



| 58 周龄 C57BL/6J 小鼠

设计老龄鼠研究的 8 个注意事项

| 摘要

JAX 提供 25-78 周龄的雄性和雌性 B6J 小鼠。老龄 C57BL/6J 小鼠 (stock # 000664) 是一系列治疗性研究的常用动物实验品种, 包括但不限于代谢紊乱、神经生物学和肿瘤学。人类衰老和小鼠衰老之间存在许多的遗传学和生理学相似性。老龄 B6J 小鼠是研究衰老过程中可能出现的生物学变化的一个很好的模型品种。也许您一直在考虑用老龄鼠进行研究——那么研究要从哪里开始呢? 研究老龄鼠需要考虑哪些因素? 您怎样调整实验设计来应对老龄鼠和年轻小鼠之间的差异? 在这里, 我们将讨论在您开展研究前的最重要的 8 个注意事项。

#1 您需要多少只小鼠?

需要多少只小鼠才能观察到不同群体之间的差异? 我们知道, 衰老过程中小鼠会有样本损耗, 因此在进行纵向研究时, 您不仅要考虑有多少只小鼠才能开始研究, 还要考虑最后需要多少只小鼠才能确保您获得有统计学意义的数据。一项研究发现, C57BL/6J (B6J) 小鼠的寿命中位数为雌性866天, 雄性901天(图1摘自Yuan等人, 2012, <https://phenome.jax.org/measures/23201>)。

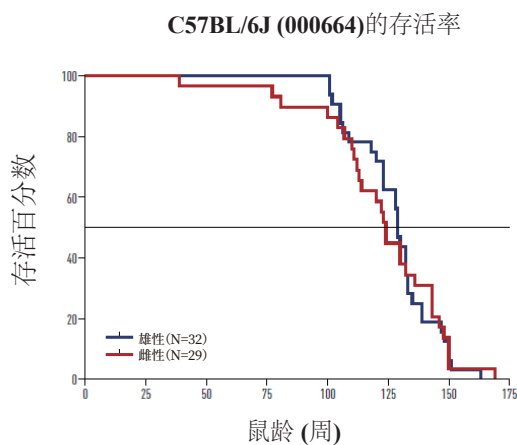


图 1

C57BL/6J 小鼠的存活率。数据来自Yuan 等人, 2012, 可从小鼠表型组数据库获取:

<https://phenome.jax.org/measures/23201>

除性别差异外, 其他研究发现, 以下因素也会影响小鼠寿命, 包括小鼠是否产仔, 以及每笼小鼠的不

同饲养密度 (实验小鼠的生物学, 第26章)。寿命差异的其他可能原因包括环境、饮食和小鼠健康状况 (Xie等人, 2017)。您在您的动物房中看到的情况可能无法反映在其他动物房中看到的情况。

为了应对非衰老相关的样本损耗, 要确定研究结束时小鼠的年龄, 并考虑在其他研究中观察到的、存活到该年龄的野生型小鼠的平均数量。计算相应百分比, 以确定研究开始时需要多少额外的小鼠。

例如:您打算用雌性B6J小鼠进行实验, 研究它们至100周龄。根据文献, B6J小鼠的损耗率约为15% (85%的小鼠存活至100周)。您还计划在研究结束时要对20只小鼠进行测定, 以获得足够的数据来确定两组之间的统计差异。在这种情况下, 您需要用24只小鼠开始研究。

研究开始时的小鼠数量 $\times 0.85 = 20 \rightarrow 20 / 0.85 = 23.5$

始终要取整!

请注意, 对照组小鼠的损耗率可能与您的实验组不同。所以, 最好高估所需的“数量”——您不想在15%的损耗时结束研究, 但发现您的治疗组有20%的损耗。此时, 您没有足够的小鼠数量来达到需要的统计显著性!

#2 何时开始?

