

[论著]

## 利用气味分子 TMT 建立大鼠条件性位置偏恶模型\*

陈琳<sup>1,2</sup> 王小红<sup>3</sup> 张婵溪<sup>3</sup> 陈磊<sup>1,2</sup> 翟海峰<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>(北京大学基础医学院药理学系,北京,100191)<sup>2</sup>(北京大学中国药物依赖性研究所,北京,100191)<sup>3</sup>(北京中医药大学中药学院,北京,102488)

**摘要** 目的: 捕食者气味影响啮齿类动物的行为, 本实验利用一种捕食者气味分子 TMT 并结合经典条件性位置偏爱(CPP)装置建立条件性位置偏恶模型。方法: 将大鼠放置在 CPP 装置内, 并在装置单侧给予 TMT, 探究急性暴露 TMT 对大鼠回避行为的影响; 将大鼠放置在 CPP 装置单侧并暴露于 TMT 20 min, 重复暴露训练 4 d 后, 再将大鼠放置在 CPP 装置内不给 TMT, 使大鼠在 CPP 测试箱内自由探索, 通过测试大鼠在伴药侧和非伴药侧的停留时间, 观测重复暴露 TMT 对大鼠条件性偏恶行为的影响。结果: 大鼠在急性暴露于 TMT 后表现显著的回避行为, 对给药侧表现位置偏恶; 大鼠在重复暴露于 TMT 后, 建立了 TMT 的负性效应与 CPP 装置给药侧相关联的记忆, 表现出条件性回避行为, 对伴药侧表现显著的位置偏恶。结论: 通过将大鼠重复暴露于 TMT 并结合 CPP 装置能够建立稳定的条件性位置偏恶(厌恶记忆)模型; 该模型可以在学习记忆相关研究中作为条件性位置偏爱(奖赏记忆)的对照模型。

**关键词** 捕食者气味; TMT; 条件性位置偏恶; 大鼠

doi: 10.13936/j.cnki.cjdd1992.2018.04.004

中图分类号 R749.6

## Establishment of conditioned place aversion in rats by predator odor TMT

CHEN Lin<sup>1,2</sup>, WANG Xiaohong<sup>3</sup>, ZHANG Chanxi<sup>3</sup>, CHEN Lei<sup>1,2</sup>, ZHAI Haifeng<sup>1,2</sup><sup>1</sup>(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, Beijing, 100191, China)<sup>2</sup>(National Institute on Drug Dependence, Peking University, Beijing, 100191, China)<sup>3</sup>(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

**Abstract** *Objective:* The predator odor molecule, TMT (2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazole), has significant effects on the behaviors of rodents. In this study, TMT and a device for conditioned place preference (CPP) are used to establish conditioned place aversion (CPA) which can be used as a comparative model of CPP. *Methods:* Rats were put into the CPP device, and TMT was given in one side of the device to investigate the effect of acute exposure of TMT on the avoidance behavior. And then rats were exposed to TMT and put into one side of the CPP device for 20 minutes. After four days of repeated exposure training, rats were allowed to explore in CPP device freely. By testing the residence time in drug-paired box and none-paired box of rats, the effect of repeated exposure of TMT on the avoidance behavior of rats was assayed. *Results:* Rats showed significant avoidance after acute exposure to TMT. After repeatedly exposure to TMT, rats established a memory that TMT-induced negative effect was associated with one side of the CPP device, shown by a significant conditioned place aversion to the TMT-paired box. *Conclusion:* A stable CPA model can be established by repeated exposure to TMT with the CPP device. This conditioned aversion (negative memory) can be used as a comparative model to CPP (reward memory) in related researches.

