

张睿,张竞丹,舒瑶,等. CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 75-85.  
Zhang R, Zhang JD, Shu Y, et al. Effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 75-85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.010

## CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响

张睿<sup>1,2</sup>, 张竞丹<sup>2,3</sup>, 舒瑶<sup>4</sup>, 邢晓雯<sup>2</sup>, 王翠<sup>2,5</sup>, 刘志强<sup>2\*</sup>, 张剑宁<sup>1\*</sup>

(1.解放军总医院第一医学中心神经外科医学部,北京 100853;2.军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所,北京 100850;3.中央民族大学生命与环境科学学院,北京 100081;4.解放军总医院第五医学中心口腔科,北京 100071;5.河北医科大学,石家庄 050017)

**【摘要】** 目的 通过动物行为学实验探究 CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响。方法 将纯合 C57BL/6J CD44 基因敲除(CD44 knockout, CD44 KO)小鼠与野生型(wild type, WT)小鼠作对比,进行平衡木实验、转棒实验、旷场实验、高架十字实验、悬尾实验、强迫游泳实验、新物体识别实验、三箱社交实验和水迷宫实验,分析比较两组小鼠的行为学差异。结果 在三箱社交实验 Stage 3 阶段,WT 雌性小鼠对新同类的探索时间要多于 CD44 KO 雌性小鼠( $P=0.0475$ )。水迷宫定位航行实验中第 5~7 天,CD44 KO 组小鼠到达目标区域所需时间长于 WT 组小鼠( $P=0.0147, 0.0182, 0.0233$ )。水迷宫空间探索实验中,CD44 KO 组小鼠到达目标区域次数更少( $P=0.0128$ ),初次到达所需时间更长( $P=0.0003$ )。从初次到达目标区域所需时间方面分析,CD44 KO 组内雄性所需时间少于雌性( $P=0.049$ ),CD44 KO 雄性小鼠所需时间多于 WT 雄性小鼠( $P=0.0137$ ),CD44 KO 雌性小鼠所需时间也多于 WT 雌性小鼠( $P=0.0036$ )。在平衡木实验、转棒实验、旷场实验、高架十字实验、悬尾实验、强迫游泳实验和新物体识别实验结果中,各组未见明显差异。结论 CD44 KO 小鼠与 WT 小鼠相比,学习记忆能力明显下降,以第 5~7 天最为显著,空间记忆能力也明显减弱。同时,CD44 KO 的雌性小鼠的社交趋向性要弱于 WT 雌性小鼠。在运动协调能力、平衡能力、耐力、焦虑、抑郁等方面,CD44 KO 小鼠与 WT 小鼠未见明显差异。

**【关键词】** CD44;动物行为学;三箱社交;Morris 水迷宫

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0075-11

### Effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice

ZHANG Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Jingdan<sup>2,3</sup>, SHU Yao<sup>4</sup>, XING Xiaowen<sup>2</sup>, WANG Cui<sup>2,5</sup>, LIU Zhiqiang<sup>2\*</sup>, ZHANG Jianing<sup>1\*</sup>

(1. Department of Neurosurgery, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China.

2. Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850. 3. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081.

4. Department of Stomatology, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071.

5. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice by animal behavior experiment. **Methods** Beam balance experiment, rotarod experiment, open field experiment, elevated plus-maze

[作者简介]张睿(1992—),男,医师,学士,研究方向:颅脑外伤与颅脑肿瘤方向。E-mail:512806411@qq.com

[通信作者]张剑宁(1964—),男,主任医师,博士,研究方向:颅脑外伤与颅脑肿瘤方向。E-mail:jnzhang2018@163.com

刘志强(1984—),男,副研究员,博士,研究方向:神经科学方向。E-mail:zhiqiangliu\_amms@163.com

\* 共同通信作者

experiment, tail suspension experiment, forced swimming experiment, novel object recognition experiment, three-chamber social experiment and Morris water maze experiment were carried out to analyze and compare the behavioral differences between homozygous C57BL/6J CD44 knockout (CD44 KO) mice and wild type (WT) mice. **Results** In Stage 3 of the three-chamber social experiment, WT female mice were seen to spend more time exploring novel objects than female mice in the CD44 KO group ( $P=0.0475$ ). From day 5 to day 7 in the water maze navigation experiment, mice in CD44 KO group were observed to take longer to reach the target area than WT mice ( $P=0.0147, 0.0182, 0.0233$ ). In the water maze space exploration experiment, mice in the CD44 KO group tended to reach the target area fewer times ( $P=0.0128$ ) and took longer time to reach the target area for the first time ( $P=0.0003$ ). The time that males in the CD44 KO group took to reach the target area for the first time was less than that taken by females ( $P=0.049$ ). Additionally, males in the CD44 KO group took more time than WT males ( $P=0.0137$ ), and females in the CD44 KO group also took more time than WT females ( $P=0.0036$ ). There were no significant differences in the result of the beam balance experiment, rotarod experiment, open field experiment, elevated plus maze experiment, tail suspension experiment, forced swimming experiment and novel object recognition experiment between the two groups. **Conclusions** Compared with WT mice, CD44 KO mice were observed to have significantly decreased learning and memory ability, especially in the 5th~7th day. In addition, their spatial memory ability was obviously weakened. Meanwhile, CD44 KO female mice were seen to have weaker social propensity than WT female mice. However, no significant differences were noted between CD44 KO mice and WT mice in the aspects of sports coordination ability, balance ability, endurance, anxiety and depression.

**【Keywords】** CD44; animal behavior; three-chamber; morris water maze trials

CD44 是一种在体内广泛表达的跨膜粘附受体,是透明质酸的主要受体之一<sup>[1]</sup>。CD44 受体在神经系统中发挥着多种作用,影响许多不同类型细胞的增殖、分化和迁移。有研究表明,敲除 CD44 基因可延缓胚胎期神经嵴细胞的迁移<sup>[2]</sup>,从而影响其分化成为神经元细胞的进程。同时,CD44 的表达还影响着成人神经干细胞的分化,缺乏 CD44 的神经干细胞,多分化为未成熟的神经元细胞<sup>[3]</sup>。还有研究表明,CD44 可以通过影响血脑屏障通透性改变认知水平<sup>[4]</sup>,CD44 基因可能影响成年个体海马神经的发育,其缺失可以导致海马体功能障碍和空间学习记忆缺陷<sup>[5]</sup>。以上各个研究均提示 CD44 基因可能会影响神经系统的功能尤其是认知水平。CD44 是体内广泛表达的受体,对于 CD44 KO 小鼠模型的研究屡见不鲜,然而 CD44 对小鼠行为能力的影响,尚未有系统性研究报道,其在研究某些疾病模型中能否应用,尚未有明确探究。

