

非人灵长类评价学习记忆功能的影响因素探讨

李 舸¹, 刘晓霖¹, 陈 锐¹, 刘书华¹, 李韵峰¹, 关雅伦¹, 李雪娇¹, 裴 中²,
黄 韧¹, 张 钰^{1*}

(1. 广东省实验动物重点实验室, 广东省实验动物监测所, 广州 510663; 2. 中山大学附属第一医院神经内科, 广州 510080)

【摘要】 目的 基于威斯康辛通用测试仪的延迟应答测试是评价非人灵长类学习记忆能力的常用方法, 该实验在进行过程中受到很多因素影响, 如何设定规范的训练和评价参数, 对正确评价猴的学习记忆能力具有重要的参考意义和价值。**方法** 本研究选取8~9岁雄性食蟹猴作为实验研究对象, 利用改良的威斯康辛通用测试仪检测, 通过食蟹猴获取食物的正确率来评价训练次数, 评价频率, 间隔评价时间, 延迟时间和陷阱食盒数量等实验因素对结果的影响。**结果** 当减少训练阶段的训练次数(小于10次)时, 食蟹猴获取食物的正确率不稳定且呈现出显著的下降趋势; 在获得足够训练的前提下, 评价频率对食蟹猴获取食物的正确率影响较小; 常规训练后3个月进行评价, 食蟹猴仍然能够获得65%的获取食物正确率; 增加延迟时间后, 会导致部分食蟹猴获取食物的正确率显著降低; 此外, 当增加到3个以上陷阱食盒时, 导致食蟹猴获取食物正确率普遍低于65%以下。**结论** 合理的设置训练和评价阶段的实验参数对非人灵长类学习记忆功能的评价具有重要的影响和意义。

【关键词】 非人灵长类; 学习记忆; 训练; 评价

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 09-0024-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671-7856. 2017. 09. 005

Investigation of influencing factors on the evaluation of learning and memory in nonhuman primates

LI Ge¹, LIU Xiao-lin¹, CHEN Rui¹, LIU Shu-hua¹, LI Yun-feng¹, GUAN Ya-lun¹,
LI Xue-jiao¹, PEI Zhong², HUANG Ren¹, ZHANG Yu^{1*}

(1. Key Laboratory of Laboratory Animals in Guangdong Province, Institute of Laboratory Animal Monitoring in Guangdong Province, Guangzhou 510663, China; 2. Department of Neurology, The First Hospital Affiliated to SunYat-sen University, Guangzhou 510080)

【Abstract】 Objective The delayed-response task based on the Wisconsin General Testing Apparatus (WGTA) is commonly used to evaluate the ability of learning and memory in nonhuman primates. Because the task may be influenced by a number of factors, how to set and standardize the parameters during the training and evaluation stage is of great significance and value for obtaining appropriate results of learning and memory ability. **Methods** In this study, 8~9 years old male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) were tested with the modified WGTA. We evaluated the influence of experimental factors such as the times of training, frequency of evaluation, interval time of evaluation, delayed time and number of stimulus trays on the results of learning and memory ability in the macaques by investigating the correct rates of food acquiring. **Results** The correct rate of food acquiring of the cynomolgus macaques was unstable and significantly

[基金项目] 广东省科技计划项目(编号:2014B040404053, 2015A020212027)。

[作者简介] 李舸(1983-), 男, 博士, 研究方向: 神经退行性疾病动物模型及机制研究。E-mail: gonanlee@gdlami.com

[通讯作者] 张钰(1970-), 女, 研究员, 研究方向: 神经退行性疾病动物模型及机制研究。E-mail: zhy@gdlami.com

decreased when the times of training was less than 10 during the training stage. The frequency of evaluation had less effect on the correct rate on the basis of enough training. The correct rate of food acquiring was still above 65% with a 3-month interval after training. However, the increase of delayed time led to significant decrease of the correct rate in some macaques. In addition, more than 3 stimulus trays also resulted in a low correct rate in general less than 65%. **Conclusions** Reasonable designing of the experimental parameters during the training and evaluation stage is important for determining the learning and memory ability in nonhuman primates.

