

Y 型电迷宫在学习记忆研究方面的改良 *

冯 婷 李 峰[△] 宋月晗 刘 燕 刘思源

(北京中医药大学 北京 100029)

摘要:为进一步科学应用学习记忆的行为学方法,通过查阅近几年相关实验研究结果,结合本实验多次操作中遇到的问题及解决方法,总结并探讨 Y 型电迷宫的合理应用。Y 型电迷宫的实验器材、方法以及指标的选择都可以进一步细节化、科学化,所以进一步的实验研究以及理论研究是十分必要的。

关键词:Y 型电迷宫;学习记忆;改良

中图分类号:B848.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)06-1164-03

Y-maze Improving in the Power of Learning and Memory Research*

FENG Ting, LI Feng[△], SONG Yue-han, LIU Yan, LIU Si-yuan

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: To further apply the behavior methods of learning and memory scientifically, we accessed to relevant experimental results in recent years and integrated the problems and solutions in our multiple experiments, and finally summarized and explored the Y-maze's rational application. The experiment equipment, methods, and indicator choice of Y-maze experiment can be further detailed and more scientific. So it is necessary to make further experimental studies and theoretical studies on it.

Key words: Y-type electric maze; Learning and memory; Improvement

Chinese Library Classification: B848.6 Document Code: A

Article ID:1673-6273(2012)06-1164-03

Y 型电迷宫实验,是国内目前研究学习记忆动物实验中较常用的行为学方法,同 Morris 水迷宫一样,在生理、病理学实验中被广泛应用。由于这种方法的操作简单易行、观察指标多,近几年在血管性痴呆、脑缺血、衰老、帕金森等的发病机制、影响因素、中药和西药的作用及作用途径方面,Y 型电迷宫实验被大多数研究人员认可。但因动物个体差异大、所处的状态不同,或者研究者所选取的指标不同,都会对实验结果产生影响。本实验组在进行该方法的操作时,同样遇到令人深思的问题。在具体实验中,应该如何减少影响因素,更准确、客观地评价动物的学习记忆能力,是亟待解决的问题。

1 Y 型电迷宫的实验器材及原理

该设备由三等分辐射式迷路箱和控制仪组成。迷路箱由等长的、臂和三者的交界区组成。箱底铺设直径 0.2cm,长 14cm,间距 1cm 的电栅。臂的内壁均贴有可导电的薄层铜片。每臂长 45cm,顶端各装一盏 15W 的刺激信号灯^[1]。Y-迷宫的控制仪有电压控制按钮、延时控制按钮、自动控制按钮和、0 四个按钮,当分别按下、按钮时,相应臂的信号灯亮,此时该臂不通电为安全区(红灯区),另外无灯光的两臂及交界区均通电而成为非安全区(电击区)。按下 0 按钮,则三臂均不通电,但交界区通电。信号灯亮后,稍停片刻电栅才开始通电,这一短暂的间歇期由延时控制按钮调节。也可按自动控制按钮,使灯光和通电由控制仪自动控制。

开始训练时,大鼠受电刺激逃离起步区,如果先跑向非安全区(由于大鼠的趋暗性,此种可能性较大),在电击作用下最终会跑向安全区(被动回避反应);如果先逃离至安全区,受大鼠的探究心理影响,会跑向非安全区进行试探,最终也会在电击作用下跑向安全区。训练的起始阶段,大鼠会出现不同程度的错误次数,多次训练后,安全区灯亮,延时后电刺激尚未开始时,大鼠即直接逃离至安全区,即形成了明暗辨别条件反射(主动回避反应)。

1.1 关于迷路箱内壁

经典迷路箱的三臂内侧均贴有导电的薄层铜片。我们观察,大鼠受到电刺激后,当刺激量尚未达到能驱使其跑动的程度时,大鼠会将前爪放于内壁上以躲避电刺激,这种行为与两种因素有关:一是大鼠的探究心理、钻孔习性、前后爪对电流的感应不同。当大鼠刚感受到电刺激时,会主动探视迷路箱这个空间外部的环境,或者当上方的挡板有空隙时,也会有这种行为;二是迷路箱内壁与箱底电栅的电流强度不同。三条臂的内壁与箱底电栅是由一个控制仪操控的,从物理学角度分析,由于两者面积的不同,电栅的电流要比内壁铜片电流强度大,所以当电流不足以驱动大鼠跑动时,大鼠会发现这种现象并将前爪置于内壁上。这种行为会影响被动条件反射的形成、达到学会标准的时间,直接影响测试结果。

