

## · 研究报告 ·

# Morris 水迷宫测评方法的改进及对快速老化痴呆小鼠 SAMP8 认知功能的再评价\*

刘金凤<sup>1</sup> 聂 坤<sup>2</sup> 栗振杰<sup>1</sup> 徐思思<sup>1</sup> 张 莹<sup>1</sup> 孙金平<sup>1</sup> 张雪竹<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-745X(2013)01-0005-04

**【摘要】**目的 改进 Morris 水迷宫的测评方法, 使之更适于评价小鼠的认知功能, 并对快速老化痴呆小鼠 SAMP8 的认知功能进行再评价。方法 以 SAMP8 组及其正常同源对照小鼠 SAMR1 为研究对象, 优化 Morris 水迷宫的测评条件, 研究入水点位置、每日游泳次数、试验次序、颜色等对其空间参考记忆能力的影响。结果 SAMP8 小鼠在各部分试验的逃避潜伏期明显长于 SAMR1 小鼠; SAMP8 小鼠比 SAMR1 小鼠的游泳速度慢, 自身游泳速度在试验过程中基本保持稳定; 在改变试验方法的第 1 日, 两组潜伏期无差异; SAMP8 小鼠的搜索策略多为随机式和边缘式, SAMR1 小鼠多为直线式和趋向式。结论 将探索试验穿插于隐蔽和反向平台试验中更能有效的检验动物的短时学习记忆能力; 不能把改变试验方法后第 1 日的成绩作为评价小鼠学习记忆能力的标准; 每日 4~5 次的训练次数不会影响小鼠的游泳速度; SAMP8 小鼠是研究年龄相关学习和记忆缺陷较好的动物模型。

**【关键词】** Morris 水迷宫 阿尔兹海默症 方法 记忆

**Improvements of Morris Water Maze Evaluation Method and Re-evaluation of the Rapid Aging Dementia SAMP8 Cognitive Function in Mice** LIU Jin-feng, NIE Kun, LI Zhen-jie, et al. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**【Abstract】Objective:** To improve evaluation of the Morris water maze, which make it more suitable for the evaluation of the cognitive function of mice. And re-evaluate the cognitive function of the rapid aging dementia mice the SAMP8 (senescence accelerated mouse prone 8). **Methods:** The SAMP8 group and its homologous normal control mice SAMR1 (senescence accelerated mouse resistant 1) were taken as the research object, and the evaluation of the Morris water maze conditions was optimized. The effect of the mice spatial reference memory capacity by into water point position, the number of daily swim, test order, color and ect were researched. **Results:** The SAMP8 mice escape latency in each part of the test significantly was longer than SAMR1 mice. SAMP8 mice swam slower than SAMR1 mice. SAMP8 mice their own swimming speed remained stable during the test. Groups latency show no difference on the first day of change the test method. The SAMP8 mice search strategy were mostly random type and edge-type while the SAMR1 mice were linear type and tend type. **Conclusion:** Explore trials interspersed in hidden and reverse platform test is more effective in test mice short-term learning memory abilities. The scores of the first day after changing test method can not be the standard of evaluate the learning and memory abilities of mice. 4~5 times a day, the number of training does not affect the swimming speed of the mice. SAMP8 mice is a good animal model to study age-related learning and memory deficits.

**【Key words】** Morris water maze; Alzheimer's disease; Method; Memory

Morris 水迷宫(MWM)近年来在行为神经科学研究中得到广泛应用。该方法通过对试验中得到的参数进行分析, 从而对影响学习记忆效果的相关药物效果或疾病相关模型的判断进行评价。SAMP8 小鼠是研究衰老和老年性痴呆的理想模型<sup>[1]</sup>, 相对于其他试验方法, Morris 水迷宫则为研究试验首选<sup>[2]</sup>。本研究在经典

的试验设计基础上, 改变试验方法, 旨在提高 Morris 水迷宫对学习记忆能力的检测效率, 优化试验流程, 为以后的研究提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取健康雄性 8 月龄 SAMP8 及其正常同源对照小鼠 SAMR1, 各 8 只, 均饲养在完全相同的条件下, 环境温度 (23±2) °C, 相对湿度 50%~60%, 自动控制光照循环 12 h 光照/12 h 黑暗, 每周更换鼠笼

\* 基金项目: 国家自然科学基金课题(81202739, 81072882); 教育部博士点课题(20111210120004); 天津市教委课题(20080217)