【Key words】 Nonhuman primates; Learning and memory; Training; Evaluation

非人灵长类动物学习记忆测试是评价动物学习和记忆能力的重要方法之一,被广泛应用于神经生物学、神经疾病研究、神经相关治疗药物评价等。其中,基于上世纪 30 年代 Harlow 发明的威斯康辛通用测试仪 (Wisconsin general testing apparatus, WGTA) 的延迟应答测试被认为是评价非人灵长类学习记忆能力的常用方法,一直沿用至今^[1]。在实验过程中,在测试仪器内设立多个陷阱食盒,并在其中一个陷阱食盒中放置奖励性食物,在一定时间内阻隔动物观察陷阱食盒后,考察动物获取奖励食物的正确率,进而评价动物的学习记忆能力。

该测试包括训练和测试两个阶段,其中,训练阶段主要是通过反复引导动物学习熟悉测试过程,降低非人灵长类动物个体的学习记忆能力差异对实验结果的影响,一般训练阶段设立 2 个陷阱食盒,通过设定一定延迟时间阻隔动物观察陷阱食盒,然后让动物自由选择,如果选择了具有食物奖励的应答位置,则被认为是正确应答,计算动物在该延迟时间下的正确应答率,从而评价其学习能力^[2]。而测试阶段则通过设定合理的延迟时间或者增加陷阱食盒数量,实现对动物学习记忆能力的综合评价^[3]。因此,本文将主要针对训练和评价阶段测试参数设置开展研究,规范非人灵长类实验动物学习记忆评价实验操作。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级 8~9 岁雄性食蟹猴 14 只,购买自广东春盛生物科技发展有限公司 [SCXK (粤) 2014-0027]。食蟹猴饲养于广东省实验动物监测所普通级动物实验室 [12 h/12 h 昼夜周期,湿度 40%~70%,温度 (21±2)℃] [SYXK (粤) 2016-0122],动物每天饲喂 2 次,其中 1 次饲喂水果。本研究所涉及的动物实验获得广东省实验动物监测所 (AAALAC 认证机构) 实验动物使用与管理委员会 (IACUC) 批准 (IACUC2016006),并符合中华人民

共和国《实验动物管理条例》。

1.2 仪器

猴学习记忆学习评价设备为在参考 WGTA 行为学测试笼具基础改装而成 (图 1)。猴笼前放置多个陷阱食盒,食盒深度 2 cm,在食盒与猴笼之间有一可以自由升降的不透明隔板,食盒与实验员之间有一单向可视观察窗。实验开始时,实验员打开食物传递窗,根据每只食蟹猴对食物的喜好,在其面前将食物随机放在其中一个食盒内,盖上盒盖并迅速放下隔板,开始计时,在设定的延迟时间到达之后,升起隔板,让食蟹猴可以看见被盖上的食盒,食蟹猴可以选择一个食盒打开并从中获得食物,实验员记录该次测试中食蟹猴是否正确选择含有食物的食盒。



注:① 猴笼;② 食盒;③ 隔板;④ 观察窗;⑤ 食物传递窗。

图 1 猴学习记忆评价装置

Note. ① Monkey cage; ② Stimulus trays; ③ Partition; ④ Window for observation; ⑤ Window for food delivery.

Fig. 1 The testing apparatus for evaluation of learning and memory ability of nonhuman primates

1.3 实验方法

1.3.1 食蟹猴学习记忆能力训练和评价方法

每只食蟹猴必须由同一个实验员负责进行训练,以减少动物的应激反应。每只食蟹猴每天完成一个训练周期,每个训练周期由 5 个不同的延迟时

间(A~E)组成,包括, $A=N\times 0=0\text{ s}$, $B=N\times 1=1\text{ N s}$, $C=N\times 2=2\text{ N s}$, $D=N\times 3=3\text{ N s}$, $E=N\times 4=4\text{ N s}$, N 为设定的基础值,以基础值设定为1为例,表示隔板在动物与食盒之间的延迟时间为0 s、1 s、2 s、3 s、4 s。每个延迟时间均进行5次训练实验,因此,每个训练周期共计进行25次训练。当天一个训练周期结束后,统计该食蟹猴在该训练周期25次训练中选择正确食盒的平均正确率,训练阶段选择食盒的平均正确率=训练阶段每天选择食盒的平均正确率之和/评价持续天数^[4,5]。

