

专题介绍

小鼠动物实验方法系列专题(五)

小鼠是生命科学研究和医学研究的重要模式生物。随着小鼠基因组测序计划的完成,国际上明显加速了在这方面研究的投入和部署。从2005年起,美国、欧盟、加拿大等批准了一系列重大科学计划,开展基因工程小鼠的大规模研制,这些项目包括美国国立卫生院的小鼠基因剔除计划(KOMP, <http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout>)、欧盟第七框架的欧洲小鼠条件性剔除计划(EuCOMM, <http://www.eucomm.org>)和加拿大的北美小鼠条件性剔除计划(NorCOMM, <http://norcomm.phenogenomics.ca/index.htm>)等。中国也在2006年由科技部立项、上海南方模式生物研究中心牵头启动了中国的小鼠条件性基因敲除计划,该计划支持了国内几十个高校和研究所150种条件性基因敲除小鼠模型的建立。随着这些研究计划的快速进展,大量基因工程小鼠模型成为科学界的共同资源,这将对功能基因组和人类疾病治疗的机制以及新药的研发产生重大而深远的影响。为帮助读者能更好地利用这些小鼠资源开展研究,我们将从本期开始以专栏形式陆续刊登介绍小鼠动物实验技术的文章,也欢迎读者能够踊跃投稿,把自己手头正在做的小鼠动物实验技术方法和心得体会介绍给大家,一起来分享实验过程中的得失和快乐。

应用高架十字迷宫分析小鼠焦虑行为

王维刚^{1,2} 吴文婷³ 周嘉斌³ 严惠敏^{3*}¹同济大学化学系,上海 200092; ²同济大学生命科学与技术学院,上海 200092;³上海南方模式生物研究中心,上海 201203)

摘要 高架十字迷宫(the elevated plus maze, EPM)是研究小鼠焦虑行为的重要实验,本文介绍了EPM的原理和实验步骤。将小鼠置于开臂闭臂接合处,面向开臂,通过录像记录分析小鼠在EPM的表现。结果发现,两种小鼠均可成功完成实验,C57小鼠在EPM内较不活跃,闭臂滞留时间占总时间百分比显著高于129Sv小鼠。应用EPM可以简单直观地分析小鼠焦虑行为。

关键词 高架十字迷宫; 焦虑; 行为学; 小鼠

高架十字迷宫(the elevated plus maze, EPM)是评价啮齿类动物焦虑反应的实验方法,相较伤害性刺激所致小鼠焦虑行为检测(如电刺激、噪声刺激、饮食剥夺和暴露在捕食者气味等)^[1],该实验具有操作简单的优点,能直观反映小鼠的条件应答。EPM实验是由Handley和Mithani^[2]在高架Y型迷宫^[3]的基础上发展而来的。EPM由开臂(open arms)和闭臂(closed arms)各两条组成,呈十字形交叉,交叉部分为中央区,距地面有一定高度。其原理是:由于面对新事物(开臂)小鼠会产生好奇心去探究,而它们有嗜暗的天性(闭臂),两者之间发生探究与回避的冲

突行为,产生焦虑心理^[4]。整个迷宫距离地面的高度相当于人类站在悬崖边,易导致动物产生恐惧不安的心理。可以通过比较小鼠在开臂和闭臂内的滞留时间和路程来评价小鼠的焦虑行为。

焦虑症是严重影响人类健康的疾病。有文献报道^[5],根据美国精神疾病诊断和统计手册第四

收稿日期: 2011-03-16 接受日期: 2011-04-07

国家863计划(No.2008AA02Z126)和上海市科委科技创新行动计划(No.10140901400)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@hotmail.com

版(DSM-IV)的诊断标准,焦虑症的终身患病率达28.8%,焦虑症的发病年龄中值为11岁。而焦虑症治疗药物的研究与开发中都需要EPM评价小鼠的焦虑状态。EPM实验检测的是小鼠对于冲突产生的条件应答性的焦虑行为。而焦虑行为与小鼠大脑边缘区、海马、杏仁核、中缝背核等脑区密切相关^[6,7]。这些脑区在焦虑症的发病中有着重要的作用。单胺类神经递质,包括肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺,在哺乳动物中枢神经系统中起到情绪调节的作用^[8],单胺类神经递质平衡紊乱是焦虑症发病原因之一^[9,10]。

