

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 74—2019

实验动物 小鼠和大鼠学习记忆 行为实验规范

Laboratory animals - Guideline for learning and memory behavior test

2019-07-10 发布

2019-08-01 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009、GB/T 20001.4—2015 给出的规则编写。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物产业技术创新战略联盟、中国实验动物学会动物模型鉴定与评价工作委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心、中国医学科学院医学实验动物研究所、湖南省实验动物中心、西南医科大学、湖南中医药大学、北京中医药大学、北京大学药学院、北大未名生物工程集团有限公司。

本标准主要起草人：刘新民、陈善广、秦川、王琼、孙秀萍、梁建辉、卢聪、董黎明、王克柱、吕静薇、姜宁、廖端芳、姜德建、成绍武、曾贵荣、石哲、杨玉洁、徐攀、常琪。

实验动物 小鼠和大鼠学习记忆行为实验规范

1 范围

本标准规定了学习记忆行为评价中常用的检测设备、实验方法和评价指标。

本标准适用于以小鼠、大鼠为实验动物,开展学习记忆、学习记忆障碍性疾病及防护措施的行为实验研究。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

动物行为实验 animal behavioral test

以实验动物为对象,在自然界或实验室内,以观察和实验方式对动物的行为信息进行采集、分析和处理,开展动物行为信息的生理和病理意义及产生机制的科学研究。

2.2

学习记忆 learning and memory

学习是神经系统接受外界环境变化获得新行为和经验的过程,分为非联合型学习(non-associative learning)和联合型学习(associative learning)两种。记忆是指对学习获得的经验或行为的保持,包括获得、巩固、再现及再巩固四个环节,分为程序性记忆(procedural memory)和陈述性记忆(declarative memory)。学习和记忆二者是互相联系的神经活动过程,学习过程中必然包含记忆,而记忆总是需要以学习为先决条件。

2.3

学习记忆行为实验 learning and memory behavioral test

以整体动物为对象,采集和分析动物行为信息,开展学习记忆的发生发展过程的科学研究。基本实验检测原理包括奖励性、惩罚性和自发活动三类。主要实验方法有操作性条件反射、跳台、避暗、穿梭、水迷宫、T迷宫、放射状迷宫、物体认知等。

3 学习记忆行为实验方法

3.1 操作条件反射

3.1.1 实验原理

操作条件反射一般以能引起奖赏效应的物质(食物、糖水等中性强化物质)作为非条件刺激信号,灯光或声音作为条件刺激信号。动物在自由探索中偶然发现了奖赏物质,在训练过程中建立了条件刺激信号与奖赏物质之间的联系;同样,动物通过对操作装置的偶然触碰,发现了操作能获得奖赏物质;最后,动物能够根据条件刺激信号的规律进行操作,以获得奖赏强化,形成条件刺激信号-操作行为反应-结果之间的操作条件反射。操作条件反射能很好地反映动物执行复杂操作任务时的判断、决策和学习记忆能力。

3.1.2 实验材料

小鼠或大鼠。

操作条件反射实验基本装置包括测试箱、非条件刺激信号和条件刺激信号发生部件、操作部件、控制单元。现在多采用计算机、摄像或传感装置,以及软件系统组成的自动化和智能化装置。

3.1.3 实验方法

3.1.3.1 操作条件反射

a) 限制饮食饮水。采用固体物质作为奖赏物质时,应控制动物摄取的食物量;采用液体物质(如糖水)作为奖赏物质时,应同时控制动物摄取的食物量和饮水量。体重控制在正常动物体重的 80%~85%为宜。

b) 限食(水)动物,放入测试箱内适应 3min~5min。

c) 奖励性条件反射测试:先给予条件性刺激(灯光或声音),时间应为 10s,然后给予 1 次奖赏;随即进入间隔期(无条件刺激和奖赏物质) 30s。每天重复 30 个~50 个周期。

d) 操作条件反射:动物获得奖励性条件反射后,进行单次操作条件反射训练。此时动物每操作踏板 1 次,给予条件性刺激(灯光或声音),时间应为 10s,然后给予 1 次奖赏。每天重复 30 个~50 个周期。

