

专题介绍

小鼠动物实验方法系列专题(七)

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。

旷场实验在小鼠行为分析中的应用

王维刚^{1,2} 刘震泽² 吴文婷³ 万颖寒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 旷场实验是一个研究小鼠自发活动与探索行为的实验。该文以*GAT1*基因敲除小鼠为例介绍了旷场实验的原理和实验步骤。将小鼠置于箱型的旷场装置中,通过录像记录并分析小鼠在旷场中的活动。结果发现,*GAT1*基因敲除小鼠的自发活动与野生型小鼠无明显差异,而*GAT1*敲除小鼠的趋避性及焦虑水平较低。旷场实验简单、有效,是一项重要的行为学实验。

关键词 旷场实验;行为学; γ -氨基丁酸转运蛋白1;自发活动;焦虑

旷场实验(open field test, OFT)是一个常用的小鼠行为学实验。OFT可以检测小鼠自发活动行为(locomotor activity)和探索行为(exploratory behavior)。该实验历史悠久,是1934年由Hall等^[1]研究者发明,最初应用在大鼠中,后推广到小鼠及其他动物上。其原理基于动物有畏惧空旷场地的天性,其活动具有趋避性(thigmotaxis)^[2];而另一方面,面对新事物又会产生好奇心去探究新场所。目前,常用的OFT系统是一个方形的箱子(也有实验者设计为圆形“斗兽场”样),小鼠在旷场(open field, OF)内可以自由活动,箱子顶部置摄像机来记录小鼠活动^[3]。OFT是用于评价动物自发活动以及焦虑状态的经典行为学实验。

目前, OFT的应用非常广泛,贯穿于小鼠行为学研究中,并推广到神经学与精神药理学研究中^[4],以抗精神病药物为例, OFT一般用来检测药物的副作用(如对行动的影响、睡眠等)^[5]。目前,在行为学研究中, OFT往往是用来做对照,以反映实验动物的自发活动行为^[6]。因其实验操作简单,所得数据量丰富,一次实验就可以对动物的自发活动、探索行为及焦

收稿日期: 2011-07-18 接受日期: 2011-08-08

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

虑、抑郁状态进行定量评价,在药物的研究与开发中得到广泛应用。

GABA转运蛋白(GABA transporters, GATs)分布在细胞膜上,主要与突触中神经递质 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的再摄取有关^[7]。GABA是中枢神经系统主要的抑制性神经递质^[8]。GABA能神经系统在焦虑与抑郁等心理疾病的发病中起到重要作用^[9]。目前的研究发现, GAT有4个亚型, *GAT1*是最重要的亚型,分布在神经突触及突触外^[10]。为了系统研究*GAT1*基因功能,本课题组前期制作了*GAT1*基因敲除小鼠并在酒精依赖^[11]及焦虑抑郁^[12]等方面做了一些研究,发现了小鼠因*GAT1*基因敲除而产生了丰富的行为学表型,是一个较佳的研究模型。本文使用OFT对*GAT1*基因敲除小鼠的自发活动进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

