

◆文献综述研究◆

慢性疲劳综合征动物模型研究概况

林基伟, 汪栋材, 吴海滨, 古炀晖, 李海文, 徐明珍

深圳市中医院治未病中心, 广东 深圳 518000

[摘要] 本综述系统回顾了既往发表的慢性疲劳综合征(Chronic fatigue syndrome, CFS)相关文献报道, 梳理、总结CFS的现有造模方法。包含单因素造模及多因素刺激造模, 其中单因素造模方法有强制游泳、慢性束缚、跑台训练, 多因素造模方法有力竭游泳加睡眠剥夺, 冷水游泳加束缚应激以及束缚跑台法等。目前大多数文献主要以多重应激源刺激制备CFS模型, 能更好、更全面的模拟慢性疲劳人群的病理状态。

[关键词] 慢性疲劳综合征(CFS); 动物模型; 综述

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2019)03-0019-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.03.006

An Overview of Animal Models with Chronic Fatigue Syndrome

LIN Jiwei, WANG Dongcai, WU Haibin, GU Yanghui, LI Haiwen, XU Mingzhen

Abstract: The paper systematically reviews the published literature and summarizes the existing modeling methods for Chronic Fatigue Syndrome (CFS), including single-factor model and multi-factor stimulation model. Forced swimming, chronic restraint, and treadmill training are involved in single-factor model. Exhaustive swimming and sleep deprivation, cold water swimming plus restraint stress, as well as restraint treadmill, etc. are involved in multi-factor stimulation model. At present, most of the literature mainly focus on modeling for CFS through the multi-factor stimulation model, which can better and more comprehensively simulate the pathological state of patients with chronic fatigue.

Keywords: Chronic Fatigue Syndrome(CFS), Animal models, Review

慢性疲劳综合征(Chronic fatigue syndrome, CFS), 也称为系统性劳累不耐受疾病(Systemic exertion intolerance disease, SEID), 是指以持续或反复发作6个月以上的较重程度疲劳为主要表现, 且临床相关体格检查、实验室指标、影像学检查无明显异常的一组症候群。常伴随系列类流感症状、认知功能损害、精神异常、睡眠障碍等非特异性症状。CFS是一种复杂且有时存在争议的症候群, 是人体长期处于自我感觉疲劳或极度疲劳状态下的综合表现, 其特征是不能解释的持续性、复发性疲劳。本病缺乏客观的临床或实验室检查指标, 诊断方面有一定困难, 需排除其他可能引起疲劳的相关疾病后, 才能对疾病急性诊断。CFS的流行程度尚不清楚, 证明诊断缺乏特异性指标。美国国家科学院医学研究所估计, 在美国大约有83.6~250万人伴有CFS, 每年造成的直接和间接经济损失高

达170~240亿美元^[1]。

中医对疲劳进行的相关描述最早可见于《黄帝内经》。对于“疲劳”状态, 不同朝代有不同的术语描述形式。最早采用“疲劳”一词的是《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治第六》, 提及“问曰: 血痹病从何得之? 师曰: 夫尊荣人, 骨弱肌肤盛, 重因疲劳, 汗出, 卧不时动摇, 加被微风, 遂得之”。此后一直沿用该词, 到宋代以后开始不断频繁使用。中医认为CFS有气血两虚、脾肾阳虚、精髓空虚、肝郁脾虚、肝肾阴虚、肝火亢盛等证型。中医根据CFS的不同临床表现, 辨证分型, 随证施治, 能收获较好的疗效。现代医学对CFS的确切病因仍不清楚, 但CFS动物造模方法很多, 迄今为止, 国内外研究者主要采用躯体疲劳方式, 如强制游泳、跑台训练来造模, 以及通过慢性束缚、不定期禁食、夹尾、睡眠剥夺等来诱

[收稿日期] 2018-10-29

[基金项目] 深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201612081)

