# 专题介绍

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。

# 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

王维刚<sup>1</sup> 周嘉斌<sup>2</sup> 朱明莉<sup>2</sup> 万颖寒<sup>2</sup> 严惠敏<sup>2\*</sup> (<sup>1</sup>同济大学生命科学与技术学院,上海200092; <sup>2</sup>上海南方模式生物研究中心,上海201203)

摘要 本文以C57和129Sv小鼠为例介绍了Morris水迷宫实验的基本原理和实验步骤。该 实验是研究鼠类空间学习记忆功能的重要实验:通过连续多日训练鼠类以水池壁的标记物进行定 位导航游泳寻找水中隐藏平台的方法检测小鼠的空间学习能力;接着撤除平台,分析小鼠在水迷宫 里搜索原隐藏平台的行为来检测小鼠的空间记忆功能。结果发现,两种小鼠均可成功完成实验,C57 综合表现优于129Sv小鼠。Morris水迷宫是对小鼠空间学习和记忆功能研究的重要工具。

关键词 Morris 水迷宫; 小鼠; 认知功能; 空间学习和记忆

Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)实验 是 1981年由 Morris<sup>11</sup>建立的,用强迫实验动物(大 鼠、小鼠)游泳并学习寻找隐藏在水中平台的方法 来测试实验动物对空间位置觉和方向觉(空间定位)的 学习记忆能力。实验基本原理:鼠类天生会游泳且 会本能地寻找水中的休息场所。此活动会涉及到一 个复杂的学习记忆过程,鼠类会根据水池壁上的标志 对其所在位置进行空间定位,目的是能成功地找到隐 藏平台,最终从水中逃脱。而根据鼠类在 MWM 实 验中的表现可以研究其对空间导航任务的信息采集 和记忆能力<sup>13</sup>。继而,研究者对MWM实验进行了修改, 可以用来研究工作记忆、参考记忆和任务策略<sup>13</sup>。 MWM 实验的空间导航任务与海马结构及功能 的完整性密切相关,但值得注意的是该任务的完成还 依赖纹状体、基底前脑、小脑、新皮质等脑区<sup>[4]</sup>, 不同脑区之间的协调合作对于该任务的完成是非常 重要的。目前认为长效突触改变是 MWM 实验中记 忆形成的神经学基础,而海马的长时程增强作用(longterm potentiation, LTP)对突触可塑性的影响最大<sup>[5]</sup>。 纹状体和MWM的固有记忆形成有关,可能控制反应

收稿日期: 2010-11-07 接受日期: 2010-12-16

国家高技术研究发展计划(863 计划, No.2008AA02Z126)资助项目 \*通讯作者。Tel: 021-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@ hotmail.com

灵活性和运动。基底前脑提供了海马与新皮质之间 的胆碱能神经支配。小脑可以调控认知功能从而对 实验产生影响。而新皮质影响小鼠在执行实验任务 时对任务的规划和执行能力。

MWM 由于在 N- 甲基天冬氨酸受体(N-methyld-aspartate receptor, NMDA receptor)功能研究、突 触可塑性和学习能力研究上具有显著的优势<sup>(6)</sup>, 被广 泛应用于学习记忆、老年痴呆、药理学、毒理学、 神经生物学等多个学科研究中。

# 1 材料与方法

# 1.1 试剂和仪器

钛白粉(上海沪江钛白化工制品有限公司)、 Morris水迷宫动物行为学分析系统(上海移数信息科 技有限公司)。它包括一个直径1.2 m的圆形不锈钢 水池,池壁上标记有东、西、南、北4个入水点, 目标象限中央水面下0.8 cm处放置圆形隐藏逃生平 台,直径9 cm,整个实验期间位置保持不变。因本 实验所研究小鼠毛色分别为黑色(C57)和灰色(129Sv), 将钛白粉按125 g/L浓度以温水冲开以隐藏平台并令 其摄像时与小鼠颜色保持鲜明对比。水池内有加热 装置将水温保持在22~24℃。水池中央上方安置有 摄像机,并与记录系统相联接。水迷宫系统示意图 见图1。实验数据由 Morris 水迷宫记录和采集相关 软件分析记录。

