



悬尾实验实时检测分析处理系统的研制及初步应用

孙秀萍^{1,2}, 张晓萌³, 卢 聪², 李翊华⁴, 刘新民²

- (1. 北京协和医学院比较医学中心 中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类动物模型三级实验室, 北京 100021;
2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 药理毒理中心, 北京 100193;
3. 中国人民公安大学医院, 北京 100038; 4. 北京经纬华清医疗设备科技公司, 北京 100101)

【摘要】 目的 建立悬尾实验实时监测分析处理系统 方法 结合计算机、机械工程和实验动物行为学, 研制悬尾实验实时监测分析处理系统。应用动物实验进行运动阈值确认和数据准确性验证, 并用抗抑郁阳性药丙咪嗪和帕罗西汀进行不动时间和“功”指标的验证。**结果** 悬尾测试箱由8个悬尾箱组成。采用四周封闭、顶面开放的形式。通过旋转固定手柄, 调节横梁高度, 实现多样本同时悬挂。8个传感器固定于横梁两侧, 分别对应8个悬尾箱。传感器采集的信号经过增益调整、滤波处理送至采集传输盒。采集传输盒采集输出信号, 数字化后送往PC机。动物的运动时间、不动时间及功值可实时显示。运动阈值为26.8时, 人机相关系数最大, 为0.94。应用本系统, 与对照组比较, 帕罗西汀和丙咪嗪可显著缩短小鼠悬尾不动时间($P < 0.01$), 帕罗西汀还可显著增加小鼠“功”值($P < 0.01$), 即增强小鼠悬尾的挣扎强度。**结论** 悬尾实验实时监测分析处理系统实现了悬尾实验的自动化, 客观性强, 重复性好, 可推广应用于抗抑郁药物的筛选和抑郁症病理机制的研究。

【关键词】 悬尾实验; 实时监测分析系统

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 05-0066-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.014

Development and application of computer-auto-controlling and analysis system for tail suspension

SUN Xiu-ping^{1,2}, ZHANG Xiao-meng³, LU Cong², LI Yi-hua⁴, LIU Xin-min²

- (1. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), and Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China;
2. Research Center of Pharmacology and Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
3. The Chinese People's public security hospital, Beijing 100038, China;
4. Beijing Jingwei Huaqing medical equipment limited company of science and technology, Beijing 100101, China)

【Abstract】 Objective To develop a computer-auto-controlling and analysis system for Tail suspension. **Methods** Combining the advantage of computer science, engineering and animal behavior into tail suspension test. The “energy”

【基金项目】 国家自然科学基金(81001655); 国家科技重大专项课题-重大新药创制项目(2009ZX09103-336); 中长期航天飞行所致应激损伤评价与防护关键技术研究(BWS11J052); 航天医学基础与应用国家重点实验室开放基金(SMFA12K01)。

【作者简介】 孙秀萍, 女, 博士, 研究方向: 神经精神疾病药理及方法学, E-mail: supering-sun@126.com。

【通讯作者】 刘新民, 教授, E-mail: liuxinmin@hotmail.com。

index was developed. The system was validated with antidepressants such as imipramine and paroxetine. **Results** The measuring principle is based on the energy developed by mice trying to escape from their suspension. During the test, the movements of the mice are analyzed in terms of force, energy and power developed over time. Each mouse is suspended by the tail using adhesive tape to a hook connected to a tail test sensor. The tail test sensor fixed to suspension bar picks up all movements of the mouse and transmits these to a signal regulation unit and transmission circuit, which amplify, filter and digitalizes the signals. The signals are displayed visually in waveform. Activity time, immobility time, energy are continuously updated. The correlation coefficient of "immobility time" collected by computer and manpower was 0.94. Using this system, both imipramine and paroxetine could decrease the immobility time and paroxetine could increase the energy induced by mice (both $P < 0.01$). **Conclusion** A stable computer-auto-controlling and analysis system for Tail suspension was established and could be used to screen the antidepressants.