**Keywords** predator odor; TMT; conditioned place aversion; rat

\* 国家自然科学基金(81271473)

\*\* 通信作者: E-mail: zhaih@hsc.pku.edu.cn

带有捕食者气味的毛发、粪便等常用来作为啮齿类实验动物的应激源。TMT (2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazole 结构式见图1) 是狐狸粪便的一种提取物,可以对啮齿类动物产生行为影响<sup>[1]</sup>。天然捕食者的气味成分受饮食和生物钟等多因素影响,作为实验工具缺乏稳定性;而TMT是单分子物质,可以人工合成,其浓度能被准确控制,并且同天然捕食者气味对啮齿类动物的行为影响相似,在研究中可替代天然捕食者气味<sup>[2]</sup>。

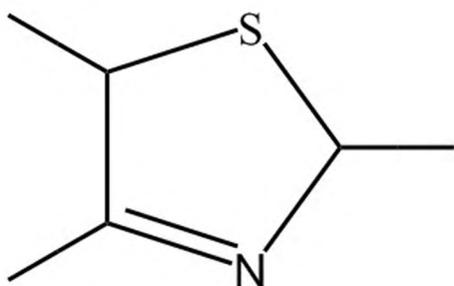


图1 气味分子TMT的化学结构式

目前有研究发现,急性暴露于TMT会导致啮齿类动物产生焦虑样行为<sup>[3]</sup>,重复暴露也会诱导长期的焦虑反应<sup>[4-5]</sup>。不同浓度的TMT对啮齿类动物行为的影响不同,低浓度的TMT可以诱导大鼠表现显著的僵直行为,但该浓度的TMT并没有诱导回避行为<sup>[6]</sup>;高浓度的TMT可以诱导啮齿类动物表现非常显著的回避行为<sup>[7-8]</sup>。TMT与具有厌恶特性的其它气味不同。有研究发现,TMT与丁酸都能诱导大鼠表现显著的回避行为,但TMT可以诱导大鼠表现僵直行为,丁酸并不能诱导显著的僵直行为<sup>[9]</sup>。TMT的其它一些行为学特性也支持TMT代替天然捕食者气味,作为研究啮齿类动物的焦虑样行为和回避行为的有效的应激源。在我们的实验中,TMT作为负性刺激,并结合经典的条件性位置偏爱装置,建立了条件性位置偏恶模型(Conditioned Place Aversion, CPA),作为一种负性记忆模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

20只体重220-240g的Sprague Dawley雄性大鼠,购买自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物房温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,湿度 $50 \pm 5\%$ ,每天8点开始照明,12h光/暗交替。实验前饲养三天以适应环境,动物均可自由饮水、摄食。实验动物的饲养与实

验操作均符合国际动物伦理学法案以及国家和北京大学医学部动物使用和保护委员会条例的相关要求。

### 1.2 试剂

TMT(2,5-Dihydro-2,4,5-trimethylthiazole)购买自Contech Enterprises Inc公司(加拿大),CAS号23236-43-3。配制TMT溶液的溶剂是邻苯二甲酸二乙酯,CAS号84-66-2,购买自北京蓝弋化工产品有限责任公司。TMT原液按1:10稀释,每次使用量100  $\mu\text{l}$ 。

### 1.3 实验装置

本实验采用了条件性位置偏爱(Conditioned Place Preference)装置,装置由左右两个大小相同的聚氯乙烯黑白箱( $30 \times 21 \times 25 \text{ cm}^3$ )以及中间较小的灰箱( $17 \times 20 \times 25 \text{ cm}^3$ )组成,中间的灰箱是连接黑白箱的通道。黑白箱四壁光滑,黑箱地板面是竖条状不锈钢棒底板,白箱地板面是网格状不锈钢底板,灰箱底部是光滑的聚氯乙烯底板。两侧黑白箱与中间灰箱之间分别有可移动的插板,在测试时把插板移走,大鼠可以在三个箱子中自由穿梭。每个箱子都有红外线装置监测大鼠的活动情况。测试时间为15 min,由电脑记录每只大鼠在三个箱子的停留时间以及穿梭次数。本实验中的大鼠条件性位置偏恶(Conditioned Place Aversion, CPA)值用伴药侧箱与非伴药侧箱的时间差表示。

