

行为箱形状对小鼠新物体识别实验结果的影响^{*}

杜艳芳 杨 洋 毕田田 毕玉莹 王 玥 李 婷 白云龙 王宇鑫

(哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究新物体识别实验在ICR小鼠学习记忆能力评价中的应用效果。方法 将40只ICR小鼠,雌雄各半,随机分为4组,方雌组(方形行为箱雌性小鼠组)、方雄组、圆雌组和圆雄组。按照相同的新物体识别实验流程,测定各组小鼠对物体的探索时间。结果 方雌组与方雄组,圆雌组与圆雄组比较,探索时间和对新物体的分辨比均无显著性差异($P>0.05$)。方组(方雌组+方雄组)与圆组(圆雌组+圆雄组)比较,对新物体的分辨比无显著性差异($P>0.05$),但圆组的总探索时间显著长于方组($P<0.01$)。结论 进行新物体识别实验时,性别不影响小鼠学习记忆能力的评价,选择圆形行为箱进行实验可更好地评价小鼠学习记忆能力。

关键词:行为箱形状;小鼠;学习记忆;新物体识别实验

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0022-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.005

动物的认知功能需要通过对其学习记忆的情况进行评价,因此需要建立规范的行为学实验方法,从而准确判断其学习记忆的情况。根据啮齿类动物具有喜欢探索陌生事物的天性^[1], Ennaceur 和 Delacour^[2]于1988年报道了一种非奖赏性的、简单的认知记忆实验模型——新物体与新位置识别实验,用于检测啮齿类动物的记忆能力。该模型根据动物对见过的熟悉物体和没有见过的新物体的探究时间的长短来评价被测试动物的记忆能力,即当被测试动物未遗忘环境中见过的熟悉物体时,便会用更多的时间探究没有见过的新物体;当被测试动物遗忘了见过的熟悉物体,则动物对环境中没有见过的新物体和见过的熟悉物体的探究时间应基本相同。与其它动物行为学实验方法相比,新物体识别实验具有不需要外部推动力,只需要适当的训练即可完成,且具有实验时间短的优点^[3-4],受到越来越多的学者的关注。但由于新物体识别实验缺乏统一的实验标准,使其应用受到一定的限制。以往研究针对物体材质、时间间隔等具体检测条件进行^[5],但缺少对行为箱形状的研究,为了进一步规范该方法的实验标准,本研究针对新物体实

验方法中的实验行为箱形状对实验结果的影响进行考察。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

健康ICR小鼠,8周龄,40只,雌雄各半,体重24~26 g,购自长春亿斯实验动物技术有限责任公司[实验动物生产许可证号:SCXK(吉)-2011-0004]。遵照国家实验动物饲养和使用指南,将小鼠饲养在屏障环境中,控制温度在 $(22\pm 1)^{\circ}\text{C}$,12 h明暗循环,自由采食和饮水,预饲期1周。

1.2 实验仪器

小鼠自主活动仪(ZZ-6型,成都泰盟科技有限公司),动物社会交互行为视频分析系统(Xeye SI V1.2,北京天鸣宏远科技发展有限公司)。

1.3 实验动物分组

ICR小鼠40只随机分为2组,每组20只,雌雄各半,即方组($n=20$)和圆组($n=20$)。各组按性别再次随机分为2组,即方雌组($n=10$)、方雄组($n=10$)、圆雌组($n=10$)和圆雄组($n=10$)。

收稿日期:2018-04-30

^{*} 基金项目:省级大学生创新训练计划项目(No.201610240041)

作者简介:杜艳芳(1997—),女,本科生,研究方向:神经药理学.E-mail:1670723070@qq.com

通信作者:杨 洋(1985—),工程师,研究方向:神经药理学.E-mail:syzxy213@163.com

1.4 新物体实验方法

实验前 5 d,实验人员每天将小鼠放到手上抚触 5 min,消除小鼠的紧张恐惧感。实验前,通过小鼠自主活动仪筛选,剔除活动异常的小鼠(活动过少、活动过多、转圈等)。实验当天,先将小鼠放到实验室,让其适应环境 1 h,然后进行正式实验。

新物体识别实验包含三个阶段(图 1)。阶段 1 (T1):分别将小鼠单独放入敞开的行为箱(底边长 44 cm×44 cm 的方形行为箱或半径为 25 cm 的圆形行为箱)中,自由探索 5 min。探索完毕后将小鼠取出,放回饲养笼中。清理行为箱中小鼠的粪尿,75%