【Key words】 Tail suspension test; Computer-auto-controlling and real time analysis system

悬尾实验,是一种抗抑郁药物活性筛选非常灵敏的行为学检测方法^[1],也可用于抑郁症病理生理机制的研究^[2]。因其快速、方便,自 1985 年提出至今,被广为接受和应用^[3]。该实验是将动物头部向下悬挂,动物为克服不正常体位,首先产生以逃避为导向的剧烈挣扎运动,在经过努力仍不能摆脱困境后,出现间断性不动,显示“行为绝望”状态。绝大多数抗抑郁药物都可以减少动物悬尾不动时间,而且作用与临床疗效显著相关^[4]。

早期悬尾实验,以人工计时居多,工作量大,客观性不强,不能定量分析动物的挣扎强度。随着信息、计算机、电子工程等技术和药理学的交叉融合,其自动化测量方法也逐渐发展起来。目前,国内外悬尾测试仪的原理有 3 种,包括力传感器、视频测量及红外热释电原理。国内产品以视频测量居多。视频测量原理固然提供了更为直观的显示界面,但其测量误差不容忽视,尤其实验动物增至 2 只以上,视频跟踪的不准确性尤为突出。红外热释电原理易受外界环境温度和动物运动状态的影响,外界环境温度过低或动物运动迟缓时,经常出现误判现象,导致结果不准确。国外产品大多为传感器原理^[5]。该原理具有更高的灵敏性和准确性。除“不动时间”这一指标外,动物的挣扎强度也成为抗抑郁药效的评价指标之一。国外文献经常用“功”值表示动物的挣扎强度^[1]。与视频及热释电原理相比,传感器原理唯一可通过“功”指标对动物挣扎强度进行定量分析。国外产品均价格不菲,以测试 6 个样本为例,价格在 15~23 万人民币不等。尽管国内悬尾仪器市场巨大,但价格因素大大限制了国外产品在我国的广泛应用。基于以上原因,我们采用力传感器原理,研制了悬尾实验实时检测分析处理系统,在硬件上进行了改进,实现了悬尾实验的自

动化,指标敏感而且丰富,满足了多样本筛选的需求,现已应用于抗抑郁药物的筛选^[6]。

1 材料和方法

1.1 硬件研制所需器材

计算机(9 寸以上宽屏液晶显示,奔腾双核 1.6G Hz 以上,内存 1G 以上,40 G 及其以上硬盘,三个以上 USB 接口,刻录光驱);测试箱(灰白色铝合金材料);传感器;数据传输线,采集传输盒。

1.2 药品

帕罗西汀(paroxetine)购自中国食品药品检定研究院提供,批号为 100357-200301;丙咪嗪(imipramine)购自 Sigma 公司,批号为 010M01291V。上述药物均于实验前用蒸馏水溶解备用。

1.3 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠,20~24 g,SPF 级,购自中国医学科学院医学实验动物中心,动物许可证号【SCXK(京)2004-0001】。动物使用许可证号:SYXK(京)2008-0019。动物自由进食进水,维持 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜节律。动物适应环境一周进行实验。

1.4 实验方法

1.4.1 硬件

采用力传感器原理,采集动物在悬挂过程中产生的张力变化。悬尾箱的设计,考虑采集自然光线,并最大程度避免周围环境对动物的干扰。在满足技术和空间需求的基础上,实现多样本检测。力求实现实验动物同时悬挂的自动化,节省人力,并保证实验数据的客观性。

1.4.2 软件

建立反映样本活动程度的数据处理技术以及

实时显示处理技术。实验完成,每个样本的实验数据和分析结果按二进制文件格式保存。除统计样本的运动参数(运动时间和不动时间)外,本系统提出“功”的概念,采用特定测量方法和数据处理算法,使之真实反应动物的挣扎程度。

1.4.3 悬尾实验实时检测分析处理系统评价指标的验证

1.4.3.1 运动阈值的确认和数据准确性验证

C57BL/6J 雄性小鼠 50 只,在测试房间适应 1 h 后,进行悬尾实验。将胶布粘在小鼠尾端 1 cm 处,再通过胶布,将小鼠悬挂于传感器下方的挂钩上。检测悬尾箱、悬尾控制单元及计算机的连接,开启计算机,打开悬尾测试软件,进行实验各项参数设置,将实验时间设为 6 min。通过调节固定手柄,降低横梁,将动物呈半悬挂状态悬挂,升高横梁,动物呈完全悬挂状态,点击采集按钮,开始实验。运动阈值取 16.8、26.8、36.8 三个值,同时进行人工不动时间的统计。采用 SPSS 16.0,首先观察散点图是否存在线性相关,再进行相关分析。

1.4.3.2 抗抑郁阳性药对“不动时间”及“功”指标的验证

C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,即空白对照组(蒸馏水)、帕罗西汀组(10 mg/kg)、丙咪嗪组(10 mg/kg),每组 10 只。各组均给予 0.2 mL/10g,单次给药后 1 h 进行悬尾实验。实验方法同 1.4.3.1。采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。结果以均数 \pm