另一个需要考虑的因素是何时开始您的实验。大约10个月的小鼠被认为相当于人类的“中年”, 18个月相当于老年。如果您想研究一个特定的衰老生物标志物, 请考虑在衰老过程中, 该生物标志物何时开始变化并在该变化开始前规划您的实验, 这样才能完整捕捉到其变化的范围。

例如,如果某一生物标记物在小鼠10个月大时开始变化——您应该考虑提早在8-9个月大时开始研究, 以捕获您观察到该生物标记物变化的时间点及其影响。但是, 如果已知生物标记物在18个月大时开始变化, 那么在9个月大时开始实验可能为时太早! 您会在表型开始显现前的9个月就开始收集数据。这是一段不必要的漫长时间, 将会给您的预算增加很大的动物饲养成本!

当表型显现时，您如何发现？寻找近交品系信息的一个好资源是小鼠表型数据库（MPD）。该数据库包含研究人员收集的表型数据——方便研究人员对品系、设施和实验室间的比较。在生物标记物可能受环境变化影响的情况下，这些数据会发挥作用，

这样您能知道“正常”的范围。此外，您可以考察不同的近交品系，以了解某些品系是否对您的表型或生物标志物更敏感或更具抗性。

#3 了解您的小鼠的健康状况

要了解小鼠正常衰老时会出现的一些预期的生理变化。随着年龄的增长，小鼠会逐渐失去体脂，变得更加衰弱，免疫系统也会改变。

血液学指标会发生改变。

例如，与8周龄B6J小鼠相比，78周龄B6J小鼠的血小板计数降低：78周龄B6J雌性小鼠为 800×10^3 个细胞/ μL ，而8周龄雌性B6J小鼠为 1019×10^3 个细胞/ μL 。

生化指标也会发生改变。

在衰老过程中，胆固醇会增加，虽然这可能存在性别差异（雌鼠8周vs. 78周： $79 \pm 9\text{mg/dL}$ vs. $89 \pm 22\text{mg/dL}$ ；雄鼠8周vs. 78周： $100 \pm 12\text{mg/dL}$ vs. $136 \pm 29\text{mg/dL}$ ）。



随着年龄的增长，身体成分会改变，体重和体脂百分比也有变化。一个重要的考虑因素是，尽管一般来说，体重随着年龄的增长而增加，但它也会变得更加多变。在8周龄时，正常体重的范围最小——但到78周时，体重的范围可能非常大（图2）。杰克森实验室网站上给出了年轻（8和16周龄）和年老（24-78周龄）C57BL/6J小鼠的基础生理数据。

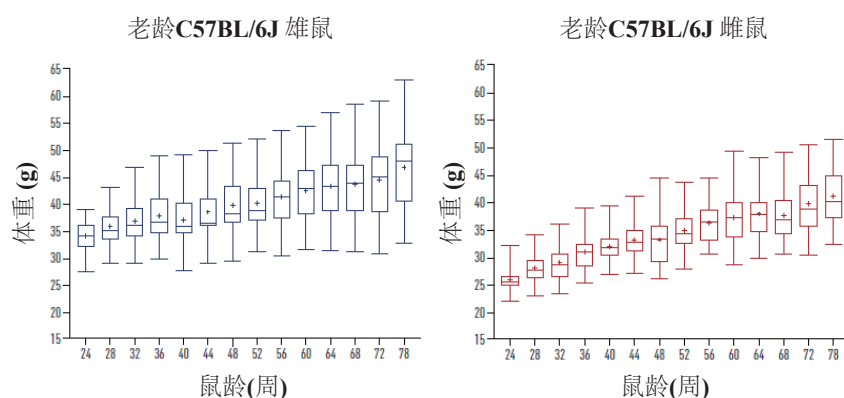


图 2

体重随着年龄的增长而增加，但也显示出较大的变异性。每月称重30只雄性和30只雌性C57BL/6J小鼠。给小鼠喂食含有6%脂肪的食物（LabDiet®5K52 配方饲料）。

