

组合行为学实验方法检测东莨菪碱制作小鼠谵妄模型

任全^{1*}, 陈旭辉², 陈明³, 杨建军¹

(1. 东南大学附属中大医院麻醉科, 南京 210009; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科, 武汉 430030; 3. 东南大学附属中大医院泌尿科, 南京 210009)

【摘要】 目的 用组合行为学实验方法检测东莨菪碱制作小鼠谵妄模型。**方法** 比较两组小鼠行为学变化; 谵妄组($n=12$)和对照组($n=8$)小鼠分别腹腔注射 15 mg/kg 东莨菪碱和等容量的生理盐水, 在注射后 30 ~ 60 min 之间对两组小鼠顺序进行黑白箱实验 10 min, 旷场实验 10 min 和非选择性非持续性注意力实验 10 min—组合行为实验法, 比较两组小鼠的 5 项行为学指标以检测谵妄状态。**结果** 与对照组相比, 谵妄组小鼠 5 项行为学指标差异均有显著性, 小鼠在白箱中停留的时间显著缩短, $P < 0.05$; 小鼠的活动速度显著增快, $P < 0.05$, 在沿壁区活动时间显著增多, $P < 0.05$, 僵住时间显著减少, $P < 0.05$; 小鼠“注意力”水平显著下降, $P < 0.05$ 。**结论** 组合行为实验法能反映谵妄诊断要素, 更好地反映谵妄状态, 且用时较短。

【关键词】 谵妄; 小鼠; 黑白箱; 旷场实验; 注意力水平; 东莨菪碱

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 05-0644-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.017

Combined behavioral test to detect delirium induced by scopolamine in mice

REN Quan^{1*}, CHEN Xuhui², CHEN Ming³, YANG Jianjun¹

(1. Department of Anesthesiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210029, China;

2. Department of Anesthesiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; 3. Department of Urology, Zhongda Hospital affiliated to Southeast University, Nanjing 210029)

Corresponding author: REN Quan. E-mail: g_quanren@yahoo.com

【Abstract】 Objective To develop a combined behavioral test for assessment of scopolamine-induced delirium in mice. **Methods** Two groups of mice were randomly assigned to receive 15 mg/kg scopolamine (delirium group; $n=12$) or isovolemic saline (control group; $n=8$) via intraperitoneal injection. We developed a novel behavioral experiment in which mice received the light and black box test for 10 min, the open-field test for 10 min, and then the non-selective non-sustained attention test for 10 min, from 30 to 60 min after intervention. Five behavioral indexes were compared between the groups to assess the delirium status. **Results** Compared with the control group, there were significant differences in all five behavioral indexes in mice in the delirium group mice at 30 min after intervention: time spent in the white box was significantly shorter ($P < 0.05$), the movement speeds were significantly increased ($P < 0.05$), time spent beside the wall area was increased significantly ($P < 0.05$), the freezing time, and the attention level were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** This combined behavioral experiment can be used to assess the key elements for delirium diagnosis, and with a faster time than conventional tests.

【Keywords】 delirium; mice; light and black box test; open-field test; non-selective non-sustained attention test; scopolamine

【基金项目】 江苏省卫计委面上项目(H2017005); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2242017K40254)。

Funded by Jiangsu Provincial Commission of Health and Family Plan General Project(H2017005); and Fundamental Research Funds for the central Universities(2242017K40254)。

【通信作者】 任全(1968—), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 围术期脑功能改变。Email: g_quanren@yahoo.com

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

谵妄是一种急性的脑功能紊乱状态,国际上通用精神混乱评估法(confusion assessment method, CAM)来诊断谵妄。CAM 基于美国《精神疾病诊断与统计手册》对谵妄的定义,诊断谵妄的敏感度和特异度分别高达 94% 和 90%^[1],包括四个方面内容:精神情绪的急性改变和波动,注意力水平下降,思维紊乱和意识水平的改变。目前,国际上还没有成熟可信的谵妄动物模型。报道中的谵妄大鼠模型^[2]只采用单一的行为学实验,注重对精神情绪和感知改变的检测,多忽视了对注意力水平的检测,而注意力水平下降是谵妄诊断的必要内容^[1]。我们使用一种新的组合行为学实验方法,同时检测与 CAM 要素相对应的小鼠的行为学改变,以更确切地反映小鼠的谵妄状态。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组