3.1.3.2 位置信号识别条件反射

a) 应在动物建立操作条件反射后进行。

b) 每个周期中,应分别指定正确位置(如左侧)和错误位置(如右侧),条件刺激信号在正确位置和错误位置交替出现,条件刺激时间间隔应为 120s。

c) 条件刺激信号出现在正确位置时,动物完成规定的正确操作次数后,给予 1 次奖赏;条件刺激信号出现在错误位置时,无论动物是否操作,不给予奖赏。

d) 每天重复 10 个~30 个周期,连续训练 5 天。

3.1.3.3 视觉信号识别条件反射

a) 应在动物建立操作条件反射后进行。

b) 每个周期中,应分别指定正确信号灯(如蓝灯)和错误信号灯(如红灯),正确信号灯和错误信号灯交替出现,信号灯出现时间间隔应为 120s。

c) 正确信号灯出现时,动物完成规定的正确操作次数后,给予 1 次奖赏;错误信号灯出现时,无论动物是否操作,不给予奖赏。

d) 每天重复 10 个~30 个周期,连续训练 4 天。

3.1.3.4 消退实验

应在上述实验模式完成后进行,实验过程和评价指标同奖励性操作条件反射,但不给予动物奖赏强化。

3.1.4 评价指标

a) 鼻触总次数(total nose poke):动物头部进入奖赏区域内探索次数。鼻触总次数越少,动物探索兴趣越低。

b) 正确鼻触次数(correct nose poke):在正确刺激信号时,动物发生的鼻触次数。正确鼻触次数越少,动物探索兴趣越低、学习记忆能力越差。

c) 鼻触正确率 (rate of correct nose poke): 正确鼻触次数/鼻触总次数。鼻触正确率越高, 动物学习记忆能力越强。当鼻触正确率连续 3 天保持在 70% 以上, 即奖励性条件反射建立。

d) 正确操作次数 (correct lever presses): 动物在操作任务中能够获得奖赏物质次数。正确操作次数越多, 动物操作和学习记忆能力越强。

e) 错误操作次数 (incorrect lever presses): 除获得奖赏的操作外, 动物的操作次数。错误操作次数越多, 动物操作和学习记忆能力越差。

f) 正确操作率 (rate of correct lever presses): 正确操作次数/(正确操作次数+错误操作次数)。正确操作率越高, 动物的操作和学习记忆能力越强。当正确操作率连续 3 天保持在 70% 以上, 即奖励性操作条件反射建立。

3.2 穿梭实验

3.2.1 实验原理

在穿梭实验中, 如果动物在规定时间内对条件刺激信号(如灯光或声音)不发生反应, 则给予惩罚性刺激(常用电刺激), 动物受到惩罚性刺激后再穿梭至对侧安全区, 形成被动逃避反应; 经过一定时间反复训练, 动物将这种条件刺激信号和电刺激相结合, 在规定时间内穿梭至对侧安全区, 避免伤害, 形成主动逃避反应。

3.2.2 实验材料

小鼠或大鼠。

穿梭实验的基本装置包括测试箱、条件刺激和非条件刺激信号发生部件、控制单元。测试箱一般为矩形或方形, 分 A、B 两室, 两室面积等大。A、B 两室间有一椭圆形小门。现在多采用计算机、摄像或传感装置, 以及软件系统组成的自动化和智能化装置。