来自杰克森实验室的最新数据显示，老龄鼠的免疫系统组成会发生变化。与年轻小鼠相比，它们的Treg 细胞明显增多，而雄性小鼠的B 细胞有所增加（图3）。与2个月大的小鼠相比，到18个月时，雄性和雌性小鼠的幼稚CD4和CD8T细胞都明显减少，而效应和效应/记忆性CD4和CD8 T细胞都明显增加（图4）。这些变化可能会影响老龄鼠免疫系统对新病原体或微生物的应答。

还有一些事情需要考虑：

- 小鼠在哪里饲养？
- 您将如何确保它们的福利？
- 与年轻小鼠相比，老龄鼠需要额外监测吗？

在您开始研究之前，您可以做的最重要的事情之一就是与您的动物房工作人员和临床兽医交谈。讨论您计划收集的数据，您认为重要的研究终点，并确定确保小鼠健康和福利的最佳方法。此外，在开始实验之前，您要获得IACUC的批准。因此，尽早进行这些对话将有助于确保每个人的进度相同，并且目标相同。

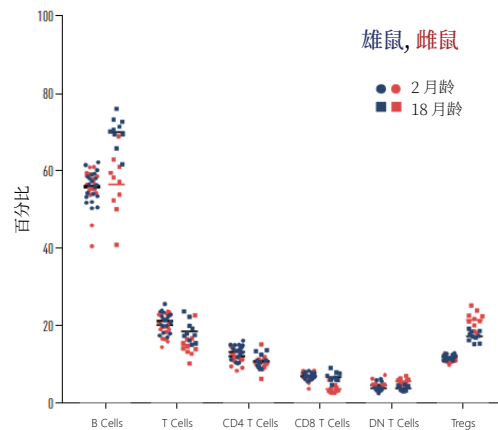


图3

脾脏流式细胞术测定发现，B6J小鼠表现出Tregs 的年龄依赖性增加和其他差异。2月龄和18月龄的C57BL/6J小鼠的活脾细胞百分比。水平线表示平均值。与2月龄雌性小鼠相比，老年雌性小鼠的T 细胞减少 ($p = 0.0383$, 平均差异为5.1%)，Tregs 增多 ($p < 0.0001$; 平均差异为10.3%)。与2月龄雄性小鼠相比，老年雄性的B细胞增多 ($p < 0.0001$; 平均差异为13.9%)，Tregs也增多 ($p=0.0129$; 平均差异为5.4%)。使用双向方差分析 (ANOVA) 和Sidak 多重比较校正法，按性别分别对数据进行分析。

