

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 75—2019

实验动物 小鼠和大鼠情绪 行为实验规范

Laboratory animals - Guideline for the emotional 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、中国医学科学院医学实验动物研究所、军事医学科学院毒物药物研究所、西南医科大学、中国航天员科研训练中心、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、孙秀萍、李云峰、陈善广、秦川、王琼、姜宁、张宏霞、吕静薇、张北月、薛瑞、张有志、陶雪、黄红。

实验动物 小鼠和大鼠情绪行为实验规范

1 范围

本标准规定了抑郁和焦虑情绪行为评价中常用的检测设备、实验方法和评价指标。

本标准适用于使用小鼠、大鼠，为研究抑郁症和焦虑症，以及防护措施而开展的行为实验。

2 术语与定义

下列术语与定义适用于本标准。

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

情绪 emotion

个体在其需要是否得到满足的情景中直接产生的心理体验和相应反应，为人和动物所共有。

2.3

抑郁 depression

面临环境应激等因素长期、慢性作用时，出现快感缺失、行为绝望、获得性无助等情绪反应。

2.4

焦虑 anxiety

一种缺乏明显客观原因，预期即将面临不良处境的紧张不安和恐惧情绪。

2.5

动物情绪行为实验 animal emotion behavioral test

以实验动物模型为对象，研究情绪所致疾病的发生机制及防治措施的科学研究。本规范中主要指负性情绪行为实验，包括抑郁行为实验（获得性无助实验；强迫游泳实验；悬尾实验；糖水偏爱实验；旷场实验；新奇物体探索实验）和焦虑行为实验（高架十字迷宫实验；明暗箱实验；旷场实验；饮水冲突实验）。

3 抑郁行为实验方法

3.1 获得性无助实验

3.1.1 实验原理

获得性无助实验是指当动物接受连续无法控制或预知的厌恶性刺激（电击）后，将其

放在可以逃避电击的环境中时,呈现出的逃避行为欠缺的现象,同时还伴有体重减轻、活动减少、攻击性降低等行为改变。

3.1.2 实验材料

小鼠、大鼠。

获得性无助实验的基本装置包括测试箱、灯(或声音)信号和电刺激装置。测试箱应为矩形或方形,分A、B两室,两室面积应等大,内部结构相同。现在多采用计算机、摄像或传感装置,以及软件系统等组成的智能化和自动化装置。

3.1.3 实验方法

3.1.3.1 模型建立期

a) 实验当天动物应放入测试箱(A室或B室)中,适应5min。

b) 动物应在电击箱内接受30个~60个运行周期的循环电击。每个运行周期应包括无信号不可逃避的双室足底电击期和间歇期,电击期时间应为3s~10s,间歇期时间应为3s~10s。电刺激频率宜为5Hz~15Hz,刺激电流强度应为大鼠0.65mA~1.80mA(推荐0.8mA)、小鼠0.15mA~0.6mA(推荐0.25mA)。如采用电压,应为大鼠65V~70V、小鼠30V~36V。

3.1.3.2 条件性回避反应测试期

a) 模型建立结束后第二天应进行条件性回避反应测试。

b) 动物放入测试箱(A侧或B侧)中,适应5min后,进行15个~30个运行周期的实验。

c) 每个运行周期的总时间应为30s,包括3s~10s的条件刺激(灯光/声音)、3s~10s的条件刺激+非条件刺激(电击条件同前)和5s~25s的间歇期(不给予任何刺激)。

d) 重复上述步骤,连续2天~3天。

3.1.4 评价指标

a) 逃避失败次数:动物在设定的非条件刺激持续时间内未完成回避反应的总次数;逃避失败次数与动物的抑郁程度成正比。抑郁行为判断标准:30次电击,动物逃避失败次数大于25次或者与对照组相比有显著性减低($P<0.05$)。

b) 逃避潜伏期:实验开始后,动物第一次穿梭至对侧测试箱的时间;逃避潜伏期与动物的抑郁程度成正比。抑郁行为判断标准:逃避潜伏期大于15s或者与对照组相比有显著性减低($P<0.05$)。

c) 其他:主动回避次数、安全区时间(无电区域)、运动总时间(实验期间动物处于运动状态的时间)、运动总路程(实验期间动物物理位移的总和)等实验指标亦作为抑郁行为辅助评价指标。这些指标值越低,表明动物抑郁程度越重。

