

不同垫料对 SPF 级 KM 小鼠学习记忆能力的影响^{*}

胡建武 李树梅 梁俊仕 余光祯 李 亮 武会娟 陈禹保

(北京实验动物研究中心, 北京 100012)

摘要:目的 探讨非专业加工制作的麦秸垫料、玉米芯垫料、刨花垫料和纸质垫料对 SPF 级昆明小鼠(KM)学习记忆能力的影响差异,以及不同垫料对小鼠行为学的影响。**方法** 选用 SPF 级 KM 小鼠 24 只,分别使用麦秸垫料、刨花、玉米芯和纸质垫料饲养 8 周后,开展 MORRIS 水迷宫行为学实验,考察其行为学的变化和学习记忆能力的差异。**结果** 麦秸组学习记忆能力增加明显高于刨花组($P<0.05$);水迷宫实验期间,各组增量差异不显著。定位航行实验结果显示,麦秸组第 5 d 的逃避潜伏期显著低于其余三组($P<0.05$),其余时间段差异无显著性;空间探索实验结果显示麦秸组小鼠穿过原平台位置的次数、游泳时间均多于其余三组。**结论** 不同垫料对水迷宫实验中 KM 小鼠的体质量影响较小,麦秸垫料对 KM 小鼠学习记忆能力的影响优于刨花垫料和玉米芯垫料,建议将麦秸垫料作为实验动物接触性垫料推广使用。

关键词:垫料;KM 小鼠;水迷宫实验;学习记忆

中图分类号: Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0013-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.003

垫料是实验动物生存环境中的接触性基础材料,不同的垫料生存环境直接影响实验动物的生理活动,进而影响动物实验结果的准确性,选择不同垫料也是体现动物福利的重要内涵。因此,实验动物国家及地方标准对实验动物垫料的物理性状、化学及生物特性都有明确的规定和要求。目前所知实验动物品种、品系、年龄、性别等对实验动物记忆能力均有不同程度的影响,但未知不同垫料饲养环境对实验动物记忆认知能力是否有影响。为了进一步探索新型麦秸垫料的安全性及其对啮齿类实验动物接触环境的影响,本实验采用 SPF 级昆明小鼠为研究对象,应用 MORRIS 水迷宫行为学实验方法,比较、开发利用新型麦秸垫料和其他 3 种垫料(刨花垫料、玉米芯垫料和纸质垫料)在工作状态下对小鼠学习记忆能力和血液生化指标的影响。为今后开展与改善学习记忆能力相关药物研究的实验动物垫料选择提供参考,也为新型麦秸垫料的安全使用和大力推广提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠(孕 13 d) 8 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],饲养在北京实验动物研究中心屏障设施内[SYXK(京)2015-0046],小鼠自由进食、进水,温度:18~26℃,湿度:38%~50%。维持 12/12 h 明暗交替光照。所有实验操作遵循动物使用相关伦理要求,福利伦理审查批准号:BLARC-2017112401。

1.2 垫料及主要仪器

1.2.1 新型麦秸垫料:利用蒸汽爆破工艺对麦秸秆原料进行爆破,做进一步处理后,进行⁶⁰Co 照射及真空包装后获得新型麦秸垫料。玉米芯垫料、刨花垫料均购自北京科澳协力饲料有限公司;纸质垫料购自北京美绿洲生物科技有限公司。

1.2.2 主要仪器:超净工作台(苏杭);电子天平(Sartorius,BSA220ZS 型);水迷宫(ZS-001MORRIS),ZS-001 MORRIS 水迷宫动物行为分析系统(众实迪

