

尚培骏,姬乃春,杨锦雯,等. 基于 *APP/PS1* 双转基因小鼠与野生型小鼠比较综述学习记忆相关行为学实验优缺点和注意事项 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 969-984.

Shang PJ, Ji NC, Yang JW, et al. Comparison of *APP/PS1* double transgenic and wild-type mice to review the advantages, disadvantages, and cautions of behavioral tests related to learning and memory [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 969-984.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.001

基于 *APP/PS1* 双转基因小鼠与野生型小鼠比较 综述学习记忆相关行为学实验优缺点和注意事项

尚培骏^{1#}, 姬乃春^{2#}, 杨锦雯¹, 赵沅杰¹, 拓振杰¹, 张晓华^{3*}

(1. 西安医学院公共卫生学院, 西安 710021; 2. 陕西省脑疾病防治重点实验室/西安医学院运动健康研究中心, 西安 710021; 3. 厦门大学神经科学研究所/福建省神经退行性疾病及衰老研究重点实验室, 福建 厦门 361005)

【摘要】 目的 根据 *APP/PS1* 转基因 AD 模型小鼠和野生型小鼠在多种行为学实验中的表现, 比较各行为学实验优缺点, 并归纳其方法、注意事项、评价指标和应用特点, 为研究动物认知相关行为学提供依据。方法 采用 Y 迷宫、I 型 T 迷宫、II 型 T 迷宫、新物体识别、旷场、转棒疲劳仪等实验, 检测 3 月龄和 6 月龄 *APP/PS1* 转基因小鼠与野生型小鼠运动能力、探索行为、学习与记忆能力、新物体识别能力、活跃度、对旷场的畏惧程度以及中枢协调能力差别。结果 *APP/PS1* 转基因小鼠的工作记忆能力显著低于同月龄 WT 小鼠, 表现为在 Y 迷宫内, 6 月龄的自主返回率显著增加, 且 6 月龄 AD 小鼠的自主交替率和自主返回率较 3 月龄 AD 小鼠显著下降, WT 小鼠没有看到这种变化。6 月龄 AD 小鼠在 I 型 T 迷宫(奖赏型)中得分和记忆时间较 WT 小鼠显著下降, 在 II 型 T 迷宫(惩罚型)中学习时间显著增加, 说明 AD 小鼠的学习能力弱于 WT 小鼠, 且记忆提取较慢, 正确率较低。在旷场实验中, 6 月龄 AD 小鼠运动距离和速度较同月龄野生型小鼠显著下降。AD 小鼠进入中心区的次数和中心区/周围区时间比显著下降, 直立次数也显著下降, 说明了 AD 小鼠的探索行为较同月龄野生型小鼠显著下降, 对旷场的畏惧程度更高。并未发现 *APP/PS1* 和 WT 小鼠在转棒疲劳仪掉落时间方面的差异, 说明中枢协调能力无显著性差异。结论 Y 迷宫操作简单、受干扰小、实验周期短, 但单只动物实验时间较长, 适用于检测工作记忆; T 迷宫符合小鼠的探索天性, 可以最为准确测定小鼠学习与记忆能力, 反映记忆的提取能力, 但实验周期长; 新物体识别实验利用小鼠对新物体的好奇心态, 精准反映小鼠识物记忆的能力, 但实验器材操作较为繁琐, 且易受动物应激行为影响; 旷场实验利用动物畏惧空旷场地的特性以及对新环境的好奇心, 主要用来测定小鼠运动能力、探索能力、活跃度以及对旷场的畏惧程度, 但实验结果易受小鼠紧张度影响; 转棒疲劳实验直观地反映了小鼠的身体协调性和抗疲劳能力, 间接反映小鼠的昼夜规律, 适合作为检测学习记忆能力的辅助指标。

【关键词】 *APP/PS1* 转基因小鼠; 阿尔茨海默病; 动物行为学; 学习记忆

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-0969-16

Comparison of *APP/PS1* double transgenic and wild-type mice to review the advantages, disadvantages, and cautions of behavioral tests related to learning and memory

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目(81801088), 陕西省高校科协青年人才托举计划(20200313), 国家级大学生创新创业训练计划项目(202111840011), 2021年陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目(2021JM-505)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China Youth Program(81801088), Shaanxi University Science and Technology Association Young Talent Lifting Program(20200313), National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students(202111840011), Natural Science Basic Research Program of Shaanxi in 2021(2021JM-505).

【作者简介】 尚培骏(2002—), 男, 在读本科生, 研究方向: 阿尔茨海默病。Email: 2696145717@qq.com;

姬乃春(1973—), 男, 硕士, 研究方向: 运动与衰老。Email: 475584122@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 张晓华(1987—), 女, 博士, 研究方向: 阿尔茨海默病。Email: xiaohuazhang2017@163.com

SHANG Peijun^{1#}, JI Naichun^{2#}, YANG Jinwen¹, ZHAO Yuanjie¹, TA Zhenjie¹, ZHANG Xiaohua^{3*}

(1. College of Public Health, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China. 2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Brain Disease Prevention and Treatment/Sports Health Research Center, Xi'an Medical College, Xi'an 710021. 3. Institute of Neuroscience, Xiamen University/Fujian Provincial Key Laboratory of Neurodegenerative Diseases and Aging Research, Xiamen University, Xiamen 361005)
Corresponding author: ZHANG Xiaohua. E-mail: xiaohuazhang2017@163.com

【Abstract】 Objective To compare the advantages and disadvantages of *APP/PS1* transgenic AD model mice and wild-type (WT) mice in a variety of behavioral experiments, and summarize the precautions, assessment criteria, and applications of these experiments to provide a basis for the study of animal cognition-related behavior. **Methods** Y maze, type I and II T mazes, new-object recognition test, open-field test, and rotarod tests were adopted to detect the motor ability, exploratory behavior, learning and memory ability, new-object recognition ability, activeness, fear of open field, and the coordination of central nervous system in 3- and 6-month-old *APP/PS1* transgenic and WT mice. **Results** Six-month-old *APP/PS1* transgenic mice showed significantly lower working memory than WT mice of the same age. This is indicated by a significant increase in the spontaneous return in the Y maze, and a significant decrease in spontaneous alternations and return in 6-month-old AD mice compared to the 3-month-old AD mice, while no such discrimination is found in WT mice. The scores and memory time of 6-month-old AD mice in the type I T maze (reward type) were significantly decreased compared with WT mice, and the learning time in the type II T maze (punishment type) was significantly increased, indicating a weaker learning ability, slower memory retrieval, and lower accuracy in AD mice compared with WT mice. In the open-field test, the total distance and speed were significantly decreased in 6-month-old AD mice compared with WT mice of the same age. The number of entries in the central area and the ratio of central to peripheral area and the number of rearings were significantly decreased in AD mice, indicating that exploratory behavior was significantly decreased in AD compared with WT mice of the same age, and the degree of fear in the open field was higher. However, there was no difference between *APP/PS1* and WT mice in the latency to fall in the rotarod test, indicating no difference in central coordination abilities. **Conclusions** The Y maze test can be operated easily and has a short time course, and is suitable for detecting working memory, but the test circle for a single animal is longer. The T maze assesses the animal's exploratory nature, which can accurately determine the learning and memory ability, and reflects the ability of memory retrieval; however, the test circle is long. The new-object recognition test was designed based on the rodents' curiosity of new objects, and could accurately reflect their ability to recognize objects. However, operation of the experimental equipment is complicated, and the test is easily affected by an animal's stress behavior. The open-field test is mainly used to measure motor and exploration abilities, activity, and fear of open field, based on the animal's fear of open field and curiosity about a new environment; however, the experimental results are easily affected by stress state. The rotarod test directly reflects the body's coordination and anti-fatigue ability and indirectly reflects the animal's diurnal rhythm, and can be used as an auxiliary index for learning and memory ability.

【Keywords】 *APP/PS1* transgenic mice; Alzheimer's disease; animal behavior; learning memory

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

动物行为学实验为研究大脑认知功能、情绪功能和相关病理生理学提供重要依据, 现已成为神经病理学理论重要支撑之一^[1]。不同于人类的认知功能可通过读写等直观方式反映, 动物的认知功能需要通过测量其学习记忆等方面体现进行评价^[2]。在众多实验动物中, 小鼠等啮齿类动物因其喜欢探索陌生事物和环境的天性^[3], 成为典型动物行为学模型之一。在行为学实验过程中, 实验者可借助实验器材创造多种合适的刺激点与刺激条件, 以便更好地观测小鼠运动能力、探索行为、学习记忆行为

等, 进而帮助研究基因工程小鼠的学习记忆能力、观察小鼠的用药反应情况、评价药物的安全性和可靠性, 为研究疾病发病机制等提供重要依据。目前, 学习记忆相关行为已被认为是探索人类神经系统疾病最简单、直接且安全的研究方法^[4]。随着记忆学研究的快速发展, 学习记忆理论不断涌现, 实验动物模型发展道路也在不断向前, 各类型记忆被不断地发现、定义, 为神经生理学和心理学提供研究基础^[5]。目前主要的学习记忆相关行为学方法包括各种迷宫、旷场实验、新物体识别实验、情景恐

惧实验、转棒疲劳实验等。但究竟在何种情况下采用何种实验方法没有精确地划分。

《柳叶刀》2020 年发布的一项报告显示,全球约有 5000 万人患有痴呆症,预计这一数字到 2050 年将增加到 1.52 亿^[6]。目前 65 岁以上老年人患有阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的比例约占 11%,85 岁以上的老年人患病比例更是高达 42%。*APP/PS1* 双转基因小鼠是 AD 主要的动物模型之一,该小鼠表达突变的人类早老素(*Presenilin 1*, *PS1*) (*DeltaE9*) 和人鼠淀粉样前蛋白融合体(*APP_{swe}*)^[7],这两个基因的表达都由小鼠朊病毒蛋白启动子启动^[8]。*APP* 基因是 AD 病理症状之一老年斑成分人淀粉样蛋白 β (Amyloid β , $A\beta$) 的前体蛋白。人类早老素基因 *DeltaE9* 突变是该基因的第 9 个外显子缺失产生的^[9],此突变会导致早发性老年痴呆症^[10]。因此,为了探索学习记忆相关行为学的特点,本研究通过分析对比 *APP/PS1* 小鼠和野生型小鼠在不同行为学实验中的运动能力、新物体识别能力以及学习与记忆能力的表现,综合各实验的优缺点和评价指标,阐述各种行为学实验的特点和应用特点,为研究者采取合理的行为学实验方法提供更好的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 背景的 *APP/PS1* 双转基因健康小鼠和野生型 C57BL/6J 雄性健康小鼠,3 月龄各 60 只,6 月龄各 95 只;3 月龄体重 22.7 ~ 25.2 g;6 月龄体重 29.5 ~ 34.5 g,购于北京华阜康生物科技有限公司【SCXK(京)2019-0008】,饲养于西安医学院实验动物中心【SYXK(陕)2022-04】,环境温度维持(23 ± 1) °C,12 h 光照循环。除 T 迷宫实验期间进行饥饿处理外,小鼠其余时间均自由采食、饮水。动物行为学实验全程在西安医学院 SPF 级动物行为室进行,遵循实验动物福利伦理审查指南【GB/T35892-2018】,经西安医学院动物伦理委员会审批(XYLS 2019016)。

