

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.08.007

Morris 水迷宫逃避潜伏期阈值设定对检测结果的影响 *

张莹林¹ 郭依清¹ 张 童¹ 蒋 明² 沈 阳¹ 姚俊岩^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院, 上海交通大学附属第一人民医院麻醉科 上海 200080; 2 复旦大学附属中山医院麻醉科 上海 200030)

摘要 目的:探讨 Morris 水迷宫不同逃避潜伏期阈值的设定是否影响阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)转基因小鼠及其同窝同龄野生型(Littermates, LM)小鼠学习和记忆能力的检测结果。**方法:**将雄性 AD 转基因鼠与雌性 C57BL/6J 野生型(Wild-Type, WT)鼠按 1:4 比例合笼繁育, 获得子代小鼠, 饲养至 3 周后进行 AD 基因表型鉴定。继而选取 4 月龄雌性 AD 转基因阳性小鼠 17 只为 AD 组, 同窝同龄 LM 雌性小鼠 15 只为 LM 组, 分析将逃避潜伏期阈值分别设定为 90 s 和 60 s 时, AD 组和 LM 组采用 Morris 水迷宫检测小鼠学习和记忆能力障碍的检出率和可靠性。**结果:**60 s 到 90 s 期间, AD 组小鼠跨越平台次数占比中位数 50.0% (0.0%, 75.0%), 明显高于 LM 组小鼠跨越平台次数占比中位数 16.7% (0.0%, 28.6%) ($P<0.05$); 60 s 到 90 s 期间, AD 组小鼠目的象限停留时间占比中位数 45.2% (37.6%, 52.8%), 显著高于 LM 组小鼠目的象限停留时间占比中位数 31.7% (28.7%, 40.9%) ($P<0.05$)。AD 转基因鼠在潜伏期阈值设定为 60 s 时较设定为 90 s 时将损失更多客观实验信息。**结论:**应用 Morris 水迷宫检测认知功能障碍时, 将逃避潜伏期阈值设定为 90 s 相较于 60 s 更能反映出 AD 鼠空间学习记忆能力的受损程度。

关键词:阿尔茨海默病; AD 转基因鼠; Morris 水迷宫; 逃避潜伏期

中图分类号:R-33; R741; R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)08-1431-05

Effect of Threshold Setting of Different Escape Latency in Morris Water Maze on Experimental Results *

ZHANG Ying-lin¹, GUO Yi-qing¹, ZHANG Tong¹, JIANG Ming², SHEN Yang¹, YAO Jun-yan^{1Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai general Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China; 2 Department of Anesthesiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether the threshold setting of different escape latencies of Morris water maze affects the cognitive behavior of Alzheimer's disease (AD) transgenic mice and their littermate (LM) mice. **Methods:** Two-month-old male AD mice were mated with three-month-old C57BL/6J Wild-Type (WT) female mice in a 1:4 ratio to obtain progeny mice. When the newborn mice were raised to 3 weeks, they were identified for AD gene phenotype. In progeny mice, four-month-old female mice were selected. 17 female AD transgenic positive mice were selected as AD group, while 15 female LM mice were selected as LM group. The detection ability and reliability of cognitive impairment in AD group and LM group were tested by Morris water maze when the threshold of escape latency set to 90s or 60s respectively. **Results:** During the period of 60 s to 90 s, the median proportion of platform crossing times number was 50.0% (0.0%, 75.0%) in the AD group, which was significantly higher than that in the LM group 16.7% (0.0%, 28.6%) ($P<0.05$); during the period of 60s to 90s, the median proportion of target quadrant residence time was 45.2% (37.6%, 52.8%) in the AD group, which was significantly higher than that in the LM group 31.7% (28.7%, 40.9%) ($P<0.05$). The AD group mice could obtain more reliable objective experimental information in the incubation period of 90s compared with 60s. **Conclusion:** When Morris water maze was used to detect the cognitive dysfunction of AD transgenic mice, setting the escape latency threshold to 90 s rather than 60 s could reflect the impairment of spatial learning and memory ability better.

Key words: Alzheimer's disease; AD transgenic mouse; Morris water maze; Escape latency

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R741; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)08-1431-05

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是痴呆中最常见的一种类型,也是现代医学研究的热点^[1]。5XFAD (Transgenic

Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations) 转基因小鼠是 AD 研究中广泛采用的模型动物^[2]。研究表明,该鼠在 4 月龄后空间认知能力逐渐下降,并可用 Morris 水迷宫评估其下降程度^[3-5]。而 AD 转基因鼠同窝同龄的 LM 鼠(Littermates,

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81771269);上海市浦江人才计划资助项目(17PJD035)

Δ 通讯作者:姚俊岩(1976-),女,硕士生导师,教授,主任医师,主要从事麻醉及其术后认知功能障碍方面的研究,

E-mail: sunshinyao@163.com, 电话:18227327803

(收稿日期:2019-10-26 接受日期:2019-11-20)