收稿日期:2018-12-17

^{*} 基金项目:北京市科学技术研究院青年骨干项目,项目编号:201626

作者简介:胡建武(1976—),男,兽医师,从事实验动物管理工作。E-mail:hujianwu@blarc.com.cn

通信作者:陈禹保(1963—),男,副研究员,研究方向:生物大数据、生物信息学、免疫组学。E-mail:chenyubao@blarc.com.cn

创,购自北京美绿洲生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组:8 只 KM 孕鼠单笼饲养,2 只/笼,分别饲养在麦秸垫料、玉米芯、刨花和纸质 4 种垫料中。选取离乳后仔鼠 24 只,随机分为 4 组,每组 6 只,雌雄各半,分别按照使用垫料的不同分为麦秸垫料组、玉米芯组、刨花组和纸质垫料组。每周更换一次垫料,常规饲养。在相同环境条件下继续饲养 8 周后,观察各组小鼠的相应指标。

1.3.2 适应性观察:观测 KM 小鼠分别对 4 种垫料饲养适应情况,观察小鼠行为反应、身体清洁度、有无外伤及过敏、嚼食垫料等情况。

1.3.3 水迷宫行为学测试:应用 ZS-001 MORRIS 水迷宫实验装置,开展隐藏平台实验和空间探索实验,检测小鼠在水迷宫装置中的学习和记忆能力。

1.3.3.1 定位航行实验:连续 6 d 分别对麦秸、刨花、玉米芯及纸质垫料饲养的 4 组小鼠进行入水训练和测试,每天训练 4 次,确保 4 个象限每天只用 1 次。第一天为适应性训练,将小鼠放入不含平台的水池中自由游泳 120 s,每次训练完成后,迅速用干净的干毛巾将小鼠擦拭干净后放回笼盒,并保证其饮水和食物供应,便于小鼠提前适应环境,减少应激反应。其余 5 d 为正式试验,每天固定时间训练 4 次,每次训练间隔 15~20 min。训练时间设置为 90 s,90 s 内小鼠未找到站台,则由实验人员将其引导至站台,并在站台上停留 10 s,逃避潜伏期记为 90 s。将逃避潜伏期均值作为参数进行数据统计。

1.3.3.2 空间探索实验:实验时间为 1 d,去除平台中心支架,任选一个象限入水点将 KM 小鼠放入水中,测试 60 s 小鼠在恒温池中的游泳时间以及穿越

目标(原平台位置)的次数。

1.3.4 体质量的检测:实验期间,每天实验前对所有小鼠进行称重并记录。

1.4 统计方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,实验数据均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间逃避潜伏期和体质量的比较采用 LSD 方差分析;各组间穿越站台次数采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物适应性研究

通过实验观察,麦秸垫料对小鼠无刺激作用,小鼠行为、反应正常。同其他 3 种垫料相比,换垫料 1 周后,麦秸垫料相对干燥度良好;相比玉米芯垫料,没有尿液集中渗漏的情况;相比纸质垫料,没有排泄物裸置的情况。

2.2 定位航行实验

逃避潜伏期结果如表 1 所示。在 5 d 的定位航行实验中,各组小鼠的潜伏期均随着训练天数的增加而缩短,由此可知,在 4 种垫料饲养环境下的 KM 小鼠经过训练后均可获得一定的空间学习能力。由图 1 可见,自第 2 天起,麦秸组、玉米芯组和纸质组的潜伏期呈下降趋势,其中麦秸组较其他 3 种垫料组具有明显的优势。进一步对组内各时间点的潜伏期进行两两比较,结果显示,第 5 天的潜伏期麦秸组显著低于其他 3 组($P<0.05$),其余各组间两两比较差异不显著,由此可见经麦秸垫料饲养下的 KM 小鼠在空间学习能力可得到明显的提高。

表 1 KM 小鼠水迷宫实验结果(定位航行)($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Results of Morris water maze(place navigation) test in KM mice

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
麦秸组	89.64±17.61	81.85±17.23	74.92±29.08	71.68±29.42	64.84±35.07 *
刨花组	86.87±15.33	87.75±11.02	81.45±23.51	81.97±19.93	84.74±17.82
玉米芯组	87.35±12.96	82.09±20.15	87.42±12.66	72.99±26.09	85.94±13.83
纸质组	90.00±0.00	83.48±17.21	82.30±19.34	83.79±19.14	81.95±22.11