1.1.2 主要试剂与仪器

APP、*PS1* 引物(金斯瑞,RP10004CN、RP10009CN),50 × TAE(生工,B548101),琼脂糖(吉至,9012-36-6),DNA ladder 核酸燃料(碧云天,D0139),4 × Taq Master Mix,8 × DNA 缓冲液(碧云

天,D0072),DL2000 DNA marker(赛默飞,SM1391),新洁尔灭(利尔康,30701122),75%乙醇(利尔康,ri5FTXeVtZj5),蒸馏水。T 迷宫(Noldus,T-Maze)、Y 迷宫(Noldus,Y maze)、新物体识别探索箱(Noldus,PhenoTyper)、旷场箱(Noldus,PhenoTyper)、疲劳转棒仪(众实科技,ZB ~ 200),动物运动轨迹跟踪系统(Noldus EthoVision XT)、小动物行为学视频记录与分析系统(Panlab SMART 3.0),摄像头(SONY,FCB-EW9500H)。

1.2 方法

1.2.1 Y 迷宫

Y 迷宫是基于啮齿动物对新环境的自发探索能力而设计的实验装置,由三个完全相同的臂组成,三个臂之间为 120° 夹角,呈 Y 字形分布(如图 1)。小鼠在前一次的记忆基础上做出下一次进臂选择,令其不断进出各个臂^[11],是测量动物学习记忆能力的典型方法。根据分析小鼠探索进入各臂的次数、顺序进而反映实验动物的瞬时记忆能力(instantaneous memory)^[12]。相比于其他实验方法,Y 迷宫更加偏向于工作记忆,在加工存储短时间内记忆的能力有更为直观地表现^[13],较为简便且无需动物学习任何规则来进行趋利避害^[14],有一定的实用性。

实验选用 3 月龄、6 月龄的 AD 小鼠与 WT 小鼠各 20 只进行实验,实验开始随机选取一臂为起始臂并将小鼠放置于起始臂末,让小鼠进行自由探索 8 min,记录小鼠运动轨迹与进臂次数 *N*,记录小鼠运动轨迹的自主交替进臂数(alternation,如 ABC):计算自主交替率,即 $\text{alternations}/(N-2)$ 、在探索结束一臂后返回上一探索臂的自主返回数(return,如 ABA)以及在两次连续探索同一臂的自主重复数(repeated)的自主返回率和自主重复率^[15]。

注意事项:(1)Y 迷宫三臂内部各有不同标记,协助小鼠分辨三臂。(2)每组小鼠随机从不同的起始臂进入,每只小鼠实验完成后需用乙醇、新洁尔灭、蒸馏水依次擦拭迷宫,消除因上一只小鼠气味遗留造成的影响。(3)实验期间实验人员切勿随意走动,切勿移动实验设备或发出噪音。(4)小鼠行为学实验期间,应保持室内环境接近饲养环境温度,过高或过低会导致小鼠产生烦躁或战栗,使其拒绝探索。(5)以小鼠尾根进入虚线位置(见图 1 虚线)为进臂标准。

1.2.2 T 迷宫

T 迷宫由一起始臂以及两对称的目标臂构成,

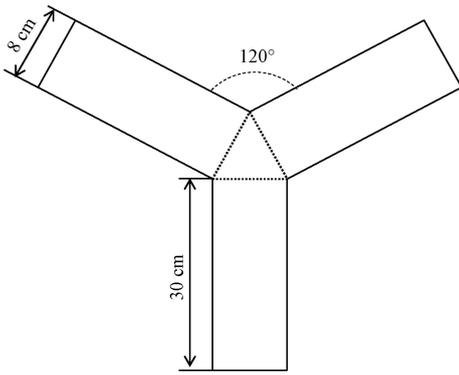


图 1 Y 迷宫示意图

Figure 1 Schematic diagram of Y maze

起始臂(start arm)和目标臂(goal arm)夹角 90° 。相较于其他实验,T 迷宫利用动物觅食行为和对周围环境探索的习性^[16],在测定动物学习与记忆能力中的长时记忆方面拥有更高的准确性^[17]。实验以小鼠是否选择正确目标臂为标准,对小鼠的学习和记忆能力进行评判^[18]。T 迷宫通常用来研究动物的空间工作记忆(spatial working memory),即测定动物在一定规则下对有用的信息的记忆存储及提取。经改进后的 T 迷宫实验方法也可用来评价参考记忆(reference memory),即小鼠自己与记忆产生联系后,探究小鼠行为与记忆之间的相互影响^[19]。常见的 T 迷宫有诱导探索型实验(I 型 T 迷宫)与惩罚型实验(II 型 T 迷宫)两种。

I 型 T 迷宫,通过借助食饵,诱导小鼠探索迷宫^[20]。诱导探索阶段,在迷宫各臂放置 2 ~ 3 个食饵,诱导小鼠探索迷宫 3 min,适应 3 d。待小鼠完全适应迷宫之后,在两目标臂末端放置食饵后随机关闭一臂(如图 2 单虚线)。实验选用 6 月龄 AD 小鼠和 WT 小鼠各 10 只进行实验,实验开始将小鼠放于起始臂末端开始计时,让小鼠自由觅食,直至小鼠接触食饵,停止计时,此段时间记为训练时间;待小鼠离开食饵区域,将小鼠带离迷宫,一段时间后(适应阶段间隔 5 s,实验阶段第 1 次间隔 20 s、第 2 次

间隔 1 min 重复实验)将小鼠重新放回起始臂,打开封闭臂闸门,让小鼠自由探索,在新的、有食饵的臂(即原封闭臂)和旧的、无食饵的臂进行选择,以第 1 次进入目标臂为评判标准,若进入原封闭臂记分为 1,反之则为 0;在接触食饵后停止计时,记为记忆时间。1 h 后再测试一轮^[21]。

II 型 T 迷宫实验存在特殊的惩罚机制。实验适应阶段,让小鼠在 T 迷宫内自由探索 3 d,每天 3 min。在小鼠熟悉迷宫之后,第 4 天让每只小鼠自主探索 T 迷宫 3 ~ 5 次,记录进入次数多的一侧,并记为偏好臂^[22]。选用 6 月龄 AD 小鼠和 WT 小鼠各 15 只进行实验,实验开始,将各小鼠对应偏好臂闸门关闭,迷宫另一臂末端放置食饵。第一步将小鼠放于起始臂末端让小鼠自由探索且开始计时,直至小鼠接触食饵^[23],停止计时并记此段时间为学习时间;间隔 10 s 后,将小鼠重新放回起始臂末端,打开偏好臂闸门并开始计时,若小鼠进入非偏好臂(放置食饵的臂)则计得分为 1,若小鼠进入偏好臂,计得分为 0,并且关闭偏好臂闸门惩罚小鼠,10 s 后打开闸门并继续记录进入非偏好臂次数,直至再次触碰非偏好臂食饵^[24]停止计时,记此时间段为记忆时间。

注意事项:(1)诱导时应选择气味较小的食饵,避免小鼠以嗅觉取代记忆引起实验误差。(2)食饵体积不宜过小,搁置在每臂中央,便于小鼠发现食饵。(3)II 型 T 迷宫中小鼠 3 min 内未探索或 I 型 T 迷宫小鼠 5 min 内未探索则排除此次实验。(4)每组实验完成后,待小鼠停止进食后再将小鼠取出,避免小鼠受到惊吓造成后续实验误差,每只小鼠做完一轮实验要采用新洁尔灭、乙醇和水分别擦拭迷宫。(5)以小鼠尾根部为标准评判是否进臂。

1.2.3 新物体识别

新物体识别实验是基于人类患有失忆症时识别环境的差异而发展起来的,用于评价啮齿动物的新物体识别记忆能力与识物记忆。本实验基于小鼠在新环境下自由探索的习性和对新物体的好奇心^[25]。该实验无需像迷宫实验,以食物为介控制小鼠,也不需要像转棒疲劳实验一样强制小鼠运动,完全依靠小鼠在密闭空间下的自由探索能力,发现周围环境变化。在小鼠自由记忆的情况下,更能模拟人类学习、记忆的行为,借此用来评估改善记忆药物的效果^[26]。

实验选用 3 月龄、6 月龄 AD 和 WT 小鼠各 25 只进行实验,实验分为适应阶段和测试阶段。在适

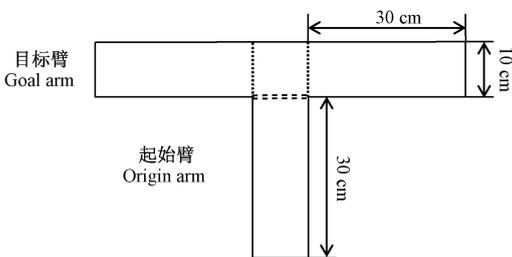


图 2 T 迷宫示意图

Figure 2 Schematic diagram of T maze

应阶段之前,需进行 3 d 的熟悉过程。实验人员每天将小鼠放到手上抚触 5 min,借此消除小鼠紧张恐惧感,并熟悉实验者气味。实验开始前,剔除活动异常小鼠(活动过少、活动过多、转圈等),符合标准的小鼠在无物体箱体中每天自由探索 3 min,待 3 d 后小鼠熟悉实验箱体内环境^[27],正式开始实验,实验步骤如下。实验开始:T1 阶段,分别在箱体底板对角放置两完全相同的物体 A、B,将小鼠放入密闭环境的箱体中,让小鼠在 A、B 两物体周围探索时间累计 25 s(以鼻尖凑近物体约 2 ~ 3 cm 为标准),或 3 min 内探索时间还不到 25 s 则停止探索,将小鼠放回饲养笼,停止 T1 阶段。1 h、24 h 后分别开始短期、长期 T2 阶段测试,将其中一个物体换成新的物体 b,物体放置位置不变,再次将小鼠放入箱体进行探索,当小鼠在 A、b 两物体周围探索时间累计 15 s,或 5 min 内探索时间还不到 15 s 则停止探索,将小鼠放回饲养笼,停止 T2 阶段,见图 3。

