

认知功能相关的动物行为学实验研究进展

郑前敏, 徐平*

(遵义医学院附属医院神经内科, 贵州 遵义 563000)

【摘要】 认知功能的行为学评估在相关疾病模型的生理机制研究、药物干预评估等实验研究中应用广泛。在众多的行为学实验中, 评估学习记忆功能的实验最为常见。本文就近年来动物模型中常用的认知行为学分析方法进行总结, 对评价内容、各个行为学实验的优势及局限性做简要介绍, 为认知功能障碍相关疾病模型的行为学分析提供参考。

【关键词】 认知功能; 行为学评估; 学习与记忆

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0085-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.015

Research of animal behavior assessment about cognitive functions

ZHENG Qian-min, XU Ping*

(Department of neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

【Abstract】 Behavior assessment of cognitive function has been widely used in related research on disease models, especially in physiological mechanism and drug intervention evaluation. Evaluating the function of learning and memory is the most common one in colourful behavioral experiments. The thesis summarizes the methods of analyzing the common cognitive behavior about animal models in recent years, briefly introduces the comment contents, advantages and limitations of each behavior test, and also provides a reference for behavior analysis mainly to the related diseases model of cognitive dysfunction.

【Key words】 Cognitive function; Behavior evaluation; Learning and Memory

认知是机体认识和获取知识的过程, 包括记忆、语言、视空间、计算、执行和理解判断等方面。认知功能障碍是指大脑高级智能加工过程出现异常而导致的学习、记忆障碍, 同时伴有失语、失用等改变的病理过程。随着人类寿命的不断延长以及人口老龄化的到来, 与认知功能障碍相关的神经退行性疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病等)患病率不断升高, 给家庭和社会经济增加了沉重的负担。而其他非神经系统疾病引起的认知功能障碍, 如糖尿病、高血压等也严重影响患者的生活质量。研究认知功能障碍的病理机制对相关疾病的防治有着重要的意义。

动物行为学评估在神经科学的多个领域应用广泛, 特别是在认知功能障碍相关疾病的动物模型评估、生理机制研究等方面发挥着重要的作用^[1-3]。学习记忆力受损是认知功能障碍中较为常见的一种表现, 在众多的行为学实验中, 评估学习记忆功能的实验最为常见。其中工作记忆与参考记忆常用于实验动物的认知功能评估。工作记忆包括注意力、短时记忆和对信息的处理; 参考记忆则被认为是一种长期的、永久的记忆或习惯, 比工作记忆的容量更大、持续时间更长、抗干扰能力更强^[4]。

下面就认知功能相关的行为学实验研究方法、评价内容等方面作简要概述。

【作者简介】 郑前敏, 在读研究生, 研究方向: 认知功能障碍。

【通讯作者】 徐平, 教授, 研究生导师, 研究方向: 认知功能障碍, 中枢神经系统感染, E-mail: xuping527@sohu.com。

1 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM)

Morris 水迷宫由英国心理学家 Morris 于 1981 年报道^[5],是目前行为神经科学中最常用的评估方法之一,广泛用于多种神经系统疾病的模型评估及药物干预研究^[1,2]。海马是与空间学习记忆密切相关的大脑区域,MWM 也被证明是与海马突触可塑性和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体功能密切相关的测试方法^[6]。实验动物被放置在一个圆形水池中,水中加入不透明的、无毒的白色颜料或奶粉,水池中包含一个隐藏的逃生平台。实验内容包括定位航行和空间探索。定位航行是随机的将动物从水迷宫的四个象限中放入,使其在水中游泳并找到逃生平台,用视频跟踪软件记录动物寻找到隐藏平台的时间(逃避潜伏期)及路径。空间探索是定位航行后撤去逃生平台,观察动物穿过原平台位置的次数和时间,考查动物对原平台的记忆^[1,2,7]。

MWM 主要用于评估啮齿类动物的空间学习记忆能力,评估对象大多为成年动物。MWM 的评价效能受实验动物的种类、性别、年龄、营养状态及是否感染等情况的影响^[8];水池大小、温度、隐藏平台的直径也是影响因素^[9]。Singh 等^[10]提出采用游泳路径的分形维数来评价 MWM 的空间学习和记忆,相较于逃避潜伏期的评价更加可靠,逃避潜伏期评价 MWM 存在游泳速度等非认知因素的影响。