注: * $P<0.05$
Note: * $P<0.05$

2.3 空间探索实验

实验结果如图 2 所示,各组小鼠穿过目标象限次数、目标象限游泳时间经统计无显著性差异

($P>0.05$)。但麦秸组的小鼠在穿过目标象限的总次数、游泳时间上均表现出一定的优势,其中穿台次数方面:麦秸组(3、2)最高、刨花组(1、2)、玉米芯组

(1、2), 纸质组(1); 游泳时间方面: 麦秸组(17.09 s)、刨花组(11.22 s)、玉米芯组(12.21 s)、纸质组(16.33 s)。这说明在麦秸垫料饲养条件下的 KM 小鼠可获得良好的空间学习记忆能力, 其对空间定位的准确性明显高于其他 3 组。

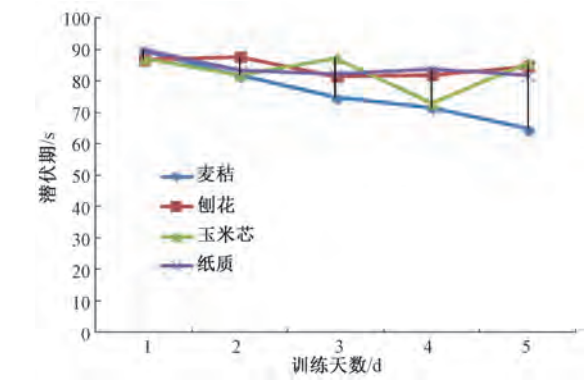


图 1 不同垫料组小鼠定位航行实验结果
Fig.1 Results of the place navigation test
in different bedding groups of mice

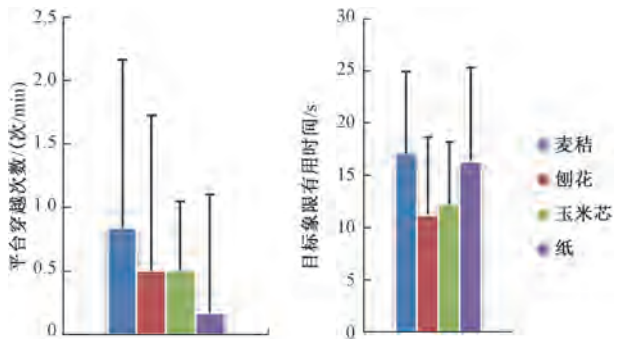


图 2 KM 小鼠空间探索实验结果
Fig.2 Results of the spatial probe test in KM mice

2.4 垫料对 KM 小鼠体质量的影响

KM 小鼠经四种不同垫料相同饲养环境下饲养 8 周后, 体质量均逐渐增加, 结果见表 2。其中麦秸组增重最大, 刨花组增重最小, 两组间变化差异显著 ($P<0.05$); 水迷宫测试期间, 各组增重两两比较无统计学差异 ($P>0.05$), 结果如图 3 所示。

表 2 不同垫料对 KM 小鼠体质量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s, g$)
Table 2 Effects of different beddings on body weight of KM mice

组别	麦秸组	刨花组	玉米芯组	纸质组
初始体质量	17.92±0.58	17.93±0.48	17.85±0.46	17.82±0.58
8 周后体质量	41.43±6.30 *	35.28±4.31 *	38.93±3.82	38.02±5.06
平均体质量增加	23.52	17.35	21.08	20.21

