

引文格式:

戎晓媛, 张玉楼, 黄康, 等. 基于视觉恐惧反应的行为分析 [J]. 集成技术, 2020, 9(4): 36-46.

Rong XY, Zhang YL, Huang K, et al. Behavior analysis of fear emotion [J]. Journal of Integration Technology, 2020, 9(4): 36-46.

基于视觉恐惧反应的行为分析

戎晓媛^{1,2} 张玉楼^{1,2} 黄康^{1,2} 刘楠^{1,2} 蔚鹏飞¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

摘 要 对于生物个体的生存和繁衍来说, 采取合适的防御行为及时应对不同危险刺激的能力至关重要。模拟捕食者从上方快速逼近(Looming)可诱发小鼠产生冻结(Freezing)或逃跑(Flight)的本能防御反应。在传统的动物行为学研究中, 通常采取耗时耗力的手动调节方式来给予危险刺激, 限制了动物行为学研究效率的进一步提高。该研究运用光遗传技术及动物行为学对小鼠防御机制进行测试。具体地, 利用新研发的反馈式小鼠行为分析系统, 对小鼠面对同一类型但不同强度的危险刺激(如灰度值大小、光刺激频率高低)时的防御反应进行研究。结果显示, 在较低灰度值的视觉刺激或低频率的光刺激条件下, 小鼠倾向于原地冻结; 在较高灰度值的视觉刺激或高频率的光刺激条件下, 小鼠倾向于逃跑至安全区域。该反馈式小鼠行为分析系统的研发实现了在线实时分析小鼠行为和对小鼠的随机刺激, 提高了实验效率和准确性。

关键词 恐惧反应; 防御行为; 随机刺激

中图分类号 Q 189 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20200330001

Behavior Analysis of Fear Emotion

RONG Xiaoyuan^{1,2} ZHANG Yulou^{1,2} HUANG Kang^{1,2} LIU Nan^{1,2} WEI Pengfei¹

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The ability of animals to respond to different life-threatening stimuli and take the most adaptive defensive behavior is essential for survival and breeding. Studies have found that a gradually expanding black disk in the upper field which simulates the looming of natural predators approaching from above can induce different instinct defensive behaviors of mice, including freezing or flight. In conventional animal behavior

收稿日期: 2020-03-30 修回日期: 2020-06-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31500861); 深圳市基础研究学科布局项目(JCYJ20170411140807570)

作者简介: 戎晓媛(共同第一作者), 硕士研究生, 研究方向为本能恐惧环路的研究基础; 张玉楼(共同第一作者), 硕士研究生, 研究方向为模式识别及动物行为分析; 黄康, 博士, 研究方向为神经信息处理与计算行为学; 刘楠, 博士, 研究方向为本能恐惧行为的神经机制和调控机理; 蔚鹏飞(通讯作者), 副研究员, 研究方向为本能行为的神经环路机制, E-mail: pf.wei@siat.ac.cn.

studies, time and labor-consuming manual operations are used to generate the stimuli, limiting the efficiency of animal behavior studies. In this paper, we have developed a closed-loop animal behavior regulation and analysis system. Based on this system, we have studied the defensive behavior of mice facing different stimuli. Looming with low gray value or low-frequency light stimulation would induce the freezing behavior of mice, which tend to escape to a safe area under looming with high gray value or high-frequency light stimulation. This study has demonstrated an automatic behavior regulation system capable of delivering random stimuli, which can further improve the efficiency and accuracy of the experiment.

Keywords fear response; defensive behavior; random stimulation

1 引言

人类和动物的“基本情感”与生俱来,在物种中广泛存在,并通过进化高度保守地刻印在大脑中可能存在的本能情感环路中^[1]。目前较为公认的情感分类是 Ekman 在 1972 年提出的六种基本情感理论,包括恐惧、愉悦、悲伤、愤怒、厌恶和惊讶^[2]。其中,恐惧情感是个体必不可少的基本情感:一方面,恐惧情感是物种进化与生存过程中最重要和最不可或缺的基本情绪表征之一,在生存和繁衍中起重要作用;另一方面,在应用动物模型的实验室研究中,恐惧刺激诱发的防御行为非常稳定,实验范式可靠且容易建立^[3]。视觉信息是自然界中一种重要的环境线索输入,对动物感知恐惧至关重要。已有研究表明,果蝇、啮齿目动物、非人灵长类动物和人类都会对来自上视野的视觉刺激产生本能防御反应^[4-6]。2013 年,阴影逼近视觉刺激范式被建立并发现该范式可诱发小鼠的逃跑或冻结防御反应^[7]。运用该范式和光遗传技术发现上丘 (Superior Colliculus, SC) 脑区与防御反应相关^[8-9]。其中,光激活上丘内侧神经元可以诱发冻结或逃跑的防御行为^[10-11]。然而,关于小鼠面对同类型但不同强度危险刺激(如视觉刺激灰度值大小、光刺激频率高低)的防御反应的差异却鲜有研究^[12]。恐惧神经环路对刺激信号的处理不当或调节异常,

将会带来很多与恐惧情绪相关的病症,如恐惧症、焦虑症、自闭症、精神分裂症、创伤后压力症和创伤后应激障碍等^[13-14]。因此,解析恐惧形成背后的大脑相关机制具有重要意义。