MWM 不需要进行额外的训练,对动物数量的要求也不高,没有嗅觉信息的干扰,实验时不需要电击及食物剥夺。但动物在水中游泳存在压力的影响,且 MWM 对工作记忆的测试也不敏感^[9,11]。

2 放射臂迷宫与放射臂水迷宫

2.1 放射臂迷宫(radial arm maze, RAM)

RAM 是由 Olton 和 Samuelson 在 1976 年报道^[12],由一个中央枢纽和周围的放射臂组成,标准臂的数量有 8 个(八臂迷宫)。为避免动物逃跑,迷宫一般在地面上方。在实验前训练动物并限制饮食,在迷宫中央及周围臂中放入食物使其自由摄取及探索周围环境。实验开始后在每个臂末端或随机的 4 个臂末端放入诱饵(食物),记录动物进入每臂的次数、时间及路线等参数。每个臂只进入一次为完美的表现,进入之前访问过的臂则被认为错误^[13,14]。

RAM 可以评估工作记忆和参考记忆。与 MWM 相比,RAM 表现更多的是基于动物的选择进入装有

诱饵或食物的臂,该方法比较容易评估及操作,不需要跟踪软件。但 RAM 的动物必须要进行食物剥夺,以充分刺激它们在迷宫内觅食^[15]。由于使用了食物作为诱饵,动物可以利用嗅觉线索来探索迷宫^[4]。

2.2 放射臂水迷宫(radial arm water maze, RAWM)

为了避免 RAM 中食欲以及嗅觉信息的影响,利用 RAM 和 MWM 相结合建立了 RAWM^[16]。实验在一个圆形水池中进行,池中有一个开放的中心向外辐射的八个臂或游泳路径。将其中一个臂作为目标臂,臂中有一个隐藏在水下的逃生平台。动物被随机放入其余的 7 个游泳臂中,允许最多 120 s 来找到逃生平台,若未能逃脱则将其引导到逃生平台^[7,17]。实验数据用跟踪软件记录,包括找到逃生平台的时间、错误的次数及时间等。

RAWM 可用于测试工作记忆和参考记忆。它结合了复杂的空间环境,避免了嗅觉信息的干扰,无需食物剥夺^[11]。但一些动物在水中没有进行有效的搜索,且水中游泳存在压力的影响^[4]。

3 T 迷宫及多重 T 迷宫

3.1 T 迷宫(T-maze)

T 迷宫是由一个长的主干臂以及两个垂直的短臂组成的“T”型迷宫。首先对动物进行适应性训练 1 d,将其放入主干臂自由探索迷宫。随后 3 d 对动物进行训练,在其中一个短臂中放入诱饵(食物)作为目标臂,动物进入目标臂为正确反应,反之为错误反应,并记录其进入目标臂的时间(潜伏期)。最后第 5 天和第 12 天进行探测实验,将迷宫旋转 180°,其余条件保持不变。动物只允许进入一次诱饵臂或非诱饵臂,进入诱饵臂被认为使用“地方”的策略(有赖于迷宫外信号),进入非诱饵臂被认为使用“反应”策略(不依赖迷宫外信号)^[3]。

T 迷宫自发交替试验(spontaneous alternation test)用于评估空间工作记忆,实验原理是啮齿类动物具有探索陌生刺激环境的倾向。将动物放入 T 迷宫的主干臂,每次进入不同的短臂为一次交替,记为一次正确的选择,进入之前访问的臂为一次错误选择。试验后计算交替次数的百分比,低于 50% 被认为工作记忆受损^[18]。

T 迷宫主要用于评估实验动物的工作记忆。设备要求简单,不需要自动录像系统(需要实验者不

断观察),可以反复实验。但由于 T 迷宫只有一个选择点到达目标臂(默认情况下选择正确臂的概率为 50%),增加了成功的可能性^[4]。

3.2 多重 T 迷宫(multiple-T-maze, MTM)

MTM 是几个 T 迷宫组合成的复合迷宫,比 T 迷宫多了更多的选择,其复杂性也增加。在实验的多次探索中,动物要学会一个复杂稳定的路线到达目标臂,该过程需要空间参考记忆的参与。在实验中对动物进行食物剥夺,并要求其在规定的时间内找到迷宫中隐藏的诱饵(食物)。实验数据用计算机跟踪系统记录,包括正确或错误决定、路径长度、到达目标箱的时间等,在不同时间进行测试可以评估短期与长期记忆^[19]。

