

# 常见啮齿类动物行为学实验在抑郁症研究中的应用

尉强<sup>1</sup> 杨楠<sup>2\*</sup> 刘雁勇<sup>1,2\*</sup>

(1. 西藏大学医学院, 西藏 拉萨 850000 2. 中国医学科学院基础医学研究所药理学系, 北京协和医学院基础学院药理学系, 北京 100005)

**摘要** 抑郁症是一种常见的精神疾患,在抑郁症的研究过程中,行为分析作为基本工具必不可少,我们可以在分子和细胞水平上获得的大量信息均需要通过动物行为予以充分验证。文章通过对啮齿类动物常用行为学实验进行梳理,对不同行为学实验使用目的进行了归纳,并对影响因素进行了分析,以促进行为学实验技术更好地在抑郁症研究中发挥作用。

**关键词** 抑郁症 行为学 啮齿类

抑郁症(*depression*)是一种常见的精神疾患,其特征包括悲伤、兴趣或欣快感缺失,有罪恶感或自我价值感低下,睡眠或食欲不振、疲倦、注意力不集中等,具有高发病率、高致残率、高复发率的特点。抑郁症发病率逐年上升,2007—2017年间,全球抑郁症的患病率增加了近13%,患病人数超过3亿人<sup>[1]</sup>。世卫组织将抑郁症列为造成全球残疾的最大因素(2015年,所有残疾人口的7.5%),抑郁也是自杀死亡的主要原因,每年全球自杀死亡人数接近800000人。抑郁症除了发病率逐年上升外,还具有高度复发的特点<sup>[2]</sup>,可能会持续或反复发作,严重损害个人工作或日常生活的能力。有研究表明,抑郁症痊愈后的疾病复发率为50%~80%,其中6个月内的复发率约为20%<sup>[3]</sup>。抑郁症不仅伤害到了人们的健康,还对世界经济带来了严重的后果。世界经济论坛的一份报告指出,抑郁症造成的经济损失约为2.5万亿美元,预计到2030年将超过6万亿美元<sup>[4]</sup>。

由于对抑郁症及抗抑郁药物的主要研究部位是中枢神经系统,因此模式动物在研究过程中必不可少。常见的模式动物包括啮齿类动物、非人灵长类动

物、斑马鱼和果蝇等。其中非人灵长类动物的大脑更像人类,所以更适合作为临床前的抑郁症研究。但由于非人灵长类动物饲养要求高、成本高,而啮齿类动物在结构、功能、代谢及疾病特点也与人类高度类似,且体型较小、性情温顺、易于饲养、繁殖周期短、便于实验操作及观察,因此对抑郁症的临床前研究首选啮齿类动物,其中涉及到抑郁症动物模型的啮齿类动物以小鼠和大鼠为主。

在抑郁症相关动物实验研究中,行为分析作为基本工具,在研究中必不可少,尽管研究人员在分子和细胞水平上获得大量信息,但这些信息均需要通过动物行为予以充分验证。

## 1 抑郁症研究中所用啮齿类动物行为学实验种类

由于抑郁症发病机制极为复杂,且除了单纯的抑郁症外,还有双向情感障碍症等不同分类,而且在临床观察中,往往发现抑郁症患者常伴有焦虑、失眠等情况。因此,抑郁症研究过程中,涉及了多种行为学检测技术<sup>[5]</sup>。与抑郁症直接相关的行为学监测指标,包括强迫游泳实验(*forced swim test*)、悬尾试验(*tail*

\*通讯作者

suspension test)等;与探究相关的实验包括开场实验(open field test)、Y迷宫实验(Y maze spontaneous altern)等;与焦虑相关的实验包括高架十字迷宫实验(elevated plus maze)、高架O迷宫实验(elevated zero maze)、爬梯实验(staircase test)等。由于在建立动物模型时,啮齿类动物也会出现像患者一样的欣快感缺失,因此,检测行为学指标还包括和摄食相关的实验,如新奇抑制摄食实验(novelty suppressed feeding test)、蔗糖饮水试验(sucrose preference test)等。在近几年的抑郁症发病机制研究中,科学家们还发现,抑郁症患者通常患有学习记忆功能障碍。因此与学习记忆能力检测相关的行为学也会在抑郁症研究用到,如经典的Morris水迷宫实验(Morris water maze)、条件位置偏爱实验等(conditioned place preference)。下面,我们将对其中部分实验进行详细的介绍。