用两个控制系统分别控制迷路箱的内壁和箱底的电压。开始训练时,先将内壁电压直接调至合适强度(使大鼠不能碰

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30873217)

作者简介:冯婷(1982-)女,博士研究生,主要研究方向:病证结合辨证规律的研究

[△] 通讯作者:李峰 E-mail: lifeng95@vip.sina.com

(收稿日期:2011-08-07 接受日期:2011-08-31)

触)箱底的电压慢慢调至驱使大鼠刚好跑动的强度。这样就能适当避免大鼠上述动作的产生,减少对实验结果的影响。

1.2 关于迷路箱的刺激信号灯

经典迷路箱在每臂顶端都装有 15W 的刺激信号灯(现在多见的黄光源)^[2],目的是让大鼠对灯光形成条件反射。由于大鼠有避暗习性,为了更快的形成条件反射,对光源有以下要求:①光源亮度要小。②光色合适。光色会影响大鼠的行为。一般来讲,不要使用使其兴奋(如红光)或抑郁的颜色,黄光相对合适。③亮度一致。除了电刺激外,三条臂的条件应该是一致的,包括气味、灯亮时的亮度。三个刺激信号灯强度不一致,必然影响学习记忆的形成。如果发现不一致,应及时检修调整。

1.3 关于仪器的性能

为了保障测试的顺利进行,除了及时对光源进行调整,还应该保证其他性能的稳定。一般要注意以下几方面:①导电性。有的大鼠对新环境不适应,或者受电刺激的影响,在测试过程中容易产生排便量增加,如果未及时处理,不仅会腐蚀电栅,影响铜棒之间的导电性,还会导致大鼠逗留在排便的位置停止不前,逃避行为减少。这便影响反应时间的计算和正误的判断。所以在测试完每只大鼠后都要及时清理大鼠粪便。测试开始前要仔细检查仪器的导电性能是否完好,除了用砂纸打磨铜棒外,还要进行必要的检修,保证测试顺利进行。除了在实验前后,平时也要定期对铜棒进行打磨和电路的检测。②迷路箱内的气味。前面大鼠留下的气味(身上气味、大、小便等)都会影响后面被测大鼠的行为,每只大鼠测试完后,电压调零,可用水或者蘸取少量酒精擦拭铜棒和内壁,以清除气味。③每次实验前还应注意检查延时是否准确和固定(因测试时间包括延时在內)、灯的亮度是否有改变、控制键是否正常等等。

2 实验方法

2.1 筛(预)选

①将大鼠放入迷路箱中适应 3-5min 后,给予适当电击,至其对 3 条臂均探索进入为止。选择活跃、对电击反应较敏感、逃避反应迅速者供测试用。淘汰反应过于迟钝或特别敏感的大鼠。②预选出电击次数 ≤ 3 次时达到连续 2 次正确反应,对电击反应较敏感的大鼠供实验用^[3]。③在上述初步筛选的基础上,通过正式的迷宫训练,淘汰达不到学会标准的大鼠。

2.2 测试

2.2.1 学习测试 实验时先将大鼠放入迷宫适应 3-5min,然后再开始正式实验。一般,学习测试有三种方法:随机休息法^[4]、随机不休息法^[5]、顺序法^[7]。根据每天训练的次数又可分为两类:固定训练次数、不固定训练次数(采用分段连续训练法)。根据这几种方法,目前实验室多用的是 4 种,即固定次数随机法、不固定次数随机法、固定次数顺序法、不固定次数顺序法。有研究比较了这四种测试法^[9]发现,"不固定次数法"容易使大鼠疲劳而注意力分散,不能客观的反映大鼠的学习和记忆能力,"顺序法"可以使大鼠形成一种空间惯性,不能达到测试的目的,"休息法"在每只大鼠上耗费的时间较长,这不仅对大鼠、测试人员的体力进行过多消耗,也对仪器有一定耗损。经过分析,"固定次数随机不休息法"是一种相对简便可靠的方法。具体步骤如下^[8]:实验时先将大鼠放入迷宫适应 3-5min,然后无规则次序变换安

全区,以训练大鼠辨别灯光刺激及安全方位的能力。大鼠受电击后逃到安全区后,灯光持续 10-15s,然后以所在支臂作为下次测试的起始位置进行下一次测试^[6,11]。每个实验日对每只大鼠进行 20 次训练。参数:电压 50-70V,延时 5s。