3.2.3 实验方法

a) 实验开始前, 动物宜置于测试箱 (A 或 B 室) 适应 3min ~ 5min。

b) 动物适应完成后, 应开始穿梭条件反射获得实验。穿梭次数应设定为 30 次 ~ 60 次。

c) 穿梭条件反射的获得: 每天给予获得训练。周期依次为条件刺激 (灯或声音) 3 ~ 5s 后, 非条件刺激 (电刺激) 15s ~ 30s, 非条件刺激结束后应有 5s ~ 10s 的间隔期 (不给予任何刺激), 达到设定的穿梭次数, 实验结束。

d) 穿梭条件反射消退: 达到设定的穿梭条件反射标准 (主动穿梭比率连续 3 天保持在 80% 以上) 后开始条件反射消退实验。实验方法同 3.2.3 (穿梭条件反射的获得)。此时应停止给予非条件刺激。

3.2.4 评价指标

a) 主动穿梭次数 (number of active escape response): 动物从有光无电室穿入到无光无电室的次数。主动穿梭次数越多, 动物学习记忆能力越强。

b) 被动穿梭次数 (number of passive avoidance response): 动物从有光有电室穿入到无光无电室的总次数。被动穿梭次数反映动物被动逃避的学习记忆能力。

c) 主动穿梭比率 (rate of number of active escape response): 主动穿梭次数/(主动穿梭次数+被动穿梭次数)。主动穿梭比率越高, 动物的学习记忆能力越强。当主动穿梭比率连续 3 天保持在 80% 以上, 即成功建立穿梭条件反射。

d) 其他如主动穿梭平均反应速度(动物形成主动穿梭过程的路程/时间)、错误区时间(动物在有光有电区停留的时间)等也可作为穿梭学习记忆能力评价指标。

3.3 跳台实验

3.3.1 实验原理

跳台是一种检测动物被动性条件反射能力的方法。给予一定程度的电刺激,动物为避免伤害而寻找安全区(绝缘跳台),经几次反复后,最终记住安全区域。跳台实验可反映动物学习记忆的获得、巩固、再现等过程。

3.3.2 实验材料

小鼠或大鼠。

跳台实验基本装置包括测试箱、跳台、电路控制系统。现在多采用计算机、摄像或传感装置,以及软件系统组成的自动化和智能化装置。

3.3.3 实验方法

a) 实验开始前动物应放入测试箱内适应 5min。

b) 获得能力测试:将动物置于测试箱底部区域,底部电网通电,开始实验。实验时间为 5min。

c) 巩固能力测试:24h 后将动物置于跳台上,底部电网通电,开始实验。实验时间为 5min。

3.3.4 评价指标

a) 错误次数(number of error):动物在一定的时间内从绝缘跳台到电网的实际次数。错误次数越多,动物学习记忆能力越差。正常动物在获得阶段(5min)的错误次数应为 1 次~5 次;在巩固阶段应小于 2 次。

b) 潜伏期(latent period):动物第一次从电网逃避到绝缘跳台的时间或动物第一次从绝缘跳台跳至电网的时间。潜伏期长短反映动物学习记忆能力。

c) 安全区时间(total time of safe zone):动物在绝缘平台停留的时间。安全区时间越长,动物学习记忆能力越强,正常动物安全区时间与总时间比值应大于 90%。

d) 错误区时间(total time of error zone):动物在电网上停留的时间。错误区时间越长,动物学习记忆能力越差,正常动物错误区时间与总时间比值应小于 10%。

3.4 避暗实验

3.4.1 实验原理

避暗是利用啮齿类动物的嗜暗习性设计,动物由于嗜暗习性而偏好进入暗室,进入暗室时则受到电击,动物为避免伤害而寻找安全区(明室),经几次反复训练后,最终记住明室为安全区域。