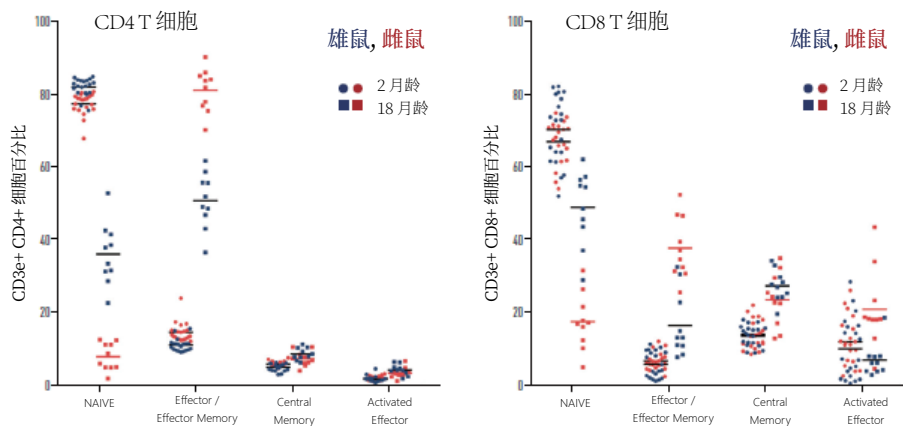


图4

脾脏流式细胞术检测表明，老年C57BL/6J小鼠的幼稚T 细胞随年龄增长而减少，效应/效应记忆性T细胞随年龄增长而增加。表达相关标志物的活脾细胞的百分比：幼稚T 细胞（CD44低，CD62高），效应/效应记忆性T 细胞（CD44高，CD62低），中枢记忆性T细胞（CD44 高，CD62 高），活化效应T 细胞（CD44低，CD62低）。水平线表示平均值。幼稚CD4 和CD8 T细胞的减少在老年雄鼠和雌鼠中很明显（所有4 次比较， $p < 0.0001$ ）。在老年雄鼠和雌鼠中，效应/效应记忆性CD4和CD8T细胞显著增加（所有4次比较， $p < 0.0001$ ）。在老年雄鼠和雌鼠中，中枢记忆性CD8T细胞显著增加（2次比较， $p < 0.0001$ ）。CD8活化的效应CD8T细胞群在老年雌鼠中有所增加 ($p < 0.0001$)。使用双向ANOVA和Sidak多重比较校正法，按性别分别对数据进行分析。

#4 您如何辨识单个小鼠?

无论您何时进行纵向研究，都要仔细考虑在研究期内如何辨识单个小鼠。一些辨识方法可能很难长期使用，因此在开始研究之前确定最佳方法至关重要。耳孔或耳部缺刻往往很受欢迎，因为它们具有成本效益。但随着小鼠的年龄增长，打斗（尤其是

雄性）会导致耳朵撕裂或刮伤，这使得难以辨识单个小鼠。更复杂的方法是植入微芯片，但这很昂贵并且可能会移位。在表1中，我们总结了一些常用的实验对象辨识方法，以及在老龄鼠中应用的注意事项。

表1 常用的实验对象辨识方法。

方法	它是什么	优点	缺点
耳孔	在耳朵上打孔或缺刻标记	<ul style="list-style-type: none">• 三周龄以下不需要麻醉• 具有成本效益	<ul style="list-style-type: none">• 可能会因打斗而扯坏• 老年时无法看清
耳标	有数字的金属标签	<ul style="list-style-type: none">• 每只小鼠有一个清晰数字	<ul style="list-style-type: none">• 会因打斗或梳毛而掉落或扯掉
微芯片	皮下植入微芯片	<ul style="list-style-type: none">• 每个微芯片都有一个可以读取的唯一标识符	<ul style="list-style-type: none">• 可能需要麻醉• 不建议用于新生幼鼠E• 芯片会移位
纹身	尾巴，脚趾或耳朵上的纹身	<ul style="list-style-type: none">• 新生幼鼠不需要麻醉	<ul style="list-style-type: none">• 如果要对成年鼠纹身，可能需要麻醉• 随着时间的推移，会褪色

#5 雄性与雌性间的区别

与幼鼠一样，老龄鼠也具有性二态性。来自国际小鼠表型分析联盟（IMPC）的数据显示，在超过2,000种基因敲除小鼠品系、超过14,000种野生型小鼠和超过40,000种基因突变小鼠中，已发现大部分的表型受性别影响，尽管这种二态性在连续而非分类的性状中更常见（56.6% vs. 9.9%，Karp等人，2017年）。重要的是，他们发现性二态性在多个研究中心内是可重复的，不到10%的二态性状表现出