标准误($\text{mean} \pm \text{SEM}$)表示。采用单样本 K-S 检验进行正态分布检验,正态分布数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),不满足正态分布的数据采用非参数检验。组间差异采用 LSD(方差齐)或 Games-Howell(方差不齐)法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 悬尾实验实时检测分析处理系统的建立

2.1.1 测试箱:测试箱由 8 个悬尾箱组成,尺寸为 $72 \times 36 \times 16$ cm(长 \times 宽 \times 高)。悬尾箱采用灰白色铝合金材料制成,尺寸为 $18 \times 18 \times 16$ cm(长 \times 宽 \times 高)。悬尾箱采用四周封闭、顶面开放的形式,既可避免周围环境干扰,又可采集自然光线。悬尾箱体设计紧凑,节省空间。通过旋转固定手柄,调节悬尾杆高度,实现多样本同时悬挂。开始实验前,将悬尾杆降至最低,动物通过挂钩悬挂于传感器下方,此时,动物前肢着地,处于半悬挂状态。所有动物悬挂完毕后,调节固定手柄,使悬尾杆上升至所需高度,此时,所有动物同时处于完全悬挂状态。悬尾实验实时检测分析处理系统见图 1。

2.1.2 传感器与信号调理单元:8 个传感器固定于横梁两侧,分别对应 8 个悬尾箱。传感器的输出经过增益调整、滤波处理送至采集传输盒。

2.1.3 采集传输装置:

