

补充钙剂及维生素 D 对快速老化小鼠学习记忆能力的影响

马志红, 纪红, 郭威早, 严之红
(航天中心医院高干二科, 北京 100049)

【摘要】目的:观察补充钙剂及维生素 D 对快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)P8 学习记忆能力的影响。**方法:**3 月龄雄性 SAMP8, 随机分为 3 组, 钙剂(治疗)组、尼莫地平(阳性对照)组、模型(SAMP8)组, 每组各 9 只;另选 9 只同月龄雄性 SAMR1 为正常对照组。治疗 12 周末应用老化度评分比较各组小鼠的老化征象;应用 Morris 水迷宫检测各组小鼠学习记忆能力。**结果:**(1)老化度评分显示:钙剂组、尼莫地平组、正常对照组小鼠比模型组小鼠的老化度评分低, 差别有统计学意义($P < 0.05$), 钙剂组、尼莫地平组、正常对照组小鼠的老化度评分之间差别无统计学意义($P > 0.05$);(2)学习记忆能力检测结果提示: Morris 水迷宫定位航行实验, 钙剂组、尼莫地平组与模型组相比逃避潜伏期明显缩短, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与正常对照组相比逃避潜伏期延长, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 钙剂组与尼莫地平组相比逃避潜伏期无明显差别($P > 0.05$)。空间探索实验结果提示钙剂组及尼莫地平组穿越平台次数较模型组增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示钙剂组及尼莫地平组的记忆保持能力较模型组提高。**结论:**补充钙剂及维生素 D 可以减轻 SAMP8 的老化度, 并改善 SAMP8 的学习记忆能力, 效果与应用钙通道阻滞剂尼莫地平接近。提示干预钙代谢紊乱能减轻 SAMP8 的老化度并改善 SAMP8 的学习记忆能力, 钙代谢紊乱可能是 SAMP8 学习记忆能力下降的病理生理机制之一。

【关键词】钙代谢紊乱;痴呆;快速老化小鼠 8; Morris 水迷宫; 老化度评分

【中国图书分类法分类号】R339.38

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-16

Effects of supplementing calcium and vitamin D on learning and memorizing abilities of senescence accelerated mouse P8

MA Zhihong, JI Hong, GUO Weizao, YAN Zhihong
(Department of Geriatrics, Aerospace Center Hospital)

【Abstract】Objective: To observe the effects of supplementing calcium and vitamin D on learning and memorizing abilities of senescence accelerated mouse P8(SAMP8). **Methods:** Totally 27 three-month-old male SAMP8 were randomly divided into 3 groups: caltrate D group ($n=9$), nimodipine group ($n=9$) and non-treatment SAMP8 group; 9 SAMR1 of the same age were used as normal controls(SAMR1 group). After 12 weeks of treatment, aging status was evaluated for each group with the scores of aging scale; the learning and memory were tested through Morris water maze. **Results:** (1) Based on the aging scale, scores were significantly lower in caltrate D group, nimodipine group and SAMR1 group than in non-treatment SAMP8 group ($P < 0.05$); there was no statistical difference among caltrate D group, nimodipine group and SAMR1 group ($P > 0.05$). (2) According to Morris water maze, latency in caltrate D group and nimodipine group was significantly shorter compared with that in non-treatment SAMP8 group ($P < 0.05$), but was significantly longer compared with that in SAMR1 group ($P < 0.05$), there was no statistical difference between caltrate D group and nimodipine group ($P > 0.05$). Result of spatial probe test showed that the number of crossing through the platform was increased in caltrate D group and nimodipine group than in non-treatment SAMP8 group, which implied that the ability of memory retention of caltrate D group and nimodipine group was improved significantly compared with that of non-treatment SAMP8 group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Supplementing of calcium and vitamin D can alleviate aging and improve learning and memorizing abilities in SAMP8 mice, similar to the effects of applying calcium channel blocker nimodipine. This study suggests that the prevention of calcium metabolic disorder can decrease aging and promote learning and memorizing abilities in SAMP8 mice, indicating calcium metabolic disorder may underlie the pathophysiology of deteriorated learning and memorizing abilities in SAMP8.