相反效应。

了解您感兴趣的两性间性状差异很有必要。老年雄性C57BL/6J小鼠的进行性葡萄糖不耐受性比老年B6J雌鼠更明显（图5）。

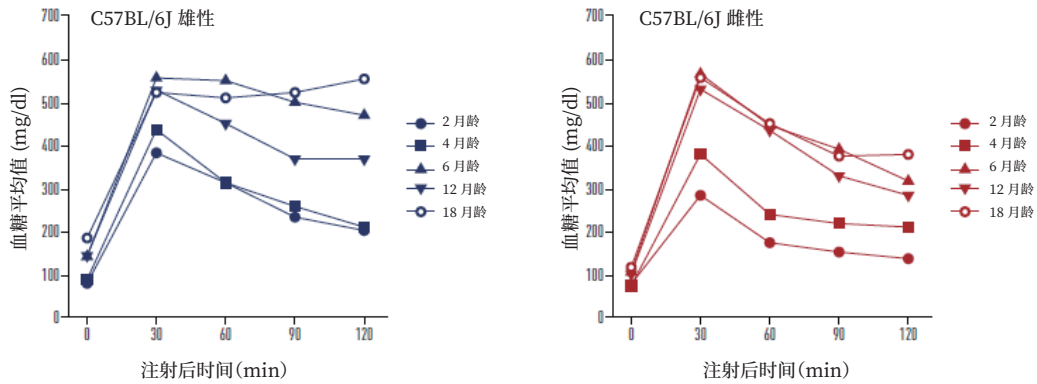


图 5
C57BL/6J小鼠的葡萄糖耐受异常。6个月龄的B6J 小鼠表现出葡萄糖耐受异常，并且随着年龄的增长而变得更严重。与雌性小鼠相比，雄性小鼠的葡萄糖不耐受性更严重。小鼠禁食16小时，然后腹腔内注射2g/kg 葡萄糖。样本量为2和4月龄小鼠各10只；6、12 和18月龄小鼠各20只。

要研究老龄鼠的代谢变化，选择仅研究雄鼠可能更合适，因为它们随着年龄的增长，具有更加渐进性的差异。美国国立卫生研究院的指南建议“在实验中充分考虑两种性别并按性别分解数据，这样可以满足基于性别的比较，并可能为临床干预提供信息。因此，按性别进行适当的分析和透明的数据报

告可以提高临床前生物医学研究的严谨性和适用性。”（NOT-OD-15-102“在NIH资助的研究中将性别作为生物学变量的考量”）。在可能的情况下，始终要分析两种性别，并确保使用适当的统计检验方法来解释性别这一生物学变量。

#6 哪种测定方法最适合您的研究?

仔细考虑您计划用于老龄鼠的测定方法，对于获取有意义的结果来说很有必要，包括那些能获得您的目标表型的最准确信息的测定方法。老龄鼠可能无法可靠地完成某些特定测定。

例A:老年C57BL/6J 小鼠的视力下降，这可能会妨碍那些需要视觉提示的试验的开展。在进行需要视觉提示的测定之前，首先采用视动功能试验来测定小鼠的视力（Rizzo等人，2018年）。考虑可以在有和无视力的小鼠中开展替代试验。自发改变试验可用于评估空间工作记忆，该实验也可以在视力降低的小鼠中进行（Rizzo等人，2018年）。

例B: 感官和精细运动能力的测定方法是贴纸去除试验，即在小鼠头顶放置小的粘性贴纸，然后计算小鼠移除贴纸所花费的时间。然而，B6背景的老鼠小鼠群体中常见的脱毛现象可能干扰该试验（Rizzo等人，2018年）。

任何需要对老龄鼠进行手术的研究的一个重要考虑因素是麻醉。老龄鼠的肾、心脏或肝脏系统功能变弱，这使得其对麻醉更加敏感。一些麻醉剂可能在老年动物中效果更好（Gargiulo等人，2012 ILAR）。考虑采用不需要麻醉的替代试验方案（见表2）。

表 2 用于评估老龄鼠表型的不同测定法

表型	测定方法
焦虑	敞箱试验 ¹
神经肌肉	握力试验 ¹
运动协调	转轮试验 ¹ 贴纸去除——受掉毛干扰（脱毛或理毛——老年B6小鼠常见） ¹
视力	视力视动功能试验 ¹
年龄相关的嗅觉改变	嗅辩试验 ¹
身体成分、饮食、运动	衰弱评估 ¹ 跑轮 ¹
心血管疾病	心电图——需要麻醉 ² 超声心动图——需要麻醉 ²
免疫功能	FACs 分类计 ³
听力	听性脑干反应——侵入性并需要麻醉 ¹ 听觉惊跳反射——非侵入性 ¹
记忆力	自发改变——不需要视力 ¹ 新空间识别——需要视觉线索 ¹