采集传输盒采集信号调理单元的输出信号,数

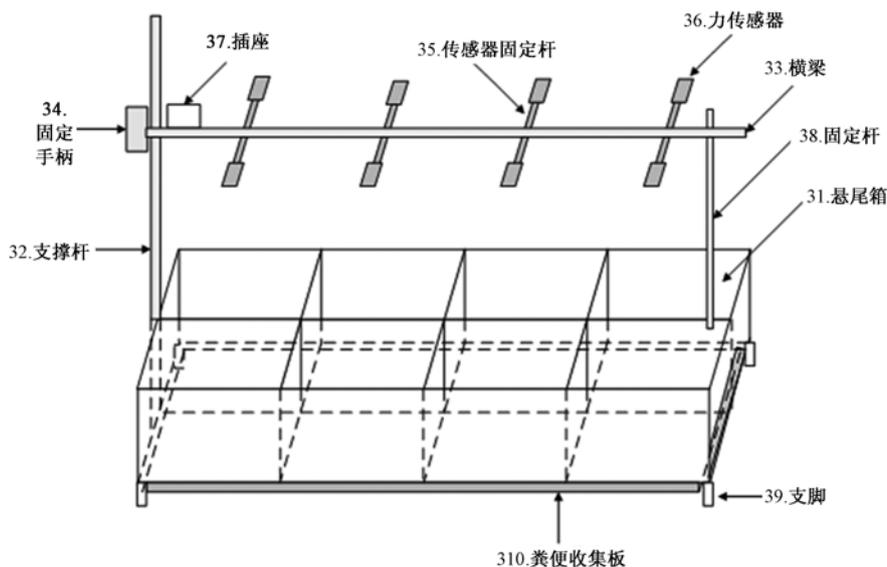


图 1 悬尾实验实时检测分析处理系统示意图

Fig. 1 Device of tail suspension system

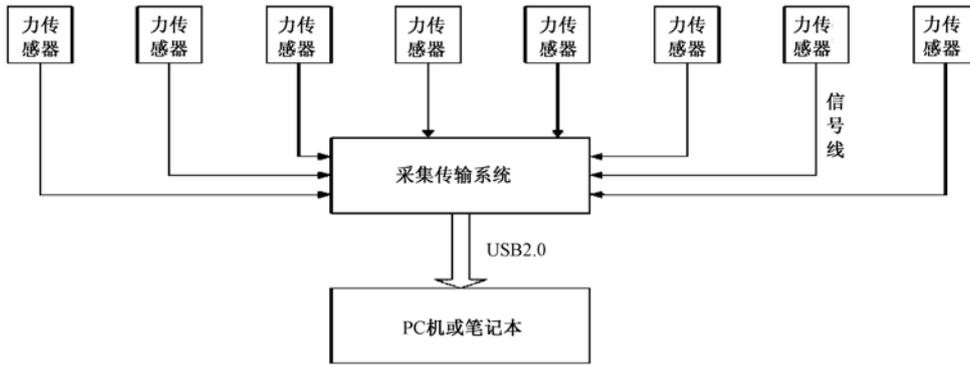


图 2 信号采集传输示意图

Fig. 2 Signal collection and transmission circuit

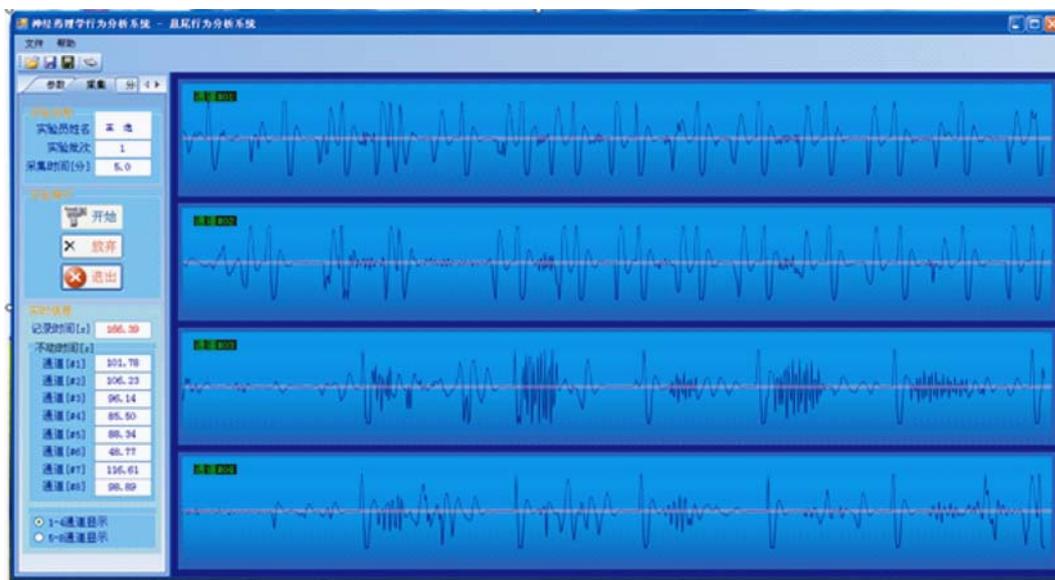


图 3 悬尾实验实时检测分析处理系统软件界面图

Fig. 3 Software interface of computer-auto-controlling and analysis system for Tail suspension

数字化后送往 PC 机。采集传输过程如下(图 2)

2.2 软件设计

软件系统包括实验基本参数设置、实验数据采集和实验数据分析三大部分。

实验基本参数设置完成后,开始实验。软件读取数字化处理后的原始数据,以波形及数字的形式,实时显示八只悬尾小鼠的运动时间和不动时间。本系统除了可以提取传统指标“不动时间”外,还可以提取“功”值,用于反应动物的挣扎强度。实验结果以 Excel 的形式生成,便于用户在 Excel、SPSS、SAS 等分析统计软件中作进一步分析处理。同时,软件可进行波形回放;阈值可调,从而实现结果再分析。软件界面图如图 3 所示。

2.3 悬尾实验实时检测分析处理系统评价指标的验证

2.3.1 运动阈值的确认和数据准确性验证

运动阈值为 16.8、26.8、36.8 时,人工计时与悬尾测试软件的相关系数见表 1。当运动阈值为 26.8 时,人机相关系数(person correlation)最大,为 0.94,双侧 $P = 0.000$,具有统计学意义。对此进行了 10 余次数据验证,结果类似,证明悬尾测试软件能准确真实的反应动物的悬尾行为。

表 1 人工计时与悬尾测试软件的相关系数

Tab. 1 The correlation coefficient of “immobility time” collected by computer and manpower

| 运动阈值 Movement threshold | 相关系数 Correlation coefficient |
|-------------------------|------------------------------|
| 16.8 | 0.89 |
| 26.8 | 0.94 |
| 36.8 | 0.89 |

