



先天性白内障 Rncat 小鼠行为学检测与分析

张燕¹, 王莹¹, 马媚², 燕顺生¹, 陈欣如^{1*}

(1. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆医科大学第一附属医院人类疾病动物模型
研究实验室, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 对先天性白内障 Rncat 小鼠行为学变化进行检测与分析。方法 以正常的 BALB/c 小鼠和 KM 小鼠为对照组, 以近亲交配和随机交配的先天性白内障 Rncat 小鼠为实验组, 分别进行小鼠的行为学检测(旷场实验、衣架实验、强迫游泳实验、悬尾实验)。结果 与近亲交配的 Rncat 先天性白内障小鼠相比, BALB/c 小鼠、随机交配的先天性白内障 Rncat 小鼠、KM 小鼠的旷场实验停留时间、强迫游泳和悬尾实验的不动时间差异有显著性。结论 先天性白内障 Rncat 小鼠与其他小鼠相比行为学检测结果有一定差异, 可为实验人员提供参考。

【关键词】 先天性白内障 Rncat 小鼠; 旷场实验; 衣架实验; 强迫游泳实验; 悬尾实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0028-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 03. 005

Measurement and analysis of the behavioral changes of Rncat congenital cataract mice

ZHANG Yan¹, WANG Ying¹, MA Mei², YAN Shunsheng¹, CHEN Xinru^{1*}

(1. Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830002, China.
2. Xinjiang Key Laboratory for Human Disease Animal Model Research, the First Affiliated Hospital of Xinjiang
Medical University, Urumqi 830054)

【Abstract】 **Objective** To measure and analyze the behavioral changes of Rncat congenital cataract mice. **Methods** Normal BALB/c mice and KM mice were used as control group, and inbred and random mated Rncat congenital cataract mice were used as experimental group. Behavioral tests, including the open field test, coat-hanger test, forced swimming test, and tail suspension test, were conducted on the mice. **Results** Compared with the inbred Rncat congenital cataract mice, the residence time in the open field test, the immobility time in the forced swimming test and tail suspension test of the BALB/c mice, randomly-mated Rncat congenital cataract mice and KM mice were significantly different. **Conclusions** There are certain differences in behavioral performance between the Rncat congenital cataract mice and the other mice. Our findings may provide a useful reference for future researchers.

【Key words】 Rncat congenital cataract mice; open field test; coat-hanger test; forced swimming test; tail suspension test

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(编号:2016D01A066)。

【作者简介】 张燕(1983—), 女, 高级实验师, 研究方向: 实验动物模型与比较医学。E-mail: 493396477@qq.com

【通信作者】 陈欣如(1962—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物模型与比较医学。E-mail: xj3408@163.com

动物行为学是科研工作者评价实验动物状态的重要指标,通过观察检测记录动物自主活动(旷场实验)、协调运动(足迹分析、衣架实验、网屏实验、滚轴实验等)、学习和记忆力(高架十字迷宫实验)等方面的行为学实验,评价实验动物运动功能、神经功能^[1]和肌肉发育等整体状态^[2]。新疆实验动物研究中心挑选发生 *CRYGS* 基因突变的 KM 小鼠,经过十余年的选种育种,采取全同胞兄妹交配方式,建立了先天性白内障小鼠模型,并联合中科院上海生物工程研究中心进行品系的鉴定及实验动物检测,正式将其命名为 Rncat 小鼠^[3]。本文以 Rncat 小鼠的近交后代和随机交配后代为研究对象,观察记录其在自主活动度、协调运动、体能检测和激惹度检测等方面的各项指标,为其在毒理学、药理学、神经学等学科的应用提供基础实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1.1.1 实验动物分组

所有实验动物均由新疆实验动物研究中心提供[SCXK(新)2016-0001],实验在新疆实验动物研究中心 SPF 级实验室内进行[SYXK(新)2015-0001]。实验组一的先天性白内障 Rncat 小鼠全部是 Rncat 小鼠全同胞兄妹近亲交配后生产的小鼠,雌雄各半共 40 只,1.5 月龄,体重为 17~21 g。实验组二的 Rncat 小鼠是来源于近亲交配 Rncat 小鼠的血缘扩大群,经过 5 代随机交配后生产的小鼠,雌雄各半共 40 只,1.5 月龄,体重为 17~22 g。实验组三为 BALB/c 小鼠,雌雄各半共 40 只,1.5 月龄,体重为 16~20 g。实验组四为 KM 小鼠,雌雄各半共 40 只,1.5 月龄,体重为 18~22 g。