### 1.4 行为学实验方法

总的实验流程见图2。

#### 1.4.1 大鼠急性暴露TMT后的回避行为

(1) 动物初测与分组(D1): 将大鼠从灰箱放入CPP装置并让其自由探索,测试15 min。如果大鼠在黑箱和白箱的停留时间差小于150 s,说明大鼠对黑白箱没有明显偏爱/偏恶,否则从实验中剔除。然后将没有明显偏爱/偏恶的16只大鼠分为TMT暴露组(TMT组)和对照组,每组8只。TMT组又分4只以白箱为伴药箱,另外4只以黑箱为伴药箱。对照组又分4只作为TMT组以白箱为伴药箱的对照,另外4只作为TMT组以黑箱为给药箱的对照。

(2) 回避行为测试(D2): TMT组以白箱(黑箱)为伴药箱的实验操作是:把滴有100  $\mu\text{l}$  TMT溶液的滤纸片( $2 \times 2 \text{ cm}^2$ )放入圆形小器皿(直径4 cm,高2 cm)并放置在白箱(黑箱)底板的固定右下角,把滴有100  $\mu\text{l}$  溶剂(邻苯二甲酸二乙酯)的滤纸片放入小器皿并放置在装置另一侧黑箱(白箱)底板的固定右下角。相应的对照组给药操作是:把滴有100

μl 邻苯二甲酸二乙酯的滤纸片放入小器皿并分别放置在白箱(黑箱)底板固定角落。将 TMT 组和对照组的大鼠分别通过中间灰箱放入 CPP 装置,测试

大鼠在黑白箱的停留时间与进入次数,测试时间 15 min。

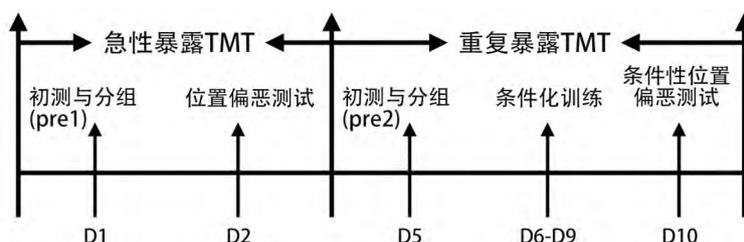


图2 行为实验流程图

### 1.4.2 大鼠重复暴露 TMT 后的条件性位置偏恶行为

(1) 动物初测与分组(D5): 动物初测和分组与急性暴露 TMT 的实验方法和分组相同。

(2) 条件化训练(D6 - D9): TMT 组以白箱(黑箱)为伴药箱的训练方法是:把滴有 100 μl TMT 溶液的滤纸片放入小器皿并放置在白箱(黑箱)底板的固定右下角,将大鼠置于白箱(黑箱)中 20 min。相应的对照组的训练方法是:把滴有 100 μl 溶剂(邻苯二甲酸二乙酯)的滤纸片放入小器皿并分别放置在白箱(黑箱)底板固定右下角,将大鼠置于白箱(黑箱)中 20 min。重复训练 4 d。

(3) 条件性回避行为测试(D10): 测试当天,将 TMT 组和对照组大鼠分别通过中间灰箱放入 CPP 装置,黑、白箱中均不给 TMT,测试大鼠在黑、白箱的停留时间与进入次数;测试时间为 15 min。

### 1.5 统计学方法

所有实验数据都用平均值 ± 标准误表示,并使用 SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 软件进行双因素方差分析和 Post Hoc 检验进行组间数据比较, P 值小于 0.05 认为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 大鼠急性暴露 TMT 产生回避行为

结果见图 3。与暴露前相比,急性暴露 TMT 对大鼠行为有显著性影响 ( $F_{[1,14]} = 8.451, P = 0.039$ ), TMT 组大鼠在急性暴露 TMT 前和急性暴露 TMT 时停留在黑白箱的时间差具有统计学显著意义 ( $P < 0.05$ ); 且在急性暴露 TMT 时, TMT 组与对照组大鼠停留在黑白箱的时间差也具有统计学显著意义 ( $P < 0.05$ )。急性暴露 TMT 使大鼠在伴药侧的停留时间显著少于非伴药侧的停留时间,对 TMT 给