LM)则常被作为其野生型对照^[6,7]。

Morris 水迷宫是评价动物学习记忆能力的经典方法,常用于神经系统认知功能受损的机制研究^[8-10]。水迷宫训练的方案对实验结果有重要影响,首先需要设定最大逃避潜伏期,以确定当实验鼠在该时间段仍未找到平台时,及时给予干预和引导,帮助其形成对于平台位置的记忆。为便于理解,下文将最大逃避潜伏期统称为潜伏期阈值。对于 AD 转基因鼠而言,由于其本身已存在一定程度的认知功能障碍,因此逃避潜伏期阈值的设定更为重要。但在国内外现有报道中,众多学者采用的标准各不相同,如 Zhong 等^[11]采用 60 s,而 Cho 等^[12]采用 90 s, Takane 等^[13]则选用 100 s, Schneider 等^[14]选用 120 s。逃避潜伏期阈值的不同设定对 Morris 水迷宫实验结果有无影响以及如何避免由此造成的偏倚亟待深入研究。为此,本研究采用 4 月龄 AD 转基因鼠及其同窝同龄 LM 鼠为实验对象,探讨将 Morris 水迷宫逃避潜伏期阈值分别设定为目前常用的 60 s 和 90 s 两个不同时间时,对两类小鼠学习和记忆能力检测结果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物扩群

本研究严格遵循实验动物保护原则、福利原则、伦理原则和综合性科学评估原则。

2 月龄雄性 SPF 级 5XFAD 小鼠 8 只,体重 20~24 g,购自昭衍(苏州)新药研究中心有限公司[SCXK(苏)2018-0006],该动物源于美国 Jackson Laboratory 公司。3 月龄雌性 SPF 级 C57BL/6J 野生型(Wild-Type, WT)小鼠 16 只,体重 18~23 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [SCXK(沪)2018-0006]。将上述动物按照雌雄比例 1:4 合笼,置于复旦大学实验动物中心 SPF 级环境中饲养繁育。饲养环境相对温度维持在 22℃~28℃,相对湿度维持 40%~60%,每日昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h。

1.2 转基因鼠基因型鉴定

1.2.1 主要试剂和仪器 组织裂解试剂盒(KG205)购自天根生化科技有限公司,PCR 扩增使用的 2× Taq PCR 预混试剂 II (KT211)购自天根生化科技有限公司。配置琼脂糖凝胶采用的琼脂糖(A9539)购自 Sigma 公司、50× TAE Buffer(RT204)购自天根生化科技有限公司和 GeneRed 核酸染料(RT211)购自天根生化科技有限公司。

PCR 所用 Tg (APP) 引物长度为 377 bp,引物序列为上游 5'-AGGACTGACCACTCGACCAG-3', 下游 5'-CGGGGGTC-TAGTTCTGCAT-3'; PCR 所用 Tg (PS1) 引物长度为 608 bp,引物序列为上游 5'-AATAGAGAACGGCAGGAGCA -3', 下游 5'-GCCATGAGGGCACTAATCAT -3'; PCR 所用内参引物长度为 324 bp, 引物序列为上游 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAA-GATCT -3', 下游 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC -3'。以上引物均购自上海生工生物工程有限公司。

PCR 扩增仪(ProFlex, 购自 Applied Biosystems 公司);台式冷冻离心机(Microfuge20R, 购自 Beckman 公司);漩涡混合仪(S1010E, 购自 Scilogex 公司);凝胶电泳系统(170-4406, 购自 Bio-Rad 公司)。

1.2.2 基因鉴定方法 5XFAD 雄鼠与 C57BL/6J 野生型雌鼠交配繁殖产生子代,待子代鼠饲养至 3 周龄时,采用 PCR 法进行基因鉴定。首先用无菌手术剪剪取鼠尾 0.5 cm 置于 1.5 mL 的 EP 管中备用,用消毒棉球按压鼠尾防止出血过度。继而在 EP 管中加入组织裂解液 48 μL 离心震荡,于 65℃ 消化 30 min 后取出涡旋震荡使组织充分裂解,再于 100℃ 煮沸 5 min 后置于 4℃,采用 10000 rpm 离心 20 min。取上清液 1 μL 作为模板,加入引物。PCR 反应体系总体积为 20 μL,其中含 2× Taq PCR Master Mix 10 μL,模板 DNA 1 μL,各引物混合物 2.4 μL 和 RNase-free 水 6.6 μL。体系混匀后采用 PCR 仪进行扩增,反应条件为预变性 94℃ 持续 3 min,变性 94℃ 持续 30 s,退火 56℃ 持续 60 s,延伸 72℃ 持续 60 s,循环 35 次后置于 72℃,持续 5 min 后终止反应。制备 1.6% 琼脂糖凝胶,并按照 1:20000 加入 GeneRed 核酸染料备用。PCR 程序结束后,取 PCR 产物加入凝胶孔中,将凝胶电泳参数设置为电压 110 V,持续 30 min。电泳结束后观察 PCR 产物长度并置于凝胶成像仪中进行成像分析。