3.4.2 实验材料

小鼠或大鼠。

避暗实验基本装置包括测试箱和电路控制系统。测试箱应为矩形或方形,分明室和暗室。现在多采用计算机、摄像或传感装置,以及软件系统组成的自动化和智能化装置。

3.4.3 实验方法

a) 实验开始前动物宜放入测试箱内适应 5min。

b) 获得能力测试: 暗室底部通电, 明室底部无电。动物置于测试箱暗室, 开始实验。实验时间为 5min。

c) 巩固能力测试: 暗室底部通电, 明室底部无电。24h 后将动物置于明室, 开始实验。实验时间应为 5min。

3.4.4 评价指标

a) 测试箱不通电的情况下, 正常动物在暗室停留时间与总时间的比值应大于 60%。

b) 错误次数 (number of error): 动物在一定的时间内从明室进入暗室的实际次数。错误次数越多, 动物学习记忆能力越差。正常动物在获得阶段 (5min) 的错误次数应为 1 次 ~ 5 次; 在巩固阶段应小于 2 次。

c) 潜伏期 (latent period): 动物第一次从明室进入暗室的时间。潜伏期越长, 动物学习记忆能力越强。

d) 安全区时间 (total time of safe zone): 动物在明室停留的总时间。安全区时间越长, 动物学习记忆能力越强。正常动物安全区时间与总时间的比值应大于 90%。

e) 错误区时间 (total time of error zone): 动物在暗室停留的总时间。错误区时间越长, 动物学习记忆能力越差。正常动物安全区时间与总时间的比值应小于 10%。

3.5 Morris 水迷宫实验

3.5.1 实验原理

将动物置于盛水的圆形测试箱中, 测试箱中安装有隐匿的平台, 并在平台空间附近布置多个参考物。动物为逃避水环境而寻找迷宫中固定位置的隐匿平台, 通过周围的空间参考物学习和记住平台位置。实验中隐蔽平台的位置与动物自身所处的位置和状态无关, 是一种以异我为参照点的参考认知, 所形成的记忆是一种空间参考记忆, 为空间记忆的常用实验方法。

3.5.2 实验材料

小鼠、大鼠。

Morris 水迷宫基本装置包括圆形测试水池、平台和空间参考物。现在多采用计算机、摄像, 以及软件系统组成的自动化和智能化装置。

3.5.3 实验方法

a) 应将水迷宫按东、南、西、北四个方向划分为 4 个象限, 放置于任意一个象限内的中央。

b) 水池中注水高度应以平台顶部低于水面 1cm ~ 2cm 为宜。水温应维持在 22℃ ~ 25℃。

c) 测试箱水面颜色背景应尽可能与动物毛发颜色形成反差, 保证平台不可见。

3.5.3.1 导航测试

a) 测试前应先将动物放在平台上适应 10s ~ 20s, 然后随机选取 3 个 ~ 4 个象限作为入水点, 将动物放入水中进行测试。实验时间宜为 1min ~ 2min (推荐 90s)。

b) 动物找到平台后, 应让其在平台上停留 10s。

c) 若未找到平台, 应人工引导至平台停留 10s。此时潜伏期应按最长实验时间计算。

d) 每天每只动物测试 2 次 ~ 4 次, 应连续检测 5 天 ~ 7 天。

3.5.3.2 探索实验

a) 应在导航测试实验 24h 后进行 (此时正常组动物寻台成功率应超过 90%)。此时应

撤除平台。

b) 应从原平台的对角象限中点, 面向迷宫壁将动物放入水中。

c) 每只动物应测试 1 次, 实验时间应与导航测试时间相同。

3.5.3.3 工作记忆实验

a) 方法一: 按“导航测试”的 a) ~ c) 步骤进行。此时每天在不同的象限更换平台的位置。实验时间应为 90s, 每天测试一次, 完成 3 个不同象限的测试, 连续检测 3~4 天, 统计动物第二次训练的登台潜伏期。

b) 方法二: 按“导航测试”的 a) ~ c) 步骤进行。此时平台固定于某一象限, 每天测试 2 次, 每次实验时间应为 90s, 两次间隔时间 15s。两次动物均从同一位置面壁放入水池, 统计两次训练的潜伏期。连续检测 3 天~4 天, 平台位置每天变换。

c) 方法一和方法二均应在“导航测试”实验后进行。此时正常组动物的寻台成功率应超过 90%。

3.5.4 评价指标

a) 潜伏期 (latency): 动物从入水到成功登上平台的总时间。潜伏期越长, 表明动物的学习记忆能力越差。

b) 登台率 (percentage of staying in platform): 成功登台动物数占总测试动物数的百分比。登台率越高, 表明动物的学习记忆能力越强。