### 1.1 强迫游泳实验(forced swim test, FST)

强迫游泳实验是一个经典的抑郁状态评价实验。以小鼠为例,当小鼠被迫进入一个有限空间游泳时,开始是呈现奋力游泳,企图逃脱的状态,而很快就变成漂浮不动的状态,仅将口鼻露出水面进行呼吸,四肢偶尔滑动以保持身体不下沉,这种状态叫做不动状态,其本质是小鼠放弃了逃脱的希望,也称为行为绝望,抗抑郁药可显著减少动物的不动时间。

实验期间保持安静,光线无明显变化,室温保持在20~25℃。该实验在装有10cm水(23±2℃)的透明有机玻璃圆筒(30cm高×18cm直径)中进行。实验开始时将小鼠放入水中,持续时间为6min,视频记录整个过程。在测试结束时,将动物从水中移出并放回笼中,双盲记录每只小鼠后4min的累积不动时间<sup>[6]</sup>。

### 1.2 开场实验(open field test, OFT)

开场实验是检测小鼠探索性的实验手段,以小鼠为例,实验用开场箱规格为50cm×50cm×35cm,划分出的中心场为25cm×25cm。实验期间保持安静,光线无变化,室温保持在20~25℃。实验时,每次将小鼠放置在开场箱正中央后立即利用动物轨迹行为分析系统采集5min的小鼠运动轨迹。整体实验结束后通过软件计算出各只小鼠运动总距离(单位:cm)及中心场停留时间比率(单位:%)。当小鼠处于抑郁状态时,自主运动减少,表现为相同时间内移动总距离减少。而进入中心区域的总次数和总时间可以用来评价小鼠的焦虑样行为<sup>[7]</sup>,小鼠焦虑时进入中心场总次数和总

时间均会有所降低,而在进行具有镇静作用的药物研究时,也会出现小鼠的自发运动减少。

### 1.3 高架十字迷宫实验(elevated plus-maze test, EPM)

高架十字迷宫实验利用了鼠类对新环境的探究心理,以小鼠为例,将小鼠放入迷宫后,小鼠会主动探究开臂,同时对高悬的敞开臂环境产生畏惧心理,而抗焦虑药会增进小鼠进入开臂的时间及百分比。

小鼠高架十字迷宫(EPM),由两个相对的敞开臂(open arms, 35cm×6cm×30cm)和两个相对的闭臂(enclosed arms, 35cm×6cm×30cm)组成,闭臂上部未封顶,迷宫中央为6cm×6cm的开阔部,迷宫离地面50cm。实验于每天13:00~18:00安静环境下进行。给药后60min,将每只小鼠放入一个60cm×60cm×35cm塑料盒中,让其熟悉环境5min后再置于迷宫中央,记录5min内小鼠分别进入开臂和闭臂的次数以及在两臂内的滞留时间,计算各组小鼠进入开臂的次数(open-arm entries, OE)和在开臂停留时间(open-arm time, OT)分别占进入各臂总次数和两臂停留总时间的百分比(OE%和OT%)<sup>[8]</sup>。

### 1.4 爬梯实验(staircase test, ST)

爬梯同样是观察动物焦虑状态的一种检测手段。在小鼠爬梯实验中,小鼠站立是指小鼠出于警惕性,前爪腾空或(一只前爪或两只前爪)扒靠在爬梯内壁向上或向前嗅探,判断是否有危险的行为。小鼠爬梯次数可以判断其运动活力,爬梯是指小鼠在爬梯实验过程中,四肢均爬上一级台阶的情况,爬下一级不做计算。实验期间保持安静,光线无变化,室温保持在20~25℃,提前清洁及干燥透明爬梯,消除多余气味。实验开始时将C57小鼠头部朝向爬梯放置于最下层靠近内壁中间的位置,开始计时,记录每只小鼠的站立及爬梯次数<sup>[9]</sup>。

### 1.5 新奇抑制摄食实验(Novelty suppressed feeding test, NSF test)

抑郁后动物对食物的摄入兴趣降低、食欲下降。新奇抑制摄食实验可用来观察动物欣快感缺失的变化<sup>[6, 10]</sup>。以小鼠为例,剥夺食物48小时后,将小鼠分别放置在他们从未探索过的开放式竞技场(40cm×40cm×30cm)的角落,中心有3粒实验食物,测量开始进食的潜伏期,然后将小鼠放回原饲养笼子内,在其中放入3颗食物,再次测量小鼠在饲养笼内的摄食潜伏时间以及在5分钟内食用的食物量(mg)/小鼠体重(g)。

