每天进行伤口消毒并予糖盐水补充醛固酮的损失。7d后行为检测发现ADX小鼠运动活动、肌肉力量和疼痛敏感性显著降低,但无焦虑或抑郁行为改变。生化检测中血清皮质酮水平完全消耗,同时发现大脑部分区域星形胶质细胞激活和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)产生^[26]。既往研究提出CFS患者具有低皮质醇特征,横断面研究也发现CFS患者TGF- β 水平显著升高^[32-33],这些临床结果与该ADX动物模型研究相互支持。但该模型尚无法解释伴有焦虑或抑郁等精神障碍的CFS患者。由于缺乏基于临床的病理生理特征作参考,该研究存在局限性,但也表明ADX模型在CFS动物实验中的进一步可行性。

3.2 应激模型

3.2.1 强迫游泳实验(FST) 雄性白化小鼠被迫在水温(22±3)℃的玻璃罐中每天游泳10 min,持续21 d后,模型组小鼠出现不动时间增加、运动活动减少和焦虑样状态,同时生化检测发现氧化应激、线粒体功能障碍(复合物I和II)及神经递质水平(多巴胺、血清素和去甲肾上腺素)改变,血红素治疗可改善上述行为和生化参数^[34]。OHBA等^[35]将雄性ICR小鼠负重(尾部负重体质量的5%)放置在装满水的塑料圆筒(直径14 cm,水温23~25℃)中强迫游泳6 min,持续25 d后,小鼠不动时间和梳理开始时间增加、运动活性降低以及丙酮酸脱氢酶

(PDH)活性下降,提示PDH功能障碍和线粒体异常可能作为CFS发病机制的一部分。

FST是应激动物模型中常用且较成熟的方法,不仅广泛用于基础研究和抗抑郁药的筛选,还可评估动物模型的抑郁样行为^[36],早期即被运用于CFS造模研究。该方法构建的动物模型不仅具有CFS的核心症状如疲劳和行为认知异常,其病理改变在CFS的临床研究中也发现。如,WOOD等^[37]研究发现CFS患者体内氧化应激水平增加和线粒体功能障碍导致机体能量供给不足,疲劳发生。FERNANDEZ-GUERRA等^[38]对小规模CFS患者的队列研究发现以丙酮酸脱氢酶(PDH)和辅酶A代谢为中心的线粒体功能障碍。这些都表明强迫游泳构建的CFS动物模型与临床的吻合程度很高。但须指出,目前尚无运用该方法构建CFS模型的标准,干预时间、是否负重、水温等应激强度改变都会对实验结果产生影响,造成模型评价之间的对比缺乏可信度,应思考如何制定最优化的造模方案。

3.2.2 慢性约束应激(CRS) 慢性约束压力作为一种神经刺激类应激源,可引起动物产生挣扎、愤怒甚至绝望的心理和行为变化,导致机体功能紊乱,类似于人类心身疾病的发展过程^[39]。王天芳^[40]首次提出慢性束缚构建慢性疲劳动物模型,让雄性Wistar大鼠钻入自制束缚筒内,并调节到不产生强烈反抗,束缚3 h,持续2周。通过对大鼠的体力、记忆、情绪等行为检测来评估模型。造模后发现,模型大鼠的体力下降出现疲劳,同时伴记忆力下降和自发活动减少,表明有抑郁倾向。PARK等^[41]将雄性C57BL/6J小鼠置于圆柱形约束器(直径30 mm,长度100 mm)中每天束缚3 h,持续15 d。造模结束后,行为测试表明小鼠运动活性降低出现疲劳症状,同时模型小鼠大脑5-HT、肾上腺素、去甲肾上腺素水平以及血清皮质酮水平均显著增加。WANG等^[42]将雄性ICR小鼠限制在通风管(直径30 mm,长度120 mm)中8 h·d⁻¹,分别监测小鼠在5、10、15 d的压力持续时间下运动活动、肌肉力量和游泳耐力。结果表明,疲劳的发展与暴露时间呈正相关,10 d的CRS即可诱发小鼠疲劳,15 d可构建稳定的小鼠疲劳模型。同时还发现CRS诱发疲劳可能与肌肉萎缩和腓肠肌线粒体功能障碍有关。

