

# 不同月龄对雌性 SD 大鼠学习记忆 相关行为及海马 TREM2 表达的影响

韩引秀, 陈征, 崔珍, 燕怡青, 刘婉玉, 王凌, 葛金芳

**摘要 目的** 观察不同月龄对雌性 SD 大鼠焦虑、绝望及学习记忆能力的影响, 并探讨其可能的神经生物学机制。 **方法**

2 月龄和 6 月龄雌性 SD 大鼠各 9 只, 适应性饲养 1 周后进行行为学实验, 包括旷场实验、高架十字迷宫实验、Morris 水迷宫实验、Y 迷宫实验和强迫游泳实验。Western blot 方法检测两组大鼠海马髓样细胞触发受体 2 (TREM2) 的蛋白表达。 **结果** 两组大鼠在旷场实验和强迫游泳实验中的表现差异无统计学意义。与 2 月龄 SD 雌鼠比较, 6 月龄 SD 雌鼠在高架十字迷宫实验中开臂的停留时间和移动距离增加; 在 Morris 水迷宫定位航行实验中的逃避潜伏期显著缩短 ( $P < 0.05$ ), 而在空间搜索实验中目标象限停留时间显著延长 ( $P < 0.05$ ); 在 Y 迷宫中的新臂优先指数显著增加 ( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示, 6 月龄 SD 雌鼠海马 TREM2 表达较 2 月龄组显著降低。Pearson 相关性检验结果表明, 海马 TREM2 的表达与大鼠在 Morris 水迷宫空间搜索实验中的目标象限游泳距离呈负相关性 ( $r = -0.724, P = 0.042$ )。 **结论** 与 2 月龄 SD 雌鼠相比, 6 月龄 SD 雌鼠的探究行为增多、学习记忆能力增强, 其机制可能与海马 TREM2 表达降低有关。

**关键词** Morris 水迷宫; Y 迷宫; 学习记忆; 月龄

**中图分类号** R 964

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0010-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.003

随着生活节奏的加快和人口老龄化趋势的增加, 抑郁症和老年性痴呆等神经精神疾病已发展为威胁人类健康的公共卫生问题。建立可靠的动物模型以探索其发病机制成为公共卫生领域和神经精神学科的重要研究方向。SD 大鼠以数量多、繁殖快、适应力强等特点, 成为药理、毒理、药效及 GLP 实验研究中常用动物, 采用行为学实验观察 SD 大鼠的

情绪及学习记忆能力是神经药理实验常用方法<sup>[1-2]</sup>。Benice et al<sup>[3]</sup>研究表明, 性别和年龄因素均可影响小鼠的学习记忆。而目前的研究<sup>[4-5]</sup>中考察年龄因素影响多使用雄性实验动物, 且多关注青年或中年实验动物与老年实验动物的差别。

研究<sup>[6]</sup>显示, 髓样细胞触发受体 2 (triggering receptors expressed on myeloid cells 2, TREM2) 是阿尔茨海默病的高风险基因, tau 蛋白过磷酸化、神经元凋亡及突触前蛋白 SNAP25 下调等密切相关<sup>[7]</sup>。提示 TREM2 的失衡在学习记忆损伤的影响。基于本课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>显示, 综合女性抑郁或认知障碍的发病率远远高于男性的文献报道<sup>[10]</sup>, 该研究以 2 月龄和 6 月龄雌性 SD 大鼠为实验对象, 观察不同月龄对神经精神行为的影响及海马 TREM2 的蛋白表达, 为抑郁症和老年痴呆模型的建立、机制研究及药物开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 2 月龄和 6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠各 9 只, 购自安徽省实验动物中心。适应性饲养 1 周后开始行为学检测。

**1.1.2 主要试剂** 一抗 Sirt1 (美国 Cell Signaling Technology 公司);  $\beta$ -actin (北京博奥森生物技术有限公司); 二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.1.3 主要仪器** Western blot 相关仪器设备 (美国 Biorad 公司)。