2.3.2 阳性药对“不动时间”及“功”指标的验证

由图 4 可见,与对照组比较,丙咪嗪、帕罗西汀

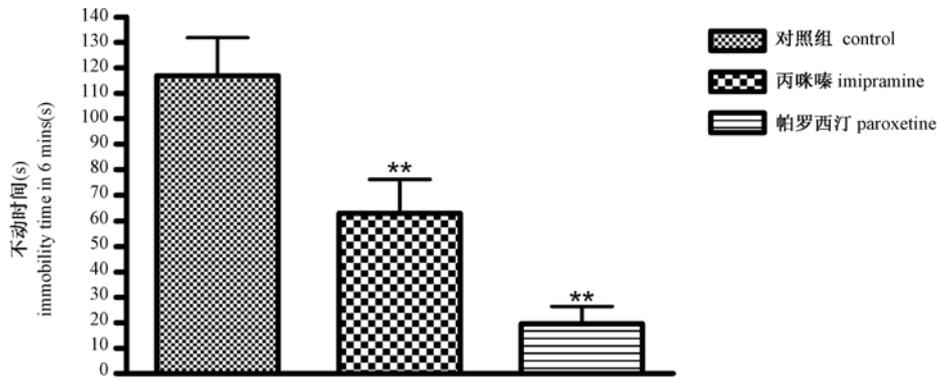


图 4 丙咪嗪、帕罗西汀对悬尾不动时间的影响(mean ± SEM, ** $P < 0.01$, 与正常组比较)

Fig. 4 The effect of imipramine and paroxetine on immobility time in tail suspension test (mean ± SEM, ** $P < 0.01$, compared with the control group)

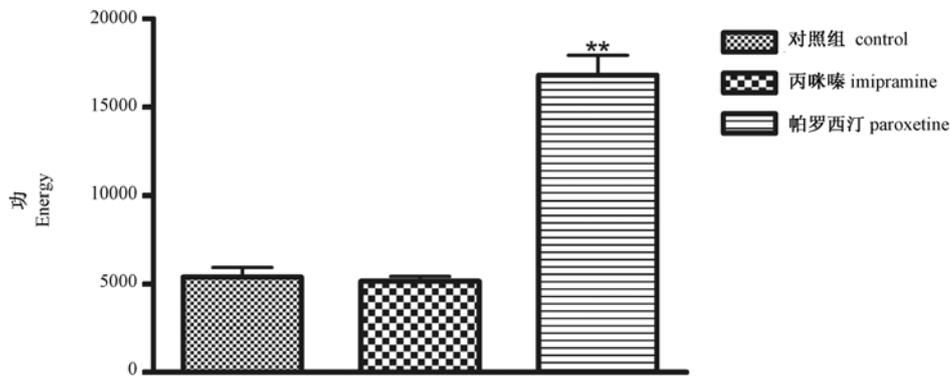


图 5 丙咪嗪、帕罗西汀对小鼠悬尾状态下“功”值的影响(mean ± SEM, ** $P < 0.01$, 与正常组比较)

Fig. 5 The effect of imipramine and paroxetine on energy induced by mice in tail suspension test (mean ± SEM, ** $P < 0.01$, compared with the control group)

可显著缩短悬尾不动时间($P < 0.01$)。

图 5 结果显示,与对照组比较,帕罗西汀可显著增加悬尾小鼠“功”值($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究提供了一套具有自主知识产权的适用于小鼠的悬尾实验实时检测分析处理系统。该系统以传感器为原理,具有高度灵敏性和稳定性,并建立了反应小鼠挣扎强度的“功”指标,填补了国内以传感器为原理的悬尾测试仪研发的空白。

目前,国内外悬尾测试仪的原理有三种,包括传感器、视频原理及红外热释电原理。视频原理,经常采用质心跟踪的方法,但对悬尾实验并不合适。因为动物在悬吊过程中,会产生以逃避为导向的运动,但质心变化可能并不明显,质心跟踪的方法显然不能有效识别动物的“动”和“不动”状态。识别鼠足,是简单、有效的跟踪方法,但要求动物腹部必须始终对准摄像头。另外,动物挂在悬尾箱

内,对背景光的强度和稳定性有一定要求,并且需要避免反光。其次,一般情况下,摄像头距离悬尾箱 30 cm 左右,跟踪效果比较理想,但仅限于一个样本的观察。增加摄像头和悬尾箱的距离,可以增加样本数,即跟踪两个或两个以上的动物。但随着摄像头和悬尾箱距离的加大,识别效果变差。广角镜头也不能有效解决这一问题。由此可见,视频跟踪的原理,并不适于悬尾仪器的研发。Juszczak^[7]曾于 2006 年发表悬尾视频分析的文章,但此后,视频跟踪的原理在国外并未大规模应用于悬尾仪器。红外热释电原理则易受外界环境温度和动物运动状态的影响,外界环境温度过低或动物运动迟缓时,经常出现误判现象,导致结果不准确。传感器原理能够检测到极微小的张力变化(如动物呼吸、胃肠蠕动等引起的张力变化),具有极高的灵敏性和稳定性,不受动物状态、背景光的限制,在空间允许的情况下,可用于多样本检测,非常适于动物悬尾运动状态的跟踪。因此,我们选择了力传感器原理研