EPM实验在药物开发和研究中得到广泛的应用:主要用于苯二氮卓类药物(benzodiazepine-related compounds)的抗焦虑作用研究^[11,12]及筛选具有抗焦虑作用的新药,也被用于研究(精神性)药物滥用的影响^[13]及激素的功能^[14];应激对生殖、衰老、妊娠的影响^[15]等。抗焦虑药主要选择性地抑制边缘系统的海马、杏仁核^[16,17],产生抗焦虑作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

高架十字迷宫动物行为学分析系统(上海移数信息科技有限公司)主要由两条开臂和两条闭臂组成,互相垂直呈“十”字交叉。每条臂长28 cm,宽5.8 cm,闭臂有高15.5 cm的围墙,开臂与闭臂接合处上方安置有摄像机,并与记录系统相联接,记录小鼠在EPM中的行为。整个迷宫置于距地面55 cm的支架上。EPM系统示意图见图1。实验数据由EPM记录和采集相关软件分析记录。

1.2 实验动物

健康C57BL/6(下文简称C57)小鼠22只,129Sv小鼠20只,购自斯莱克公司,均为雄性,10周龄,体重23 g~28 g。小鼠饲养在恒温(21 °C~22 °C)房间,每隔12 h光暗循环。实验选取的时间段为9:00~12:00,非实验期间小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。

1.3 实验步骤

首先:实验开始前确认EPM装置是清洁、无味道的(尤其注意上次实验留下的小鼠的粪便等),实验者在操作软件中记录小鼠的编号、日期、状态;实验动物提前运送到行为学实验室专用临时笼架,适应环境3 h左右,减少动物紧张。

其次:将小鼠从笼内取出(小鼠背向实验者),将

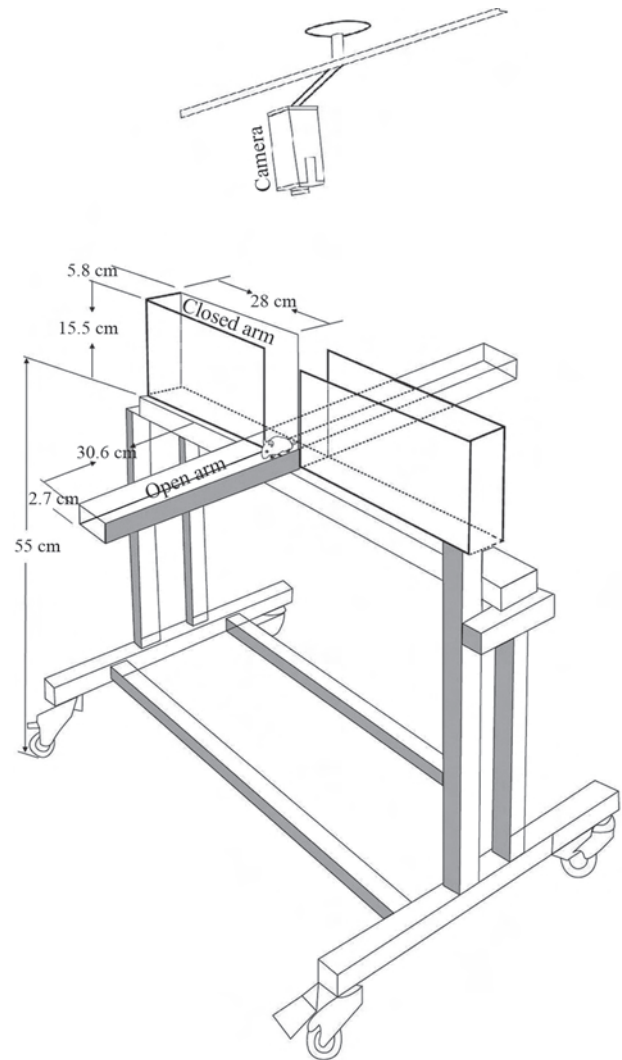


图1 高架十字迷宫系统示意图

开臂和闭臂置于距地面55 cm的高架上,高架底部有滑轮可移动,小鼠放入开臂与闭臂联接处,面向相同的开臂。迷宫顶部置摄像机记录动物行为。

Fig.1 System of the elevated plus maze

The elevated plus maze is placed on a movable platform with casters 55 cm off the ground. Mouse is placed at the junction of the open and closed arms, facing the same open arm. A camera is hung above the junction of arms to record animal behavior.