**1.2 方法** 采用行为学方法检测, 行为学实验参照本课题组常规方法在本院神经药理学实验室独立进行<sup>[11-12]</sup>, 实验期间暗光照明且摄像机实时记录。实验结果采用 Any-maze 行为学分析软件分析。

**1.2.1 旷场实验** 黑色旷场高 30 cm, 为一边长 100 cm 的正方形封闭区域。用白线将其划分为 16 个面积大小相等的正方形方格。中间 4 个方格定义为中央区域, 外周 12 个则为周围区域。将大鼠面壁由任一角落放入旷场中自由活动 5 min, 记录并分析

2017-07-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: 81401122); 安徽省自然科学基金 (编号: 1408085MH154)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 韩引秀, 女, 硕士研究生;

葛金芳, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gejinfang@ahmu.edu.cn

其活动距离、中央区域停留时间、直立次数及理毛次数。

**1.2.2 高架十字迷宫实验** 高架十字迷宫离地 50 cm,由 2 个开放臂 45 cm × 10 cm × 30 cm、2 个闭合臂 45 cm × 10 cm × 30 cm 和 1 个中间区 4 cm × 4 cm 组成。实验时每只大鼠放在中间(头朝开放臂),允许其自由探索 5 min,记录并分析其不同区域的停留时间、活动距离及潜伏期。

**1.2.3 Morris 水迷宫实验** 迷宫为一圆形池,内壁呈黑色,∅ 1.6 m、高度为 50 cm。实验期间注入水并用食用色素将池水染成黑色,保持水深 30 cm、水温(22~23)℃,实验期间平台位置及迷宫外参照物保持不变,实验的迷宫被划分为四等分区域,依次定义为第一、二、三、四象限,实验分定位航行和空间搜索两部分。定位航行期间大鼠连续接受为期 3 d 的训练,每天 4 次,记录大鼠 60 s 内分别从 4 个不同象限入水点入水找到平台所需的时间,即逃生潜伏期,4 次实验的平均成绩记为当日最终成绩,进入最后统计。第 4 天进行空间搜索实验,即撤除平台,从平台的对侧象限入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 60 s 内的游泳轨迹并进行分析。

**1.2.4 Y 迷宫** Y 迷宫由一个中心区域和周围连接的三条完全相同的封闭臂 48 cm × 10 cm × 20 cm 组成,三臂互为 120°角,呈三等分辐射状。将其中一个臂封闭起来作为新异臂,另外两个臂中固定放入动物的为起始臂,则余下一个为熟悉臂。正式实验之前需先进行训练期实验,训练期将大鼠放入起始臂,使其在起始臂和熟悉臂探索 10 min。24 h 后进入检测期实验,此时开放新异臂,允许大鼠自由探索 5 min,记录并分析大鼠的运动轨迹,根据公式计算新异臂优先指数。新异臂优先指数 = 新异臂停留时间/熟悉臂停留时间。

**1.2.5 强迫游泳实验** 大鼠强迫游泳实验装置为一个高 60 cm,∅ 25 cm 的圆柱型透明容器,实验时控制水温在(22~23)℃,水深 30 cm。每只大鼠游泳 5 min,观察指标包括:① 不动时间:指大鼠基本不做主动的活动,身体基本呈笔直状态漂浮不动,仅在必要的时候用后肢碰触底面避免窒息,水面平静无起伏;② 挣扎时间:指大鼠积极主动的活动,四肢无秩序运动,尤其前爪在水面上不断运动,努力向桶壁上方挣扎,水面起伏不停;③ 游泳时间:指大鼠在桶内主动的环绕游泳,身体弯曲,背部拱起。

**1.3 Western blot 方法检测大鼠海马 TREM2 的表达** RIPA 裂解液裂解右侧海马,匀浆后进行蛋白

定量。取匀浆后,等量组织加入蛋白变性剂,在沸水中煮沸 10 min 进行蛋白变性。变性后取 50 μg 蛋白用 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分离、转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,孵育相应一抗(TREM2 及 β-actin 浓度均为 1:1 000)并 4℃过夜、洗脱后加二抗 37℃孵育 2 h,洗脱后 ECL 显色、曝光并进行定量分析。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。Morris 水迷宫中大鼠逃避潜伏期的比较采用重复测量的单因素方差分析,其余变量的组间比较采用 student's *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同月龄对 SD 雌鼠在旷场实验中表现的影响** 2 月龄大鼠在旷场实验中的活动总距离平均 21.8 m,平均速度 7.2 s,中央停留时间平均 2.9 s,直立次数平均 26.0 次,理毛次数平均 1 次;6 月龄大鼠在旷场实验中的活动总距离平均 21.9 m,平均速度 7.3 s,中央停留时间平均 5.7 s,直立次数平均 27.6 次,理毛次数平均 2 次。可见,两组大鼠在旷场实验中的活动距离和速度差异无统计学意义,与 2 月龄相比,6 月龄 SD 雌鼠的中央停留时间、直立次数和理毛次数均有增加趋势,但两组间差异无统计学意义。