本论著以 CD44 KO 小鼠与 WT 小鼠作对照,通过平衡木实验、转棒实验比较小鼠的运动能力,通过旷场实验、高架十字实验比较小鼠的焦虑情况,通过悬尾实验、强迫游泳实验比较小鼠的抑郁程度,通过三箱社交实验比较小鼠的社交能力,通过新物体识别实验、水迷宫实验比较小鼠的学习记忆能力。通过上述实验,从而系统性探讨 CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本实验从江苏集萃药康生物科技有限公司 [SCXK(苏)2018-0008] 购买获得 5 只 SPF 级杂合 C57BL/6J CD44 KO 小鼠,体重 ( $25 \pm 1.5$ ) g, 20 周龄,其中雌鼠 2 只,雄鼠 3 只。繁殖后得到 13 只 SPF 级纯合 C57BL/6J CD44 基因敲除小鼠,雌性 6 只,雄性 7 只,体重 ( $25 \pm 2$ ) g, 10 周龄。本实验的 16 只 SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠,雌性 7 只,体重 ( $21 \pm 1$ ) g, 雄性 9 只,体重 ( $25 \pm 0.5$ ) g, 10 周龄,均从斯贝福(北京)生物技术有限公司购买 [SCXK(京)2019-0010]。实验动物饲养于 SPF 级动物实验室内鼠笼架中(苏州猴皇动物实验设备科技有限公司,规格:PEI) [SYXK(军)2019-0004]。实验动物饲养单位为军事医学研究院军事认知与脑科学研究所,本实验经军事医学研究院实验动物中心动物实验室实验动物管理与使用委员会审查批准 (IACUC-DWZX-2022-566)。本实验中,动物饲养和实验过程均按照 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

引物序列由江苏集萃药康生物科技有限公司设计,北京擎科生物科技有限公司合成;蛋白酶 K (Solarbio 北京索莱宝, lot: No. 1019C022); 2×santaq PCR master mix (with blue dye) (上海生工 Sangon Biotech, B532061-0040, lot: HC17KA2941)。凝胶

图像分析系统(上海天能 Tanon 2500);电泳仪(DYY-7C型,北京六一生物科技有限公司);any-maze stoelting 行为学分析系统(美国);转棒仪(Panlab, 美国 Harvard Apparatus)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物的基因鉴定

##### (1) 引物设计

根据 CD44 基因的特性设计第一对引物 F1 和 R1,用于检测 C57BL/6J CD44 KO 小鼠中包含 CRISPR/Cas9 片段的等位基因片段,检测发生突变造成缺失的 CD44 基因,PCR 扩增片段长度为 246 bp;以野生型 C57BL/6J 小鼠基因组 DNA 序列为模板设计引物 F2 和 R2,用于检测 WT C57BL/6J 小鼠的 CD44 等位基因的片段,扩增片段长度 337 bp(见表 1)。

##### (2) DNA 提取

裂解液配方:1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(tris-HCl) 1 mL + 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 2 mL + 10% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 5 mL + 5 mol/L NaCl 2 mL,加水至 100 mL 配制成裂解液。将 5  $\mu$ L 蛋白酶 K 加入到 500  $\mu$ L 裂解液中,放入 1.5 mL EP 管中,剪取加入小鼠尾巴组织约 2 mm。放入 55 $^{\circ}$ C 的水浴锅中过夜消化,上下颠倒混匀。加入等体积的酚/氯仿混合溶液(500  $\mu$ L),混匀,离心(12000 r/min, 15 min)。吸取约 300  $\mu$ L 上清液,加入 400  $\mu$ L 100%乙醇,上下颠倒混匀,离心(12000 r/min, 10 min)。弃去上清,再加入 70%乙醇 800  $\mu$ L,离心(12000 r/min, 5 min)。弃去上清,小心吸弃残留乙醇,晾干,即得到 DNA。

##### (3) PCR 扩增

PCR 反应体系总体积为 25  $\mu$ L,分别加入 12.5  $\mu$ L mix, 9.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,引物各 1  $\mu$ L 和 DNA 1  $\mu$ L。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C $\times$ 5 min, 95 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 58 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 72 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C $\times$ 5 min。

##### (4) 琼脂糖凝胶电泳

用含染色剂的 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测

(120 V, 40 min),电泳结束后,用紫外凝胶成像系统进行观察拍照。

#### 1.3.2 行为学测试方法

##### (1) 平衡木实验

平衡木实验用于测试小鼠的运动协调和平衡能力。架起一根长约 1 m 的狭窄平衡木,将小鼠放在起始端,用强光束诱导小鼠穿过平衡木到达另一侧。首先训练 3 d,使小鼠从平衡木起始端向终端爬行,爬行到终点后,使小鼠在终点暗箱处休息 30 s,然后开始下一次训练,每天训练 3 次,直至小鼠可自行无停顿爬行经过平衡木。第 4 天开始测试,记录小鼠从平衡木起始端到达终端所需的时间。耗时越短,说明小鼠的平衡能力越强。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的平衡木实验。

##### (2) 转棒实验

转棒实验用于衡量小鼠的运动性和耐力。先将转棒仪调整为训练状态,让小鼠进行适应性训练。训练持续 3 d,每天训练 3 次,每次间隔 10 min。训练时,将转棒仪目标转速设置为 15 r/min,时间持续 150 s。将小鼠放在转棒仪上,启动转棒仪使转速从 0 开始逐步达到目标转速,然后维持目标转速直至时间结束。训练起始时,小鼠易在加速时掉落,应迅速将小鼠放回转棒仪,直至训练结束。随着训练次数的增加,第 3 天训练时,大部分小鼠均可在转棒仪上停留 150 s,或接近 150 s。正式实验时,将与目标时间差距过大的小鼠剔除,记录每只小鼠在转棒上的停留时间。小鼠在转棒仪上停留的时间越长,耐力越强。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的转棒实验。

##### (3) 旷场实验

旷场实验主要用于评价动物的焦虑状态。将小鼠放置于 60 cm $\times$ 60 cm $\times$ 20 cm 的陌生实验箱中,持续时间 5 min,利用动物行为分析软件跟踪记录小鼠的运动轨迹,通过比较不同小鼠在中央区探索的时间,来比较小鼠的焦虑程度。在中央区探索时间越长,说明小鼠的焦虑程度越轻。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的旷场实验。

