

高架十字迷宫和旷场实验焦虑模型小鼠生活行为和学习记忆能力的比较

招慧莹 王淑英[✉] 李毅 李心悦
(佳木斯大学)

Comparison of living behavior and learning and memory ability in mice with the elevated maze and open field anxiety model

摘要: 目的 比较高架十字迷宫和旷场实验致焦虑模型小鼠的生活行为、学习能力和焦虑存在时间的差异。方法 SPF 级雌性 KM 小鼠 30 只, 随机分为高架十字模型组(A 组)、旷场实验模型组(B 组)、空白对照组(C 组)。观察小鼠的学习能力、生活行为(贴壁次数、前举次数、理毛时间、睡眠时间)。结果 焦虑后小鼠较焦虑前小鼠贴壁次数、前举次数、理毛时间增多($P < 0.05$); 记忆正确次数减少($P < 0.05$); A 组小鼠焦虑前后行为变化较 B 组大, 焦虑存在时间长。结论高架十字迷宫建立焦虑模型效果优于旷场实验。

关键词: 高架十字迷宫 旷场实验 生活行为 学习记忆能力

焦虑症(Anxiety Disorders, AD) 已经非常普遍的存在于我们的生活之中, 患有 AD 的病人及家庭 会承担经济和精神的 双重压力。调查显示[1], 我国 AD 患者已高达 4.98%, 并且最近几年 AD 患病人口也呈逐年上升趋势。AD 已经成为临床上很多疾病的主要诱因, 长期处于焦虑情绪中, 不利于机体的正常运作, 一般来说 AD 常伴有多种疾病的同时出现, 长时间下去, 也会出现抑郁致死的危害。因此更多的专业人士关注了 AD 这一病症, 希望通过研究治焦虑的药物, 治疗 AD 的一系列危害问题。因小鼠与人有 90% 以上的相同基因, 所以现在多选用焦虑小鼠模拟 AD 患者进行药物研究。目前, 建立短效焦虑模型的方法通常采用高架十字迷宫和旷场实验, 但是实验者通常只是随机选择其中一种方法, 两种方法哪个建焦虑模型效果更好, 目前没有人做过比较。本实验旨在通过观察焦虑模型小鼠的生活行为、学习能力和焦虑存在时间的差异, 比较两种方法哪个建立小鼠焦虑模型更好, 为研究人员选择更适合的致焦虑模型提供理论和实验依据。

1. 材料和方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级 KM 雌性小鼠 30 只, 随机分为高架十字模型组(A 组)、旷场实验模型组(B 组)、空白对照组(C 组), 每组 10 只。

1.2 模型制备

1.2.1 高架十字迷宫焦虑小鼠模型制备

迷宫由两条相对的开放臂, 两条相对的闭合臂和中央区组成。其原理是小白鼠具有嗜暗性, 会更加倾向于在闭合臂中活动, 但是出于对新鲜事物的好奇, 在探究心理的作用下小鼠会探出头并在开放臂中活动。高架十字迷宫距地面较高, 小鼠在上面相当于人站在悬崖峭壁上, 当其探出头活动时对高处的感知, 会使小鼠产生探究新奇事物的恐惧, 从而引发探究与回避的冲突性行为, 由此产生焦虑心理[2]。实验前饥饿小鼠, 使其适应环境, 然后将小鼠从中央区面向闭合壁放入迷宫, 建立焦虑模型, 完成后将小鼠放入笼内, 喷洒酒精清洁迷宫, 再进行下一只小鼠的实验。

1.2.2 旷场实验焦虑小鼠模型制备 将 78cm × 78cm × 40cm 内壁为黑色的旷场实验箱置于空地, 正上方安置摄像机记录正常小鼠建立焦虑模型过程。将安抚后的小鼠放入旷场实验箱中央[3], 利用小鼠对新开阔环境的恐惧建立焦虑模型, 建立焦虑模型时长为 480s。

1.3 小鼠生活行为观测 根据查阅文献可知, 高架十字迷宫建模时间为 8 点到 9 点, 旷场实验建模时间为 17 点到 18 点, A 组建模前于 8 点-9 点、B 组小鼠于 17 点-18 点和 C 组小鼠的贴壁次数、前举次数、理毛时间、睡眠时间进行为期三天的观察, 建立焦虑模型后 A 组于 8 点-9 点、B 组小鼠于 17 点-18 点观察记录上述指标, 并记录焦虑前后三组小鼠的饮食、排便和社交情况。