垫料 1 次,自由取食和饮水。动物由天津中医药大学第一附属医院试验动物中心提供。

1.2 仪器 Morris 水迷宫由圆形水池、圆柱形平台和记录系统 3 部分组成。水池直径 90 cm,高 50 cm,池壁及池底涂成黑色。试验开始前,向水池注水 30 cm 深,水温保持在 $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。随意将水池分为 4 个象限;将无色透明的平台(直径 9 cm,高 28 cm)置于任一象限中央,平台表面没于水下 1 cm。摄像头置于水池中央的上方约 2 m 处,自动采集动物游泳轨迹图像,所收集信号直接输入计算机,由图像自动采集和分析系统(中国医学科学院药物研究所提供)自动分析和处理。

### 1.3 Morris 水迷宫试验

1.3.1 隐蔽平台试验 将平台置于第 3 象限中央,平台中点距池壁 22.5 cm,且位置保持不变。训练时将动物面朝池壁轻轻放入水中,记录小鼠从入水至找到平台的游泳轨迹及时间(逃避潜伏期)等。试验前 1 d,让小鼠在迷宫中自由游泳以熟悉环境,上下午各 1 次,每次时间为 60 s。如果 60 s 内找不到平台,由试验者将小鼠放到平台上 10 s 以熟悉环境。正式试验过程中,小鼠如果在 60 s 内找不到平台也将其放在平台上 10 s,并将潜伏期记为 60 s。每次训练后用干毛巾将小鼠擦干,以防止低体温造成的应激。此试验于第 1~5 日进行,上下午各两次,且入水点随机改变,但同 1 d 内上下午入水点的次序相同。

1.3.2 反向试验 将平台置于第 1 象限中央,平台中点距池壁 22.5 cm,其他条件及方法同隐蔽平台试验。此试验于第 6~8 日进行。

1.3.3 空间探索试验 此试验穿插于隐蔽平台试验和反向试验间歇进行。即每天的隐蔽和反向试验结束后便撤除平台,入水点选取第 2 象限,游泳时间为 60 s,记录小鼠在原平台处停留时间以及穿越次数等。此部分试验于第 2~8 日进行。

1.3.4 可视平台试验 为排除感觉、视觉或运动功能障碍对空间学习记忆的影响,第 9 日进行可视平台试验。此时平台高出水面 1 cm,并将平台表面包裹成绿色,其余操作同隐蔽平台试验,上下午各 1 次。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件。计量数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,隐蔽平台试验、反向试验、探索试验的数据用单个重复测量因素的方差分析;可视平台试验和组间同 1 d 数据比较时用  $t$  检验;搜索策略用秩和检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 隐蔽平台试验结果 见表 1~表 2。由表可见, SAMR1 小鼠的逃避潜伏期明显低于 SAMP8 小鼠( $P<0.01$ );两组游泳的平均速度比较,差异没有统计学意义( $P>0.05$ ),说明两组小鼠的适应能力和体能情况基本相同,可排除由于速度产生的误差;从搜索策略的结

果发现,两组之间有差异( $P<0.05$ )。

表 1 各组小鼠在隐蔽平台试验中逃避潜伏期比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日
SAMR1	8	13.39±3.49	16.00±5.86	13.07±4.08	20.61±5.94	19.48±11.05
SAMP8	8	42.27±11.39**	36.70±14.57**	37.66±14.39**	33.60±6.90*	52.49±6.66**

与 SAMR1 组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。下同。

表 2 各组小鼠在隐蔽平台试验中平均速度比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日
SAMR1	8	7.63±0.75	7.41±0.35	8.06±0.72	8.35±0.63	7.87±1.28
SAMP8	8	7.79±1.33	7.86±1.60	8.13±1.33	7.16±1.49*	7.93±2.16

2.2 反向平台试验结果 见表 3~表 4。结果显示 SAMR1 小鼠的逃避潜伏期在第 6 日与 SAMP8 小鼠无差异,第 7、8 日明显低于 SAMP8 小鼠( $P<0.05$ ),说明试验方法的改变对两组小鼠的影响一样, SAMR1 小鼠在后 2 d 成绩转好,提示其学习能力更强。从游泳速度结果可以看出, SAMR1 小鼠的游泳速度快于 SAMP8 小鼠,两组分别与隐蔽试验时速度比较得知, SAMR1 组较之前变快( $P<0.05$ ), SAMP8 组较之前无显著差异,说明 SAMR1 小鼠的适应能力更强;从搜索策略看,两组之间有差异( $P<0.05$ )。

表 3 各组小鼠在反向平台试验中逃避潜伏期比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	第 6 日	第 7 日	第 8 日
SAMR1	8	43.80±9.35	28.23±9.62	28.89±13.37
SAMP8	8	44.93±14.24	49.79±10.90**	33.39±10.66*

