

小鼠生活笼实验引入适应期的必要性研究

尹媛, 陆璐, 王蕴, 杨景, 付鹤玲

(南京医科大学医药实验动物中心, 南京 210000)

[摘要] 目的 探讨用于小鼠代谢功能检测的生活笼实验是否需要引入适应期, 以及如何判断和设置适应期时间长短。**方法** 收集2016—2017年的31次小鼠生活笼实验数据。每次实验设置3 d即72 h适应期, 记录小鼠饮水、饮食、产热率和体质量等数据, 72 h后开始正式检测。对收集到的饮水、饮食、产热率和体质量数据做24 h分段分析, 判断小鼠适应效果。**结果** 356只小鼠中有约12%在96 h实验结束时饮水量低于1 mL, 24~48 h与48~72 h的饮水量、进食量、产热率和体质量均存在明显差异(均 $P<0.05$); 48~72 h与72~96 h的饮水量、产热率和体质量无明显差异($P>0.05$), 但进食量仍存在明显差异($P<0.05$)。对各次实验的进食量适应性做独立验证, 发现进食量适应性与小鼠体质量存在显著相关性($P<0.05$)。**结论** 有约12%的小鼠在72 h适应期结束后仍无法适应新水瓶, 设计实验时需要考虑增加样本数量。如果进食量数据不是重点研究方向, 48 h适应期已经足够得到稳定结果。

[关键词] 生活笼; 适应期; 饮水; 进食; 体质量; 小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)04-0358-05

Necessity of an Acclimatization Period in a Home Cage Experiment of Mice

YIN Yuan, LU Lu, WANG Yun, YANG Jing, FU Heling

(Animal Core Facility, Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China)

Correspondence to: FU Heling, E-mail: fuheling@njmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate whether an acclimatization period should be introduced into the home cage experiment for the detection of metabolic function in mice, and how to judge and set its length. **Methods** Data from 31 home cage experiments in 2016-2017 were collected, and each experiment was set up with a 3-day (72 hours) acclimatization period. Data such as water consumption, food intake, heat production, and body weight were recorded. The data were analyzed using 24-hour interval analysis to determine the acclimatization effect. **Results** Approximately 12% of the 356 mice drank less than 1 mL at the end of 96 hours. There were significant differences in water consumption, food intake, heat production rate, and body weight between 24-48 hours and 48-72 hours, but no significant differences were detected between 48-72 hours and 72-96 hours, except in food intake. Independent verification of the food intake of each experiment showed that there was a significant correlation between food intake adaptability and weight. **Conclusion** Approximately 12% of the mice were unable to learn or adapt to the new water bottle after the 72-hour acclimatization period, therefore, researchers should consider increasing the sample size of the experiment to eliminate invalid data. If food intake is not the focus of a study, the 48-hour acclimatization is sufficient to obtain reliable results.

[Key words] Home cage; Acclimatization; Water consumption; Food intake; Weight; Mice

随着人们生活水平的提高, 膳食习惯和生活方式发生改变, 代谢异常疾病如糖尿病等的发病

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金-重点项目(2017NJMUZD022)

[作者简介] 尹媛(1983—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事实验动物代谢功能研究。E-mail: yinyuan83@njmu.edu.cn

[通信作者] 付鹤玲(1986—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事实验动物表型分析研究。E-mail: fuheling@njmu.edu.cn

率正逐年增高。代谢异常疾病是影响现代社会人群健康和生活质量的一类常见疾病,还会增加其他疾病如心血管疾病等的患病风险^[1]。目前,很多实验动物代谢疾病模型尤其是小鼠或大鼠代谢异常模型发展迅速^[2],而对这类疾病动物模型的代谢或行为指标的评价成为了研究方法中的重点。