注: * $P<0.05$
Note: * $P<0.05$

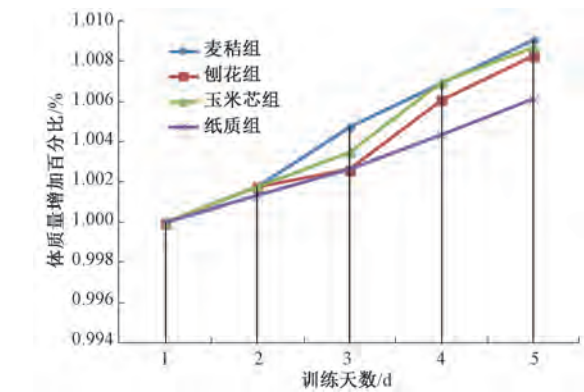


图 3 各组小鼠水迷宫试验期间体质量增加百分比
Fig.3 The increased body weight percentage of
each group during the water maze test

3 讨论

目前, MORRIS 水迷宫实验广泛用于开展海马

功能、学习记忆机制、衰老、药物对学习记忆障碍的改善、某些疾病对学习记忆功能的影响以及新药的研发、药物机型筛选、疗效评价、衰老模型评价、康复医学以及药物毒理学研究等领域^[1]。根据 MORRIS 水迷宫实验原理可知, 小鼠的自身生理因素和环境因素均会对实验结果产生一定影响。李爱萍等^[2]报道, 受动物品系及遗传背景的影响, 在 MORRIS 水迷宫中不同品系的小鼠学习记忆能力差异较为明显。Wahlsten 等^[3]选用 8 个近交品系小鼠进行水迷宫实验, 发现 C57BL/6 和 DBA/2 J 在迷宫试验中表现良好, 薛丹等^[4]报道, C57BL/6 小鼠、KM 小鼠和 ICR 小鼠都能完成 MORRIS 水迷宫的定位航行实验、空间搜索实验和工作记忆实验, 且非空间因素对 C57BL/6 小鼠学习记忆能力的评价干扰较小。诸多学者以 C57BL/6 小鼠为研究对象, 应用 MORRIS 水迷宫实验开展了神经退行性疾病、中枢神经系统与脑认知系统的相关研究方面。如 Huang 等^[5]研

究脂多糖对记忆检索的影响,探讨免疫激活与学习记忆功能的相互作用。Stackman 等^[6]研究小鼠定向反应与前丘脑神经元之间的关联。范琳犀等^[7]研究发现皮质酮慢性注射可诱导 C57 小鼠抑郁行为发生改变并损害学习记忆功能。刘港等^[8]研究表明,采用雄性 KM 小鼠侧脑室注射 AB_{25-35} 可快速成功制备阿尔茨海默病(AD)小鼠模型。在定位航行实验中,KM 小鼠的逃避潜伏期随着训练次数的增加而减少,这与本研究的结果一致。王南溪等^[9]用水迷宫实验测试不同剂量的黄粉虫油脂对 KM 小鼠增重及学习记忆能力的影响。胡华等^[10]探讨活血荣络片治疗阿尔茨海默病的机制。在 MORRIS 水迷宫实验过程中,其测试结果不仅与动物种类有关,MORRIS 水迷宫的实验设备、实验环境(光照、噪声)等许多因素均会影响实验结果。周海东等^[11]发现平台颜色可以改变大鼠的水迷宫成绩,蓝色平台的大鼠学习能力提升速度快于白色平台组。黄明^[12]发现 90 dB 的噪声(2 h/天)可以导致 KM 小鼠空间性学习记忆能力和情绪性记忆能力受损。

众所周知,垫料作为啮齿类实验动物生存环境中的重要组成部分,其原料、形状、大小等因素均会对实验动物及动物实验结果有不同程度的影响^[13]。越来越多的研究表明,丰富环境可以对小鼠脑损伤具有复苏的作用,可以改善其记忆和运动能力,认为环境丰富化对啮齿类动物脑功能改善、减轻老龄化带来的空间认知和运动缺陷等具有重要生物学意义^[14-15]。