选择 8 月龄清洁级 white type naïve 雌性小鼠(C57BL/6 J)(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) 20 只,体重 22.9 ~ 27.6 g。将小鼠分为两组:谵妄组(12 只)和对照组(8 只)。两组小鼠分开饲养,4 只/笼。小鼠的饲养和行为学实验严格按照 MGH 动物实验中心的伦理和操作规范实行(animal protocol number: 2006N000219)。实验在哈佛大学医学院麻省总医院(MGH)老年麻醉研究中心(149, 13th St., Room 4310, Charlestown, MA 02129.)完成。

1.1.2 试剂与仪器

氢溴酸东莨菪碱粉剂(Xi'an Wharton Bio-Tech, Shaanxi, China)用生理盐水配制成 6 mg/L 溶液。黑白箱(40 cm × 40 cm × 40 cm),旷场实验箱(60 cm × 40 cm × 35 cm),非选择性非持续性注意力实验箱(40 cm × 40 cm × 40 cm),Any-Maze 动物跟踪分析系统(Stoelting Co., Wood Dale, IL, US)及专用摄像头(置于实验箱上方 60 cm)用于记录分析小鼠的行为学指标。

1.2 方法

谵妄组小鼠腹腔注射氢溴酸东莨菪碱 15 mg/kg,对照组则腹腔注射相同容量的生理盐水。于干预后 30 ~ 60 min 对小鼠顺序联合进行黑白箱实验(light and black box test, LBBT)(10 min),旷场实验

(open-field test, OFT)(10 min)和非选择性非持续性注意力实验(non-selective non-sustained attention test, NNAT)(10 min)。每个实验所需进行的“预适应”过程均在实验 6 ~ 24 h 前完成。每个实验只以后 5 min 的数据作为有效数据,前 5 min 用于小鼠适应场景的变化。

1.2.1 黑白箱实验(LBBT)

在一安静无干扰的封闭实验房内,以白织灯照明,自然亮度,黑白箱的白箱暴露在灯光下,黑箱顶端封闭仅通过下方与白箱相通的孔洞能透入些许光线。预适应时,将小鼠单独置于白箱中,使其自由探索黑箱和白箱。共预适应 3 次,每次 10 min,次与次之间间隔 6 ~ 24 h,于第 3 次时记录 10 min 内的后 5 min 小鼠在白箱中停留的时间作为基础值。第 3 次预适应后 6 ~ 24 h 进行实验,实验干预后 30 ~ 40 min 测试 10 min,记录小鼠后 5 min 在白箱内停留的时间。

1.2.2 旷场实验(OFT)

60 cm × 40 cm 的实验箱底部化分为沿壁区和中央区两部分;两区分界线为椭圆形,椭圆形的四个顶点距离箱壁均为 5 cm,也就是中央区为长径 50 cm 宽径 30 cm 的椭圆区,沿壁区为箱底去除中央区以外的部分。预适应时,将小鼠置入箱中 3 次,每次 10 min,次与次之间间隔 6 ~ 24 h,记录第 3 次的 10 min 内的后 5 min 小鼠在沿壁区的活动时间,僵住时间和总体的运动速度作为基础值。第 3 次预适应后 6 ~ 24 h 进行实验,于干预后 40 ~ 50 min 测试小鼠在箱内后 5 min 上述行为学指标。

1.2.3 非选择性非持续性注意力实验(NNAT)^[3]

利用小鼠对于新事物好奇的天性,观察小鼠对环境中新出现的物体的认知和兴趣程度,以判断小鼠的注意力水平。本实验采用改良的 NNAT 测试小鼠的注意力水平:在实验箱底(正方形)的两对角线的三分位点上放置物体—共四个物体,这些物体无味,大小相似(约 4 cm × 4 cm × 4 cm),而颜色形状和质地可能不同。预适应时,箱内放置的物体完全相同,将小鼠置入箱中 3 次,每次 10 min,次与次之间间隔 6 ~ 24 h,记录第 3 次后 5 min 小鼠与每个物体接触的时间,计算百分率作为基础值。第 3 次预适应后 6 ~ 24 h 进行实验,干预后 50 ~ 60 min 测试时,将箱内四个物体的其中一个替换成大小相似但颜色形状和质地不同的“新物体”,再将小鼠置入

箱内,记录后 5 min 小鼠与“新物体”接触的时间,计算百分率作为测试值。小鼠对“新物体”的注意程度(即注意力水平)是它与“新物体”接触的时间百分率,即:

小鼠注意力水平^[3] =

小鼠与“新物体”接触的时间

小鼠与所有四个物体接触的总时间

×100%

1.3 统计学方法

采用 Microsoft Office 2011 Excel 软件对资料进行统计学分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用组间 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