小鼠行为表型主要取决于外界感觉信息输入的种类和大脑中枢对这些信息的不同处理方式^[15]。科研人员通常给予小鼠光、图像、声音、气味等刺激,深入解析小鼠行为。虽然现有的小鼠行为分析系统或算法功能已经非常强大,能较为准确地分析小鼠多种行为特征变量,但它们均存在一个不足之处,即无法在线实时分析小鼠多种行为特征变量并进行反馈调节。因此实验人员只能在实验完成后,进行离线视频分析。但实际情况是,大多数实验人员需要在实验过程中实时分析小鼠的多种行为特征变量,并在它们达到阈值时给予反馈调节,从而更好地研究小鼠行为。本文自主研发的反馈式小鼠行为分析系统,不仅能在线实时分析小鼠质心坐标位置、速度、头部偏转角度、运动状态等行为特征变量,还可以在小鼠多种行为特征变量值同时达到阈值时,给予相应类型的随机刺激形成反馈调节。该系统刺激种类多样化,可以更好地满足实验人员的需求。实验人员通过图形用户界面就可以方便、可视化地观察刺激过程中的各种变量,也可以调节刺激阈值。当行为特征变量达到设定阈值时,自动触发刺激^[16]。反馈式小鼠行为分析系统不仅能在线

或离线分析动物的各种行为特征变量,还可以更改反馈式小鼠行为分析系统程序中的参数值(实验装置参数值、间隔帧数、时间等)和多种行为变量的阈值,从而满足不同实验者的要求,降低系统成本,实现对动物行为的精确分析。同时,该系统还可以实现实验过程的全自动化。本文利用该反馈式行为分析系统,探索小鼠在不同强度视觉刺激及不同频率光刺激下的防御行为。

2 方 法

2.1 材料

本文动物实验方案经中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审查通过(受理号为 SIAT-IRB-150302-NS-WLP-A0126-4)。Etv1-CreER 转基因小鼠为中国科学院深圳先进技术研究院培育出的转基因品系,实验所用小鼠共 34 只,年龄为 8~12 周。动物生存环境为无特定病原体实验室,照明周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,期间给予充足的饲料和饮水。实验所用病毒为本实验室自制 AAV-DIO-ChR2-mCherry,滴度为 2.19×10^{12} ,每只小鼠于每个位点注射 500 nL。

2.2 动物手术实验

本文动物实验包括病毒注射、光纤植入、灌流及脑组织固定、脑组织切片及免疫组织化学观察。

2.2.1 病毒注射

首先,使用 10% 水合氯醛腹腔麻醉小鼠(注射剂量为 0.04 mL/10 g),麻醉好之后,采用剪刀去除头部表面毛发,并使用立体定位仪固定小鼠,接着使用消毒剪刀剪开头皮,暴露前囟(Bregma)和后囟(Lambda)。然后,以前囟为坐标原点,后囟(0, 0, 4.24)为参考点建立直角坐标系,通过前囟前后(Anteroposterior, AP)、中缝左右(Mediolateral, ML)、颅骨(硬脑膜)平面向下(Dorsoventral, DV)确定坐标位置。接着,

调节小鼠颅骨处于同一水平面。最后,调节定位仪,确定注射目标脑区,采用颅钻打孔后,将预先吸好病毒的注射针缓慢下降至目标位置,以 100 nL/min 的速度注射病毒。注射结束后停针 10 min,再缓缓将针头移出,用酒精或碘伏擦拭颅骨,手术针进行缝合。其中,病毒注射位置坐标为 SC(AP: 3.8 mm, ML: 0.6 mm, DV: -1.7 mm)。

2.2.2 光纤植入

病毒注射 3 周后可植入光纤,重复病毒注射步骤至确定注射位置后,使用颅钻打孔,并调节立体定位仪,将光纤头缓慢下降至目标脑区,再把采用牙科水调匀的牙科粉涂抹于颅骨表面将光纤头包埋固定,待其冷却凝固。其中,光纤植入坐标为 SC(AP: 3.8 mm, ML: 0.5 mm, DV: -1.3 mm)。手术 1 周后进行行为学实验。

2.2.3 灌流及脑组织固定

行为学实验后,先将完全麻醉的小鼠四肢固定于实验台,手术剪剪开小鼠胸腔,将灌注针头插入左心室;然后,剪开右心耳,匀速(20 mL/min)灌注磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution, PBS),待小鼠脑组织中的血液排除干净,灌注多聚甲醛溶液,对脑组织进行固定;最后,将固定好的鼠脑浸泡于 4% 多聚甲醛溶液固定 1 天,再换 30% 蔗糖溶液脱水 3 天后,将鼠脑包埋并放置于 -20°C 或 -80°C 备用。

2.2.4 切片及免疫组织化学观察

将包埋好的鼠脑置于冰冻切片仪并固定在切片机的托盘上,收集目标脑区的脑片置于含有 PBS 的 24 孔板中。其中,组织切片厚度为 30 μm 。采用 PBS 溶液洗涤脑片后贴于载玻片上,封片后使用玻片扫描仪观察目标脑区病毒表达情况及确认光纤埋植位置。

2.3 行为学分析

本研究将统计给予视觉刺激或光刺激后小鼠逃跑所用时间、冻结时间、在安全区域里的时间和自由运动时间等。采用反馈式小鼠行为分析系

统对同一类型(视觉刺激或光刺激)不同刺激强度下小鼠的防御反应进行研究, 以此来评估小鼠对于视觉刺激或光刺激的恐惧程度及其采取的反应。

2.4 行为学装置搭建及系统调试

反馈式小鼠行为分析系统由行为学实验箱、小鼠行为分析系统、随机刺激系统三部分组成。如图 1(a)所示, 行为学实验箱由透明亚克力材料制成, 是一个底部直径为 50 cm 的圆柱形旷场装置(高 45 cm)。其中一端开口 10 cm 并外接一长为 50 cm 长方体, 其底部和侧面均不透明, 顶部有可以拆卸的盖子, 用于遮蔽顶部的视觉刺激, 可为动物提供一个安全区域。视觉呈现通过一块置于行为实验箱装置正上方的 42 英寸液晶显示器实现。在行为实验箱装置和液晶显示器之间, 圆柱形旷场装置正上方 38 cm 处为一个顶部摄像头, 用于拍摄小鼠行为视频。摄像头为自行购买的 120° 广角摄像头, 表面积较小(2 cm×2 cm), 保障了在不遮挡显示器呈现视觉刺激的同时, 完整地拍摄小鼠在圆形旷场中的行为视频, 最终摄像头通过 USB 接口将视频实时传输到小鼠行为分析系统。