##### (4) 高架十字实验

高架十字实验常用于测试小鼠的焦虑状态<sup>[6]</sup>。高架十字迷宫拥有 4 条相互交叉贯通的通路臂,其

表 1 引物序列合成

Table 1 Synthesis of primer sequence

名称 Name	引物序列 Primer sequence
F1	5'-GAGTCTGGGTAAAGCCACTTCTTTC-3'
R1	5'-CCATCACACCTTCATTAACATGCC-3'
F2	5'-CCTCTAAGATCTCCGTTTCCTCCC-3'
R2	5'-CGGTTTCAGTTTGACTTGCC-3'

中两条是开放臂,为开阔且无围墙保护的空間,另外两条为封闭臂,是两侧封闭的空间,测试装置距离地面有大约 50 cm 高度的距离。小鼠在天性的驱使下会追求遮蔽,趋向于在封闭臂上待较长的时间。实验开始时,将小鼠放在中心位置,让小鼠自由探索 4 条臂,同时利用分析软件跟踪记录小鼠的运动轨迹,持续时间为 5 min。通过计算比较不同小鼠在开放臂上待的时间,从而探讨小鼠焦虑程度<sup>[7]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的高架十字实验。

#### (5) 悬尾实验

悬尾实验用于测试小鼠的抑郁程度。采用自制测试设备,用胶带将小鼠的尾巴粘在盒子顶部的挂钩上,将小鼠完全倒立悬挂在空中,小鼠将努力挣扎,试图摆脱该环境,在经过努力仍无法摆脱后,小鼠将间歇性进入静止状态,静止时间既包括小鼠静止不动的时间,也包括仅微弱抖动四肢并非试图挣扎逃离状态下的时间。测试时间持续 6 min,记录后 4 min 小鼠搅动与静止的持续时间,通过比较,探讨小鼠的抑郁程度。挣扎时间越长,抑郁程度越低<sup>[8]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的悬尾实验。

#### (6) 强迫游泳实验

用于评估小鼠的抑郁程度。将小鼠放入 1 个不可逃避的盛满水的透明容器中,小鼠将努力挣扎,试图摆脱该环境,在经过努力仍无法游出容器后,小鼠将停止挣扎,进入静止状态。小鼠仅微弱抖动四肢并非试图挣扎逃离状态下的时间,也应算入静止时间。测试持续 6 min,记录后 4 min 小鼠与逃逸相关的活动时间,从而比较小鼠的抑郁程度<sup>[9]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的强迫游泳实验。

#### (7) 新物体识别实验

用于研究小鼠学习记忆行为<sup>[10-12]</sup>。与上述旷场实验一样,将小鼠放置于 60 cm×60 cm×20 cm 的陌生实验箱中,分为 3 个阶段:习惯期持续 5 min,让小鼠适应实验箱;训练期共持续 10 min,实验箱中摆放两个完全相同的物体,让小鼠自由探索;测试期持续共 10 min,将其中一个物体变换成另一个形状完全不同的新物体,再让小鼠自由探索。其中,训练期与测试期间隔 2 h。小鼠因为天生喜欢新奇,凭借对旧物体存在的记忆,测试期会花更多时间探索新物体。分别记录每个阶段小鼠对两个物体的探

索时间,进行比较分析,这反映了小鼠的学习记忆行为。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的新物体识别实验。

#### (8) 三箱社交实验

用于评估动物的社交行为能力。实验装置由 3 个矩形箱子组成,每个矩形箱子的大小约为 20 cm×50 cm,每两个相隔的箱子之间都有大小为 7 cm×7 cm 的贯通通道,使小鼠可以在 3 个箱子之间来回往返探索。在左侧和右侧箱子的角落里各放 1 个大小完全一致的金属笼子,大小恰好足够容纳 1 只小鼠。分为 3 个阶段,每个阶段持续 10 min,开始时分别将小鼠放置在中间的矩形箱子中:第一个阶段让小鼠探索两个空置的笼子;第二个阶段,将其中 1 个笼子中放置 1 个不同品系的陌生小鼠,另 1 个笼子放置 1 个玩具鼠,小鼠由于天性,趋向于探索陌生小鼠;第三阶段:将玩具鼠替换为另 1 只不同品系的小鼠,由于天性,小鼠趋向于探索最新替换的陌生小鼠。通过分析小鼠不同阶段对于新同类的探索时间,可以比较小鼠社交行为的趋向性<sup>[13-16]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的三箱社交实验。

#### (9) Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫是由 Morris 于 1981 年报道<sup>[17]</sup>。用于评估小鼠的学习记忆能力。小鼠具有会游泳又怕水的天性,故而强迫其在水中游泳,小鼠可以依靠寻找辨识四周的空间参考标志物,来判断自己的位置,以及记忆逃逸平台所在的位置,从而爬上平台。Morris 水迷宫是一个圆形水池,直径约为 120 cm,水池壁高度约为 50 cm,将其平均分为四个象限,将逃逸平台(直径 10 cm,高度 20 cm)摆放在在第一象限中央。水迷宫四周桶壁上分别贴有正方形、圆形、三角形和箭头图案,以供小鼠辨别位置。将水位控制在刚刚没过逃逸平台,水内撒入漂白粉混匀,从而使小鼠无法肉眼看到逃逸平台,实验期间保持水温、参考图案位置、顺序及室内光线强度等环境条件不变。实验共持续 7 d,前 6 d 为定位航行实验,用于评价小鼠的学习记忆能力。每天每只动物测试 2 次,单次测试时间为 90 s。选取逃逸平台所在象限的对面象限为动物第一次入水象限,每天分别更换不同入水点位。实验开始时,将小鼠放入水中,立即开始计时,小鼠找到并爬上逃逸平台所需的时间,即为逃避潜伏期。小鼠爬上逃逸平台后,使其在平台上停留 30 s,以适应并记忆周边环

境。若小鼠在 90 s 内无法找到逃逸平台,则逃避潜伏期按 90 s 计算,同时实验人员帮助小鼠找到平台,将其放置在平台上停留 30 s。小鼠逃避潜伏期的长短反映了其学习记忆能力,逃避潜伏期越短,说明其学习记忆能力越强<sup>[18-19]</sup>。第 7 天为空间探索实验,用于评估小鼠的空间记忆能力。撤去逃逸平台,将最远离逃逸平台的位置设为小鼠的入水点。使小鼠在水池内自由游动探索 90 s,小鼠将凭记忆试图寻找原逃逸平台所在位置,记录其第一次到达原逃逸平台所在区域所需时间,以及进入这个区域的次数,从而评价小鼠的空间记忆能力<sup>[20]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的 Morris 水迷宫实验。

### 1.4 统计学方法

数据分析由 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,代表性的柱状图与折线图由 GraphPad Prism 8.0.2 软件生成。数据采用平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间的数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  时,认为数据存在统计学差异。



注: M; DNA marker; 1; CD44 基因敲除小鼠纯合子; 2; CD44 基因敲除小鼠杂合子。

图 1 PCR 鉴定 CD44 基因敲除小鼠的凝胶电泳分析

Note. M, DNA marker. 1, Homozygous CD44 knockout mice. 2, Heterozygous CD44 knockout mice.

