

## 引文格式:

叶家霖, 徐阳, 王枫. 基于三维行为分析系统的视觉本能恐惧行为检测装置 [J]. 集成技术, 2022, 11(5): 45-57.

Ye JL, Xu Y, Wang F. A device based on 3D-motion learning framework for animal visually-evoked innate fear behavior analysis [J]. Journal of Integration Technology, 2022, 11(5): 45-57.

# 基于三维行为分析系统的视觉本能恐惧行为检测装置

叶家霖<sup>1,2</sup> 徐 阳<sup>1,2</sup> 王 枫<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

<sup>2</sup>(中国科学院大学 北京 100049)

**摘 要** 动物的行为学分析是神经科学研究中的重要一环, 然而, 以往的分析方法大多基于人工识别或使用图像识别技术分析动物轨迹。前者耗时费力、主观性强, 后者忽略了三维空间中动物的大量身体姿态信息。基于已有动物行为自然结构的三维行为分析框架, 该文设计并搭建了一套适用于多场景, 如视觉本能恐惧行为的三维空间姿态采集设备, 优化了数据处理及分析流程中的部分环节。结果表明, 该系统能够较为准确地识别小鼠的 5 大类特征性动作, 并且高精度地还原小鼠在视觉恐惧信号刺激下的动态防御行为。该研究为视觉本能恐惧行为的自动化分析提供了一种高效、客观、量化的解决方案, 结合其他神经科学前沿研究手段, 能更加精细、深入地解析该行为的神经环路机制。

**关键词** 动物行为学; 视觉本能恐惧行为; 动作层次结构; 无监督聚类

**中图分类号** Q 189; Q 331 **文献标志码** A **doi**: 10.12146/j.issn.2095-3135.20220120001

## A Device Based on 3D-Motion Learning Framework for Animal Visually-Evoked Innate Fear Behavior Analysis

YE Jialin<sup>1,2</sup> XU Yang<sup>1,2</sup> WANG Feng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

<sup>2</sup>(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

\*Corresponding Author: feng.wang@siat.ac.cn

**Abstract** Behavioral analysis of animals is an essential part of neuroscience research. However, most previous methods are based on manual recognition or use image recognition technology to analyze animal trajectories. The former is time-consuming and subjective, while the latter ignores the large amount of body posture information of animals in three-dimensional space. Based on the existing three-dimensional behavioral analysis framework inspired by the natural structure of animal behaviors, this study designs and

收稿日期: 2022-01-20 修回日期: 2022-02-21

基金项目: 国家自然区域创新发展联合基金集成项目 (U20A6005); 深圳市重大脑疾病机制研究与转化重点实验室项目 (ZDSYS20200828154800001)

作者简介: 叶家霖, 硕士研究生, 研究方向为神经生物学; 徐阳, 硕士研究生, 研究方向为计算行为学; 王枫 (通讯作者), 副研究员, 研究方向为情绪与行为性别差异的神经环路机制, E-mail: feng.wang@siat.ac.cn.

builds a three-dimensional spatial posture acquisition device applicable to multiple scenarios, such as visual innate fear behavior, and optimizes some parts of the data processing and analysis process. The results show that the system is able to accurately identify the five major types of mouse movements, and can restore the dynamic process of defensive behaviors of mice under the visually life threaten with high accuracy. This study provides an efficient, objective, and quantifiable solution for the comprehensive analysis of visually-evoked innate fear behavior. Furthermore, combined with other cutting-edge methods, this system may provide to more finely and deeply data for the neural circuit mechanism of behaviors.

**Keywords** ethology; visual innate fear behavior; hierarchical behavior; unsupervised cluster

**Funding** This work is supported by National Natural Science Foundation of China-Guangdong Joint Fund (U20A6005) and Shenzhen Key Laboratory of Translational Research for Brain Diseases (ZDSYS20200828154800001)

**Ethical Statement** This study was approved by the Animal Care and Use Committees at the Shenzhen Institute of Advanced Technology (ID number: SIAT-IACUC-20210726-ZKYSZXJJSYJY-RZC-WF-A1162-01)

## 1 引 言

在神经科学研究中,与大多数可客观检测的生理化学指标不同,认识和理解模式动物的行为及情绪反应往往需要通过各种行为学范式对动物的行为和动作进行解读和判断<sup>[1]</sup>。目前,对录制的视频进行人工辨识是动物行为学分析的主要方法之一。但这种传统的分析方法不仅耗时费力,而且结果容易受到实验者主观因素的影响<sup>[1-2]</sup>。因此,开发高效、客观、可定量描述的行为分析方法,对神经行为学研究尤为重要<sup>[2-3]</sup>。

计算机科学技术的进步推动了动物行为自动化分析的发展。一些基于图像识别方法的商业化软件,如 ANY-maze<sup>[4]</sup>、Xeye Aba<sup>[5]</sup>等,已广泛应用于自动追踪动物的运动轨迹。然而,这些分析方法将小鼠身体简化为一个物理点,忽略了动物在三维空间中的姿态信息,难以识别更复杂的动作,如站立、理毛等。为提高动物行为学分析的解析度,黄康等<sup>[6]</sup>于 2021 年提出,使用 Behavior Altas 分析框架对动物行为自然结构进行层次化分解。这一方法能够无偏倚地识别小鼠 40

种以上的动作,为自动化高精度分析动物的行为提供了重要的工具。

为了更好地认识小鼠更多的行为,需要在此基础上扩大应用场景,开发适配多种行为学范式的检测及分析系统。视觉本能恐惧行为在进化上高度保守<sup>[7-8]</sup>,对个体生存及物种繁衍极为重要<sup>[9]</sup>。稳定、典型、层次化结构鲜明的本能防御行为可以被视觉威胁刺激诱导产生,包括装死(Freezing)<sup>[4]</sup>、逃跑<sup>[10]</sup>和防御样攻击<sup>[11]</sup>。其中,小鼠典型的逃跑行为可大致分为四部分基本内容,即威胁检测、风险评估、启动逃跑和再次评估威胁<sup>[12]</sup>。但这种本能防御行为的动作时序变化规律,由于分析方法的精度不足,已发表的文章中暂时缺少对该过程的量化分析结果。

为了解析视觉威胁下小鼠防御行为的动作模块结构及其变化规律,本研究通过改造升级姿态采集设备,优化数据处理的部分流程,搭建了一套适用于检测小鼠视觉本能恐惧行为的三维精细行为学分析装置。结果表明,该装置能够无遮挡地从多角度采集动物行为学视频数据,较为清晰地合理地将动物的姿态动作进行划分,鉴别出了 5