1.4 焦虑时长的观测 通过录像观察焦虑后 A 组、B 组小鼠的行为, 与 C 组进行对比, 当 A 组、B 组小鼠焦虑后行为与 C 组无差异时认为焦虑消失, 记录焦虑时长。

1.5 Y 迷宫检测小鼠学习能力 通过 Y 迷宫实验记录小鼠的实际 alternation 数, 最大 alternation 数, 并计算自主交替率。实际 Alternation 被定义为连续进入三个臂, 如(1,2,3 或 1,3,2); 最大 alternation 为进臂次数的总和-2; 自主交替率=实际 alternation/最大 alternation × 100%。自主交替率作为检测不同焦虑模型对学习影响的指标, 自主交替率高学习能力强。根据结果得出焦虑对小鼠学习能力的影响。

1.6 统计方法 采用 SPSS23.0 及 GraphPad Prism8 分析数据

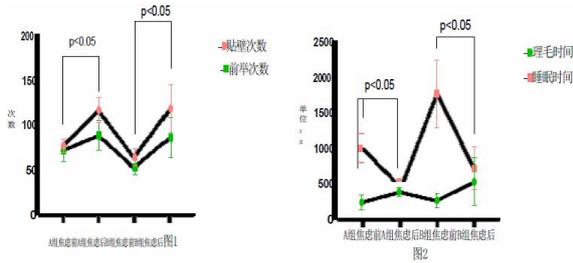
2. 结果

2.1 高架十字迷宫和旷场实验小鼠生活行为对比

2.1.1 小鼠生活行为 1 (见表 1)

表 1 A、B、C 组小鼠生活行为 1 (x ± s)

小鼠组别	贴壁次数(次)	前举次数(次)	理毛时间	(s)睡眠时间 (s)
A 组焦虑后	116.30 ± 13.98	87.90 ± 16.66	375.80 ± 61.63	440.80 ± 115.23
	B 组焦虑前	63.40 ± 9.69	52.10 ± 8.60	253.40 ± 102.75
B 组焦虑后		117.90 ± 26.79	85.40 ± 22.11	518.10 ± 336.92
	C 组	44.33 ± 4.63	27.00 ± 4.33	206.50 ± 28.54



由图中数据可知 A 组、B 组焦虑小鼠的贴壁次数、前举次数、理毛时间显著高于焦虑前小鼠 (P<0.05), 睡眠时间显著低于焦虑前小鼠(P<0.05)。对 A 组和 B 组小鼠在建立焦虑模型后一个小时内进行观察, 发现贴壁次数、前举次数并没有显著的差异。B 组小鼠的理毛时间多于 A 组, 睡眠时间少于 A 组。

2.1.2 小鼠生活行为为 2 (见表 2)

表 2 A、B、C 组小鼠生活行为 2 (x±s)

小鼠组别	饮食(g)	排便(g)	社交(次)
A 组焦虑前	44.96 ± 2.80	20.60 ± 1.60	6.0 ± 1.6
A 组焦虑后	38.60	31.56	3.2
B 组焦虑前	38.62 ± 1.87	17.20 ± 1.20	5.4 ± 1.2
B 组焦虑后	30.80	29.36	3.0
C 组	57.83	27.60	6.0

由表中数据可知焦虑小鼠的饮食摄入量减少, 排便量和排便次数明显增加, 社交行为减少, 互嗅、互追的行为明显减少。大多数焦虑后小鼠倾向于远离或逃避其他小鼠。焦虑小鼠有明显的躁动不安, 拒绝睡眠行为。

2.2 焦虑时长(见表 3)

表 3 A、B 组小鼠焦虑时长

组别	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A 组	39	37	49	53	60	48	65	55	40	44
B 组	44	28	37	34	23	35	33	26	24	40

(注: A、B、C、D……表示每笼的每只小鼠)

根据表中数据可知 A 组小鼠焦虑时长均值为 49 分钟, B 组小鼠焦虑时长均值为 32.4 分钟, 可知 A 组小鼠焦虑时间要长于 B 组小鼠。实验观察时一笼里放入三只小鼠, 按照焦虑建模顺序放入笼中, 时间间隔为 8 分钟。顺次放入的第二只小鼠的焦虑行为低于第一只; 第三只低于第二只和第一只。放入笼中的第三只、第二只小鼠的焦虑消失时间短于第一只小鼠, 由此推断社交行为能缓解焦虑。