[作者简介] 林基伟(1989-), 男, 主治医师, 研究方向: 慢性病养生管理。

[通信作者] 徐明珍, E-mail: 1048782137@qq.com。

导心理疲劳。但未有公认、统一的造模方法,所以在动物致病模型方面更加需要进行综合梳理,有利于CFS的未病预防、防止传变的机制研究。

1 CFS的单因素造模方法

应激是机体为了适应外界各种强烈的或有害的刺激,身体反应出以交感神经肾上腺髓质和下丘脑-垂体-肾上腺皮质反应为主的非特异性全身反应。适度应激有利于人体的适应能力,可以维持机体内环境稳定。应激大体可以分为躯体应激和心理应激2类,但现实绝大多数应激表现为这2类应激综合的结果,只能相对指出某一应激以躯体或者心理因素为主^[2]。CFS单因素造模,多数只能从单方面侧重模型的构建。如单纯的强制游泳法,只能从体力疲劳单方面侧重构造模型;慢性束缚模型则主要通过心理应激来构造CFS模型,它们均能从某一方面模拟人类的疾病状态。过度训练构造的模型能从运动能力维度反应CFS的状态,心理应激模型主要从免疫体液系统来揭示应激产生的机制^[3]。单因素造模的模型都有较好的可操作性和重复性。此外,单因素造模的应激源有可控性,通过控制应激源刺激的幅度、频度、持续时间,能够研究应激源对应激反应及对机体影响的量效关系。常见的单因素造模方法有以下几种。

1.1 强制游泳 强制游泳是CFS单因素造模的代表方法。近年来研究多采用冷水强制游泳,涵盖多方面刺激,如温度、体力及精神等。由于慢性疲劳造成因素不单纯是生理方面的肌肉疲劳,还有心理疲劳在起作用,所以强制冷水游泳法,既有不断对体能进行消耗的躯体刺激,还有冷水进行心理应激刺激,所以,强制冷水游泳法诱导的模型能更好趋同于慢性疲劳疾病的现实环境。聂晓莉等^[3]通过强制游泳方法制作大鼠慢性疲劳模型,将大鼠于水温(24±1)℃,水深30cm进行游泳,每天强制游泳2h,连续5周。每亚组大鼠游泳后换水,各亚组大鼠分别在1~5周的周末测定其力竭游泳时间。蒲荣^[4]采用慢性负重力竭游泳法构建慢性疲劳大鼠模型,大鼠负重自己体质量的5%重量在水温(30±2)℃,水深50cm水桶里进行力竭游泳,每天1次,共21天。大鼠浮在水面不动时,用棒驱赶使其维持运动状态。游泳动作明显失调、不能再坚持,且沉入水底10s不能回到水面时视作力竭。

1.2 慢性束缚 慢性束缚应激属于非损伤性刺激,用于CFS的造模,主要是源于长期反复的束缚能造成挣扎、急躁、愤怒、抑郁、绝望等心理及行为变化。虽然只有躯体活动受限,但束缚过程中引起的机体功能紊乱,与人类躯体及精神疲劳这一类心身疾病过程相似。王天芳等^[5]根据大鼠喜钻洞的特性,从行为学角度探究可调节束缚筒对疲劳大鼠的体力、情绪、记忆力等方面的影响。将大鼠头向通气口置入,使动物钻进束缚筒内,关闭闸门并调节玻璃瓶改变大鼠的活动空间,并调节到其不产生强烈反抗的紧张程度,平架在木板上。每天束缚开始时间不同,随机确定,每次束缚3h。丁秀芳^[6]将实验大鼠置于

特制的束缚制动筒内,固定身体与尾部,使之不能随意活动。每天束缚制动1次,造模时间随机,持续时间从第1天的1h逐渐增至每天6h,连续21天,束缚制动期间禁食、禁水。张斌等^[7]将大鼠置于有机玻璃制成的束缚管中,通风良好确保大鼠能够自由呼吸,束缚过程中不会造成躯体上的伤害,每天束缚应激6h,连续14天,期间禁水禁食。

1.3 跑台训练 跑台训练是通过强制性的跑台被动跑步,大鼠不断持续的跑步,造成躯体性疲劳。跑台的训练造模需要前期进行跑步训练,现多用于运动型疲劳造模,中医现代科学研究的劳力造模也多采用跑台训练。史丽萍等^[8]对实验小鼠进行疲劳建模,实验前小鼠先熟悉跑台,以0.17m/s进行跑台运动训练,每天5~10min,连续2天,以大鼠力竭不能继续跑动,且下跑台后伏地喘息暂时无逃避反应为标准。实验期间,饮水及饲料不加限制。钟雨^[9]对试验大鼠先进行为期3天的跑台适应训练,每天10m/min,第2天适应速度为15m/min,第3天为18m/min。适应后进行为期6天的跑台力竭测试,力竭速度为18m/min,力竭标准为小鼠连续掉落电网被电击,始终处于跑道后1/3段,静息成腹卧位,呼吸急促,无法完成跑台任务。