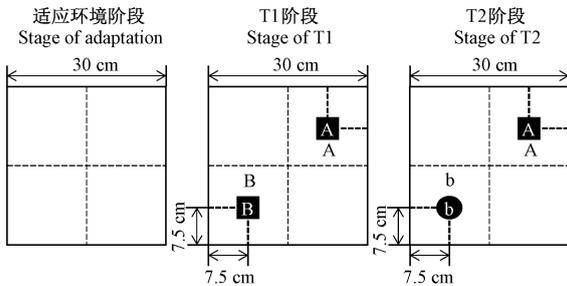


图 3 新物体识别实验示意图

Figure 3 Schematic diagram of new object recognition test

注意事项:(1)探索物体的时间需要根据小鼠的学习能力摸索,与年龄和基因型密切相关^[28]。(2)物体可以选择不同材质、形状和颜色^[29];具有一定重量,防止小鼠推翻;应保证新旧物体存在差异;避免选择太过鲜艳的颜色,如橙色。(3)每只动物实验完成后需擦拭粪便尿液,因实验在密闭空间内进行,在清洁箱体时切勿用乙醇等刺激性试剂擦拭^[30]。(4)每组实验完毕后,先取出物体,后取出小鼠,减少对动物的刺激。

1.2.4 旷场实验

旷场实验常用于检测啮齿动物运动能力、探索能力、活跃性以及对其旷场的畏惧程度。自 20 世纪 40 年代被学者发明以来,旷场实验已经被广泛应用到神经生物学研究与生物节律当中。旷场实验一方面利用了动物畏惧空旷场地的天性,激发动物趋利避害的内在特点^[31],用来评价小鼠的运动和情绪行为。另一方面,利用小鼠在好奇心的驱使下探索

新环境,旷场也为新物体识别实验的建立提供一定的前提基础^[32]。

选用 6 月龄 AD 小鼠和 WT 小鼠各 15 只进行实验,实验开始前,实验人员应消除小鼠的恐惧。实验开始将小鼠放入箱体 3 min,摄像头记录行动轨迹。通过软件分析其在中央区与周边区逗留时间、速度和运动距离,以及直立次数和理毛行为等,见图 4。

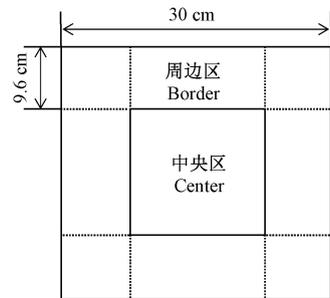


图 4 旷场实验示意图

Figure 4 Schematic diagram of open-field

1.2.5 转棒疲劳实验

转棒疲劳实验为检测啮齿动物运动功能、抗疲劳能力和昼夜节律提供了方法,主要用于运动协调性、平衡感测试、抗疲劳药物筛选和鉴定,也可间接反映动物的昼夜节律^[33]。实验期间,当动物被放置在滚筒中央的转棒上时,为避免滑落,需调整平衡,随转棒转动而跑动。通过测量动物在滚筒上行走的时间来评定实验对象的中枢神经系统疾病^[34]。

转棒疲劳仪以动物运动时间作为实验指标,若动物掉落,仪器将自动记录动物在转棒上的坚持时间以及滑落瞬间转棒的速度。因小鼠的协调性由小鼠的中枢神经系统决定,协调性越差的小鼠会在越短时间内从转棒下掉落^[35]。转棒疲劳仪运动能力在帕金森病、酒精依赖、亨廷顿病、智力发育、运动失调和阿尔茨海默病的药物评价等研究上,被认为是非常重要的检测指标^[36]。实验选用 3 月龄、6 月龄 AD 和 WT 小鼠各 15 只进行实验,实验适应阶段分为三个阶段,三个阶段间无时间间隙:T1 阶段,转棒以加速度 5 r/min^2 从静止开始匀加速至速度为 5 r/min ;T2 阶段,更改加速度为 10 r/min^2 ,加速至 15 r/min 后匀速转动 2 min;T3 阶段,继续以加速度 10 r/min^2 加速至 20 r/min 后继续匀速 2 min。若小鼠在测试过程中掉落,记录掉落时间^[37],待 20 min 后重新对掉落小鼠开始实验,记录小鼠在转棒上持续的时间。小鼠在进行适应实验期间训练小鼠体力,加强小鼠协调能力。正式实验阶段,T1、T2、T3 各阶段加速度不

变,结束时匀速速度分别达到 5 r/min、15 r/min、18 r/min,记录小鼠在转棒持续时间。

注意事项:(1)测试期间,舍弃连续 3 次以上实验失败的小鼠。(2)待小鼠稳定站立在转棒上时开始实验。(3)选择拥有高摩擦系数的转棒材质。

1.2.6 APP/PS1 小鼠的培育

实验所用 APP/PS1 双转基因小鼠品系为 APP^{swe}/PSEN1^{dE9}(C57BL/6J),该小鼠携带小鼠胚

病毒蛋白启动子启动下的突变的人早老素基因 PSEN1(DeltaE9)和人鼠淀粉样前蛋白(APP^{swe})融合体,其中 PSEN1 的 DeltaE9 突变是该基因的第 9 个外显子缺失产生的,此突变会导致早发性老年痴呆症。设计了 APP 和 PSEN1 的引物,序列如表 1,进行基因鉴定。该小鼠在大约 4 个月皮层开始出现淀粉样斑块,在大约 6 个月时海马中出现淀粉样斑块,并且随着年龄的增长而增加大小和数量。

表 1 APP/PS1 小鼠引物序列

Table 1 APP/PS1 mouse primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences	退火温度(°C) Annealing temperature(°C)	片段大小(bp) Maximum fragment (bp)	循环次数 Cycles
APP	F:5'-GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG-3' R:5'-CTTGTAAGTTGGATTCTCATATCCG-3'	65	350	40
PS1	F:5'-AATAGAGAACGGCAGGAGCA-3' R:5'-GCCATGAGGGCCTAATCAT-3'	60	608	40
GAPDH	F:5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAATCT-3' R:5'-GTAGGTGGAAATTTAGCATCATCC-3'	60	324	40

1.2.7 APP/PS1 基因鉴定

实验用 APP、PS1,两种引物对小鼠的基因型进行鉴定,当小鼠共同表达 APP/PS1 基因时,鉴定为 APP/PS1 双转基因。小鼠使用双面耳标进行序列编号,以鼠尾为标本提取 DNA。

(1)组织的消化

将 Protease Plus 与 Buffer L 按 1:50 配制,充分混合后向含有样本的 EP 管内加入 100 μL 新鲜消化液,55°C 金属浴/水浴反应 30 min(确保鼠尾完全浸入消化液中),后将样本在 95°C 金属浴/水浴中孵育 5 min 以灭活反应蛋白酶。以 12 000 r/min 离心 5 min 后取含有 DNA 的上清液为 PCR 模板。

(2)PCR 的扩增

反应体系在配置过程中,最好处于低温情况下,以确保 PCR 扩增的效率以及特异性。配置比例(见表 2)。将上述配置好的样本进行 PCR 扩增,程序为(见图 5):①94°C 预变性 5 min(1 次循环);②94°C 变性 20 s,56°C 退火 30 s,72°C 延伸 45 s(35 次循环);③72°C 充分延伸 5 min(1 次循环);④扩增结束 4°C 保持。

(3)琼脂糖凝胶电泳

在 1 × TAE 溶液中加入 2% 琼脂糖,微波加热充分溶解后,待冷却至 50°C 时加入核酸染料,充分混匀后倒入模具。凝固后浸入含有 1 × TAE 溶液的电解槽中待用;DNA 扩增产物与 DNA 缓冲液混合后以 8 ~ 10 μL 每孔上样,上样完毕后以 120 V 恒压电泳 25 min。

表 2 反应体系的配置

Table 2 Configuration of reaction system

试剂 Reagents	20 μL 反应体系(μL) 20 μL reaction system(μL)	50 μL 反应体系(μL) 50 μL reaction system(μL)
2 × M-PCR OPTI™ MIX	10.0	25
正向引物(10 μmol/L) Forward primer(10 μmol/L)	0.5	1
反向引物(10 μmol/L) Reverse primer(10 μmol/L)	0.5	1
模板(DNA) Templates(DNA)	1.0	2
DEPC H ₂ O	8.0	21