酒精擦拭,消除异味。本阶段在实验第一天上午、下午分别进行一次。阶段 2 (T2):分别在行为箱的两个相对的区域中放入 2 个完全相同的物体(物体 1 和 1'),再次将小鼠放入行为箱中探索 5 min。每次实验结束后,彻底清理行为箱。本阶段实验在第二天上午进行。阶段 3 (T3):物体 1 不变(旧物体),物体 1' 更换为物体 2(新物体),再次将小鼠放入行为箱中探索 5 min。每次实验结束后,彻底清理行为箱。本阶段实验在第二天下午进行。所有实验均在上午 8 点至下午 5 点之间进行。

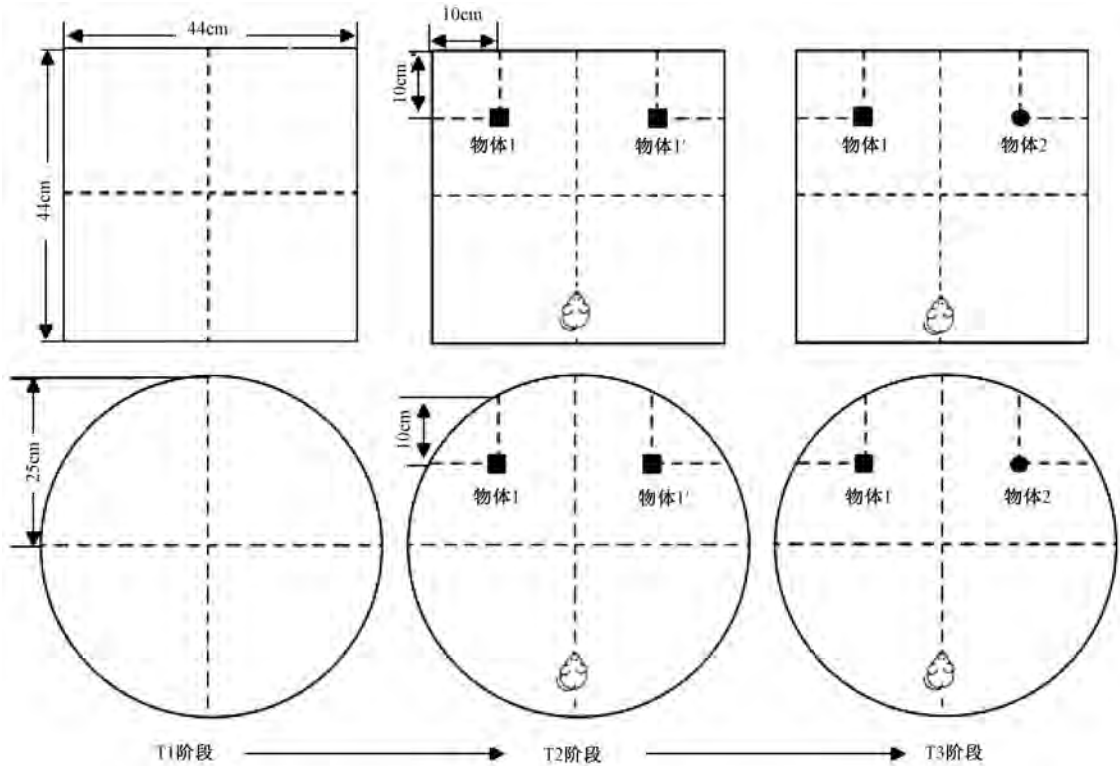


图 1 新物体识别实验示意图

Fig.1 The schematic diagram of novel object recognition test

采用动物运动轨迹跟踪系统记录分析 T2 和 T3 中小鼠分别探索 2 个物体的时间,其中探索物体 1 的时间记为 F,探索物体 1' 或 2 的时间记为 N,探索两个物体的总时间记为 F+N,计算小鼠对物体 1' 和 2 的分辨比 (discrimination ratio, DR) [$DR = N / (N + F) \times 100\%$]。探索定义为小鼠面朝物体,鼻子与该物体的距离 ≤ 2 cm。

1.5 数据统计分析

采用 SPSS 21.0 for windows 统计软件包分析。数据用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方

差分析进行多组间比较,两两比较采用 LSD-t 检验;组内比较用配对 Student t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠性别对新物体识别实验结果的影响

在 T2 阶段,各行行为箱中的实验动物对物体 1 和 1' 的探究时间: (31.16±16.75) s, (30.97±16.50) s; (30.37±15.95) s, (31.73±15.10) s; (112.33±