组合行为实验法有效检测出多项与谵妄相关

的小鼠行为学改变。

2.1 两组小鼠的基础值对照

在实验干预前两组小鼠三个行为学实验对比,各行行为学指标差异无显著性,*P* > 0.05,见表 1。

2.2 两组小鼠在干预后 30 min 的行为学对照

与对照组相比,谵妄组小鼠在注射 15 mg/kg 东莨菪碱后 30 min,其黑白箱实验,旷场实验和 NNAT 的各项行为学指标均出现了具有统计学意义的变化:黑白箱实验中,小鼠在白箱中停留的时间明显缩短,*P* < 0.05;旷场实验中,小鼠的活动速度显著增快,*P* < 0.05,在沿壁区活动时间显著增多,*P* < 0.05,僵住时间显著减少,*P* < 0.05;NNAT 中,小鼠对新物体的认知力—“注意力”水平显著下降,*P* < 0.05。详见表 2。

表 1 干预前两组雌性小鼠体重和各项行为学实验的测试值
Table 1 Five behavioral indexes detected from the control group and delirium group before intervention

组别 Groups	体重 Weigh (g)	黑白箱实验 LBBT	旷场实验 OPT			NNAT 基础值
		白箱停留时间 Time spent in light box(%)	沿壁区活动时间 Time spent off center area(s)	僵住时间 Freezing time(s)	平均活动速度 Average moving speed(m/s)	Baseline * 注意力水平 attention level(%)
对照组 Control group (n = 8)	24. 7 ± 1. 0	43. 7 ± 32. 5	232. 8 ± 27. 3	85. 4 ± 30. 6	0. 047 ± 0. 012	21. 5 ± 7. 4
谵妄组 Delirium group (n = 12)	24. 8 ± 1. 6	46. 3 ± 30. 0	247. 2 ± 11. 7	82. 9 ± 27. 2	0. 048 ± 0. 015	24. 7 ± 7. 6
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0. 856	0. 856	0. 119	0. 854	0. 871	0. 366

注: * “新物体”所替换的“老物体”在 NNAT 预适应实验中被小鼠注意的水平。
Note. * The attention level was assessed using an ‘old object’ in the preconditioning test that was replaced by a ‘novel object’ in the non-selective non-sustained attention test (NNAT).

表 2 干预后 30 min 对照组和谵妄组小鼠各项行为学实验的测试值
Table 2 Five behavioral indexes detected from the control group and delirium group 30 min after intervention

	黑白箱实验 LBBT	旷场实验 OPT			NNAT [#]
	白箱停留时间 Time spent in light box(%)	沿壁区活动的时间 Time spent off center area(s)	僵住时间 Freezing time(s)	平均的活动速度 Average moving speed(m/s)	注意力水平 Attention level(%)
对照组 Control group (n = 8)	53. 4 ± 34. 0	237. 6 ± 26. 1	41. 6 ± 16. 9	0. 037 ± 0. 018	53. 5 ± 7. 5
谵妄组 Delirium group (n = 12)	0. 8 ± 1. 13	273. 3 ± 9. 9	10. 4 ± 6. 7	0. 081 ± 0. 023	38. 0 ± 15. 4
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	< 0. 0001	0. 0004	< 0. 0001	0. 0002	0. 0163

注: [#] 干预后, NNAT 中“新物体”被小鼠注意的水平。
Note. [#] Attention level detected with a “noval object” in the NNAT test.

3 讨论

谵妄被美国国立卫生研究院 (NIH) 定义为“伴随着身体或精神疾病出现的突然的严重混乱和脑功能的迅速变化”^[4]。CAM 诊断主要包括: (1) 精神状态急剧变化且波动大; (2) 注意力下降; (3) 思维混乱; (4) 知觉改变, 四项诊断指标。如果有 (1) 和 (2) 存在, 加上 (3) 或 (4) 的任意一项, 即为 CAM 阳性, 表示谵妄存在。然而, 动物实验却很难模拟人的谵妄状态, 因为无法测量动物的精神变化和思维变化。在研究人的谵妄过程中, 动物的谵妄模型显得非常重要, 然而目前的谵妄模型多没有针对谵妄“四要素”的检测, 尤其是注意力水平的检测。因此, 我们试图采用新方法同时观察小鼠谵妄模型针对 CAM 要素的多项行为学指标的改变。