## 1.2 实验动物

健康C57小鼠19只,129Sv小鼠20只,均为雄性,10周龄,体重23~28g。小鼠饲养在恒温(21~22℃)房间,每隔12h光暗循环。非实验期间小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。

## 1.3 实验步骤

自发明以来,研究者出于不同的实验目的建立了 多种MWM实验方案<sup>[5]</sup>,而一个最基本的MWM实验 分为空间记忆采集实验和空间搜索实验两部分。实



#### 图1 Morris 水迷宫系统示意图

小鼠放入充满不透明的乳白色液体的水池中并强迫游泳至其寻找到隐藏平台。水池分为四个象限,池壁上标记 N、E、S、W(图中星 号所示),分别表示北、东、南、西。

#### Fig. 1 System of Morris water maze

The mouse is put into the tank full of opaque milky liquid and made to swim till it gets to the submerged escape platform. The tank is divided into four equal quadrants labeled N (north), E (east), S (south), W (west). The asterisks indicate visual cues which are marked on the wall of the tank.

验设计时需要考虑动物性别、年龄、种属、背景 及健康状态等影响因素4%。实验过程中,起止时间应 保持一致,并保证环境因素的一致性。实验室需保 持安静,实验人员不得使用香水或者其他有刺激性气 味的物品。池壁标记物体的位置在同一实验中保持 固定,不要随意改变实验室中物品的位置。实验人 员将小鼠放入水池后,立即离开所站立的位置,防止 小鼠将实验人员误认为标记物。

1.3.1 空间记忆采集实验(acquisition trial) 用于 测量小鼠在水迷宫中的学习和记忆能力。实验历时 6天。实验开始前半小时将小鼠置水迷宫所在房间 以适应环境。每天每只小鼠训练4次,每次以半随 机(semi-random)方式选择入水点(见表 1),实验者将 小鼠以手托起令其面向池壁,轻轻放入水中。小鼠 在60 s内能寻找到平台,则记录其搜寻并登上平台所 需要的时间,即潜伏期(latency)。若小鼠在60 s内 未能找到平台,则由实验者用手将其引导至平台,潜 伏期记为60s。小鼠登上平台后,让其在平台上停 留 30 s, 以让其根据 4 个象限的参照物(图 1,\* 所示) 来进行空间学习和记忆,并减少小鼠紧张。每次训 练完成后,用干毛巾将小鼠擦干,并用加热器将小鼠 烘干,以防止低体温造成的应激。每只小鼠总计训 练24次。计算每天各组小鼠潜伏期、游泳距离、 平均游泳速度和探索模式。

1.3.2 空间探索实验(probe/retention trial) 用干测 量动物对平台的空间位置的记忆能力。在第7天撤 除平台,随机选择一个入水点,将小鼠置于水中,游 泳 60 s, 期间测量: (1)目标象限(target quadrant, 即原 平台所在象限)滞留时间占总时间百分比;(2)游泳路 程; (3)平均游泳速度; (4)搜索策略。

### 2 结果

现以目前生命科学研究中最常用的C57和

### 2.1 水迷宫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。

经过6天的训练,两个鼠种寻找平台的潜伏期明 显缩短,从训练的第2天起C57潜伏期显著低于 129Sv 小鼠(图 2A)。游泳总路程越来越短(图 2B)。 而两者平均游泳速度也呈降低趋势(图 2C)。小鼠在 目标象限滞留时间占总时间百分比随实验时间增长