药侧表现回避。以上数据表明,急性暴露 TMT 诱导大鼠回避行为。

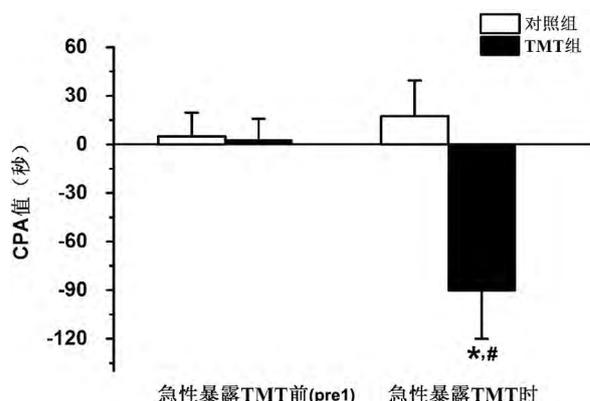


图3 急性暴露 TMT 诱导大鼠回避行为

大鼠在实验前后形成位置回避的程度用 CPA 值(伴药箱停留时间与非伴药箱停留时间的差值)表示为均值 ± SEM。(\* 表示急性暴露 TMT 时 TMT 组与对照组比, Student t-test; # 表示 TMT 组急性暴露 TMT 时与暴露前比,  $P < 0.05$ , paired Student t-test); 对照组 ( $n = 8$ ), TMT 组 ( $n = 8$ )

### 2.2 重复暴露 TMT 后诱导大鼠产生条件性位置偏恶

结果见图 4。重复暴露 TMT 对大鼠行为有显著性影响 ( $F_{[1,14]} = 7.837, P = 0.037$ ), TMT 组大鼠在重复暴露 TMT 前与重复暴露 TMT 后停留在黑白箱的时间差具有统计学显著意义 ( $P < 0.05$ ); 且在重复暴露 TMT 后, TMT 组与对照组大鼠停留在黑白箱的时间差也具有统计学显著意义 ( $P < 0.05$ ), 说明 TMT 组大鼠形成了将 TMT 的负性效应与暴露环境相关联的学习记忆, 回避之前的伴药侧, 表现条件性位置偏恶。以上数据表明, 重复暴露 TMT 使大鼠形成对暴露环境的负性记忆, 建立了条件性位置偏恶模型。

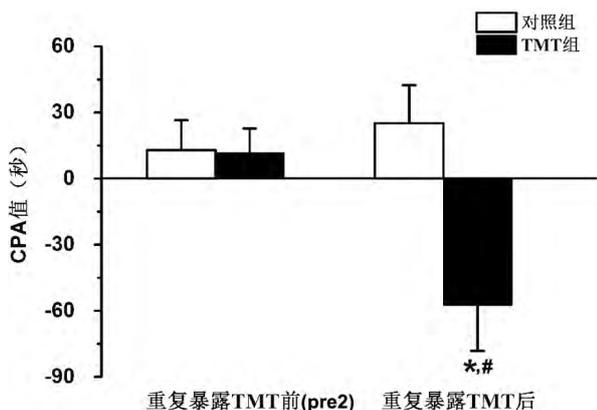


图4 重复暴露 TMT 诱导大鼠条件化厌恶行为  
大鼠在实验前后形成位置回避的程度用 CPA 值( 伴药箱停留时间与非伴药箱停留时间的差值) 表示为均值 ± SEM。( \* 表示重复暴露 TMT 后 ,TMT 组与对照组比 ,Student t - test; #表示 TMT 组重复暴露 TMT 后与暴露前比  $P < 0.05$  ,paired Student t - test); 对照组(  $n = 8$  ) ,TMT 组(  $n = 8$  )

### 3 讨论

本实验中 ,我们首先验证了急性暴露 TMT 能够导致大鼠回避 ,大鼠对放置 TMT 的测试盒表现为位置偏恶; 然后通过大鼠重复暴露 TMT 并结合条件性位置偏爱装置建立了条件性位置偏恶( CPA) 模型。