3.2 强迫游泳实验

3.2.1 实验原理

当动物被迫在一个受限的空间游泳时,它们首先拼命游动,试图挣扎逃跑,当逃跑无法实现时即处于一种漂浮不动姿势,这种“不动行为”称为“行为绝望状态”。

3.2.2 实验材料

小鼠、大鼠。

强迫游泳实验的基本装置是测试箱。现在多采用计算机、摄像(传感),以及软件系统

等组成的自动化和智能化设备。

3.2.3 实验方法

a) 实验前调节测试箱内水温, 水温应为 $23^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 。水深应根据动物体重进行调整, 动物尾巴与测试箱底面保持一定距离。

b) 如同时进行多只动物实验, 每两只动物间应用不透明挡板隔开。

c) 大鼠强迫游泳实验, 应在实验前一天预游, 24h 后进行强迫游泳实验。记录 5min 内动物的不动时间、游泳时间及攀爬时间。

d) 小鼠强迫游泳实验, 应在检测当天进行。

e) 小鼠游泳时间应为 6min, 记录后 4min 的游泳时间、不动时间及攀爬时间。

3.2.4 评价指标

评价指标应采用动物不动、攀爬、游泳三类动作的时间及次数进行判定。

a) 不动: 动物在水中停止挣扎, 呈漂浮状态, 仅有轻微的肢体运动以保持头部浮在水面。不动时间越长表明抑郁程度越重。正常小鼠不动时间为检测时间的 40% ~ 80%; 正常大鼠不动时间为检测时间的 30% ~ 70%。抑郁行为判断标准: 不动时间与对照组相比显著性增加 ($P < 0.05$)。

b) 游泳: 动物进行流畅、协调的运动, 动物四肢始终在水面以下。游泳时间和游泳距离越少, 表明抑郁程度越重。

c) 攀爬: 动物四肢强有力伸出水面, 并沿测试箱壁做剧烈的上下动作。5min 检测期内, SD 大鼠攀爬时间 60s ~ 130s。攀爬时间越少, 表明动物抑郁程度越重。

3.3 悬尾实验

3.3.1 实验原理

当动物尾巴被悬挂时, 起初会剧烈挣扎试图逃脱, 但几分钟后发现逃跑无望即处于不动状态, 称为“行为绝望状态”。

3.3.2 实验材料

小鼠。

悬尾实验的基本装置是测试箱。现在多采用计算机、摄像或传感装置, 以及软件系统等组成的自动化和智能化设备。

3.3.3 实验方法

a) 实验开始前, 动物尾部悬吊使小鼠呈倒悬体位, 头部应与悬尾箱底面保持一定距离。

b) 如同时进行多只动物实验时, 每两只动物间应用不透明挡板隔开。

c) 记录检测期动物的不动时间。

d) 实验时间应为 6min, 记录后 4min 内动物的不动时间。

3.3.4 评价指标

用不动、运动挣扎两类动作行为的时间进行判定。

a) 不动: 动物停止挣扎, 身体呈垂直倒悬状态, 静止不动。不动时间越长, 表明抑郁程度越重。正常组 c57 小鼠不动时间较长, 均值多大于 100s; 正常组 ICR 小鼠不动时间均值多小于 100s。抑郁行为判断标准: 不动时间与对照组相比有显著性增加 ($P < 0.05$)。

b) 运动挣扎: 动物有明显可见的挣扎运动。运动挣扎时间越短, 表明抑郁程度越重。

3.4 糖水偏爱实验

3.4.1 实验原理

利用啮齿类动物对甜味的偏好而设计。动物禁食禁水一段时间后,同时给予饮用水和低浓度蔗糖水,以动物对蔗糖水的偏嗜度(蔗糖偏嗜度)为指标检测动物是否出现快感缺失这一抑郁症状。