# 2.3 空间探索实验

小鼠对平台搜索一般可分为三种策略[7]:1)空间 策略(spatial strategy); 2) 系统搜索策略(non-spatial systematic strategy); 3) 重复环绕策略(repetitive looping strategy)。空间策略是指小鼠直接游向平台、最多 用一圈路程便游向平台或者直接游向目标象限的模 式。系统非空间搜索策略指的是小鼠系统地搜索水 池而没有对目标象限的清晰空间定位,属于一种"地 毯式"搜索。而重复环绕策略是指小鼠不停地以环 状轨迹沿着水池边游泳的模式来搜索平台。小鼠游泳 轨迹通过软件可作搜索策略分类,两个鼠种每天搜索策 略占总策略的百分比分布图分别见图 3A、图 3B。对 7天内小鼠所有的搜索策略统计(图4)可见129Sv以重 复环绕策略为主, 而C57以空间策略为主, 两者之间有 显著差异(P<0.01)。两者典型搜索轨迹分别见图 3C、 图 3D。平台穿越次数(图 5A)是一个 MWM 常用的评 分指标,两个鼠种间无明显差异。目标象限时间占总 搜索时间百分比见图 5B, 129Sv 小鼠显著高于 C57 小 鼠。而C57小鼠总游泳路程及平均游泳速度显著高于

表1 Morris 水迷宫空间记忆采集(隐藏平台寻找实验)实验起始象限 
 Table 1
 Morris water maze spatial (hidden platform) start positions

	空间记忆采集实验(Spatial acquisition)			
实验日	第1次实验	第2次实验	第3次实验	第4次实验
Day	Trial 1	Trial 2	Trial 3	Trial 4
1	Е	S	W	Ν
2	S	W	Ν	Е
3	W	Ν	Е	S
4	Ν	Е	S	W
5	Е	S	W	Ν
6	S	W	Ν	E

#### 2.2 空间记忆采集实验

而增加(图2D)。

N (north), E (east), S (south), W (west).



图 2 空间记忆采集实验训练6天结果(数据表示为均数±标准误)
 A: 潜伏期 (s); B: 总路程 (cm); C: 平均泳速 (cm/s); D: 目标象限滞留百分比(%)。\*P<0.05; \*\*P<0.01。</li>
 Fig. 2 Acquisition trials over 6 days of training (data expressed as means ± SEM).
 A: latency (s); B: path length (cm); C: swim speed (cm/s); D: Percent time in target quadrant (%).\*P<0.05; \*\*P<0.01.</li>

129Sv小鼠(图5C、图5D, P<0.01)。

# 3 讨论

水迷宫实验有许多种,但是只有 MWM 可以简称为水迷宫实验<sup>[5]</sup>,这也说明该实验的重要性。自发明以来, MWM已成为分析鼠类动物空间学习和记忆行为的一个有效工具<sup>[1]</sup>。海马是记忆形成的重要结构<sup>[8,9]</sup>,因此 MWM 也被广泛用于海马功能研究<sup>[10]</sup>。 另外 MWM 还被应用于研究化学因素和药物对学习和记忆功能的影响<sup>[11-13]</sup>,也被应用于管理毒理学 (regulatory toxicology)领域以研究毒性物质对生物体的影响<sup>[14]</sup>。

空间记忆采集实验和空间搜索实验是MWM最 基本的实验<sup>[5]</sup>,水迷宫还可以进行空间逆转实验 (spatial reversal)、空间双逆转加小平台实验(spatial double-reversal with a smaller platform)、重复学习 (repeated learning)、信号学习(cued learning)、辨 别学习(discrimination learning)等<sup>[5]</sup>多种任务。存在 一些影响水迷宫实验的因素:动物性别、年龄、种 属、背景、健康状态、实验给小鼠带来的应激、 小鼠必须学会实验的规则(在隐藏平台上等待"救 援")及理解如何得到救援<sup>[15]</sup>。这也是该实验需要 连续多日训练的原因。通常研究者用 2~3 天的时间 对小鼠进行训练<sup>[5]</sup>,而作者在预实验中发现,小鼠3天 对于水迷宫任务的学习是不够的,故本实验训练 6 天。实验中,作者对 MWM 的细节做了一些调整:使 用的是安全无毒的染料(钛白粉)来让水池中的水呈白 色从而和实验鼠的毛色形成鲜明对比。Morris<sup>[11]</sup>用 的是白色的大鼠,所以将其头部染黑,用牛奶来让池 水染成白色;作者在预实验中发现染发剂多数会造成