**2.2 不同月龄对 SD 雌鼠在高架十字迷宫实验中表现的影响** 与 2 月龄 SD 雌鼠比较,6 月龄 SD 雌鼠在开臂的停留时间(图 1A)和活动距离(图 1B)显著增加,但进入开臂和闭臂的潜伏期无显著差异(图 1C)。

**2.3 不同月龄对 SD 雌鼠在 Morris 水迷宫实验中表现的影响** 两组大鼠在 Morris 水迷宫定位航行实验中找到水下平台所需时间(逃生潜伏期)(图 2A)。重复测量的单因素方差分析结果表明,实验天数( $F = 19.697, P < 0.001$ )和月龄( $F = 6.956, P = 0.018$ )均对 SD 雌鼠的逃生潜伏期有显著影响。两者之间无交互效应。与 2 月龄 SD 雌鼠比较,6 月龄 SD 雌鼠的逃生潜伏期缩短。

空间搜索实验结果表明,两组大鼠在 1 min 自由游泳时间内的游泳总距离和游泳速度差异无统计学意义。与 2 月龄 SD 雌鼠比较,6 月龄 SD 雌鼠在目标象限(定位航行实验中逃生平台所在象限)的停留时间和游泳距离均显著增加(图 2B、2C)。提示 6 月龄 SD 雌鼠的学习记忆能力优于 2 月龄 SD