旷场实验动物行为学分析系统(上海移数信息科技有限公司)。该仪器主要由一个尺寸为25 cm×

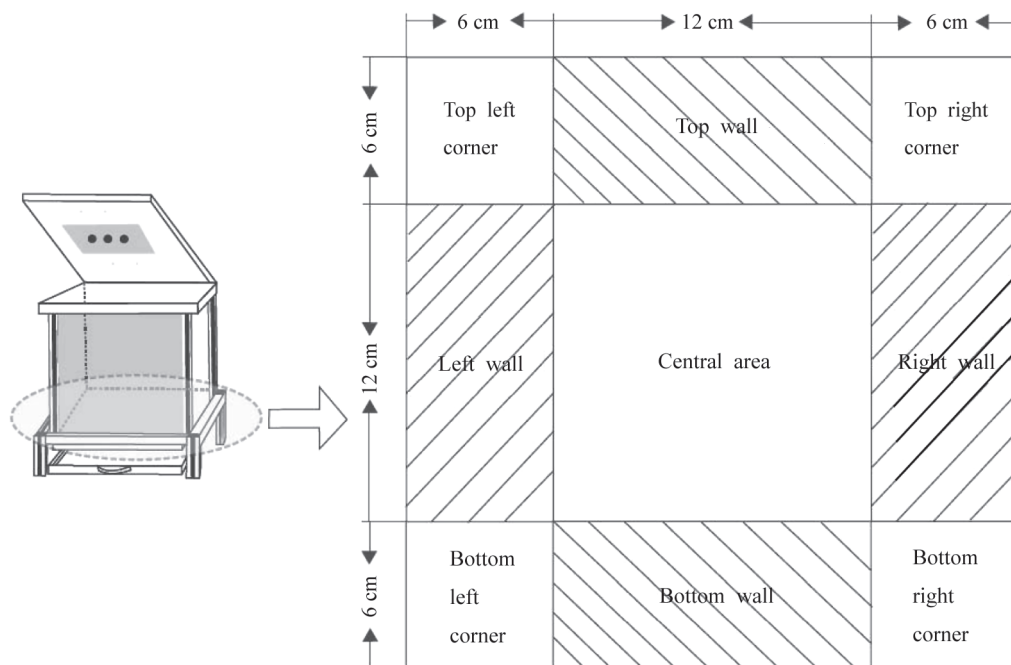
25 cm×38 cm的封闭箱子组成,箱子顶部中央安置有摄像机,与记录系统相联接,记录小鼠在旷场中的行为,小鼠进入OF后,关闭上盖以使OF内光线较暗(星光条件),箱子底部被划分为左上、左下、右上、右下约6 cm×6 cm面积的四个角(corner),上、下、左、右约12 cm×6 cm面积的四个边(wall),箱子中央区约12 cm×12 cm区域为中央区(central area),四个角与四个边组成周边区(out ring),软件可在图像上区分上述区域, OFT系统示意图见图1。实验数据由OFT记录和采集相关软件分析记录。

1.2 实验动物

健康*GAT1*基因敲除小鼠及其同窝野生型对照小鼠由上海南方模式生物研究中心提供,各20只,均为雄性,10周龄,体重23~28 g。小鼠饲养在恒温(21~22 °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OF装置是清洁、无味道的(尤其注意彻底清理上次实验留下的小鼠的粪便、



左: 系统为封闭箱型,箱子顶部置摄像机记录动物行为;右: 旷场被分为四角、四边和中央区。

Left: OF system is a closed box with camera on its ceiling; Right: schematic representation of the open field showing the three different areas (corners, walls and central area) in which the various behaviors were recorded.

图1 旷场系统示意图

Fig.1 System of the open field system

尿液等), 实验者在操作软件中记录小鼠的编号、日期、状态; 其次, 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小时左右, 减少动物紧张; 将小鼠从笼内取出(小鼠背向实验者), 将小鼠放置在OF装置中央, 实验者迅速、轻柔关闭OF上盖; 打开录像记录系统, 记录小鼠在OF内的活动, 总时间15分钟; 最后, 实验结束后将小鼠放回笼内; 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

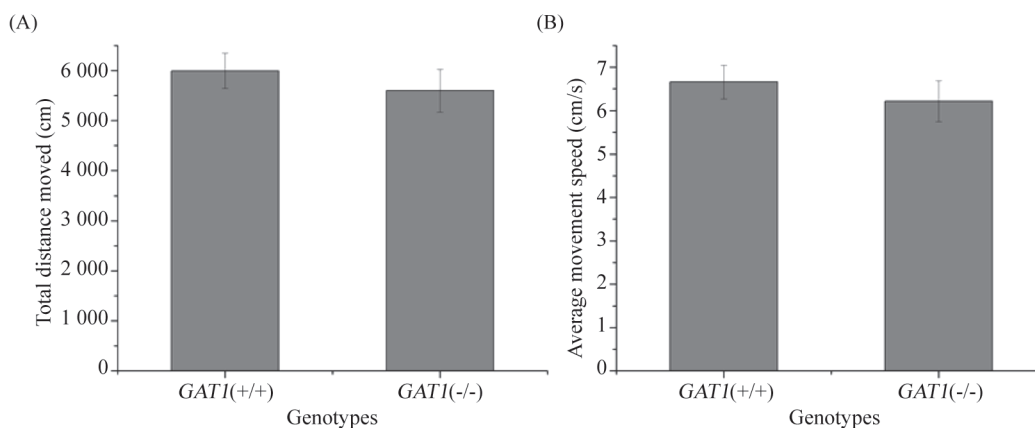
现以*GAT1*基因敲除小鼠(*GAT1*^{-/-})及其同窝野生型对照(*GAT1*^{+/+})为例, 应用OF实验检测两种基因型小鼠的自发活动。