1.4 电刺激 电刺激包括电脉冲刺激和进食电刺激,都是通过电刺激使大鼠躯体和神经长期处于紧张状态,造成其应激性疲劳。张俊慧等^[10]通过渗盐水浸湿造模组大鼠2足踝关节,电疗带固定接电针仪,采用频率10Hz,强度1.5V的随机波,每次刺激10min,每天2次,共2周。邹军等^[11]对大鼠采用波宽2ms的电脉冲,1mA电流强度的电击,每天15次,每次时间间隔20s。进食电刺激法为喂养大鼠时,予棍棒敲打鼠笼30min,或用电路板放电4次,每次持续3min,规定每天定时喂食2次^[12]。

2 CFS的多因素造模方法

由于目前CFS病因尚未明确,病理机制不明晰。单一因素造模较难说明CFS的病理机制。现代研究多采用多因素造模,其中综合的造模方法有力竭游泳、束缚限制、跑台训练、睡眠剥夺、悬吊游泳、冷水游泳、夹尾巴刺激、拥挤试验等,由2种及以上造模方法组合造模。兼顾躯体与精神、心理压力方面的应激,更符合CFS的致病影响因素。

2.1 力竭游泳+剥夺睡眠 赵丽^[13]采用剥夺大鼠睡眠20h和力竭游泳法建立慢性疲劳大鼠模型。每天下午1点将大鼠饲养于30cm×20cm×15cm的塑料盒,注入2cm高的清洁水,使水刚没过大鼠四肢,大鼠能够自由进食饮水但无法睡眠,至次日上午9点将大鼠取出,剥夺睡眠共20h。每天上午9点将大鼠放入水深50cm、水温(25±1)℃的塑料游泳池中行1次力竭游泳,力竭标准为大鼠头部沉入水中10s而不能浮出水面,持续3周。

2.2 冷水游泳+束缚应激 张文静^[14]用冷水游泳加束缚应激造模。每天上午将大鼠放置于水深40~45cm、高90cm、直径

60 cm, 水温维持在 $(15 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的水桶内强制游泳。力竭沉入水后将大鼠捞出, 用布擦拭, 风筒吹风干燥后放回笼中。下午将大鼠强制束缚, 放置于自制的束缚筒1 h, 持续造模21天。冷水游泳力竭标准为大鼠游泳动作消失, 水淹鼻尖, 身体下沉, 至再次浮出水面的时间超过10 s。杨启昭^[15]采用同样造模方法进行造模, 不同的是采用单号日期束缚, 双号日期冷水游泳交替, 持续14天。

2.3 束缚+跑台 尹喜玲等^[16]上午将大鼠束缚, 下午进行跑台训练, 连续12天。束缚每3天增加0.5 h, 时间分别为1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h。每天以10 m/min的速度做10 min的跑台运动。然后进行力竭训练, 以10 m/min的速度完成10 min的运动后, 加速至20 m/min进行20 min, 30 m/min进行30 min, 并依次不断递增跑速, 直至大鼠力竭。

2.4 束缚+睡眠紊乱+拥挤+跑台 张杨^[17]采用束缚+睡眠紊乱+拥挤+跑台建立CFS大鼠模型。每天上午11点开始强制大鼠以20 m/min的速度进行1 h跑台运动。下午2点将大鼠放入实验室自制的大鼠尿液收集-束缚筒, 大鼠头部位于筒前端锥形通气口, 保证大鼠能够正常呼吸, 并用螺丝分别将前端和末端口封住, 使大鼠活动受限, 束缚时间持续2 h。除去束缚及强制运动时间外, 每天拥挤生活时间为21 h, 饲养在35 cm × 25 cm × 15 cm的饲养箱中, 每天晚上8点, 将大鼠置于单独房间并打开日光灯, 同时施加噪音刺激。第2天早上8点关闭噪音及灯光。

2.5 束缚+力竭游泳+夹尾巴刺激 王娜娜^[18]、叶双双^[19]将大鼠置于束缚筒中, 为避免大鼠产生适应性, 每3天依次增加束缚时间, 分别为30 min、45 min、60 min、75 min、90 min, 造模21天, 其间隔天交替进行力竭游泳和夹尾激怒刺激, 单日进行夹尾激怒和慢性束缚, 用夹子夹取大鼠尾巴, 距离尾根1~2 cm, 以其可耐受且不脱落为度, 双日进行慢性束缚和力竭游泳, 把大鼠放于水温 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 水深约45 cm的游泳箱内, 监测大鼠自下水游泳至力竭(头端沉入水下3 s未能回到水上面或游泳动作显著失调为力竭)的时长, 每天进行的时间不相同。