当 PCR 引物扩增产物长度同时存在 377 bp 和 608 bp 时,表明该动物同时表达 APP 和 PS1 两种基因,即被判定为 5XFAD 转基因鼠;而 PCR 引物扩增产物长度仅为 324 bp 时,说明该动物不表达 APP 和 PS1 两种基因,即被判定为同窝同龄 LM 鼠。

1.3 实验分组

基因表型鉴定成功后,将其按表型分类,并继续置于 SPF 级环境中饲养至 4 月龄。选取雌性 AD 转基因小鼠 17 只为 AD 组,雌性同窝同龄 LM 小鼠 15 只为对照组进行后续研究。

1.4 Morris 水迷宫行为学训练及测试

本实验使用的水迷宫为直径 1.2 m,高 0.5 m 的不锈钢圆形水池,分为 4 个象限:SW (southwest)、NW(northwest)、NE (northeast)和 SE(southeast)。在池水中加入无毒钛白粉混匀呈乳白色以使动物利用视觉无法辨认池内平台位置。维持池内水温恒定为 22±2℃。使用遮光帘围起水池的四周及顶部,遮光帘顶部中央安放摄影系统并连接电脑主机用于监测小鼠在水池中的游泳情况。实验期间保持周围环境固定不变,避免噪音,以免影响实验结果。全程通过 Ethovision13.0 软件(Noldus 公司,荷兰)追踪并获取实验小鼠的各项实验数据。

本研究的水迷宫实验方案为将实验鼠训练 7 d,在第 7 d 训练结束后 1 h 进行检测。具体方案如下:在定位航行实验阶段,将平台放在水池的 SW 象限并隐藏于水面下 1 cm 处。将小鼠面朝池壁放入水中,入水点按照 SW、NW、NE 和 SE 顺序依次进行,每天均训练 4 次,训练间隔时间为 45 min。每次训练过程中,平台位置保持不变。分别将逃避潜伏期阈值设定为 90 s 或 60 s,记录每次实验中 90 s 内或 60 s 内小鼠寻找到平台所用的时间即为逃避潜伏期实际测定值。若小鼠在相应的逃避潜伏期阈值时间内未能找到平台,便缓慢引导小鼠至平台并停留 15 s。第 7 d 训练结束后进入空间探索实验阶段。实验中,首先撤去平台,继而将小鼠从水迷宫 NE 方向放入水中,检测小鼠凭记忆寻找原平台位置的能力。分别记录实验鼠在 90 s 和 60 s 内的运动轨迹,穿越原平台次数和目的象限停留时间占比并进

行比较。

1.5 统计分析

采用 GraphPad Prism6.0 软件 (Graph Pad Software I 公司, 美国) 进行数据分析。潜伏期实测值以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm \text{sem}$)表示, 采用重复测量方差分析进行组间比较。60 s 到 90 s 期间内穿越平台次数及目的象限停留时间占比用 M (P25, P75) 表示, 采用 Mann-Whitney U 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扩群繁育

本研究发现 2 月龄 5XFAD 小鼠与 3 月龄 C57BL/6J 野生型小鼠交配后, 雌鼠受孕率高达 100%, 平均 20 天可繁殖新生小鼠 4~6 只, 性别随机。各小鼠毛发及体重的生长将新生小鼠饲养至 4 月龄时, 随机抽取 32 只雌鼠以备后续实验。

2.2 实验鼠基因表型鉴定结果

本研究中用于鉴定子代小鼠基因型的 PCR 方法稳定可靠, 可重复性强, 表型鉴定成功率达 100%。其中, 携带 APP/PS1 两种基因即为 5XFAD 转基因鼠; 此两种基因均不携带则为 LM 鼠。PCR 鉴定部分结果如图 1 所示, 图中阳性参照为购买的已确认为 5XFAD 的转基因鼠, 阴性参照为 WT 野生型小鼠。