CRS模型操作简便,可重复性高,与CFS发生发展过程有相似性,能代表当前大多人在相对狭小的空间久坐并疏于锻炼的状态,并能显著诱导疲劳症状。但CFS的疲劳主要特点是经休息后无法缓

解,与一般疲劳有所区别,应进一步展开疲劳小鼠休息后的行为检测,同时该模型在模拟CFS除疲劳以外症状上具有一定局限性,故建议可联合其他造模手段共同构建更具代表性的CFS动物模型。

除FST和CRS模型外,还存在用其他类型的应激源来构建模型,如跑台、睡眠剥夺、电刺激、夹尾、悬尾、噪声和拥挤等,也有结合2种及以上的混合应激模型,但需注意应同时给予实验动物躯体与精神双重应激,而非单纯的多因素刺激。

3.3 病证结合中医模型

3.3.1 三劳模型 “三劳”即形劳、神劳、房劳。过度体力劳动,损耗人体精气可致形劳,如《黄帝内经·素问》云:“劳则气耗”,表现为四肢倦怠无力,语声低微,精神疲惫等症。思虑劳神太过,暗耗心血,或思虑伤脾可致神劳,出现心悸怔忡、健忘失眠,食欲不振等症。肾藏精,纵欲过度耗伤肾中精气造成房劳,表现为腰膝酸软,头昏耳鸣,遗精早泄等。余曦明等^[43]采用“合笼+强迫游泳+夹尾”的组合刺激,构建“三劳模型”,具体为单日让发情期雌鼠和雄鼠合笼,每次合笼之间更换一批雌鼠,以耗尽其肾精;双日小鼠被迫在常温下游泳30 min,形成躯体疲劳;每天不定时用夹尾激怒小鼠30 min,通过情志刺激造成神劳。共造模14 d。造模结束后小鼠出现明显的疲劳行为,如皮毛色泽减退、反应迟钝、体质量下降、易怒、纳差等。该模型从中医“过劳”的3个方面为切入点,并基本涵盖了CFS的主要发病因素。成功构建了具有中医特色的CFS“三劳模型”。

3.3.2 肝郁脾虚模型 临床中肝郁脾虚型CFS患者十分常见,彭敏等^[12]对CFS中医证候频次归纳,肝郁脾虚证占37.5%。这与现代社会普遍压力大而节奏快,负面情绪难以疏解,郁怒日久有关。肝主疏泄,调畅情志,情志不遂则郁怒伤肝。脾主运化,与肝在生理相互联系,病理上相互影响。谢亚娜等^[44]采用“强迫游泳+慢性束缚+饮食控制”的方法制备CFS大鼠肝郁脾虚模型。将大鼠置于水温(26±1)℃、水深45 cm的圆筒内强迫游泳15 min,或置于束缚袋中约束3 h,上述方法每日随机交替进行,以免大鼠产生适应性,同时进行单日进食,双日禁食的饮食控制,共造模21 d。该方法中慢性束缚限制大鼠自由,使其产生不愉快的情绪,游泳造成体力消耗,劳伤筋骨、肌肉,影响肝主筋之功能。加上饮食不节,脾胃功能受损。诸多病因共同作用后,造模大鼠出现自发运动能力减退以及精神萎靡、倦怠纳差、易激惹、大便稀溏等表现与肝郁脾虚