大类特征性动作。通过对小鼠在视觉本能恐惧反应中动作模块的细致分析, 基本可以还原该过程的动作时序变化。在未来结合高时空精度的神经信号记录和神经环路调控技术, 能够深入解析调控视觉本能恐惧行为的神经环路机制, 对理解恐惧异常神经精神疾病的发生和发展均具有重要意义。

## 2 方 法

### 2.1 实验动物

本研究使用的动物实验方案及饲养方式均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: SIAT-IACUC-20210726-ZKYSZXJJSYJY-RZC-WF-A1162-01)。实验选用 8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 雌雄各 3 只, 采购于浙江维通利华公司。所有实验小鼠饲养于无特定病原体的屏障环境中, 可自由摄取食物和饮水。实验室照明周期为 12 h 光照(8:00~20:00)/12 h 黑暗(20:00~次日 8:00)。动物送达后适应环境两周后开展实验。

### 2.2 视觉本能恐惧行为学范式

通过在小鼠上视野施加不断扩大的黑色圆盘(Looming 刺激)模拟空中天敌迫近, 从而稳定地诱发小鼠的视觉本能恐惧行为<sup>[4,10]</sup>。Looming 行为学测试箱及相关设置大多参考杨星等<sup>[13]</sup>使用的参数(图 1(a)), 其中, 为了多角度记录小鼠的三维姿态, 行为箱外壁改用透明的亚克力材料。Looming 视觉刺激由 MATLAB 的 Psychtoolbox 工具包控制产生, 通过正上方的显示屏呈现。黑色圆盘面积的大小由小鼠的视野与圆盘直径的夹角  $\theta$  来计算(图 1(c))。一次完整的 Looming 刺激包括 15 组重复的视觉刺激: 首先是 250 ms 的圆盘均匀扩大(从  $0^\circ$  到  $40^\circ$ ), 并在  $40^\circ$  时维持 50 ms, 然后圆盘消失。停顿 30 ms 后, 新的一组刺激继续施

加, 直到 15 组刺激施加结束(图 1(c))。所有小鼠在实验前一天放入行为测试箱适应 10 min, 期间不给予 Looming 刺激。正式实验时长为 15 min, 先将小鼠放入行为测试箱并让其自由探索 5 min, 在随后的 10 min 内, 每当动物运动到圆筒旷场中心区域(图 1(a)中红色虚线内), 手动施加一次 Looming 刺激。每只小鼠共接受 2 次 Looming 刺激, 每次刺激间隔时长至少 3 min(图 2(a))。所有行为学实验均在 9:00~13:00 间完成, 每次放置小鼠前均用浓度为 20% 的酒精彻底清理箱体。

### 2.3 姿态采集设备的搭建及系统调试

为了从多角度获取动物在三维空间中的姿态信息, 本研究使用 4 个 Realsense 深度摄像头拍摄动物行为(Intel, 型号 D435i; 曝光参数固定, 帧率为 30 帧/s, 分辨率为  $640 \times 360$ )。为了让相机视野能够完全覆盖 Looming 行为学测试箱, 参考黄康等<sup>[6]</sup>使用的摄像头最佳视野覆盖角度  $70^\circ$ , 计算摄像头放置距离并设计箱体架构(图 1(a))。另外, 为了适配 Looming 行为测试的实验条件, 本研究对设备进行改造和升级, 包括: (1) 增加支撑显示屏的支架。姿态采集设备内顶部是可升降的显示器支架, 可以根据实验需求调整显示器高度, 以达到最佳的 Looming 视觉刺激效果。(2) 减少屏幕光源对拍摄的影响。在 Looming 行为学测试中, 需要上方屏幕维持常亮。为减少光线反射引起的过曝, 在设备底面铺设可吸光磨砂软垫。(3) 采用滑轨和螺丝组合固定摄像头高度, 配合可伸缩的多角度旋转摄像头支架, 可便于调整相机拍摄位置以获得最佳视野。(4) 外箱体四面均为可开闭的磁吸式柜门, 方便实验人员放入动物及清洁行为实验箱。(5) 门内侧贴满黑色吸音海绵, 能有效屏蔽外界光源对拍摄曝光度的影响及外界声源对小鼠行为的影响。