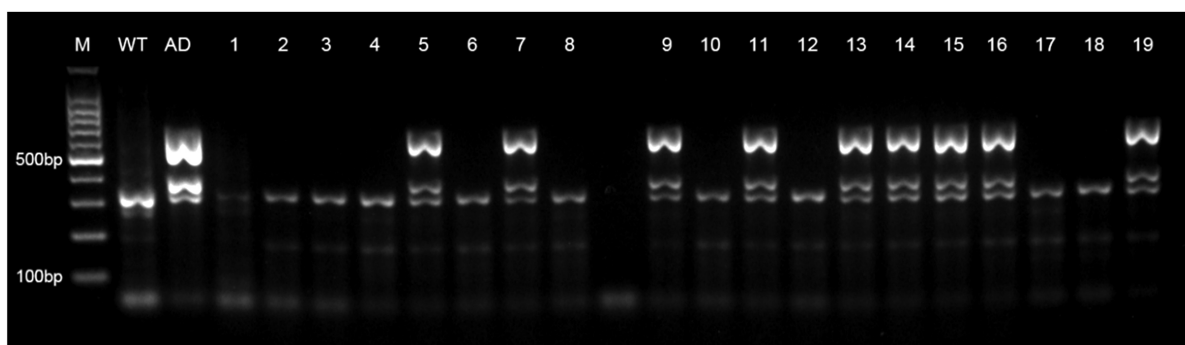


图 1 PCR 法基因鉴定部分结果示意图

Fig.1 Schematic diagram of partial results of PCR geno-typing

注: M 为 Marker, AD 为阳性参照, WT 为阴性参照。数字表示样品编号, 其中, 5、7、9、11、13、14、15、16 和 19 被判定为 5XFAD 转基因鼠; 1、2、3、4、6、8、10、12、17、18 被判定为 LM 鼠。

Note: M is Marker, AD is as a positive reference, and WT is as a negative reference. The numbers indicate the sample numbers, wherein 5, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16 and 19 were judged to be 5XFAD transgenic mice; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 18 was judged as LM mouse.

2.3 逃避潜伏期实测值

在定位航行实验中, 当逃避潜伏期阈值设定为 60 s 或 90 s 时, 随着训练时间的延长, 均可以观察到潜伏期实测值逐渐缩

短, 但 AD 鼠和 LM 鼠组间比较结果提示两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 如图 2 所示。

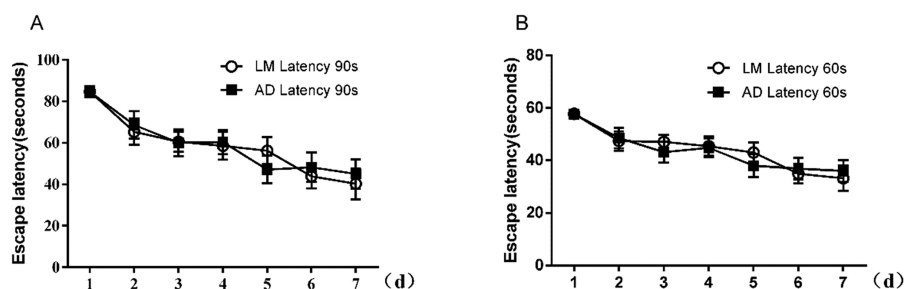


图 2 逃避潜伏期阈值设定为 90 s 和 60 s 时两组潜伏期实测值的比较

Fig.2 Comparison of the two groups of measured values of incubation period when the threshold of escape incubation period is set at 90s and 60s

2.4 运动轨迹

在空间探索实验中, 逃避潜伏期阈值分别设定为 60 s 和 90 s 时, AD 鼠和 LM 鼠寻找平台的运动轨迹如图 3 所示。总体可见, 相对于 LM 鼠, AD 鼠的运动轨迹更密集, 活动范围几乎遍布整个水池。LM 鼠的运动轨迹则主要集中在水池中央, 总跨越平台次数较 AD 鼠有所增加。

在逃避潜伏期阈值设定为 90 s 时 (图 3B), AD 鼠在目的象限寻找平台的轨迹和停留的频率增加, 穿越平台次数也较逃避潜伏期阈值设定为 60 s 时 (图 3A) 增多。说明 60 s 到 90 s 的

时间段内, AD 鼠寻找平台的尝试次数增加。但对 LM 鼠在逃避潜伏期阈值设定为 90 s 时 (图 3D) 和逃避潜伏期阈值设定为 60 s 时 (图 3C) 进行比较的结果发现, LM 鼠在目的象限寻找平台的轨迹、停留的频率和穿越平台次数未发生明显改变。

2.5 跨越平台次数占比

比较 60 s 至 90 s 期间内两组小鼠跨越平台次数占总跨越平台次数的占比, 结果提示 60 s 到 90 s 时段内, AD 鼠跨越平台次数占比中位数 50.0% (0.0%, 75%), 明显高于 LM 鼠跨越平台次数占比中位数 16.7% (0.0%, 28.6%), AD 鼠跨越平台次

数占比相对 LM 鼠更大($P<0.05$),如图 4 所示。

2.6 目的象限时间占比

比较 60 s 至 90 s 期间两组小鼠目的象限停留时间占总停留时间的比值,结果发现 60 s 到 90 s 时段内,AD 鼠目的象限

停留时间占比中位数 45.2 % (37.6 %, 52.8 %),显著高于 LM 鼠目的象限停留时间占比中位数 31.7 % (28.7 %, 40.9 %),AD 鼠较 LM 鼠具有更大的停留时间占比($P<0.05$),如图 5 所示。