Figure 1 Gel electrophoresis analysis of CD44 knockout mice identified by PCR

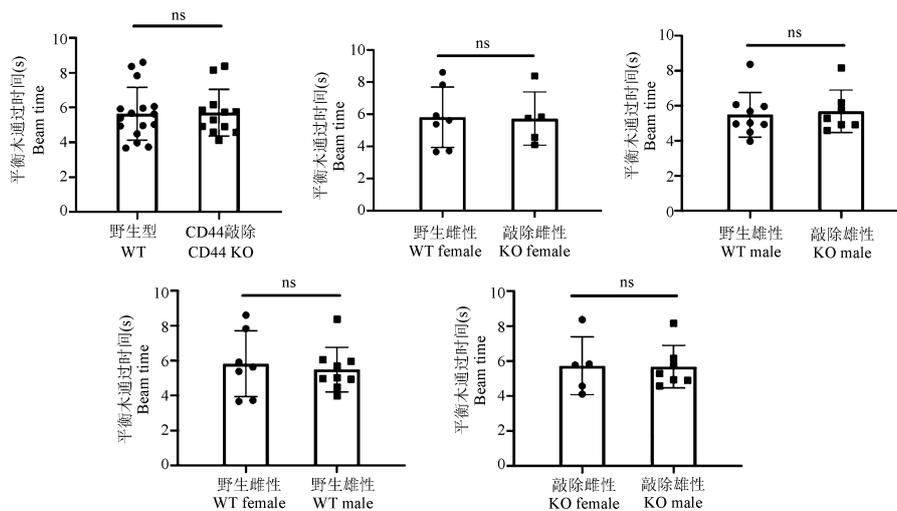


图 2 平衡木实验结果比较

Figure 2 Comparison of experimental results of beam balance experiment

## 2 结果

### 2.1 基因鉴定

小鼠经基因鉴定结果如图 1 所示, C57BL/6J CD44 KO 纯合子小鼠在第一个反应体系中, 只在 246 bp 位置出现条带, 在第二个反应体系中, 没有出现条带。杂合子小鼠在第一个反应体系中, 在 246 bp 位置出现条带, 在第二个反应体系中, 在 337 bp 位置出现条带。

### 2.2 平衡木实验

在平衡木实验中, WT 小鼠( $n = 16$ )与 CD44 KO 小鼠( $n = 12$ ), 在通过平衡木所需时间上未见明显差异( $P = 0.9092$ )。且 WT 雌性小鼠( $n = 7$ )与 WT 雄性小鼠( $n = 9$ )对比( $P = 0.6795$ )、CD44 KO 组雌性小鼠( $n = 6$ )与 CD44 KO 组雄性小鼠( $n = 7$ )对比( $P = 0.951$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P = 0.9315$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P = 0.7712$ ), 通过平衡木所需时间均没有明显差异。见图 2。

### 2.3 转棒实验

在转棒实验中,WT 小鼠( $n=16$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ ),在转棒仪上停留时间未见明显差异( $P=0.4927$ )。且 WT 雌性小鼠( $n=7$ )与 WT 雄性小鼠( $n=9$ )对比( $P=0.2956$ )、CD44 KO 组雌性小鼠( $n=6$ )与 CD44 KO 组雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.2794$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P=0.6774$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P=0.6135$ ),在转棒仪上停留时间均没有明显差异。见图 3。

### 2.4 旷场实验

在旷场实验中,WT 小鼠( $n=13$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ ),去中央区域探索的时间未见明显差异( $P=0.9932$ )。且 WT 雌性小鼠( $n=6$ )与 WT 雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.7915$ )、CD44 KO 组雌性

小鼠( $n=6$ )与 CD44 KO 雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.9591$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P=0.8837$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P=0.9335$ ),去中心区域探索的时间均没有明显差异。见图 4。

### 2.5 高架十字实验

在高架十字实验中,WT 小鼠( $n=13$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ )对比,去开放臂探索的时间未见明显差异( $P=0.8754$ )。且 WT 雌性小鼠( $n=6$ )与 WT 雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.1457$ )、CD44 KO 组雌性小鼠( $n=6$ )与 CD44 KO 组雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.5599$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P=0.2944$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P=0.4278$ ),在开放臂探索的时间均没有明显差异。见图 5。