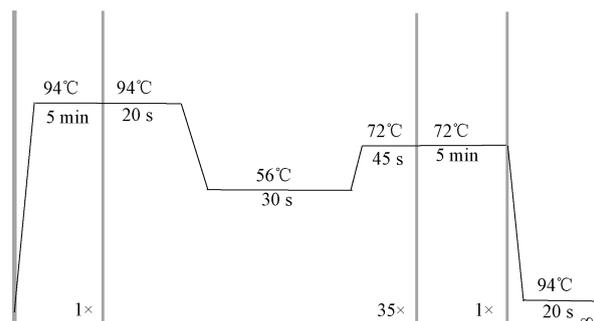


图 5 PCR 扩增程序

Figure 5 PCR amplification procedure

以上各种实验方法的设备、评价指标、应用特点的比较见表 3,各种行为学实验方法的优缺点比较见表 4。

表 3 不同行为学实验方法及指标列表

Table 3 Methods and indexes of different behavior tests

名称 Name	实验设备规格 Experimental equipments	评价指标 Evaluation indexes	应用特点 Applications
Y 迷宫 Y maze	Y 迷宫各臂夹角 120°, 每一臂尺寸 30 cm × 8 cm × 15 cm(长 × 宽 × 高)。Y maze with three arms (30 cm long × 8 cm wide × 15 cm high) at 120° angles.	不同进臂方式次数: 统计小鼠自主交替进臂数(alternation); 自主返回进臂数(return); 自主重复进臂数(repeated)。计算 3 种实验结果反应率: 反应率(%) = (各结果出现次数/总进臂次数-2) × 100%。 The arm entries were recorded and the percentage of alternations (entry into an arm that differs from the previous two entries) was calculated with the following formula: (Arm alternations/Total entries-2) × 100%.	评价环境工作记忆。 Evaluate environmental working memory.
I 型 T 迷宫 T maze I	T 迷宫由两个长 30 cm、宽 10 cm、高 20 cm 的目标臂(goal arms) 和一个与之垂直的长 45 cm、同样宽度与高度的起始臂(approach arm) 组成。 T maze consists of two goal arms (30 cm in length, 10 cm in width and 20 cm in height) and a perpendicular start arm (45 cm in length and with the same width and height with the goal arms).	得分标准: 小鼠进入是否原目标臂。 学习时间: 在关闭一侧闸门时小鼠第 1 次触碰食饵的时间。 记忆时间: 打开闸门后小鼠第 1 次触碰食饵的时间。 Standard of score: Whether the mouse enters the target arm. Learning duration: The first time of the mice touched the food when one of the gates was closed. Memory duration: The first time when the mouse touched the food when two gate were opened.	
II 型 T 迷宫 T maze II		得分: 小鼠是否进入非偏好臂。 错误次数: 小鼠进入偏好臂的次数。 学习时间: 小鼠第 1 次触碰食物所用时间。 惩罚: 若小鼠进入偏好臂, 则关闭闸门惩罚 10 s。 记忆时间: 测试阶段进入起始臂直至触碰食饵的时间。 Standard of scores: Whether the mice enter the nonpreferred arm. Number of errors: The number of entries of the preferred arms. Learning duration: The time duration of the first touch to the food. Punishment: If the mice enter the preferred arm, close the gate for 10 s. Memory duration: The time duration from entering the start arm until the food is touched during the test phase.	评价学习与记忆能力, 以及记忆的存储与提取。 Evaluation of learning and memory ability, as well as the storage and retrieval of memory.
新物体识别实验 New object recognition	新物体识别/旷场实验封闭仓底面为边长 30 cm 的正方形, 侧箱高为 50 cm, 顶部有摄像头用于记录。 Bottom of the new object recognition/open field test experiment is a square with a side length of 30 cm and a side box height of 50 cm. There is a camera on the top for recording.	短期测试: 在 T1 阶段结束 1 h(甚至更短时间)后开始 T2 阶段。 长期测试: 在 T1 阶段结束 24 h 后开始 T2 阶段。 统计小鼠在 T2 阶段在探索新物体耗费的时间比例(探索新物体时间/探索新旧物体总时间)。 Short-term test: The T2 phase begins 1 h (or even less) after the end of T1 phase. The long-term test: The T2 phase began 24 h after the end of T1 phase. The proportion of time spent on exploring new objects (time spent exploring new objects/total time spent exploring new and old objects) was calculated.	评价新物体识别能力与识物记忆。 Evaluate the ability for recognition for new object and the discrimination ability for different object.
旷场实验 Open field test		对比在中央区与周边区的移动距离与速度。 进入旷场中心区的次数。 中心旷场时间与周围区域时间比。 直立次数。 Compare the distance and speed in the center and the border. The number of entries in the center. The ratio of the time in the center to the border. Numbers of rearing.	评价运动能力、探索能力、活跃性以及对旷场的畏惧程度。 Assess locomotion, exploration, activity, and fear of the open field.
转棒疲劳实验 Rotarod test	转棒直径: 30 mm 转棒长度: 60 mm 转速范围: 5 ~ 40 r/min 带微机数据接口 调整度: 1 r/min。 Turn rod diameter: 30 mm Length of the rod: 60 mm Range of speed: 5 ~ 40 r/min with microcomputer data interface Adjust the degree of: 1 r/min。	得分: 小鼠在阶段时间内未掉下转棒视为成功。 掉落时间: 小鼠在转棒上持续运动的时间。 Scores: If the mice did not drop from the rotarod during the test, it was considered successful. Falling time: The duration of sustained time of the mice on the rotary rod.	评价中枢神经协调能力。 Evaluation of coordination ability of the central nervous system.

表 4 不同行为学实验的优缺点比较

Table 4 Comparison of the advantages and disadvantages of different behavior tests

名称 Name	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Y 迷宫 Y maze	<p>(1) 利用啮齿动物对新异环境的天然探索的自然习性,不需要动物学习任何的规则来趋利避害,能够有效的反映小鼠对环境的记忆能力。(2) 人为干预少,简单方便。(3) 实验周期最短。</p> <p>(1) Y maze is designed based on the rodents' native exploratory behavior for new environment, there is no need for animals to learn rules to avoid dangerous environment, which could effectively reflect the memory of rodents to environment. (2) Less manual interventions, easy operation. (3) Short test period.</p>	<p>(1) 虽实验周期短,但单次实验耗费时间长。(2) 小鼠个体差别较大,进入臂次数差异较大。(3) 在 3 个臂交汇处需要仔细观察小鼠尾根,否则容易产生误差。</p> <p>(1) Albeit short test cycle, but long time for single assay. (2) Individual difference is significant, especially the entries of arms. (3) The tail should be carefully observed when the mice enter the intersections of three arms to avoid the errors.</p>
I 型 T 迷宫 T maze I	<p>在测定、训练动物长时记忆方面拥有更高的准确性,包括记忆的存储和提取。 It is more accurate when assess the long term memory of animals, it can be used to test the storage and retrieve of memory.</p> <p>(1) 适应期间撒食饵,诱导小鼠探索,加快了小鼠对迷宫的熟悉速度。(2) 重复 2 次实验,可以更好的检测小鼠的短期学习记忆能力的同时,也更有利于加深小鼠记忆。</p> <p>(1) The food was provided during the adaptation stage, which helps the mice to familiarize the environment. (2) There is two stage for the test period, which can evaluate the short term memory, in the meanwhile help the consolidation of the memory.</p>	<p>小鼠因警惕心理,拒绝在发现食物的第一时间进食,影响实验者对时间指标的评判。 Mice often refuse to eat the food because of the vigilance, which will interrupt the assessment for the memory duration.</p> <p>迷宫只有一个选择点到达目标臂,则选择正确臂的概率默认为 50%,无法排除小鼠误打误撞得分的情况,增加了成功的可能性。 There is only one target zone, so the chance for choosing the right arm is 50%, thus the mice might find the right arms randomly, the chance for success is increased.</p>
II 型 T 迷宫 T maze II	<p>(1) 惩罚条件可以让小鼠更快了解到自己的错误,并进行行为更正,加深记忆。(2) 偏好臂的设置规避了小鼠主观性跑向某臂的结果。</p> <p>(1) Punishment during the test stage helps the mice to quickly realize the mistakes and modify their behavior when the memory was consolidated. (2) The setting for preference arms helps avoiding the native preference of arm entry.</p>	<p>(1) 小鼠可能存在不愿主动探索迷宫的情况。(2) 惩罚机制会使某些小鼠受到惊吓,增加实验误差。 (1) Mice may be unwilling to explore the maze. (2) The punishment mechanism will frighten some mice and increase the error during the experiment.</p>
新物体识别实验 New object recognition	<p>(1) 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。(2) 实验步骤少,实验时间相对较短。</p> <p>(1) It allows animals to learn in a completely natural state, which could better simulate the learning and memory behavior of humans and primates. (2) Fewer experimental steps and relatively shorter experimental duration.</p>	<p>(1) 实验箱体对小鼠影响较大,如方形行为箱的角落易造成小鼠的角落效应,使小鼠主观上拒绝进行新物体识别。(2) 实验器材在各种实验中最为复杂,前期准备工作较多,需要精准的跟踪和记录系统。(3) 相较于其他实验器材较难清理。</p> <p>(1) Experiment-box has modest influence on the mice. For example, the corner of the square box easily causes corner-effect, it may leads to the refusal of mice to recognize the new object subjectively. (2) Experimental equipment is the most complex in all experiments, and it needs a lot of preparation before the experiment conducted accurate tracking and recording system. (3) It is more difficult to clean the chamber compared to other experimental equipment.</p>
旷场实验 Open field experiment	<p>(1) 利用了动物畏惧空旷场地的天性,激发动物趋利避害的内在特点。(2) 单次实验便可得出鼠的自发活动与探索行为数据。(3) 无需任何训练。</p> <p>(1) Test is designed depend on the fear of animals for avoiding being harmed and to seeking being benefited. (2) The spontaneous activity and exploratory behavior can be detected in a single experiment. (3) No training is needed.</p>	<p>(1) 实验耗时较长。(2) 小鼠个体差异较大。(3) 因小鼠活动习性,须在晚上暗条件下进行。</p> <p>(1) Long experiment time. (2) Individual differences. (3) Because of the inherent behavior of mice, the experiment should be carried out in the dark.</p>
转棒疲劳实验 Rota rod system	<p>(1) 适用范围广,可做疲劳测试、中枢神经功能以及运动行为。(2) 实验过程简单,无复杂的程序以及繁杂的准备工作。</p> <p>(1) It is broadly applied in various tests including the fatigue test, the function of central nervous system, and the exercise behavior. (2) Operation of the experiments is simple without complicated procedures and preparations.</p>	

1.3 统计学分析

所有数据均用平均数 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,数据分析采用 SPSS 18.0 软件,数据通过 *t* 检验 (或 mann-whitney 非参数检验),当 $P < 0.05$ 为具有显著性差异,作图采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件。

2 结果

2.1 APP/PS1 小鼠基因鉴定

裂解鼠尾提取 DNA,经 PCR 和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型,核酸凝胶成像结果显示, *GAPDH* 内参条带在 391 bp, *APP* 基因条带在 344 bp, *PS1* 基因条带在 608 bp,结果见图 6~8,可以看到编号为 288、289、290、292、293、294、296、297、298、352、353、363、365、366、368、371、373、374、375、376、378 和 380 小鼠为 *APP/PS1* 双转基因小鼠,其余为野生型小鼠。