2.1 总体活动情况

GAT1^{-/-}在OF中15分钟内活动总路程为(5 992.82±351.63) cm, *GAT1*^{+/+}总路程为(5 596.00±424.43) cm, 二者无显著差异($P>0.05$, 图2A)。两者在OF中的平均速度分别为(6.66±0.39) cm/s和(6.22±0.47) cm/s ($P>0.05$, 图2B)。

2.2 周边区活动情况

四个角和四个边共同组成周边区。*GAT1*^{-/-}小

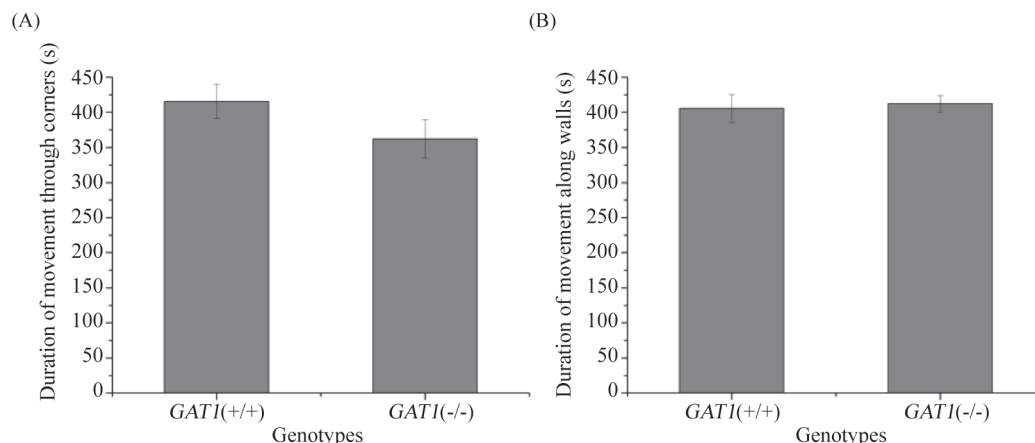


A: 总路程; B: 平均速度。数据表示为均数±标准误, $n=20$ 。

A: total distance moved; B: average movement speed. Data expressed as means±SEM, $n=20$.

图2 旷场内小鼠活动整体情况

Fig.2 Activity in the OFT



A: 四角活动时间; B: 四边活动时间。数据表示为均数±标准误, $n=20$ 。

A: duration of movement through corners; B: duration of movement along walls. Data expressed as means±SEM, $n=20$.