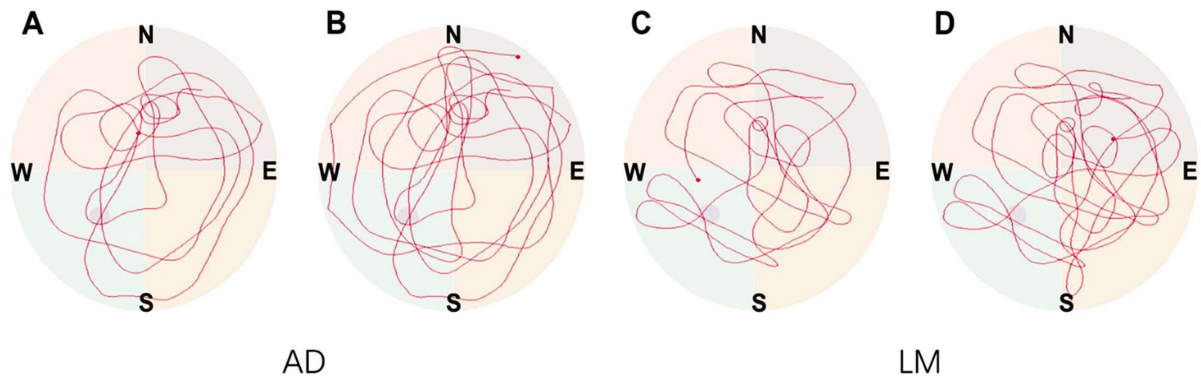


图 3 逃避潜伏期阈值设定为 90 s 和 60 s 时两组测试运动轨迹示意图

Fig.3 Schematic diagram of two groups of test movement tracks when the escape latency threshold is set at 90s and 60s

注:图中 E、W、S 和 N 分别代表东、西、南、北四个方向,● 示原平台所在位置,目的象限为 SW 象限。A:AD 组阈值为 60 s 的运动轨迹图;B:AD 组阈值为 90 s 的运动轨迹图;C:LM 组阈值为 60 s 的运动轨迹图;D:LM 组阈值为 90 s 的运动轨迹图。

Note: E, W, S and N represent the east, west, south and north directions respectively, ● showing the location of the original platform and the target quadrant is the SW quadrant. A: the movement tracks of the AD group of 60s; B: the movement tracks of the AD group with a threshold of 90s; C: the movement tracks of the LM group of 60s; D: the movement tracks of the LM group of 90s.

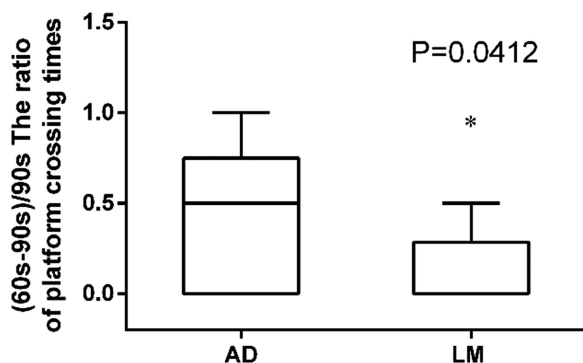


图 4 两组 60 s 至 90 s 期间跨越平台次数占总次数比值

Fig.4 The proportion of platform crossing times between the two groups in 60 s-90 s

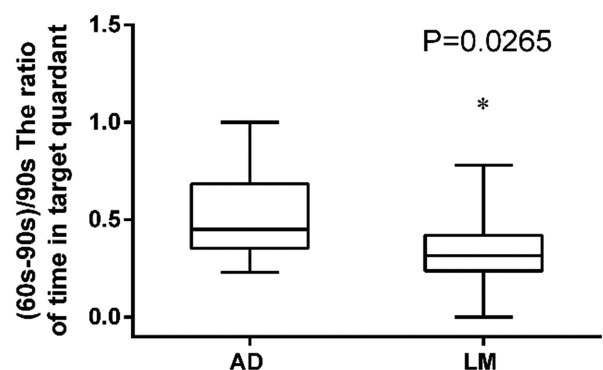


图 5 两组 60 s 至 90 s 期间目的象限停留时间占比

Fig.5 The proportion of Time in target quadrant between the two groups in 60 s-90 s

3 讨论

本研究采用的 5XFAD 转基因鼠是 AD 疾病中常用的实验动物。该鼠表达 5 个家族性 AD 的突变基因,包括 APP695 基因的 K670N / M671L、1716V 和 V717I 三个位点突变及 PS1 基因的 M146L、L286V 两个位点突变。5XFAD 转基因鼠在 1.5 月龄时即有淀粉样斑块的形成,并随年龄增加而逐渐出现神经元变性和损伤,在 4-5 月龄时出现空间认知能力下降,6 月龄时该鼠海马区出现神经纤维缠结并逐渐累及皮层,9 月龄时突触和皮质区的神经元减少,与 AD 疾病发生发展相似。因此 5XFAD 转基因鼠能够较好地模拟 AD 患者脑内主要的神经病理过程及行为学表现,常被用于 AD 发病机制和治疗效果的实验研究^[2,15,16]。