2.2 APP/PS1 和 WT 小鼠的工作记忆存在差异且均随月龄增大呈下降趋势

Y 迷宫可以测试小鼠的工作记忆能力。6 月龄 *APP/PS1* 小鼠相比于 WT 小鼠在自主返回率更高,有显著性差异性 ($P < 0.05$, 图 9),说明同月龄 *APP/PS1* 小鼠工作记忆能力较 WT 小鼠差;此外,6 月龄 *APP/PS1* 小鼠的自主交替率较 3 月龄小鼠显著降低 ($P < 0.05$, 图 9),自主返回率频率显著增加 ($P < 0.001$, 图 9),WT 小鼠的自主交替率频率也随月龄增加而减少,自主重复率频率随月龄增加而增加,但无显著性差异,见图 9。以上结果表明,6 月龄 *APP/PS1* 和 WT 小鼠工作记忆能力有差异,且 *APP/PS1* 小鼠随月龄增加工作记忆下降更为明显。

2.3 APP/PS1 和 WT 小鼠的记忆存储和提取能力具有显著性差异

T 迷宫可以同时测试小鼠的学习和记忆能力,

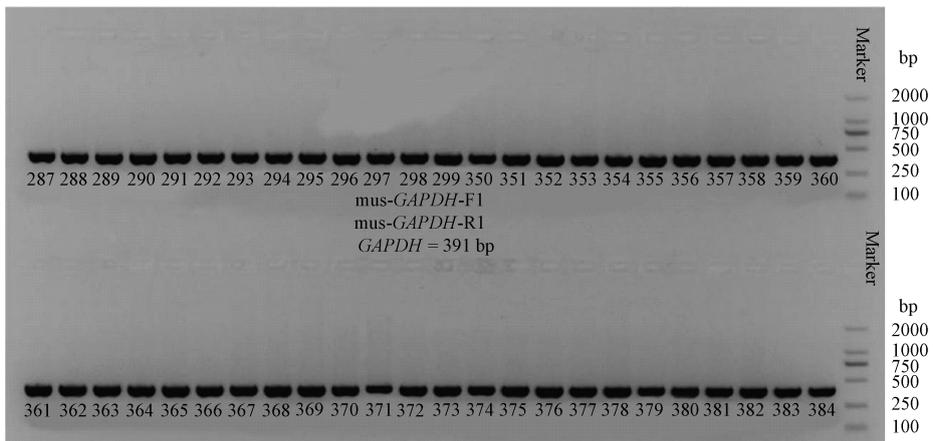


图 6 GAPDH 鉴定结果

Figure 6 GAPDH identification results

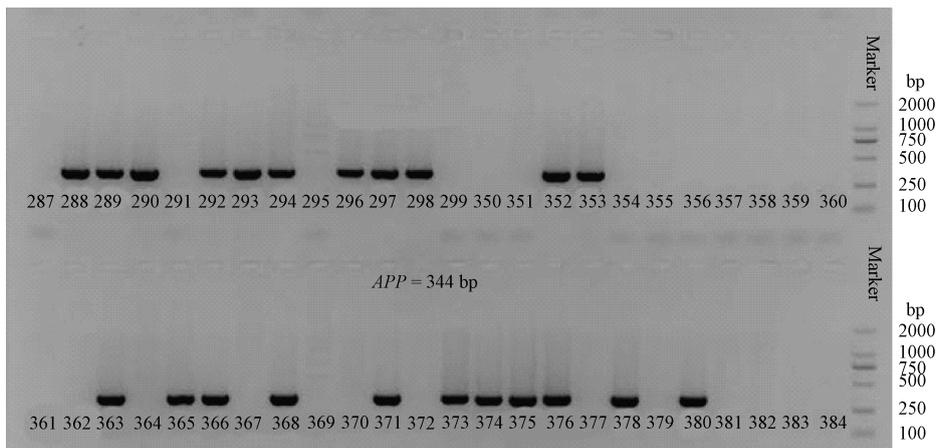


图 7 APP 基因型鉴定结果

Figure 7 APP genotype identification results

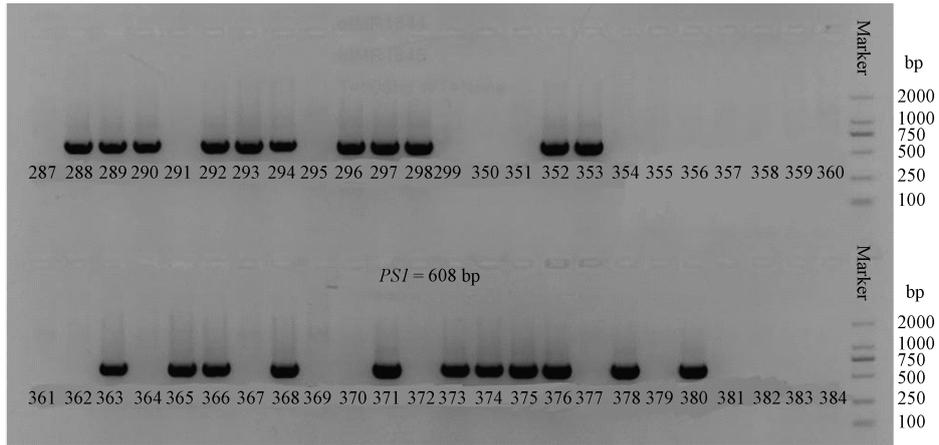
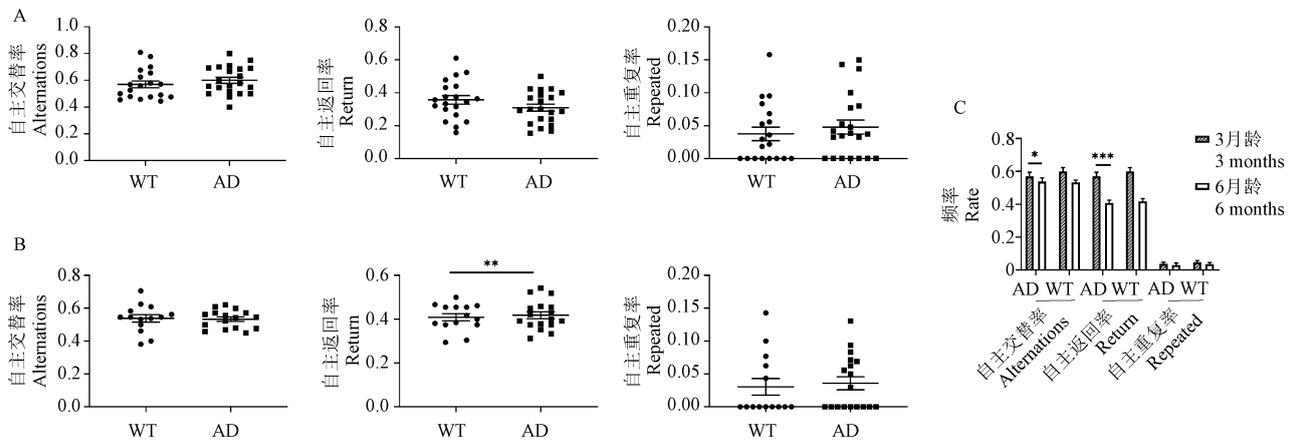


图 8 PS1 基因型鉴定结果

Figure 8 PS1 genotype identification results



注:A:3月龄 *APP/PS1* 小鼠和 WT 小鼠对比;B:6月龄 *APP/PS1* 小鼠和 WT 小鼠对比;C:两种小鼠不同月龄前后比较。与 WT 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 9 3月龄和6月龄 *APP/PS1* 小鼠和 WT 小鼠 Y 迷宫差异比较

Note. A. Comparison between 3 month old *APP/PS1* mice and WT mice. B. Comparison between 6 month old *APP/PS1* mice and WT mice. C. Comparison the difference before and after. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 9 Comparison of the differences in Y maze of *APP/PS1* mice and WT mice at 3 and 6 months of age

能够反映记忆的存储和提取。基于 I 型 T 迷宫实验,发现 6 月龄 *APP/PS1* 小鼠在学习阶段的第 1 天记忆时间显著长于 WT 小鼠 ($P < 0.05$, 图 10A);在测试阶段,第 1 天记忆时间显著长于 WT 小鼠 ($P < 0.05$, 图 10D),说明小鼠在第 1 次学习和记忆环境下更敏感。2 d 的测试阶段,*APP/PS1* 小鼠在得分率方面均显著低于 WT 小鼠 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, 图 10F, 10G)。说明 *APP/PS1* 和 WT 小鼠在学习与记忆时间和准确率之间存在差异,*APP/PS1* 小鼠记忆提取能力显著低于 WT 小鼠。基于 II 型 T 迷宫,*APP/PS1* 和 WT 两种小鼠在记忆时间方面未出现显著性差异,但学习方面,*APP/PS1* 小鼠学习时间长于 WT 小鼠 ($P < 0.001$, 图 10H, 10I);*APP/PS1* 和 WT 小鼠在得分率无明显差别,见图 10。综上,