谵妄的发生机制目前尚不明确, 研究认为主要可能与以下因素有关: ①中枢神经递质失调。中枢胆碱能缺陷, 其他中枢递质如多巴胺、去甲肾上腺素、5 羟色胺、 γ -氨基丁酸 (GABA) 等的失调^[5-7]。中枢的乙酰胆碱在意识、注意、感知觉传人的调节中起重要作用, 结构及功能神经影像资料显示谵妄患者的中枢胆碱能通路存在异常^[8-9], 临床研究也发现, 使用对胆碱能系统功能有损害的药物时患者易发生谵妄^[10], 血清抗胆碱能活性 (SAA) 水平与谵妄的发生密切相关, 谵妄患者的血清 SAA 水平升高, 且升高程度与谵妄症状的严重程度呈正相关, 两者间存在量效关系^[11]。②中枢炎症。手术创伤会引起一系列炎症反应, 导致炎症介质如 C-反应蛋白以及促炎细胞因子白细胞介素 IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、IL-6 等的释放, 会破坏血脑屏障, 使其易于穿过血脑屏障进入脑内刺激星型胶质细胞及小胶质细胞使其激活, 进一步释放促炎因子, 进而产生神经毒性反应, 引起谵妄^[12]。其中, 中枢神经递质失调, 特别是胆碱能功能低下, 5 羟色胺, 多巴胺, 去甲肾上腺素的水平下降等是谵妄发生的主要机制。

3 ~ 30 mg/kg 的东莨菪碱可使小鼠脑内的¹⁴C-多巴胺和¹⁴C-去甲肾上腺素水平降低, 引起精神症状, 推测与其阻断了抑制性毒蕈碱反应相关^[13]。因此, 一直以来东莨菪碱常被用来制作小鼠的谵妄模型。我们在实验中采用东莨菪碱 15 mg/kg 的剂量确实诱导了小鼠的行为学改变, 这些改变可能与谵妄有关。

小鼠在注射东莨菪碱后 30 ~ 60 min 之间在三

个实验中均表现出行为学改变: 在白箱中停留的时间的缩短 (黑白箱实验), 沿壁区停留的时间延长 (旷场实验) 反映了小鼠探索性明显减弱和对周围知觉的改变; 而运动速度的明显升高和不动时间的减少 (旷场实验) 则反映了小鼠的兴奋性的升高; 但是其注意力水平明显下降 (NNAT 实验)。综合起来, 这些行为学的改变反映了 CAM 的三个要素——情绪状态的急剧变化, 知觉改变及注意力下降。

不同于传统的旷场实验, 我们将中央区定义为箱底中央的椭圆区域, 该椭圆的四个顶点分别到四壁的距离相等 (5 cm), 该距离约相当于小鼠体宽的 1.5 ~ 2 倍。沿壁区 (在其他文献中也称周边区) 为除去中央区以外的区域, 小鼠在沿壁区时其身体总是非常靠近箱壁, 这与小鼠易于贴壁运动的天性非常相符。传统的分区方法是“画格法”, 在箱底画等大的方格 (方格大小 20 cm $\times$ 20 cm), 最贴近箱壁的方格为周边区, 其余的为中央区, 这种分法有些刻板且与动物的大小和运动规律相关性不大。裘毅敏等^[2]用传统的旷场实验测试东莨菪碱制作大鼠谵妄模型的行为学改变, 发现大鼠在中央区停留的时间显著增多, 认为是大鼠对新环境认知能力差的表现。我们的实验结果却相反, 小鼠在中央区停留的时间明显缩短 (在沿壁区的时间延长), 分析原因我们发现这种结果的差异可能来自三个方面: ①文献^[2]使用的是大鼠, 东莨菪碱的剂量为 3 mg/kg, 我们使用了小鼠和 15 mg/kg 的剂量; ②文献^[2]的实验箱较大, 且底部用了传统的画格法区分中央区和周边区, 区域的大小与大鼠的尺寸不相关, 这样人为地划分区域合理性不足; ③文献^[2]是单一测试旷场实验 1 h, 而在 1 h 之内动物的行为可能已有多次改变, 且较长时间在同一单调环境下动物的活动区域有可能已不再具有特点而是杂乱无章。我们的实验也在 1 h 内完成, 但却在三个 10 min 内顺序完成三个实验, 行为学检测的侧面更为丰富。这种实验动物, 器材和方法上的差异是否对行为学结果造成影响还有待探究。但是从行为学的解释来说, Katz^[14]和 Walsh^[15]的观点支持本实验结果, 认为大鼠避免在中心区停留 (贴壁运动增多) 是其情绪变化的表现。

根据 CAM 的标准, 注意力下降是谵妄模型的必要指标, 目前文献报道的谵妄模型多缺少对这项指标的检测。NNAT 被用来检测大鼠和小鼠的注意力水平, 其原理是如果大鼠或小鼠的注意力水平正