【Key words】calcium metabolic disorder; dementia; senescence accelerated mouse P8; Morris water maze; scores of aging

作者介绍: 马志红, Email: 15810659975@163.com,

研究方向: 老年痴呆症的治疗。

通信作者: 严之红, Email: zh_yan1029@163.com。

随着社会的老龄化,老年痴呆症的发病率逐年上升,给患者、家庭带来极大的痛苦,给社会带来了沉重的负担,成为医学领域的热点和难点。研究发现骨质疏松与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)之间存在相关关系^[1-3],钙代谢紊乱可能是引发骨质疏松、老年痴呆症等老年常见疾病的共同病理生理学基础。绝大多数研究表明:补充钙和维生素 D 是一种防治骨质疏松及骨折的有效方法。本研究拟以快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)P8 为模型,通过补充钙剂及维生素 D 或应用钙通道阻滞剂干预钙代谢紊乱,观察 SAMP8 老化度和学习记忆能力的变化。

1 材料与方法

1.1 动物给药与分组

选用 3 月龄雄性 SAMP8 随机分为 3 组,钙剂组[69 mg/(kg·d)],尼莫地平组[6.6 mg/(kg·d)],模型组,每组各 9 只;另选 9 只同月龄雄性 SAMR1 为正常对照组。体质量 25.5~30.0 g,清洁级,购自天津中医药大学第一附属医院动物中心,批号:SCXK(津)2008-0001,饲养于天津医科大学试验动物中心清洁鼠房,动物喂养环境保持通风干净,温度 20℃~25℃,湿度 55%~58%,饮水及饲料高温蒸汽灭菌。药品:钙尔奇 D(惠氏制药集团),尼莫地平(丽珠集团丽珠制药厂),溶媒均为 0.9%生理盐水,灌胃给药。SAMP8 组和 SAMR1 组予同体积的 0.9%生理盐水灌胃,持续 12 周。

1.2 老化度评分测试

采用日本京都大学竹田俊男和细川吕则教授制定的老化度评分标准^[4]将小鼠外在形体及行为的老化改变从反应性、被动性逃避反应、皮毛光泽、皮毛粗糙程度、脱毛程度、皮肤溃疡、眼周损害、角膜混浊、白内障、脊柱后弯等 11 项进行观察,再根据程度不同将每项指标划分为 3~5 级不等,标定分值,根据这个统一的评分标准,客观地给动物评分,积分越高则老化度越高。老化度评分作为老化生物学的一个指标,从外在形体及行为改变来评定机体的老化程度,可以较客观地反映机体的衰老征象。

1.3 Morris 水迷宫

Morris 水迷宫主要由 1 个不锈钢圆柱形水池和 1 个可移动位置的平台组成,水池上空 2 m 处有 1 个数字摄像头,自动采集动物游泳图像,将信号直接输入计算机,由图像自动采集和分析系统(中国医学科学院药物研究所)自动分析和处理,实验可供分析的参数有逃避潜伏期、各象限游泳距离、原平台象限游泳距离与总距离之比、原平台象限游泳时间与总时间之比、平台偏离角、40 cm 穿环时间、跨越平台次数以及中、外环游泳距离百分比等。

水池高 50 cm,直径 120 cm,被分为 SW、NW、SE 和 NE 4 个象限,站台高 28 cm,直径 90 cm,水池中加水深约 30 cm,

水面高出站台表面 2 cm,水温控制在(24±1)℃。实验在安静的房间内进行,水池位置、光源位置及强度等各种实验条件保持不变,水池四周设置空间参照物。所有实验小鼠均进行隐蔽平台试验 5 d,探索实验 1 d 及可视平台实验 1 d。

1.3.1 动物熟悉环境 1 d 试验前 1 d,让动物在不含平台的水池中自由游泳 90 s,上午下午各 1 次,使其熟悉迷宫环境;