型CFS患者的临床症候相似。采取针刺“太冲”“合谷”“足三里”等疏肝健脾穴位后,模型大鼠的运动能力及焦虑、抑郁表现明显改善,说明该造模成功。

3.3.3 脾肾阳虚模型 肾为先天之本,脾为后天之本,CFS的发生与脾肾关系密切。脾主肌肉,脾气健运则肌肉丰满壮实,四肢活动有力。肾藏精,精生髓,骨髓充盈则骨骼健壮,运动健捷。贺恋词^[45]认为CFS应重视调补脾肾,建立脾肾阳虚动物模型并验证健脾祛湿、益肾固精之药膳神仙粥的疗效。方法如下,对大鼠采用力竭游泳+慢性束缚隔日交替进行,持续4周后,行为学表现出明显的躯体疲劳和心理疲劳,首先复制出CFS疾病模型。然后对CFS大鼠予番泻叶水煎剂0.1 mL·kg⁻¹灌胃,每日1次,持续4周。番泻叶为苦寒泻下之药,易伤脾阳,服药日久累积肾阳导致脾肾阳虚证,持续泄泻亦损耗阳气,加重病症。也可将上述中西医造模方法同步进行。造模后大鼠表现为活动减少、精神萎靡、倦怠蜷卧、喜扎堆拱背、毛发稀疏无泽、纳差、便溏等,满足脾肾阳虚证候判断标准,经药膳神仙粥治疗后大鼠疲劳表现及脾肾阳虚诸证均见明显改善,说明该脾肾阳虚证CFS动物模型是有效的。此造模方法结合疾病造模和证候造模双重因素,能在以病统证下展开多种证的研究,但“证”的构建因素与CFS的形成之间逻辑性不强,故存在割裂病证内在联系的弊端。

3.3.4 脾虚模型、肾虚模型 CFS病性以虚为主,临床中除两脏或多脏相互影响外,尚存在单一脏腑的虚证,尤其对于疾病早期病情较轻,或是体质偏颇,先天不足者多见。冯玉华等^[46]建立脾虚证候疲劳模型大鼠,采用“饮食不节+过度疲劳+情志失调”的方法造模4周后,模型大鼠运动活动减少、情绪易激惹、纳差、大便稀溏等症状与临床CFS患者基本相符,同时客观指标检测大鼠D-木糖排泄率下降,血清胃动素和血管活性肠肽先升高后降低,说明大鼠胃肠功能紊乱,以此判定出现脾虚证候。但该造模方法与前文构建肝郁脾虚动物模型相似度高,两模型大鼠行为表现也十分相像,在相兼证候上可控性一般。

对于肾虚证动物模型的构建,使用广泛、认可度较高的是药物造模,其中用激素诱导动物产生类似肾虚症状,是最早使用的肾虚动物造模方法^[47]。王宇航等^[48]对大鼠予以连续肌注30 mg·kg⁻¹氢化可的松9 d,同时每天在水温(10±1)℃的游泳池(150 cm×80 cm×40 cm)中游泳10 min。一方面游泳造成大鼠体力下降,产生疲劳;另一方面,肌注激素后大鼠出现精神萎靡、毛色光泽减退、眯眼、喜扎

堆等肾虚症状。综合造模前后大鼠的变化,说明此模型能部分模拟肾虚型CFS的临床表现。但使用药物造模不符合中医对疾病病因病机的理解,故有效性还有待考据。

病证结合中医模型在现代医学、中医理论指导下构建,具有可动态观察、造模因素全面、模型与临床实际更贴合等优势,被广泛运用于多种疾病基础

研究^[49]。目前关于CFS的病证结合模型类型较少,接下来应在中医理论指导下结合CFS自身特点,构建更多体现中医特色、符合中医思维、具有良好的稳定性和可重复性的动物模型。基于方证对应原则,还可对造模动物采取方药反证^[50],不仅能检验模型建立成功与否,还能为CFS的中医药治疗提供新思路。现有CFS动物模型对比分析见表3。