小鼠放置在开臂与闭臂接合处,小鼠面朝开臂,实验者迅速安静离开EPM;打开录像记录系统,记录小鼠在EPM内的活动,总时间5 min;实验结束后将小鼠放回笼内。

最后:以75%乙醇擦拭EPM实验装置,并用纸巾擦干。

1.4 实验数据的统计分析

用Origin 8.0软件(Origin Lab公司)进行统计分析,

使用One way ANOVA方法统计,并作图。数据表示为均数±标准误。

2 结果

以目前生命科学研究中常用的C57 BL/6和

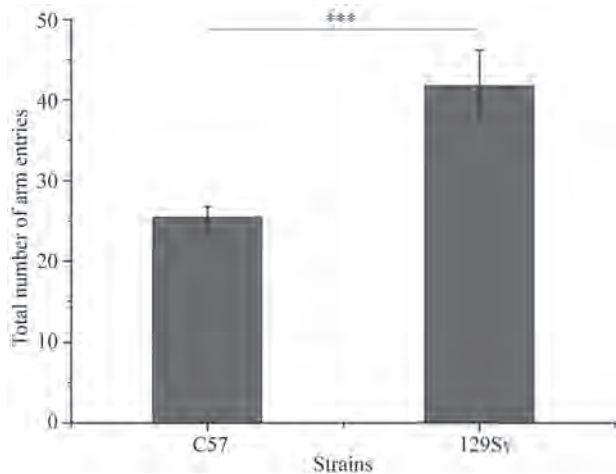


图2 高架十字迷宫小鼠进臂总次数(数据表示为均数±标准误, $n \geq 20$, *** $P < 0.001$)

Fig.2 Total number of arm entries in EPM (data expressed as means ± SEM, $n \geq 20$, *** $P < 0.001$)

129Sv小鼠为例,应用EPM实验比较两者焦虑行为的差异。

2.1 总体活动情况

C57小鼠进臂总次数(25.39±1.44)显著小于($P < 0.001$)129Sv小鼠进臂总次数(41.75±4.42)(图2)。而两者进入闭臂次数C57(15.12±0.84)显著小于($P < 0.05$)129Sv小鼠(23.5±3.55)。

2.2 中央平台活动

中央平台所指区域是开臂与闭臂联接处, C57小鼠在中央平台区滞留总路程(1298.83 mm±84.04 mm)显著大于($P < 0.001$)129Sv小鼠(187.50 mm±19.55 mm)(图3A); 中央平台区滞留总时间C57(80.11 s±5.51 s)显著小于($P < 0.001$)129Sv小鼠(153.69 s±14.88 s)(图3C); 中央平台区路程占总路程百分比C57(17.41±1.06)%显著小于($P < 0.001$)129Sv小鼠(52.04±3.80%)(图3B); 中央平台滞留时间占总时间百分比C57(26.89±1.83)%显著小于($P < 0.001$)129Sv小鼠(51.23±4.96%)(图3D)。