制本系统,并通过阈值设定等方式,取得了敏感、稳定的指标。

悬尾实验,主要用于抗抑郁药物的筛选。因此,必须满足多样本要求。同时,实现多样本同时悬挂也是亟待解决的问题。本系统通过横梁的自动升降,解决了这一问题,节省了人力,并保证了实验数据的客观性。另外,建立自然光线下安静、稳定的实验环境,是保证行为学实验数据可靠性的先决条件。国内外的悬尾仪器产品,悬尾箱的设计均为侧面开放,动物易受周围环境的干扰。本系统悬尾箱采用四周封闭,顶面开放的形式,既避免了周围环境的干扰,同时,又可采集自然光线,保证了实验数据的可靠性。除统计样本的运动参数(运动时间和不动时间)外,本系统提出了“功”的概念,用于反应动物的挣扎强度,从而更细致地反应抗抑郁药物的药效。

保证悬尾实验实时监测分析处理系统数据的准确性,是该仪器研发最为重要的环节之一。通过人机数据相关性分析对系统提供的数据进行相关性验证,是仪器研发最为基本和最为重要的工作^[8]。通过 SPSS 相关性统计分析,我们发现,当运动阈值设为 26.8 时,人机相关系数达 94%,双侧 $P=0.000$,具有统计学意义,说明悬尾测试软件能准确真实的反应动物的悬尾行为。

丙咪嗪为三环类抗抑郁药物,经常作为阳性药应用于抑郁症相关的实验研究^[9]。帕罗西汀为 5-羟色胺重摄取抑制剂,具有高效、强力的抗抑郁作用,可显著缩短悬尾实验动物不动时间^[10]。本研究发现,丙咪嗪和帕罗西汀的抗抑郁作用在悬尾实验实时检测分析处理系统中可得到良好体现,验证了该系统的有效性。帕罗西汀还使小鼠“功”值增加,即增强悬尾小鼠的挣扎强度,显示了其强有效的抗抑郁作用。丙咪嗪未表现出该作用。

综上所述,基于传感器原理,研制了悬尾实验实时监测分析处理系统,实现了悬尾实验的自动化,客观化,重复性好,人机数据高度相关,指标敏感,并增加了“功”和“功率”等反应悬尾动物挣扎强度的指标,使抗抑郁药物活性评价更加细致,可推

广应用于抗抑郁药物筛选和抑郁症病理机制的研究。

参考文献:

- [1] Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005,29(4-5):571-625.
- [2] Lu X, Ross B, Sanchez-Alavez M, Zorrilla EP, et al. Phenotypic analysis of GalR2 knockout mice in anxiety- and depression-related behavioral tests [J]. *Neuropeptides*, 2008,42(4):387-97.
- [3] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985,85(3):367-70.
- [4] Jacobsen JP, Nielsen EO, Hummel R, et al. Insensitivity of NMRI mice to selective serotonin reuptake inhibitors in the tail suspension test can be reversed by co-treatment with 5-hydroxytryptophan [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008,199(2):137-50.
- [5] Liu X, Gershenfeld HK. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice [J]. *Biological Psychiatry*, 2001,49(7):575-81.
- [6] 孙秀萍,李腾飞,石哲,等. 人参总皂苷和远志总苷配伍对小鼠抗抑郁作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2012,22(6):30-6.
- [7] Juszcak GR, Sliwa AT, Wolak P, et al. The usage of video analysis system for detection of immobility in the tail suspension test in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006,85(2):332-8.
- [8] 王琼,买文丽,李翊华,等. 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散安神镇静作用验证[J]. *中草药*, 2009,40(11):1773-1779.
- [9] Cunha MP, Machado DG, Bettio LEB, et al. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2008,32(8):1913-20.
- [10] Varty GB, Cohen-Williams ME, Hunter JC. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test [J]. *Behav Pharmacol*, 2003,14(1):87-95.

[修回日期]2014-04-04