训练阶段完成后,根据实验设计要求,进入学习记忆评价阶段。评价阶段的基础值 N 根据实验要求选择,一般要求 $\geq$ 训练阶段的最高 N 值。与训练阶段相似,评价阶段每只食蟹猴每天完成一个训练周期,持续评价数天,或者增加陷阱盒用同样方法评价。

1.3.2 训练次数对食蟹猴学习记忆能力评价的影响

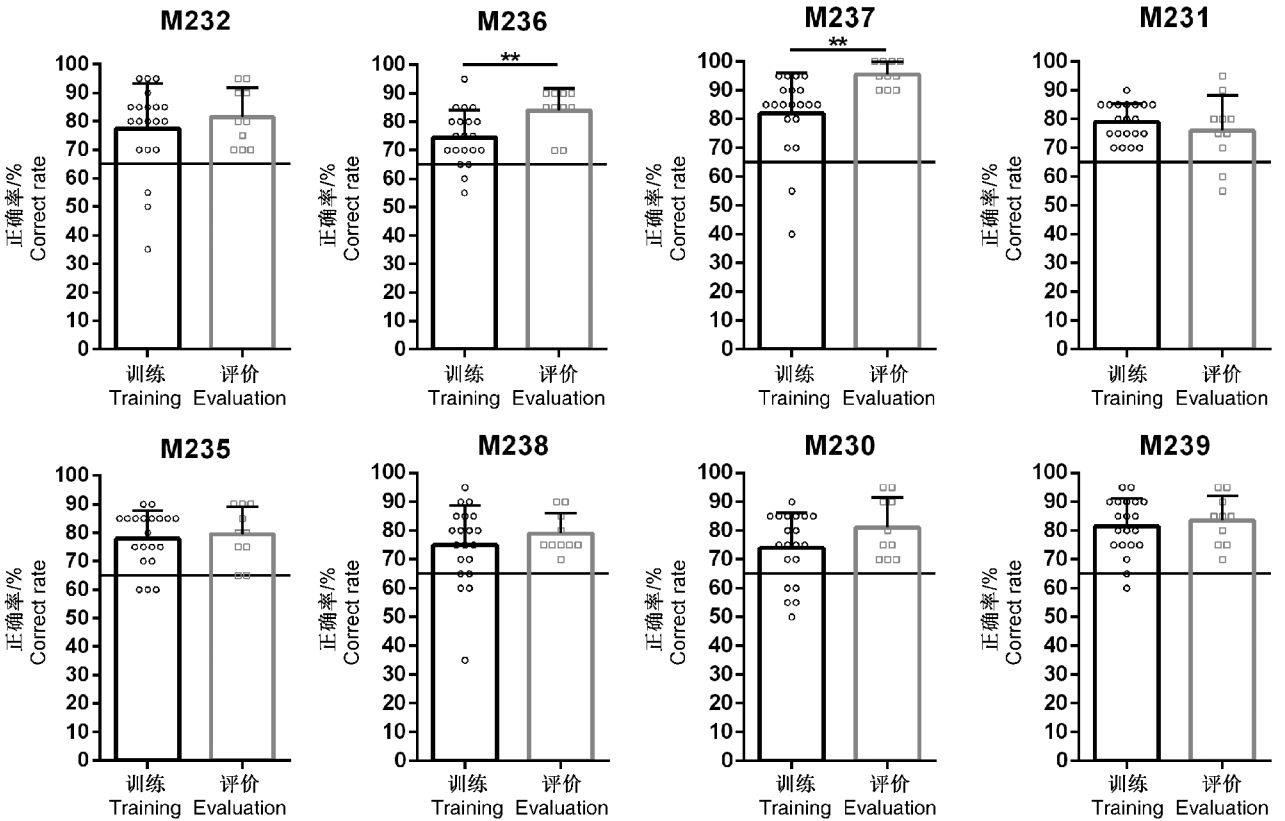
训练阶段 14 只雄性食蟹猴被分为 2 组,其中 A

组 8 只动物(动物编号:M232,M236,M237,M231,M235,M238,M230,M239)每天均完成一个训练周期,连续训练 20 d,仪器内设置 2 个陷阱食盒,从基础值 $N=1$ (延迟时间为0 s、1 s、2 s、3 s、4 s)开始训练,当正确率达到 65% 以上,以基础值 N 为 2 进行训练,以此类推,直至基础值 N 设定为 4,并维持该基础值直至 20 d 训练结束。训练结束后 2 个月,以基础值 $N=4$ 进行评价,连续评价 10 d,每天完成一个评价周期,对比训练与评价阶段的正确率差异。