2.3 开臂活动

开臂进入次数C57(10.35±0.89)显著小于($P < 0.01$)129Sv小鼠(18.25±2.48)(图4A); 开臂滞留时间两种小

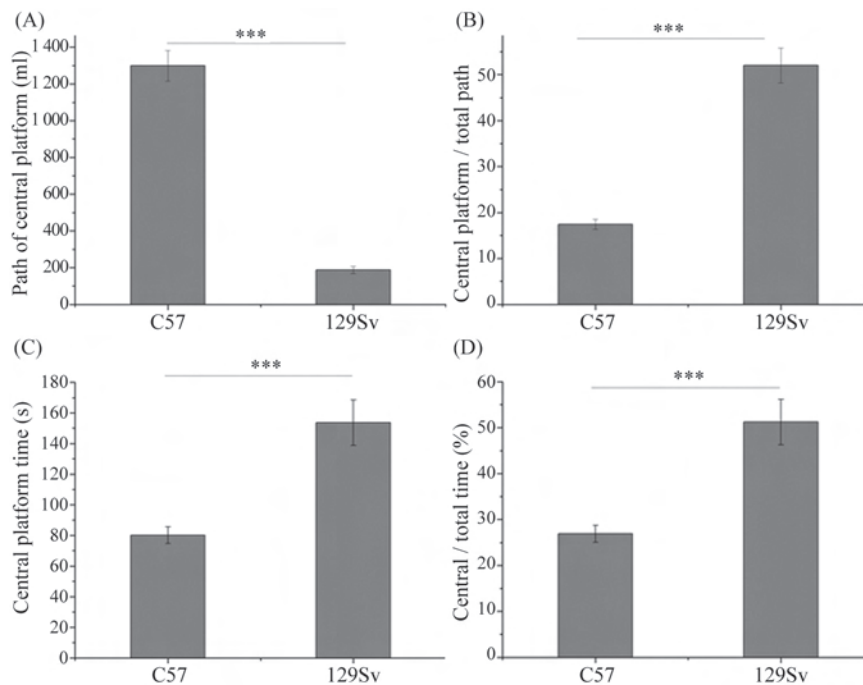


图3 中央平台区活动

数据表示为均数±标准误, $n \geq 20$; A: 中央平台区路程; B: 中央平台区路程占总路程百分比(%); C: 中央平台区滞留时间(s); D: 中央平台区滞留时间占总时间百分比(%); *** $P < 0.001$.

Fig.3 Activity in the central platform

Data expressed as means ± SEM, $n \geq 20$; A: path of central platform (mm); B: percent of central/total path (%); C: central platform time (s); D: percent of central/total time (%); *** $P < 0.001$.

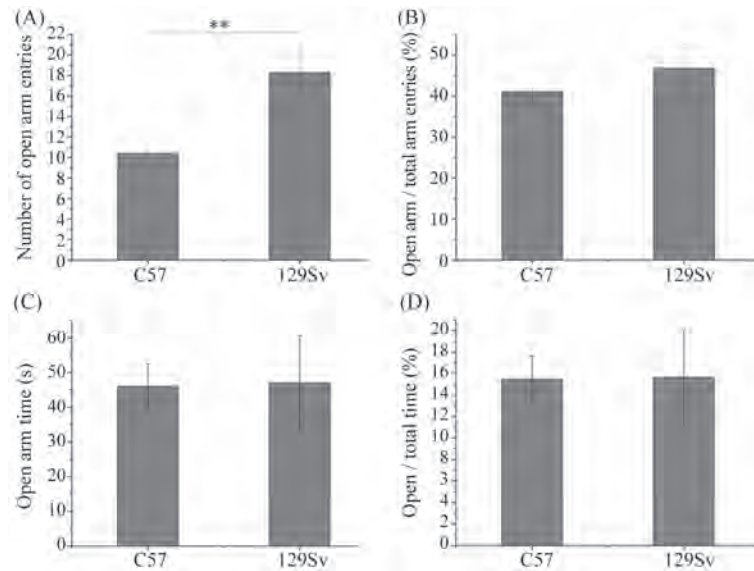


图4 开臂活动

数据表示为均数±标准误, $n \geq 20$; A: 开臂进入次数; B: 开臂进入次数占总进臂次数百分比(%); C: 开臂滞留时间(s); D: 开臂滞留时间占总时间百分比(%); ** $P < 0.01$ 。

Fig.4 Activity in the open arms

Data expressed as means ± SEM, $n \geq 20$; A: open arm entries; B: percent of open arm/total entries (%); C: open arm time (s); D: percent of open arm/total time (%); ** $P < 0.01$.