1.1.2 动物实验的环境及操作控制

实验室温度保持在 20℃~24℃,相对湿度 30%~50%,实验定时开始于每天 10~13 时。实验前一周,每天捉放抚摸实验小鼠,让其适应实验人员的移动及触碰方式。实验开始前,将各待测小鼠分笼饲养一夜,确保小鼠正常饮食体能充沛。操作人员确定不变,实验时身穿白色隔离服,戴一次性口罩和手套。各项实验每只小鼠测定前,实验人员手套及各项实验用具均用 45% 浓度酒精擦拭,待气味完全挥发后,再进行下一只小鼠的实验。这些环境、人员及操作的控制是为了最大程度减少因人员变动、操作手法、动物气味残留等因素引起动物实验

数据的改变,实验期间遵守 3R 原则,给予实验动物人道关怀处理。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠自主活动度检测:旷场实验^[4]

实验室自制长宽高分别为 50 cm × 50 cm × 40 cm 的旷场实验箱,将实验箱内部涂成黑色,将箱底正方形平均分为 16 小格,沿箱壁的 12 方格记为外周格,中心 4 小格为中央格。箱体正上方连接视频记录系统。实验动物初始被放在中央格,记录实验 5 min 之内实验动物对各区域的探索表现。

1.2.2 小鼠协调运动度检测:衣架实验^[5]

首先自制衣架状器械,水平为长 40 cm、直径 3 mm 的细园杆,悬挂至距离实验台高约 40 cm 的半空。实验动物初始时帮助小鼠以前爪抓住水平杆中部,同时开始计时观察 30 s。计分标准参照^[6]:小鼠 10 s 内从水平杆上掉落记为零分,小鼠前爪能抓住水平杆记为 1 分,小鼠尝试攀爬水平杆记为 2 分,小鼠的 3 只爪子能抓住水平杆记为 3 分,小鼠 4 只爪子抓住水平杆并且尾巴缠绕在水平杆上记为 4 分,小鼠在水平杆上行走并尝试在水平杆末端停留记为 5 分。记录小鼠从水平杆上掉落的时间或在水平杆末端的停留时间。

1.2.3 小鼠体能检测:强迫游泳实验^[7]

用有机玻璃自制长宽高为 30 cm × 30 cm × 20 cm 的小鼠游泳盒,水深约 10 cm,水温保持在 21℃~23℃,强迫每只小鼠游泳 6 min 后观察记录小鼠接下来 4 min 内小鼠累计不动时间。

1.2.4 小鼠激惹度检测:悬尾实验^[8]

将小鼠尾部(距尾尖约 1.5 cm)用医用胶布固定在水平木板上,小鼠头部距离实验台约 10 cm 左右,小鼠保持倒悬状态 2 min 后,连续观察 4 min 内实验小鼠倒悬活动状态,记录小鼠身体下垂、完全不动的总时间。

1.3 统计学方法

所有数据采用 IBM SPSS Statistics 19.0 统计分析,所有测定值均以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 旷场实验结果

各组小鼠在旷场实验的表现中,组一小鼠在中央格、外周格的停留时间为(8135.44 ± 3264.15) s、(287998.10 ± 3045.52) s,与组二小鼠停留时间

(8023.18 ± 3427.26) s、(287864.32 ± 2999.61) s 相比差异无显著性,与组三小鼠停留时间(6182.69 ± 3105.33) s、(289356.75 ± 3112.85) s,组四小鼠停留时间(7471.56 ± 2990.97) s、(289047.65 ± 3013.74) s 相比差异有显著性($P < 0.01$)。在实验中,组一小鼠移动格子(188.04 ± 17.46)次、站立(40.02 ± 3.85)次,与组二小鼠(183.12 ± 19.10)次、(39.13 ± 3.72)次相比差异无显著性,与组三小鼠(125.75 ± 14.28)次、(31.64 ± 6.37)次,组四小鼠(138.74 ± 12.31)次、(32.23 ± 6.69)次相比各项数值差异有显著性($P < 0.01$)。各组小鼠实验结果详见表 1。

2.2 衣架实验结果

在衣架实验中,组一小鼠实验得分为(4.6 ± 0.34),与组三小鼠得分(4.5 ± 0.92)相比差异有显著性($P < 0.05$);组一小鼠在水平杆末端停留时间为(16.5 ± 4.5) s,与组三(16.0 ± 6.22) s 相比差异有显著性($P < 0.05$);组一小鼠从水平杆上掉落的时间(18.3 ± 3.01) s,组三小鼠(17.4 ± 3.13) s,两组数据相比差异有显著性($P < 0.05$)。组一小鼠各项结果与组二、组四小鼠相比差异无显著性。详见表 2。