图3 两种小鼠7天实验期间搜索策略分布

A: 129Sv 小鼠搜索策略; B: C57 小鼠搜索策略; C: 129Sv 小鼠典型游泳轨迹; D: C57 小鼠典型游泳轨迹。

Fig. 3 Distribution of search strategies used by mice over 7 days of trials

A: search strategies employed by 129Sv mice; B: search strategies employed by C57 mice; C: typical swim-tracking path employed by 129Sv mice; D: typical swim-tracking path employed by C57 mice.





# Fig. 4 Average percent search strategies of 7 days of testing in 2 mice strains

Data expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*P < 0.01.

12

实验动物过敏,而且染毛也是对动物的一个应激,所 以尽量避免对实验动物毛发进行染色;而牛奶虽然安 全无毒,且多数研究者用脱脂奶粉来染池水,但由于 水温要保持22~24℃,使用奶粉易变质,实验持续多 日若每天更换成本过高,故本实验尝试用钛白粉进行 池水染色,实践中发现其价廉且安全可靠。在MWM 实验中,需注意小鼠的年龄、性别、营养及健康状 态对其行为的影响,注意每日的实验环境基本保持一 致(灯光、气味、水温及物品位置等);每次小鼠入 水的方向需保持一致(头朝标记物);实验完成后需及 时将小鼠擦干并置于加热器旁保温以减少低体温形 成的应激。

本文以C57和129Sv两种小鼠为例,进行MWM 实验,两种小鼠的潜伏期、总路程和平均游泳速度 随时间呈降低趋势,而目标象限滞留时间百分比随时 间逐渐增加(图 2)。说明两个鼠种均可以在训练期 间有效进行空间学习定位,完成寻找隐藏平台的任 务。而C57的潜伏期、目标象限滞留时间百分比表 现优于129Sv小鼠,说明C57在空间学习功能上占优 势。在搜索策略上(图 3、图 4),C57以更有效的空 间策略为主。在空间探索实验中,两个鼠种的平台



A: 平台穿越次数; B: 目标象限滞留时间百分比 (%); C: 总路程 (cm); D: 平均泳速 (cm/s)。\*P<0.05, \*\*P<0.01。 Fig. 5 Result of retention trail (data expressed as means ± SEM)

A: number of times of passing over; B: percent time in the target quadrant (%); C: path length (cm); D: swim speed (cm/s).\*P<0.05, \*\*P<0.01.

穿越次数无明显差异(图5A),这可能与小鼠探索平台 方式有关,作者在实验中观察到有些小鼠习惯用前爪 探到平台后登台,也有小鼠习惯于整个身体登台,另 外分析软件在小鼠的身体完全覆盖在原平台所在区 域才记为1次,某些小鼠的穿越次数是0,但分析其 轨迹图可见其已经穿越平台所在区域,这些小鼠可能 在其前爪探索不到平台时转而向其他方向搜索。 C57游泳速度及总路程显著高于129Sv小鼠;而从目 标象限滞留时间来看,129Sv要显著高于C57小鼠。 说明在水迷宫实验中,鼠种差异明显,C57是一个较 适合进行MWM研究的鼠种,这也与其他研究者报道 的结果一致<sup>[16,17]</sup>。

综上所述,本实验简要介绍了Morris水迷宫实验的方法,该方法用于研究小鼠在空间学习和记忆中的 表型差异,是小鼠行为学研究的重要工具。129Sv和 C57小鼠均可完成MWM任务,而C57的表现要优于 129Sv。

#### 参考文献(References)

- 1 Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. Learn Motiv 1981; 12 (2): 239-60.
- 2 Kumar A, Seghal N, Padi SV, Naidu PS. Differential effects of

cyclooxygenase inhibitors on intracerebroventricular colchicine-induced dysfunction and oxidative stress in rats. Eur J Pharmacol 2006; 551 (1-3): 58-66.