### 2.4 相机标定与行为学视频数据采集

相机标定采用 MATLAB 的 Camera Calibrator

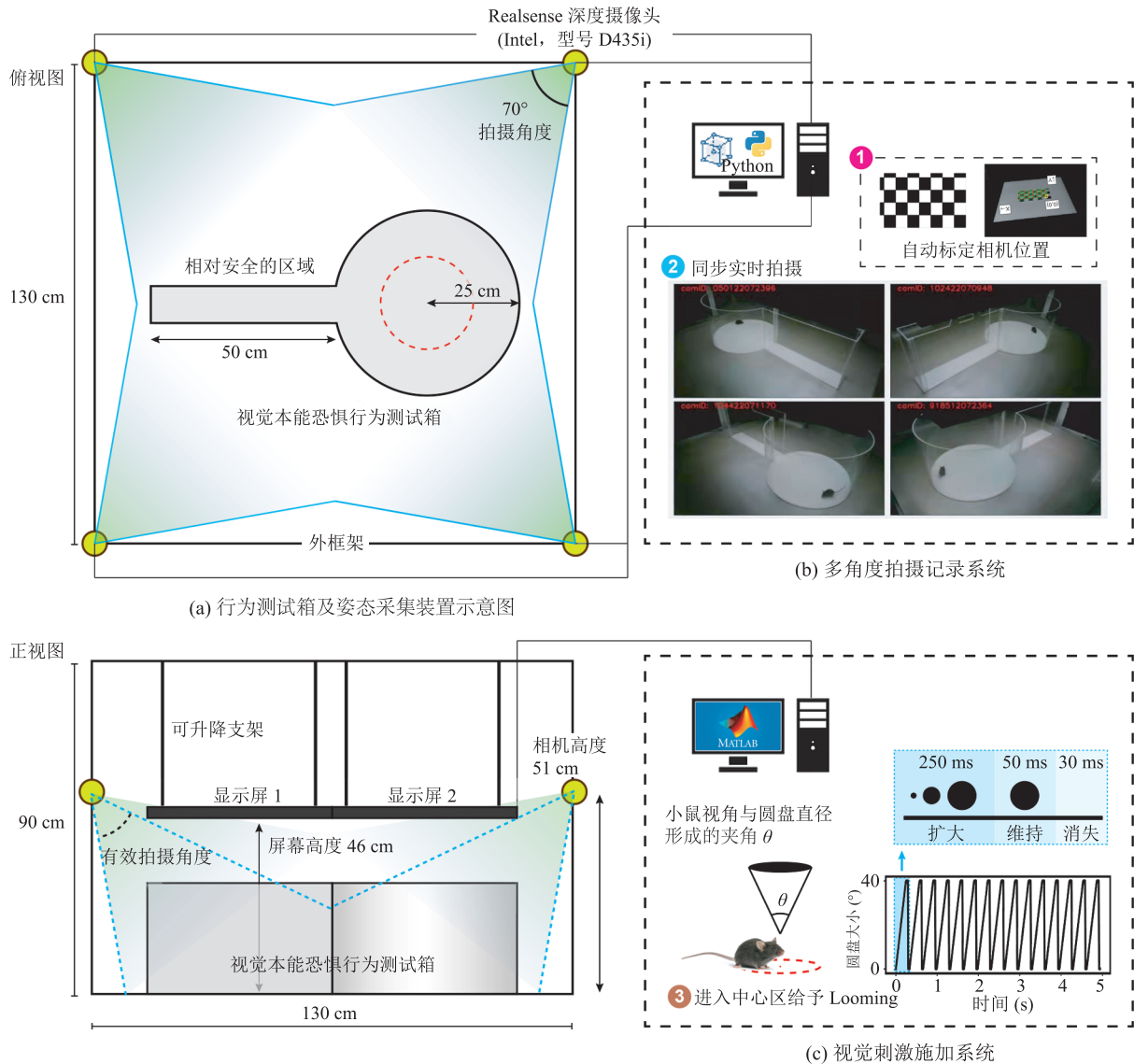


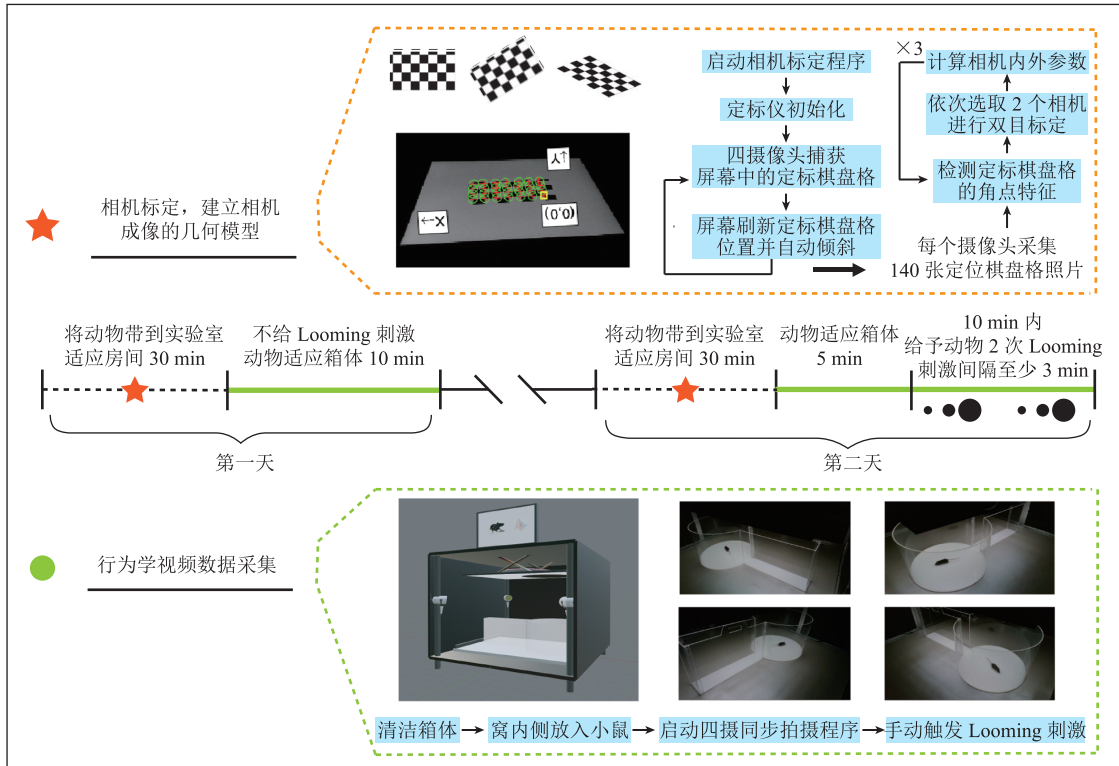
图1 自动化记录小鼠视觉本能恐惧行为的姿态采集设备

Fig. 1 An apparatus for automatically recording mice's postures of visually-evoked innate fear behaviors

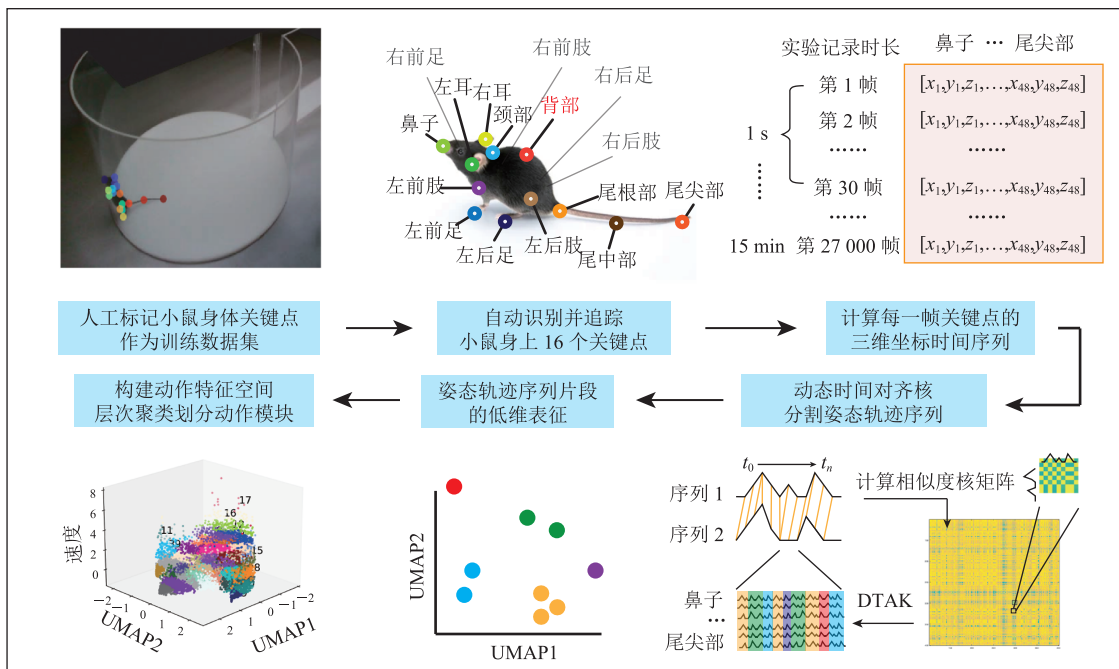
工具包完成，过程如下：4个摄像头，设置其中1个为主摄像头，其余3个副摄像头分别与主摄像头进行双目标定，然后再确定主摄像头的相机内、外参数和畸变参数。人工检查图片拍摄质量及每一对相机的重投影误差，使其小于1%，以确保相机的标定效果。根据实验设计，完成行为学实验，收集行为学视频数据。文件存储位置、统一命名、拍摄时长和同步四摄像头拍摄时间等由Python脚本控制(图2(a))。