为研究小鼠的本能恐惧, 需要通过显示器模拟天敌给予小鼠视觉刺激, 进而分析小鼠在视觉刺激下的行为变化。视觉刺激 Looming 范式细节如图 1(b)所示, 圆盘大小可以用度数来表示, 一半视角度数的正切值是黑盘半径与显示器高度的比值。图 1(b)显示, 一次完整的刺激中共有 15 次视觉刺激(1 次/s)。其中, 在每一次视觉刺激时, 黑盘从 0~250 ms 先均匀地从 2° 增大到 40°, 然后在 40° 持续 250 ms 后消失; 显示器则维持原有亮度 500 ms, 随后进行下一次视觉刺激。依此循环, 直到给予小鼠 15 次视觉刺激后, 一次刺激完成。为避免小鼠适应环境从而无法诱发本能恐惧反应, 采用随机的方式给予小鼠视觉刺激。其中, 随机刺激是指随机给予小鼠灰度值、黑盘大小、频率、时长等参数不同的视觉

刺激。

反馈式小鼠行为分析系统如图 1(c)所示, 圆柱形旷场上方的摄像头实时采集小鼠行为视频流, 通过 USB 接口把数据传递给小鼠行为分析系统——以 Bonsai 可视化编程框架为基础^[17], 搭建的一套自动化动物行为分析系统。该系统能实时分析小鼠质心坐标位置、速度、头部偏转角度等行为特征变量。当小鼠到达实验人员提前设定的感兴趣区域, 且行为变量达到阈值时, 通过串口将小鼠行为特征参数发送至随机刺激系统, 待系统收到完整命令后, 通过内置程序进行串口清零操作, 以确保下次行为特征参数传递的准确性。其中, 随机刺激系统包括视觉刺激及随机序列生成系统和其他刺激生成装置。实验人员通过提前在 Matlab 平台编写程序, 生成含有特定参数的视觉刺激和光刺激, 随后根据实验需要在系统中生成多项刺激命令, 同时通过提前编写随机函数, 随机选择刺激命令并给予小鼠相应刺激。随机视觉刺激通过调用 Psychtoolbox 工具包, 在安装 Matlab 的电脑上生成并通过 42 英寸液晶显示器进行显示。其他刺激通过该系统发送刺激命令至相应刺激生成装置继而生成刺激。以光刺激为例, 生成装置采用 Arduino 开发板接收和处理刺激命令, 通过解析刺激命令程序生成对应的数字信号发送给激光器, 使激光器发出随机序列对应的特定频率及特定脉冲宽度的激光, 并通过光纤刺激小鼠特定脑区。在给予刺激后, 小鼠行为分析系统继续捕获视频分析小鼠行为变化, 同时根据实验需要自动或手动更改行为变量阈值形成闭环反馈。

反馈式小鼠行为分析系统主要通过图像处理算法对小鼠行为视频进行分析, 进而得到小鼠各种行为特征变量。图 2(a)为行为分析算法相应流程, 按照先后顺序依次为: ①采用圆柱形旷场上方 120° 广角摄像头拍摄完整的小鼠行为视频。②对视频进行视野裁剪操作, 剪除视频中多余的

