

不同平台对大鼠 Morris 水迷宫学习记忆能力的影响

张玉霞,李玥,宋涛

(中国科学院电工研究所生物电磁技术研究部,北京 100190)

摘要:目的 探讨水迷宫不同形状逃避平台对大鼠学习记忆能力的影响。方法 选用44只健康雄性SD大鼠,利用Morris水迷宫装置检测学习记忆能力,并观察两种不同形状(圆柱形和杆状)逃避平台对大鼠学习记忆的影响。结果 逃避潜伏期结果显示,两种平台潜伏期无统计学差异($P > 0.05$);空间探索实验结果也无统计学差异($P > 0.05$)。结论 两种形状逃避平台对大鼠学习记忆能力无明显影响。

关键词: Morris水迷宫;形状;平台;学习记忆

中图分类号:R338.64 文献标志码:A

Effects of different platforms on the learning and memory capability of rats in the Morris water maze

ZHANG Yuxia, LI Yue, SONG Tao

(Research Department of Biological Electromagnetic Technology, Institute of Electrical Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Objective To study the effects of platforms with different shapes on learning and memory capability using the Morris water maze. **Methods** Morris water maze was used to detect learning and memory capability of 44 healthy male SD rats. Two escape platforms with different shapes (cylinder or rod) were used to investigate the effects of different platforms on learning and memory capability. **Results** The data of escape latency showed no significant difference ($P > 0.05$). There was no significant difference in probe trial ($P > 0.05$). **Conclusion** Platforms with different shapes do not affect the learning and memory capability in Morris water maze.

Key words: Morris water maze; Shape; Platform; Learning and memory

水迷宫已成为评价动物学习记忆功能的重要手段,在神经科学领域广为应用^[1]。研究表明,水迷宫隐蔽平台与水迷宫水池的直径比值对动物学习记忆过程的形成有明显影响,大鼠和小鼠可能需要不同规格水池及平台^[2-3]。不同形状平台对动物学习记忆能力是否有影响,尚未见报道。目前常见平台有圆柱形和杆状两种,本实验比较两种平台对SD大鼠水迷宫学习记忆能力获得和保持的影响,为水迷宫规范使用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠44只,体质量200~250g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,根据随机数字表分为2组:圆柱平台组和杆状平台组,每组22只。各组动物分笼饲养,每笼4只,饲养期间动物自由进食饮水,动物房光照节律为

12 h:12 h。动物适应性饲养1周后开始实验。实验采取双盲法。

1.1.2 实验装置 Morris水迷宫装置由中国医学科学院药物研究所提供。整套装置包括圆形水池、隐蔽平台、摄像机和计算机。水池直径150 cm,高45 cm,池壁为黑色,水池周围由黑色窗帘遮挡,避免可视参照物影响。隐蔽平台直径9.5 cm。摄像机记录实验中动物运动轨迹,并传送到计算机,由计算机分析处理。

两种形状平台见图1。杆状平台顶部为一个圆形平板(尺寸同圆形平台),底部圆形面积增大,中间由一个细杆连接(图1左);圆柱平台为上下直径均一的圆柱体,底部面积增大以增加稳定性(图1右)。



图1 两种形状平台
Fig.1 Two platforms with different shapes

实验中将水注入水池,水面高于平台1.5 cm,加入墨水使水面模糊,水温保持在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。池壁平均分为4个假想点:东(E)、南(N)、西(W)、北(N),将水池分成4个象限。隐蔽平台置于西南(SW)象限。实验期间周围环境维持不变,保持安静,以免干扰动物学习。

1.2 方法 水迷宫行为测定分为隐蔽平台获得实验和空间探索实验两部分。两种平台实验流程相同,交替进行。

1.2.1 隐蔽平台获得实验 共进行5 d,每天每只大鼠进行4次训练。每次以半随机方式选择入水点(表1),将大鼠面向池壁,轻轻放入水中,开始计时。如果大鼠在120 s内能找到并爬上平台,则记录其爬上平台所需要的时间,即逃避潜伏期。若大鼠不能在120 s内找到平台,则由实验者将其引导至平台,逃避潜伏期记为120 s。大鼠登上平台后,让其在平台上停留15 s。4次训练结束后,用干毛巾将大鼠擦干并放回鼠笼。各组大鼠潜伏期用于统计分析。

