

# ApoE 基因敲除小鼠认知功能障碍的 Morris 水迷宫观察

杨秀丽<sup>1</sup> 张文高<sup>2</sup> 郑广娟<sup>2</sup> 刘美霞<sup>2</sup>

**摘要** 目的: 评估 ApoE 基因敲除(ApoE knockout, ApoEKO)小鼠的学习记忆功能。方法: 采用经典 Morris 水迷宫, 测试 3 月龄雄性 ApoEKO 小鼠与 C57BL/6J 小鼠, 共训练 7 天, 记录每天的潜伏期与游泳轨迹, 分析小鼠在目的象限停留的时间; 第 8 天去除平台, 记录小鼠停留各象限的时间百分比。结果: 所有小鼠的潜伏期都逐渐缩短, C57BL/6J 小鼠获取隐藏平台位置的速度明显比 ApoEKO 小鼠快, 在目的象限停留的时间也明显比 ApoEKO 小鼠长, 但这仅表现在最初几天, 最终二者的成绩日趋接近, 第 8 天空间搜索实验结果二者差异无显著性意义。结论: 水迷宫测试成绩显示 ApoEKO 小鼠存在认知功能障碍, 主要表现在训练最初阶段, 即获取信息阶段; 给予足够的训练后, ApoEKO 小鼠的表现能够达到正常 C57BL/6J 小鼠的水平。

**关键词** Apo 基因敲除; 小鼠; 认知; Morris 水迷宫

中图分类号: R245.97, S338.21, R49 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2006)-02-0121-03

**Cognitive impairment displayed by ApoE knockout mice in the Morris water maze/YANG Xiuli, ZHANG Wengao, ZHENG Guangjuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(2):121—123**

**Abstract Objective:** To observe the cognition of ApoE knockout (ApoEKO) mice. **Method:** Three-month old male ApoEKO mice and C57BL/6J mice were tested by Morris water maze. All animals were tested for seven consecutive days, in which escaping latency and swimming track were recorded automatically, and the time spent in the target quadrant was obtained. On the eighth day the platform was removed and the percentage of time spent in different quadrants was analyzed. **Result:** Both groups reduced their latencies across days. But in the early stage of the test, ApoEKO mice displayed much longer latencies and spent less time in the target quadrant than C57BL/6J mice. The performance of both groups were indistinguishable toward the end of the test. **Conclusion:** ApoEKO mice displayed cognitive impairment in the Morris water maze, especially in the early stage of the acquisition phase. But they were eventually able to learn the task with more training sessions.

**Author's address** Qingdao Hiser Hospital, 266034

**Key words** ApoEKO mice; Morris water maze; cognition

ApoE 基因敲除(ApoE knockout, ApoEKO)小鼠能够在自然膳食下形成动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS), 且病理学改变与人类极为相似, 因此广泛应用于 AS 的研究中<sup>[1]</sup>。目前的研究显示 ApoE 与老化、老年性痴呆(AD)、脑卒中, 以及脑外伤时出现的中枢神经系统功能紊乱有关联, 且 ApoE4 与老年性痴呆间的密切相关性已经得到逐步证实, 因此有关 ApoEKO 小鼠神经功能, 尤其是认知功能的研究成为新的热点。本研究采用经典 Morris 水迷宫实验对 ApoEKO 小鼠的认知功能进行评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** ApoEKO 小鼠与 C57BL/6J 小鼠各 10 只, 均为 12 周龄, 雄性, 体重  $22 \pm 2$ g, 由北京大学医学院动物科技部提供。

**1.1.2 主要仪器:** Morris 水迷宫。

### 1.2 方法

**1.2.1 Morris 水迷宫:** 圆形水池直径为 120cm, 高 60cm, 平台高度 50cm, 直径 10cm, 平台低于水面 1cm, 水温  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , 水的表面覆盖白色塑料泡沫颗粒。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机, 计算机自动跟踪计时并记录游泳轨迹。实验期间迷宫外参照物保持不变。

**1.2.2 定位航行实验(place navigation):** 小鼠连续接受 7 天训练, 每天 4 次, 每次间隔 20s, 记录小鼠分别从四个象限不同入水点入水找到平台所需的时间, 即逃避到平台上的潜伏期(escaping latency)。4

1 青岛海慈医疗集团神经内科, 青岛市人民路 4 号, 266034

2 山东中医药大学

作者简介: 杨秀丽, 女, 主治医师, 博士研究生

收稿日期: 2005-06-11

次潜伏期成绩的平均值作为当日最终成绩进入最后统计。如果小鼠在 120s 内未找到平台, 其潜伏期按 120s 计算。记录小鼠每天在平台所在象限即目的象限(target quadrant)停留的时间。