各类代谢笼系统由于能实现无干扰的长时程连续动态观察,获得小鼠或大鼠的自发行为和实时代谢指标,赢得了研究者的青睐^[3]。常见的代谢笼系统都是1笼1只动物的设计,实验时长至少24 h以上。在动物数量较多、实验设计时间较长时,如何加快实验进程,提高仪器和时间的利用率,同时又保证最终结果的稳定性和准确性是很多研究者关注的焦点。在本文研究者所在的实验平台,早期的数次大鼠生活笼实验发现部分超重大鼠适应期效果不佳。查阅已发表文献时发现,很多研究者为提高动物适应性,会将适应期延长至3 d甚至1周^[4-6]。为提高实验结果的准确性和可比性,同时顾及动物模型的检测时间点,本研究采用已发表文献的方案,将生活笼实验的适应期强制延长至3 d即72 h。但适应期的延长,增加了实验的整体时长和仪器的周转周期,对研究者的实验时间点设计也带来一些不便因素。为了优化实验日程,科学设计实验进程,本研究进一步收集了1年内31次实验数据,对适应期数据和适应效果做了多方比较评价,以期对适应期的必要性和时长选择提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、仪器和耗材

1.1.1 实验动物

8周龄以上SPF级成年小鼠,体质量为15~55 g,雌雄未限定。统计中包含C57BL/6J小鼠、糖尿病等各类代谢相关疾病模型小鼠,均由南京医科大学医药实验动物中心[SCXK(苏)2016-0002]提供。动物饲养和代谢笼实验均在南京医科大学医药实验动物中心屏障设施[SYXK(苏)2020-0022]内开展,环境温度为22~24℃,相对湿度40%~70%,昼夜节律为12 h,光照时间为上午7:00至下午19:00。

1.1.2 仪器

小动物代谢功能监测系统购自德国TSE公司,型号为TSE PhenoMaster system。实验中使用接近小鼠正常饲养笼的生活笼具,1次实验可以同时开展12笼检测。实验中所用水瓶、食瓶是仪器配套的圆柱形悬挂式器具。每笼配有实时重力感应探头,用于饮水量、进食量和体质量检测。通过气体探头检测氧气(O₂)和二氧化碳(CO₂)含量变化,间接计算产热率,以此反映动物代谢功能。

1.1.3 垫/饲料

饮水是与常规饲养相同的酸化水。饲料由各次实验的实验者自行携带。垫料使用玉米芯颗粒垫料。

1.2 实验方法

1.2.1 仪器设置

选择小鼠生活笼具,提前1 d将水瓶、食瓶和体质量篮组装好,挂在重力感应探头下竖直悬挂过夜。实验开始前完成开机预热和探头校正等步骤,在笼盒底部均匀铺洒一层玉米芯颗粒垫料。实验开始时,将不同组别的动物间隔排布,1笼放置1只,装填对应的水和饲料,并保证水瓶和食瓶的开口朝向笼内,以便于小鼠接触。启动软件,设置72 h适应期检测。在72 h适应期后,新建正式检测文件,开始正式实验。

1.2.2 动物适应期检查

在适应期内,每日2~3次定时检查仪器和小鼠状态,查看小鼠饮水、饮食和气体数据等。如果小鼠在24 h后饮水或饮食数据仍然偏低,给予小鼠适当诱导。饮水数据偏低时,轻轻提起水瓶,轻触水瓶口滴下1~2滴水滴,诱导小鼠舔舐;效果不好时重复2~3次,并继续观察24 h。饮食数据偏低时,取出小颗粒饲料,放置在食瓶开口处,诱导小鼠啃食,并继续观察24 h。正式检测开始后,减少检查次数和检查时间,尽量不干扰实验环境。

1.2.3 数据收集和分析

收集了2016—2017年1年内的31次小鼠生活笼实验数据,全部采用72 h适应期的实验设计。剔除部分动物状态极度恶化或中途死亡的数据后,共收集到356只小鼠的适应期和正式检测