表1 Morris水迷宫实验入水点

| 实验日 | 第1次 | 第2次 | 第3次 | 第4次 |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | N | E | SE | NW |
| 2 | SE | N | NW | E |
| 3 | NW | SE | E | N |
| 4 | E | NW | N | SE |
| 5 | N | SE | E | NW |

1.2.2 空间探索实验 实验第6天,将隐蔽平台撤掉。将动物从东北(NE)入水点放入水中,动物在水中游60 s,实验只进行1次。记录以下指标:动物第1次通过平台时间、动物通过平台次数、动物在原平台象限(目标象限)时间百分比、动物游泳总路程和平均速度。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0软件。隐蔽平台实验中的逃避潜伏期采用重复测量方差分析;空间探索实验中第1次通过平台时间、目标象限百分比、游泳总路程和平均速度采用 t 检验,动物通过平台次数采用秩和检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 隐蔽平台获得实验 两组大鼠在第1天训练时潜伏期分别为 (72.38 ± 5.37) s、 (68.60 ± 6.62) s,差异无统计学意义($P = 0.66$)。在训练过程中,两组大鼠潜伏期均明显缩短。在3 d后,潜伏期缩短到30 s左右,且比较稳定。重复测量方差分析显示,两组潜伏期差异无统计学意义($P = 0.85$)。见图2。

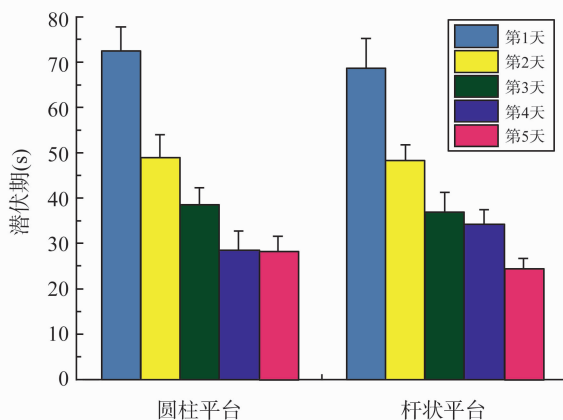


图2 动物水迷宫隐蔽平台获得实验潜伏期
Fig.2 Escape latency of rats in spatial acquisition

2.2 空间探索实验 t 检验结果显示,两种平台大鼠在空间探索实验中各检测指标差异无统计学意义(表2)。秩和检验结果也表明,大鼠通过平台次数差异无统计学意义($P = 0.78$)。

表2 动物空间探索实验结果

| 分组 | 目标象限时间百分比(%) | 动物第1次通过平台时间(s) | 游泳总路程(cm) | 平均速度(cm/s) | 通过平台次数 |
|----------|--------------|----------------|----------------|--------------|--------|
| 圆柱平台 | 29.66 ± 1.83 | 6.04 ± 2.57 | 782.86 ± 28.24 | 13.08 ± 0.47 | 0(0,1) |
| 杆状平台 | 26.64 ± 2.21 | 8.49 ± 3.26 | 740.61 ± 36.32 | 12.39 ± 0.61 | 0(0,1) |
| <i>P</i> | 0.30 | 0.56 | 0.36 | 0.37 | 0.78 |

注:通过平台次数用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,其余指标用 $\bar{x} \pm s_x$ 表示。

3 讨论

Morris 水迷宫实验作为一种经典的检测学习记忆能力的神经行为学方法,广泛用于各个领域,如动物模型评价^[4]、药物研究^[5]等。水迷宫操作简单,但仍受很多因素,如种属^[6-7]、性别^[8-11]、年龄^[12]、营养状态^[13]、训练方式^[14-15]等的影响,因此,不同学者进行研究时根据需要对水迷宫方法做了改进。