3.4.2 实验材料

小鼠或大鼠。

饮水瓶装置。饮水瓶盛装液体体积大鼠应不少于 50mL、小鼠应不少于 30mL。纯水和蔗糖液体容量相同。

3.4.3 实验方法

a) 大鼠蔗糖饮水训练:动物应单笼饲养,进行 48h 的蔗糖饮水训练。前 24h 给予两瓶 1%~2%蔗糖水,后 24h,一瓶给予 1%~2%蔗糖水,另一瓶给予饮用纯水(每隔 6h 交换两个水瓶位置)。

b) 大鼠蔗糖偏嗜度测定:大鼠禁食禁水 14h~23h,自由饮用两瓶不同的水,其中一瓶为 1%~2%蔗糖水,一瓶为饮用纯水。测定 1h 内大鼠对两瓶水的饮用量(g)。

c) 小鼠糖水偏爱实验:操作流程同大鼠。但在 48h 饮水训练时,应全程给予 1%~2%蔗糖水和饮用纯水(每隔 6h 交换两个水瓶位置),不需要禁食禁水,测定 8h~15h 内(中间宜交换两瓶位置 1 次)小鼠对两瓶水的饮用量(g)。

3.4.4 评价指标

应采用蔗糖偏嗜度作为评价指标。

蔗糖偏嗜度(%) = $\frac{\text{蔗糖水饮用量}}{\text{蔗糖水饮用量} + \text{饮用水饮用量}} \times 100\%$ 。

抑郁行为判断标准:蔗糖偏嗜度低于 0.4 或者与对照组相比有显著性减低($P < 0.05$)。

3.5 旷场实验

3.5.1 实验原理

动物在新奇环境中出现探究活动增加。抑郁模型动物探究兴趣缺失,在新奇环境中活动减少。

3.5.2 实验材料

大鼠、小鼠。

旷场实验基本装置为测试箱。现在多采用计算机、摄像或传感装置,以及软件系统等组成的自动化和智能化设备。

3.5.3 实验方法

a) 实验前,动物应适应检测环境 60min。

b) 动物放入测试箱内,立即开始检测。

c) 每次实验时应从同一位置、同一方向放入动物。

d) 实验检测时间宜为 5min~10min。

3.5.4 评价指标

a) 总路程:动物在实验记录时间内产生的物理位移累积。

b) 速度:动物在单位时间产生的物理位移。5min 内正常动物总路程多为 1000cm~

2500cm, 速度为 3cm/s ~ 8cm/s。动物出现抑郁行为时, 速度减慢。

c) 运动总时间: 动物在实验记录时间内的产生物理位移时所需的时间累积。正常动物运动时间多大于检测时间的 30%。抑郁行为判断标准: 与对照组相比有显著性减低 ($P < 0.05$)。

d) 站立次数: 动物在实验记录时间内的站立总次数。10min 检测时间, 正常组大鼠站立次数 20 次 ~ 50 次; 10min 检测时间, 正常组小鼠站立次数 60 次 ~ 130 次。抑郁行为判断标准: 与对照组相比有显著性减低 ($P < 0.05$)。