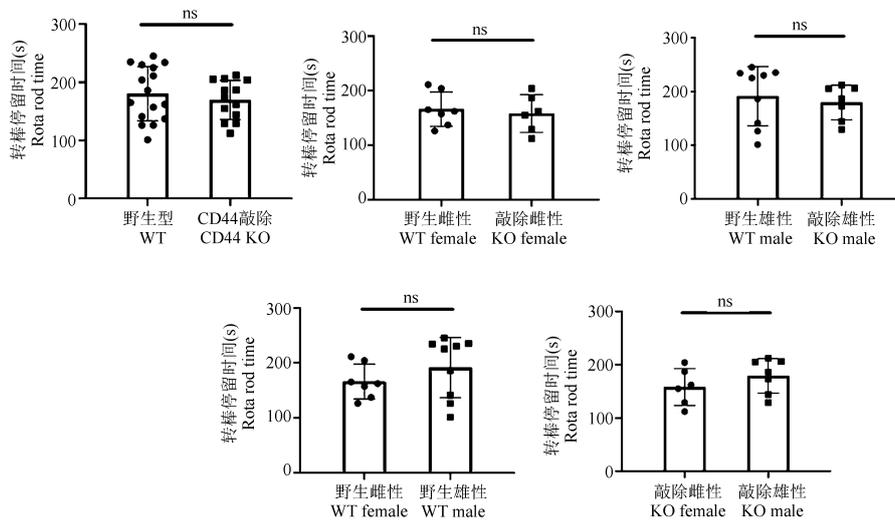


图 3 转棒实验结果比较

Figure 3 Comparison of experimental results of rotarod experiment

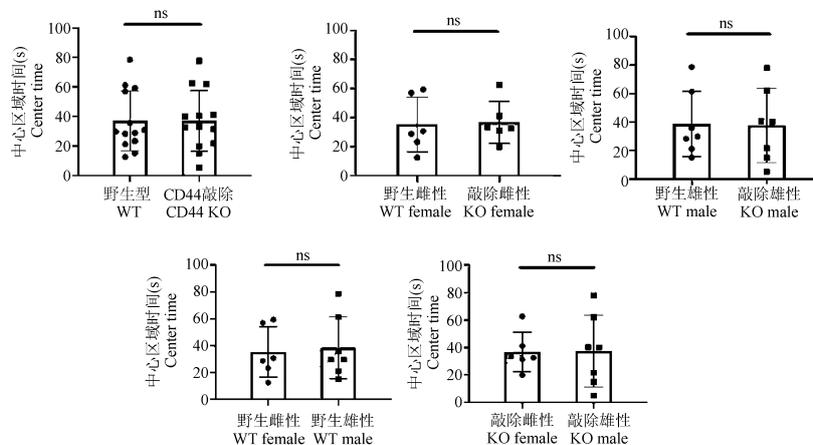


图 4 旷场实验结果比较

Figure 4 Comparison of experimental results of open field experiment

### 2.6 悬尾实验

在悬尾实验中, WT 小鼠 ( $n=16$ ) 与 CD44 KO 小鼠 ( $n=13$ ), 搅动挣扎持续时间未见明显差异 ( $P=0.3518$ )。且 WT 雌性小鼠 ( $n=7$ ) 与 WT 雄性小鼠 ( $n=9$ ) 对比 ( $P=0.7163$ )、CD44 KO 组雌性小鼠 ( $n=6$ ) 与 CD44 KO 组雄性小鼠 ( $n=7$ ) 对比 ( $P=0.1632$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比 ( $P=0.9753$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比 ( $P=0.1039$ ), 搅动挣扎持续时间均没有明显差异。见图 6。

### 2.7 强迫游泳实验

在强迫游泳实验中, WT 小鼠 ( $n=16$ ) 与 CD44 KO 小鼠 ( $n=13$ ), 逃逸相关活动时间未见明显差异 ( $P=0.0691$ )。且 WT 雌性小鼠 ( $n=7$ ) 与 WT 雄性小鼠 ( $n=9$ ) 对比 ( $P=0.5495$ )、CD44 KO 组雌性小

鼠 ( $n=6$ ) 与 CD44 KO 组雄性小鼠 ( $n=7$ ) 对比 ( $P=0.6967$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比 ( $P=0.4572$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比 ( $P=0.1021$ ), 逃逸相关活动时间均没有明显差异。见图 7。

### 2.8 新物体识别实验

在新物体识别实验中, WT 小鼠 ( $n=13$ ) 与 CD44 KO 小鼠 ( $n=12$ ), 探索新物体的时间未见明显差异 ( $P=0.1012$ )。且 WT 雌性小鼠 ( $n=6$ ) 与 WT 雄性小鼠 ( $n=7$ ) 对比 ( $P=0.2746$ )、CD44 KO 组雌性小鼠 ( $n=6$ ) 与 CD44 KO 组雄性小鼠 ( $n=6$ ) 对比 ( $P=0.6246$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比 ( $P=0.3874$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比 ( $P=0.1442$ ), 探索新物体的时间均没有明显差异。见图 8。

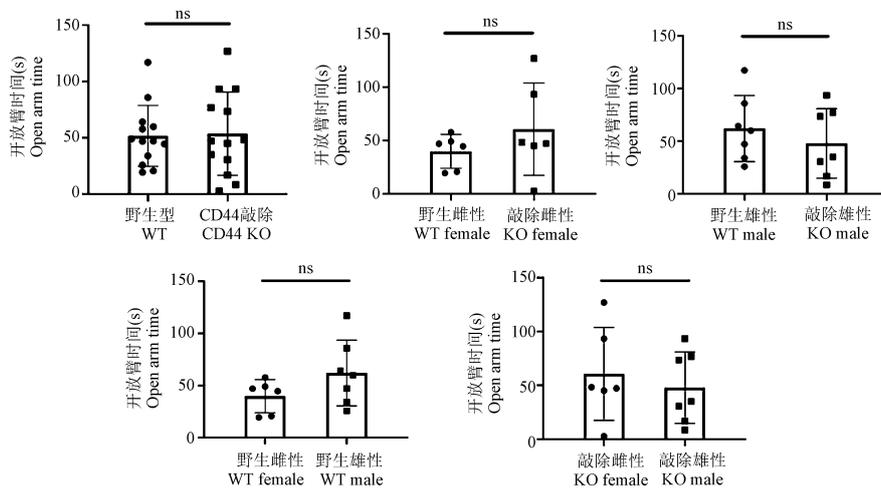


图 5 高架十字实验结果比较

Figure 5 Comparison of experimental results of elevated plus-maze experiment

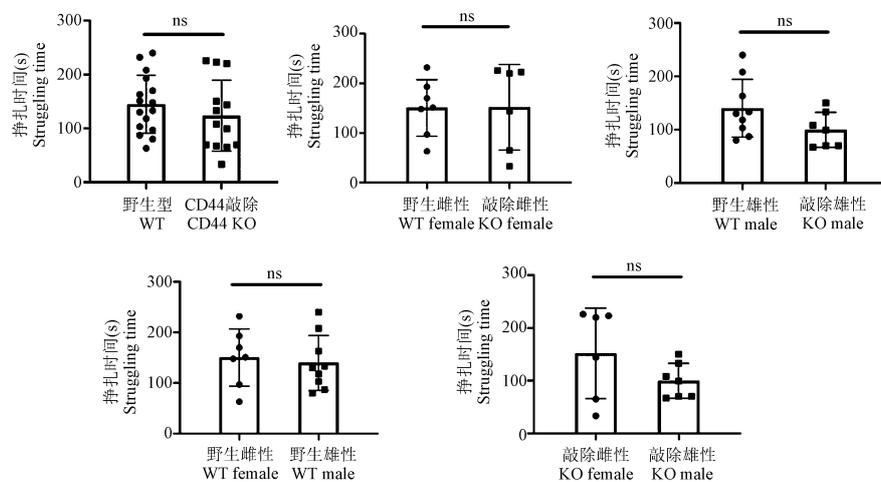


图 6 悬尾实验结果比较

Figure 6 Comparison of experimental results of tail suspension experiment

## 2.9 三箱社交实验

在三箱社交实验中(WT 小鼠  $n=16$ , CD44 KO 小鼠  $n=12$ , WT 雌性小鼠  $n=7$ , WT 雄性小鼠  $n=9$ , CD44 KO 雌性小鼠  $n=6$ , CD44 KO 雄性小鼠  $n=6$ ), Stage 2 阶段,各小组小鼠对新同类的探索时间未见明显差异( $P=0.3052, 0.5901, 0.4252, 0.6041, 0.8856$ )。Stage 3 阶段,WT 雌性小鼠对新同类的探索时间要多于 CD44 KO 雌性小鼠( $P=0.0475$ )。其余各组小鼠对新同类的探索时间均没有明显差异( $P=0.1242, 0.9601, 0.3513, 0.2356$ )。见图 9。