MTM 可用于测试工作记忆和参考记忆。其运用了更为复杂的选择系统,每次试验都包含有多个选择点。但对实验动物进行食物剥夺可能是一个潜在的问题^[4]。

4 Barnes 迷宫(Barnes maze)

为了避免水迷宫中游泳压力的影响,Barnes 在 1979 年建立了 Barnes 迷宫^[20],是一个在地面上进行的迷宫实验。实验原理是啮齿类动物具有避光喜暗、逃避噪音的习性。实验由一个圆形平台构成,为防止动物逃脱,用支架将平台支撑到一定高度,在平台周边以一定间隔布满穿透平台的圆洞,其中一个洞与其下方的暗箱连接(目标箱)。实验前将动物放入平台中央使其自由探索 5 min,用强光或噪声刺激动物使其逃到圆洞下方的暗箱中,若没有找到目标箱则将其引导进入箱内停留 1 min。实验过程中用视频跟踪软件进行记录^[3,21],记录动物找到正确洞口的时间(最多 5 min)、进入错误洞口的时间及次数等。

Barnes 迷宫适用于偏好黑暗环境的啮齿类动物,可以评估短期和长期记忆。实验时没有游泳压力的影响,也不需要食物剥夺,尤其适用于小鼠^[4]。但在实验中小鼠有时会缺乏探索迷宫的动力,如发现目标箱后没有进入、或在目标箱周围而没有进入。针对上述问题 Harrison 等^[22]提出采用计算原始潜伏期、原始路径及原始错误次数来解决。

5 星迷宫(star maze)

星迷宫是一种评估实验动物空间导航能力的行为学方法^[23]。由五个臂和一个中心五边形环组

成,臂内充满水以及不透明或惰性的无毒产品。实验动物不能从一个臂直接游泳到下一个臂,必须要在五边形周边游泳到达。实验包括训练阶段和探测阶段。在训练阶段,其中一个臂作为目标臂,有一个可见的逃生平台,迫使动物寻找逃生平台逃跑;随后进行探测实验,将逃生平台淹没,在每个臂的墙壁上装饰不同的设计以提供线索,当小鼠到达平台,允许其在上面对待 30 s。若在规定游泳时间内(60 s)没有找到逃生平台,将其放到平台上保持 30 s。实验数据通过视频数据采集系统收集,最后根据动物到达逃生平台的时间、路径及游泳速度等进行综合分析^[23,24]。

星迷宫主要用于小鼠空间导航能力的研究,实验中小鼠要通过学习来选择迷宫内的路线,其主要依赖于时间顺序记忆能力^[25]。该实验不需要食物的限制,也没有嗅觉信息的干扰,但其在评估空间学习记忆及大鼠学习记忆等方面还有待深入的研究^[26]。

6 新物体识别(novel object recognition, NOR)实验

利用啮齿类动物喜欢探索陌生事物的天性,Ennaceur 和 Delacour 于 1988 年报道了新物体与新位置识别实验^[27],用于检测啮齿类动物的空间记忆能力。将动物放置在一个装置里使其探索两个相同的物体,在规定的時間间隔之后再返回到装置中,使其探索一个熟悉的物体和一个新的物体,记录探索每一个物体的时间^[28,29]。

目前对 NOR 实验对象的探索评分有视觉观察和计算机 2D 视频分析。但前者依赖于实验者的观察能力,后者容易受实验以外对象行为的影响。为了克服上述问题,Junpei 等人建立了一种 3D 计算机视频分析系统运用于 NOR 实验的探索评分^[30],该系统为 NOR 实验提供了一个可重复性和比较准确的评估方法,并首次建立了实验对象探索线路的 3D 轨迹。

NOR 实验主要用于评估工作记忆、注意力以及焦虑等。其设备简单,无需外部奖励或惩罚作为动力,试验时间短,也不需要食物剥夺。但 NOR 实验中每个动物的探索水平有时不一致^[31,32]。

7 条件性恐惧(fear conditioning, FC)实验

FC 是一种基于经典的巴甫洛夫条件反射而建立起来的关联学习方法,通过对实验动物的训练将

条件刺激与非条件刺激联系起来^[11]。其中情景恐惧实验用于评估啮齿类动物的恐惧学习记忆。冻结行为是动物在恐惧条件下常见的反应,是一种除了呼吸完全不动的状态,该行为也是衡量恐惧相关的学习记忆的指标。在 FC 实验中,首先将动物放入训练装置中使其适应环境;随后进行 3 次恐惧环境训练,将动物暴露于一个和听觉线索(条件刺激)配对的足部电击(非条件刺激)环境,使实验动物在听觉线索与电击之间、电击与环境之间学会关联记忆;训练完成 48 小时后将动物放入原训练室,动物产生情景恐惧记忆,通过表现出冻结行为来应对恐惧环境。记录一定时间内动物出现冻结行为的次数,实验数据用相关公式计算为冻结百分比^[33]。