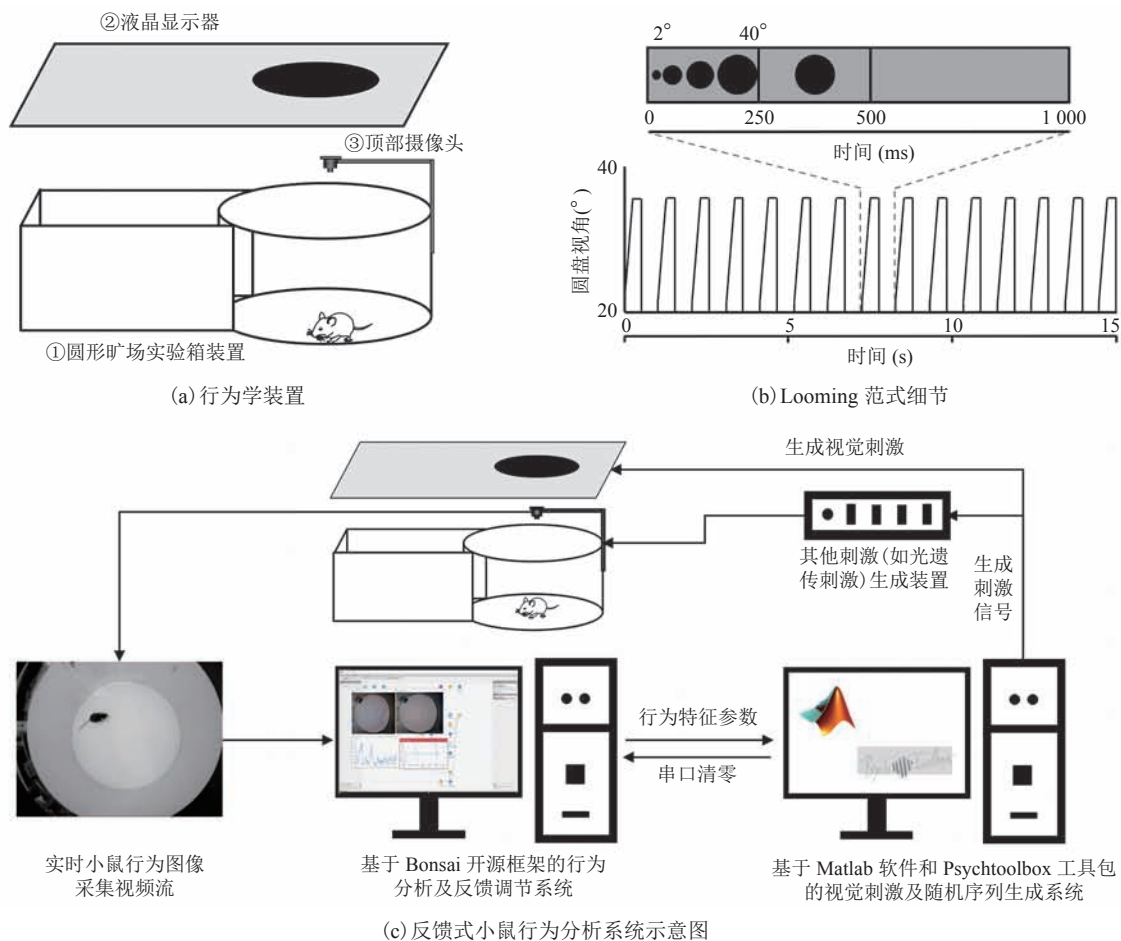


图1 小鼠行为分析和随机刺激系统

Fig. 1 Mouse behavior analysis and random stimulation system

部分。其中，使用圆外切矩形对视频进行裁剪。这种裁剪方式可以根据裁剪区域像素长宽与圆柱形旷场实际半径的比值，计算出小鼠特征变量值实际大小，如小鼠运动速度和运动轨迹的真实数值等。③对裁剪区域视频进行色彩平衡处理，目的是将小鼠与旷场背景进行分离。④通过平滑去噪处理，消除视频中的噪声信号。⑤对视频进行形态学操作，主要为腐蚀和膨胀操作，用来消除视频中光纤对行为分析的影响，使小鼠身体轮廓更加平滑。⑥对视频进行自适应二值化操作，其中像素值小于阈值的设为1，其他像素值设为0，从而得到二值化视频。此时白色小鼠轮廓与黑色背景形成鲜明对比。⑦对视频进行Canny算子边缘提取，得到较为精确的小鼠身体轮廓，接着寻

找视频中小鼠轮廓的最大联通区域，得到小鼠质心，进而得到小鼠质心位置坐标。

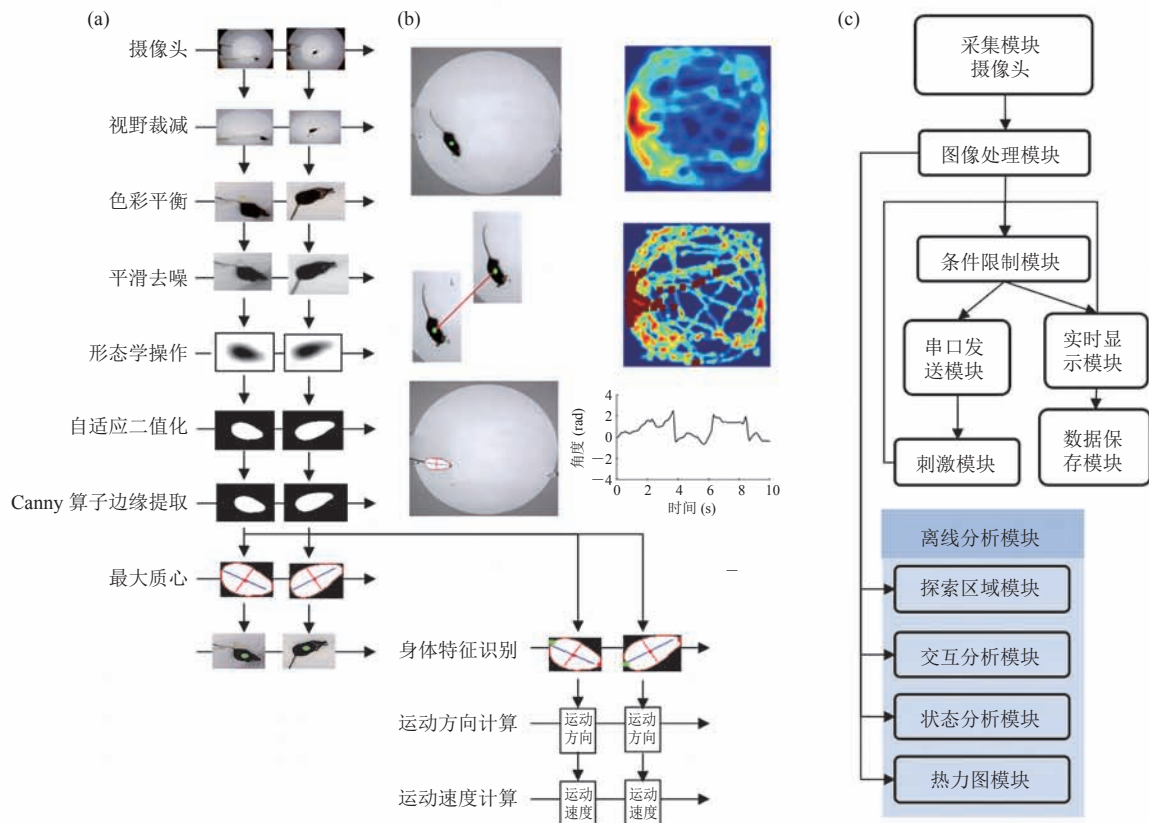
通过检测视频中小鼠身体极大值点，得到小鼠头部和尾部特征点，通过身体长轴和短轴夹角计算出小鼠头部偏转角度，如图2(b)所示。最终，利用不同帧小鼠质心位置坐标间的欧式距离来计算运动速度。本文中，采用 f_1 表示视频帧率， f_n 表示间隔的帧数； (x_1, y_1) 为前一帧小鼠的质心位置坐标， (x_2, y_2) 为间隔 f_n 帧后小鼠质心位置坐标；实验装置实际长度为 L_1 ，实际宽度为 W_1 。对于圆形旷场来说， L_1 与 W_1 均为旷场直径， L_3 和 W_3 为经过图像裁剪、去畸变处理之后的装置像素长和像素宽，则小鼠的运动速度的计算公式为：

$$v=f_1 \times \sqrt{[(x_2-x_1) \times L_1 / L_3]^2 + [(y_2-y_1) \times W_1 / W_3]^2} / f_n(1)$$