本研究成功对 5XFAD 鼠进行了繁育和扩群,雌鼠受孕率达到 100 %。在合笼期间,研究者每日称取雌鼠体重并观察有

无阴栓和腹部隆起,从多方面判断雌鼠是否受孕。若合笼 7 天后仍未受孕,即更换笼位以保证雌鼠受孕率。本研究发现,孕鼠平均 20 天产出一批小鼠,每批 4~6 只不等。雌鼠哺乳期间添加灭菌的鸡蛋和葵花籽增加孕鼠营养,可避免食仔情况发生。在扩群期间,小鼠的基因表型、数量、出生日期、断乳日期、父母代基因型、来源鼠笼都进行详细记录。

本研究在子代鼠饲养至 3 周时使用 PCR 法对其进行基因鉴定,无一只子鼠出现鉴定结果不确定或鉴定失败,鉴定成功率达 100%。该方法可获得基因表型明确为阳性的 5XFAD 小鼠和同窝同龄基因表型明确为阴性的 LM 小鼠。

Morris 水迷宫主要用于评估海马相关的认知功能损害及其程度,也是研究 AD 转基因动物空间记忆能力的经典方法。水迷宫实验通常分为定位航行实验和空间探索实验 2 个阶段。其中,定位航行实验历时数天,目的是训练小鼠使之产生空间学习记忆;空间探索实验则是考察小鼠对原平台的记忆能

力^[17,18]。据报道,Morris 水迷宫用于评价 5XFAD 转基因小鼠空间记忆能力时,其定位航行实验的训练方案各不相同,如 Zhong 等^[10]逃避潜伏期阈值为 60 s,连续训练 7 天;而 Cho 等^[11]逃避潜伏期阈值为 90 s,连续训练 5 天。另有研究者将逃避潜伏期阈值设定长于 90 s,如 Takane 等^[12]采用 100 s,连续训练 4 天;而 Schneider 等^[13]则采用 120 s,连续训练 4 天。以上水迷宫训练方案的不同造成实验结果检出的 AD 鼠学习和记忆能力受损程度的效力不同,不能排除实验结果存在一定程度的偏倚。考虑到 4 月龄 5XFAD 本身已存在一定程度的学习记忆能力受损,本研究采用了将实验鼠训练 7d,在第 7d 训练结束后 1 h 再进行检测的方案。

Morris 水迷宫检测得出的实验数据主要包括逃避潜伏期、跨越平台次数和目的象限停留时间占比,通过上述指标可充分反映动物的空间记忆能力^[19-21]。其中,跨越平台次数和目的象限停留时间占比受逃避潜伏期阈值设定的影响。应用 Morris 水迷宫检测 AD 鼠的认知功能障碍时,潜伏期阈值的设定需谨慎考量,如潜伏期阈值设定较短,可能不足以使已有一定程度认知损害的 AD 鼠产生空间记忆,无法准确比较干预前后认知能力的差异,导致实验结果准确性降低;如潜伏期阈值时间设定较长,又可能由于实验鼠被迫游泳时间过长,耗费体力过多而影响其找到平台的成功率,对实验结果仍会造成偏倚。因此,如何针对特殊的 AD 转基因鼠设置合适的逃避潜伏期阈值值得深入研究。

综合上述因素,本研究选取目前常用的 60 s 和 90 s 两种逃避潜伏期阈值设定标准进行了探讨。研究结果发现,在定位航行实验阶段,无论将逃避潜伏期阈值设定为 60 s 还是 90 s,随着训练时间的延长,均可观察到 AD 鼠和 LM 鼠的逃避潜伏期实际测定值呈下降趋势,但 AD 鼠和 LM 鼠两种品系之间无统计学差异。

在撤去平台后的空间探索实验阶段,我们测试了逃避潜伏期阈值设定为 60 s 和 90 s 时两种实验鼠的运动轨迹,结果发现 AD 鼠寻找平台的总体运动轨迹较 LM 鼠更密集。且与 LM 鼠不同,随着时间的增加,AD 鼠在 90 s 内目的象限的轨迹、停留的频率和穿越平台次数较 60 s 内均有所增加。进一步比较发现,在 60 s 到 90 s 这一时间段内,AD 鼠跨越平台次数占比明显比 LM 鼠大;同时,AD 鼠在目的象限的停留时间占比较 LM 鼠也同步增大,两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这说明在 60 s 到 90 s 这一时段内,AD 鼠寻找平台的尝试增加,这可能与 4 月龄 AD 鼠在训练之前就已存在一定程度的学习和记忆能力障碍有关^[21-23]。上述结果表明,与 LM 鼠相比,60 s 到 90 s 期间即潜伏期的后 30 s 时间对于 AD 鼠的行为学观察和检测有更为重要的意义。AD 鼠在潜伏期阈值设定为 60 s 时较设定为 90 s 时损失更多客观实验信息,并可能由此导致水迷宫对于其认知能力下降的检出率降低,产生假阴性结果。