## 2.5 行为学视频数据处理

参考 Behavior Altas<sup>[6]</sup>的三维行为分析框架进行视频数据处理(图2(b))。首先进行人工标定训练集数据与模型训练：选择小鼠的鼻子、左耳、右耳、颈部、左前肢、右前肢、左后肢、右后肢、左前足、右前足、左后足、右后足、背部、尾根部、尾中部和尾尖部这16个身体关键点进行人工标记，总共标记了2500帧图片。然后将训练模型、拍摄的行为学视频(4个摄像



(a) 行为学实验流程及视频数据采集步骤



(b) 使用 Behavior Atlas 动物三维行为分析框架分析行为

图 2 小鼠三维动作姿态数据采集及 Behavior Atlas 的数据处理流程图

Fig. 2 Procedure of three-dimensional motion and posture data acquisition of mice and the flow chart of data processing in Behavior Atlas

头)及相机标定文件规范整理并上传到 Behavior Altas 云服务器,对动物行为进行分解,最终得到每一帧的动作模块标签。云服务器基本运算流程如下(图 2(b)): (1)使用人工标记的图片数据集训练 DeepLabCut 深度神经网络; (2)使用训练好的神经网络模型自动追踪上述 16 个关键点; (3)重建小鼠三维骨架,获得小鼠 16 个关键点的三维坐标时间序列(姿态轨迹序列); (4)计算姿态轨迹序列相似性核矩阵,使用动态时间对齐核(Dynamic Time Alignment Kernel, DTAK)的动态规划算法无监督分割姿态轨迹序列; (5)姿态轨迹序列的低维表征,生成二维的姿态特征空间; (6)加入速度维度,构建三维的动作特征空间,层次聚类划分出基本的动作模块。最后,使用 Python 编写程序对导出的初级数据细致分析并导出论文图片。

### 3 实验结果

#### 3.1 小鼠行为的结构化姿态特征分析

对采集的所有行为学视频进行三维行为学分析,系统聚类生成了 40 类动作模块。为了更准确地描述每一类动作模块所代表的小鼠姿态特征,本研究选取每一类中最具有代表性的 50 个视频片段(即动作特征空间中距类中心最近的 50 个点)进行人工查验与注释(表 1)。根据小鼠背部点坐标的位移速度及整体的姿态特征,将小鼠的动作分为 5 大类。

具有较高移速运动特征的动作中:漫步(第①大类)的速度介于 60~150 mm/s(图 3(c)),动作一致性为 79.76%(表 1),大多表现为以较慢的速度向前移动,该类动作包含不同姿态特征的动作模块(图 3(f)),如动作模块 25 有很大比例是小鼠以较慢的速度移动,甚至停顿,其姿态特征表现为嗅探或抬头观察;而动作模块 28 大多是小鼠在缓慢地向右转(表 2)。行走(第②大类)的

速度介于 140~280 mm/s(图 3(d)),动作一致性为 66.40%(表 1),表现为小鼠以一定速度向前移

表 1 动作模块的注释与动作一致性统计

Table 1 Movement annotation and the statistics of behavior consistency

动作类别	动作模块	人工复检一致性 (%)	动作模块在动作类别中占比 (%)	整体一致性 (%)
漫步	25	86.00	12.27	79.76
	28	54.00	8.82	
	30	82.00	27.77	
	26	78.00	13.35	
	29	70.00	11.10	
	38	88.00	26.69	
行走	4	66.00	19.45	66.40
	14	58.00	18.57	
	3	60.00	5.15	
	13	76.00	12.55	
	8	78.00	16.99	
	7	66.00	13.51	
奔跑	16	92.00	84.90	89.97
	17	78.57	15.10	
起立	40	100.00	14.97	82.28
	37	98.00	25.01	
	24	100.00	12.90	
	23	88.00	4.90	
	1	68.00	7.58	
	2	80.00	7.46	
	31	56.00	9.27	
	32	68.00	7.52	
	33	40.00	10.39	
	停顿	18	74.00	
10		54.00	4.06	
20		74.00	9.23	
22		76.00	17.83	
9		88.00	5.12	
35		78.00	9.64	
36		80.00	15.49	
6		72.00	11.35	
5		86.00	5.12	
19	42.00	5.39		
21	50.00	6.44		

注:动作模块标签 15、11、27、39 因动作片段过短无法进行人工识别,整体一致性 =  $\sum$  (人工复检一致性  $\times$  动作模块在动作类别中占比)