1.3.2 定位航行实验 历时 5 d。试验时平台位置固定不变,置于 SW 象限中央,平台中点离池壁 22.5 cm,在平台对侧选两个与之距离相等的点作为入水点,将动物面向池壁放入水中,记录动物寻找到隐藏在水面下平台的时间即逃避潜伏期等指标。如果动物在 90 s 内未找到平台,则将其引至平台停留 10 s,逃避潜伏期记为 90 s。每天在 2 个入水点各训练 1 次,以 2 次逃避潜伏期的算术均值作为这 1 d 的成绩进行统计分析。逃避潜伏期反映了动物空间辨别及学习记忆的获得能力,即学习能力。

1.3.3 空间探索实验 实验的第 6 天撤除平台,任选 1 个相同的入水点将动物放入水中,动物在水中游泳 60 s,记录 60 s 内小鼠的游泳轨迹,对小鼠穿越原平台所在位置的次数等指标进行统计分析。探索实验是 Morris 水迷宫中较为敏感而精确的测试方法,各组穿越平台的次数反映出动物的记忆保持能力。

1.3.4 可视平台实验 1 d 为排除感觉、视觉或运动功能障碍对空间学习记忆的影响,最后 1 d 进行可视平台实验,让平台位置露出水面 2 cm,并黏上黄色胶带,其余操作同定位航行实验。

1.4 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。正态分布资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布资料用中位数、四分位间距 $M(Q1, Q3)$ 表示。定位航行试验潜伏期采用重复测量方差分析,以组别作组间因素,不同训练天数为组内因素;老化度评分和空间探索试验中跨越平台次数为非正态分布,采用秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠老化度评分结果

经秩和检验,钙剂组、尼莫地平组、正常对照组小鼠的老化度评分差别无统计学意义($P>0.05$),与模型组差异存在统计学意义($P<0.05$),老化度评分钙剂组最低、模型组最高(表 1)。提示给予钙尔奇 D、尼莫地平治疗的 SAMP8 老化度有所下降,老化延缓。

表 1 各组小鼠老化度评分比较

组别	例数(n)	$M(Q1, Q3)$	Z 值	P 值
钙剂组	9	0(0.0, 1.0)	8.732	0.033
尼莫地平组	9	0(0.0, 1.5)		
模型组	9	2(1.0, 3.0)		
正常对照组	9	0(0.0, 1.5)		

表 2 各观察期内各组潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison on latency trends at different observation periods among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (<i>n</i>)	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
钙剂组	9	83.05 ± 14.67	85.43 ± 7.38	77.27 ± 12.22	81.31 ± 14.11	62.53 ± 17.62
尼莫地平组	9	87.06 ± 5.77	86.53 ± 10.32	73.17 ± 9.87	79.13 ± 16.44	63.92 ± 15.84
模型组	9	87.59 ± 7.03	89.97 ± 0.02	88.00 ± 3.45	88.46 ± 4.55	86.02 ± 6.85
正常对照组	9	59.83 ± 30.85	63.40 ± 23.54	50.37 ± 18.70	58.62 ± 9.11	39.78 ± 22.90
<i>F</i> 值		5.015	7.383	14.853	10.308	11.336
<i>P</i> 值		0.006	0.001	0.000	0.000	0.000

注:各观察期内 4 组间潜伏期差异均有统计学意义,第 1~5 天均为正常对照组潜伏期最低、模型组最高

2.2 定位航行实验潜伏期结果

钙剂组、尼莫地平组及正常对照组的逃避潜伏期均随训练天数的增加呈缩短趋势,学习成绩逐渐提高,钙剂组、尼莫地平组逐渐接近正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组没有表现出这种趋势,整个训练过程中逃避潜伏期维持在较高的水平,说明 SAMP8 的学习能力明显低下。钙剂组、尼莫地平组逃避潜伏期与模型组相比明显缩短,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2、表 3,图 1)。时间与组别无交互作用,提示各组之间的差别不受检测时间的影响。说明补充钙剂和维生素 D 或应用钙离子拮抗剂均可改善 SAMP8 小鼠的学习能力 (表 4)。

表 3 各组间潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.3 Comparison on latency trends among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	潜伏期	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
钙剂组	77.92 ± 15.38	46.684	0.000
尼莫地平组	77.96 ± 14.67		
模型组	88.01 ± 5.01		
正常对照组	54.40 ± 22.83		