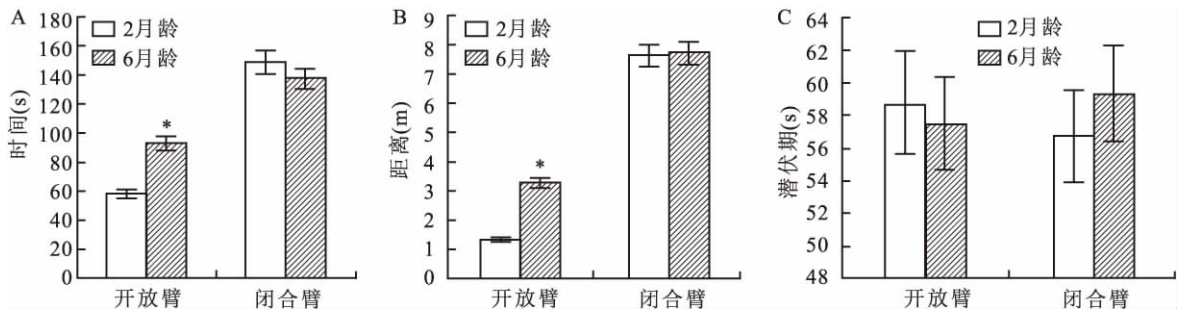


图1 不同月龄SD雌鼠在高架十字迷宫实验中的表现

A: 停留时间; B: 移动距离; C: 潜伏期; 与2月龄组比较: \* P < 0.05

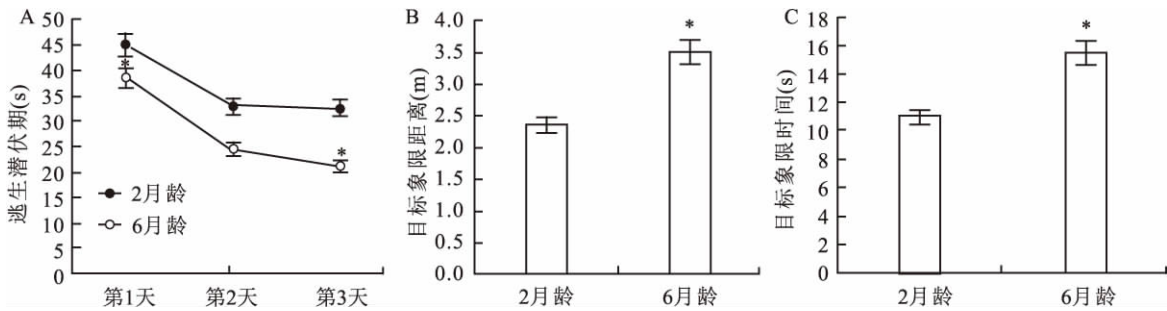


图2 不同月龄SD雌鼠在Morris迷宫实验中的表现

A: 定位航行实验的逃生潜伏期; B: 探索实验的目标象限游泳距离; C: 探索实验的目标象限停留时间; 与2月龄组比较: \* P < 0.05

雌鼠。

**2.4 不同月龄对SD雌鼠在Y迷宫实验中表现的影响** 与2月龄SD雌鼠比较,6月龄SD雌鼠在Y迷宫实验中的新异臂优先指数显著增加。提示6月龄SD雌鼠的学习记忆能力优于2月龄SD雌鼠。见图3。

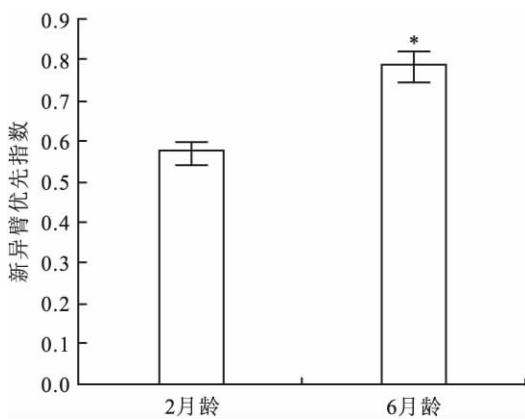


图3 不同月龄SD雌鼠在Y迷宫实验中的表现  
与2月龄组比较: \* P < 0.05

**2.5 不同月龄对SD雌鼠在强迫游泳实验中表现的影响** 两组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间均

较短,提示两组大鼠均无行为绝望样表现,且两组大鼠的不动时间、游泳时间和挣扎时间均差异无统计学意义。见图4。

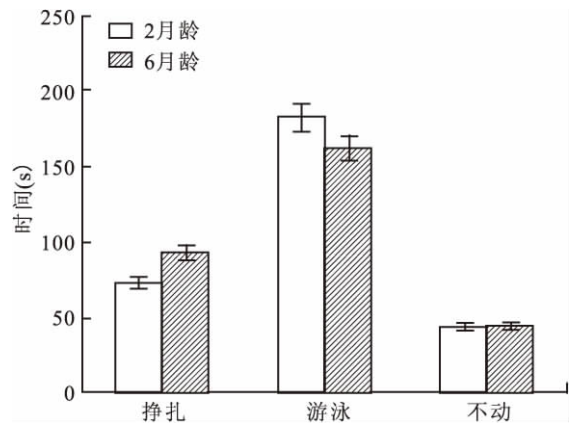


图4 不同月龄SD雌鼠在强迫游泳实验中的表现

**2.6 不同月龄对SD雌鼠海马TREM2表达的影响** 与2月龄SD雌鼠比较,6月龄SD雌鼠海马TREM2表达显著降低。Pearson检验结果表明,海马TREM2的表达与大鼠在Morris水迷宫空间搜索实验中的目标象限游泳距离呈负相关性( $r = -0.724, P = 0.042$ )。见图5。