2.2.2 记忆保持(再现)测试 学习测试 24h^[9]、48h、1 周^[3]、30d 后,以同样的方法测试。

2.3 试验方法注意事项

2.3.1 动物种类及月龄的选取 考虑到 Y-型迷宫的尺寸和电刺激对动物的影响,目前此仪器多用于对大鼠的测试。而正常幼年大鼠和老年大鼠的学习记忆能力较差^[4,11],所以一般在造模后评价药物对学习记忆的影响时,多使用 2-12 月龄且体型相近的大鼠。

2.3.2 个体差异的影响 由于不同大鼠对电刺激的敏感程度不同,先天学习记忆能力相差比较大,在筛选时务必严格仔细。淘汰对电刺激耐受性差和不敏感的大鼠,务必不能混进本身存在学习障碍的大鼠,以免影响实验结果。筛选以及后面的测试都要求操作规范,尺度较难把握,所以尽量由专人操作,以减小误差。

2.3.3 大鼠放入迷宫的位置 本实验组认为,每只大鼠放入迷宫中的位置应该是随机的,不能从同一个臂口或者按一定次序放入。尽管每次测试后清理大鼠留下的气味,但大鼠的嗅觉较之人要灵敏,不能完全保证对下一只测试大鼠不产生影响。

2.3.4 测试环境 大鼠是一种对光线和声音比较敏感的动物,为了排除这些因素对实验的干扰,要求实验室环境安静,光线较暗,实验员操作熟练,以减少差异。实验一般在每天的固定时间进行。

2.3.5 关于测试电压 测试电压一般在 50-70V。由于个体差异的存在,尽管经过筛选,每只大鼠对电刺激的敏感度不同,每次测试对电压的调整还是关键环节。实际操作时,应以让动物刚好跑动的强度为固定强度,每只大鼠的适合电压强度范围应该在筛选步骤开始摸索并进行记录,在正式学习测试时进行调整即可。另外,在调电压的过程中,接近合适范围的下限时速度应放慢,以免对大鼠造成损伤。比如,在筛选时刚好使大鼠跑动的电压为 58-62V,记录该电压值,在正式进行学习测试时,电压调整到 52-58V,注意大鼠的行为变化,不能直接调至 58V 左右,因同一只大鼠不同时间对电刺激的反应也不相同。

2.3.6 关于记忆保持测试 一般在造模或给药前,被跳出来的大鼠都是达到学会标准的。根据个人实验设计不同,可适当的调整记忆保持测试的时间。比如,本实验造模时间为 1 周,只需要测试 24h、48h、1 周的指标即可。

3 测试指标和标准

3.1 测试标准

3.1.1 正误判定标准 大鼠受电击后从起步区直接逃到安全区为"正确反应",若逃到无灯光的任何另一臂,记为"错误反应"。^[10]以大鼠在足底通电后 10s 一次性跑向安全区为正确反应,否则为错误反应。

3.1.2 达标(学会)标准 每个实验日进行 20 次训练测试错误反应次数(EN) ≤ 2 次,全天总反应时间(TRT) $\leq 120s$ 作为判定大鼠学会的标准。EN 反映大鼠反应的正确度,TRT 反映大鼠反

应时间的长短,两者可综合评价大鼠的学习记忆能力。

3.1.3 测试指标 目前测试指标有8种。分别为达标所需的训练次数、达标所需的天数、错误反应次数、全天总反应时间、主动回避率、正确反应率、全组正确率、3天学会率。Y-型迷宫的测试指标较多且不统一,应用者应根据各自实验方法和目的选择代表性的指标。

3.2 测试注意事项

3.2.1 关于正误的判断 这一标准包括很多信息:①对大鼠的行为方向有所限制,强调了"一次性"、"直接",即如果大鼠向起步区逆向逃窜也算作"错误反应",本实验组进行测试时发现,大鼠一次性作出正确反应后,在灯光持续的10-15s之间,有可能再跑向非安全区。此行为的产生多与大鼠的探究心理有关,当电刺激能促使大鼠跑动而又足以使其产生很多不适感时,大鼠会试探性的从安全区再跑向非安全区。此行为应该归于"正确反应"或者"错误反应",有待于进一步探讨。②对大鼠的反应时间有所限制,要求大鼠在足底通电后10内跑向安全区。延时一般设为5s,所以要求实验人员严格计算时间点,以对正误反应作出正确判断。

3.2.2 指标的选择 能反映逃避反应的概括指标有两个,即时间和次数,EN和TRT从不同方面综合评价了大鼠的学习记忆能力,其他指标均是在两者的基础上延伸出来的。所以我们认为,在造模或给药后,EN和TRT就能评价大鼠的学习记忆能力。

目前Y型电迷宫的应用较为广泛,经过改良后的实验方法及操作注意事项可以大大提高及研究的科学性,更多的优化条件还需要进一步探索。

参考文献(References)