常,它就能够识别与“样本物体”区别不大的“新物体”并会花较多的时间探索新物体,那么它与新物体接触的时间就代表它的注意力水平,如果小鼠与新物体的接触时间明显少于对照组,表示它的注意力水平下降。我们的实验检测了 NNAT,谵妄组小鼠的注意力水平明显下降了。

东莨菪碱是小分子抗胆碱药,易于通过血脑屏障,因此可作用于中枢产生谵妄。但东莨菪碱同样具有外周的抗胆碱作用,因此,行为学实验也可能受到东莨菪碱外周抗胆碱作用的影响,如肌张力升高和瞳孔扩大,反映为运动速度的增高和在黑箱中停留时间延长。然而,谵妄的发生机制中,血清抗胆碱能活性(SAA)的升高同样会出现中枢的和外周的效应,因此也符合谵妄的症状。不过,本实验也存在明显的不足:没有反映东莨菪碱对行为学的剂量效应。在较大或较小的剂量下,小鼠的这些行为学效应的改变如何?用东莨菪碱造小鼠谵妄模型时有没有最适合的剂量推荐?值得进一步研究。

总之,我们使用的新的行为学实验方法—组合行为实验法,较全面地反映诊断谵妄状态的 CAM 要素,连续三个场景实验更能反映小鼠谵妄的行为学特征,且用时较短。

(致谢:此实验得到了 MGH 老年麻醉中心谢仲淙教授的大力支持,为实验提供了动物、实验场所和 Any-Maze 动物跟踪分析系统并取得了 MGH 动物实验中心的动物实验伦理许可,特在此表示感谢!)

参 考 文 献(References)

- [1] Inouye SK, Van Dyck CH, Alessi CA, et al. Clarifying confusion: the confusion assessment method. A new method for detection of delirium [J]. *Ann Intern Med*, 1990, 113(12): 941–948.
- [2] 裘毅敏,李士通,江继宏等. 腹腔注射东莨菪碱诱发大鼠谵妄模型[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(6): 694–695.
- Qiu YM, Li ST, Jiang JH, et al. A rat delirium model induced by intraperitoneal injection of scopolamine [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31(6): 694–695.
- [3] Millecamps M, Etienne M, Jourdan D, et al. Decrease in non-selective, non-sustained attention induced by a chronic visceral inflammatory state as a new pain evaluation in rats [J]. *Pain*, 2004, 109(3): 214–224.
- [4] Reade MC, Finfer S. Sedation and delirium in the intensive care unit [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(5): 444–454.
- [5] Gunther ML, Morandi A, Ely EW. Pathophysiology of delirium in the intensive care unit [J]. *Crit Care Clin*, 2008, 24(1): 45–65, viii.
- [6] Robinson TN, Raeburn CD, Angles EM, et al. Low tryptophan levels are associated with postoperative delirium in the elderly [J]. *Am J Surg*, 2008, 196(5): 670–674.
- [7] Maldonado JR. Pathoetiological model of delirium: a comprehensive understanding of the neurobiology of delirium and an evidence-based approach to prevention and treatment [J]. *Crit Care Clin*, 2008, 24(4): 789–856, ix.
- [8] Fong TG, Bogardus ST Jr, Daftary A, et al. Cerebral perfusion changes in older delirious patients using 99mTc HMPAO SPECT [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006, 61(12): 1294–1299.
- [9] Alsop DC, Fearing MA, Johnson K, et al. The role of neuroimaging in elucidating delirium pathophysiology [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006, 61(12): 1287–1293.
- [10] 蓝海珍,于布为. 术后谵妄的研究进展[J]. *上海医学*, 2013, 36(02): 161–164.
- Lan HZ, Yu BW. Advance on research of postoperative delirium [J]. *Shanghai Med J*, 2013, 36(02): 161–164.
- [11] Flacker JM, Cummings V, Mach JR Jr, et al. The association of serum anticholinergic activity with delirium in elderly medical patients [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 1998, 6(1): 31–41.
- [12] Van Gool WA, Van De Beek D, Eikelenboom P. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide [J]. *Lancet*, 2010, 375(9716): 773–775.
- [13] Hitzemann RJ, Loh HH, Domino EF. Effect of scopolamine on the cerebral accumulation of 14 C-catecholamines from 14 C-tyrosine [J]. *Pharmacology*, 1972, 8(4): 291–299.
- [14] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247–251.
- [15] Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review [J]. *Psychol Bull*, 1976, 83(3): 482–504.

[收稿日期] 2018-04-11