注:各组间潜伏期差异存在统计学意义,正常对照组潜伏期最低、模型组最高

表 4 各观察期内潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4 Comparison on latency trends at different observation periods ($\bar{x} \pm s$)

观察期	潜伏期	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
第 1 天	79.38 ± 20.49	8.744	0.000
第 2 天	81.33 ± 16.63		
第 3 天	72.20 ± 18.24		
第 4 天	76.88 ± 16.05		
第 5 天	63.07 ± 23.11		

注:各观察期内潜伏期差异存在统计学意义,第 5 天潜伏期最低、第 2 天最高。时间与组别的交互作用无统计学意义 $F = 0.778, P = 0.672$

2.3 空间探索实验结果

表 5 显示,经秩和检验各组穿越平台次数差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经两两比较发现模型组与正常对照组差异存在统计学意义 ($P < 0.05$),模型组穿越平台次数最少,正常对照组最多。钙剂组及尼莫地平组穿越平台次数较模型组增加,提示钙剂组及尼莫地平组的记忆保持能力较模型组提高。

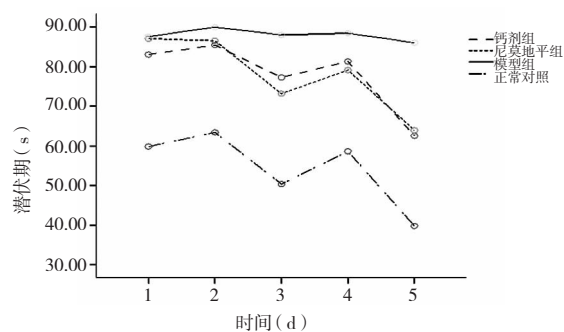


图 1 各组在不同观察期内潜伏期变化趋势

Fig.1 Latency trends at different observation periods among groups

表 5 各组穿越平台次数比较

Tab.5 Number of crossing the platform among groups

组别	例数 (<i>n</i>)	<i>M</i> (<i>Q</i> 1, <i>Q</i> 3)	<i>Z</i> 值	<i>P</i> 值
钙剂组	9	1 (1.0, 1.5)	9.066	0.028
尼莫地平组	9	1 (0.0, 3.0)		
模型组	9	0 (0.0, 1.0)		
正常对照组	9	2 (1.5, 4.0)		

3 讨论

当前人口老龄化已成为世界各国所面临的重要公共卫生问题,衰老及与衰老有关的疾病成为人类面临的巨大挑战。高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、骨质疏松、老年痴呆等老年性疾病的病因、发病机制目前尚未彻底阐明,通常认为它们是多种因素作用于不同环节所导致。然而,临床研究发现这些老年慢性疾病常常多病并发,它们可能存在共同发病机制。如果能够找到它们之间共同的发病机制并加以干预治疗,必将引发老年性疾病治疗的重大革新。

近年来,钙代谢紊乱成为老年性疾病研究的热点和焦点。众所周知钙对骨骼的生长、发育有至关重要的影响。然而,骨骼钙的动员失控不仅导致了

骨质疏松,而且会造成体内各脏器病理性钙化从而引发疾病。衰老过程中各种原因导致的生物膜损伤使钙通道功能异常,钙细胞内流增加,细胞内钙超载,引发线粒体功能障碍,激活钙离子依赖的磷脂酶、钙蛋白酶等导致细胞损伤、死亡,其结果导致脏器老化,心、脑、血管损伤。钙超载可能是老年性疾病发生发展的最终通路。