唐莉莉^[16]研究发现丰富环境组的 KM 小鼠表现活跃,探索主动性增加,丰富环境强化小鼠的情绪学习记忆;而贫瘠环境组小鼠活动减少、情绪烦躁不安,氧化应急水平下降,使机体抵抗外界不良环境的能力下降。吴冰洁等^[17]通过对近交系衰老模型 SAMP8 小鼠的研究也发现并证实了环境丰富能刺激、提高动物体内促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(Cor)水平,能减轻精神行为异常及显著提高小鼠的学习及记忆能力。李春禄等^[18]通过对野生小家鼠和 KM 小鼠对丰富环境(锯末垫料为主,普通环境基础上添加玩具)的学习记忆能力影响实验,发现早期的丰富环境饲养显著缩短野生小家鼠的潜伏期,KM 小鼠没有显著影响,而经过学习训练野生小家鼠和 KM 小鼠的潜伏期都显著缩短。野生小家鼠更有良好的可塑性和应变能力,而实验 KM 小鼠

经过驯化后对环境变化更容易适应。因此,本实验选用 KM 小鼠作为研究对象,这与我们的研究结果一致。但是,在刨花与玉米芯等常规垫料饲养中,结果显示在 4 种垫料饲养环境下的 KM 小鼠经过训练后均可获得一定的空间学习能力,自第 2 天起,麦秸组、玉米芯组和纸质组的潜伏期呈下降趋势,其中麦秸组较其他 3 种垫料组具有明显的优势,但差异不显著。

据报道,大小鼠的迷宫实验认知和行为评价的差异也可能和应激反应有关^[19],应激状态下人类和动物释放的肾上腺皮质激素影响记忆的形成,损害记忆的获得和再现。在水迷宫浸水游泳的环境应激下,除了因整体环境因素如垫料富集,增加小鼠的幸福感等对小鼠形成的保护作用,也应该考虑到小鼠个体差异。我们在试验中发现,雌性小鼠的认知能力显著高于雄性,这与宿瑞敏^[20]研究结果相一致。

本实验发现,新型麦秸垫料可促进 KM 小鼠体质量增加,且增加情况要优于玉米芯和纸质垫料组,与刨花垫料组相比较差异显著($P < 0.05$);舒畅等^[21]曾报道普通刨花垫料对 KM 小鼠体质量的增加缓慢,本次结果与之相一致。水迷宫实验显示,4 种垫料饲养下的小鼠差异不显著,但结合实际饲养环境来看,纸质垫料组的小鼠表现欠佳,不建议完全用纸质垫料饲养或开展相关研究。麦秸垫料组表现则明显优于刨花垫料和玉米芯垫料组,因此麦秸垫料可以作为实验动物接触性垫料推广使用。

参 考 文 献

- [1] 武海霞,吴志刚,刘红彬. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用[J]. 神经药理学报, 2014, 4(5): 30-35.
- [2] 李爱萍,赵慧,李韶,等. 不同鼠种在 Morris 水迷宫学习记忆行为中的种属差异[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1): 29-31.
- [3] Wahlsten D, Cooper S F, Crabbe J C. Different rankings of inbred mouse strains on the Morris maze and a refined 4-arm water escape task [J]. Behavioural Brain Research, 2005, 165(1): 36-51.
- [4] 薛丹,徐淑萍,刘进修,等. 水迷宫实验中三种品系小鼠学习记忆能力的比较[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(2): 149-152.
- [5] Huang Z B, Wang H, Rao X R, et al. Effects of immune activation on the retrieval of spatial memory [J]. Neurosci Bull, 2010, 26(5): 355-364.
- [6] Stackman R W Jr, Lora J C, Williams S B. Directional