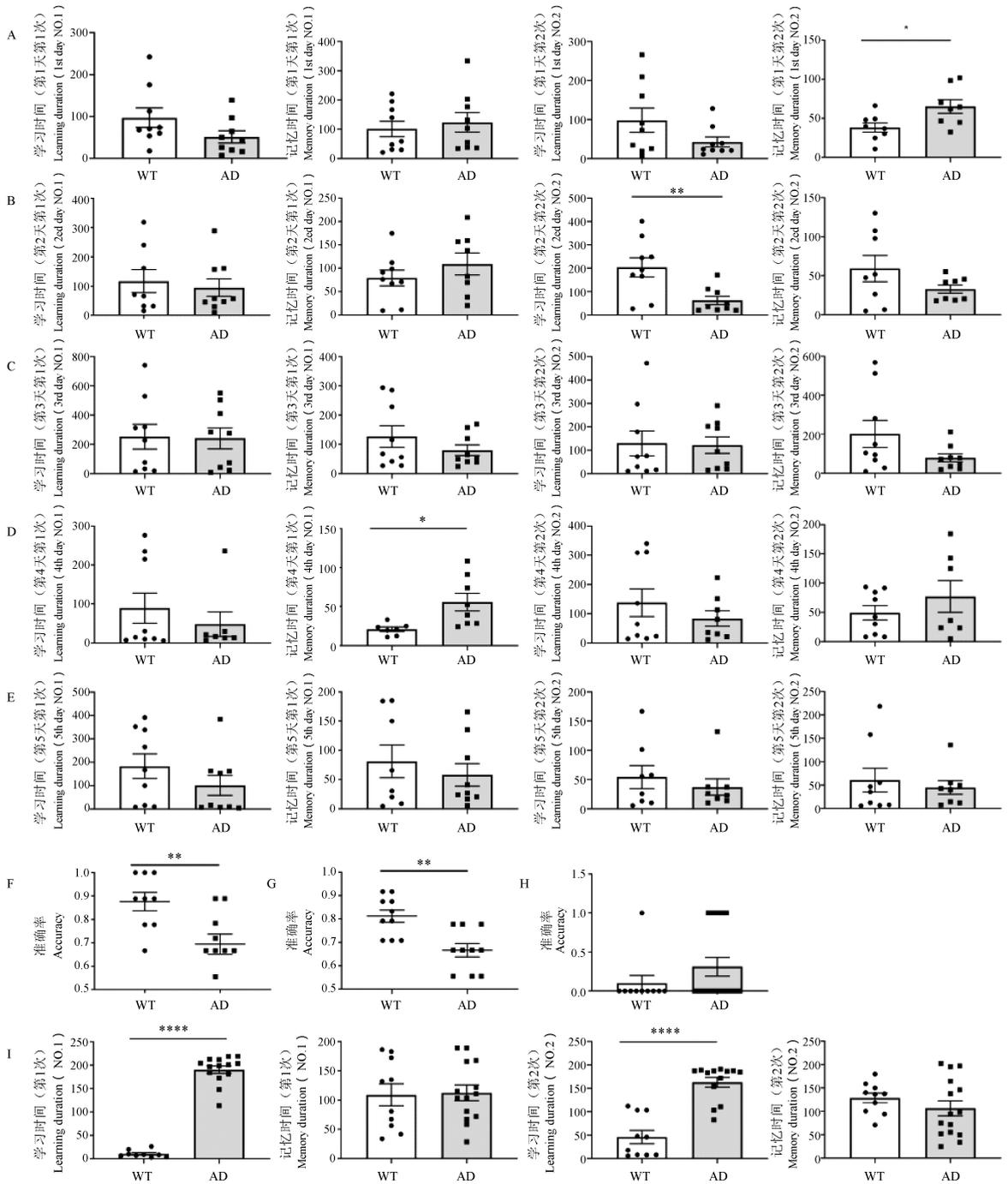
APP/PS1 和 WT 小鼠在记忆的存储和提取方面存在差异,*APP/PS1* 小鼠较 WT 小鼠记忆存储时间显著增加,记忆提取时间增加,记忆准确率降低。

2.4 *APP/PS1* 和 WT 小鼠的新物体识别能力与识物记忆无明显差异

新物体识别实验可以测试小鼠的识物记忆,结果发现,无论是 3 月龄还是 6 月龄小鼠,*APP/PS1* 和 WT 小鼠对新物体识别记忆均无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 11。这与文献报告不同^[38],可能是因为学习阶段时长过短或者学习阶段和测试阶段的时间间隔不同引起的。

2.5 *APP/PS1* 和 WT 小鼠的运动能力、探索能力、活跃性以及旷场的畏惧程度均存在差异

旷场实验着重于研究小鼠在密闭空间内的运

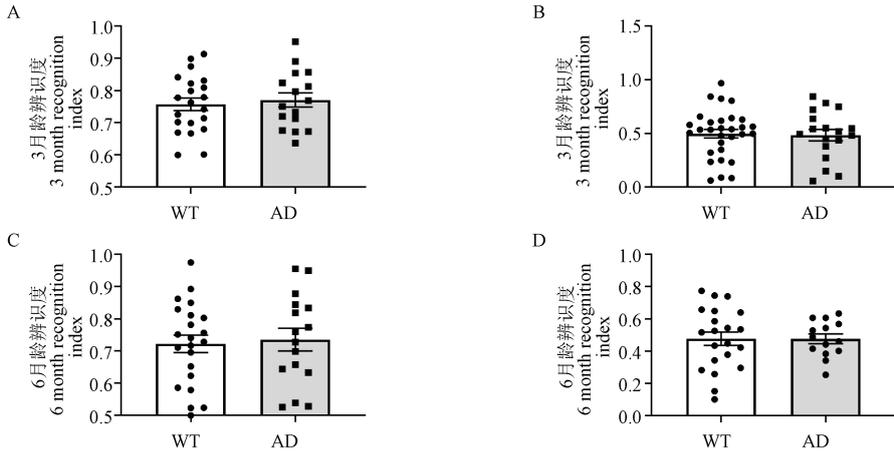


注: A ~ C: 6 月龄 *APP/PS1* 小鼠与 WT 小鼠在 I 型 T 迷宫中第 1 ~ 3 天训练阶段(学习与测试间隔 5 s)两次学习时间、记忆时间; D、E: I 型 T 迷宫中 *APP/PS1* 小鼠与 WT 小鼠测试阶段第 1 天(间隔 20 s)和第 2 天实验(间隔 1 min)两次学习时间、记忆时间; F、G: 6 月龄 *APP/PS1* 小鼠与 WT 小鼠在 I 型 T 迷宫测试阶段第 1 天和第 2 天得分; H: 6 月龄 *APP/PS1* 小鼠与 WT 小鼠在 II 型 T 迷宫平均分; I: 6 月龄 *APP/PS1* 小鼠与 WT 小鼠在 II 型 T 迷宫中测试阶段学习时间、记忆时间; 与 WT 组相比, **** $P < 0.0001$ 。(下图同)

图 10 T 迷宫内学习时间、记忆时间与得分

Note. A ~ C. Learning and memory duration in the first three training days in type I T maze of 6 month old *APP/PS1* mice and WT mice. D, E. Learning and memory duration of the two test days (20 s, 1 min interval) in type I T maze of *APP/PS1* mice and WT mice. F, G, the scores of the two test days in the Type I T maze in 6 month old *APP/PS1* mice and WT mice scored on day 1 and Day 2 test phase. H. Average score in type II T maze of 6 months old *APP/PS1* mice and WT mice. I. Learning time and memory duration in type II T maze in 6 month old *APP/PS1* mice and WT mice. Compared with WT group, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 10 Learning and memory duration and scores in T maze



注:A,C:3月龄和6月龄 *APP/PS1* 小鼠和 WT 小鼠探索两个相同物体的识别参数;B,D:3月龄和6月龄 *APP/PS1* 小鼠和 WT 小鼠探索新物体识别参数。

图 11 3月龄和6月龄 *APP/PS1* 和 WT 新物体识别实验识别参数

Note. A, C. Recognition indexes of two identical objects of 3 and 6 month old *APP/PS1* mice and WT mice. B, D. Recognition indexes of the new object of 3 and 6 month old *APP/PS1* mice and WT mice.

Figure 11 Recognition index in the new object recognition test of *APP/PS1* and WT mice at 3 and 6 month of age

动能力、探索能力、活跃性以及旷场的畏惧程度。实验表明;*APP/PS1* 小鼠的运动能力比同月龄 WT 小鼠弱,表现在规定时间内的运动距离显著低于 WT 小鼠 ($P < 0.01$, 图 12A);因两种小鼠移动速度也存在显著性差异 ($P < 0.01$, 图 12B),所以说明 *APP/PS1* 小鼠活跃性也比同月龄 WT 小鼠的低;与 WT 小鼠比较,*APP/PS1* 小鼠进入中心旷场的次数同显著降低 ($P < 0.01$, 图 12E),且 *APP/PS1* 小鼠

待在旷场中央区时间与周围区域时间比显著低于 WT 小鼠 ($P < 0.01$, 图 12K),可得出结论,*APP/PS1* 小鼠对旷场的畏惧程度高于 WT 小鼠。另外,*APP/PS1* 小鼠的直立次数显著低于 WT 小鼠 ($P < 0.001$, 图 12J),说明 *APP/PS1* 小鼠较 WT 小鼠的探索能力更弱,更容易对旷场产生畏惧和焦虑,见图 12。综上所述,*APP/PS1* 小鼠的运动能力、探索能力、活跃性较 WT 小鼠更差。

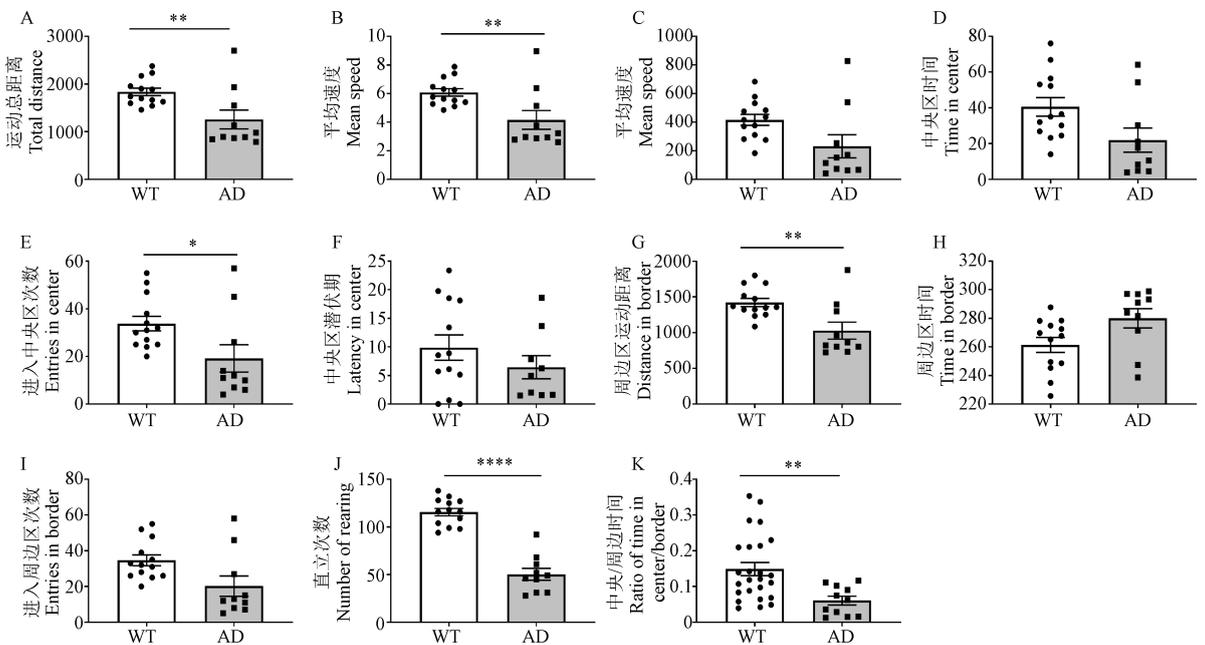


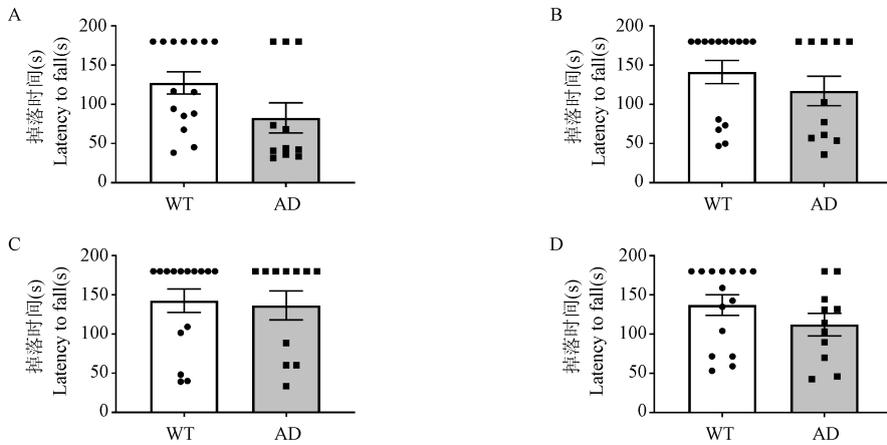
图 12 6月龄 *APP/PS1* 和 WT 小鼠在旷场实验的表现

Figure 12 Performance of 6-month-old *APP/PS1* and WT mice in the open field test