数据。以24 h为时间节点,整理匹配了每只小鼠的24 h、48 h、72 h和96 h时间点的各项数据。

1.3 观测指标

由于生活笼具接近但不完全等同于小鼠正常饲养笼,小鼠面对此新奇环境需要适应,首日运动数据可能不同于后几日数据,同时运动数据并不直接影响动物的生理数据和适应情况,因此本次实验中未纳入运动数据。本研究选择了饮水、进食、体质量和产热率数据来评估小鼠的适应期效果,其中重点关注指标为饮水和进食数据。

1.4 统计学方法

采用SPSS 17.0统计分析软件包进行结果分析。饮水、进食、体质量和产热率数据均为正态分布计量资料,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。第1轮饮水、进食、体质量和产热率数据分析是对同一只小鼠不同时间点的数据进行比较,采用配对 t 检验;第2轮对进食适应性存在差异的小鼠体质量数据进行比较,采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 约12%的小鼠对生活笼具适应性较差

在收集到的356只小鼠中,有80只小鼠(22.5%)在48 h后累计饮水量低于1 mL,在72 h适应期结束时仍有59只小鼠(16.6%)累计饮水量低于1 mL。继续观察到正式实验阶段,59只小鼠中有42只小鼠(11.8%)在正式检测第1天即72~96 h阶段饮水量低于1 mL,即有近12%的动物直到正式检测期或实验结束仍无法适应生活笼饮水条件。在各项数据中,饮水对小鼠正常

生存和生理状态的影响最大,正常饲养状态下小鼠日饮水量均值约为4 mL,连续72 h或96 h饮水量低于1 mL可能对小鼠生理状态产生较大的负面影响,实际实验中应对这部分小鼠予以剔除。

2.2 适应期第3天与正式检测期的饮水、体质量和产热率数据无明显差异

剔除72 h累计饮水量低于1 mL的小鼠,对剩余297只小鼠的各项数据进行整理分析。适应期第2天即24~48 h时间段的数据与适应期第3天即48~72 h时间段的数据相比,饮水量、体质量和产热率都存在明显差异,说明适应1 d不足以获得良好的适应效果($P < 0.01$,表1)。适应期第3天即48~72 h时间段的数据与正式检测期第1天即72~96 h时间段的数据[饮水量(2.74 ± 1.72) mL,进食量(3.67 ± 1.48) g,体质量(31.11 ± 8.97) g,产热率(78.62 ± 19.28) J·kg⁻¹·h⁻¹]相比,饮水量、体质量和产热率均无明显差异($P > 0.05$),说明适应2 d已经获得充足而良好的适应效果,适应期第3天的数据可以作为正式检测数据来分析(表1)。

2.3 进食量的适应效果存在差异,与小鼠体质量呈负相关

对纳入分析的297只小鼠的进食量数据进行第1轮配对 t 检验,发现适应第2天与适应第3天的进食数据存在明显差异($P < 0.01$,表1),适应第3天与正式检测第1天的进食数据也存在明显差异($P < 0.05$),提示适应72 h仍无法使小鼠适应实验笼中进食器具。对31次实验的进食数据进行分次独立分析,结果发现有18次实验中适应期第3天与正式检测第1天的进食数据无明显差异($P > 0.05$),提示取得了良好适应效果;

表1 小鼠适应期第2天与适应期第3天各指标适应效果评价

Table 1 Evaluation of the adaptation effect on each index on the second and the third days of the acclimatization period ($\bar{x} \pm s$)

指标	动物数/只	适应期第2天(24~48 h)	适应期第3天(48~72 h)	t 值	P 值
饮水量/mL	297	2.42±1.60	2.68±1.56	3.61	<0.001
进食量/g	297	2.96±1.47	3.32±1.35	5.68	<0.001
体质量/g	297	30.85±9.40	31.12±9.15	2.66	0.008
产热率/(J·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)	297	77.12±18.94	78.96±19.74	4.10	<0.010