c) 穿台次数 (number of crossing platform): 动物穿过虚台 (探索实验中, 撤除平台后的位置) 的次数。正常动物 90s 实验时间内穿台次数为 2 次~4 次。穿台次数越少, 表明动物的记忆能力越差。

d) 工作记忆实验中的方法二, 评价指标为前后两次寻台潜伏期的差值, 差值越小, 表明工作记忆能力越强。

e) 匹配实验中, 其他如目标象限时间比率 (percentage of time in target quadrant)、目标象限游程比率 (percentage of swimming distance in target quadrant) 也可作为评价指标。

3.6 T 型迷宫

3.6.1 实验原理

T 型迷宫是空间工作记忆的经典评价方法。在 T 型迷宫内特定位置放置食物, 检测动物对“正在经历”的信息进行短暂储存和加工并指导下一步行动计划的能力。限食后, 动物寻找食物动机更强。

3.6.2 实验材料

小鼠、大鼠。

T 型迷宫实验的基本装置包括测试箱、挡板、食物。测试箱分为主干臂和左、右两个目标臂。左、右目标臂与中心的连接处应各有一组可插入挡板的闸门。现在多采用计算机、摄像, 以及软件系统组成的自动化和智能化检测装置。

3.6.3 实验方法

3.6.3.1 自发连续交替选择实验

a) 动物放入 T 型迷宫的主干臂起始箱, 应关闭闸门, 动物限制在主干臂内 10s。

b) 打开闸门, 此时动物离开主干臂进入一个目标臂。

c) 动物四肢进入目标臂内后, 迅速将动物放回主干臂起始箱。此时应关闭闸门, 限制在臂内 5s ~ 10s。

d) 应重复步骤 a) ~ c) 5 次 ~ 9 次, 每次时间应不超过 2min。

3.6.3.2 奖赏交替选择实验

适应训练

a) 动物限食: 食物调整至 10g/天/只 ~ 15g/天/只 (标准食物 2 粒左右/天/只)。以动物体重降至实验前的 85% ~ 90% 为准。

b) 开启 T 型迷宫所有门, 放置食物。

c) 将多只动物放入迷宫 3min, 必要时补充食物。每天至少做 4 次, 每次与前一次间隔至少 10min。适应 2 天。

d) 强迫选择训练: 将动物放入主干臂的起始箱, 打开闸门, 让动物进入迷宫的主干臂。随机、交替选择左、右两臂之一放入 4 粒食丸, 同时关闭另一侧臂, 使动物被迫选择食物强化臂并完成摄食; 每天 6 次, 连续 4 天。保持关闭左侧门的次数与关闭右侧门的次数相等。

正式试验

a) 强迫训练: 关闭一侧目标臂, 强迫动物进入另一侧开放臂以获得 2 粒食丸奖赏。

b) 立即 (最短延迟, 少于 5s) 将动物放回主干臂, 在主干臂中限制 10s。然后同时开放两个目标臂。动物四肢均进入一个目标臂时完成“一次选择”。动物返回到强迫选择训练时进入过的臂则没有食物奖赏, 并且将其限制在该臂内 (限制时间与动物吃掉奖赏物的时间应相同, 如 10s), 记录一次错误选择; 若动物进入另一个臂, 则获得食物奖赏 (4 粒食丸), 记录一次正确选择。重复上述过程 6 次。

3.6.4 评价指标

动物选择一次未进的目标臂, 记为正确一次。反之, 则为选择错误一次。

评价指标: 正确率 (%) = 正确次数 / (正确次数 + 错误次数)。

正常大小鼠正确率一般为 80% 以上。

3.7 放射状 (八臂) 迷宫

3.7.1 实验原理

放射状迷宫 (radial arm maze) 实验是通过限食后, 动物有更强的觅食驱动力, 在迷宫特定位置放置食物。动物对迷宫各臂进行探索, 经过一定时间的训练, 动物可记住食物在迷宫中的空间位置。常用八臂迷宫。