- 3 Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods 1984; 11 (1): 47-60.
- D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Rev 2001; 36 (1): 60-90.
- 5 Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc 2006; 1 (2): 848-58.
- Morris RG, Davis S, Butcher SP. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage?
   Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1990; 329 (1253): 187-204.
- 7 Brody DL, Holtzman DM. Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. Exp Neurol 2006; 197 (2): 330-40.
- 8 Martin SJ, Clark RE. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. Cell Mol Life Sci 2007; 64 (4): 401-31.
- 9 Bird CM, Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. Nat Rev Neurosci 2008; 9 (3): 182-94.
- 10 Magnusson K, Hånell A, Bazov I, Clausen F, Zhou Q, Nyberg F. Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze

performance in male rats. Neuroscience Letters 2009; 467 (3): 189-93.

- 11 Fitsanakis VA, Thompson KN, Deery SE, Milatovic D, Shihabi ZK, Erikson KM, *et al.* A chronic iron-deficient/high-manganese diet in rodents results in increased brain oxidative stress and behavioral deficits in the morris water maze. Neurotox Res 2009; 15 (2): 167-78.
- 12 Park SJ, Kim DH, Lee IK, Jung WY, Park DH, Kim JM, et al. The ameliorating effect of the extract of the flower of *Prunella vulgaris* var. lilacina on drug-induced memory impairments in mice. Food Chem Toxicol; 48 (6): 1671-6.
- 13 Su J, Sripanidkulchai K, Wyss JM, Sripanidkulchai B. Curcuma comosa improves learning and memory function on ovariectomized rats in a long-term Morris water maze test. J Ethno-

pharmacol; 130 (1): 70-5.

- 14 Onishchenko N, Tamm C, Vahter M, Hokfelt T, Johnson JA, Johnson DA, *et al.* Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. Toxicol Sci 2007; 97 (2): 428-37.
- 15 Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. Cognitive Brain Res 1996; 3 (3-4): 167-81.
- 16 Voikar V, Koks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. Physiol Behav 2001; 72 (1-2): 271-81.
- 17 Wolff M, Savova M, Malleret G, Segu L, Buhot MC. Differential learning abilities of 129T2/Sv and C57BL/6J mice as assessed in three water maze protocols. Behav Brain Res 2002; 136 (2): 463-74.

# Morris Water Maze in the Analysis of Mouse Phenotype

Wei-Gang Wang<sup>1</sup>, Jia-Bin Zhou<sup>2</sup>, Ming-Li Zhu<sup>2</sup>, Ying-Han Wan<sup>2</sup>, Hui-Min Yan<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; <sup>2</sup>Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

**Abstract** This article presented the basic protocal of the Morris water maze. MWM is widely used to study spatial learning and memory in the rodents. Animals are put into the pool of opaque water where they are trained to escape to a hidden platform in the navigation of visually distinct cues for 6 days (acquisition). At the 7 th day, the platform was removed. Animals will search for the missing platform (retention). A good performance in the learning and memory test was established in both strains. C57 mice showed better performances in the trail. Taken together, MWM plays an important role in the analysis of mouse phenotype.

**Key words** Morris water maze; mouse; cognitive function; spatial learning and memory

Received: November 7, 2010 Accepted: December 16, 2010

This work was supported by the National High-tech R&D Program of China (No.2008AA02Z126)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: 86-21-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@hotmail.com