B 组 6 只动物(动物编号:M267,M269,M268,M270,M271,M233)每天均完成一个训练周期,连续少于或等于 10 d,仪器内设置 2 个陷阱食盒,只以基础值 $N=1$ (延迟时间为0 s、1 s、2 s、3 s、4 s)进行训练。训练结束后 2 个月,以基础值 $N=4$ 进行评价,连续评价 10 d,每天完成一个评价周期,对比评价训练与评价阶段的正确率差异。

1.3.3 评价频率对食蟹猴学习记忆能力评价的影响

A 组 2 只食蟹猴(M230,M239)分别在间隔 1



注:与训练阶段比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 A 组食蟹猴训练阶段与评价阶段的正确率比较($\bar{x}\pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the training stage, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Fig. 2 Comparison of the correct rates between the training and evaluation stages of cynomolgus macaques in Group A

周和间隔 2 周后,以基础值 $N = 4$ 开展评价,探讨不同时间间隔对食蟹猴学习记忆能力的影响。

1.3.4 长时间间隔后对食蟹猴学习记忆能力评价的影响

A 组 2 只食蟹猴 (M230, M239) 在训练结束后间隔 3 个月,以基础值 $N = 4$ 开展评价,探讨长时间遗忘对评价记忆能力的影响。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。实验数据采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