¹Rizzo 等人, 2018 年; ²Doevendans 等人, 1998 年; ³杰克森实验室

测定试验开展的顺序很重要，应该提前确定。有些试验对开展顺序很敏感；通常建议从侵袭性最小的试验开始，最后是侵袭性最大的（McIlwain 等人，

2001年）。研究表明，先开展的试验会影响后续试验的结果，即使是试验期间给予小鼠恢复时间（McIlwain 等人，2001年）。

#7 测定验证和统计分析

在任何研究中，验证您的测定方法至关重要。在测试新疗法的功效之前，确保技术人员受过培训并且设备正常工作。其目标是在您投入资源到治疗组之前，先用对照群体进行验证。在老龄鼠研究中，这种验证同样重要；即使您之前已在年轻小鼠中验证过您的测定方法，也请使用对照老年组进行重新验证。对于老龄鼠来说，这可能很困难——先要花时间使小鼠变老再用于验证，所有这一切都必须在实验开始前完成。

对于某些测定方法，例如认知功能评估试验，东莨菪碱可用于验证。东莨菪碱可以模拟老龄鼠的认知缺陷。但是，东莨菪碱可能不是所有测定（即视力或嗅觉）的合适验证方法。另一种选择是购买已经老龄的小鼠（最老至78周龄）——这非常快速，并便于您在与计划使用的群体更相似的模型中验证您的测定方法。

除了在开展实验前验证测定方法之外，还必须制定合适的数据分析计划。为生物学变量设置适当对照很重要（即性别）。但是，您可能还需要控制其他变量，例如体重——随着小鼠年龄的增长，其体重将会更加多变。对于诸如握力试验等试验，应将结果根据体重进行校正（Rizzo等人，2018年）。在

设计实验之前，咨询生物统计学家始终是很有必要的，这样可以确定获得具有统计学意义结果所需的小鼠数量。任何研究都是如此，特别是在纵向研究中——您肯定不希望在一年的研究结束时发现您没有足够的数据点！

#8 考虑您的实验终点

最后但同样重要的是，考虑老年动物群体的健康监测和实验终点至关重要。务必咨询兽医工作人员，讨论如何监测老龄鼠群体的健康状况，并关注它们的福利。必须持续监测这些变化，不仅是为了实验管理，还为了实验小鼠的福利。

制定一组明确界定的终点对于正确设计您的研究至关重要。当研究结束时，终点就是小鼠的关键点——无论是因为您已经获得了研究所需的数据，还是因为衰老导致健康问题日积月累、从而意味着要对小鼠实施安乐死。如果您正在研究肿瘤生长的速度，那么终点可能是肿瘤达到一定大小的时间点。同样，在研究寿命时，终点可能是小鼠自然、自发死亡的时间点。除了研究的科学目标外，始终考虑动物福利至关重要——向您单位的动物保护和利用委员会（IACUC）核实相关问题是确保人道动物福利终点得到满足的最佳途径。

但是，您将决定终点，并确定评估小鼠健康状况的方法。衰弱与身体状况评估是一般健康评估的一种常用方法。衰弱被定义为“虚弱、缓慢、活动少和耐力差”（Toth 2018年）。有多种评估衰弱的方法，但在小鼠研究中使用最多的是临床衰弱指数（CFI，Toth 2018年，Rizzo 2018年）。小鼠衰弱与人类衰弱相似。例如，在小鼠和人类中，衰弱分数都随着年龄的增长而增加，尽管不同人群的衰弱评分具有更大的变异性（Toth 2018年）。

另一种评价小鼠福利的方法是基于体重和体温。研究表明，在不同品系中，体重和体温的下降都是死亡的前兆，即使没有发病征兆（Toth 2018年）。通过监测实验小鼠的体重和温度，您就可能预测出小鼠可能接近其自然终点的时间点。