另外有13次实验适应期第3天的进食数据与正式检测第1天存在明显差异 ($P < 0.05$), 提示适应3 d效果不佳。

为了分析进食数据出现适应差异的原因, 对小鼠的体质量数据进行了独立样本 t 检验。第2轮分析结果发现, 取得良好适应效果的小鼠群体平均体质量为 (28.08 ± 8.43) g, 适应效果不佳的小鼠群体平均体质量为 (34.22 ± 10.00) g, 两个样本群的体质量和进食量都存在明显差异, 体质量偏高的小鼠进食适应效果较差 (表2)。

表2 小鼠进食适应性与体质量相关分析
Table 2 Correlation analysis of food intake and body weight of mice

($\bar{x} \pm s$)				
指标	适应良好	适应不佳	t 值	P 值
动物数/只	179	118	—	—
体质量/g	28.08 ± 8.43	34.22 ± 10.00	5.51	< 0.001
进食量/g	3.90 ± 1.58	3.33 ± 1.24	3.51	0.001

3 讨论

本文研究使用德国TSE公司的PhenoMaster系统, 该系统有两类不同设计的笼具。其中生活笼具由于设计更接近小鼠的正常饲养笼具和正常饲养环境, 获得研究者更多偏好, 也是本研究使用的对象。生活笼具可以提供无干扰的连续动态观测数据, 包括小鼠自发的饮水、进食、行为、运动数据等, 同时也可以采集小鼠的体质量数据, 并能持续精准监测密封笼具内的温度、 O_2 、 CO_2 含量的动态变化, 提供小鼠呼吸交换率、产热率等代谢指标数据^[4-7]。生活笼虽然趋于接近小鼠正常饲养笼, 但实验开端对于小鼠仍然是进入新环境的过程, 同时为了获得饮水、进食数据, 生活笼配套的水瓶和食瓶也不同于常规的器具, 需要小鼠学习适应。而这个新奇环境探索和适应的过程, 可能会对小鼠的各种行为数据和代谢指标产生一定影响, 这段时间的数据或许并不能体现小鼠真实的行为代谢功能。为了避免环境变化和适应学习过程对获得数据的影响, 该系统建议在正式实验之前设置2 d适应期。适应

期内仪器各项设置和数据采集与正式实验阶段完全一致, 这部分数据是否可以用于分析也是很多实验者关心的问题^[3]。由于关注方向不同, 已发表文献中代谢笼系统的实验日程设计也存在很多差异: 有少部分研究并未设置适应期; 大部分研究者虽然设置了适应期, 但适应期的时间从2 h到7 d不等^[8-10]; 有些研究还额外增加了在实验室环境的预适应期^[5]。

本研究通过分析了1年内31次生活笼实验数据, 重点关注可能影响小鼠生存和代谢的饮水、进食指标, 同时也分析了反映小鼠代谢状态的体质量变化和产热率数据, 结果发现适应期是必要且非常关键的设计要点。适应期的第2天与第3天的数据相比, 饮水、进食、体质量和产热数据都存在显著差异, 小鼠在第2天仍然处于学习或探索阶段, 适应期第2天的数据不能用于分析。在这个阶段需要设置定时检查, 重点关注小鼠的适应情况, 并且对适应效果较差的小鼠给予适当的诱导教学, 以期加快小鼠的适应进程, 获得良好的适应效果。适应期第3天与正式检测第1天的数据相比, 饮水、体质量和产热数据都已经达到稳定, 各项数据自身对照无明显差异, 说明适应2 d取得了良好的适应效果, 第3天的数据实际可以作为正式实验数据纳入最终结果分析。与预期不同的是, 进食数据在适应期第3天仍未达到稳定, 第3天与正式检测第1天的进食数据仍存在明显差异。