鼠无明显差异(图4C); 开臂进入次数占总进臂次数百分比两者之间无明显差异($P > 0.05$, 图4B); 开臂滞留时间占总时间百分比两者无明显差异($P > 0.05$, 图4D)。

2.4 闭臂活动

闭臂进入次数 C57 (15.12 ± 0.84) 显著低于 ($P < 0.05$) 129Sv 小鼠 (23.5 ± 3.55) (图 5A); 闭臂滞留时

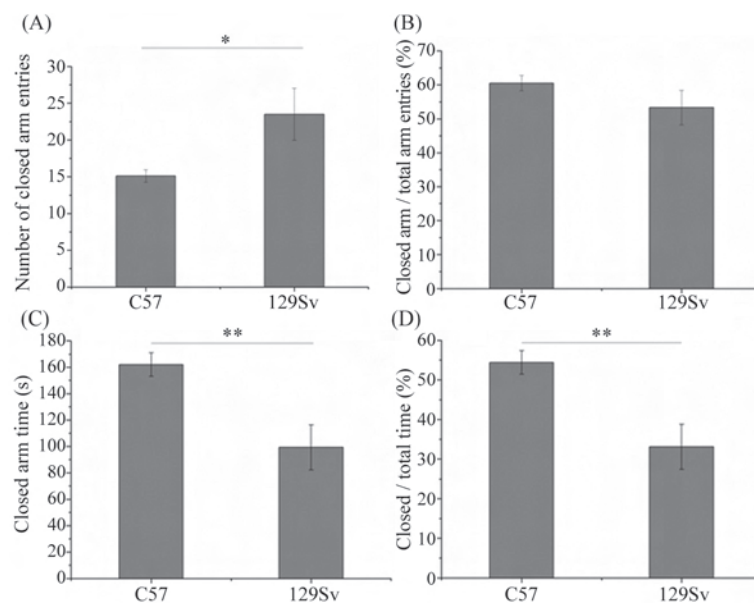


图5 闭臂活动

数据表示为均数±标准误, $n \geq 20$; A: 闭臂进入次数; B: 闭臂进入次数占总进臂次数百分比(%); C: 闭臂滞留时间(s); D: 闭臂滞留时间占总时间百分比(%); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig.5 Activity in the closed arms

Data expressed as means ± SEM, $n \geq 20$; A: closed arm entries; B: percent of closed arm/total entries (%); C: closed arm time (s); D: percent of closed arm/total time (%); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

间C57(162.10 ± 8.83 s)显著高于($P < 0.01$)129Sv小鼠(99.33 ± 17.11 s)(图5C); 闭臂进入次数占总进臂次数百分比C57(60.51 ± 2.24 %)与129Sv小鼠(53.33 ± 5.08 %)无明显差异($P > 0.05$)(图5B); 闭臂滞留时间占总时间百分比C57(54.42 ± 2.96 %)显著高于($P < 0.01$)129Sv小鼠(33.11 ± 5.70 %) (图5D)。

3 讨论

EPM实验是用来检测动物焦虑行为的一个重要实验,可以简单直观地反映其焦虑状态,自发明以来得到了广泛的应用。对于一项以行为学方式检测焦虑的实验,需要具备效度(validity)。效度指的是概念定义(conceptual definition)与操作化定义(operational definition)间是否契合^[18]。EPM实验具有表面效度(face validity)、结构效度(construct validity)和预测效度(predictive validity)^[1,19]。表面效度指的是EPM测量的指标能够有效测量实验中想检测的指标(即焦虑);结构效度指的是EPM测量的指标(如开臂滞留时间等)可以反映无法直接观察的指标(焦虑);预测效度指的是EPM检测的结果能够预测其他相关实验(比如开场实验)的结果,具有一致性^[1]。因为EPM在行为学分析上的效度,在抗焦虑药物的筛选及焦虑行为的检测上得到了广泛的应用。