结合速度和不同帧间像素累积和变化对动物冻结行为、逃跑行为和正常状态进行分类。通过小鼠质心位置得到小鼠轨迹矩阵, 根据小鼠经过相同位置的次数增加该位置权重, 进而得到小鼠轨迹热力图, 如图 2(b) 第 1 个热力图所示。将小鼠在不同位置的速度大小映射到颜色空间, 即可得到小鼠的速度热力图, 如图 2(b) 第 2 个热力图所示。

如图 2(c) 所示, 反馈式小鼠行为分析系统主要包括视频采集、图像处理、条件限制、串口发送、实时显示、刺激、数据保存和离线分析等模块。圆柱形旷场上方摄像头采集的小鼠行为视频, 经过图像处理模块对各种图形进行处理后,

得到小鼠多种行为特征变量值, 随后由条件模块对相应特征变量值与预设阈值进行大小判断, 如达到阈值则将刺激命令通过串口发送模块发送至刺激模块, 刺激模块解析命令后给予小鼠相应刺激。实验人员可以通过实时显示模块观察小鼠行为特征变量的变化情况, 当刺激后小鼠行为特征变量达到反馈阈值时, 系统自动或实验人员手动修改刺激参数值进行反馈调节。最终, 通过数据保存模块, 将动物各种行为特征变量值保存到指定路径, 并采用离线分析模块对离线视频进行分析。离线分析模块由探索区域、交互分析、状态分析和热力图模块组成, 其中探索区域模块可以根据小鼠质心位置坐标, 分析小鼠进入感兴趣区域的次数和时间。对视频中图像进行二值化处理, 背景将变成黑色, 而小鼠身体轮廓则变成白



(a) 图像处理模块流程图; (b) 小鼠行为变量可视化; (c) 行为分析系统流程图

图 2 行为分析系统流程图及行为变量可视化

Fig. 2 Flow chart of behavior analysis system and visualization of behavior variables

色。因此，当小鼠进入感兴趣区域时，该区域像素累加和将变高。利用统计函数记录小鼠位于感兴趣区域的帧数 f_n ，帧数与帧率 f_1 的比值即为小鼠在感兴趣区域时间 t_1 ，即：

$$t_1 = f_n / f_1 \quad (2)$$

结合像素累积和与时间阈值关系，可求得小鼠进入感兴趣区域的次数。交互分析模块可以分析旷场中小鼠与笼中小鼠社交的时间和次数；状态分析模块可以根据速度和不同帧像素的变化情况，分析小鼠行为状态变化，如分析小鼠在刺激前后行为状态的变化；热力图模块可以采用图像处理算法分析小鼠轨迹热力图和速度热力图。综上所述，反馈式小鼠行为分析系统能较为全面地分析小鼠行为特征变量，并及时给予反馈调节。

本系统将基础图像处理算法按照一定的逻辑顺序组合起来，实现对小鼠多种行为特征变量的分析，这些算法是其中必不可少的一个环节，基于此实现了同时对小鼠多种行为特征变量分析的强大功能。本系统的创新点主要有：(1)与传统分析系统相比，系统基于摄像头模组拍摄小鼠行为视频，完成对小鼠多种行为特征变量的分析，不需要额外的传感器，成本较低。(2)通过不同帧间的像素距离和实际行为学实验箱的尺寸来确定小鼠运动速度，结合速度和不同帧图像的像素变化来确定小鼠的运动状态(冻结或逃跑)。(3)通过开发板编写的命令解析程序把光刺激命令转换为

数字信号，然后将激光器通过光纤连接到小鼠特定脑区给予相应频率、时间、脉宽等特征的光刺激。采用开发板替代价格昂贵的波形发生器，极大地节约了成本。(4)虽然传统小鼠行为分析方法功能很强大，但存在一个共同的缺点是无法对小鼠多种行为特征变量进行实时分析。而与其他传统小鼠分析软件和算法相比，本系统最大的优点是能够实时低延迟地分析小鼠多种行为特征变量，并在多种行为特征变量同时满足阈值条件时，给予小鼠多种类型的随机刺激进行反馈调节。

3 实验结果

3.1 不同强度视觉刺激诱发小鼠防御行为

设定旷场底部中心半径 1/2 的同心圆区域为感兴趣区域，当小鼠进入该区域且满足预设时间速度等条件时，摄像装置捕捉上述信息并通过随机刺激系统触发视觉刺激。为改变刺激的强度，本文设置 5 个灰度值不同的圆盘(25%、45%、60%、75% 和 100%)，由 5° 逐渐扩散到 20°，背景灰度值均保持一致，如图 3(a)所示。将小鼠放入行为学箱体，随机不重复地给予 5 种灰度视觉刺激各一次，记录并对行为学进行分析，结果如图 3(b~c)所示($n=15$)。当视觉刺激强度为 25% 时，小鼠未表现出逃跑反应，冻结小鼠占