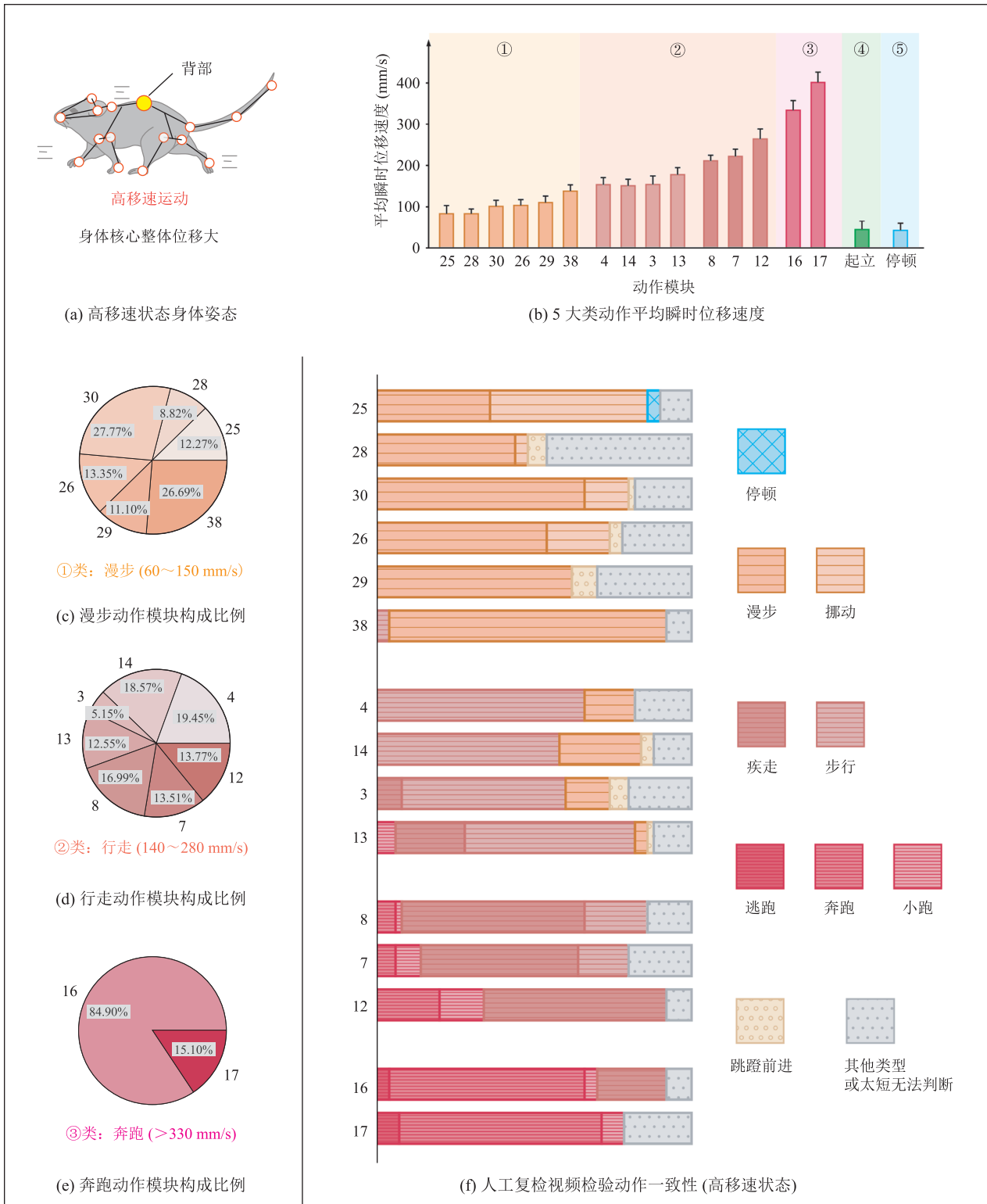


图 3 高移速状态下的动作模块组成、特征及人工查验一致性

Fig. 3 Components and the features of relative high-speed movement state, and the consistency of each movement module reviewed manually

表2 高移速状态动作模块的详细动作特征描述

Table 2 Detailed feature description of high-speed movement modules

动作大类	动作模块标签	背部姿态点 平均移动速度 (mm/s)	具体动作特征描述
①漫步： 小鼠向前移动，速度介于 60~150 mm/s，同时表现多种探 索行为，包括嗅探、观察等	25	(83 ± 20)	移速低，较多表现为向前挪动
	28	(83 ± 11)	移速低，较多表现为向右转
	30/38	(101 ± 15)/(138 ± 15)	移速较低，较多表现为身体紧贴地面，鼻子向下探索
	26	(103 ± 14)	移速较低，较多表现为身体贴着地面前进，有部分向左转
②行走： 小鼠以较快速度向前移动，速度 介于 140~280 mm/s，主要为面 朝向前方前进，或头朝下探索， 或向左转，或向右转	29	(110 ± 16)	移速较低，较多表现为踏步前进的同时，抬头探索
	4/13	(153 ± 17)/(177 ± 17)	踏步前进，较多表现为身体紧贴地面，鼻子向下探索
	14	(153 ± 21)	踏步前进，较多表现为向左转
	3	(153 ± 21)	踏步前进，较多表现为向右转
	8/7/12	(211 ± 14)/(221 ± 18)/(263 ± 24)	疾走，移动速度较快，存在一定比例身体紧贴地面，鼻子 向下探索
③奔跑： 小鼠以非常快的速度向前移动，包 括逃跑行为，速度 > 300 mm/s	16	(333 ± 24)	向前移动速度非常快
	17	(401 ± 25)	

表3 低移速状态动作模块的详细动作特征描述

Table 3 Detailed feature description of low-speed movement modules

动作大类	动作模块标签	具体动作特征描述
④起立： 小鼠两后足着地，前肢不同程度地抬起，整体 身体高度提升	40、37	表现为扶着亚克力透明墙壁站立，踮着脚向上伸展身体
	24、23	表现为站立，存在一定比例的其他各类起立状态动作
	2、1	表现为站立且弯腰，其余一定比例为扶墙弯腰爬或理毛状态
	32、31、33	最大比例为各类起立状态动作，存在一定比例的停顿状态，具体表现为 停顿向上观望或向上嗅探
⑤停顿： 小鼠整体核心没有位移或位移量极少，平均瞬 时位移速度 < 40 mm/s，整体特征为身体蜷缩， 或在原地伸缩嗅探	18、10	表现为停顿或位移极小状态，大多为向上嗅探或起身嗅探
	20、36、6	表现为身体停顿在原地嗅探，存在很大一部分比例侧向右边嗅探
	22、35	表现为身体停顿在原地嗅探，存在很大一部分比例侧向左边嗅探
	9、5	表现为身体停顿在原地向前嗅探，存在一定比例完全静止不动的状态
理毛亚类： 小鼠停在原地，扭头舔舐毛发并用前足梳理， 或用前足沾湿唾液梳理面部毛发及胡子	19	表现为理毛时头扭向身体右侧，存在一定比例的停顿状态，具体为向 右、起身或向上嗅探
	21	表现为理毛时头扭向身体左侧，存在一定比例的停顿状态，具体为向 左、起身或向上嗅探
无法确定类型	11、15、27、 39	切割的动作片段小于 0.5 s 的占一半以上，人工难以识别，仅从可识别 的视频片段来看，5 和 11 是高速地左转，27 和 39 是高速地右转