3.7.2 实验材料

小鼠、大鼠。

放射状 (八臂) 迷宫基本装置包括测试箱、挡板和食物。测试箱由中央区和八个相同形状、相同尺寸的迷宫组成。中央区通往各臂的入口处有一活动挡板。现在多采用计算机、摄像, 以及软件系统组成的自动化和智能化检测装置。

3.7.3 实验方法

a) 动物购入适应后, 应对动物进行限食。体重控制在正常动物体重的 85% ~ 90% 为宜。

b) 第一次实验应在禁食 24h 后开始。

c) 实验开始时, 迷宫各臂及中央区应平均分撒食物颗粒, 每臂应放 4 粒, 食物直径宜为 3mm。

d) 食物分撒完毕后, 应同时将 4 只动物置于迷宫中央, 此时应打开通往各臂的门。实验时间宜为 10min。

e) 重复 c)、d) 操作, 应连续检测 3 天。

f) 第 4 天起动物应单只进行训练。在每个臂靠近外端食盒处各放一颗食粒, 动物自由摄食, 应在食粒吃完或实验 10min 后将动物取出。一天 2 次, 连续检测 2 天。

g) 第 6 天开始, 应随机选 4 个臂设定为工作臂, 另外 4 个臂为参考臂。每个工作臂应放一颗食粒, 关闭各臂门。

h) 将动物放在迷宫中央 30s 后, 打开各臂门, 动物应在迷宫中自由活动并摄取食粒, 动物吃完 4 个臂的所有食粒或者 10min 后, 应终止实验。每天应训练两次, 间隔期应不少于 1h。

3.7.4 评价指标

a) 总时间 (total time): 即动物吃完所有食粒所需要的时间, 如果到实验规定时间内未吃完, 以最长时间记录。其反映学习记忆能力。正常大小鼠的总时间占测试时间的比率为 40%~60%。

b) 重复错误次数 (number of repetitive error): 实验规定时间内动物重复进入已吃过食粒的臂的次数。其反映工作记忆能力。正常动物的工作记忆错误次数应不大于 3 次。

c) 总出错次数 (number of total error): 动物进入无食粒迷宫臂的次数。其反映动物参考记忆能力。正常动物的参考记忆错误次数应不大于 5 次。

3.8 物体认知

3.8.1 实验原理

利用啮齿类动物天生喜欢接近和探索新奇物体的本能来检测动物的学习记忆能力。

3.8.2 实验材料

小鼠、大鼠。

物体认知实验基本装置包括测试箱、物体。现在多采用计算机、摄像, 以及软件系统等组成的自动化和智能化检测装置。

3.8.3 实验方法

实验有四种模式: 新物体识别实验, 物体位置识别实验, 时序记忆实验, 情景记忆实验。每种实验模式均应包括适应期、熟悉期、测试期三个阶段, 详见表 1。每种实验模式均应符合配对平衡原则。

3.8.4 评价指标

a) 新奇偏爱指数 (novelty preference index, NI): 测试期内动物对新奇物体的探索时间与对新奇物体和熟悉物体探索时间之和的比值, 即 $NI = T_n / (T_n + T_f)$ 。NI 值大于 0.5 表明动物对新奇物体具有偏爱性, 小于 0.5 则暗示动物对熟悉物体更加偏爱。“ T_n ”是指测试期动物对新奇物体的探索时间, “ T_f ”是指测试期动物对熟悉物体的探索时间。新奇偏爱指数越高, 动物学习记忆能力越强。正常动物的 NI 应大于 0.5。