综上所述,本研究发现,采用 Morris 水迷宫评估 5XFAD 鼠的空间记忆能力时,潜伏期阈值的设定标准对检出的效力将产生重要影响。潜伏期阈值设定为 90 s 较 60 s 能更客观地反应 AD 鼠的学习和记忆能力,有望降低实验评估的假阴性率。在未来的 AD 疾病的基础研究中,Morris 水迷宫的潜伏期阈值设定为 90 s 更有优势。

参考文献(References)

- [1] Suh J, Romano DM, Nitschke L, et al. Loss of Ataxin-1 Potentiates Alzheimer's Pathogenesis by Elevating Cerebral BACE1 Transcription[J]. Cell, 2019, 178(5): 1159-75.e17
- [2] Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation[J]. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2006, 26(40): 10129-10140
- [3] Kang S, Ha S, Park H, et al. Effects of a Dehydroevodiamine-Derivative on Synaptic Destabilization and Memory Impairment in the 5xFAD, Alzheimer's Disease Mouse Model [J]. Frontiers in behavioral neuroscience, 2018, 12: 273
- [4] Richard BC, Kurdakova A, Baches S, et al. Gene Dosage Dependent Aggravation of the Neurological Phenotype in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease [J]. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2015, 45(4): 1223-36
- [5] Lebois EP, Schroeder JP, Esparza TJ, et al. Disease-Modifying Effects of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Activation in an Alzheimer's Disease Mouse Model [J]. ACS chemical neuroscience, 2017, 8(6): 1177-87
- [6] Park JC, Ma J, Jeon WK, et al. Fructus mume extracts alleviate cognitive impairments in 5XFAD transgenic mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2016,16(1): 426
- [7] Gurel B, Cansev M, Koc C, et al. Proteomics Analysis of CA1 Region of the Hippocampus in Pre-, Progression and Pathological Stages in a Mouse Model of the Alzheimer's Disease [J]. Current Alzheimer research, 2019, 16(7): 613-21
- [8] Possin KL, Sanchez PE, Anderson-Bergman C, et al. Cross-species translation of the Morris maze for Alzheimer's disease[J]. The Journal of clinical investigation, 2016, 126(2): 779-83
- [9] Alves S, Churlaud G, Audrain M, et al. Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice[J]. Brain: a journal of neurology, 2017, 140(3): 826-42
- [10] Segev A, Yanagi M, Scott D, et al. Reduced GluN1 in mouse dentate gyrus is associated with CA3 hyperactivity and psychosis-like behaviors[J]. Molecular psychiatry, 2018 [Epub ahead of print]
- [11] Zhong L, Xu Y, Zhuo R, et al. Soluble TREM2 ameliorates pathological phenotypes by modulating microglial functions in an Alzheimer's disease model [J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1365
- [12] Cho GM, Lee SY, Park JH, et al. Photobiomodulation using a low-level light-emitting diode improves cognitive dysfunction in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences, 2018, [Epub ahead of print]
- [13] Takane K, Hasegawa Y, Lin B, et al. Detrimental Effects of Centrally Administered Angiotensin II are Enhanced in a Mouse Model of Alzheimer Disease Independently of Blood Pressure [J]. Journal of the American Heart Association, 2017, 6(4): [Epub ahead of print]
- [14] Schneider F, Baldauf K, Wetzel W, et al. Behavioral and EEG changes in male 5xFAD mice [J]. Physiology & behavior, 2014, 135: 25-33