**1.2.3 空间搜索实验(spatial probe test):**第 8 天撤除平台, 从任一入水点将小鼠面向池壁放入水中, 记录 120s 内小鼠的游泳轨迹并进行分析。观察分析小鼠停留各象限的时间百分比。

### 1.3 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 C57BL/6J 小鼠与 ApoEKO 小鼠的潜伏期成绩相比较

第 1 天两者的成绩差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 随学习时间的延长二者的潜伏期均呈递减趋势, 但第 2、3 天 ApoEKO 小鼠的潜伏期明显长于 C57BL/6J 小鼠的潜伏期 ( $P < 0.01$ ), 第 4、5 天二者的潜伏期逐渐接近, 但 ApoEKO 小鼠的潜伏期仍长于 C57BL/6J 小鼠的潜伏期 ( $P < 0.05$ ), 第 6、7 天二者潜伏期差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 小鼠每天在平台所在象限停留时间分析结果

第 1 天二者未见明显差异 ( $P > 0.05$ ), 随着时间的推移二者在平台所在象限停留时间都呈上升趋势, 但 C57BL/6J 小鼠的上升趋势更为明显, 第 3、4、5 天二者差距尤其明显 ( $P < 0.01$ ), 第 2、6 天二者差距相对较小 ( $P < 0.05$ ), 第 7 天二者无明显差异 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 空间搜索实验结果

C57BL/6J 小鼠与 ApoEKO 小鼠在原平台所在

象限停留的时间都明显高于其他象限 ( $P < 0.01$ ), 时间比都明显超过 25%, 二者间差异未见显著性意义 ( $P > 0.05$ )。图 3。

图 3 C57BL/6J 小鼠与 ApoEKO 小鼠在目的象限停留时间比 (%)

## 3 讨论

Morris 水迷宫是用于啮齿类动物学习记忆功能评估的重要工具, 由英国生理学家 Morris<sup>[2]</sup>设计并首次使用, 最常采用的实验动物是大鼠与小鼠。受试动物根据迷宫周围的参照物确定平台位置, 这是一种以异我为参照的认知过程, 形成的记忆属于参考记忆(reference memory)。

本研究运用 Morris 水迷宫对 ApoEKO 小鼠的认知功能进行评估, 结果发现在开始训练的前几天 C57BL/6J 小鼠获取隐藏平台位置的速度明显比 ApoEKO 小鼠快, 在目的象限停留的时间也明显比 ApoEKO 小鼠长, 而且这种差距随着时间的推移表现的更为明显, 这一结果提示 ApoEKO 小鼠利用迷宫外周参照物获取利用平台相关信息的能力比 C57BL/6J 小鼠弱, 但这仅表现在最初几天, 最终二者的成绩日趋接近, 空间搜索实验结果二者差异也无显著性意义, 表明 ApoEKO 小鼠利用迷宫外周参照物获取利用平台相关信息的能力最终与 C57BL/6J 小鼠相当。

在 Morris 水迷宫的训练过程中受训动物要获取两个方面的信息<sup>[3-4]</sup>: ①利用迷宫外周参照物获取平台的所在位置; ②利用迷宫外周参照物获取如何到达平台所在位置。本研究发现 ApoEKO 小鼠在训练的早期尤其是每次找寻的最初阶段存在障碍, 提示 ApoEKO 小鼠从不同点入水后找寻平台过程中, 主要障碍可能存在于如何到达平台, 而在不是确定平台位置。

许多研究已经证实 ApoEKO 小鼠的中枢胆碱能神经系统受到损害, 程度与年龄呈正相关<sup>[5-6]</sup>, 研究者也认为这正是 ApoEKO 小鼠出现认知功能障碍的主要原因; 还有研究结果显示 ApoE 通过抗氧化作用发挥它的神经保护作用<sup>[7]</sup>, 这一结果提示 ApoE 基因缺失对认知功能的影响尤其是老化后出现的智能下