3.6 新奇物体探索实验

3.6.1 实验原理

基于动物先天寻求新奇事物的行为, 在动物适应后的环境中引入新奇物体, 动物对新奇物体探索行为增加。抑郁动物探索行为明显减弱。

3.6.2 实验材料

大鼠、小鼠。

基本装置包括测试箱、物体 (圆柱体或长方体)。现多采用计算机、摄像或传感装置, 以及软件系统组成的自动化和智能化设备。

3.6.3 实验方法

a) 适应期: 动物放入自发活动测试箱, 适应 5min 后, 取出, 放回原笼。

b) 测试期: 在同一环境条件下引入一新物体 (应放入中心位置), 再将待测动物面壁放入测试箱, 开始实验。

c) 检测时间应为 10min。

3.6.4 评价指标

动物对新物体的探索标准: 动物口鼻在新奇物体 $\leq 2\text{cm}$ 范围内, 直指向新奇物体或直接接触物体。潜伏期: 实验开始至动物首次主动探索 (接触) 物体的时间。如规定检测时间内, 动物没有接触新物体, 则潜伏期记录为检测时间。正常大鼠潜伏期多在 130s 以内。抑郁行为判断标准: 与对照组相比潜伏期有显著性增加 ($P < 0.05$)。

4 焦虑行为实验方法

4.1 高架十字迷宫实验

4.1.1 实验原理

高架十字迷宫由于开臂和外界相通, 对动物来说具有一定的新奇性, 同时又具有一定的威胁性, 这种新奇和威胁相结合, 使动物产生焦虑。

4.1.2 实验材料

小鼠、大鼠。

高架十字迷宫基本实验装置是测试箱。测试箱由开臂、闭臂、中央平台区组成。测试箱底部宜距离地面一定的高度。现在多采用计算机、摄像或传感装置, 以及软件系统等组成的自动化和智能化设备。

4.1.3 实验方法

a) 将动物置于迷宫中央平台区, 面向开臂, 开始实验, 无适应期。

b) 实验时间应为 5min。

4.1.4 评价指标

以动物四肢全部进入开(闭)臂作为进出开(闭)臂的标准,判定指标如下。

a) 开臂次数: 实验时间内进入开臂的总次数。正常组动物开臂次数为 10 次~20 次,开臂次数与焦虑程度成反比。

b) 开臂次数百分比: 实验时间内动物进入开臂的次数/进入开臂和闭臂总次数之和 $\times 100\%$, 正常组动物开臂次数百分比范围为 20%~45%。开臂次数百分比与焦虑程度成反比。

c) 开臂时间百分比: 实验时间内, 动物进入开臂的时间/进入开臂和闭臂的总时间之和 $\times 100\%$ 。正常组动物开臂时间百分比范围为 20%~40%。开臂时间百分比与焦虑程度成反比。

d) 总次数: 实验时间内进入开臂和闭臂的总次数之和。正常组动物总次数范围为 20 次~30 次。

e) 其他: 闭臂次数和闭臂次数百分比(实验时间内进入闭臂的总次数/开臂和闭臂总次数之和)。这些指标值越高, 表明动物焦虑程度越重。

4.2 明暗箱实验

4.2.1 实验原理

啮齿类动物喜暗避明, 同时喜欢探究新奇环境, 因此对明箱既产生回避行为, 又有探究倾向, 由此形成矛盾冲突状态, 显示焦虑行为。

4.2.2 实验材料

大鼠、小鼠。

明暗箱实验基本装置为测试箱。测试箱宜为矩形或方形的立方体, 应包括明室和暗室两室。现在多采用计算机、摄像或传感装置, 以及软件系统等组成的自动化和智能化设备。

4.2.3 实验方法

a) 实验开始时, 从明室或暗室放入动物, 无适应期, 测试时间应为 5min~10min。

b) 观察动物进出明暗室的行为。

4.2.4 评价指标

a) 动物在暗室中停留时间应大于总时间的 60%。

b) 穿箱次数: 动物进入暗室次数与进入明室次数之和。检测时间 5min, 正常组动物穿箱次数为 5 次~20 次。穿箱次数越少, 表示焦虑程度越轻。

c) 明室时间: 动物在明室停留的时间。正常组动物在明室的时间为总时间的 20%~40%。明室时间越少, 表示焦虑程度越重。

4.3 旷场实验

4.3.1 实验原理

动物由于对陌生环境的恐惧, 主要在周边区域活动, 在中央区域活动较少。同时, 动物对陌生环境的新奇, 又促使其产生在中央区域探究的动机。利用动物在旷场环境中恐惧和好奇探究形成的矛盾冲突, 研究动物的焦虑状态。