表3 现有CFS动物模型对比分析

Table 3 Comparative analysis of existing CFS animal models

动物模型	模型特点	类别	造模对象	造模方法	临床吻合度
免疫诱导模型	优点:易于操作,可控性好,在临床症状与病理特征上吻合度高; 缺点:重复性一般,对实验剂量要求严格,动物死亡率高	革兰氏阴性菌脂多糖诱导 ^[19]	雌性 C57 BL/6 小鼠	单次剂量注射造模, LPS 3 mg·kg ⁻¹ 经腹腔一次性注射联合负重(5% 体重)游泳 20 min	符合西医临床表现①②⑨, 吻合度 42.5%
		布鲁氏菌抗原溶液诱导 ^[21]	雌性 BALB/c 小鼠	2 周 1 次单只小鼠腹腔注射 BA 抗原溶液 0.2 mL, 注射 6 次, 共 12 周	符合西医临床表现①②⑨, 吻合度 42.5%
		聚肌胞诱导 ^[25-26]	雌性 C57 BL/6 小鼠	单次剂量注射造模, Poly I: C 20 mg·kg ⁻¹ 经腹腔一次性注射	符合西医临床表现①②⑨, 吻合度 42.5%
			雄性 ICR 小鼠	单次剂量注射造模, Poly I: C 20 mg·kg ⁻¹ 经腹腔一次性注射	符合西医临床表现①②⑤⑧, 吻合度 50%; 符合中医临床表现①②③⑦, 吻合度 68%
应激模型	优点:病理特征与临床患者高度相似,有进一步研究的可行性; 缺点:缺乏基于临床的病理生理特征作参考	肾上腺切除模型 ^[26]	雄性 ICR 小鼠	氯胺酮麻醉下行双侧肾上腺切除术	符合西医临床表现①②③⑦⑩, 吻合度 70%; 符合中医临床表现①②③⑥, 吻合度 68%
		强迫游泳实验 ^[34-35]	雄性白化小鼠	水温(22±3) °C 的玻璃罐中每天游泳 10 min, 持续 21 d	符合西医临床表现①②⑤⑦⑨, 吻合度 57.5%
			雄性 ICR 小鼠	水温 23~25 °C 塑料圆筒中负重(5% 体重)强迫游泳 6 min, 持续 25 d	符合西医临床表现①②⑤⑦, 吻合度 55%
病证结合中医模型	优点:操作简便,可重复性高,与CFS发生发展过程有相似性; 缺点:在模拟除疲劳以外症状上具有一定局限性	慢性约束应激 ^[40-42]	雄性 Wistar 大鼠	自制束缚筒内束缚 3 h, 持续 2 周	符合西医临床表现①②⑤, 吻合度 47.5%; 符合中医临床表现①②⑤⑦, 吻合度 56%
		三劳模型 ^[43]	雄性 C57 BL/6J 小鼠	圆柱形约束器中每天束缚 3 h, 持续 15 d	符合西医临床表现①②④⑤, 吻合度 55%; 符合中医临床表现①②④⑦, 吻合度 56%
			雄性 ICR 小鼠	每天在通风管中限制活动 8 h, 在 5、10、15 d 进行观察	符合西医临床表现①②⑦, 吻合度 47.5%
			雄性 BALB/c 小鼠	单日让发情期雌鼠和雄鼠合笼; 双日常温下被迫游泳 30 min; 每天不定时夹尾激怒 30 min, 造模 14 d	符合西医临床表现①②, 吻合度 40%; 符合中医临床表现①②③⑦⑧, 吻合度 76%
脾虚模型 ^[44]	优点:具有“证”的动态观察性,造模因素全面,模型与临床实际更贴合,造模成功率高; 缺点:相兼证候上可控性一般,存在割裂病证内在联系的弊端,仅以动物表征为评价标准,缺乏对四诊信息的客观化采集,模型评价手段局限	肝郁脾虚模型 ^[44]	雄性 SD 大鼠	水温(26±1) °C 的圆筒内强迫游泳 15 min 或置于束缚袋中约束 3 h; 单日进食, 双日禁食, 造模 21 d	符合西医临床表现①②⑤⑨, 吻合度 50%; 符合中医临床表现①②③④⑦⑧, 吻合度 84%
		脾肾阳虚模型 ^[45]	雄性 SD 大鼠	力竭游泳+慢性束缚隔日交替进行, 持续 4 周; 番泻叶水煎剂 0.1 mL·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 灌胃, 持续 4 周	符合西医临床表现①②, 吻合度 40%; 符合中医临床表现①②③④⑧, 吻合度 76%
		脾虚模型 ^[46]	雄性 SD 大鼠	单日禁食, 双日正常饮食; 25 °C 水温中负重游泳至耐力极限; 每日定时夹尾刺激, 造模 4 周	符合西医临床表现①②③⑧⑨, 吻合度 65%; 符合中医临床表现①②③⑦⑧, 吻合度 76%
		肾虚模型 ^[48]	雄性 Wistar 大鼠	氢化可的松 30 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ 肌肉注射, 持续 9 d; 水温(10±1) °C 的游泳池中游泳 10 min, 持续 9 d	符合西医临床表现①②⑨, 吻合度 42.5%; 符合中医临床表现①②③⑧, 吻合度 68%