2.6 睡眠剥夺+力竭游泳+慢性束缚刺激 金小千^[20]对大鼠进行睡眠剥夺、力竭游泳结合束缚造模。每天中午12点将笼中底层垫料撤除放入清水, 水深以没过鼠头及四肢为准, 使大鼠无法正常睡眠, 次日早上8点将大鼠取出, 共剥夺睡眠20 h。随后每只大鼠按照体质量的5%进行鼠尾负重游泳, 水深35 cm、水温 21°C , 力竭游泳10天行鼠尾10%负重游泳, 每次时间为20~25 min, 至鼠头没于水面10 s后将大鼠取出泳池。随后再以一次性束缚袋进行束缚, 以铁丝在袋口进行结扎, 静置于地面2 h后将大鼠取出, 持续21天。

2.7 其他常用应激方法 陈传伟^[21]用强制冷水游泳加夹尾巴刺激进行疲劳造模。此外, 尹喜玲等^[16]将悬吊游泳结合负重游泳构建CFS模型。高春风^[22]则采用多种应激随机组合进行刺激

造模, 每天将大鼠放于游泳缸中负重约5%力竭游泳1次。游泳后采用不可预知的应激方法, 刺激方式有12 h禁食, 12 h禁水, 通宵照明, 夹尾1 min, 110 dB超声刺激持续1 h, 1 mA, 30 V足底电击5次, 每隔1 min刺激1次, 每次持续30 s。以上刺激每天随机给予2种, 使大鼠不能预料刺激的发生, 以避免产生适应。

3 中医分型的CFS造模方法

中医药辨治慢性疲劳, 多数分型进行辨证治疗。现有对CFS的证型进行疲劳造模的有气虚证、肝郁脾虚证、以及形劳、神劳、房劳的三劳模型, 均能体现中医的辨证论治特点。在具体的实验当中, 更能体现中医辨证治疗的干预机制。

3.1 气虚型慢性疲劳状态模型 冯玉华等^[23]用饮食失调、疲劳过度、情绪失调的方法构建大鼠模型。单日禁食, 双日正常饮食, 使大鼠饥饱失常、饮食不节, 期间强迫其负重游泳20 min。游泳3周, 休息1周, 水温 25°C 左右, 游泳过程, 防止溺死, 及时捞出体力不支大鼠。另外, 每天下午采用夹尾方法激惹大鼠, 造成情志失调。宋石龙^[24]先将大鼠适应性饲养1周后, 随机分配成空白对照组、模型组和治疗组, 模型组和治疗组采用单日冷水游泳, 水温为 $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每次游泳10 min, 双日灌精猪油, 每天2次, 每次2 mL。每天食大白菜, 不限量。脾气虚型大鼠造模时间共20天。

3.2 肝郁型慢性疲劳状态模型 丁秀芳^[25]将大鼠置于特制的束缚制动筒内, 固定身体与尾部, 使之不能随意活动。每天束缚制动1次, 造模时间随机, 持续时间从第1天的1 h逐渐增至每天6 h, 连续21天。在束缚制动期间禁食、禁水。赵博等^[25]将大鼠在光线自然、安静的实验室环境里适应性喂养7天后, 随机行禁食、禁水、昼夜颠倒、冷水游泳、热烘、夹尾、电击、束缚、倾斜鼠笼、水平振荡等应激方法, 28天内, 每天1种应激方法刺激, 而且相邻2天不重复同一种方法, 同种刺激在这个周期内不超过4次, 使大鼠不能预料刺激的发生。

3.3 三劳刺激的疲劳状态模型 余曦明等^[26]对小鼠用游泳+夹尾+合笼等不同刺激, 构建中医的形劳、神劳、房劳的三劳模型。单日让发情期模型雌鼠与之合笼, 而且每次合笼都新换一批雌鼠; 双日让其在常温下游泳, 每次30 min; 每天用夹尾激怒法刺激小鼠, 刺激启动时间不固定, 每次30 min, 连续造模14天。在游泳过程中, 木棒驱赶小鼠使其维持运动状态。当小鼠运动协调性明显下降, 让其休息3 min, 再放入池中继续进行游泳。

4 小结

综上, 目前大多数研究者主要采用躯体疲劳(强制游泳、跑台训练等)和心理疲劳(慢性束缚、睡眠剥夺、电刺激、夹尾刺激等)的方法造模。其中, 多数以多重应激源刺激构建CFS模型。通过多重因素刺激造模, 能有效避开各种对实验设备要求高或对动物较高致伤的刺激。有较高的可操作性和稳定性,