2.6 APP/PS1 和 WT 小鼠中枢协调能力无明显差异

转棒疲劳实验主要检测小鼠的中枢协调能力, 经实验, 并未发现 APP/PS1 和 WT 小鼠在转棒掉落时间方面的差异, 说明中枢协调能力无显著性差异

($P > 0.05$), 见图 13。这可能是因为转棒疲劳仪更适用于检测小鼠的与运动协调性相关的神经系统疾病如亨廷顿舞蹈症和帕金森病, 在学习与记忆方面仅可能作为辅助或参考指标。



注:A:3月龄 APP/PS1 小鼠和 WT 小鼠适应阶段掉落时间对比;B:3月龄 APP/PS1 小鼠和 WT 小鼠测试阶段掉落时间对比;C:6月龄 APP/PS1 小鼠和 WT 小鼠适应阶段掉落时间对比;D:6月龄 APP/PS1 小鼠和 WT 小鼠测试阶段掉落时间对比。

图 13 转棒疲劳实验掉落时间

Note. A. Comparison of the latency to fall in the adaptation stages between 3 month old APP/PS1 mice and WT mice. B. Comparison of the latency to fall in the testing stages between 3 month old APP/PS1 mice and WT mice. C. Comparison of the latency to fall in the adaptation stages between 6 month old APP/PS1 mice and WT mice. D. Comparison of the latency to fall in the testing stages between 6-month-old APP/PS1 mice and WT mice.

Figure 13 Latency to fall of rotarod test

3 讨论

动物行为学实验在药理学中已被视为基础实验方法, 同时也越来越多的被应用在精神生理学及精神病理学的基础研究中, 如在帕金森病症、酒精依赖综合征、亨廷顿病、智力发育、运动失调^[39]和阿尔茨海默病的发病机制研究领域发挥重要作用^[40]。因此, 了解和总结各种行为学实验的特点和适用范围非常关键, 能够帮助研究者选择更科学和精准的方法观察小鼠的行为学。本文作者采用 APP/PS1 双转基因小鼠与野生型小鼠两种动物, 比较验证学习记忆相关行为学实验特点、优缺点、注意事项和应用。采用 Y 迷宫、T 迷宫、新物体识别、旷场实验以及转棒疲劳实验对两种小鼠进行全面的对比分析。5 种行为学实验各有测试侧重, Y 迷宫测试工作记忆^[41], T 迷宫可以测试学习与记忆能力, 特别能够反映记忆的存储和提取, 新物体识别测试小鼠的新物体识别能力与识物记忆, 旷场测试运动能力、探索能力、活跃性以及以及对旷场的畏惧程度, 转棒疲劳测试中枢协调能力。经研究发现, 雌性小鼠因受雌激素影响, 在行为学实验中, 经常表现出异常

的行为, 如潜伏期过长、易焦虑等情况, 通常情况下, 行为学实验选择雄性小鼠会使实验结果更加稳定^[42]。

基于 APP/PS1 双转基因小鼠与 WT 小鼠实验比较发现, 在 Y 迷宫中, 同月龄的 APP/PS1 小鼠与 WT 小鼠的工作记忆能力有明显差异, APP/PS1 小鼠较 WT 小鼠自主交替率显著降低, 以及自主返回率显著增加。对比不同月龄的同类型小鼠发现, 两种小鼠的工作记忆能力均随月龄增加而下降, 且 APP/PS1 小鼠相比于 WT 小鼠下降更明显。说明 APP/PS1 小鼠工作记忆能力显著低于 WT 小鼠。在 T 迷宫中, APP/PS1 小鼠相比于 WT 小鼠的学习记忆能力差, 表现为记忆的存储和提取较慢, 提取的准确率较差, 这与以往报道是一致的^[43]。在新物体识别实验中, 对比两种小鼠的新物体识别能力, 通过对比两种小鼠的短时识物记忆和长时识物记忆两个方面, 并未发现显著性差异, 这与文献报道不一致, 这可能与学习和测试阶段的间隔时长存在密切关系^[44], 测试和训练阶段间隔 24 h, 可能两种小鼠的都遗忘了对旧物体的识别记忆。在旷场实验中, WT 小鼠的运动能力、探索能力和活跃性均

显著高于 *APP/PS1* 小鼠,对旷场的畏惧程度和焦虑程度低于 *APP/PS1* 小鼠,也存在显著差异性。在转棒疲劳实验中,*APP/PS1* 小鼠与 WT 小鼠的中枢协调能力无显著差异性。

现如今,越来越多的动物行为学模型被广泛应用到神经系统疾病和药理学实验中^[45],这些模型都尽可能去贴合小鼠生性习惯,对多种动物的研究和药品应用提供路径。研究对比了 5 种学习记忆相关行为学的特点、优缺点、注意事项和应用,发现 Y 迷宫反映小鼠自发的探索行为,是工作记忆的最佳和最便捷的检测方法^[46];T 迷宫对学习记忆的检测更为敏感和细致,能反映记忆的存储和提取;新物体识别实验可能需要更好的摸索学习和测试阶段的时间间隔,并且需要精确的跟踪和识别系统;旷场实验可以作为学习记忆、运动能力、畏惧焦虑行为的综合指标,可以放在一系列行为学实验设计的最开始阶段,便于观察对动物行为有大致地了解;转棒疲劳实验更适合与运动协调能力相关的神经系统疾病^[47],如帕金森病^[48]、亨廷顿病^[49]等。综上,为有关神经系统疾病行为学实验的选择提供了理论基础、方法借鉴和参考标准。

参 考 文 献(References)

[1] 王萌萌,米佳,王国强,等. 芪枝渴痹通方对糖尿病小鼠行为学及坐骨神经病理学的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5565-5568.
Wang MM, Mi J, Wang GQ, et al. Effects of Qizhike Bitong Formula on behavior and sciatic nerve pathology in diabetic mice [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(9): 5565-5568.

[2] 贾秀英. 动物行为学的形成与发展 [J]. 杭州教育学院学报, 1997, 2(4): 34-35.
Jia XY. The formation and development of animal behavior [J]. J Hangzhou Educ Inst, 1997, 2(4): 34-35.

[3] 劳莹蘅,刘雷,刘民. 试析实验动物学教学与科研的发展方向 [J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2015, 31(11): 17-18.
Lao QH, Liu L, Liu M. On the development direction of teaching and scientific research in laboratory animal science [J]. J Chifeng Univ (Nat Sci Edit), 2015, 31(11): 17-18.

[4] 陈霄,严隽陶,尹露,等. 丰富环境对抑郁大鼠行为学及海马 CA1 区脑源性神经营养因子、酪氨酸激酶受体 B 蛋白表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2022, 37(1): 21-26.
Chen X, Yan JT, Yin L, et al. Effects of enriched environment on behavior and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B in hippocampal CA1 region of depressed rats [J]. Chin J Rehabil Med, 2022, 37(1): 21-26.

[5] 姜宁,张亦文,姚彩虹,等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.
Jiang N, Zhang YW, Yao CH, et al. Overview of animal behavioral tests of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 830-838.

[6] Jack CR Jr. Advances in Alzheimer's disease research over the past two decades [J]. Lancet Neurol, 2022, 21(10): 866-869.

[7] Yan QY, Lv JL, Shen XY, et al. Patchouli alcohol as a selective estrogen receptor β agonist ameliorates AD-like pathology of *APP/PS1* model mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(9): 2226-2241.

[8] Yeh SH, Shie FS, Liu HK, et al. A high-sucrose diet aggravates Alzheimer's disease pathology, attenuates hypothalamic leptin signaling, and impairs food-anticipatory activity in *APP^{swe}/PS1^{dE9}* mice [J]. Neurobiol Aging, 2020, 90: 60-74.

[9] Jiwaji Z, Tiwari SS, Avilés-Reyes RX, et al. Reactive astrocytes acquire neuroprotective as well as deleterious signatures in response to Tau and A β pathology [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 135.

[10] 石辉,原丽,张军,等. *APP^{swe}/PS1^{dE9}* 双转基因阿尔茨海默病模型小鼠的行为学及病理学特征研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 499-506.
Shi H, Yuan L, Zhang J, et al. The behavioral and pathological characteristics in *APP^{swe}/PS1^{dE9}* double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Chin J Neuroanat, 2016, 32(4): 499-506.

[11] Miller RC, Miller EK. Lack of a long-term effect of LSD on Y-maze learning in mice [J]. Nature, 1970, 228(5276): 1107-1108.

[12] 韩引秀,陈征,崔珍,等. 不同月龄对雌性 SD 大鼠学习记忆相关行为及海马 TREM2 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(1): 10-14.
Han YX, Chen Z, Cui Z, et al. Effect of aging on the learning and memory-associated behaviors and the hippocampal protein expression of TREM2 in female SD rats [J]. Acta Univ Med Anhui, 2018, 53(1): 10-14.

[13] Wirths O, Breyhan H, Schäfer S, et al. Deficits in working memory and motor performance in the *APP/PS1ki* mouse model for Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(6): 891-901.

