

益智中草药研究中的一种新方法[△]

中国医学科学院
药用植物研究所(北京 100094)
中国协和医科大学

刘新民* 陈善广** 王圣平
孟慧** 宿双宁** 宋洁
尚伟芬 杨峻山 肖培根

摘 要 利用计算机自动控制、图像分析处理和多媒体视频等多种技术,将小鼠在圆形水迷宫的学习记忆行为表现转换为活动图像并显示其实时运动轨迹路线,利用计算机对获得的信息资源进行综合分析、优化组合后,建立了由运动距离、速度、寻找平台时间、运动轨迹组成的评价指标。正常动物及慢性 ig 酒精实验结果证明上述指标更为规范客观、科学准确,更符合小鼠在圆形水迷宫内的学习记忆行为表现。从而为益智中草药研究提供了一种自动化程度高、获取信息量大、符合国际标准的圆形水迷宫计算机自动控制和图像分析处理系统及相应的指标评价体系。

关键词 益智中草药 小鼠 圆形水迷宫 计算机自动控制 图像分析处理

寻找益智药物对防治老年性痴呆等学习记忆障碍疾病的重要性是不言而喻的。相应的研究方法和手段引起了国际上的高度重视。随着计算机的出现及在此基础上发展起来的各种高新技术向动物实验研究领域的渗透,利用计算机自动控制和图像分析处理技术进行益智药物研究已成为国际药学界的重要研究手段^[1,2]。我们在进行促智中草药的研究过程中,结合药学、电子工程学和计算机科学等多学科的综合优势,将计算机自动控制、图像分析处理、红外感应和多媒体视频等多种技术联合引入益智药物研究中,建立了一套包括跳台^[3]、避暗^[4]、水迷宫(方形和圆形两种)和穿梭 4 种比较完善的用于益智药物研究的计算机图像分析处理系统。笔者介绍圆形水迷宫计算机图像分析处理系统及相应的指标评价标准。

1 实验材料

1.1 实验仪器: Pentium (PC-586) 计算机(内存 16 M, 硬盘容量 1G)、TVGA 显示卡、摄像机(韩国)、多媒体视频卡和打印机,自制

的圆形水迷宫测试箱。

1.2 工具药: 无水乙醇(北京化工厂)。

1.3 实验动物: 22 ± 2 g 昆明种小鼠, 动物合格证号医动字 01-3001, 雌雄兼用, 中国医学科学院实验动物研究所提供。实验环境设施合格证号: 医动字第 01-2073(二级)。

2 方法与结果

2.1 硬件研制原理及组成: 参考国内外有关文献^[1,2,5]进行改进, 利用 0.5 cm 厚的不锈钢板制成高度为 30 cm、直径为 65 cm 的圆形水迷宫测试箱, 底层设置加热装置, 温度控制器自动控制水温($25^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ 可选)。设计时以保证高信噪比和使用方便为原则。将 Morris 水迷宫方法中的白色摄像背景(水面颜色)调整为黑色以简化实验操作和保证目标的准确识别, 采用多媒体视频卡代替专用的图像卡, 以保证信号采集的实时性和准确性。

2.2 软件研制原理及流程图: 以 PC-586 作为系统软件平台, 使用 BC++、汇编和 dBase 语言混合编程, 设计仿 Windows 风格的开放式中文集成界面。全套软件由 1 个检测处理

* Address: Liu Xinmin, Institute of Medicinal Plant Development, CAMS, PUMC, Beijing

** 中国航天医学工程研究所

[△]国家科委生命中心博士新医药创新项目基金资助课题

模块、3 个通用模块(视频卡驱动、接口卡驱动和打印驱动)和 2 个统计模块(文件转换与统计分析)组成,其中检测处理模块由系统说明、参数设置、开始实验、数据管理与回放等 4 个子功能模块组成。

“系统说明”给操作人员提供软件使用帮助信息。小鼠在迷宫内的识别依赖于“参数设置”的完成,“参数设置”共有 3 项,〔实验参数〕包括动物、药品、检测模式(圆形或方形)及实验结果存贮路径的指定等,以供将来文件交换、统计分析、结果调用和贮存等;〔几何标定〕是在水迷宫箱体直径两端进行标记,以确定小鼠的活动范围,同时将水迷宫自动划分为四个象限,在指定的象限内标记实(虚)平台位置和实验起始区域,〔照度标定〕〔照度标定〕与〔几何标定〕构成了全套系统识别目标正确与否的关键。照度标定完毕,自动弹出“文件保存窗口”,进行文件和数据的存贮。完成上述步骤后可进入“开始实验”模块。由于多媒体视频跟踪技术的采用,准确捕获了动物在迷宫内每一点的活动方向和运动轨迹,利用计算机对获得的信息资源进行综合分析、优化组合后,获取一系列更符合动物空间方位觉表现的指标(见动物实验部分),这其中的核心部分由“数据管理和回放”子功能模块控制。除指标的分析重组外,“数据管理和回放”模块还利用存贮的文件完成文件交换、统计分析和结果的打印输出。