表 1 物体认知实验方法

	适应期	熟悉期	测试期
新物体识别实验	10min/d, 连续 3 天	适应完成后开始, 时间宜为 5min	熟悉期结束后间隔一定时间(推荐 30min), 应更换其中一个物体为新物体, 时间宜为 5min
物体位置识别实验		适应完成后开始, 时间宜为 5min	宜在熟悉期结束后间隔一定时间(推荐 30min) 开始, 应更换其中一个物体的位置, 时间宜为 5min
时序记忆实验		两个熟悉期实验。两个熟悉期间隔 20min, 每次实验时间宜为 5min	宜在第二次熟悉期结束后间隔一定时间(推荐 30min) 开始, 时间宜为 5min
情景记忆实验		两个熟悉期实验。两个熟悉期间隔 20min, 第二次熟悉期应更换背景, 每次实验时间宜为 5min	宜在第二次熟悉期结束后间隔一定时间(推荐 30min) 开始, 时间宜为 5min

b) 相对辨别指数 (relative discrimination index, RI): 测试期内动物对新奇物体的探索时间和对熟悉物体的探索时间之差除以总探索时间, 即 $RI = (T_n - T_f) / (T_n + T_f)$ 。RI 的数值范围应为 -1 到 +1。-1 表示动物在测试期时完全偏爱熟悉物体, 0 表示动物在测试期时对熟悉物体和新奇物体的探索时间相同, 无物体偏爱性, +1 表示动物在测试期时完全偏爱新奇物体, 即负值表明动物偏爱熟悉物体, 正值表明动物更加偏爱新奇物体、能辨别出新奇物体。相对辨别指数越高, 动物学习记忆能力越强。正常动物的 RI 宜为 0.4 ~ 0.6。

4 行为评价实验设计原则

4.1 检测方法

研究学习记忆行为改变时, 宜至少采取上述学习记忆实验方法中的两种, 每种实验方法应重复一次。

- 全部行为检测方法中, 应都呈现同向性改变。
- 至少一次应表现出统计学上的显著性差异。

4.2 实验设计原则

a) 必须由研究机构动物保护和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 审查并批准同意。严格遵守动物福利指南的 3R 原则。

b) 行为学实验顺序的安排原则, 一般先安排对动物应激较小的实验, 再安排应激较大的实验。

- 针对不同的行为学实验, 选择适合的动物品系。

4.3 行为学实验条件

- 动物购入实验室后适应 3 ~ 5 天。
- 实验前, 实验者应对动物进行抚触, 使动物熟悉、适应实验者。
- 在实验前, 动物应适应检测环境 30 ~ 60min。
- 实验环境条件: 安静, 光源为非直接照射光源, 照度应为 20 ~ 40lux。特殊情况, 如焦虑模型检测, 照度可调至 200 ~ 400lux。
- 同一测试箱内如进行多只动物实验, 前只完成检测后, 应对测试环境进行擦拭和清洁等, 避免残存动物气味 (水迷宫除外), 再进行下一只动物的检测。

4.4 动物模型

- a) 新药、保健食品功效评价, 应选择三种或以上不同致病原理模拟的动物模型。
- b) 至少两种模型显示出改善作用并表现出统计学意义。

4.5 动物选择及阳性药物

- a) 宜采用健康成年雄性动物。
- b) 模拟女性特有的疾病应采用雌性动物。
- c) 每组实验动物数, 大鼠应为 8~10 只; 小鼠应为 10~15 只。
- d) 应根据模型原理、指标敏感性和研究目的, 选择与受试药物活性成分或作用机制相似的上市药物作为阳性对照药。
- e) 不同模型评价时, 宜根据模型发病机制选择阳性药。

4.6 实验数据处理

- a) 行为学实验结果以均数 $\pm$ 标准误 ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) 表示。
 - b) 采用单样本 K-S 检验进行正态分布检验。
 - c) 正态分布数据采用独立样本 t 检验或单因素方差分析 (one-way ANOVA)。
 - d) 不满足正态分布的数据采用非参数检验。
 - e) 重复测量实验, 采用重复测量方差分析进行数据统计。
-