动，姿态特征表现为向左转，或向右转，或身体紧贴地面，鼻子向下探索(表 2)。奔跑(第③大类)的速度大于 300 mm/s(图 3(e))，动作一致性高达 89.97%(表 1)，主要表现为小鼠以非常快的速度奔跑前进，包含逃跑(表 2)。

具有较低移速运动特征的动作中：起立(第④大类)，动作一致性高达 82.28%(表 1)，整体

表现为小鼠从四足着地的姿势转变为后足着地，前肢抬起(图 4(a)，表 3)。停顿(第⑤大类)，动作一致性为 72.69%，整体表现为小鼠停留在原地，进行嗅探或完全静止不动(图 4(d)，表 3)。其中，动作模块 19 和 21 有超过一半的比例为理毛行为(除去太短无法辨识的视频片段)，身体分别扭向右侧或左侧(图 4(f)，表 3)。



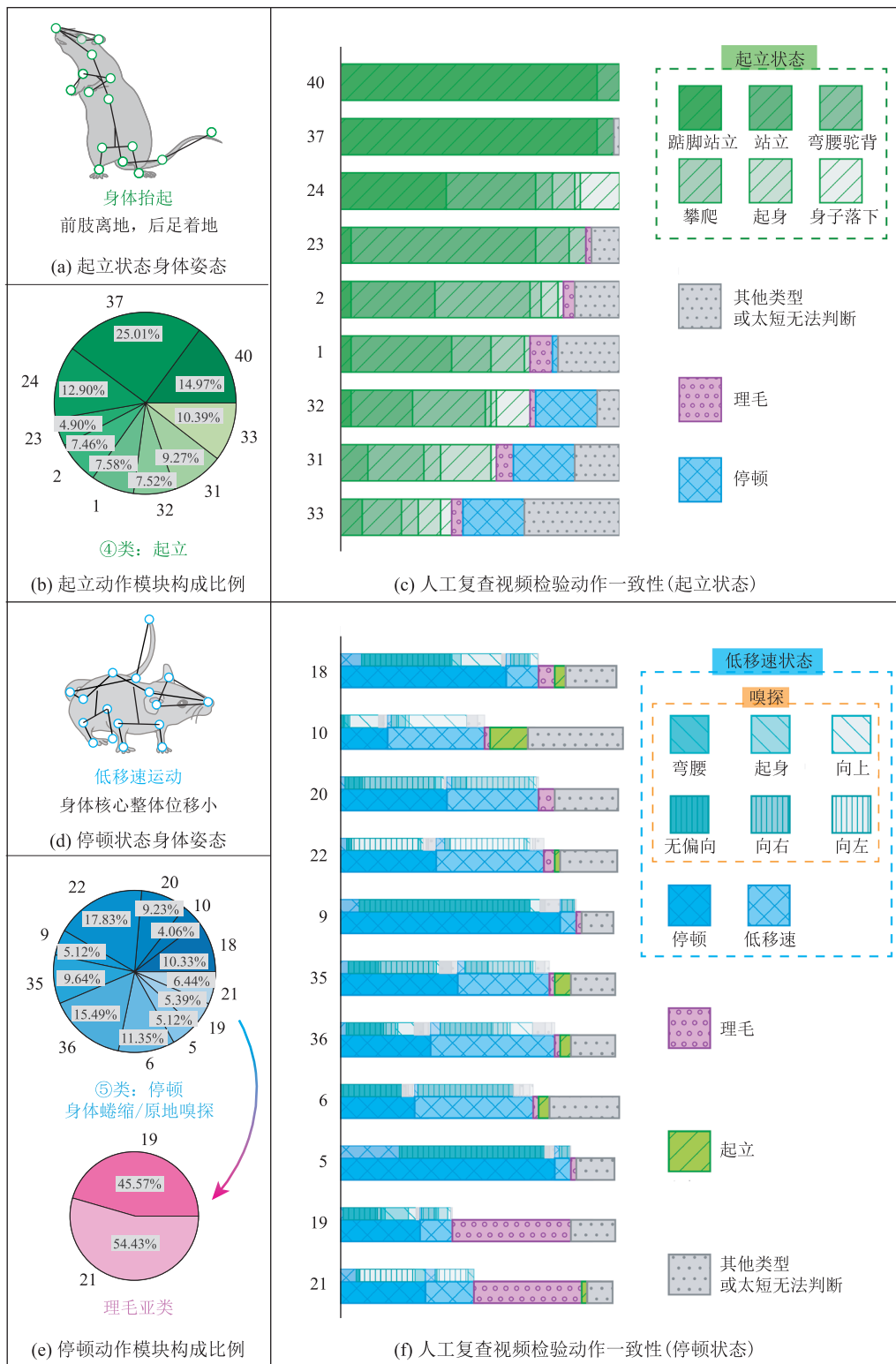


图 4 低移速状态下的动作模块组成、特征及人工查验一致性

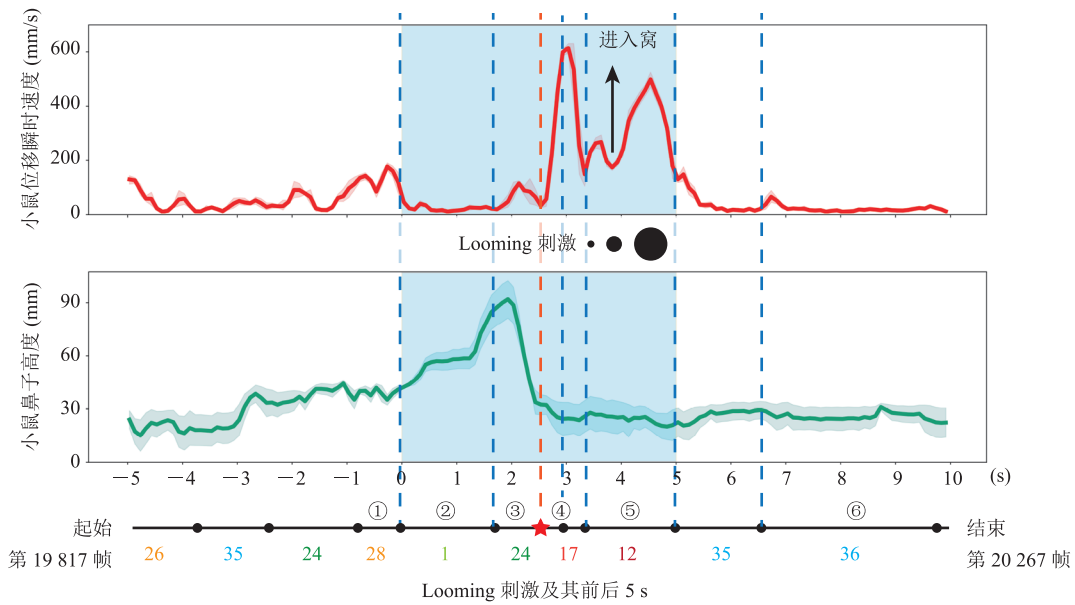
Fig. 4 Components and the features of relative low-speed movement state, and the consistency of each movement module reviewed manually