4.3.2 实验材料

小鼠、大鼠。

基本装置包括测试箱。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

动化和智能化设备。

4.3.3 实验方法

a) 实验开始时不应有适应期。实验检测时间宜为 5min ~ 10min。

b) 实验开始时, 动物放入旷场中央区开始实验, 每次实验时应从同一位置、同一方向放入动物。

c) 以测试箱中心为圆点, 将测试箱划分中央区和边缘区。中心区宜划分测试箱总面积的 30% ~ 50%。

d) 观察动物在自发活动测试箱的行为。

4.3.4 评价指标

a) 总路程: 动物在测试时间内产生的物理位移累积和速度。小鼠 5min 内的总路程为 1000cm ~ 2500cm。

b) 中央区(周边区)路程: 动物在中央(周边)区域内产生的物理位移累积。

c) 中央(周边区)时间: 实验时间内, 动物在中央(周边)区域停留的时间, 应包括运动时间和静止时间。

d) 中央区路程比值: 规定时间内, 动物在中央区路程与总路程(中央区+周边区)的比值。正常动物为 10% ~ 20%。

e) 中央区时间比值: 规定时间内, 动物在中央区停留的时间与总时间(中央区+周边区)的比值。正常动物为 5% ~ 15%。

f) 总体路程和平均速度不变的条件下, 中央区活动路程、总时间减少, 表明动物的焦虑行为加重。

4.4 饮水冲突实验

4.4.1 实验原理

动物禁水一定时间后, 会产生强烈的饮水动机, 但一旦饮水时又给予动物电击惩罚使之产生恐惧, 这种矛盾冲突反复出现, 会使动物表现出经典的焦虑行为。

4.4.2 实验材料

大鼠、小鼠。

饮水冲突实验装置。基本装置是测试箱, 内部包括电击和饮水部件。现多应用计算机、摄像, 以及软件操作系统组成的自动化和智能化装置。

4.4.3 实验方法

a) 非惩罚饮水训练: 动物禁水 24h 后, 应单只放入测试箱内, 让其充分探究, 直到发现瓶嘴并开始舔水, 测试时间应为 3min。

b) 惩罚实验: 动物应继续禁水 24h, 共 48h 后置于测试箱。动物找到瓶嘴并开始舔水后自动开始计数和计时, 20 次舔水次数后给予一次电击(舔水与电击次数之比为 20:1)。测试时间应为 3min。

4.4.4 评价指标

舔水次数: 惩罚期内大鼠舔吸水管的次数。焦虑动物的舔水次数明显减少, 抗焦虑药则可使舔水次数明显增多。检测期内, 正常动物惩罚期舔水次数为 200 次 ~ 400 次。

5 行为实验评价原则

5.1 检测方法

研究抑郁、焦虑行为改变时,应至少采取上述抑郁、焦虑行为实验方法中的两种,每种实验方法应重复一次。

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

5.2 实验设计原则

a) 必须经研究机构的实验动物管理和使用委员会 (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。

c) 针对不同的行为学实验,选择适合的动物品系。

5.3 行为学实验条件

a) 动物购入实验室后适应 3 天。

b) 实验前,实验者应对动物进行抚触,使动物熟悉、适应实验者。

c) 动物在实验前,应适应检测环境 60min。

d) 实验环境条件:安静,光源为非直接照射光源,照度一般为 20lux ~ 40lux。特殊情况,如焦虑模型检测,照度可调至 200lux ~ 400lux。

e) 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。

5.4 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。

c) 至少两种模型显示出改善作用并出现统计学意义。

5.5 动物选择及阳性药物

a) 应采用健康成年雄性动物。

b) 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 只 ~ 10 只;小鼠应为 10 只 ~ 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。

5.6 实验数据处理

a) 行为学实验结果以均数 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ 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。