老龄B6J小鼠具有模拟人类衰老过程中出现的各种年龄相关疾病的潜力。尽管所给出的大部分数据都来自老龄C57BL/6J小鼠，但其中的许多结论适用于一般老龄鼠品系。仔细设计并考虑老龄鼠的独特需求将有助于确保您获得重要且可重复的数据。请记住，这些类型的研究有可能是长期的，提前制定细致的计划将有助于您的研究取得成功。

要了解JAX 老龄B6J小鼠的更多信息，请访问 www.jax.org/aged-b6。

参考文献

- Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;39(1):34-49. Review. PubMed PMID: 9764188.
- Karp NA, Mason J, Beaudet AL, Benjamini Y, Bower L, Braun RE, Brown SDM, Chesler EJ, Dickinson ME, Flenniken AM, Fuchs H, Angelis MH, Gao X, Guo S, Greenaway S, Heller R, Heralut Y, Justice MJ, Kurbatova N, Lelliott CJ, Lloyd KCK, Mallon AM, Mank JE, Masuya H, McKerie C, Meehan TF, Mott RF, Murray SA, Parkinson H, Ramirez-Solis R, Santos L, Seavitt JR, Smedley D, Sorg T, Speak AO, Steel KP, Svenson KL; International Mouse Phenotyping Consortium, Wakana S, West D, Wells S, Westerberg H, Yaacoby S, White JK. 2017 Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits. *Nat Commun*. Jun 26;8:15475. doi: 10.1038/ncomms15475. PubMed PMID: 28650954; PubMed Central PMCID: PMC5490203.
- McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav*. 2001 Aug;73(5):705-17. PubMed PMID: 11566205.
- NOT-OD-15-102 "Consideration of Sex as a Biological Variable in NIH-funded Research." National Institutes of Health, April 11, 2019, https://orwh.od.nih.gov/sites/orwh/files/docs/NOT-OD-15-102_Guidance.pdf.
- Russell ES. "Chapter 26: Lifespan and Aging Patterns." *Biology of the Laboratory Mouse*, edited by Earl Green, Dover Publications, 1968, pp. 511-519.
- Sukoff Rizzo SJ, Anderson LC, Green TL, McGarr T, Wells G, Winter SS. 2018 Assessing Healthspan and Lifespan Measures in Aging Mice: Optimization of Testing Protocols, Replicability, and Rater Reliability. *Curr Protoc Mouse Biol*. Jun;8(2):e45. doi: 10.1002/cpmo.45. PubMed PMID: 29924918.
- Toth, L. 2018 Identifying and Implementing Endpoints for Geriatric Mice. *Comparative Medicine* Dec; 68(6):439-451. doi: 10.30802/AALAS-CM-18-000022. PubMed PMID: 30486919
- Xie K, Neff F, Markert A, Rozman J, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, Becker L, Brommage R, Garrett L, Henzel KS, Hölter SM, Janik D, Lehmann I, Moreth K, Pearson BL, Racz I, Rathkolb B, Ryan DP, Schröder S, Treise I, Bekeredjian R, Busch DH, Graw J, Ehninger G, Klingenspor M, Klopstock T, Ollert M, Sandholzer M, Schmidt-Weber C, Weiergräber M, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrab de Angelis M, Ehninger D. Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nat Commun*. 2017 Jul 24;8(1):155. doi: 10.1038/s41467-017-00178-3. PubMed PMID: 28761067; PubMed Central PMCID: PMC5537224.
- Yuan R, Meng Q, Nautiyal J, Flurkey K, Tsaih SW, Krier R, Parker MG, Harrison DE, Paigen B. Genetic coregulation of age of female sexual maturation and lifespan through circulating IGF1 among inbred mouse strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 22;109(21):8224-9. Epub 2012 May 7. PubMed 22566614.

Notes:



杰克森实验室 The Jackson Laboratory

上海市浦东新区金科路 2889 弄 3 号长泰广场 C 座 629 室

技术支持

电话：400-001-2626

邮件：micetech@jax.org.cn

网站：www.jax.org/cn

询价下单：

电话：400-693-5700

邮件：orderquest@jax.org.cn

网站：jax.ibiocard.com



扫码关注官方微信