此外，存在时长小于 0.5 s 占一半以上的动作模块(表 3)，人工无法准确识别和判断。因此，这些动作模块暂不纳入上述归类。但从少数可以辨别的片段来看，这些动作模块是小鼠在快速地左转或右转。

### 3.2 视觉本能恐惧行为范式下的小鼠动作解析

本研究选取一只在视觉刺激下表现出典型逃跑行为的小鼠行为数据，细致分析其受到

Looming 刺激前 5 s、施加刺激的 5 s 以及刺激结束后 5 s 的动作特征(图 5)。施加 Looming 刺激前，小鼠在自由探索，时而向前移动(动作模块 26)，又或是停顿嗅探(动作模块 35)。随后，小鼠起身并向右转，步行进入(动作模块 24 和 28) Looming 触发区。当施加 Looming 刺激后，小鼠立刻做出反应，首先抬头起身朝上方探测(动作模块 1)。从小鼠的瞬时位移速度曲线可以准确



(a) 视觉本能恐惧行为学范式下小鼠的防御动作变化

①步行 (右转)	②起身	③站立
④逃跑	⑤奔跑	⑥停顿

(b) 小鼠典型动作姿态视频截图及三维骨架重建效果图

图 5 视觉威胁刺激下小鼠的动态本能防御行为动作解析

Fig. 5 Dynamic action analysis of visually-evoked innate fear behavior

地反映(图 5(a)小鼠位移瞬时速度), 原本运动的小鼠速度突然降低, 转变为相对静止的状态。同时, 从鼻子高度曲线也能看出(图 5(a)小鼠鼻子高度), 小鼠身体高度在逐渐提升, 最终达到站立姿态(动作模块 24, 系统动作分割存在偏差, 红色星号为人工校对视频修正结果)。随着 Looming 刺激的持续, 小鼠评估危险后, 产生本能恐惧逃跑行为(动作模块 17)。该时刻小鼠的身体高度迅速下降(图 5(a)小鼠鼻子高度), 然后水平瞬时位移速度在极短时间内达到峰值(图 5(a)小鼠鼻子高度), 反映了小鼠从站立姿态落下前肢, 立刻启动逃跑行为。在到达安全区域(窝)的边缘时, 小鼠再次评估周围环境的风险。但此时 Looming 刺激仍未结束, 小鼠察觉到危险未解除, 启动了第二次奔跑(动作模块 12), 直到抵达窝的最深处停顿下来(动作模块 35), 进入较长时间不动状态(动作模块 36)。

## 4 讨论与分析

本研究将黄康等<sup>[6]</sup>开发的三维行为学分析框架进行应用场景升级, 并使用小鼠的视觉本能恐惧行为进行验证。通过采集 6 只小鼠的视觉本能恐惧行为视频并进行分析, 证明了本研究迁移设计的这套三维动物姿态采集系统的鲁棒性强, 可以方便实验人员获取 Looming 刺激下动物的三维姿态信息, 为视觉本能恐惧的精细化神经环路研究提供了高通量、高精度、自动化的行为学分析设备及方法。

动物的行为由若干个动作模块按照一定的逻辑顺序串联组成, 解析这些动作模块的组合排列顺序是理解动物自然行为语义特征的关键。2018 年, Markowitz 等<sup>[14]</sup>通过 MoSeq 系统识别动作模块, 并使用自回归隐马尔可夫模型计算了其状态转移概率, 解析了背侧纹状体在组织动物自然行为序列结构中的作用。本研究所使用的分析系统

能对 Looming 刺激下小鼠的动作进行较为准确的识别和分割(图 4), 仅从系统标定的动作模块标签, 基本可以还原小鼠在视觉威胁刺激前、中、后时间段中行为、动作及姿态的动态变化。这对理解视觉本能防御行为的动作模块组成逻辑, 进而理解不同脑状态下及疾病模型小鼠视觉恐惧行为模式变异的神经机制具有重要意义。

这套行为分析系统能够较为准确地识别和区分小鼠在视觉威胁刺激下的 5 大类特征性动作, 即高移速状态的漫步、步行和奔跑, 以及低移速状态下的起立和停顿。从整体上看, 高移速状态的动作模块分割效果更好, 表现较高的一致性。这主要是因为高移速状态的动作表型单一, 不会出现太多与前进无关的动作。同时, 分析系统对小鼠的身体姿态有灵敏的反应, 如动作模块 28 和 3, 是小鼠向前移动的过程中向右转; 而动作模块 26 和 14 则是前进过程中往左转。这表明本研究使用的分析框架可以将动物运动以外的身体姿势较为准确地识别出来, 通过无监督聚类形成独立的动作模块。而低移速状态的动作模块识别表现欠佳, 对于特征明显的动作模块, 如 40 和 37, 小鼠扶墙垫脚站立, 类内一致性非常好。但处于停顿状态的动作模块人工复检一致性偏低, 主要原因是停顿状态的小鼠大部分处于身体蜷缩的状态, 16 个身体姿态点容易偏移或聚到一起, 对后续的行为分解影响很大。因此, 在原地完全静止不动, 与在原地嗅探这种身体小幅度运动大概率会被归入同一动作模块。类似地, 起身嗅探和向上嗅探在动作姿态上与理毛动作具有一定的相似性, 比起其他低移速动作, 这些归入同一动作模块也具有其合理性。

综上, 虽然这套精细行为分析系统对动作识别和分类准确度仍有待进一步提高, 但与传统的分析方法相比, 其在分析动态的视觉本能恐惧行为时更具优势(表 4)。首先, 对比人工分析(需要全程从视频观察动物)及以 ANY-maze 为代表的商

表4 视觉本能恐惧行为研究使用的行为学分析方法

Table 4 Behavioral analysis methods in visually-evoked innate fear behavior research