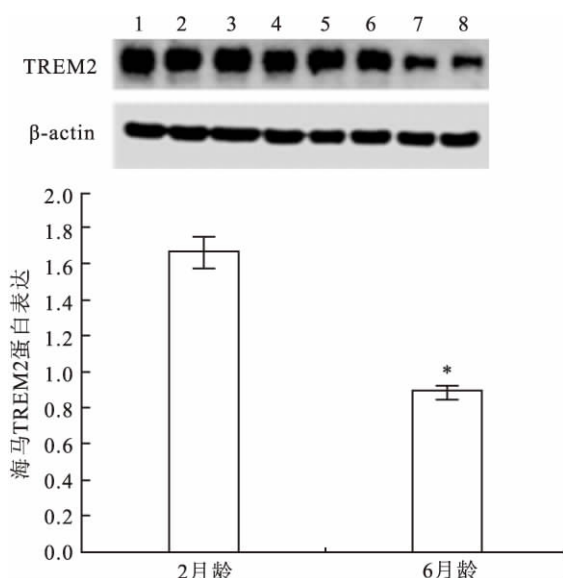


图5 不同月龄SD雌鼠海马TREM2的表达

1~4:2月龄组;5~8:6月龄组;与2月龄组比较:\* $P < 0.05$

### 3 讨论

模型动物的神经行为学实验是在神经生物学和神经药理学领域重要和常用的实验手段。除了应激刺激、药物干预等暴露因素之外,实验动物的品系、年龄、性别等自然因素也会影响到实验动物的表现。本研究以SD雌鼠为实验对象,观察不同月龄对其神经行为学的影响。

旷场实验被广泛用于检测大、小鼠的自主活动、焦虑及探究行为<sup>[13]</sup>。本研究中,2月龄和6月龄SD雌鼠在旷场实验中均适度活动,且活动距离和速度差异无统计学意义,提示两组大鼠的自主活动状态正常且无差别。与2月龄SD雌鼠比较,6月龄SD雌鼠的中央停留时间、直立次数和理毛次数均有增加趋势,但两组间差异无统计学意义。

高架十字迷宫实验是利用动物对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧,形成矛盾冲突行为来考察动物的焦虑状态<sup>[14]</sup>。通常认为,进入开放臂次数及停留时间与大鼠的焦虑情绪成负相关,进入开放臂次数越少,停留时间越短,说明老鼠的焦虑情绪越严重。本研究中,6月龄SD雌鼠在开臂的停留时间和活动距离均高于2月龄SD雌鼠,提示6月龄SD大鼠更不焦虑。除了可以评价焦虑状态之外,实验动物在开臂的活动状态也反映实验动物对新异环境的探究欲望。综合其在旷场实验中直立次数增多的行为,本研究结果显示6月龄SD雌鼠探究行为

较2月龄增多。

强迫游泳实验可检测实验动物的绝望行为,可用于抑郁症动物模型评价及抗抑郁药物筛选。本研究中,2组大鼠的不动时间均较短,且两组大鼠的不动时间、游泳时间及挣扎时间差异均无统计学意义,提示两组大鼠无行为绝望表现。

Morris水迷宫和Y迷宫是评估啮齿类动物空间学习和记忆能力的经典方法<sup>[14-16]</sup>,品系、性别和年龄均为影响其实验结果的重要因素之一<sup>[17]</sup>。本研究中,与2月龄SD雌鼠比较,6月龄SD雌鼠在Morris水迷宫定位航行试验中的逃生潜伏期缩短、空间探索实验中的目标象限停留时间及游泳距离增加,提示其学习记忆能力优于2月龄组。与此相一致的是,6月龄SD雌鼠在Y迷宫中的新臂优先指数也显著高于2月龄组。与此相对应,在人类的成长过程中,从少年到青壮年时期的学习记忆能力也逐渐增强,随年龄进一步增长至老年时期则学习记忆能力逐渐下降。

研究<sup>[8-9]</sup>显示,TREM2的基因多态性和表达改变与阿尔茨海默病等认知障碍性疾病的发病密切相关,阿尔茨海默病患者脑内TREM2表达上调并与神经病理学改变密切相关。本研究中,6月龄SD雌鼠海马TREM2表达低于2月龄组,且与大鼠在Morris水迷宫空间探索实验中的目标象限游泳距离成负相关,进一步证实TREM2在学习记忆中的作用。

综上所述,与2月龄SD雌鼠比较,6月龄SD雌鼠的探究行为增多,学习记忆能力增强,其机制可能与两组大鼠海马TREM2的表达差异有关。然而,本研究的不足在于没有同时观察模拟人类老龄阶段的SD雌鼠行为学改变,也没有同时关注性别差异。这些因素有待于以后的研究中进一步观察和分析。

### 参考文献

- [1] Russo E, Citraro R, Davoli A, et al. Ameliorating effects of aripiprazole on cognitive functions and depressive-like behavior in a genetic rat model of absence epilepsy and mild-depression comorbidity [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 64: 371-9.
- [2] Chen Z, Xu Y Y, Wu R, et al. Impaired learning and memory in rats induced by a high-fat diet: involvement with the imbalance of nesfatin-1 abundance and copine 6 expression [J]. *J Neuroendocrinol*, 2017, 29(4).
- [3] Benice T S, Rizk A, Kohama S, et al. Sex-differences in age-related cognitive decline in 57BL/6J mice associated with increased brain microtubule-associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity [J]. *Neuroscience*, 2006, 137(2): 413-23.