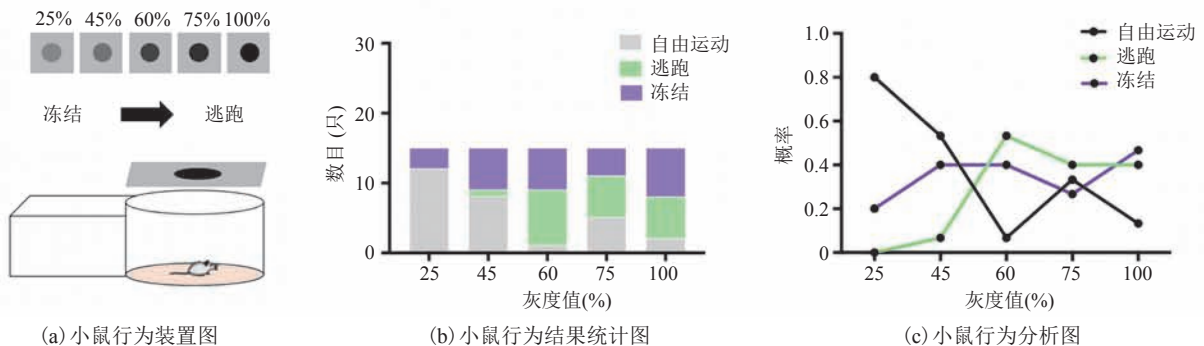


图 3 行为学装置示意图及行为结果统计图

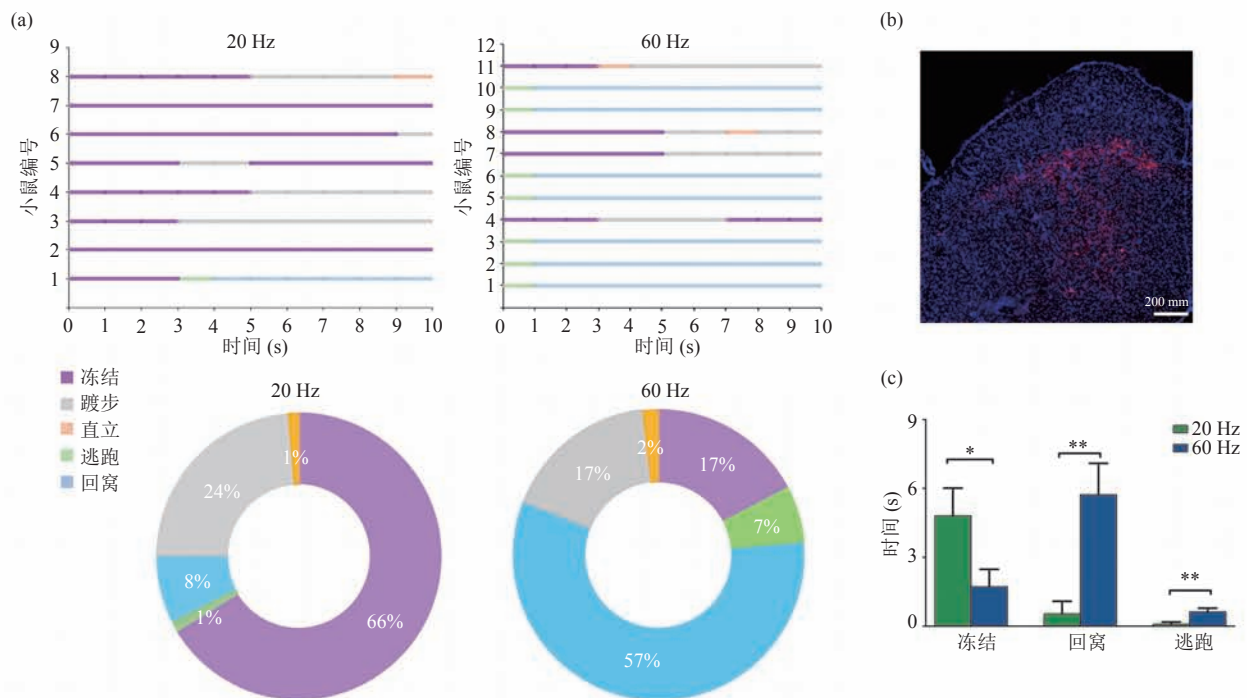
Fig. 3 Schematic diagram of behavior device and statistical graph of behavior results

总数的 20% ($n=3$)、自由运动占 80% ($n=12$); 当刺激强度为 45% 时, 冻结小鼠占 40% ($n=6$), 较 25% 时上升了 20%, 逃跑小鼠占 6.7% ($n=1$), 自由运动占 53.3% ($n=8$); 当刺激强度为 60% 时, 冻结小鼠占 40% ($n=6$), 逃跑小鼠占 53.3% ($n=8$), 自由运动占 6.7% ($n=1$); 当刺激强度为 75% 时, 冻结小鼠占 26.7% ($n=4$), 逃跑小鼠占 40% ($n=6$), 自由运动占 33.3% ($n=5$); 当刺激强度为 100% 时, 冻结小鼠占 46.7% ($n=7$), 逃跑小鼠占 40% ($n=6$), 自由运动占 13.3% ($n=2$)。这表明, 随着刺激强度的增加, 小鼠表现出逃跑或冻结行为, 其中逃跑行为倾向更显著, 自由运动占比降低; 而在小鼠视觉刺激强度较低时, 仅易诱发小鼠产生冻结防御行为。

3.2 不同频率光刺激诱发小鼠防御行为

本研究将 AAV-ChR2-mCherry 病毒注射在转基因小鼠上丘脑区, 利用光遗传学方法, 结合随机刺激系统, 通过不同频率的光随机刺激小

鼠 SC 脑区, 对得到的实验数据进行统计分析。采用 20 Hz 频率光刺激瞬间, 小鼠均表现出冻结行为, 但因个体差异, 冻结时长从 3~10 s 不等。在 8 次实验中, 仅有 1 次小鼠在冻结 3 s 后跑回窝。采用 60 Hz 频率光刺激瞬间, 11 次实验中有 7 次小鼠迅速反应逃跑回窝, 如图 4(a) 所示。将实验后的小鼠进行灌流、鼠脑切片处理以验证病毒表达情况。图 4(b) 显示, 在 SC 脑区病毒表达良好, 表明行为学实验有效。当不同频率的光刺激小鼠时, 小鼠表现出不同的行为反应, 如图 4(c) 所示。其中, 低频刺激更容易诱发小鼠产生冻结反应 (20 Hz 光刺激冻结时间为 (4.818 ± 1.197) s, 60 Hz 光刺激冻结时间为 (1.727 ± 0.751) s, $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (均值 \pm 标准误差), $P=0.040$ 8); 高频刺激下小鼠更倾向于逃跑 (20 Hz 光刺激逃跑时间为 $(0.090$ 91 \pm 0.090 91) s, 60 Hz 光刺激逃跑时间为 $(0.636$ 4 \pm 0.152 1) s, $P=0.005$ 9)。此外, 高频刺激下逃跑后小鼠偏向于