图 1 C57BL/6J 小鼠与 ApoEKO 小鼠找到平台的潜伏期

图 2 C57BL/6J 小鼠与 ApoEKO 小鼠每天在平台所在象限停留时间比较

降与氧化性损伤增强有关。还有研究者认为 ApoEKO 小鼠在迷宫实验中表现出的认知功能障碍与其焦虑的异常增加有关<sup>[8-9]</sup>。

ApoEKO 小鼠遭受脑损伤后损害病理改变严重,神经元修复障碍导致恢复差而缓慢,潜在机制尚未完全阐明。ApoEKO 小鼠的外周神经存在形态与功能的损害<sup>[10]</sup>,受损外周神经的恢复能力也明显减弱减弱;当 ApoE 缺失时能够加重脑缺血所致的神经损伤<sup>[11]</sup>,Kitagawa K 等<sup>[12]</sup>的研究发现 ApoE 具有抗氧化作用是其潜在作用机制。Masliah E 等<sup>[13]</sup>通过转基因方法使 ApoEKO 小鼠重新获得 ApoE 基因,结果发现 ApoEKO 小鼠的认知障碍得到明显改善,而且 ApoEKO 小鼠损坏的突触、突起等神经结构也得到修复,这既支持 ApoE 的神经保护作用,也提示 ApoE 存在潜在的治疗价值。最新研究显示雌激素的神经保护作用依赖 ApoE 的存在<sup>[14]</sup>,Nathan BP 等<sup>[15]</sup>的研究发现 ApoE 在嗅觉形成与维护中发挥重要作用,而 Grainger DJ<sup>[16]</sup>的研究显示 ApoE 与其受体结合后能够参与免疫系统的调控。

神经系统各部分之间是互相联系的,其中一个部位的功能丧失,对其他部分的调控作用随之丧失,因此受损脑组织以外的区域也会发生变化,但神经系统功能具有可塑性,受损的神经元具有潜在的修复功能,破坏神经元间的联络可以重建,这使得脑卒中等神经系统疾病后的康复成为可能。中枢神经系统内 ApoE 由星形胶质细胞合成并分泌,ApoE 参与维护胆固醇、磷脂的动态平衡,调节神经膜重塑时胆固醇与磷脂的动员与再分布,从而参与调节突触可塑性的维护以及神经细胞受损时的修复。

有关 ApoEKO 小鼠在迷宫实验中的认知功能障碍原因至今尚未完全阐明,进一步的研究有助于揭示 apoE 在神经系统的发育与修复中的重要作用,并有助于临床认知康复治疗方案的修订。

## 参考文献

- [1] Jawien J, Nastalek P, Korb R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. J Physiol Pharmacol, 2004, 55(3):503.
- [2] Morris RGM. Spatial localization does not depend on presence of local cues[J]. Learning Motivation, 1981, 12:239.

- [3] Sutherland RJ, Dyck RH. Place navigation by rats in a swimming pool[J]. Can. J Psychol, 1984, 38:322.
- [4] Whishaw LQ. Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: A dissociation between getting there and knowing where[J]. J Neurosci, 1995, 15:5779.
- [5] Kleinfeld O, Diebler MF, Chapman S, et al. The effects of apolipoprotein E deficiency on brain cholinergic neurons [J]. Int J Dev Neurosci, 1998, 16(7-8):755.
- [6] Fisher A, Brandeis R, Chapman S, et al. M1 muscarinic agonist treatment reverses cognitive and cholinergic impairments of apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Neurochem, 1998, 70(5): 1991.
- [7] Kitagawa K, Matsumoto M, Hori M, et al. Neuroprotective effect of apolipoprotein E against ischemia [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 977:468.
- [8] Holscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks[J]. Behav. Brain Res, 1999, 100:225.
- [9] Raber J, Akana SF, Bhatnagar S, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in ApoE (-/-) mice: possible role in behavioral and metabolic alterations [J]. J Neurosci, 2000, 20: 2064.
- [10] Pola R, Gaetani E, Flex A, et al. Peripheral nerve ischemia: apolipoprotein E deficiency results in impaired functional recovery and reduction of associated intraneural angiogenic response[J]. Exp Neurol, 2003, 184(1):264.
- [11] Horsburgh K, Kelly S, McCulloch J, et al. Increased neuronal damage in apolipoprotein E-deficient mice following global ischaemia[J]. Neuroreport, 1999, 10(4):837.
- [12] Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. Protective effect of apolipoprotein E against ischemic neuronal injury is mediated through antioxidant action[J]. J Neurosci Res, 2002, 68(2): 226.
- [13] Masliah E, Samuel W, Veinbergs I, et al. Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE [J]. Brain Res, 1997, 751(2):307.
- [14] Horsburgh K, Macrae IM, Carswell H. Estrogen is neuroprotective via an apolipoprotein E-dependent mechanism in a mouse model of global ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(10):1189.
- [15] Nathan BP, Yost J, Litherland MT, et al. Olfactory function in apoE knockout mice[J]. Behav Brain Res, 2004, 150(1-2):1.
- [16] Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Immunol, 2004, 173(10):6366.