老年痴呆症是老年人群常见病之一,是一种以认知功能障碍为主要表现的临床综合征。AD 是老年痴呆症的常见类型。研究发现 AD 的发生与钙稳态失调有关,在 AD 首发症状出现前很久已存在钙稳态失调。钙代谢紊乱不仅在 AD 的起病过程中起着重要作用,而且还参与了被认为是 AD 病因病理特征的 β 淀粉样蛋白所导致的突触功能障碍^[1]。钙通道阻滞剂(如尼莫地平)能够作用于脑内钙通道,减轻钙超载,进而改善 AD 患者的学习记忆能力,已被广泛应用于 AD 治疗,故本研究以其作为阳性对照。临床研究也显示骨质疏松与 AD 之间存在相关关系。研究对 71 位早期 AD 患者和 69 位非 AD 对照组通过全身骨密度检查和头 MRI 扫描及认知功能测试,结果提示无论男女在 AD 临床早期都存在着明显的骨质丢失。骨密度减少与脑萎缩及记忆减退相关,提示骨质疏松可能是促使 AD 恶化的主要机制之一,而且 AD 神经退行性变化可能进一步影响 AD 患者的骨量,AD 的脑结构改变可能影响骨改建或骨质流失^[2-3]。最近的一项研究发现,维生素 D 缺乏可能和认知功能下降有关,维生素 D 水平增加可以减少出现认知功能减退和老年痴呆症的风险^[4]。这些研究证实 AD 患者体内存在严重的钙代谢紊乱,AD 与骨质疏松密切相关,干预钙代谢紊乱不仅可以预防和治疗 AD 患者的骨质疏松,而且可能能够改善 AD 患者的记忆障碍,延缓 AD 患者病程进展。

SAM 由日本京都大学首次培育成功,分为 SAMP 及抗快速老化亚系(senescence accelerated mouse resistant, SAMR),是目前探讨衰老及衰老相关疾病的发生机制、评价药效及其作用机制成熟的动物模型。P 系列中的 SAMP8 主要表现为学习记忆功能呈增龄性加速衰退,记忆障碍的特点是被动回避及主动回避反应和空间学习记忆能力下降^[5],能很好地模拟表现 AD 的症状及病理特点。同源对照小鼠 SAMR1 表现为正常衰老,常作为 SAMP8 的正常对照。另有研究发现 SAMP8 不仅认知功能增龄性衰退,而且较 SAMR1 更早地出现骨质疏松,具备骨质疏松

的特点^[6]。

Morris 水迷宫是研究脑学习记忆机制研究的一种经典实验方法,其原理是通过反复多次训练使大鼠/小鼠学会寻找固定位置的隐蔽平台,形成稳定的空间位置认知。这种空间认知是通过加工空间信息形成的,是一种以异我为参照点的参考认知,测定的是一种空间参考记忆,与海马、纹状体、基底前脑、小脑等脑功能区域有关^[7]。从信息加工和提取方式来看,这种空间参考记忆进入意识系统,主要储存在边缘系统(如海马)以及大脑皮层相关脑区,常伴有 Hebb 突触修饰,应该属于陈述性记忆。临床上痴呆患者陈述性记忆首先受损而且比较突出,所以从检测的记忆属性来说,运用 Morris 水迷宫来进行防治此类疾病药物的筛选研究是比较恰当的^[8]。本研究还应用了包括多因素重复测量数据在内的统计分析方法,提高了研究结果的客观性和科学性^[9]。

本研究以 SAMP8 为实验对象,以 SAMR1 为对照,以钙尔奇 D 或尼莫地平干预钙代谢,通过老化度评分、Morris 水迷宫观察 SAMP8 衰老征象及认知的变化,探索干预钙代谢紊乱预防和治疗老年痴呆症的有效方法,为临床用药提供直接的动物实验证据。

实验中模型组出现明显的衰老体征,老化度较正常对照组显著增加,因此本研究所用的 SAMP8 可以较好地模拟 AD。钙剂组、尼莫地平组的老化度,得分均显著低于模型组,提示补充钙剂、维生素 D 或钙离子拮抗剂均可有效延缓 SAMP8 的老化进程,改善 SAMP8 的全身衰老状况。钙剂组、尼莫地平组及正常对照组的逃避潜伏期较模型组均明显缩短,穿越平台次数较模型组增加,提示补充钙剂和维生素 D 或钙离子拮抗剂均可提高 SAMP8 的学习记忆能力及记忆保持能力。本实验还通过可视平台实验排除了各组小鼠在感觉、视觉及运动功能方面的差异,保证了实验结果的可靠性。总之,实验结果表明及早干预 AD 患者的钙代谢紊乱,给予补充钙剂和维生素 D 或钙离子拮抗剂可能提高 AD 患者的学习记忆能力,延缓 AD 的病程进展,而且钙剂及维生素 D 与应用钙离子拮抗剂作用相当。