(a) 小鼠行为统计图; (b) 病毒表达图; (c) 小鼠行为分析图 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 非配对 t 检验)

图 4 光刺激结果图

Fig. 4 The results of light stimulation

回窝 (20 Hz 光刺激回窝时间为 (0.5455 ± 0.1772) s, 60 Hz 光刺激回窝时间为 (5.727 ± 1.369) s, $P=0.0022$)。

4 讨论与分析

传统的小鼠行为分析中,常用的软件或算法主要有 3 种:深度传感器、Any-maze 软件和红外传感器,具体如图 5 所示。

如图 5(a)所示,采用低成本深度传感器从下方捕获小鼠的形状,可以在没有光学标记或透明地板的情况下捕捉小鼠的足迹和 3D 爪尖位置。该方法的优点是能准确地追踪小鼠的轨迹特征^[18]。目前已有研究采用商业化行为分析软件,如 Any-maze 软件(图 5(b))对小鼠行为进行分析^[19]。Any-maze 动物行为分析系统不仅可以用于 Barnes(巴恩斯)迷宫、高架 Zero 迷宫^[20-21]、Morris 水迷宫、T-迷宫、Y-迷宫^[22]、八臂迷宫^[23]和高架十字迷宫^[20,24]等各类迷宫的小鼠行为分析,还可以分析圆形旷场和方形旷场中小鼠行为特征变量。该软件的优点是能分析小鼠多种行为特征变量,并且适用实验装置范围广。但以上两种方法都存在一个不足,即无法在线实时分析小鼠多种行为特征变量并进行反馈调节,实验人员无法在实验过程中实时分析小鼠的多种行为特征变量。图 5(c)所示为使用红外踏板对小鼠进行行为分析,虽然该方法能实时分析小鼠行为^[25],但

它是通过小鼠四肢对红外光的遮挡来确定小鼠位置,由于小鼠四肢不间断地在不同位置遮挡红外光,从而造成所求小鼠位置的不准确。

反馈式小鼠行为分析系统除了能进行离线分析外,相比于传统方法最大的优点是它能实时分析小鼠速度、质心位置坐标、轨迹等多种行为特征变量,并且在小鼠多种行为特征变量达到阈值时自动给予反馈调节。经过人工对位置、距离、速度等多种行为变量进行测量计算,与本系统对多种行为变量分析结果对比发现,本系统与人工统计结果的误差要远远小于不同人员测量结果间的误差,证明了本系统的可用性。但在小鼠细节捕捉方面,本文系统还存在一定的局限性,如尚无法做到在实现实时刺激的基础上对小鼠行为(如毛发梳理、肢体伸展、尾巴摆动)进行捕捉并分析。因此,有待进一步提升和完善,使实验结果更为精细化。

关于逃跑和冻结防御行为,大部分研究聚焦于防御行为与神经元的关系。例如,Salay 等^[26]发现腹中线丘脑脑区的两类神经元分别介导小鼠产生逃跑和冻结防御行为;Shang 等^[10]发现位于上丘脑区不同层的同一神经元介导不同防御行为。但对同一类型不同强度危险刺激诱发的防御反应鲜有研究。本文基于反馈式动物行为分析系统探讨了小鼠在不同灰度值或光刺激频率刺激时采取的防御行为。其中,给予小鼠不同灰度值的 Looming 视觉刺激,当灰度值较小时,小鼠

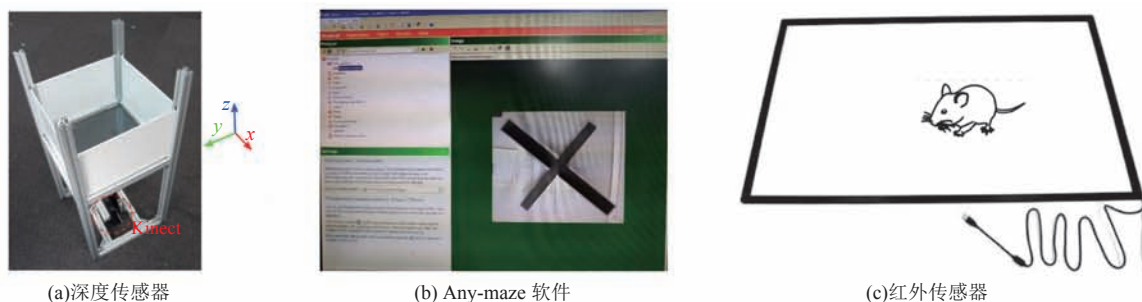


图 5 传统动物行为分析方法示意图

Fig. 5 Schematic diagram of traditional animal behavior analysis methods

倾向于冻结, 在躲避捕食者的同时最大程度保存体力; 当灰度值较大时, 危险系数增大, 小鼠逃跑比例上升。采用光遗传学激活小鼠上丘脑区神经元, 当光刺激频率较低时, 小鼠趋向于原地冻结; 当光刺激频率较高时, 小鼠会采取迅速逃跑至安全区域的防御行为。虽然小鼠对同种类型不同强度的刺激表现出不同的防御反应, 但其具体神经机制和调控机理尚未清楚——不同防御反应的产生是由于上丘脑区神经元投射的不同而形成不同神经环路, 还是上丘脑区内部一类或几类神经元构成了微环路, 进而介导不同的防御反应, 均有待进一步研究。