图3 边、角活动情况

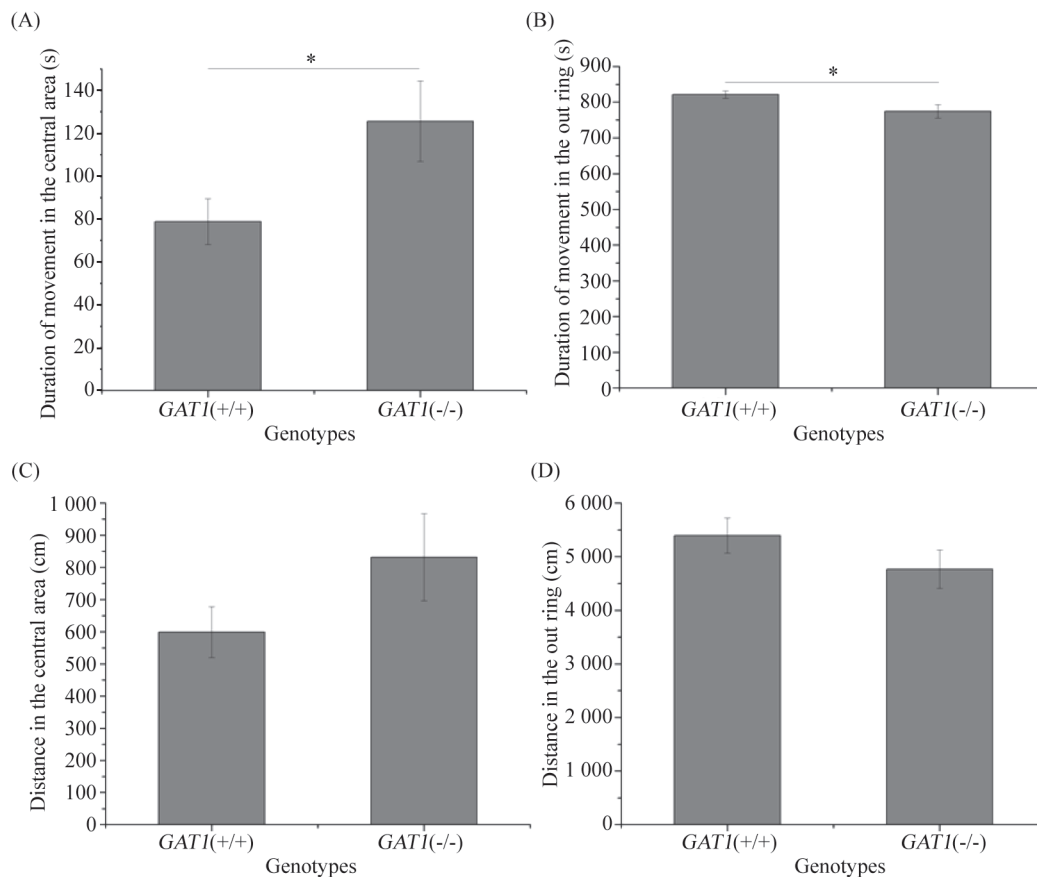
Fig.3 Activity in the corners and walls

鼠在四个角活动时间为(415.60 ± 24.53) s, $GAT1^{+/+}$ 为(362.28 ± 27.45) s, 两者无显著差异($P > 0.05$, 图3A), 四个边活动时间 $GAT1^{-/-}$ 为(405.58 ± 19.92) s, $GAT1^{+/+}$ 为(412.12 ± 11.74) s, 两者无显著差异($P > 0.05$, 图3B)。

2.3 中央区活动情况

$GAT1^{-/-}$ 中央区活动时间(125.59 ± 18.77) s显著($P < 0.05$)大于 $GAT1^{+/+}$ (78.82 ± 10.62) s (图4A); 周边区

活动时间 $GAT1^{-/-}$ 为(774.41 ± 18.77) s, 显著($P < 0.05$)小于 $GAT1^{+/+}$ (821.18 ± 10.62) s (图4B)。两种基因型小鼠的中央区路程分别为 $GAT1^{+/+}$ (598.77 ± 79.31) cm, $GAT1^{-/-}$ (831.57 ± 135.45) cm两者无显著差异($P > 0.05$, 图4C)。两者周边区路程分别为 $GAT1^{+/+}$ (5394.04 ± 328.30) cm, $GAT1^{-/-}$ (4764.44 ± 360.20) cm, 两者无显著差异($P > 0.05$, 图4D)。



A: 中央区活动时间; B: 周边区活动时间; C: 中央区路程; D: 周边区路程。* $P < 0.05$, 数据表示为均值 $\pm$ 标准误, $n=20$ 。

A: duration of movement in the central area; B: duration of movement in the out ring; C: distance in the central area; D: distance in the out ring. * $P < 0.05$. Data expressed as means $\pm$ SEM, $n=20$.

图4 中央区与周边区活动

Fig.4 Activity in the central area and out ring

3 讨论

本文以 $GAT1$ 基因敲除小鼠及其同窝野生型小鼠为例介绍了OFT的应用。总路程和平均速度被视为反映小鼠自发活动的主要数据^[13], 两种基因型在OF中无明显差异($P > 0.05$, 图1), 说明两种基因型小鼠自发活动无明显差异。OFT的设计原理是基于小

鼠的趋避性, 指的是小鼠畏惧开阔、未知、可能存在潜在危险的场所, 因而其有“贴墙”活动的天性^[14]。OFT中对趋避性的研究结果, 可以给研究者提示进行深入的焦虑、抑郁相关实验研究(如高架十字迷宫等行为学实验)^[15]。趋避性是以小鼠在OF周边区(四个角和四个边)活动的总时间来评价的^[16]。本实