EPM实验虽然简单,但同样有一些需要注意的步骤。其中最需要注意的是:实验开始时,实验者需要手持小鼠使其背对实验者放置在开臂与闭臂的接合处,且让小鼠面对开臂(若面对闭臂,实验结果将受很大影响^[1]),且同一实验中所有小鼠均需要面对同一开臂,否则可能会产生数据偏差^[1]。接着实验者迅速离开,小鼠进入EPM的同时另一名实验者将记录系统打开,记录小鼠在EPM中的行为。其他一些可能影响EPM实验结果的事项包括:小鼠的年龄、性别、营养及健康状态、小鼠对环境的适应、实验条件基本保持一致(实验时间段、固定的实验者、灯光、气味等)。意外情况的处理:在实验中偶尔小鼠会从EPM上掉落,这时实验者需要立即将小鼠从地上抓起放回迷宫并将该事件记录下来,最后在数据处理过程中留意此意外对结果产生的差异^[1]。目前,大部分实验是以小鼠四爪都进臂作为完全进臂的标准,也有以动物前爪进入为进臂标准^[1,20],这与EPM行为分析软件的计算能力有关,本文所用国产软件是将小鼠作为一个整体来分析其在EPM中的表

现,软件的处理能力尚待提高。

本文以C57和129Sv两种小鼠为例说明EPM在焦虑行为分析中的应用。进臂总次数与进入闭臂次数可以整体评价小鼠的活跃程度的标准^[21],实验中发现,C57这两个指标显著小于129Sv小鼠,说明在EPM中C57小鼠较不活跃。目前,一般认为中央平台区既不属于开臂也不属于闭臂,也有研究者将该区域归为闭臂的延伸,而在一项影响因素分析研究发现中央平台活动时间与小鼠焦虑行为不相关^[1],中央平台区的数据意义存在争议,为了避免平台区的数据干扰,有些研究者改用高架零迷宫(the elevated zero-maze),即开臂与闭臂呈环状联接^[22]。开臂和闭臂的数据是EPM实验的重要指标。本实验中两种小鼠之间开臂进入次数占总进臂次数百分比、闭臂进入次数占总进臂次数百分比及开臂滞留时间占总时间百分比均无明显差异。但闭臂滞留时间占总时间百分比C57显著高于129Sv小鼠。综合开臂和闭臂的数据说明C57小鼠在闭臂停留的时间和进入次数总体上高于129Sv小鼠,说明两种小鼠在焦虑行为上有差异,C57较129Sv小鼠要更为焦虑。实验条件对行为学实验结果影响较大,本实验得到的结果与Rodgers等^[23]的报道不一致,他们发现对照组(腹腔注射生理盐水)开臂进入次数占总进臂次数百分比C57小鼠显著小于129Sv小鼠,而开臂滞留时间占总时间的百分比C57小鼠显著大于129Sv小鼠,这两个结果之间并不一致且与本实验结果不同,究其原因可能是腹腔注射的应激影响了小鼠的焦虑状态,另外,他们使用的EPM数据采集软件与本实验中所用的也不同。有些EPM分析软件可以采集低头(head dips,指小鼠面对开臂时,低头向地板的行为)、后腿直立(rears)及面对刺激的身体伸展姿势(stretch-attend posture,指小鼠在迷宫里虽然不动,但面对刺激时身体会向前或者向刺激方向伸展的行为)的次数和持续时间^[1,24],而这些因素也被认为是小鼠的“危险评估”(risk assessment)行为^[1,25]。

综上,本实验简要介绍了高架十字迷宫实验的方法,该方法可以研究小鼠焦虑行为的表型差异,是小鼠行为学研究的重要工具。129Sv和C57小鼠均可成功完成EPM实验,而C57较129Sv更为焦虑。

参考文献(References)