## 2.10 水迷宫实验

由图 10A 可见,在水迷宫定位航行实验中,WT 小鼠( $n=16$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ )在前 4 d 实验时,到达目标区域所需时间未见明显差异( $P=0.1874, 0.9447, 0.8931, 0.1474$ ),从第 5~7 天,

CD44 KO 小鼠到达目标区域所需时间长于 WT 小鼠( $P=0.0147, 0.0182, 0.0233$ )。在水迷宫空间探索实验中,CD44 KO 小鼠到达目标区域次数更少( $P=0.0128$ )(图 10B),初次到达所需时间更长( $P=0.0003$ )(图 10C)。

从初次到达目标区域所需时间方面来看,CD44 KO 雌性小鼠( $n=6$ )所需时间也多于 WT 雌性小鼠( $n=7$ )( $P=0.0036$ )(图 11A),CD44 KO 雄性小鼠( $n=7$ )所需时间多于 WT 雄性小鼠( $n=9$ )( $P=0.0137$ )(图 11A),CD44 KO 组内雄性所需时间少于雌性( $P=0.049$ )(图 11A)。从到达目标区域次数方面分析,各组间未见明显差异( $P=0.0944, 0.0925, 0.8934, 0.5653$ )(图 11B)。

此次研究所进行实验以及实验结果汇总如下表(见表 2)。

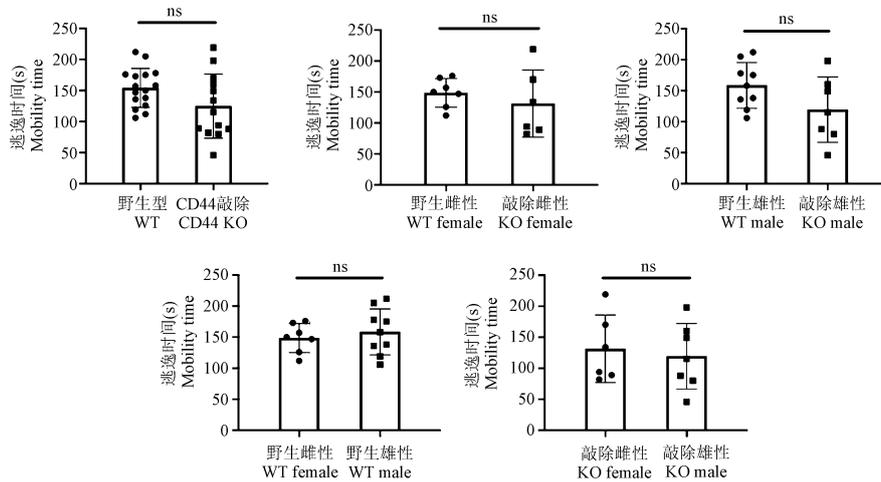


图 7 强迫游泳实验结果比较

Figure 7 Comparison of experimental results of forced swimming experiment

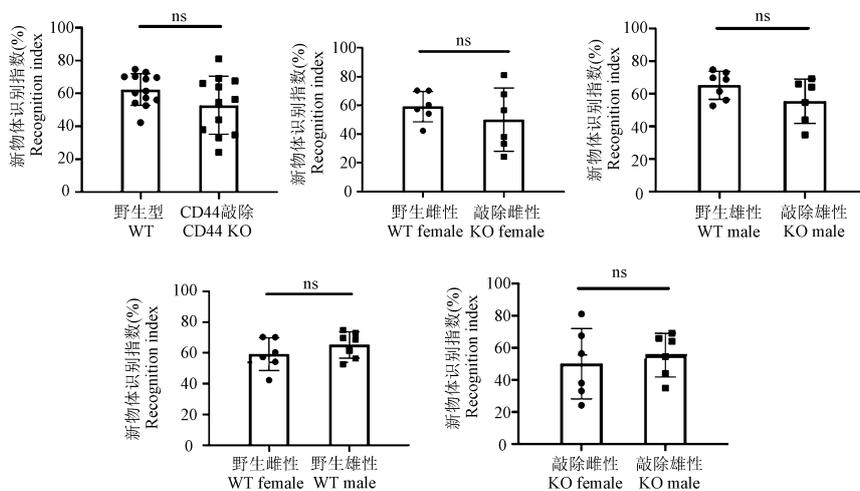
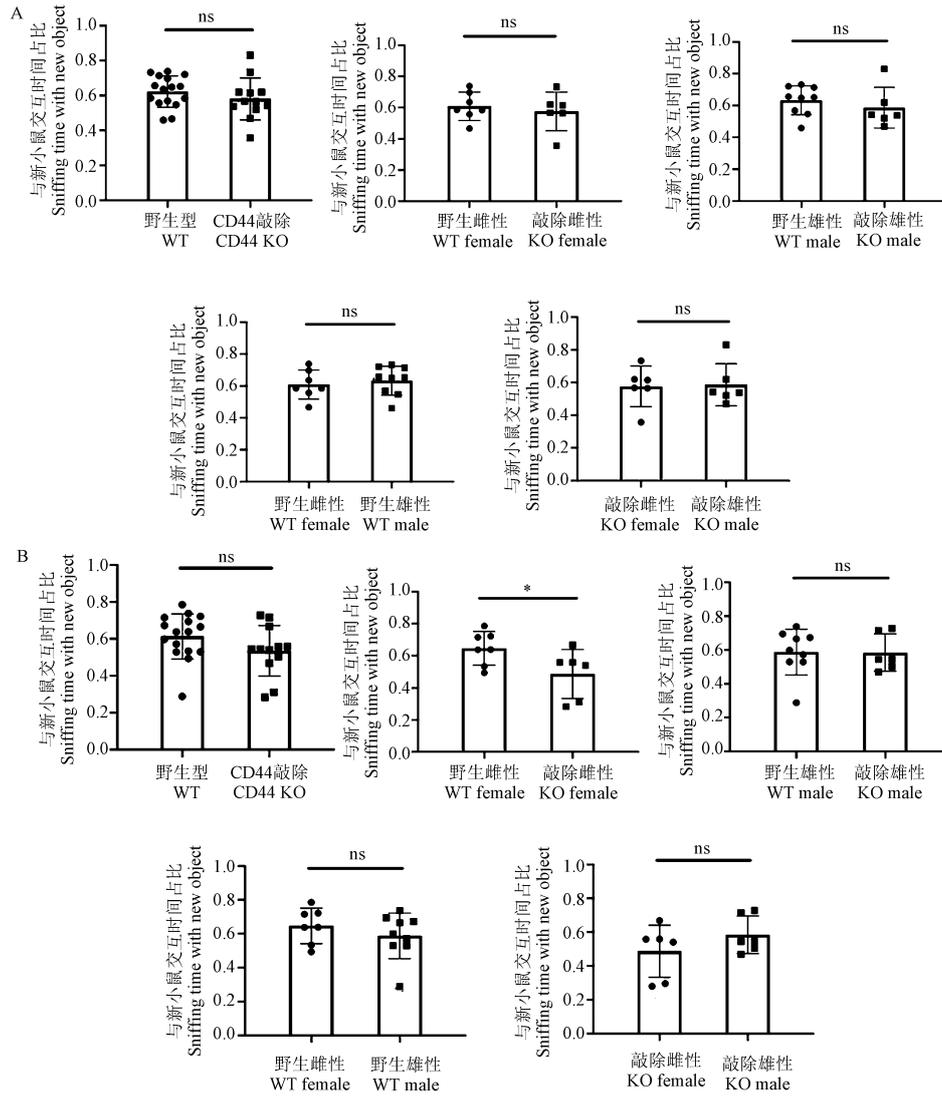