水迷宫中的隐蔽平台也是水迷宫装置中很关键的一个组成部分。有研究比较隐蔽平台直径分别为 5 cm 和 10 cm 时动物的学习记忆能力,发现尽管在经过训练后动物仍然能找到隐蔽平台,但是平台直径小明显延长了潜伏期,认为隐蔽平台直径与水池直径比值是水迷宫实验的一个影响因素^[3,16]。不同形状隐蔽平台对水迷宫影响的研究很少,目前市场上常见的平台为圆柱形和杆状,本实验比较这两种平台对大鼠水迷宫学习记忆能力的影响。

潜伏期是隐蔽平台实验中一个相对稳定的评价指标。研究发现,不同实验室之间水迷宫实验设备、训练方法、动物种类及周围环境等存在差异,但逃避潜伏期受这些因素影响较小,检测结果差别不大^[14]。隐蔽平台获得实验主要训练动物找到平台,各研究训练时长不尽相同。有的认为 3 d 即可^[3],有的训练次数较多^[17]。本实验中,潜伏期在训练 3 d 后达到稳定水平。第 1 天两组大鼠逃避潜伏期并无统计学差异,具有可比性。在随后的 5 d 训练中,两组大鼠逃避潜伏期均随着训练次数增加迅速缩短,表明两组大鼠均具有良好的学习记忆能力。两种平台组间比较无统计学差异,说明这两种平台对大鼠学习记忆能力的获得无显著影响。

空间探索实验是在一系列隐蔽平台实验训练后撤掉平台进行的,通过多次训练,动物学会利用环境等外界因素形成稳定的空间认识,反映大鼠的空间参考记忆能力^[18]。实验中可供分析的指标较多:第 1 次通过平台时间、目标象限所占时间百分比、穿越平台次数、游泳总路程、平均速度、原平台象限游泳距离与总距离之比、圆形域分析等,其结果很大程度

上与隐蔽平台训练模式有关,如 Markowska 等^[19]在动物学习阶段将平台设计为间歇地出现,能够更有效地检测其空间参考记忆能力。本研究采用前 5 种指标评价记忆能力。实验中大鼠第 1 次通过平台时间和通过平台次数两组均无统计学差异,考虑到通过平台次数具有很大的随机误差,因此本研究采用目标象限所占时间百分比来表示大鼠记忆能力,能够更准确反映大鼠记忆状态。结果显示,目标象限时间百分比也无统计学差异。两种不同形状的隐蔽平台对于 SD 大鼠水迷宫测试无明显影响,游泳总路程和平均速度也无明显差异。其中游泳速度还可以作为评判大鼠运动能力的一个指标,排除大鼠由于运动障碍导致的假阳性结果。

学习记忆是一个复杂的过程,许多脑区参与水迷宫学习记忆能力检测,其中报道最多的是海马。一般认为,海马的整合功能对于空间学习很重要,海马损伤时大鼠表现为明显的学习记忆障碍,但具体作用机制还不清楚。其他脑区,如纹状体、基底前脑、小脑以及一些新皮层脑区也参与到水迷宫测试过程中^[1]。不同脑区之间的协调合作对于学习记忆的获得非常关键。目前认为突触改变是水迷宫记忆形成的神经生物学基础,纹状体可能控制反应灵活性和运动,基底前脑提供海马与新皮层之间的胆碱能支配,小脑的主要作用可能是调控认知功能,新皮层主要影响学习中的规划和执行能力^[20]。

动物在水中游泳时,借助全身各种感觉,如嗅觉、触觉等进行定位参照,然后通过感觉传导通路将这些信息传送到大脑中进行信息整合,最终形成记忆,表现为找到水中隐蔽平台时间缩短。本研究所用平台差别在于:杆状平台比圆柱平台表面积小,大鼠在池中游泳接近平台时,可能所感受到的体表压力不同,传入脑中信息不同,最终导致水迷宫检测结果不同。从本实验结果来看,这种差异并未影响学习记忆能力的获得和维持。