表 4 各组小鼠在反向和可视平台试验中平均速度比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	第 6 日	第 7 日	第 8 日	第 9 日(可视)
SAMR1	8	10.04±0.88	9.45±1.47	9.23±1.10	9.09±1.06
SAMP8	8	7.85±2.20*	7.91±2.00*	7.70±1.76*	7.05±1.50*

2.3 探索试验结果 表 5~表 8 结果显示,与 SAMR1 小鼠比较, SAMP8 小鼠的第 1 次穿越时间明显延长于 SAMR1 组,且穿越次数较少,游泳速度较慢,在原平台象限和中环区域的游泳距离与总路程之比也小于 SAMR1 组( $P<0.05$ ),提示 SAMP8 小鼠的记忆保持能力明显低于 SAMR1 小鼠。

表 5 各组小鼠在探索试验中第 1 次穿越平台时间比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日	第 7 日	第 8 日
SAMR1	8	10.39±8.22	13.21±11.39	13.90±14.51	16.75±18.17	12.60±9.58	16.65±18.72
SAMP8	8	35.29±25.94*	23.82±24.04*	37.72±20.06*	36.02±24.05*	21.16±18.25*	39.12±20.27*

表 6 各组小鼠在探索试验中在原平台象限路程/总路程比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日	第 7 日	第 8 日
SAMR1	8	0.33±0.07	0.36±0.07	0.38±0.19	0.41±0.09	0.22±0.06	0.23±0.08
SAMP8	8	0.28±0.11	0.25±0.11*	0.23±0.06*	0.24±0.13*	0.23±0.04	0.20±0.10

表 7 各组小鼠在探索试验中在中环区域路程/总路程比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日	第 7 日	第 8 日
SAMR1	8	0.08±0.02	0.09±0.01	0.08±0.01	0.06±0.03	0.10±0.02	0.08±0.01
SAMP8	8	0.06±0.03	0.06±0.04	0.06±0.03	0.06±0.04	0.07±0.05	0.06±0.04

表 8 各组小鼠在探索试验中平均速度比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 6 日	第 5 日
SAMR1	8	10.06±1.00	10.35±1.00	9.92±0.89	10.09±1.30	10.45±1.30	11.10±1.39
SAMP8	8	7.30±1.61*	8.47±1.56*	7.67±1.76*	8.09±3.04*	8.25±2.69*	7.64±2.13*

2.4 可视平台试验结果 两组小鼠逃避潜伏期和搜索策略的比较差异均无统计学意义,提示动物在感觉、视觉或运动功能方面的差异未对其空间学习记忆产生明显的影响。

### 3 讨 论

海马是记忆形成的重要结构<sup>[3-4]</sup>,其突触的可塑性和长时程增强效应是空间学习和记忆的神经功能基础<sup>[5]</sup>,神经元突触的变化,直接影响水迷宫学习记忆成绩<sup>[6]</sup>。SAMP8 小鼠脑内的神经病理学变化能够较好地模拟 AD 以及老化脑的病理变化。在 SAMP8 小鼠脑中,微管蛋白  $\alpha$ -3、 $\alpha$ -1A、 $\beta$ -5 和肌动蛋白表达水平下降<sup>[7]</sup>,导致皮质萎缩、轴突发育不良、树突棘减少、囊泡运输障碍,引发其学习记忆障碍<sup>[8]</sup>。海绵样变性是 SAMP8 小鼠脑内发现的最早的形态学变化之一,尤其是在大细胞网状结构(MGRF)、脑桥网状结构、巨细胞网状神经核的神经纤维内可以看到大小不等的空泡。MGRF 有与学习记忆相关的功能,并且是脑内学习记忆系统的一部分,在被动回避反应中,学习记忆能力随着在 MGRF 空泡化面积的扩大而不断恶化<sup>[9]</sup>。试验利用啮齿类动物天性会水又怕水的特性作为驱动力,迫使动物找到平台避水上岸,并通过多次训练,学会利用环境标记物与隐匿平台关系来判断平台位置,形成稳定的空间认识,这种空间参考记忆进入意识系统,其储存与提取涉及边缘系统(海马)、纹状体、基底前脑、小脑和其他的神经区域,其记忆过程属于陈述性记忆<sup>[5]</sup>。Morris 水迷宫广泛用于啮齿类动物的视觉相关的空间记忆和工作记忆的检测中,但对于检测动物长时程记忆的可靠性仍存在争议。