有部分研究者发现动物的品系、体质量, 甚至周龄都会对代谢实验产生影响^[11]。本次纳入分析的31次实验中涵盖了不同周龄和体质量的小鼠, 对这31次实验数据分别进行分析的结果提示, 进食适应性与小鼠体质量存在负相关。因此, 推测部分体质量超重的小鼠模型, 如糖尿病模型鼠等, 对进食器具适应性可能较差, 在日程允许的情况下可以考虑对这类实验适当延长适应期。

综上所述, 在小鼠生活笼实验中, 适应期是非常必要且关键的设计。为了获得更加真实准确

的动物行为代谢数据, 正式实验开始前需设置至少 2 d 的适应期。部分超重小鼠模型的进食适应效果可能较差, 如果重点关注进食数据, 可能需要延长适应期至 3 d 以上, 或增加整个实验时长, 并在实验结束后对数据进行分段分析, 然后再决定纳入正式分析的时间范围。对适应阶段始终无法学会饮水进食、适应效果一直较差的小鼠, 要重点关注其生理状态, 必要时可以及时中止这类小鼠的实验进程, 以免动物状态恶化甚至死亡, 造成宝贵动物模型的损失。在实验设计时也要考虑到这部分无法适应的小鼠的比例, 适当增加组内动物数量, 以保证最终能获得足够分析的样本数据。

参考文献:

- [1] 王一然, 王奇金. 慢性病防治的重点和难点:《中国防治慢性病中长期规划(2017—2025 年)》解读[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(7):828-831. DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.07.0828.
- [2] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望[J]. 中国科学(生命科学), 2014, 44(9): 851-860. DOI:10.1360/N052014-00186.
- [3] TSCH P M H, SPEAKMAN J R, ARCH J R, et al. A guide to analysis of mouse energy metabolism[J]. Nat Methods, 2011, 9(1):57-63. DOI:10.1038/nmeth.1806.
- [4] BAKE T, MORGAN D G, MERCER J G. Feeding and metabolic consequences of scheduled consumption of large, binge-type meals of high fat diet in the Sprague-Dawley rat[J]. Physiol Behav, 2014, 128: 70-79. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.01.018.
- [5] GOUGOULA C, BIELFELD A P, POUR S J, et al. Metabolic and behavioral parameters of mice with reduced expression of Syndecan-1[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0219604. DOI:10.1371/journal.pone.0219604.
- [6] BIAN H X, WU Z Y, BAO B, et al. ¹H NMR-based metabolic study reveals the improvements of bitter melon (*Momordica charantia*) on energy metabolism in diet-induced obese mouse[J]. Pharm Biol, 2016, 54(12): 3103-3112. DOI:10.1080/13880209.2016.1211713.
- [7] BRUSCHETTA G, JIN S, KIM J D, et al. Prolyl carboxypeptidase in agouti-related peptide neurons modulates food intake and body weight[J]. Mol Metab, 2018, 10:28-38. DOI:10.1016/j.molmet.2018.02.003.
- [8] FISCHER J, KOCH L, EMMERLING C, et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity [J]. Nature, 2009, 458(7240): 894-8. DOI: 10.1038/nature 07848
- [9] CYRANKA M, VEPRIK A, MCKAY E J, et al. Abcc5 knockout mice have lower fat mass and increased levels of circulating GLP-1[J]. Obesity (Silver Spring), 2019, 27(8):1292-1304. DOI:10.1002/oby.22521.
- [10] KIM GH, YISS. Chronic oral administration of *Passiflora incarnata* extract has no abnormal effects on metabolic and behavioral parameters in mice, except to induce sleep[J]. Lab Anim Res, 2019, 35: 31. DOI: 10.1186/s42826-019-0034-9.
- [11] CLEMENS L E, JANSSON E K, PORTAL E, et al. A behavioral comparison of the common laboratory rat strains Lister Hooded, Lewis, Fischer 344 and Wistar in an automated homecage system[J]. Genes Brain Behav, 2014, 13(3):305-321. DOI:10.1111/gbb.12093.

(收稿日期: 2020-09-28 修回日期: 2021-01-06)