- [4] Kougias D G, Hankosky E R, Gulley J M, et al. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) ameliorates age-related deficits in water maze performance, especially in male rats [J]. *Physiol Behav*, 2017, 170: 93–9.
- [5] Gocmez S S, Gacar N, Utkan T, et al. Protective effects of resveratrol on aging-induced cognitive impairment in rats [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2016, 131: 131–6.
- [6] Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2): 117–27.
- [7] Lue L F, Schmitz C T, Serrano G, et al. TREM2 protein expression changes correlate with Alzheimer's disease neurodegenerative pathologies in post-mortem temporal cortices [J]. *Brain Pathol*, 2015, 25(4): 469–80.
- [8] 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): 107–17.
- [9] Bimonte H A, Hyde L A, Hoplight B J, et al. In two species, females exhibit superior working memory and inferior reference memory on the water radial-arm maze [J]. *Physiol Behav*, 2000, 70(3–4): 311–7.
- [10] 谢双燕, 胡佳佳, 周伯荣, 等. 盐酸帕罗西汀对卵巢切除大鼠学习记忆能力及血清雌激素水平的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(11): 1602–5.
- [11] Ge J F, Xu Y Y, Qin G, et al. Nesfatin-1, a potent anorexic agent, decreases exploration and induces anxiety-like behavior in rats without altering learning or memory [J]. *Brain Res*, 2015, 1629: 171–81.
- [12] 秦干, 徐亚运, 程江群, 等. 白藜芦醇改善亚临床甲状腺功能减退症大鼠的学习记忆能力及其可能机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(3): 378–82.
- [13] Boyko M, Kutz R, Grinshpun Y, et al. Establishment of an animal model of depression contagion [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 281: 358–63.
- [14] Walf A A, Frye C A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2): 322–8.
- [15] 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): 848–58.
- [16] Deacon R M, Rawlins J N. T-maze alternation in the rodent [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 7–12.
- [17] 宿艳敏. Morris 水迷宫实验中三种小鼠的学习能力及其性别差异 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.

## Effect of aging on the learning and memory-associated behaviors and the hippocampal protein expression of TREM2 in female SD rats

Han Yinxiu, Chen Zheng, Cui Zhen, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the difference in the anxious, despair-like, and learning and memory behavior tasks between female SD rats aging 2 month and 6 month and explore the possible mechanisms. **Methods** After one week's adapt breeding, 18 female SD rats aging 2 month or 6 month were given the behavior tests including the open field test, the elevated plus maze, Morris water maze, Y maze, and the forced swimming test. The hippocampus were collected and the protein expression of triggering receptors expressed on myeloid cells 2 (TREM2) was detected *via* Western blot. **Results** There was no statistically significant difference between the two groups as regard to the moving distance, the duration in the center, and the frequencies of rearing and grooming in the open field test and the immobility in the forced swimming test. However, the sucrose preference index in the sucrose preference test, the duration in the target quadrant in the test phase of the Morris water maze ( $P < 0.05$ ), and the preference index of the novel arm in the Y maze were increased in the 6 month group as compared with the 2 month group ( $P < 0.05$ ), while the escaping latency in the Morris water maze was decreased ( $P < 0.05$ ). The hippocampal protein expression of TREM2 in the 6 month group was less intensive than that in the 2 month group. Moreover, result of Pearson test showed that the hippocampal protein expression of TREM2 was negatively correlated with the duration in the target quadrant in the test phase of the Morris water maze ( $r = -0.724, P = 0.042$ ). **Conclusion** These results indicated that the female SD rats aging 6 month have more exploring activity and better learning and memory ability than 2 month group, the mechanism of which might be associated with the decreased expression of TREM2 in the hippocampus.

**Key words** Morris water maze; Y maze; learning and memory; aging