参考文献:

- [1] D'Hooge R, De Deyn P P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. Brain

- Res Brain Res Rev, 2001, 36(1):60-90.
- [2] Ikonen S, Schmidt B H, Riekkinen P Jr. Characterization of learning and memory behaviors and the effects of metrifonate in the C57BL strain of mice[J]. Eur J Pharmacol, 1999, 372(2):117-126.
- [3] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848-858.
- [4] 王绪平, 芮登俊, 陈宇, 等. Morris 水迷宫实验评价血管性痴呆大鼠模型的学习记忆能力[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1):99-100.
- [5] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, et al. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin[J]. Neuropharmacology, 2014, 77:68-80.
- [6] Francis D D, Zaharia M D, Shanks N, et al. Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability[J]. Physiol Behav, 1995, 58(1):57-65.
- [7] 薛丹, 徐淑萍, 刘进修, 等. 水迷宫实验中三种品系小鼠学习记忆能力的比较[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(2):149-152.
- [8] Bucci D J, Chiba A A, Gallagher M. Spatial learning in male and female Long-Evans rats[J]. Behav Neurosci, 1995, 109(1):180-183.
- [9] 潘华, 李强. 论游泳训练对不同性别大鼠 Morris 水迷宫测试成绩的影响[J]. 西南师范大学学报:自然科学版, 2012, 37(10):163-167.
- [10] 陆彩霞, 罕园园, 仝品芬, 等. 水迷宫实验中不同性别树鼯学习记忆能力的比较[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5):74-76.
- [11] Ge J F, Qi C C, Qiao J P, et al. Sex differences in ICR mice in the Morris water maze task[J]. Physiol Res, 2013, 62(1):107-117.
- [12] Gower A J, Lamberty Y. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice[J]. Behav Brain Res, 1993, 57(2):163-173.
- [13] Bedi K S. Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life[J]. Physiol Behav, 1992, 51(5):1001-1007.
- [14] 边慧, 方松, 缪应达, 等. 两种不同训练时程方法对海马损伤大鼠水迷宫成绩的影响[J]. 动物学研究, 2012, 33(2):237-240.
- [15] Li G G. Short-term versus long-term water maze training effects on hippocampal neuronal synaptic plasticity in a rat model of senile dementia[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(9):929-932.
- [16] Williams M T, Moran M S, Vorhees C V. Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats[J]. Int J Dev Neurosci, 2004, 22(5-6):273-283.
- [17] Xu Z, Li J, Zhang F, et al. Working memory task decreases the survival of newly born neurons in hippocampus[J]. Neurobiol Learn Mem, 2011, 95(3):239-247.
- [18] 刘金凤, 聂坤, 栗振杰, 等. 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[J]. 中国中医急症, 2013, 22(1):5-7.
- [19] Markowska A L, Spangler E L, Ingram D K. Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAMP8 and R1)[J]. Physiol Behav, 1998, 64(1):15-26.
- [20] 王维刚, 周嘉斌, 朱明莉, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(一)——Morris 水迷宫实验在小鼠表型分析中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(1):8-14.

(编辑:周英智)

(上接第6页)

- [17] Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(12):723-738.
- [18] Yan S D, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease[J]. Nature, 1996, 382(6593):685-691.
- [19] Arancio O, Zhang H P, Chen X, et al. RAGE potentiates A β -induced perturbation of neuronal function in transgenic mice[J]. EMBO J, 2004, 23(20):4096-4105.
- [20] Blatnik M, Frizzell N, Thorpe S R, et al. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes; formation of S-(2-succinyl) cysteine, a novel chemical modification of protein and possible biomarker of mitochondrial stress[J]. Diabetes, 2008, 57(1):41-49.
- [21] Sabbagh M N, Agro A, Bell J, et al. PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease[J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2011, 25(3):206-212.

(编辑:张彩凤)