验发现, $GAT1^{-/-}$ 小鼠与 $GAT1^{+/+}$ 在OF的边、角区域活动无明显差异($P>0.05$, 图3); 而对于反映趋避性的周边区活动时间上看, $GAT1^{-/-}$ 小鼠较野生型要显著($P<0.05$, 图4B)减少, $GAT1^{-/-}$ 小鼠更富有“冒险”倾向, 在中央区活动时间显著增多($P<0.05$, 图4A)。这说明 $GAT1^{-/-}$ 小鼠趋避性及焦虑水平较低。而中央区 and 周边区活动路程两种小鼠无明显差异($P>0.05$, 图4C和图4D)。 $GAT1$ 主要功能为GABA的再摄取^[17], 基因敲除之后, GABA再摄取减少, 从而影响了小鼠焦虑与抑郁状态, 达到抗抑郁效果, 与地西洋(减少或拮抗GABA的合成)的作用效果类似^[12]。

OFT实验操作简单, 应用广泛, 但同样需要注意其结果易受到以下因素影响。小鼠相关因素: 实验前动物饲养环境、动物性别、背景、是否伴随应激(饮水及食物剥夺)及昼夜节律等。由于目前基因工程小鼠在繁育过程中涉及不同小鼠背景, 因此必须注意实验中的小鼠背景, 必要的时候需繁殖育种进行背景纯化, 为了实验结果的可信, 本实验中的 $GAT1$ 基因敲除小鼠是与C57BL/6J背景小鼠回交10代以上得到的杂合子($GAT1^{+/-}$)小鼠的后代。实验中小鼠的周龄和性别需要保持一致, 因雌鼠有动情周期, 激素水平可能会影响行为, 故本实验选择的是成年雄鼠。最后, 实验前一定仔细检查小鼠的健康状态, 避免小鼠疾病影响实验结果。实验装置相关因素: OF的形状、体积、实验持续时长、数据采集方式(摄像系统或红外系统)等^[3]。本实验所得平均速度和总路程与Liu等^[12]得到结果不一致, 可能因为采用了不同的实验装置, OF尺寸、照明情况、实验时长、数据采集软件都不同。本实验中的OF装置使用了微光(OF上盖关闭), 可以减少强光给予小鼠的应激, 更符合小鼠在自然界的照明条件; Liu在实验中选择的是较明亮的照明, 易导致野生型小鼠焦虑而减少活动, 而 $GAT1^{-/-}$ 焦虑状态较轻, 可能因此所得结果与本文不一致。实验者相关因素: 实验前注意小鼠在行为学研究房间的适应, 并注意小鼠的昼夜节律, 尽量选择同一时间段进行实验。同一批实验由同一实验者操作, 使用同样的方式抓取小鼠, 手势轻柔, 放置在OF中, 迅速安静关闭OF上盖, 离开实验环境。以上因素在OFT实验时值得注意。

OFT实验历史悠久, 用来检测抗抑郁与焦虑药物时, 具有很好表面效度(face validity)^[18], 其结果与高架十字迷宫具有一致性, 两者的结果可以相互印

证。自发明以来, OFT得到了广泛的应用, 可以作为其他行为学实验的对照实验、研究焦虑和抑郁的实验、研究探索行为的实验。研究者根据不同的需要, 设计了原理一致但具体方法不同的实验。对于小鼠来说, 通常OF尺寸为25 cm×25 cm, 实验时间从10分钟到1小时, 一般每只小鼠只能做一次OFT^[3]。所得到的数据除了文中所述之外尚有后腿直立(rearing)、梳毛(grooming)等更精细的行为数据(本实验由于软件功能所限, 无法获得上述数据)。因OFT对小鼠各方面影响较小, 而其他行为学实验(比如强迫游泳、水迷宫实验等)对小鼠影响较大, 故在同一批小鼠进行不同行为学实验时, 应先进行OFT实验。

综上, 本文简要介绍了旷场实验的方法, 该实验可以研究小鼠自发活动行为、焦虑行为, 是小鼠行为学研究的重要工具。

参考文献 (References)