### 1.6 Morris水迷宫实验(Morris water maze)

Morris水迷宫实验是经典的对空间学习记忆能力进行评价的技术手段,可以用于大鼠或小鼠。大小鼠使用的水迷宫大小有所不同,如大鼠的迷宫直径为210cm,小鼠的直径为122cm。两者的侧面均为51cm高,带有不反射光线的内表面。对于白色鼠,较大迷宫的内部被涂成黑色,而对于黑色鼠,迷宫的内部被涂成白色。同样,水中的目标平台也有所不同,大鼠的平台通常为直径10cm,小鼠为5~10cm不等,平台越小,测试难度越高。水温一般为19~22℃。

实验过程根据模型动物的学习记忆损伤程度不同略有不同,其中一种做法是,实验时学习期为5天,每天进行4次。每两次之间的间隔时间可以在15秒到15分钟之间。从远端象限入水,如果动物未能在指定的时间内找到平台,通常将其拾起并放置在平台上约15秒后再次进行学习。在学习结束24小时后,进行测试,记录动物寻找平台的潜伏期、路径、速度等参数,并分析动物寻找平台的搜寻轨迹<sup>[11]</sup>。

## 2 行为学实验影响因素

在行为学检测中,除检测流程、技术参数外,还有很多因素会对实验结果产生影响,也应得到足够的重视。

### 2.1 环境因素

由于啮齿类动物对外界信息比较敏感,因此,外界环境对测试会产生较大的影响。首先,在测试前,实验动物的居住环境要均一稳定,包括每个居住笼内的动物数量,均尽量保证均一,进行操作时,对动物轻拿轻放,任何环境的突然改变均可对动物产生应激刺激,影响行为学的检测。在建立慢性应激致抑郁小鼠模型时,单笼居住、垫料潮湿、无垫料、彻夜光照、更换同笼伙伴等均会造成额外应激<sup>[12]</sup>。在测试过程中对光线、声音的控制要尤其注意。由于啮齿类动物会留下尿液及粪便在测试仪器中,所产生的气味信号会对接下来的测试产生影响,因此每只动物测试后的清理也十分重要。部分实验检测,由于受到啮齿类动物的活跃性的影响,还要选择活跃度适中的时间段进行行为测试,避免过度活跃或者活跃度下降对行为学测试产生影响。

### 2.2 种属、性别及年龄等因素

在行为学检测中,不同的动物选择,对行为学检测结果均可能产生影响,行为学实验的流程也可能会

出现不同的变化。例如,在强迫游泳实验中为了保证稳定的不动基线时间,大鼠需要提前24小时进入水中,进行预游泳,而小鼠则无需预先游泳,就足以确保稳定的不动基线时间<sup>[13]</sup>。在大鼠中,不同品系之间观察到基线稳定性的差异超过十倍,例如Wistar-Kyoto大鼠稳定的不动基线时间比SpragueDawley大鼠的长得多,并且攀爬行为明显降低。而在高架十字迷宫实验中,实验人员更多的会选择雄鼠进行实验,雌鼠由于发情周期时雌激素的波动,会影响实验鼠在开臂的停留时间和次数<sup>[8]</sup>。同样的情况也出现在迷宫实验中<sup>[14]</sup>,在水迷宫中,雌性鼠的优势较小,而在放射状迷宫中,雄性的优势较小。年龄对实验也有一定的影响,在学习记忆实验中最为明显,衰老大鼠本身就存在着明显的学习记忆障碍,自然衰老大鼠是一个经典的学习记忆障碍模型<sup>[15]</sup>。因此,在开始设计行为学实验前,审慎地选择实验动物,并选择适当的实验流程是十分必要的。

## 3 未来发展

随着抑郁症的高发,临床对研究抑郁症病因、开发新的药物的需求增多,啮齿类动物的行为学研究会持续受到关注,如何能够准确地评价抑郁症动物的行为学改变越来越受到重视。行为学实验从诞生时依靠人眼观察、手动记录,发展到了采用计算机轨迹观察、视频记录,实验的准确度得到了提升。随着计算机技术的发展,动物行为学观察也将进入新的时代。三维成像技术可以大大提高动物行为学改变的捕捉精度,特别在识别强迫游泳不动状态等容易被主观意愿影响的行为学实验中,可以提高测试的准确度,为抑郁症研究提供更多的帮助。

## 参考文献

- [1]GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet. 2018, 392(10159): 1789–1858.
- [2]Kennis M, Gerritsen L, van Dalen M, Williams A, Cuijpers P, Bockting C. Prospective biomarkers of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. Mol Psychiatry. 2020, 25(2): 321–338.