很多研究者在传统方法的基础上进行了很多改进,如 Markowska<sup>[10]</sup>发现在动物学习阶段将平台设计为间歇地出现,可更加有效地检测其空间参考记忆能力。Arteni<sup>[11]</sup>在水迷宫中采用了两个隐藏平台,轮流升起不同平台的方法还可以检测动物的工作记忆。本试验采取了较为经典的试验流程。有研究发现重复 MWM 定位航行训练能够增强动物的空间学习能力,但并不影响动物的空间记忆能力,定位航行试验中每天至少训练 3 次(除目标象限外的其他 3 个象限分别作为 1 次入水点),因为从不同象限入水以及不同的入

水次序对 MWM 检测动物的记忆力都是有影响的,且从目标象限入水,其找到平台的随机性增大,而从远离目标象限入水,其找到平台随机性减小,应把远离目标的象限作为第 1 次入水点<sup>[12-13]</sup>。本试验设计将空间探索试验穿插于隐蔽和反向平台试验中进行,旨在更好的测量动物的学习能力以及短时间内记忆的保持能力。在训练量上舍弃了目标象限的入水点,每日 4~5 次,从游泳速度结果分析上看小鼠在试验过程中速度基本保持稳定,未由于体能原因产生误差。动物的游泳时间直接关系到统计结果,试验者大都根据自己的经验确定,有统计结果显示大鼠在 60~120 s 之间找到平台次数的比例只占其找到平台次数的 5%,在统计结果上只是小概率事件,所以最大潜伏期取 60 s 可以节约试验时间<sup>[14]</sup>。但是由于动物种类不同,体质不同,年龄不同等对最大潜伏期的要求也不尽相同,如何避免最大潜伏期对最终统计结果的影响还有待进一步研究。在试验条件上,有研究指出在水中加入脱脂奶粉或无毒染料使之变浑浊<sup>[15]</sup>,但近期文献很少提及,除非出于图像监视目的的需要。因为小鼠在游泳时头上仰,其视野朝上,无论水是否透明,它都不能看到水下平台。再者,老年体弱动物在游泳过程中可能会溺水,加入水的物质可能增大小鼠游泳时的阻力。很多科学试验表明,老鼠是色盲且弱视的动物,其二色视觉只能分辨紫外线偏蓝的颜色(波长为 359 nm)和绿色(波长为 510 nm)<sup>[16-17]</sup>,且老鼠的视觉 88% 感应的是绿色,只有 12% 能感应紫外线偏蓝的颜色<sup>[18]</sup>。所以在可视平台试验中应将平台包成绿色或蓝色,而不是之前试验者提到的黄色。

通过数据分析可以得知 SAMP8 小鼠比 SAMR1 小鼠学习能力低下,且在反向平台试验和探索试验中表现更为明显;小鼠的游泳速度会在试验几天后达到高峰并维持稳定,长时间的训练(4~5 次/d)没有影响小鼠的游泳速度;在改变试验方法的第 1 日,SAMR1 和 SAMP8 小鼠学习适应能力基本一样,所以不可将改变试验方法后第 1 日的成绩列为评定学习记忆能力好坏的标准;SAMR1 小鼠的搜索策略多为直线式和趋向式,SAMP8 小鼠多为随机式和边缘式,随试验进行均有所进步,SAMP8 小鼠比 SAMR1 小鼠进步慢。影响试验结果的因素很多,Morris 水迷宫是一种被动的、厌恶式的条件反应,尽管合适的水温可以减少动物的不适与压力,但对动物来说仍是负面刺激;在反向空间任务中,仅将平台移到对侧象限但不改变空间线索的位置并不能确切地称为反向,因为当平台移动位置时,远处房间内线索的同中心空间关系并未改变,动物需要学习新的平台位置和完全重排线索关系;评价指标过于纷繁复杂,之间互相影响,每个指标反映的行为性质需要深入探讨,解释难度较大。(下转第 22 页)



化,引起 VSMC 增殖;但在后期,TGF- $\beta$  可以抑制 VSMC 的增殖<sup>[1]</sup>。

欣舒注射液由人参、麦冬、川芎组成。组方中人参大补元气、补脾益肺、生津安神;药理研究表明,人参中人参皂苷能保护血管免受自由基损伤,这可能是它激活血管内皮细胞 NOS 释放 NO 的结果<sup>[2]</sup>。人参、黄芪及其水提物可以通过增加 VSMC 中 NO 含量而防治 AS 的发生发展<sup>[3]</sup>。组方中麦冬具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦的功效。麦冬有负性频率和增加心肌营养血流量的作用,故在心肌缺血时,麦冬既能降低心肌耗氧量,同时又能增加心肌氧的供应<sup>[4]</sup>。组方中川芎具有活血行气、祛风止痛的功效。川芎含挥发油、生物碱(如川芎嗪等)、酚性物质(如阿魏酸等),川芎嗪对血管内皮细胞有保护作用,可抑制血管平滑肌细胞增殖<sup>[5]</sup>。人参、麦冬、川芎合用,可收益气养阴、活血通络之效。