4 CFS动物模型的评价指标

现有模型多通过观察疲劳症状的表现程度来评价造模是否成功。动物实验中常运用力竭游泳时间、不动时间、旷场实验、鼠尾悬挂实验、水迷宫实验等客观评定疲劳程度(身体疲劳和心理疲劳),结合动物的一般情况如运动活性、精神状态、体质量、食欲、大便性状等进行综合评定。

CFS诊断目前没有特异性指标,动物实验在制备模型的同时,常进行可能的机制探究及生化指标

检测。主要机制及指标涉及免疫系统、神经内分泌系统、氧化应激及基因和蛋白质组学方面^[51]。病理状态下IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎性细胞因子水平明显升高^[52]。HPA轴作为压力反应调节器,其产物皮质醇水平被认为与疲劳密切相关,但目前无法明确支持CFS中的皮质醇过高的假说^[53]。血清素、肾上腺素、去甲肾上腺素^[54-55]等单胺类神经递质亦是常用检测指标。有关CFS动物模型的相关指标见表4。

表4 CFS动物模型指标分析

Table 4 CFS animal model index analysis

类别	指标	采样部位	变化
疲劳程度	运动活性、握力测试、力竭游泳时间、不动时间、旋杆脱落实验、旷场实验、鼠尾悬挂实验、水迷宫		疲劳随时间加重
促炎细胞因子	IL-1 β 、IL-6、TNF- α	血清、大脑	升高
转化生长因子	TGF- β	血清、大脑	升高
应激激素	皮质醇	血清	不明确
单胺类神经递质	5-HT、肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺	大脑	不明确
氧化应激标志物	3-NT、4-HNE	大脑	升高
	丙二醛(MDA)	血清	升高
线粒体功能	腓肠肌结构、PDH	腓肠肌	下降
基因及蛋白组学	腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)信号通路、NLRP3/Caspase-1信号通路、脑源性神经营养因子(BDNF)/络氨酸激酶B(TrkB)信号通路		
其他	病原微生物、脑萎缩、肝损伤、肠道菌群失调		

5 小结

人类疾病动物模型的构建与使用是生物医学研究的重要内容,有助于深入探索疾病发生、发展规律和研究防治措施。由于CFS致病因素广泛且临床症状差异性较大、造模方法未统一等,将直接影响动物模型的构建及后续研究的科学性。因此,在现有造模方法的基础上应进一步展开各模型之间的对比分析,确定恰当造模因素,积极探索更客观的检测指标,提高模型与临床实际吻合度,随着模型构建的逐步完善及模型评价体系的标准化,其应用前景将更为广泛。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] STRASSHEIM V, NEWTON J L, COLLINS T. Experiences of living with severe chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis [J]. Healthcare (Basel), 2021, 9(2): 168.

[2] LIM E J, SON C G. Review of case definitions for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS)[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 289.

[3] SIOMKO J, NEWTON J L, KUJAWSKI S, et al. Prevalence and characteristics of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) in Poland: A cross-sectional study [J]. BMJ Open, 2019, 9(3): e023955.

[4] SMITH M E, HANEY E, MCDONAGH M, et al. Treatment of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: A systematic review for a National Institutes of Health pathways to prevention workshop [J]. Ann Intern Med, 2015, 162(12): 841-850.

[5] 李匡时, 邹忆怀, 李宗衡, 等. 慢性疲劳综合征病机及辨证治疗研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(11): 1245-1249.

[6] MISSAILIDIS D, ANNESLEY S J, FISHER P R. Pathological mechanisms underlying myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome [J]. Diagnostics (Basel), 2019, 9(3): 80.

[7] LIM E J, AHN Y C, JANG E S, et al. Systematic review and Meta-analysis of the prevalence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME)[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 100.