表 1 各组小鼠旷场实验结果统计表($\bar{x} \pm s, n = 40$)

Tab.1 Results of open field test in the mice

| 组别 Groups | 中央格停留时间(ms) Residence time in the central grid | 外周格停留时间(ms) Residence time in the periphery grid | 移动格子数 Times of grid ambulation | 站立次数 Stand-up times |
|---------------|---|---|-----------------------------------|------------------------|
| 组一 Group 1 | 8135.44 ± 3264.15 | 287998.10 ± 3045.52 | 188.04 ± 17.46 | 40.02 ± 3.85 |
| 组二 Group 2 | 8023.18 ± 3427.26 | 287864.32 ± 2999.61 | 183.12 ± 19.10 | 39.13 ± 3.72 |
| 组三 Group 3 | 6182.69 ± 3105.33 ** | 289356.75 ± 3112.85 ** | 125.75 ± 14.28 ** | 31.64 ± 6.37 ** |
| 组四 Group 4 | 7471.56 ± 2990.97 ** | 289047.65 ± 3013.74 ** | 138.74 ± 12.31 ** | 32.23 ± 6.69 ** |

注:与组一相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the group 1, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 各组小鼠衣架实验结果统计表($\bar{x} \pm s, n = 40$)

Tab.2 Results of coat-hanger test in the mice

| 组别 Groups | 实验得分 Scores | 在水平杆末端停留时间(s) Residence time at the end of the horizontal bar | 从水平杆上掉落的时间(s) Latency time of falling from the horizontal bar |
|---------------|----------------|--|--|
| 组一 Group 1 | 4.6 ± 0.34 | 16.5 ± 4.58 | 18.3 ± 3.01 |
| 组二 Group 2 | 4.7 ± 0.57 | 16.8 ± 5.03 | 19.8 ± 2.76 |
| 组三 Group 3 | 4.5 ± 0.92 * | 16.0 ± 6.22 * | 17.4 ± 3.13 * |
| 组四 Group 4 | 4.8 ± 0.38 | 16.9 ± 5.64 | 19.8 ± 2.89 |

注:与组一相比,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the group 1, * $P < 0.05$.

2.3 强迫游泳实验结果

强迫游泳实验中,组一小鼠的累计不动时间最短,为(137.38 ± 10.66) s,组二小鼠与其相比时间稍长(140.43 ± 11.24) s 但差异无显著性,组三、组四小鼠的累计不动时间明显长于组一,分别是(171.63 ± 16.75) s 和(182.62 ± 12.53) s,与组一相比差异有显著性($P < 0.01$)。详见表 3。

2.4 悬尾实验结果

各组实验小鼠悬尾实验结果见表 4。组一小鼠在悬尾实验中,累计不动时间是(104.83 ± 11.22) s,与组二小鼠的累计不动时间(115.29 ± 9.76) s 相比差异无显著性,与组三、组四小鼠累计不动时间相比差异有显著性($P < 0.01$)。详见表 4。

3 讨论

先天性白内障 Rncat 小鼠,是以 KM 小鼠的基因突变小鼠为亲本,经过新疆实验动物研究中心十年以上的近交选育,建立的先天性白内障模型小鼠。作者在十余年的饲养过程中发现,无论是以近交繁殖或者是随机交配繁殖的方式,该种群小鼠均能很好地保持其先天性白内障特质。

表 3 各组小鼠强迫游泳实验结果统计表($\bar{x} \pm s, n = 40$)

Tab. 3 Results of forced swimming test in the mice

| 组别 Groups | 累计不动时间(s) Immobility time |
|---------------|------------------------------|
| 组一 Group 1 | 137.38 ± 10.66 |
| 组二 Group 2 | 140.43 ± 11.24 |
| 组三 Group 3 | 171.63 ± 16.75** |
| 组四 Group 4 | 182.62 ± 12.53** |

注:与组一相比,** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the group 1, ** $P < 0.01$.表 4 各组小鼠悬尾实验结果统计表($\bar{x} \pm s, n = 40$)

Tab. 4 Results of tail suspension test in the mice

| 组别 Groups | 累计不动时间(s) Immobility time |
|---------------|------------------------------|
| 组一 Group 1 | 104.83 ± 11.22 |
| 组二 Group 2 | 115.29 ± 9.76 |
| 组三 Group 3 | 155.42 ± 12.58** |
| 组四 Group 4 | 160.63 ± 12.69** |

注:与组一相比,** $P < 0.01$ 。Note. Compared with the group 1, ** $P < 0.01$.