能在行为表现上与疾病症状相一致,造模手段与病因相关联,造模所致的行为学改变能持续足够长的时间。近年来,CFS的动物造模在不断地贴近该病的生理和病理机制,对慢性疲劳的机理研究及抗疲劳干预的相关评价提供的证据更加可靠,但仍需要在动物造模的规范性、统一性方面进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Committee on the Diagnostic Criteria for Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome, Board on the Health of Select Populations, Institute of Medicine. Beyond Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome[M]. Washington DC: The National Academies Press(US), 2015.
- [2] 张丽,张振贤,黄瑶,等.不同慢性应激综合模式下慢性疲劳动物实验研究概况[J].中国中西医结合杂志,2016,36(8):1015-1020.
- [3] 聂晓莉,李晓勇,靳文,等.慢性疲劳大鼠模型的建立及其对肝功能的影响[J].热带医学杂志,2007(4):323-325,344.
- [4] 蒲荣.艾灸对慢性疲劳大鼠海马炎症细胞因子和小胶质细胞影响的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [5] 王天芳,陈易新,季绍良,等.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(5):26-30.
- [6] 丁秀芳.慢性束缚应激对大鼠LC-NE系统的影响及逍遥散的干预作用的研究[D].广州:南方医科大学,2013.
- [7] 张斌,张乔,马英男.慢性束缚应激对大鼠睡眠时相的影响及酸枣仁汤的干预作用[J].中医药信息,2014,31(4):126-129.
- [8] 史丽萍,马东明,解丽芳,等.力竭性运动对小鼠肝脏超微结构及肝糖原肌糖原含量的影响—“肝为罢极之本”的实验研究[J].辽宁中医杂志,2005,32(9):971-973.
- [9] 钟雨.黄秋葵抗疲劳活性部位筛选及其生化机制研究[D].天津:天津科技大学,2015.
- [10] 张俊慧,胡兵,沈思钰,等.复方消疲悦意饮对实验性慢性疲劳大鼠行为学的影响[J].医学研究生学报,2008,21(8):817-819.
- [11] 邹军,苑建齐,吕爽,等.运动配合中药及艾灸对慢性疲劳综合症大鼠行为及外周血淋巴细胞凋亡的影响[J].时珍国医国药,2010,21(9):2214-2217.
- [12] Chi A, Kang C, Zhang Y, et al. Immunomodulating and antioxidant effects of polysaccharide conjugates from the fruits of Ziziphus Jujube on Chronic Fatigue Syndrome rats[J]. Carbohydr Polym, 2015, 122: 189-196.
- [13] 赵丽.艾灸对慢性疲劳模型大鼠神经内分泌免疫系统的影响[D].广州:广州中医药大学,2012.
- [14] 张文静.基于“健脾益气”法探讨针刺脾俞穴联合人参皂苷 Rg3 抗疲劳机制的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2016.
- [15] 杨启昭.背俞穴埋线干预慢性疲劳综合征大鼠的作用机制研究[D].广州:广州中医药大学,2015.
- [16] 尹喜玲,肖颖,李可基.多重应激建立慢性疲劳综合征动物模型的研究[J].中国运动医学杂志,2005,24(4):452-456.
- [17] 张杨.运动干预下对大鼠慢性疲劳的代谢机制探索与康复评价[D].西安:陕西师范大学,2017.
- [18] 王娜娜.升阳益胃颗粒对慢性疲劳大鼠骨骼肌SDH及线粒体细胞色素c的影响[D].郑州:河南中医药大学,2017.
- [19] 叶双双.龟鹿益神配方颗粒对慢性疲劳大鼠行为和骨骼肌线粒体的影响[D].郑州:河南中医学院,2014.
- [20] 金小千.不同频率电针背俞穴对CFS大鼠HPA轴及免疫影响与临床研究[D].广州:广州中医药大学,2017.
- [21] 陈传伟.针刺干预慢性疲劳综合征的临床及作用机理研究[D].广州:广州中医药大学,2010.
- [22] 高春风.头针对慢性疲劳综合征大鼠免疫细胞因子的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014.
- [23] 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.
- [24] 宋石龙.机械推拿对慢性疲劳综合征脾虚型大鼠行为学和血清IL-1 β 及IL-6含量的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2010.
- [25] 赵博,柴丽,吴大梅,等.复合多因素方法复制肝郁脾虚证动物模型的实验研究[J].成都中医药大学学报,2013,36(3):10-14,23.
- [26] 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.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)