已有一些研究探讨建立 CPA 模型的方法和应用。大鼠腹腔注射氯化锂常用来建立 CPA<sup>[10]</sup>; 另外一些精神活性物质也可以作为工具药。小鼠腹腔注射低剂量尼古丁建立条件性位置偏爱 ,并注射高剂量尼古丁建立 CPA ,两者相互参照研究遗传背景对尼古丁奖赏效应与厌恶效应的影响<sup>[11]</sup>; 大鼠腹腔注射吗啡后给予纳洛酮急性戒断可以建立 CPA ,从而研究负性记忆的消退机制<sup>[12-13]</sup>; 直接腹腔注射高剂

量纳洛酮<sup>[14]</sup> 或 U50488H( 选择性  $\kappa$  - 受体激动剂) 也可以建立 CPA<sup>[15]</sup>。虽然多数研究通过注射药物诱导动物 CPA ,其它一些方式 ,比如局部脑区电刺激也是一种诱导 CPA 的有效方式<sup>[16]</sup>。本实验使用气味就能够建立 CPA ,相比使用其他工具药或电刺激方法 ,使用气味建立 CPA 的实验操作更简易; 由于 TMT 的浓度和暴露时间可操控性好 ,为建立 CPA 提供了一种新方式。

由于大鼠的行为表现受环境和 TMT 浓度等因素影响<sup>[6]</sup> ,预实验中我们尝试了不同浓度的 TMT 溶液的实验效果 ,最终确定溶液浓度为 1:10 ,用量 100  $\mu$ l。该浓度的 TMT 溶液能够在本实验的测试环境中诱导大鼠表现显著的回避行为 ,并不会导致大鼠产生不良的生理反应。结果也表明 ,该浓度的 TMT 溶液有强烈的厌恶特性 ,可以诱导显著的回避行为 ,与前人发表的结果一致<sup>[17]</sup>。对于大鼠形成 CPA 的机制 ,或许是因为 TMT 气味产生的强烈的生理刺激; 但我们更倾向于 TMT 诱导的恐惧等心理原因<sup>[18]</sup>。如果在 CPA 实验中同时记录僵直行为等表现为表现 ,将有助于分析大鼠产生条件性回避的行为学机制。

总之 ,我们利用 TMT 建立了 CPA 模型; 大鼠形成了 TMT 的负性效应与暴露环境相关联的记忆。此模型可以作为 CPP 模型的对照模型; 条件性位置偏爱模型与正性记忆相关 ,条件性位置偏恶模型与负性记忆相关 ,在学习记忆相关研究中 ,可以将两种模型结合使用 ,作为进一步研究学习记忆神经机制的行为学工具。

### 4 参考文献

- [1] Fendt M , Endres T. 2,3,5 - Trimethyl - 3 - thiazoline ( TMT) , a component of fox odor - just repugnant or really fear - inducing? [J]. *Neurosci Biobehav Rev* 2008 , 32( 7) , 1259 - 1266.
- [2] Blanchard DC , Markham C , Yang M , et al. Failure to produce conditioning with low - dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli [J]. *Behav Neurosci* 2003 , 117( 2) , 360 - 368.
- [3] Hacquemand R , Choffat N , Jacquot L , et al. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety - and fear - related behaviors in mice [J]. *Behav Brain Res* 2013 , 238 , 227 - 231.
- [4] Fendt M , Endres T , Lowry CA , et al. TMT - induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing [J]. *Neurosci Biobehav Rev* 2005 , 29( 8) , 1145 - 1156.
- [5] Post RJ , Dahlborg KM , O'Loughlin LE , et al. Effects of juvenile exposure to predator odor on adolescent and adult anxiety and pain nociception [J]. *Physiol Behav* 2014 , 131 , 57 - 61.
- [6] Endres T , Apfelbach R , Fendt M. Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline , a component of fox odor [J]. *Behav Neurosci* 2005 , 119( 4) , 1004 - 1010.