本实验中,腹主动脉球囊损伤后,腹主动脉 bFGF、TGF- $\beta_1$  表达升高,可能参与再狭窄的发生,VEGF 可

能没有参与再狭窄的发生,但可能通过促进血管内皮修复,防止再狭窄的发展。欣舒注射液可增加腹主动脉 VEGF 表达,降低 bFGF、TGF- $\beta_1$  表达。欣舒注射液具有防治 PCI 术后再狭窄的作用,这可能与其有增加腹主动脉 VEGF 表达,降低 bFGF、TGF- $\beta_1$  表达的作用有关。

#### 参 考 文 献

- [1] 高伟,霍勇,朱国英,等.再狭窄的细胞和分子生物学[J].中国介入心脏病学杂志,1997,5(2):85-89.
- [2] Kim H. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical-induced injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 189:670.
- [3] 靳朝东.通过黄芪、人参和黄芪提取物的处理增加血管平滑肌中 NO 含量和环磷鸟苷含量[J].中草药,1996,27:316.
- [4] 马清钧,王淑玲.临床实用中药学[M].江西:江西科学技术出版社,2002:120.
- [5] 田代华.实用中药辞典[M].北京:人民卫生出版社,2002:9.

(收稿日期 2012-12-01)

(上接第 7 页)

#### 参 考 文 献

- [1] 褚芹,于建春,潘建明,等.快速老化模型小鼠 SAMP8 行为学的增龄性变化[J].现代生物医学进展,2008,8(10):1801-1804.
- [2] 李子艳,马惠冬.阿尔茨海默病转基因小鼠的行为学检测方法[J].中国医药导报,2011,8(16):13-15.
- [3] Martin SJ,Clark RE. The rodent hippocampus and spatial memory:from synapses to systems[J]. Cell Mol Life Sci 2007, 64(4):401-431.
- [4] Bird CM,Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(3): 182-194.
- [5] 方松,余化霖.Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2010,30(4):321-326.
- [6] Malone JJ,Hanna S,Saporta S. Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory[J]. Pediatr Diabetes, 2008, 9(6):531-539.
- [7] Cristina DV,Marina G,Silvia GM,et al. Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes[J]. J Neurochem, 2009, 111(4):945-955.
- [8] 吴小强,王小珊.快速衰老小鼠 SAMP8 有关阿尔茨海默病基因蛋白研究进展[J].医学研究杂志,2011,40(11):9-12.
- [9] 马芹颖,强静,王铭维.快速老化小鼠 SAMP8 脑内神经病理学变化的研究进展[J].中国老年学杂志,2010,31(19):3858-3860.
- [10] Markowska AL, Spangler EL. Behavioral assessment of the senescence accelerated mouse (SAM P8 and R1), Physiol[J]. Behav, 1998, 64(1):15-26.
- [11] Arteni NS,Salgueiro J. Neonatal cerebral hypoxia ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat[J]. Brain Research, 2003, 973(2):171-178.
- [12] 罗小泉,骆利平,陈海芳,等. Morris 水迷宫检测大鼠记忆力方法的探讨[J].时珍国医国药,2010,21(10):2667-2669.
- [13] 郑红,往文,刘渝,等.重复 Morris 水迷宫训练提高大鼠空间学习能力却不影响空间记忆能力[J].神经解剖学杂志, 2007, 23(6):599-603.
- [14] 胡镜清,温泽淮,赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J].广州中医药大学学报,2000,17(2):117-119.
- [15] 陈娟,左红艳,王德文,等.不同波段电磁辐射对大鼠学习记忆的影响[J].中医行为医学科学,2006,15(12):1061-1063.
- [16] Govardovskii VI,Rohlich P,Szel A,et al. Immunocytochemical reactivity of rod and cone visual pigments in the sturgeon retina. Vis Neurosci, 1992, 8(6):531-537.
- [17] Radlwimmer FB,Yokoyama S. Genetic analyses of the green visual pigments of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) [J]. Gene, 1998, 218(1-2):103-109.
- [18] Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights[J]. Exp Biol, 2001, 204 (Pt 14):2439-2446.

(收稿日期 2012-10-10)