48.26) s, (112.50±49.76) s; (112.61±47.93) s, (112.32±47.10) s 基本相同 ($P>0.05$), 在 T3 阶段, 各行为箱中的实验动物对物体 2 的探索时间显著长于对物体 1 的探索时间 ($P<0.05$) 见图 2, 但相同形状的行为箱(方形行为箱, 圆形行为箱)中不同性别小鼠对 2 号新物体的 DR 无显著性差异 ($P>0.05$), 见图 3。

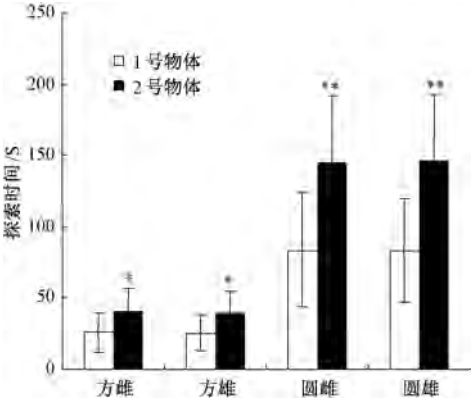


图2 T3 阶段 4 组小鼠对 1 和 2 号物体的探索时间 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig.2 The exploration times of object 1 and 2 of mice in T3 period (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

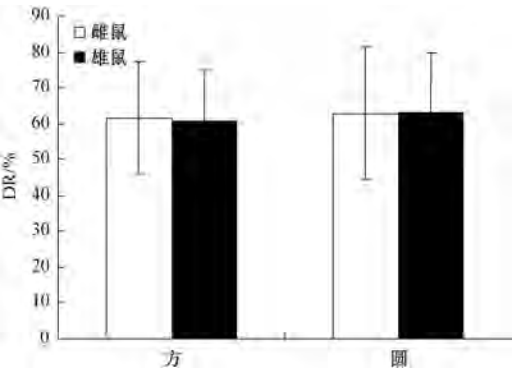


图3 相同行为箱中雌雄小鼠的分辨比

Fig.3 The discrimination ratio of female and male mice in the same experimental condition

2.2 行为箱形状对新物体识别实验结果的影响

在 T2 阶段, 不同形状行为箱中小鼠对两物体在 5 min 内探索时间 (30.76±15.93) s, (31.35±15.40) s; (112.47±46.81) s, (112.41±47.16) s 的差异未达到显著水平 ($P>0.05$); 在 T3 阶段, 小鼠对 2 号物体的探索时间显著长于 1 号物体, 但两种形状行为箱中小鼠对新物体的分辨比无显著差异 ($P>0.05$) 见图 4。T2、T3 两阶段中, 圆形行为箱中

小鼠对两物体的探索总时间 (224.88±37.05) s, (229.15±33.38) s 显著长于方形行为箱中小鼠对两物体的总探索时间 (62.11±23.30) s, (65.58±22.40) s ($P<0.01$) 见图 5。

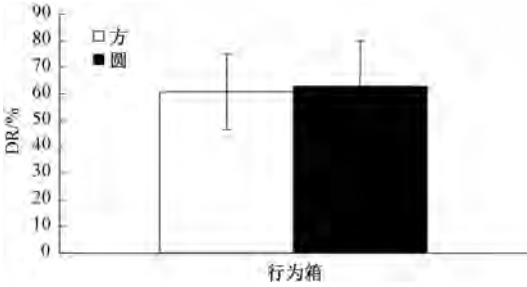


图4 两种行为箱中小鼠对新物体的分辨比

Fig.4 The discrimination ratio of novel object in mice about two types of experimental conditions

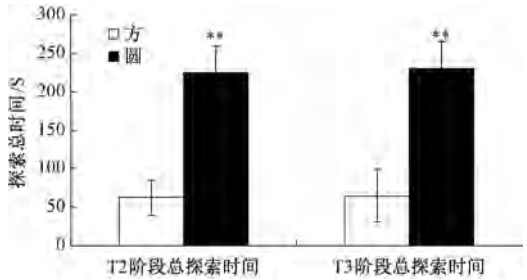


图5 T2 和 T3 阶段各行为箱中的总探索时间 (** $P<0.01$)

Fig.5 The total exploration times of each experimental condition in T2 and T3 periods (** $P<0.01$)