图 8 新物体识别实验结果比较

Figure 8 Comparison of experimental results of novel object recognition experiment

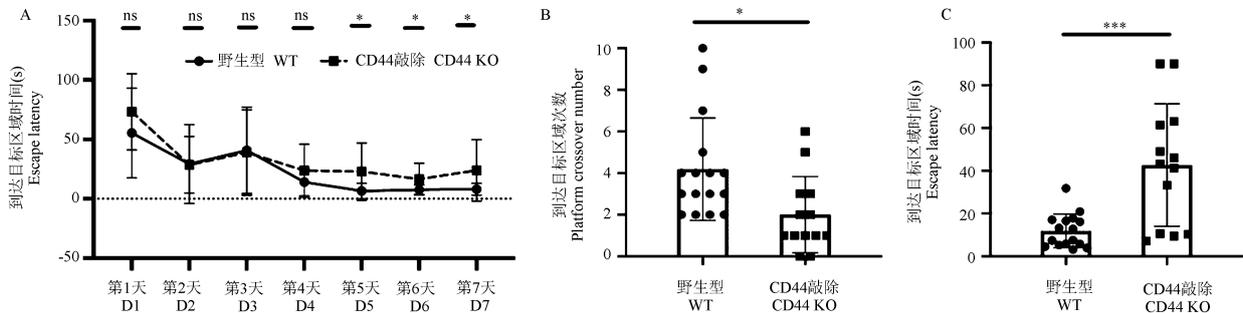


注:A;Stage 2;B;Stage 3。Stage 3 中,与 CD44 基因敲除雌性小鼠相比,\* $P<0.05$ 。

图 9 三箱社交实验 Stage 2 和 Stage 3 结果比较

Note. A, Stage 2. B, Stage 3. During stage 3, Compared with homozygous CD44 knockout female mice, \* $P<0.05$ .

Figure 9 Comparison of experimental results of three-chamber social experiment Stage 2 and Stage 3

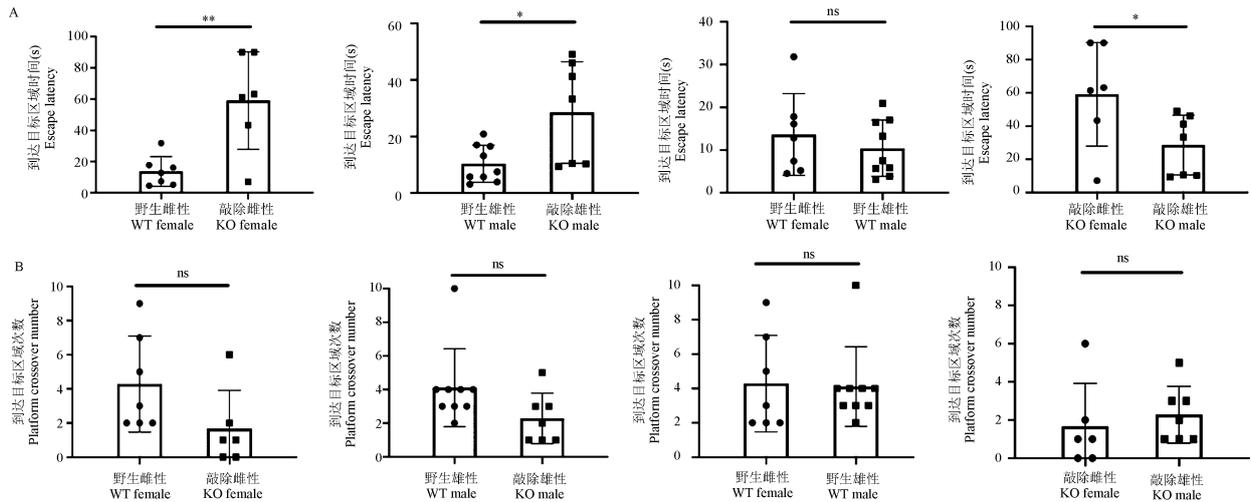


注:与 CD44 KO 相比,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

图 10 水迷宫实验总体结果比较

Note. Compared with homozygous CD44 knockout mice, \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 10 Comparison of overall results of water maze experiment



注:A;到达目标区域时间方面;B;到达目标区域次数方面。与 CD44 KO 雌性相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 11 水迷宫实验空间探索结果比较

Note. A, In terms of time to reach the target area. B, In terms of the times to reach the target area. Compared with homozygous CD44 knockout female mice, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 11 Comparison of space exploration results of water maze experiment

表 2 实验结果及意义汇总

Table 2 Summary of experimental results and significance

实验名称 Experiment	含义 Meaning	结果 Result
平衡木实验 Beam balance experiment	运动协调和平衡能力 Sports coordination and balance ability	无统计学差异 No statistical difference
转棒实验 Rotarod experiment	运动能力和耐力 Athletic ability and endurance	无统计学差异 No statistical difference
旷场实验 Open field experiment	焦虑状态 Anxious state	无统计学差异 No statistical difference
高架十字实验 Elevated plus-maze experiment	焦虑状态 Anxious state	无统计学差异 No statistical difference
悬尾实验 Tail suspension experiment	抑郁程度 Degree of depression	无统计学差异 No statistical difference
强迫游泳实验 Forced swimming experiment	抑郁程度 Degree of depression	无统计学差异 No statistical difference
新物体识别实验 Novel object recognition experiment	学习记忆能力 Learning and memory ability	无统计学差异 No statistical difference
三箱社交实验 Three-chamber social experiment	社交行为能力 Social behavior ability	WT 雌性 > CD44 KO 雌性 WT female > CD44 KO female
水迷宫实验 Water maze experiment	学习记忆和空间记忆能力 Memory ability	CD44 KO < WT, CD44 KO 雌 < CD44 KO 雄 CD44 KO < WT, CD44 KO female < CD44 KO male