[8] 王艳云, 刘改芬. 心理行为干预对慢性疲劳综合征患

- 者的康复作用[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2012,21(4):343-345.
- [9] KÖNIG R S, ALBRICH W C, KAHLERT C R, et al. The gut microbiome in myalgic encephalomyelitis (ME)/chronic fatigue syndrome (CFS) [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:628741.
- [10] 张兆晖,李立华. 中医治疗慢性疲劳综合征的新进展[J]. 世界中医药, 2021, 16(6):991-995.
- [11] 彭程云,田明月,胡斌,等. 针刺治疗慢性疲劳综合征研究进展[J]. 中医临床研究, 2021, 13(18):86-88.
- [12] 彭敏,马宏博,司国民. 慢性疲劳综合征中医证候及证素特点的文献评析[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(6):691-693.
- [13] FUKUDA K, STRAUS S E, HICKIE I, et al. The chronic fatigue syndrome: A comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group [J]. *Ann Intern Med*, 1994, 121(12):953-959.
- [14] CARRUTHERS B M, VAN DE SANDE M I, DE MEIRLEIR K L, et al. Myalgic encephalomyelitis: International consensus criteria [J]. *J Intern Med*, 2011, 270(4):327-338.
- [15] Royal College of Physicians. Myalgic encephalomyelitis (or encephalopathy)/chronic fatigue syndrome: Diagnosis and management [M]. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE), 2021:11-13.
- [16] 田硕,曹利华,苗明三,等. 基于临床中西医病症特点的中医药动物模型评价新方法[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6):165-169.
- [17] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:361.
- [18] 王天芳,张翠珍,王琳. 慢性疲劳综合征的病因病机及辨证论治[C]//世界中医药学会联合会亚健康专业委员会成立暨首届世界亚健康学术大会论文集. 北京:出版者不详, 2006:80-87.
- [19] ZHANG Z T, DU X M, MA X J, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in lipopolysaccharide-induced mouse fatigue and its relevance to chronic fatigue syndrome [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):71.
- [20] CHAVES-FILHO A, MACEDO D S, DE LUCENA D F, et al. Shared microglial mechanisms underpinning depression and chronic fatigue syndrome and their comorbidities [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 372:111975.
- [21] HE Q, SAWADA M, YAMASAKI N, et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and neurogenesis in a mouse model of chronic fatigue syndrome, and the treatment with kampo medicine [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(1):110-115.
- [22] BJØRKLUND G, DADAR M, PIVINA L, et al. Environmental, neuro-immune, and neuro-oxidative stress interactions in chronic fatigue syndrome [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(11):4598-4607.
- [23] BIANCHI F, PRETTO S, TAGLIABUE E, et al. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(10):747-756.
- [24] SEPÚLVEDA N, CARNEIRO J, LACERDA E, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome as a hyper-regulated immune system driven by an interplay between regulatory T cells and chronic human herpesvirus infections [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2684.
- [25] VASIADI M, NEWMAN J, THEOHARIDES T C. Isoflavones inhibit poly(I:C)-induced serum, brain, and skin inflammatory mediators - relevance to chronic fatigue syndrome [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11:168.
- [26] LEE J S, JEON Y J, PARK S Y, et al. An adrenalectomy mouse model reflecting clinical features for chronic fatigue syndrome [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1):71.
- [27] RAANES E, STILES T C. Associations between psychological and immunological variables in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: A systematic review [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12:716320.
- [28] WATANABE Y. Brain science on myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome [J]. *Brain Nerve*, 2018, 70(11):1193-1201.
- [29] NODA M, IFUKU M, HOSSAIN M S, et al. Glial activation and expression of the serotonin transporter in chronic fatigue syndrome [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9:589.
- [30] TOMIC S, BRKIC S, LENDAK D, et al. Neuroendocrine disorder in chronic fatigue syndrome [J]. *Turk J Med Sci*, 2017, 47(4):1097-1103.
- [31] TRAUTMANN A. [Mechanisms underlying chronic fatigue, a symptom too often overlooked II - From deregulated immunity to neuroinflammation and its consequences] [J]. *Med Sci (Paris)*, 2021, 37(11):1047-1054.
- [32] ROERINK M E, ROERINK S, SKOLUDA N, et al. Hair and salivary cortisol in a cohort of women with chronic fatigue syndrome [J]. *Horm Behav*, 2018, 103:1-6.
- [33] MONTROYA J G, HOLMES T H, ANDERSON J N, et al. Cytokine signature associated with disease severity