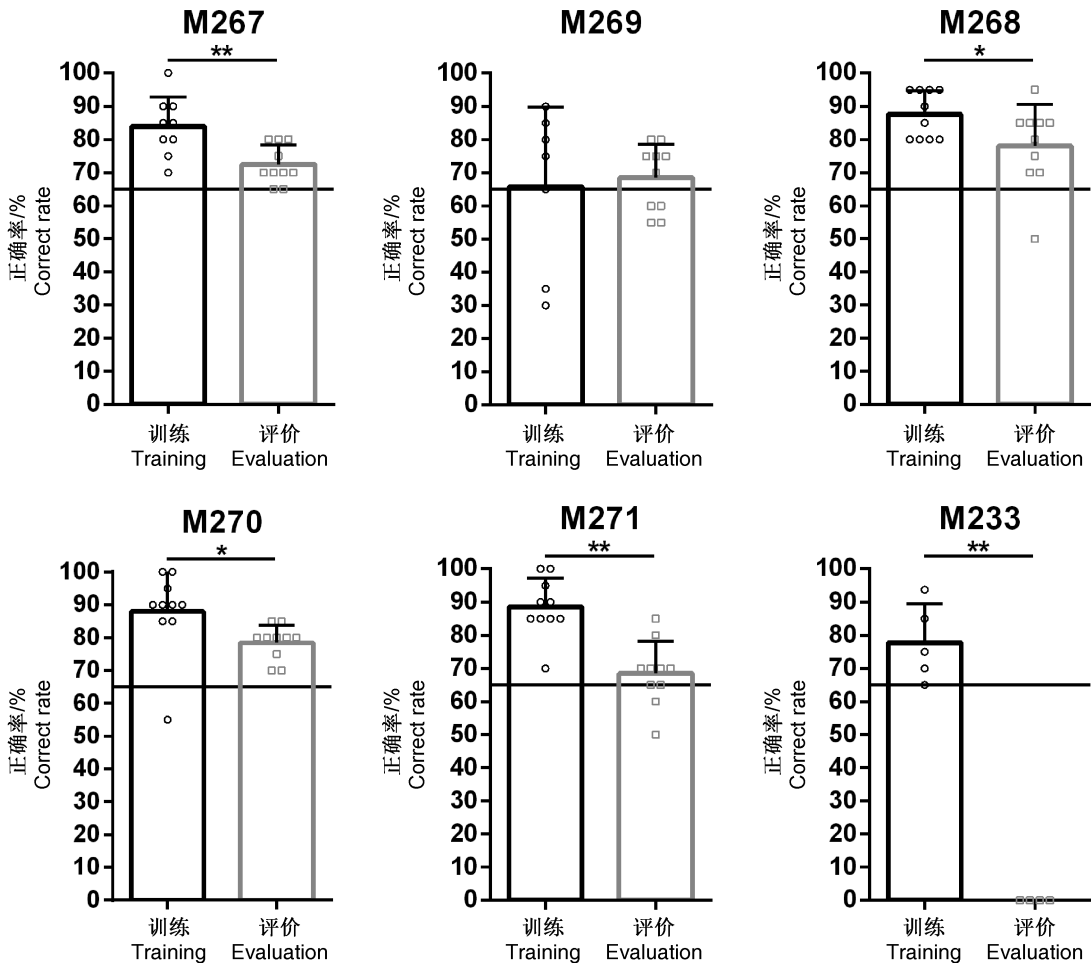
2 结果

2.1 训练次数对食蟹猴学习记忆评价的影响

A 组 8 只食蟹猴在训练 20 次后均能在基础值

N 设定为 4 时(延迟时间 0 s, 4 s, 8 s, 12 s, 16 s),选择具有食物奖励的陷阱食盒的正确率达到 65% 以上(图 2)。间隔 2 个月后,以基础值 N 为 4 开展评价发现,除编号为 M231 的食蟹猴外,其余食蟹猴在评价阶段的平均正确率与训练阶段相比均出现上升趋势,其中编号为 M236 和 M237 的食蟹猴正确率显著升高($P < 0.01$)(图 2)。

B 组 6 只食蟹猴训练次数小于 10 次,并且训练阶段基础值 N 仅采用 1(延迟时间 0 s, 1 s, 2 s, 3 s, 4 s),间隔 2 个月后,以基础值 N 为 4 开展评价发现,除编号为 M269 的食蟹猴平均正确率基本与训练阶段保持一致外,其它 5 只食蟹猴的平均正确率都出现显著降低($P < 0.05$)(图 3),此外,编号为 M233 的食蟹猴已无法完成记忆评价试验。



注:与训练阶段比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

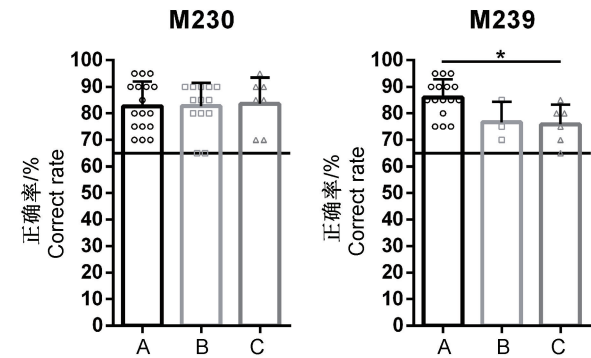
图 3 B 组食蟹猴训练阶段与评价阶段的正确率比较 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. Compared with the training stage, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 Comparison of the correct rates between the training and evaluation stages of cynomolgus macaques in Group B

2.2 评价频率对食蟹猴学习记忆能力试验的影响

编号为 M230 和 M239 的食蟹猴分别采用每天评价一次,每周评价一次以及每两周评价一次的评价频率开展学习记忆能力评价,结果表明,分别选用 3 种评价频率开展评价,2 只食蟹猴的正确率均能保持在 65% 以上,但编号为 M239 的食蟹猴延长评价频率开展评价导致正确率出现显著降低 ($P < 0.05$) (图 4)。



注:A:每天 1 次;B 每周 1 次;C:每 2 周 1 次。与每天评价一次比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 评价频率对食蟹猴学习记忆能力正确率的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. A: Once a day; B: Once a week; C: Once two weeks. Compared with the evaluation frequency of once a day, * $P < 0.05$.