- [1] 任榕娜,陈新民,孔祥英.避暗及迷宫实验研究锌缺乏及锌过量对大鼠学习记忆的影响[J].现代预防医学,1997,24(1):61-66
Ren Rong-na, Chen Xin-min, Kong Xiang-ying. Effect of dietary Zinc-deficiency and Zinc-excess on rat's Learning and Memory in Step through test and Maze test [J]. Modern Preventive Medicine, 1997, 24(1): 61-66(In Chinese)
- [2] 徐翔,董强,张丽.Y迷宫训练后大鼠海马区基质金属蛋白酶-9表达及其作用[J].中国临床保健杂志,2010,13(5):499-502
Xu Xiang, Dong Qiang, Zhang Li. The matrix metalloproteinase-9 expression in the rat hippocampus and its role after Y maze training [J]. Chinese Journal of Clinical Healthcare, 2010, 13(5): 499-502(In Chinese)
- [3] 郭宗君,郭云良,许贞峰,等.药物诱发大鼠痴呆模型的初步研究[J].中国老年学杂志,1999,19(9):295-297
Guo Zong-jun, Guo Yun-liang, Xu Zhen-feng, et al. The experiment of drug induced dementia model of the rats [J]. Chinese Journal of Gerontology, 1999, 19(9): 295-297(In Chinese)
- [4] 王跃春,王子栋.大鼠Y-型迷宫测试指标正常值的确定[J].中国行为医学科学,2003,12(3):333-334
Wang Yao-chun, Wang Zi-dong. The normal values of the testing indexes of Y-type maze test in rats [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2003, 12(3): 333-334(In Chinese)
- [5] 徐斌,陈俊抛,林煜,等.去松果体对大鼠学习记忆及海马结构星形胶质细胞的影响[J].中国行为医学科学,2000,9(3):188-190
Xu Bin, Chen Junpao, Lin Yu, et al. Effect of pinealectomy on the learning and memory abilities and astrocyte in hippocampal formation of rats [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2000, 9(3): 188-190(In Chinese)
- [6] 王福顺,岳文浩,段耀奎,等.纹状体蓝对大白鼠学习记忆的影响[J].泰山医学院学报,1997,18(2):251-253
Wang Fu-shun, Yue Wen-hao, Duan Yao-kui, et al. Gynostemma's impact on learning and memory in rats [J]. Journal of Taishan Medical College, 1997, 18(2): 251-253(In Chinese)
- [7] 林熠,陈俊抛,刘辉,等.学习记忆过程中海马S100 β 和NOS表达的变化及其相关性[J].中国行为医学科学,2000,9(2):97-99
Lin Yu, Chen Junpao, Liu Hui, et al. The expressions and their correlation of S100 β and nitric oxide synthase in hippocampus during the processing of learning and memory [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2000, 9(2): 97-99(In Chinese)
- [8] 王秀丽,唐洪丽,索国玲.癫痫持续状态对发育期大鼠学习记忆及海马磷酸化的c-AMP反应元件结合蛋白表达的影响[J].实用儿科临床杂志,2007,22(22):1723-1725
Wang Xiu-li, Tang Hong-li, Suo Guo-ling. Effect of the developmental stages rat's learning and memory and hippocampal phosphorylated c-AMP response element binding protein's expression in Status epilepticus [J]. Journal of Pediatrics, 2007, 22(22): 1723-1725(In Chinese)
- [9] 王跃春.大鼠Y-型迷宫测试法的筛选与优化[J].中国行为医学科学,2005,14(1):50-52
Wang Yao-chun. The filtration and optimization of rat's Y-type maze testing methods [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2007, 22(22): 1723-1725(In Chinese)
- [10] 尹兆宝,王健,周如倩,等.补肾方对老年性痴呆大鼠学习记忆和细胞因子的影响[J].中国老年学杂志,2000,20(1):33-34
Yin Zhao-bao, Wang Jian, Zhou Ru-qian, et al. Effects of tonifying the kidney formula on serum cytokines of dementia rats and its memory and behaviour of learning [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2000, 20(1): 33-34(In Chinese)
- [11] 赵燕星,苏殿三,王祥瑞,等.阿尔茨海默病APPsw/PS1dE9双转基因型与野生型小鼠学习记忆能力的比较[J].中国临床神经科学,2010,18(6):561-564
Zhao Yan-Xing; Su Dian-San; Wang Xiang-Rui, et al. Comparison of Learning and Memory of APPsw/PS1dE9 Double Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease and Wild-type Mice [J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2010, 18(6): 561-564(In Chinese)