FC 实验的设备要求简单,动物训练时间少且不需要禁食。但电击刺激可能会对实验动物产生一定伤害。

8 主动回避任务与被动回避任务

8.1 主动位置回避任务(active place avoidance task)

主动位置回避任务是由位置回避任务改进而成^[34],用于评估啮齿类动物的空间学习记忆。实验在一个干燥光滑的可旋转圆形舞台上进行,周围由有机玻璃包围避免动物逃跑。圆形舞台上有一个 60°宽的避免区域,在舞台旋转时该区域位置保持不变,动物进入其中会有一个轻度的足部电击惩罚。舞台开始缓慢旋转后,动物为逃避电击而回避避免区域。实验数据由视频跟踪系统记录,包括进入避免区域的次数、回避所需的最大时间、第一次进入避免区域的时间及路径长度等^[35]。

主动位置回避任务可用于评估动物的短期变化,实验数据可以快速采集,动物不需要食物剥夺。但足部电击刺激可能会对动物身体产生伤害。

类似的主动回避任务还有穿梭箱回避、爬杆法、跑道回避等。

8.2 抑制性回避任务(inhibitory avoidance task)

抑制性回避任务属于被动回避任务,利用啮齿类动物偏爱黑暗环境的天性而建立,常用于啮齿类动物学习和记忆的研究。在进行实验训练时将动物放入一个回避装置,该装置由一个暗隔间和一个亮隔间组成,中间有门连接。打开两个隔室之间的门,当动物由亮隔间进入暗隔间时,遭遇一次足部电击。在训练后间隔 24 或 48 小时测量动物从亮隔

间到之前受到电击的暗隔间的时间(潜伏期),潜伏期越长表示记忆越好^[36]。

抑制性回避任务只需要对动物进行短期训练,避免了记忆获取与巩固的重叠。但厌恶刺激会对动物产生一定伤害。

类似的被动回避任务还有跳台实验、两室实验等。

9 总结

随着人口老龄化进程的到来,年龄相关的认知功能障碍已经成为神经科学研究的热点。为了更好的研究认知功能相关的疾病机理,选择合适的行为学实验研究方法是有必要的。动物模型的认知功能评估可以为相关疾病的研究提供重要的依据。但也有其局限性,人类的认知功能是一个复杂的脑部高级神经活动过程,动物的行为学测试内容不完全类似于人类的认知,还有许多认知功能是人类独有的或不能在实验模型中充分表现出来的(例如语言或数学)。在实验中,仅通过动物的表现无法精确评估学习和记忆的相关信息,因为实验对象可能受其他与认知能力不相关的信息的干扰,比如感觉运动功能、焦虑及活动的应激反应等。而每种行为学实验的侧重点与使用条件不一样,具体应用时要根据不同的需求进行选择。必要时结合多种行为学方法进行综合分析,并与组织病理学、影像学及神经电生理技术等结合,为认知功能障碍相关疾病的研究提供科学可靠的依据。

参考文献:

- [1] Antunes MS, Goes ATR, Boeira SP, *et al.* Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice[J]. *Nutrition*, 2014, 30(11-12): 1415-1422.
- [2] Cantarella G, Di Benedetto G, Puzzo D, *et al.* Neutralization of TNFSF10 ameliorates functional outcome in a murine model of Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2015, 138(1): 203-216.
- [3] Sharma S, Haselton J, Rakoczy S, *et al.* Spatial memory is enhanced in long-living Ames dwarf mice and maintained following kainic acid induced neurodegeneration[J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131(6): 422-435.
- [4] Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice[J]. *Life Sci*, 2010, 87(17-18): 521-536.
- [5] Morris. RGM. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues[J]. *Learning and Motivation*, 1981, 12(2): 239-260.
- [6] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J].