- in chronic fatigue syndrome patients [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(34):E7150-E7158.
- [34] THAKUR V, JAMWAL S, KUMAR M, et al. Protective effect of hemin against experimental chronic fatigue syndrome in mice: Possible role of neurotransmitters [J]. Neurotox Res, 2020, 38(2): 359-369.
- [35] OHBA T, DOMOTO S, TANAKA M, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome induced by repeated forced swimming in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(7):1140-1145.
- [36] BOGDANOVA O V, KANEKAR S, D'ANCI K E, et al. Factors influencing behavior in the forced swim test [J]. Physiol Behav, 2013, 118:227-239.
- [37] WOOD E, HALL K H, TATE W. Role of mitochondria, oxidative stress and the response to antioxidants in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: A possible approach to SARS-CoV-2 'long-haulers'? [J]. Chronic Dis Transl Med, 2021, 7(1):14-26.
- [38] FERNANDEZ-GUERRA P, GONZALEZ-EBSEN A C, BOONEN S E, et al. Bioenergetic and proteomic profiling of immune cells in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients: An exploratory study [J]. Biomolecules, 2021, 11(7):961.
- [39] GUEDRI K, FRIH H, CHETTOUM A, et al. Chronic restraint stress induced neurobehavioral alterations and histological changes in rat [J]. TEH, 2017, 9(2): 123-129.
- [40] 王天芳. 慢性束缚致慢性疲劳动物模型的研制及其行为学观察 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999(5):25.
- [41] PARK S H, JANG S, LEE S W, et al. *Akebia quinata* Decaisne aqueous extract acts as a novel anti-fatigue agent in mice exposed to chronic restraint stress [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 222:270-279.
- [42] WANG Z, XIA T, JIN S, et al. Chronic restraint stress-induced muscle atrophy leads to fatigue in mice by inhibiting the AMPK signaling pathway [J]. Biomedicines, 2021, 9(10):1321.
- [43] 余曦明, 陈思源, 余望怡. 中医慢性疲劳综合征动物模型的建立与评价 [J]. 中国医药科学, 2014, 4(2): 22-24.
- [44] 谢亚娜, 嵇波, 张琴, 等. 电针对肝郁脾虚型慢性疲劳综合征大鼠血清炎症因子及肠道菌群的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(11):63-68.
- [45] 贺恋词. 基于分子对接方法探究药膳神仙粥对慢性疲劳综合征脾肾阳虚证大鼠的免疫调节机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [46] 冯玉华, 杨育同, 王坤芳. 脾气虚慢性疲劳型亚健康状态大鼠模型的构建及评估 [J]. 山西中医学院学报, 2015, 16(3):21-23.
- [47] 崔玮, 孙理军. 基于中医理论探讨肾虚动物模型的造模方式 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11):2737-2739.
- [48] 王宇航, 魏小丽, 宋石龙, 等. 机械推拿对慢性疲劳综合征肾虚型大鼠行为学及血清 IL-1 β 、IL-6 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5):1235-1237.
- [49] 胡齐帅, 张晓艳. 病证结合动物模型研究进展 [J]. 中医学报, 2022, 37(2):299-303.
- [50] 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.
- [51] 马巧琳, 胡斌, 王钟磊. 针刺治疗慢性疲劳综合征的实验指标选取及机制研究现状 [J]. 针刺研究, 2021, 46(11):980-984.
- [52] BLUNDELL S, RAY K K, BUCKLAND M, et al. Chronic fatigue syndrome and circulating cytokines: A systematic review [J]. Brain Behav Immun, 2015, 50: 186-195.
- [53] POWELL D J, LIOSSI C, MOSS-MORRIS R, et al. Unstimulated cortisol secretory activity in everyday life and its relationship with fatigue and chronic fatigue syndrome: A systematic review and subset Meta-analysis [J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(11):2405-2422.
- [54] 刘占东, 吴岩珏, 李任, 等. 慢性运动性疲劳大鼠海马多种单胺类递质水平变化规律的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(6):513-515.
- [55] STRAHLER J, FISCHER S, NATER U M, et al. Norepinephrine and epinephrine responses to physiological and pharmacological stimulation in chronic fatigue syndrome [J]. Biol Psychol, 2013, 94(1):160-166.

[责任编辑 王鑫]