本实验通过对先天性白内障 Rncat 小鼠进行行为学检测,对比同月龄的 Rncat 小鼠与正常的近交系 BALB/c 小鼠及 KM 小鼠在自主活动度、协调运动、体能和激惹度等方面的行为数据,检测到 Rncat 小鼠在行为学上与其他近交系或封闭群小鼠的不同,这些数据的差异,可能与实验小鼠月龄相同但体重差异有关,也可能与白内障小鼠病理改变导致的行为学改变有关。

旷场实验用于评价实验动物在新环境的自主活动度与紧张度,以小鼠的水平活动次数评价小鼠活动的强弱。此次旷场实验中,在相同的环境条件下,Rncat 小鼠在中央格停留的时间和穿越格子的次数明显高于其他小鼠,客观地反映 Rncat 小鼠的自主活动量高于其他小鼠,可能因为该小鼠先天性白内障病理学改变,引起的焦虑相关行为学变化。此次实验中所有小鼠在四周格的时间明显高于其在中央格的时间,这可能与小鼠对空旷环境的恐惧感及沿壁活动的天性有关。

衣架实验主要评价小鼠脑对肢体的肌力和协

调的控制功能^[9],强迫游泳实验直接用于测试小鼠体能,同时也反映小鼠在强迫游泳实验时,产生“行为绝望”的表现^[10]。此次实验中 Rncat 小鼠与 KM 小鼠在衣架实验及强迫游泳实验中结果相近,但与 BALB/c 小鼠差异有显著性,可能是由于 Rncat 小鼠来源于 KM 小鼠,相同月龄小鼠脑对肢体的控制和体能等表现相似,而由于 BALB/c 小鼠的近交繁殖特性导致其体形较小、体能较弱,所以其与 Rncat 小鼠及 KM 小鼠在衣架实验中结果相比差异有显著性。

悬尾实验则反映实验动物激惹程度,该项实验评价指标为累计不动时间,实验结果显示 Rncat 小鼠与 BALB/c 小鼠或 KM 小鼠相比,累计不动时间短,为 Rncat 小鼠可能成为小鼠绝望模型的实验动物提供科学数据基础。

参考文献:

- [1] 曾莉,张旻,卜碧涛. 实验啮齿类动物行为学评估 [J]. 神经损伤与功能重建, 2008, 3(5): 352-356.
- [2] 董婷,尼佳乐,魏科,等. 苯并[α]芘对新生幼鼠的海马组织 ATP 酶及钙离子的影响 [J]. 中南大学学报(医学版), 2015, 40(4): 356-361.
- [3] 金怡萍,燕顺生,金玫瑰,等. Rncat 先天性白内障小鼠的晶状体形态学研究 [J]. 眼科新进展, 2004, 24(5): 361-363.
- [4] 尉晓娜,谢于鹏,夏誉,等. 低氧对小鼠旷场行为的影响 [J]. 温州医学院学报, 2012, 42(1): 17-19.
- [5] Lorivel T, Hilber P. Motor effects of delta 9 THC in cerebellar Lurcher mutant mice [J]. Behav Brain Res, 2007, 181(2): 248-253.
- [6] 杨静,程九华,吕强,等. 短期低压与常压缺氧预处理对小鼠急性高空缺氧所致协调运动能力下降防护作用的比较 [J]. 空军医学杂志, 2017, 33(1): 1-5.
- [7] 乔向阳,王晓英,刘宏云. 不同研究条件对 BALB/C 小鼠强迫游泳实验的影响 [J]. 海南医学, 2012, 23(2): 24-26.
- [8] 李影,孙佳明,张静,等. 珍珠母不同炮制品对小鼠抗抑郁作用研究 [J]. 吉林中医药, 2014, 34(4): 388-389, 392.
- [9] B úrez-López S, Bosch-García D, Gómez-Andrés D, et al. Abnormal motor phenotype at adult stages in mice lacking type 2 deiodinase [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e103857.
- [10] 马行,库宝善,姚海燕,等. 对抑郁模型小鼠强迫游泳实验方法的探讨 [J]. 徐州医学院学报, 2005, 25(3): 230-233.

[收稿日期]2017-08-24