- Nat Protoc, 2006, 1(2): 848–858.
- [7] Talboom JS, West SG, Engler-Chiurazzi EB, *et al.* Learning to remember: cognitive training-induced attenuation of age-related memory decline depends on sex and cognitive demand, and can transfer to untrained cognitive domains[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(12): 2791–2802.
 - [8] D’Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 36(1): 60–90.
 - [9] Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents[J]. *ILAR J*, 2014, 55(2): 310–332.
 - [10] Singh S, Kaur H, Sandhir R. Fractal dimensions: A new paradigm to assess spatial memory and learning using Morris water maze[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 299: 141–146.
 - [11] Puzzo D, Lee L, Palmeri A, *et al.* Behavioral assays with mouse models of Alzheimer’s disease: practical considerations and guidelines[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 450–467.
 - [12] DS. O, RJ. S. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats[J]. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1976, 2(2): 97–116.
 - [13] Aher YD, Subramaniam S, Shanmugasundaram B, *et al.* A Novel Heterocyclic Compound CE – 104 Enhances Spatial Working Memory in the Radial Arm Maze in Rats and Modulates the Dopaminergic System[J]. *Front Behav Neurosci*, 2016, 10: 20.
 - [14] Mahmoud RR, Sase S, Aher YD, *et al.* Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139739.
 - [15] Murphy GG. Spatial Learning and Memory-What’s TLE Got To Do With It? [J]. *Epilepsy Curr*, 2013, 13(1): 26–29.
 - [16] Buresova O, Bures J, Oitzl MS, *et al.* Radial maze in the water tank: an aversively motivated spatial working memory task[J]. *Physiol Behav*, 1985, 34(6): 1003–1005.
 - [17] Liu WC, Yang SN, Wu CW, *et al.* Hyperbaric Oxygen Therapy Alleviates Carbon Monoxide Poisoning-Induced Delayed Memory Impairment by Preserving Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Hippocampal Neurogenesis [J]. *Crit Care Med*, 2016, 44(1): 25–39.
 - [18] Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 266: 94–103.
 - [19] Falsafi SK, Ghafari M, Miklosi AG, *et al.* Mouse hippocampal GABAB1 but not GABAB2 subunit-containing receptor complex levels are paralleling retrieval in the multiple-T-maze[J]. *Front Behav Neurosci*, 2015, 9: 276.
 - [20] Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat[J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1979, 93(1): 74–104.
 - [21] Li L, Csaszar E, Szodorai E, *et al.* The differential hippocampal phosphoproteome of *Apodemus sylvaticus* paralleling spatial memory retrieval in the Barnes maze [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 264: 126–134.
 - [22] Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, *et al.* Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze[J]. *Learn Mem*, 2006, 13(6): 809–819.
 - [23] Rondi-Reig L, Petit GH, Tobin C, *et al.* Impaired sequential egocentric and allocentric memories in forebrain-specific-NMDA receptor knock-out mice during a new task dissociating strategies of navigation[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(15): 4071–4081.
 - [24] Fouquet C, Babayan BM, Watilliaux A, *et al.* Complementary Roles of the Hippocampus and the Dorsomedial Striatum during Spatial and Sequence-Based Navigation Behavior[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67232.
 - [25] Fouquet C, Tobin C, Rondi-Reig L. A new approach for modeling episodic memory from rodents to humans: the temporal order memory [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 215(2): 172–179.
 - [26] Vorhees CV, Williams MT. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2014, 45: 75–90.
 - [27] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data[J]. *Behav Brain Res*, 1988, 31(1): 47–59.
 - [28] Kim S, Kim T, Lee HR, *et al.* Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice[J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 16.
 - [29] Rogel-Salazar G, Luna-Munguia H, Stevens KE, *et al.* Transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes does not modify the short- and long-term memory formation in rats evaluated in the novel object recognition test [J]. *Epilepsy Behav*, 2013, 27(1): 154–158.
 - [30] Matsumoto J, Uehara T, Urakawa S, *et al.* 3D video analysis of the novel object recognition test in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 272: 16–24.
 - [31] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [J]. *Cogn Process*, 2012, 13(2): 93–110.
 - [32] Rajagopal L, Massey BW, Huang M, *et al.* The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(31): 5104–5114.
 - [33] Hylin MJ, Orsi SA, Moore AN, *et al.* Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning[J]. *Learn Mem*, 2013, 20(5): 267–273.
 - [34] Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, *et al.* Dissociation of exteroceptive and idiothetic orientation cues: effect on hippocampal place cells and place navigation[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1997, 352(1360): 1515–1524.
 - [35] Bahnik S, Stuchlik A. Temporal and spatial strategies in an active place avoidance task on Carousel: a study of effects of stability of arena rotation speed in rats [J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1257.
 - [36] Atucha E, Roozendaal B. The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory[J]. *Front Behav Neurosci*, 2015, 9: 60.