- responding of C57BL/6J mice in the Morris water maze is influenced by visual and vestibular cues and is dependent on the anterior thalamic nuclei [J]. J Neurosci, 2012, **32** (30): 10211-10225.
- [7] 范琳犀,姜宁,陈远伟,等.皮质酮诱导小鼠抑郁伴发的学习记忆损伤[J].中国比较医学杂志,2018,**28**(4):59-64.
- [8] 刘港,胡增蛟,杨胜.BALB/c 和昆明小鼠 A13 侧脑室注射建立阿尔茨海默病小鼠模型比较[J].军事医学科学院院刊,2009,**33**(6):554-557.
- [9] 王南溪,杨伟,杨春平,等.黄粉虫油脂对小鼠体质量及学习记忆能力的影响[J].食品工业科技,2015,**36**(1):356-360.
- [10] 胡华,李彩云,苏丽清,等.活血荣络片对 APP/PS1 双转基因小鼠认知能力及 $A\beta$ 沉积的影响[J].中华中医药学刊,2016,**34**(4):879-881.
- [11] 周海东,陈益君,朱洁.平台颜色对大鼠 Morris 水迷宫训练成绩的影响[J].中国现代医生,2018,**56**(13):25-27.
- [12] 黄明.噪声对小鼠学习和记忆的影响及其相关机制的研究[D].武汉:华中师范大学,2008.
- [13] 李树梅,胡建武.啮齿类实验动物垫料的研究进展[J].实验动物科学,2018,**35**(1):76-82.
- [14] Faverjon S, Silveira D C, Fu D D, *et al.* Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats [J]. Neurology, 2002, **59**(11):1357-1364.
- [15] Bennett J C, Mcrae P A, Levy L J, *et al.* Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice [J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2006, **85**:139-152.
- [16] 唐莉莉.丰富和贫瘠环境对老龄雌性小鼠空间学习和记忆的影响[D].武汉:华中师范大学,2009.
- [17] 吴冰洁,刘敏,岳巍,等.丰富环境刺激对快速老化小鼠精神行为学的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2012,**34**(5):325-328.
- [18] 李春禄,张佳靖,王冬梅,等.丰富环境对野生小家鼠和昆明小鼠空间学习记忆能力的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2011,**20**(7):624-626.
- [19] Salldi C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage [J]. Neural Plast, 1998, **6**:41-52.
- [20] 宿艳敏. Morris 水迷宫实验中三种小鼠的学习能力及其性别差异[D].石家庄:河北医科大学,2013.
- [21] 舒畅,张延英,蔡兴,等.凹土玉米芯垫料对 KM 小鼠安全性影响的研究[J].实验动物科学,2014,**31**(3):23-25.

Effect of Different Bedding on Learning and Memory Ability of Specific Pathogen-free KM Mice

HU Jianwu, LI Shumei, LIANG Junshi, YU Guangzhen, LI Liang, WU Huijuan, CHEN Yubao

(Beijing laboratory Animal Research Center, Beijing 100012, China)

Abstract: Objective To investigate the differences of bedding materials consisted of wheat straw, wood shavings, corn and the paper on the body weight and the learning and memory ability of SPF KM mice. **Method** Twenty-four KM mice were feeding with wheat straw, wood shavings, corn and the paper beddings for 8 weeks. The MORRIS water maze behavior experiment was performed to determine the learning and memory skills and the body weight. **Result** Comparing with animals used the shavings bedding, the weight of the KM mice in the wheat straw bedding group was raised, significantly, $P < 0.05$; The MWM result showed: the weight gain of each group was not significant. In the place navigation test, the wheat straw group was significantly lower than the other three groups ($P < 0.05$) on the 5th day; in the spatial probe test, KM mice used the wheat straw bedding spent more time in the target quadrant than other groups. **Conclusion** Different bedding material has little effect on body weight of KM mice in Morris water maze test, KM mice used the wheat straw bedding performed better than wood shavings and corn bedding in learning and memory ability, and the wheat straw bedding can be safely used in KM mice breeding. **Key words:** bedding; KM mice; Morris water maze (MWM) test; learning and memory