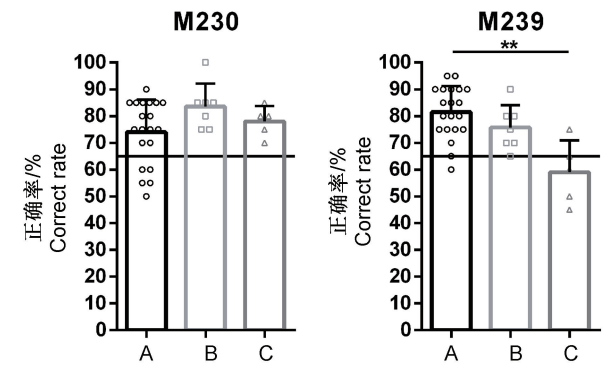
Fig. 4 Effect of evaluation frequency on the correct rate of learning and memory of cynomolgus macaques

2.3 食蟹猴训练后对学习记忆遗忘的影响

编号为 M230 和 M239 的食蟹猴,间隔 3 个月通过增加基础值 N 或增加陷阱盒对学习记忆能力进行评价。结果表明,间隔 3 个月,当以基础值 N 为 4 (延迟时间为 0 s, 4 s, 8 s, 12 s, 16 s) 进行记忆评价时,2 只食蟹猴获取奖励性食物的平均正确率仍然维持在 65% 以上,而以基础值 N 为 10 (延迟时间为 0 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s) 进行评价时,编号为 M230 的食蟹猴还能维持较好的平均正确率,但编号为 M239 的食蟹猴平均正确率显著下降 ($P < 0.01$) (图 5)。而在增加陷阱食盒的测试中,无论是增加到 3 个还是 4 个,2 只食蟹猴的平均正确率都达不到 65% (图 6)。

3 讨论

当动物在做出某一正确行为后并获得奖励,大脑向负责决策的区域发送“奖赏”信号,从而促进动物的认知能力提升,形成良性循环,这被称作“奖赏

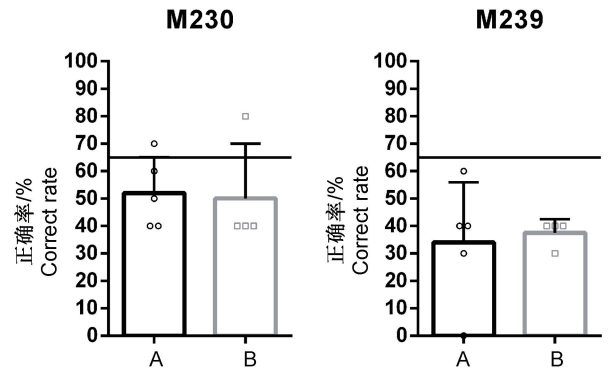


注:A:训练阶段;B:间隔 3 个月 N=4;C:间隔 3 个月 N=10。与训练阶段比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 增加基础值 N 对食蟹猴学习记忆能力评价的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note. A: The training stage; B: 3-month interval, N=4; C: 3-month interval, N=10. Compared with the training stage, ** $P < 0.01$.

Fig. 5 Effect of increase of N value on evaluation of learning and memory ability of the cynomolgus macaques



注:A:3 个陷阱食盒;B:4 个陷阱食盒。

图 6 增加陷阱食盒对食蟹猴学习记忆能力评价的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

Note: A: 3 trays; B: 4 trays.

Fig. 6 Effect of increase of quantity of stimulus trays on the evaluation of learning and memory ability of cynomolgus macaques

效应”^[6]。大脑的这一特点也为在动物上开展学习记忆能力评价成为可能^[7]。由于非人灵长类实验动物个体在学习记忆能力上差异较大,因此,相比于使用在啮齿类上进行的各类标准化的学习记忆功能评价实验,利用非人灵长类开展学习记忆评价过程更为复杂且难度较大。

威斯康辛通用测试仪是进行非人灵长类动物学习记忆测试的金标准,训练是有效降低不同动物个体差异影响评价结果的重要手段,该阶段主要是使动物熟悉和适应测试环境和设备,使不同的动物