5 总 结

本文提出一种自主研发的反馈式小鼠行为分析系统。与其他软件和算法相比, 该系统可以实时分析小鼠多种行为特征变量, 给予小鼠多种类型的随机刺激并能进行反馈调节, 实现了小鼠行为学实验的全自动化操作。通过该系统对同一类型不同刺激强度下小鼠的防御行为进行研究发现, 在低强度的危险刺激(低灰度值、低光刺激频率)时, 小鼠倾向于原地冻结; 在高强度的危险刺激(高灰度值、高光刺激频率)时, 小鼠趋向于逃跑至安全区域。这表明, 反馈式小鼠行为分析系统可以实现小鼠行为调控和分析的自动化, 节约成本的同时提高了实验效率和准确性, 也丰富了动物行为学研究工具库。此外, 本研究发现不同强度的刺激会诱发小鼠产生相应的防御行为, 加深了对大脑恐惧相关机制的理解, 可为恐惧相关疾病治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Ledoux J. Rethinking the emotional brain [J]. *Neuron*, 2012, 73(4): 653-676.
- [2] Ekman P, Friesen WV. Constants across cultures in face and emotion [J]. *Journal of Personality and Social Psychology*, 1971, 17(2): 124-129.
- [3] Medina JF, Repa JC, Mauk MD, et al. Parallels between cerebellum-and amygdala-dependent conditioning [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, 3(2): 122-131.
- [4] Muijres FT, Elzinga MJ, Melis JM, et al. Flies evade looming targets by executing rapid visually directed banked turns [J]. *Science*, 2014, 344(6180): 172-177.
- [5] Cléry J, Guipponi O, Odouard S, et al. The prediction of impact of a looming stimulus onto the body is subserved by multisensory integration mechanisms [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2017, 37(44): 10656-10670.
- [6] Maier JX, Neuhoff JG, Logothetis NK, et al. Multisensory integration of looming signals by rhesus monkeys [J]. *Neuron*, 2004, 43(2): 177-181.
- [7] Yilmaz M, Meister M. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli [J]. *Current Biology*, 2013, 23(20): 2011-2015.
- [8] Shang CP, Liu ZH, Chen ZJ, et al. A parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice [J]. *Science*, 2015, 348(6242): 1472-1477.
- [9] Wei PF, Liu N, Zhang ZJ, et al. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6756.
- [10] Shang CP, Chen ZJ, Liu AX, et al. Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1232.
- [11] Evans DA, Stempel AV, Vale R, et al. A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions [J]. *Nature*, 2018, 558(7711): 590-594.
- [12] Evans DA, Stempel AV, Vale R, et al. Cognitive control of escape behaviour [J]. *Trends in Cognitive Science*, 2019, 23(4): 334-348.
- [13] Silva BA, Cross CT, Graff J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization [J]. *Learning & Memory*, 2016, 23: 544-555.

- [14] Zuj DV, Palmer MA, Lommen MJ, et al. The centrality of fear extinction in linking risk factors to PTSD: a narrative review [J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2016, 69: 15-35.
- [15] Hoelter SM, Dalke C, Kallnik M, et al. "Sighted C3H" mice—a tool for analysing the influence of vision on mouse behaviour? [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13: 5810-5823.
- [16] Apt KR, Brunekreef J, Partington V, et al. Alma-O: an imperative language that supports declarative programming [J]. *ACM Transactions on Programming Languages & Systems*, 1998, 20(5): 1014-1066.
- [17] Lopes G, Bonacchi N, Frazão J, et al. Bonsai: an event-based framework for processing and controlling data streams [J]. *Frontiers in Neuroinformatics*, 2015, 9: 7.
- [18] Nakamura A, Funaya H, Uezono N, et al. Low-cost three-dimensional gait analysis system for mice with an infrared depth sensor [J]. *Neuroscience Research*, 2015, 100: 55-62.
- [19] D'agostino G, Cristiano C, Lyons DJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha plays a crucial role in behavioral repetition and cognitive flexibility in mice [J]. *Molecular Metabolism*, 2015, 4(7): 528-536.
- [20] Kanner AM, Schachter SC, Barry JJ, et al. Depression and epilepsy, pain and psychogenic non-epileptic seizures: clinical and therapeutic perspectives [J]. *Epilepsy & Behavior*, 2012, 24(2): 169-181.
- [21] Dugbartey GJ, Talaei F, Houwertjes MC, et al. Dopamine treatment attenuates acute kidney injury in a rat model of deep hypothermia and rewarming—the role of renal H₂S-producing enzymes [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 769: 225-233.
- [22] Rodgers RJ, Cole JC, Aboualfa K, et al. Ethopharmacological analysis of the effects of putative anxiogenic agents in the mouse elevated plus-maze [J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1995, 52(4): 805-813.
- [23] Payandemehr B, Ebrahimi A, Gholizadeh R, et al. Involvement of PPAR receptors in the anticonvulsant effects of a cannabinoid agonist, WIN 55, 212-2 [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2015, 57: 140-145.
- [24] Tanaka-Esposito C, Chen Q, Lesnefsky EJ. Blockade of electron transport before ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury during reperfusion in aged rat hearts [J]. *Translational Research*, 2012, 160(3): 207-216.
- [25] 于波, 程绍信, 冯汉炯, 等. 动物行为检测方法及装置: 中国, ZL201711402570.3 [P]. 2018-06-29.
- [26] Salay LD, Ishiko N, Huberman AD. A midline thalamic circuit determines reactions to visual threat [J]. *Nature*, 2018, 557(7704): 183-189.