- [3]牛雅娟.《中国抑郁障碍防治指南》药物治疗解读[J].临床药物治疗杂志,2018,16(05):6-8.
- [4]Gururajan A, Reif A, Cryan JF, Slattery DA. The future of rodent models in depression research. *Nat Rev Neurosci* 2019, 20(11): 686-701.
- [5]Towers AE, York JM, Baynard T, Gainey SJ, Freund GG. Mouse Testing Methods in Psychoneuroimmunology 2.0: Measuring Behavioral Responses. *Methods Mol Biol*. 2018(1781): 221-258.
- [6]Li D, Zheng J, Wang M, et al. Changes of TSPO-mediated mitophagy signaling pathway in learned helplessness mice. *Psychiatry Res*. 2016(245): 141-147.
- [7]Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003, 463(1-3): 3-33.
- [8]Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007, 2(2): 322-328.
- [9]Jacobson LH, Bettler B, Kaupmann K, Cryan JF. Behavioral evaluation of mice deficient in GABA(B(1)) receptor isoforms in tests of unconditioned anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007, 190(4): 541-553.
- [10]Comai S, De Gregorio D, Posa L, Ochoa-Sanchez R, Bedini A, Gobbi G. Dysfunction of serotonergic activity

- and emotional responses across the light-dark cycle in mice lacking MT2 receptors. *J Pineal Res*. 2020: e12653.
- [11]Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [12]Liu Y, Yang N, Hao W, et al. Dynamic proteomic analysis of protein expression profiles in whole brain of Balb/C mice subjected to unpredictable chronic mild stress: implications for depressive disorders and future therapies. *Neurochem Int* 2011, 58(8): 904-913.
- [13]Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012, 7(6): 1009-1014.
- [14]Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 28(8): 811-825.
- [15]Liu Y, Aisa HA, Ji C, Yang N, Zhu H, Zuo P. Effects of Gossypium herbaceum extract administration on the learning and memory function in the naturally aged rats: neuronal niche improvement. *J Alzheimers Dis*, 2012, 31(1): 101-111.

编校 旦增克祖

(上接9页)

### 3 讨论

本试验中引进的脱毒马铃薯四个品种中,与当地对照品种和新品系 200905 相比都能提前成熟,产量最高属当地对照品种,商品薯率最低,其次是脱毒马铃薯新品 200905 商品薯率排三,产量第三是中薯 18 号,商品薯率最高。综合试验分析,本试验综合性状表现较好的有新品系 200905 和中薯 18 两个品种,其单株薯重、大薯率、商品薯率均高于对照当地品种。

当年,西藏年平均气温 5.2℃,较常年偏高 0.5℃,年降水量为 394.6 毫米,较常年偏少 55.4 毫米<sup>[5]</sup>,主要农区农业气象条件对农作物生长的影响总体上弊略大于利。日喀则市出现阶段性干旱、病虫害,造成青稞、马铃薯作物产量减产。日喀则市拉孜县 6~7 月前期因降水少,影响植株生长,参试品种均表现提前开花,秋季后期因早霜影响,所有品种不同程度霜害,影响产量。

### 参考文献

- [1]杨利,扎西普尺,杨喜珍,等.日喀则市马铃薯新品种引种比较试验[J].中国马铃薯,2016,30(3):129-134.
- [2]谢婉,田发益,赵芳玉,等.西藏日喀则地区马铃薯地方资源评价[J].贵州农业科学,2015,43(11):17-22.
- [3]杨丹,李淑举,王素华,等.中薯系列马铃薯新品种比较试验[J].作物研究,2018,32(01):18-22.
- [4]谢婉,扎西普尺,杨喜珍,等.西藏马铃薯育种现状及建议[J].西藏科技,2016(11):3-44,16.
- [5]曾钰婷,许娟妮,祁驰恒,等.2015年西藏马铃薯产业现状、存在问题及建议[C].中国作物学会马铃薯专业委员会,河北省农业厅,张家口市人民政府.2016年中国马铃薯大会论文集,2016:118-120.

编校 旦增克祖