### 3 讨论

本实验发现,CD44 KO 的小鼠与 WT 小鼠相比,学习记忆能力明显下降,以第 5~7 天最为显著,空间记忆能力也明显减弱。同时,CD44 KO 雌性小鼠的社交行为能力要弱于 WT 雌性小鼠。但在运动协调能力、平衡能力、耐力、焦虑、抑郁等方面,CD44 KO 的小鼠与 WT 小鼠未见明显差异。由此可知,CD44 基因的表达对小鼠的认知功能,特别是记忆能力有影响,后续以 CD44 相关基因敲除动物做行为学实验时,学习与空间记忆能力方面的实验,需与普通野生型小鼠鉴别开,以免实验结果有偏差。

关于 CD44 基因敲除后影响学习记忆功能的机制,小鼠的运动协调能力、平衡力、耐力、焦虑抑郁程度等未见明显异常,提示 CD44 基因敲除不会引起广泛性中枢神经系统异常。而本实验所得 CD44 KO 小鼠的认知功能障碍,与海马功能障碍的表现相一致。Morris 水迷宫所探究的小鼠空间记忆能力也对神经系统的发育程度十分敏感<sup>[21]</sup>,且已有文献提出 CD44 可能影响成年个体海马神经的发育<sup>[5]</sup>,故而猜想 CD44 参与成年个体海马的发育,从而影响动物的认知能力。

在三箱社交实验中,CD44 KO 雌性小鼠的社交趋向性弱于 WT 雌性小鼠,而雄性小鼠之间则未发

现相关差异,提示 CD44 基因的表达与性别因素有关。有文献提出,雌二醇可以通过下调几个微 RNA 的表达,增加环指蛋白 4 的表达,从而降低转录因子 Sp1 的水平,最终增强了 CD44 的表达<sup>[22]</sup>。这也提示着 CD44 的表达与雌激素存在相关性。这仍有待进一步实验研究探讨。

由于行为学指标存在个体差异性,一般行为学研究需要多批次的动物实验来验证。在本研究中,我们也进行了共 3 批次动物行为学实验,并且得到了相似的结果。由于不同批次实验条件无法完全一致,且不同批次动物之间总体行为能力存在一定差异,因此,尽管不同批次实验的结果趋势是一致的,但是并不适合将不同批次结果放在一起统计分析,所以本研究中展示了最具有代表性的一批研究数据。本实验所得结果,符合前述研究所报道的“CD44 基因的缺失可以导致海马体功能障碍和空间学习记忆缺陷<sup>[19]</sup>”。本研究的局限性在于,只研究了 CD44 基因对于行为能力的表观影响。在接下来的研究工作中,我们将进一步探讨 CD44 如何受到调控,上下游分子机制如何,哪些调控因子相互作用形成相关通路等分子机制方面的问题。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules [J]. *Mol Pathol*, 1999, 52(4): 189-196.
- [ 2 ] Casini P, Nardi I, Ori M. Hyaluronan is required for cranial neural crest cells migration and craniofacial development [J]. *Dev Dyn*, 2012, 241(2): 294-302.
- [ 3 ] Su W, Foster SC, Xing R, et al. CD44 transmembrane receptor and hyaluronan regulate adult hippocampal neural stem cell quiescence and differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(11): 4434-4445.
- [ 4 ] Sun J, Wu J, Hua F, et al. Sleep deprivation induces cognitive impairment by increasing blood-brain barrier permeability via CD44 [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 563916.
- [ 5 ] Raber J, Olsen RHJ, Su W, et al. CD44 is required for spatial memory retention and sensorimotor functions [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 275: 146-149.
- [ 6 ] Pellow S, Johnston AL, File SE. Selective agonists and antagonists for 5-hydroxytryptamine receptor subtypes, and interactions with yohimbine and FG 7142 using the elevated plus-maze test in the rat [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1987, 39(11): 917-928.
- [ 7 ] Nasehi M, Ostadi E, Khakpai F, et al. Synergistic effect between D-AP5 and muscimol in the nucleus accumbens shell on memory consolidation deficit in adult male wistar rats: an isobologram analysis [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2017, 141: 134-142.
- [ 8 ] 田野, 栗焱, 原一桐, 等. 长时程抑郁小鼠模型建立及行为与神经病理特征观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 358-363.
- [ 9 ] Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 177(3): 245-255.
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] Kim S, Kim T, Lee HR, et al. Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice [J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 16.
- [ 12 ] Rogel-Salazar G, Luna-Munguia H, Stevens KE, et al. Transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes does not modify the short-and long-term memory formation in rats evaluated in the novel object recognition test [J]. *Epilepsy Behav*, 2013, 27(1): 154-158.
- [ 13 ] Pearson BL, Defensor EB, Blanchard DC, et al. C57BL/6J mice fail to exhibit preference for social novelty in the three-chamber apparatus [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 213(2): 189-194.
- [ 14 ] Reilly MP, Weeks CD, Topper VY, et al. The effects of prenatal PCBs on adult social behavior in rats [J]. *Horm Behav*, 2015, 73: 47-55.
- [ 15 ] Takechi K, Suemaru K, Kiyoi T, et al. The  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor modulates autism-like behavioral and motor abnormalities in pentylenetetrazol-kindled mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 775: 57-66.
- [ 16 ] Hsieh LS, Wen JH, Miyares L, et al. Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 637: 142-147.
- [ 17 ] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues [J]. *Learn Motiv*, 1981, 12(2): 239-260.
- [ 18 ] Li H, Kang T, Qi B, et al. Neuroprotective effects of ginseng protein on PI3K/Akt signaling pathway in the hippocampus of D-galactose/A $\beta$ 1-42 inducing rats model of Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 162-169.
- [ 19 ] Sha HY, Zhao JB, Sha MX, et al. Effects of vitamin B12 on postoperative cognitive dysfunction induced by isoflurane anesthesia in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(8): 1959-1966.
- [ 20 ] Golub MS, Germann SL, Lloyd KCK. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 153(1): 159-170.
- [ 21 ] Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats [J]. *Learn Mem*, 2009, 16(2): 147-154.
- [ 22 ] Young MJ, Chen YC, Wang SA, et al. Estradiol-mediated inhibition of Sp1 decreases miR-3194-5p expression to enhance CD44 expression during lung cancer progression [J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1): 3.