本研究仅从行为学初步观察了补充钙剂和维生素 D 或钙离子拮抗剂对 SAMP8 小鼠的记忆能力影响,对于药物作用的机制及对骨质疏松的影响,有待下一阶段实验研究进一步探讨。

罗格列酮调节 IDE 和 GSK-3 β 的活性改善 阿尔茨海默病动物认知能力

杨文青¹, 马 晶¹, 宋晓征², 余华荣¹

(1. 重庆医科大学基础医学院生理教研室、神经科学研究中心, 重庆 400016; 2. 三六三医院神经内科, 成都 610041)

【摘要】目的:研究作为胰岛素增敏剂的过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors γ , PPAR γ) 激动剂-罗格列酮对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 动物模型的认知水平、 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -peptide, A β) 和 Tau 的影响, 并探讨其改善 AD 模型认知能力的可能机制。**方法:**通过侧脑室注射链脲佐菌素建立 AD 动物模型, 并用罗格列酮处理动物, 第 1 次手术后 21 d 用 Morris 水迷宫检测动物的学习和记忆水平; 采用 Western blot 检测胰岛素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (pGSK-3 β)、Tau、磷酸化 Tau (phosphoTau, pTau) 的表达; 通过免疫组化检测 A β 40 和 A β 42 在大脑的沉积。**结果:**Morris 水迷宫结果显示罗格列酮可以明显改善 AD 大鼠的认知能力 ($P < 0.001$); Western blot 结果显示罗格列酮能增加 IDE 的表达 ($P = 0.028$)、降低 GSK-3 β 的活性 ($P = 0.012$)、减少 Tau 的磷酸化水平 ($P = 0.001$); 免疫组化结果显示罗格列酮处理的大鼠, 其大脑皮质 A β 40 和 A β 42 的沉积量均较模型组减少。**结论:**罗格列酮可以明显改善 AD 动物的认知能力、A β 的沉积和 Tau 的磷酸化, 机制可能与其调节胰岛素信号通路相关的 IDE 和 GSK-3 β 的表达有关。

【关键词】阿尔茨海默病; 罗格列酮; β 淀粉样蛋白; Tau; 胰岛素降解酶; 糖原合成酶激酶-3 β

【中国图书分类法分类号】R741.05

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-09

作者介绍: 杨文青, Email: ywqljtt@126.com,

研究方向: 神经病学。

通信作者: 余华荣, Email: 1370748729@qq.com。

参 考 文 献

- [1] 陈艳杏, 孙圣刚. 阿尔茨海默病中的钙紊乱机制研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(5): 441-444.
Chen Y X, Sun S G. The progress of calcium dysregulation in alzheimer's disease[J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2009, 36(5): 441-444.
- [2] Loskutova N, Honea R A, Vidoni E D, et al. Bone density and brain atrophy in early Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2009, 18(4): 777-785.
- [3] Swerdlow R H, Burns J M, Khan S M, et al. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1812(12): 1630-1639.
- [4] Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, et al. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM)[J]. Mech Ageing Dev, 1984, 26(1): 91-102.
- [5] Wang T J, Pencina M J, Booth S L, et al. Vitamin D deficiency and

risk of cardiovascular disease[J]. Circulation, 2008, 117(4): 503-511.

[6] Chen C C, Wang M F, Liu M H, et al. Effects of age on plasma levels of calcium-regulating hormones and bone status in male SAMP8 mice[J]. Chin J Physiol, 2004, 47(1): 7-14.

[7] DHooge R, De Deyn P P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. Brain Res Rev, 2001, 36(1): 60-90.

[8] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 117-119.

Hu J Q, Wen Z H, Lai S L. A preliminary study on the memory attribution and methodology of morris water maze test[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2000, 17(2): 117-119.

[9] 陈长生, 徐勇勇, 曹秀堂. 医学研究中重复观测数据的统计分析方法[J]. 中国卫生统计, 1996, 13(6): 55-58.

Chen C S, Xu Y Y, Cao X T. The statistical analysis of the Repeated observational data in medical research[J]. Chinese Journal of Health Statistics, 1996, 13(6): 55-58.

(责任编辑: 关蕴良)