- 1 Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comparat Psychol* (1921) 1934; 18(3): 385-403.
- 2 Shin J, Gireesh G, Kim SW, Kim DS, Lee S, Kim YS, *et al.* Phospholipase C beta 4 in the medial septum controls cholinergic theta oscillations and anxiety behaviors. *J Neurosci* 2009; 29(49): 15375-85.
- 3 Gould TD, Gould TD. Mood and anxiety related phenotypes in Mice. *Hew Jersey: Humana Press*, 2011: 1-20.
- 4 Hart PC, Bergner CL, Smolinsky AN, Dufour BD, Egan RJ, Laporte JL, *et al.* Experimental models of anxiety for drug discovery and brain research. *Methods Mol Biol* 2010; 602: 299-321.
- 5 Han M, Deng C, Burne THJ, Newell KA, Huang XF. Short- and long-term effects of antipsychotic drug treatment on weight gain and H1 receptor expression. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33(5): 569-80.
- 6 Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry* 2010; 15(12): 1152-63.
- 7 Madsen KK, Ebert B, Clausen RP, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A, White HS. The selective GAT inhibitors tiagabine and N-[4,4-bis(3-methyl-2-thienyl)-3-butenyl]-3-hydroxy-4-(methylamino)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]isoxazol-3-ol (EF1502) exhibit mechanistic differences in their ability to modulate the ataxia and anticonvulsant action of the extrasynaptic GABAA receptor agonist gaboxadol. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338(1): 214-9.
- 8 Sumner P, Edden RAE, Bompas A, Evans CJ, Singh KD. More GABA, less distraction: A neurochemical predictor of motor decision speed. *Nat Neurosci* 2010; 13(7): 825-7.

- 9 Earnheart JC, Schweizer C, Crestani F, Iwasato T, Itohara S, Mohler H, *et al.* GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J Neurosci* 2007; 27(14): 3845-54.
- 10 Chiu CS, Jensen K, Sokolova I, Wang D, Li M, Deshpande P, *et al.* Number, density, and surface/cytoplasmic distribution of GABA transporters at presynaptic structures of knock-in mice carrying GABA transporter subtype 1-green fluorescent protein fusions. *J Neurosci* 2002; 22(23): 10251-66.
- 11 Cai YQ, Cai GQ, Liu GX, Cai Q, Shi JH, Shi J, *et al.* Mice with genetically altered GABA transporter subtype I (GAT1) expression show altered behavioral responses to ethanol. *J Neurosci Res* 2006; 84(2): 255-67.
- 12 Liu GX, Cai GQ, Cai YQ, Sheng ZJ, Jiang J, Mei Z, *et al.* Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology* 2006; 32(7): 1531-9.
- 13 Walz K, Spencer C, Kaasik K, Lee CC, Lupski JR, Paylor R. Behavioral characterization of mouse models for Smith-Magenis syndrome and dup (17) (p11.2p11.2). *Hum Mol Genet* 2004; 13(4): 367-78.
- 14 Marchei P, Diverio S, Falocci N, Fatj J, Ruiz-de-la-Torre JL, Manteca X. Breed differences in behavioural development in kittens. *Physiol Behav* 2009; 96(4/5): 522-31.
- 15 Jacob W, Yassouridis A, Marsicano G, Monory K, Lutz B, Wotjak CT. Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: Role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav* 2009; 8(7): 685-98.
- 16 Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25(3): 235-60.
- 17 Fish KN, Sweet RA, Lewis DA. Differential distribution of proteins regulating GABA synthesis and reuptake in axon boutons of subpopulations of cortical interneurons. *Cereb Cortex* 2011; doi: 10.1093/cercor/bhr007.
- 18 Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 1990; 46(3): 321-40.

The Use of Open Field Test in the Behavior Analysis of Mice

Wang Weigang^{1,2}, Liu Zhenze², Wu Wenting³, Wan Yinghan³, Yan Huimin^{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 open field test (OFT) is a simple and reliable behavior test for rodents. Here we used it for the behavior analysis of *GAT1* mutant mice to illustrate its basic principle and protocol. Each mouse was put into the open field and its behaviors were recorded for further analysis. We found that *GAT1* knockout mice do not show any abnormalities in their locomotive activities, but they manifest lower levels of depression and anxiety-related behaviors compared to their wild type littermates. These results suggest that *GAT1* could potentially be used as a therapeutic target for the treatment of depression and anxiety.

Key words the open field test; ethology; GABA transporter 1; locomotion; anxiety

Received: July 18, 2011 Accepted: August 8, 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