- Models to Identify Correlates of a Diabetic Peripheral Neuropathy Diagnosis from Electronic Health Record Data[J]. *Pain Med*, 2017, 18(1): 107-115
- [10] 王宏伟, 冷锦红. 糖尿病周围神经病变的中医药治疗研究进展[J]. *中医药信息*, 2017, 34(4): 124-128
- [11] Rojas DR, Kuner R, Agarwal N. Metabolomic signature of type 1 diabetes-induced sensory loss and nerve damage in diabetic neuropathy[J]. *J Mol Med*, 2019, 97(6): 845-854
- [12] 方朝晖, 吴以岭, 赵进东. 糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指南(2016年版)[J]. *中医杂志*, 2017, 58(7): 625-630
- [13] 张倩, 梁晓春, 王超, 等. 660例糖尿病周围神经病变患者中医证型及临床特点分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(1): 62-67
- [14] Lee KA, Lee NY, Park TS, et al. Morphologic comparison of peripheral nerves in adipocyte tissue from db/db diabetic versus normal mice[J]. *Diabetes Metab J*, 2018, 42(2): 169-172
- [15] 刘永华, 江锦红, 吴迪炯, 等. 补肾活血法与益气补肾法治疗慢性再生障碍性贫血的疗效比较[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22(3): 234-238
- [16] 贺丰杰, 蔡竞, 陈梅. 从肾虚血瘀论治薄型子宫内膜经验[J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(3): 536-539
- [17] 孙中莉, 王明杰, 王丽娟, 等. 益气开窍清心法治疗老年性痴呆的理论刍议[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(10): 1374-1375+1401
- [18] 顾丽, 魏跃钢. 魏跃钢治疗结节性红斑临床经验[J]. *山东中医药大学学报*, 2018, 42(3): 248-250
- [19] 李莎莎, 钟利群, 夏梦幻. 泽泻汤的相关研究概况 [J]. *现代中医临床*, 2017, 24(4): 56-60
- [20] 王保芹, 朱洁, 李泽庚. 甘草在方剂中的作用及配伍规律[J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(1): 52-54
- [21] Li QR, Wang Z, Zhou W, et al. Epalrestat protects against diabetic peripheral neuropathy by alleviating oxidative stress and inhibiting polyol pathway[J]. *Neural Regener Res*, 2016, 11(2): 345-351
- [22] Wang X, Lin H, Xu S, et al. The clinical efficacy of epalrestat combined with α -lipoic acid in diabetic peripheral neuropathy: Protocol for a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2018, 97(6): e9828
- [23] 袁志俊, 何晓英, 袁平等. 莫诺昔通过抑制炎症反应改善脑出血模型大鼠的神经功能[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(8): 1217-1222
- [24] 张春晶, 李淑艳, 赵容杰, 等. 人参皂苷 Rh1 对哮喘模型小鼠炎症因子表达的抑制作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1): 163-167
- [25] Moustafa P E, Abdelkader N F, El Awdan S A, et al. Liraglutide ameliorated peripheral neuropathy in diabetic rats: Involvement of oxidative stress, inflammation and extracellular matrix remodeling[J]. *J. Neurochem*, 2018, 146(2): 173-185
- [26] Xie W, Zhang Z, Song L, et al. Cordyceps militaris Fraction induces apoptosis and G2/M Arrest via c-Jun N-Terminal kinase signaling pathway in oral squamous carcinoma KB Cells [J]. *Pharmacogn Mag*, 2018, 14(53): 116-123
- [27] Xu T, Niu C, Zhang X, et al. β -Ecdysterone protects SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced apoptosis via c-Jun N-terminal kinase and Akt-associated complementary pathways [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(4): 489-499
- [28] Tripathi D, Cheekatla S S, Paidipally P, et al. c-Jun N-terminal kinase 1 defective CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells prolong islet allograft survival in diabetic mice[J]. *Sci. Rep*, 2018, 8(1): 3310
- [29] Zhang X, Luo S, Wu J, et al. KIND1-Loss Sensitizes Keratinocytes to UV-induced Inflammatory Response and DNA Damage [J]. *J Invest. Dermatol*, 2017, 137(2): 475-483
- [30] Liu Y, Wei J, Zhao Y, et al. Follistatin-like protein 1 promotes inflammatory reactions in nucleus pulposus cells by interacting with the MAPK and NF κ B signaling pathways[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 43023-43034
- [31] 郭文鹤, 李晓宇, 黄娜娜, 等. 基于中药性味理论的补骨脂配伍规律研究进展[J]. *中国药物警戒*, 2017, 14(12): 737-741

(上接第 1435 页)

- [15] Martorell AJ, Paulson AL, Suk HJ, et al. Multi-sensory Gamma Stimulation Ameliorates Alzheimer's-Associated Pathology and Improves Cognition [J]. *Cell*, 2019, 177(2): 256-71.e22
- [16] Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, et al. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model [J]. *Science (New York, NY)*, 2018, 361(6406)
- [17] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nature protocols*, 2006, 1(2): 848-58
- [18] Wood RA, Bauza M, Krupic J, et al. The honeycomb maze provides a novel test to study hippocampal-dependent spatial navigation [J]. *Nature*, 2018, 554(7690): 102-5
- [19] Yang S, Gu C, Mandeville ET, et al. Anesthesia and Surgery Impair Blood-Brain Barrier and Cognitive Function in Mice [J]. *Frontiers in immunology*, 2017, 8(902)
- [20] Bahn G, Park JS, Yun UJ, et al. NRF2/ARE pathway negatively regulates BACE1 expression and ameliorates cognitive deficits in mouse Alzheimer's models[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(25): 12516-23
- [21] Tang X, Wu D, Gu LH, et al. Spatial learning and memory impairments are associated with increased neuronal activity in 5XFAD mouse as measured by manganese-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36): 57556-70
- [22] Gu L, Wu D, Tang X, et al. Myelin changes at the early stage of 5XFAD mice[J]. *Brain research bulletin*, 2018, 137: 285-93
- [23] Wei Z, Chen XC, Song Y, et al. Amyloid beta Protein Aggravates Neuronal Senescence and Cognitive Deficits in 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease[J]. *Chinese medical journal*, 2016, 129(15): 1835-1844