( 下转第 287 页)

- [5] Foster C, Bowers L, Nijman H. Aggressive behaviour on acute psychiatric wards: prevalence, severity and management [J]. *J Adv Nurs* 2007 58(2):140-149.
- [6] 郑淑凤, 李冬, 王楠. 护理人员遭受住院精神病患者攻击情况调查及分析[J]. *中国实用护理杂志* 2003 19(12B):55-56.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会. 2009年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2009.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 2010年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2010.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会. 2011年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2011.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会. 2012年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2012.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. 2013年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2013.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 2014年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2014.
- [13] 国家卫生和计划生育委员会. 2015年中国卫生和计划生育统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社 2015.
- [14] 程金凤, 蔡细英. 28165例输血前及手术前患者四项感染指标监测结果分析[J]. *中国感染控制杂志* 2014 13(4):223-224.
- [15] 王仙明, 金炬. 2006-2008年我院医务人员职业暴露损伤调查分析[J]. *中华全科医学* 2010 8(5):629-630.
- [16] 崔晓娜. 护士职业暴露状况及其相关因素、预防措施的研究进展[J]. *全科护理* 2017 15(6):678.
- [17] 高军. 医护人员经血液传播疾病的高危因素及防护对策[J]. *中国消毒学杂志* 2012 29(10):959-960.
- [18] 汪文文, 杜江, 赵敏, 等. 四川省某地区物质使用情况调查: 酒精、烟草和精神活性物质使用相关问题筛查测试[J]. *中国药物依赖性杂志* 2015 24(5):367.
- [19] 张明园, 肖泽萍. *精神病学教科书* [M]. 人民卫生出版社 2010 9(1):1137.

收稿日期: 2018-05-18

修回日期: 2018-07-13

## (上接第266页)

- [7] Hebb AL, Zacharko RM, Dominguez H, et al. Odor-induced variation in anxiety-like behavior in mice is associated with discrete and differential effects on mesocorticolimbic cholecystokinin mRNA expression [J]. *Neuropsychopharmacology* 2002 27(5):744-755.
- [8] Hebb AL, Zacharko RM, Gauthier M, et al. Exposure of mice to a predator odor increases acoustic startle but does not disrupt the rewarding properties of VTA intracranial self-stimulation [J]. *Brain Res* 2003 982(2):195-210.
- [9] Wallace KJ, Rosen JB. Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces [J]. *Behav Neurosci* 2000 114(5):912-922.
- [10] Gore-Langton JK, Flax SM, Pomfroy RL, et al. Measures of the aversive effects of drugs: A comparison of conditioned taste and place aversions [J]. *Pharmacol Biochem Behav* 2015 134:99-105.
- [11] Ise Y, Mori T, Katayama S, et al. Genetic background influences nicotine-induced conditioned place preference and place aversion in mice [J]. *J Nippon Med Sch* 2014 81(1):53-56.
- [12] Li CL, Zhu N, Meng XL, et al. Effects of inactivating the agranular or granular insular cortex on the acquisition of the morphine-induced conditioned place preference and naloxone-precipitated conditioned place aversion in rats [J]. *J Psychopharmacol* 2013 27(9):837-844.
- [13] Wang WS, Chen ZG, Liu WT, et al. Dorsal hippocampal NMDA receptor blockade impairs extinction of naloxone-precipitated conditioned place aversion in acute morphine-treated rats by suppressing ERK and CREB phosphorylation in the basolateral amygdala [J]. *Br J Pharmacol* 2015 172(2):482-491.
- [14] Cagniard B, Murphy NP. Affective taste responses in the presence of reward- and aversion-conditioned stimuli and their relationship to psychomotor sensitization and place conditioning [J]. *Behav Brain Res* 2013 236(1):289-294.
- [15] Robles CF, McMackin MZ, Campi KL, et al. Effects of kappa opioid receptors on conditioned place aversion and social interaction in males and females [J]. *Behav Brain Res* 2014 262:84-93.
- [16] Hurtado MM, Garcia R, Puerto A. Tiapride impairs the aversive effect of electrical stimulation of the parabrachial complex in a conditioned place task [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2014 74(3):307-316.
- [17] Hebb AL, Zacharko RM, Gauthier M, et al. Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice [J]. *Eur J Neurosci* 2004 20(9):2415-2429.
- [18] Takahashi LK, Hubbard DT, Lee I, et al. Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala [J]. *Behav Neurosci* 2007 121(1):100-110.

收稿日期: 2018-03-05

修回日期: 2018-03-27