通过训练后能够达到一定的标准,降低动物个体差异对评价测试的影响,考察动物的学习能力^[8]。因此,合理的训练不仅能够减少动物个体差异对实验的影响,同时,能够有效地控制实验周期降低实验成本。因此,在本研究中,我们首先考察了训练次数对动物学习记忆评价的影响,我们发现当训练阶段的训练天数超过 10 d 时,即能够使动物在间隔 2 个月后进行的评价中达到较好正确率,当训练阶段训练天数低于 10 d 时,即使所有动物在训练阶段能够达到预设的 65% 以上的正确率,但动物在评价阶段的正确率均出现不同程度的下降,甚至有的动物根本无法完成评价,这表明较少的训练天数对最终的评价结果产生较大的影响,10 d 训练可能是保证动物能够完成学习记忆能力评价的最低要求。

评价阶段主要是对动物记忆能力的考察,我们发现,评价频率对整个实验结果的影响较小,但是选择合理基础值 N 设置延迟时间是获得客观稳定的评价结果的关键因素,理论上在评价阶段 N 值可以随意设置,而在近年来的一些研究中,我们也发现不同的研究对于 N 值的选取存在较大差异^[9-11]。在研究中我们发现,不同的食蟹猴在训练阶段达到规定的正确率后,间隔 3 个月进入评价阶段,在选择与训练阶段相同基础值 N(延迟时间相同)下,食蟹猴选择食盒的正确率并未受到影响,但当评价阶段基础值 N 增加(延迟时间增加)到 10 时,不同的食蟹猴选择食盒的正确率呈现出较大差异,因此,在实际实验过程中,根据实验目的选择合理的基础值 N 对于评价结果至关重要。

在非人灵长类动物学习记忆能力评价中,目前大多数测试仍然是通过改变评价阶段的延迟时间获得评价结果,在本研究中,我们进一步探讨了训练与评价之间的间隔时间以及食盒数量设置对影响非人灵长类动物学习记忆评价的影响。在保证足够的训练,并且在评价阶段设置与训练阶段相同的延迟时间的前提下,我们发现,将训练与评价之间的间隔时间增加到 3 个月时,仍然能够将动物选择食盒的正确率维持在 65% 以上,但是,当我们在评价阶段将陷阱食盒数量增加后,却明显地降低了

所有动物选择食盒的正确率,这种普遍性地降低可能主要是由于动物本身的学习记忆能力相关,并非动物个体差异造成,因此,增加陷阱食盒的方式可能并不适用于动物的学习记忆功能评价。

参考文献:

- [1] Harlow HF, Bromer JA. A test-apparatus for monkeys [J]. *Psychol Rec*, 1938, 2(19): 434-436.
- [2] Golub MS, Hogrefe CE, Germann SL. Iron deprivation during fetal development changes the behavior of juvenile rhesus monkeys [J]. *J Nutr*, 2007, 137(4): 979-984.
- [3] Burbacher TM, Grant KS. Methods for studying nonhuman primates in neurobehavioral toxicology and teratology [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22(4): 475-486.
- [4] Roberts BM, Holden DE, Shaffer CL, et al. Prevention of ketamine-induced working memory impairments by AMPA potentiators in a nonhuman primate model of cognitive dysfunction [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 212(1): 41-48.
- [5] Vezoli J, Fifel K, Leviel V, et al. Early presymptomatic and long-term changes of rest activity cycles and cognitive behavior in a MPTP-monkey model of Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23952.
- [6] Rolls ET. The orbitofrontal cortex and reward [J]. *Cereb Cortex*, 2000, 10(3): 284-294.
- [7] Rolls ET. Memory systems in the brain [J]. *Annu Rev Psychol*, 2000, 51: 599-630.
- [8] Cappon GD, Bowman CJ, Hurtt ME, et al. Object discrimination reversal as a method to assess cognitive impairment in nonhuman primate enhanced pre- and postnatal developmental (eP-PND) studies: statistical power analysis [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2012, 95(5): 354-362.
- [9] Sackett G, Ruppenthal G, Hewitson L, et al. Neonatal behavior and infant cognitive development in rhesus macaques produced by assisted reproductive technologies [J]. *Dev Psychobiol*, 2006, 48(3): 243-265.
- [10] Golub MS, Hogrefe CE, Germann SL, et al. Behavioral consequences of developmental iron deficiency in infant rhesus monkeys [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2006, 28(1): 3-17.
- [11] Leconte I, Bailey G, Davis-Bruno K, et al. Value of juvenile animal studies [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2011, 92(4): 292-303.

[收稿日期]2017-06-29