[14] 王跃春,王子栋,孙黎明,等. 动物学习记忆能力的 Y-型迷宫测试法 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2001, 22(5): 137-140.
Wang YC, Wang ZD, Sun LM, et al. The Y-type maze test used in learning and memory of animal (a review) [J]. J Jinan Univ Nat Sci Med Edit, 2001, 22(5): 137-140.

[15] Stover KR, Campbell MA, van Winssen CM, et al. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease [J]. Behav Brain Res, 2015, 289: 29-38.

[16] Salek MM, Carrara F, Fernandez V, et al. Bacterial chemotaxis in a microfluidic T-maze reveals strong phenotypic heterogeneity in chemotactic sensitivity [J]. Nat Commun, 2019, 10

- (1): 1877.
- [17] 杨玉洁, 李玉姣, 李杉杉, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 129-134.
- Yang YJ, Li YJ, Li SS, et al. Comparison of experimental maze tests used to assess the learning and memory abilities in rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(12): 129-134.
- [18] 董慧贤, 谢红林, 白江涛, 等. 阿尔茨海默病转基因动物模型的学习记忆能力改变及病理学观察 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(5): 394-397.
- Dong XH, Xie HL, Bai JT, et al. Observation of learning memory and pathological changes in the *PS1/APP* double transgenic Alzheimer's disease of mouse model [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2015, 32(5): 394-397.
- [19] Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent [J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 7-12.
- [20] Mogensen J, Boyd MH, Nielsen MD, et al. Erythropoietin improves spatial delayed alternation in a T-maze in rats subjected to ablation of the prefrontal cortex [J]. Brain Res Bull, 2008, 77(1): 1-7.
- [21] 程晓红, 易寄东, 刘玲爱, 等. 丙戊茶碱和左旋乙酰肉毒碱对改善老年大鼠水迷宫学习记忆行为的作用 [J]. 中国行为医学科学, 2004, 13(2): 138-139.
- Cheng XH, Yi JD, Liu LA, et al. Two different NGF stimuli improved the behaviors of learning and memory of aged rats in the T water-maze task [J]. Chin J Behav Med Sci, 2004, 13(2): 138-139.
- [22] Belzung C, Chapillon P, Lalonde R. The effects of the lurcher mutation on object localization, T-maze discrimination, and radial arm maze tasks [J]. Behav Genet, 2001, 31(2): 151-155.
- [23] 郑君芳, 陈慧敏, 宋然, 等. 蛋白质组学方法分析多 T 迷宫训练后的小鼠空间记忆蛋白 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(11): 1054-1060.
- Zheng JF, Chen HM, Song R, et al. Spatial memory proteins were analyzed by MTM training and proteomics in mice [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2013, 29(11): 1054-1060.
- [24] Laimiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests [J]. Behav Brain Res, 2014, 266: 94-103.
- [25] 杜艳芳, 杨洋, 王玥, 等. 新物体识别实验应用研究 [J]. 科学技术创新, 2018, 7(3): 46-47.
- Du YF, Yang Y, Wang Y, et al. Research on experimental application of new object recognition [J]. Sci Technol Innov, 2018, 7(3): 46-47.
- [26] Araujo APC, de Lucena JD, Driessens DC, et al. Rats recognize spatial and temporal attributes in a new object recognition memory task with multiple trials [J]. J Neurosci Methods, 2021, 348: 108936.
- [27] 杜艳芳, 杨洋, 毕田田, 等. 行为箱形状对小鼠新物体识别实验结果的影响 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(1): 22-25.
- Du YF, Yang Y, Bi TT, et al. Influence of the shape of the testing environment on novel object recognition test in mice [J]. Lab Anim Sci, 2019, 36(1): 22-25.
- [28] 柳云龙, 杜淑文, 吕丽, 等. 海马 Rac1 蛋白的激活调节新物体识别记忆的遗忘过程 [J]. 科学新闻, 2017, 4: 124.
- Liu YL, Du SW, Lv L, et al. Activation of the hippocampal Rac 1 protein modulates the forgetting process of novel object recognition memory [J]. Sci News, 2017, 4: 124.
- [29] 曹岚, 董原, 战义强, 等. 气味对小鼠学习记忆及脑内乙酰胆碱酯酶活性的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(15): 1465-1467.
- Cao L, Dong Y, Zhan YQ, et al. Effects of odor on learning and memory and acetylcholinesterase activity in brain of mice [J]. Chin J Gerontol, 2008, 28(15): 1465-1467.
- [30] Shin J, Gireesh G, Kim SW, et al. Phospholipase C β 4 in the medial septum controls cholinergic *Theta* oscillations and anxiety behaviors [J]. J Neurosci, 2009, 29(49): 15375-15385.
- [31] 王维刚, 刘震泽, 吴文婷, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(七)旷场实验在小鼠行为分析中的应用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(11): 1191-1196.
- Wang WG, Liu ZZ, Wu WT, et al. The use of open field test in the behavior analysis of mice [J]. Chin J Cell Biol, 2011, 33(11): 1191-1196.
- [32] 刘雨萌, 金元宝, 孟凡欣, 等. 枸杞子多糖通过改善氧化应激延缓疲劳作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 344-348.
- Liu YM, Jin YB, Meng FX, et al. Anti-fatigue activity of *Lycium barbarum* polysaccharides in mice by attenuating oxidative stress [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(18): 344-348.
- [33] 韦健, 谢纯珠, 袁青. 针刺结合疲劳转棒训练改善 pMCAO 大鼠运动和认知功能 [J]. 中国针灸, 2019, 39(7): 748-754.
- Wei J, Xie CZ, Yuan Q. Improvements of motor and cognitive functions in the rats with permanent middle cerebral artery occlusion treated with acupuncture and rota-rod training [J]. Chin Acupunct Moxibust, 2019, 39(7): 748-754.
- [34] 陈世坚, 李舸, 张钰, 等. MPTP 诱导帕金森病小鼠亚急性与慢性模型的比较及评价 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8): 1247-1252.
- Chen SJ, Li G, Zhang Y, et al. Comparison and evaluation of MPTP-induced subacute and chronic models of Parkinson's disease in mice [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(8): 1247-1252.
- [35] 薛卫星, 刘卫平. 咖啡酸苯乙酯通过下调 LRRK2 抑制 JNK 信号通路减轻大鼠创伤性脑损伤 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(3): 473-480.
- Xue WX, Liu WP. Caffeic acid phenethyl ester reduces traumatic brain injury in rats by down-regulating LRRK2 and inhibiting JNK signaling pathway [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(3): 473-480.
- [36] 张馨芸, 林慧娇, 李欣, 等. 五味子酯甲通过调节肝脏 Nr1f2/ARE 抗氧化通路改善小鼠疲劳的作用 [J]. 食品科学, 2020, 41(1): 190-195.

- Zhang XY, Lin HJ, Li X, et al. Schisantherin a improves fatigue in mice by regulating the Nrf2/ARE antioxidant pathway in liver [J]. Food Sci, 2020, 41(1): 190-195.
- [37] 吴名草, 王晶, 沈旭丹, 等. 人参葛根植物饮料对小鼠体力疲劳的缓解作用研究 [J]. 粮油食品科技, 2022, 30(5): 212-218.
- Wu MC, Wang J, Shen XD, et al. Research on relieving effect of botanical beverage with ginseng extract and *Pueraria* extract on physical fatigue in mice [J]. Sci Technol Cereals Oils Foods, 2022, 30(5): 212-218.
- [38] Dudchenko PA, Talpos J, Young J, et al. Animal models of working memory: a review of tasks that might be used in screening drug treatments for the memory impairments found in schizophrenia [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2013, 37(9): 2111-2124.
- [39] May F, Stracke J, Heitmann S, et al. Structuring broiler barns: how a perforated flooring system affects animal behavior [J]. Animals, 2022, 12(6): 735.
- [40] Kambe Y. Recent behavioral findings of pathophysiological involvement of lactate in the central nervous system [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2022, 1866(7): 130137.
- [41] Gong DY, Choi YS. Development of new analytical method evaluating working memory on Y maze [J]. J Life Sci, 2016, 26(2): 234-240.
- [42] 徐晓虹, 张洁净, 姜科声. 葛根素对雌激素剥夺小鼠学习记忆行为的影响 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(9): 667-671.
- Xu XH, Zhang JJ, Jiang KS. Effects of puerarin on learning-memory behaviour in estrogen-deprived female mice [J]. Chin Pharm J, 2005, 40(9): 667-671.
- [43] Christina A, Timothy EAM, et al. The journal of the experimental analysis of behavior announces a special issue on the topic of: strengthening the research-practice loop in applied animal behavior [J]. J Exp Anal Behav, 2021, 116(3): 397.
- [44] 李盛建, 黄竹燕, 叶夷露, 等. 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.
- Li SJ, Huang ZY, Ye YL, et al. Influence of object material and inter-trial interval on novel object recognition test in mice [J]. J Zhejiang Univ Med Sci, 2014, 43(3): 346-352.
- [45] Dougherty JP, Springer DA, Cullen MJ, et al. Evaluation of the effects of chemotherapy-induced fatigue and pharmacological interventions in multiple mouse behavioral assays [J]. Behav Brain Res, 2019, 360: 255-261.
- [46] Sohroforouzani AM, Shakerian S, Ghanbarzadeh M, et al. Effect of forced treadmill exercise on stimulation of BDNF expression, depression symptoms, tactile memory and working memory in LPS-treated rats [J]. Behav Brain Res, 2022, 418: 113645.
- [47] Altarifi A, Alsalem M, Mustafa A. Effects of intraplantar administration of Complete Freund's Adjuvant (CFA) on rotarod performance in mice [J]. Scand J Pain, 2019, 19(4): 805-811.
- [48] Bagewadi HG, Rajeshwari, Patil Banderao V, et al. Rotarod test and Catalepsy bar test: behavioral testing and neuromodulation of *Aloe vera* in MPTP induced Parkinson's disease animal model [J]. Int J Basic Clin Pharmacol, 2018, 7(3): 494.
- [49] 刘畅, 吕晓菁, 郑秀玉, 等. 亨廷顿舞蹈症发病机制的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(4): 619-622.
- Liu C, Lu XJ, Zheng XY, et al. The review of pathological mechanisms in Huntington's disease [J]. Lett Biotechnol, 2008, 19(4): 619-622.

[收稿日期] 2022-10-09