文章	分析方法	摄像机个数	分析指标						
			启动逃跑时间	冻结行为时长	轨迹分析	位移速度	回窝时间	其他	姿态分析
Yilmaz 等 <sup>[15]</sup>	MATLAB 脚本	顶部 1 个	✓	✓	✓		✓		无
	人工计数	侧面 1 个							站立
蔚鹏飞等 <sup>[4, 20]</sup>	ANY-maze	顶部 1 个		✓					无
尚从平等 <sup>[16]</sup> 和 尚从平等 <sup>[5]</sup>	Xeye Aba	顶部 1 个			✓	✓		逃跑/冻结二态性	无
Franceschi 等 <sup>[17]</sup>	MATLAB 脚本	顶部 1 个					✓	逃跑/冻结概率	无
Evans 等 <sup>[18]</sup>	Mantis	顶部 1 个	✓				✓	✓	逃跑概率
Salay 等 <sup>[19]</sup>	Biobserve	顶部 1 个	✓	✓					窝内停留时间
		侧面 1 个							尾巴拍打地面
周政等 <sup>[10]</sup>	ANY-maze MATLAB 脚本	顶部 1 个	✓				✓		窝内停留时间
曾渝婷等 <sup>[21]</sup>	人工计数	顶部 1 个	✓				✓		窝内停留时间

业化软件(需要一定的人工操作, 设定参数), 本研究通过优化数据采集及分析处理工作流程, 编写了衔接各环节的脚本程序, 基本实现分析过程全自动化, 能够节省实验人员的时间和精力。并且, 大数据驱动的无监督学习也最大程度上避免了实验人员的主观偏倚。再者, 目前该领域的研究大多基于单相机捕获的动物运动轨迹, 如对位移速度、冻结时间、启动逃跑的潜伏期等衡量动物恐惧程度的指标进行分析<sup>[4-5,10,15-19]</sup>。本研究使用 4 个相机从多角度采集动物在三维空间中的姿态动作动态变化信息, 对动物视觉本能恐惧行为分析精度高于以往。对行为的精细解析更有利于发现在情绪异常、疾病模型等状态下, 小鼠姿态动作、动作模块转换规律等的变异, 进而更好地理解恐惧异常相关的精神疾病发病机理, 同时也为筛选有效的治疗药物提供更精准的数据支撑。

## 5 总结

目前, 前沿神经生物学技术, 如双光子微型显微镜能完成两种类型神经元单细胞精度的钙活

动记录<sup>[22]</sup>, 而光遗传技术已可以实现毫秒级别的特定脑区特定神经元类型调控<sup>[4-5,10,19]</sup>。而行为学分析远滞后于这些高时空精度的神经记录-调控技术。为了更加细致开展行为、情绪及神经精神疾病的神经环路研究, 精细的行为动作解析显得尤为重要。本研究搭建了一套可用于动物视觉本能恐惧行为研究的三维精细行为学分析系统。利用该系统, 可以较为准确地识别并分类出小鼠的 5 大类特征性动作: 漫步、步行、奔跑、起立和停顿。本文选取 Looming 刺激前、中、后共 15 s 的行为片段进行细致分析, 结果表明该系统对小鼠动作的识别与人工观察的结果表现出高度的一致性。使用本研究搭建的这一系统能客观、高效、自动化地获取动物在实验中行为的动态变化过程, 为更加精细地解析行为的神经环路机制提供了高效、便捷的工具。

## 参考文献

- [1] Anderson DJ, Perona P. Toward a science of computational ethology [J]. *Neuron*, 2014, 84(1): 18-31.

- [2] Datta SR, Anderson DJ, Branson K, et al. Computational neuroethology: a call to action [J]. *Neuron*, 2019, 104(1): 11-24.
- [3] Pereira TD, Shaevitz JW, Murthy M. Quantifying behavior to understand the brain [J]. *Nature Neuroscience*, 2020, 23(12): 1537-1549.
- [4] 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.
- [5] 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(1): 1232.
- [6] Huang K, Han YN, Chen K, et al. A hierarchical 3D-motion learning framework for animal spontaneous behavior mapping [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2784.
- [7] Mobbs D, Hagan CC, Dalgleish T, et al. The ecology of human fear: survival optimization and the nervous system [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2015, 9: 55.
- [8] Carr JA. I'll take the low road: the evolutionary underpinnings of visually triggered fear [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2015, 9: 414.
- [9] Amaral DG. The amygdala, social behavior, and danger detection [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, 1000(1): 337-347.
- [10] Zhou Z, Liu XM, Chen SP, et al. A VTA GABAergic neural circuit mediates visually evoked innate defensive responses [J]. *Neuron*, 2019, 103(3): 473-488.
- [11] Xie ZY, Gu HT, Huang MZ, et al. Mechanically evoked defensive attack is controlled by GABAergic neurons in the anterior hypothalamic nucleus [J]. *Nature Neuroscience*, 2022, 25(1): 72-85.
- [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] Yang X, Liu QQ, Zhong JL, et al. A simple threat-detection strategy in mice [J]. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 93.
- [14] Markowitz JE, Gillis WF, Beron CC, et al. The striatum organizes 3D behavior via moment-to-moment action selection [J]. *Cell*, 2018, 174(1): 44-58.
- [15] Yilmaz M, Meister M. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli [J]. *Current Biology*, 2013, 23(20): 2011-2015.
- [16] 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.
- [17] de Franceschi G, Vivattanasarn T, Saleem AB, et al. Vision guides selection of freeze or flight defense strategies in mice [J]. *Current Biology*, 2016, 26(16): 2150-2154.
- [18] Evans DA, Stempel AV, Vale R, et al. A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions [J]. *Nature*, 2018, 558(7711): 590-594.
- [19] Salay LD, Ishiko N, Huberman AD. A midline thalamic circuit determines reactions to visual threat [J]. *Nature*, 2018, 557(7704): 183-189.
- [20] Wei PF, Liu N, Zhang ZJ, et al. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway [J]. *Nature Communication*, 2015, 6: 6756.
- [21] Tseng YT, Zhao BH, Chen SP, et al. The subthalamic corticotropin-releasing hormone neurons mediate adaptive REM-sleep responses to threat [J]. *Neuron*, 2022, 110(7): 1223-1239.
- [22] Zhang C, Zhu H, Ni Z, et al. Dynamics of a disinhibitory prefrontal microcircuit in controlling social competition [J]. *Neuron*, 2022, 110(3): 516-531.