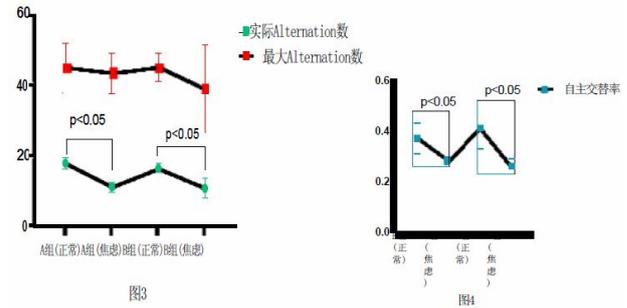
2.3A 组小鼠和 B 组小鼠学习能力对比(见表 4)

A 组正常和焦虑建模小鼠于 8 点-9 点、B 组正常和焦虑建模小鼠于 17 点-18 点、C 组小鼠在 Y 迷宫中学习, 观察录像记录数值。

表 4 A、B、C 小鼠学习能力

小鼠组别	实际 Alternation 数	最大 Alternation 数	自主交替率
A 组焦虑前	17.75 ± 1.67	44.75 ± 7.01	0.41 ± 0.08
A 组焦虑后	11.00 ± 1.41	43.25 ± 5.70	0.26 ± 0.03
B 组焦虑前	16.25 ± 1.28	44.88 ± 3.98	0.37 ± 0.06

B 组焦虑后	10.63 ± 2.83	38.75 ± 12.44	0.28 ± 0.02
C 组	16.50 ± 2.73	43.63 ± 3.97	0.38 ± 0.08



由以上数据可知 A 组、B 组焦虑后小鼠的实际 Alternation 数、自主交替率少于 A 组、B 组正常状态, 差异显著(P<0.05)。可见高架十字迷宫和旷场实验箱建立的焦虑模型小鼠学习记忆能力明显降低。A 组小鼠焦虑后自主交替率由 41% 下降到 26%, B 组小鼠焦虑后自主交替率由 37% 下降到 28%, A 组小鼠自主交替率下降的更多, 因自主交替率可进一步反映小鼠的学习能力, 可以得出高架十字迷宫迷宫建立的焦虑模型后小鼠学习能力下降的更明显。

4. 讨论

A 组(高架十字模型组) 焦虑后小鼠的睡眠时间少于 B 组(旷场实验模型组)焦虑后小鼠, 根据录像观察其整体表现为好动, 难以入睡。除此之外, A 组小鼠焦虑消失的时间节点均值为 49 分钟, B 组小鼠焦虑消失的时间节点均值为 32.4 分钟。A 组小鼠焦虑后自主交替率由 41% 下降到 26%, B 组小鼠焦虑后自主交替率由 37% 下降到 28%, 可见高架十字迷宫对学习能力的较大影响。综上所述, 高架十字迷宫建立焦虑模型较旷场实验箱建立焦虑模型效果好。

动物研究是药物研发不可缺少的重要部分。在众多的建立焦虑小鼠模型的方法中, 因高架十字迷宫和旷场实验均有实验操作方便、器械使用简单、实验过程和结果也都便于观察和记录的优点, 因此这两种建立焦虑模型的方法常被药物研发者使用。但是哪种更加适合药物研究还没有相关文献指出, 两者之间的差异也无相关的实验数据支撑。本实验得出 A 组模型小鼠与空白对照组小鼠的生活行为无差异的时间节点长于 A 组小鼠, A 组模型小鼠的学习能力较 B 组模型组差且高架十字迷宫被研究得比较透彻, 各种评价指标也都很清晰, 该迷宫利用了小鼠对新鲜事物探索和趋暗两种天性的矛盾冲突, 这样既不会对小鼠造成躯体上的伤害又可以成功建立焦虑模型, 高架十字迷宫实用性更强, 希望通过我们的实验研究, 能为药物研发者在选择焦虑小鼠模型时提供理论和实验依据。

参考文献:

[1]李婧婷.针刺对慢性束缚应激焦虑模型小鼠海马级 mPFC 中炎症因子表达的影响[D].
 [2] 黄海阳,洗绍祥,杨忠奇.温胆片对高架十字迷宫实验大鼠脑组织神经递质 GABA、Glu 含量的影响[J].中药新药与临床药理,2015.(09)631-635.
 [3]史海霞,董永丽,杨俭勤.温肾健脾法对腹泻型肠易激综合征大鼠内脏敏感性和旷场实验的影响[J].世界中西医结合杂志,2019.(02)207-210.
 黑龙江省大学生创新创业项目项目编号: S202210222144