3 讨论

新物体识别实验是在模仿测试人类失忆症的识别任务的基础上发展起来的, 评价的是啮齿动物对物体的识别记忆能力。该模型是建立在啮齿动物对新异物体的自发探索行为的基础上, 且该模型不像迷宫学习中必须剥夺动物饮食或在避免水淹动机下进行学习记忆^[6], 也不像被动回避测试中给予动物电击等负性强化让动物学习记忆^[7]。所以该模型最大的优点就在于可以让动物在完全自然的状态下进行学习记忆测试, 能够更好地模拟人类和灵长类动物的学习记忆行为^[8]。因此, 该模型越来越多地用在评估药物对记忆的作用研究上。

在新物体实验方法的使用中, 如何规范实验流程, 建立实验动物行为学评价标准成了实验的核心问题。本实验通过比较采用不同形状的行为箱进行新物体实验时结果的差异, 推断行为箱形状对实验

结果有一定的影响。本实验中,T2 阶段的两个物体完全相同,且对于小鼠来说均为首次接触,因此各组小鼠对物体的 DR 值均在 50%左右,表明实验动物无位置偏爱异常发生,即实验动物对两个不同位置上的相同物体兴趣相同。T3 阶段,小鼠对 2 号物体的探索时间显著长于 1 号物体,说明实验中选用的新物体引起了小鼠的探索兴趣,物体的选择正确。各行行为箱中,雌雄小鼠对新物体的分辨比无差异,表明不同性别的实验小鼠对新物体的分辨程度相同,即性别不影响对新物体识别实验结果。进一步的实验结果,在 T3 阶段中,不同形状的行为箱中的实验动物均能对新物体显示出积极的探索兴趣,分辨比相似,表明行为箱的形状差异不影响实验动物对新物体识别行为。但实验动物在两种形状的行为箱中的总探索时间存在差异,说明行为箱的形状对实验动物的活动程度有一定的影响。这可能是由于方形行为箱的角落效应造成的。

研究结果表明,虽然在两种不同形状的行为箱中进行的新物体识别实验,动物对新物体识别结果无差异,但为了避免角落造成的实验动物活动能力降低现象的发生,我们认为采用圆形行为箱进行新物体识别实验能够更准确地反应实验动物对新物体的识别能力。

参 考 文 献

[1] Berlyne D E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior [J]. Br. J. Psychol. Gen., 1950, **41**(1-2): 68-80.

[2] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data [J]. Behav Brain Res, 1988, **31**(1): 47-59.

[3] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [J]. Cogn Process, 2012, **13**(2): 93-110.

[4] Rajagopal L, Massey B W, Huang M, *et al.* The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia [J]. Curr Pharm Des, 2014, **20** (31): 5104-5114.

[5] 李盛建, 黄竹燕, 叶夷露. 物体材质与检测间隔时间对小鼠新物体识别实验结果的影响 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2014, **43**(3):346-352.

[6] 齐越, 刘冉, 贾冬, 等. 温郁金挥发油对 A β ₍₂₅₋₃₅₎ 致阿尔兹海默病小鼠模型行为学的影响 [J]. 实验动物科学, 2017, **34** (5):27-31.

[7] Esmailpour K, Sheibani V, Shabani M, *et al.* Effect of low frequency electrical stimulation on seizure-induced short- and long-term impairments in learning and memory in rats [J]. Physiology & Behavior, 2017, **168**: 112-121.

[8] Lyon L, Saksida L M, Bussey T J. Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: a review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models [J]. Psychopharmacology, 2012, **220** (4): 647-672.

Influence of the Shape of the Testing Environment on Novel Object Recognition Test in Mice

DU Yanfang, YANG Yang, BI Tiantian, BI Yuying, WANG Yue, LI Ting, BAI Yunlong, WANG Yuxin
(School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Object To investigate the effects of the result of novel object recognition tests in different experimental conditions with ICR mice. **Method** Divided 40 ICR mice (half male and female) into 4 groups randomly, the square female group (the female mice group working in the square box), the square male group, the round female group and the round male group. According to the same experimental process of novel object recognition, the exploration time of mice in each group was measured. **Result** There was no significant differences between the square female group and the square male group, the round female group and the round male group in the total exploration time and the discrimination ratio of novel object ($P>0.05$). Compared the square group (the square female group+the square male group) with the round group (the round female group + the round male group), there was no significantly differences in the discrimination ratio of novel object ($P>0.05$), but the total exploration time of the round group was significantly longer than that of square group ($P<0.01$). **Conclusion** In the experiment of novel objects, the sex of mice did not affect the evaluation of learning and memory ability of mice, and the choice of round behavior box for experiments could better evaluate the learning and memory ability of mice. **Key words:** the shape of the testing environment; mice; learning and memory; novel object recognition test