- 1 Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay

- of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protocols* 2007; 2(2): 322-8.
- 2 Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 327(1): 1-5.
 - 3 Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *J Comp Physiol Psychol* 1955; 48(4): 254-60.
 - 4 Roy V, Chapillon P, Jeljeli M, Caston J, Belzung C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. *Psychopharmacology* 2009; 203(1): 131-41.
 - 5 Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62(6): 593-602.
 - 6 Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 1993; 56(1): 115-8.
 - 7 Oler JA, Fox AS, Shelton SE, Rogers J, Dyer TD, Davidson RJ, *et al.* Amygdalar and hippocampal substrates of anxious temperament differ in their heritability. *Nature* 2010; 466(7308): 864-8.
 - 8 Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, *et al.* 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 2005; 8(6): 828-34.
 - 9 Head KA, Kelly GS. Nutrients and botanicals for treatment of stress: adrenal fatigue, neurotransmitter imbalance, anxiety, and restless sleep. *Altern Med Rev* 2009; 14(2): 114-40.
 - 10 Smoller JW, Paulus MP, Fagerness JA, Purcell S, Yamaki LH, Hirshfeld-Becker D, *et al.* Influence of RGS2 on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65(3): 298-308.
 - 11 Gannon RL, Lungwitz E, Batista N, Hester I, Huntley C, Peacock A, *et al.* The benzodiazepine diazepam demonstrates the usefulness of Syrian hamsters as a model for anxiety testing: Evaluation of other classes of anxiolytics in comparison to diazepam. *Behav Brain Res* 2011; 218(1): 8-14.
 - 12 Violle N, Balandras F, Le Roux Y, Desor D, Schroeder H. Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 2009; 203(1): 35-42.
 - 13 Hoffer RS, Hodgson SR, Roberts KW, Bryant CD, Evans CJ, Eitan S. Extracellular signal-regulated kinase activation in the amygdala mediates elevated plus maze behavior during opioid withdrawal. *Behav Pharmacol* 2009; 20(7): 576-83.
 - 14 Walf AA, Koonce C, Manley K, Frye CA. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behav Brain Res* 2009; 196(2): 254-60.
 - 15 Walf AA, Frye CA. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol Behav* 2010; 99(2): 169-74.
 - 16 Preskorn SH, Drevets WC. Neuroscience basis of clinical depression: implications for future antidepressant drug development. *J Psychiatr Pract* 2009; 15(2): 125-32.
 - 17 Shirayama Y, Muneoka K, Fukumoto M, Tadokoro S, Fukami G, Hashimoto K, *et al.* Infusions of allopregnanolone into the hippocampus and amygdala, but not into the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex, produce antidepressant effects on the learned helplessness rats. *Hippocampus* 2010; doi: 10.1002/hipo.20824.
 - 18 Stone-Romero EF, Alvarez K, Thompson LF. The construct validity of conceptual and operational definitions of contextual performance and related constructs. *Hum Resour Manage R* 2009; 19(2): 104-16.
 - 19 Inagaki H, Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y. The alarm pheromone in male rats as a unique anxiety model: Psychopharmacological evidence using anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 94(4): 575-9.
 - 20 Dringenberg HC, Levine Y, Menard JL. Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. *Behav Brain Res* 2008; 186(1): 143-7.
 - 21 Hogg S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54(1): 21-30.
 - 22 Braun AA, Skelton MR, Vorhees CV, Williams MT. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 97(3): 406-15.
 - 23 Rodgers RJ, Davies B, Shore R. Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. *Genes Brain Behav* 2002; 1(4): 242-51.
 - 24 Curio M, Jacone H, Perrut J, Pinto AC, Filho VF, Silva RC. Acute effect of *Copaifera reticulata* *Ducke copaiba* oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61(8): 1105-10.
 - 25 Rodgers RJ, Cole JC. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol Behav* 1993; 53(2): 383-8.

The Use of the Elevated Plus Maze to Analyze Anxiety Behavior in Mice

Wei-Gang Wang^{1,2}, Wen-Ting Wu³, Jia-Bin Zhou³, Hui-Min Yan^{3*}

(¹Department of Chemistry, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ³Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract The elevated plus maze (EPM) is an important behavioral assay for rodents to assess the anxiety behavior. We introduced the basic principle and protocol of EPM. Mice are placed at the junction of the four arms facing the same open arm, activities were recorded by a video-tracking system. Both finished the test, but C57 showed less general activity than 129Sv. C57 mice showed significantly higher percent of closed/total time than the 129Sv. EPM is a simple and direct test to analyze anxiety behavior in mice.

Key words the elevated plus maze; anxiety; ethology; mouse

Received: March 16, 2011 Accepted: April 7, 2011

This work was supported by the Grant 863 Program of China (No.2008AA02Z126) and the Program of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (No.10140901400)

*Corresponding author. Tel: 86-21-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@hotmail.com