3 动物实验

表 1 正常小鼠在圆形水迷宫中的学习记忆能力($\bar{x} \pm s, n=10$)

日期	距离(cm)	时间(s)	速度(cm/s)	发现次数	%
第一天	1528.22±891.40	85.67±53.20	20.25±5.56	0.00±0.00	80
第二天	1729.45±957.27	73.33±36.40	23.17±2.05	2.50±1.38	100
第三天	511.52±583.49**	30.33±42.21*	24.60±11.24	0.17±0.41	100
第四天	428.42±316.68**	19.67±16.54***	24.13±4.84	0.33±0.82	100
第五天	271.97±247.11***	13.17±13.08***	26.13±8.88	0.17±0.41	100

和第一天相比,* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

从上表中可以看出,由于第一天训练时 80% 的动物在规定时间内(120 s)即找到了隐于水面下的平台,故此处%对判断动物在圆形水迷宫中的学习记忆能力来说价值不大。

3.1 正常动物在圆形水迷宫内的学习记忆过程:开机后从系统界面中选择“水迷宫计算机图像分析处理系统”,启动系统软件对多媒体视频卡进行检测和初始化。鼠标点压“参数设置”功能模块进行实验参数的设置,其中测试模式选择圆形水迷宫、实验时间为 120 s,打印机设置为“自动打印”项。随后进行几何标定,在第一象限(操作人员依顺时钟方向任意选定,本实验以左上 1/4 为第一象限,见图 1 和图 2)设置实平台(动物要寻找的平台),在第三象限的外 1/3 处设置实验开始区域,在第二象限(或前一次实验时的实平台位置)设虚平台。几何标定完毕后,迷宫内放入 20 cm 深的水(水温控制在 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$),用黑色染料使成黑色。在实平台标定处放置直径为 5.5 cm 的硬质平台,平台顶端为黑色,没于水面下 1 cm,使平台不可见。在完成照度标定后,将正常健康小鼠置于开始区域,鼠标拉出“开始实验”菜单,此时摄像机自动开始搜索目标,一旦在开始区域检测到红色活动质点(小鼠)后自动计时,以动物发现平台并在平台上停留 5 s 以上的时间作为寻找平台的时间(Time),如在平台上的时间少于 5 s 则计算为发现次数(Finds),规定时间内未找到者以 120 s 计。实验完毕后调用自动存入的数据文件统计分析动物到达平台的 Times、游泳距离(Dist.)、速度(Speed)、发现次数(Finds)和在规定时间内找到平台的动物数(%)。实验结果如下(表 1 及图 1)。

但随着训练时间的增加,Dist. 及 Time 逐步减少,至第三天已表现出统计学上的差异,Speed 也有渐进性增加的趋势,Dist. 及 Time 对小鼠在圆形迷宫中的空间定向学习记忆能

力的评价具有重要意义,尤为明显的是动物的运动轨迹分布图的密度随着训练次数的增加而逐步降低(图 1)。

3.2 酒精连续给药对小鼠学习记忆的影响: 小鼠随机分为正常组(蒸馏水)、20%、30%、40%乙醇组,10 mL/kg ig,连续 7 d 后进行测试,如前设置参数、几何标定和照度标定,统计各组动物到达平台的 Time、Dist.、Speed、



图 1 正常小鼠在圆形水迷宫中运动轨迹分布图

◎-实平台 ○-虚平台 □-起始区域 Finds 及%,结果见表 2 及图 2。

表中数据表明20%和30%酒精连续 ig 7 d

表 2 酒精连续给药对小鼠学习记忆的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

日期	组别	距离(cm)	时间(s)	速度(cm/s)	发现次数	%
第一天	NS	1306.08±1091.91	87.70±42.71	20.97±5.52	1.10±1.73	80
	20%	1205.09±809.72	106.20±33.30	12.38±7.31**	1.10±3.14	60
	30%	1458.47±689.50	102.30±34.74	14.69±4.69	0.00±0.00	60
第二天	NS	768.33±808.25	46.00±46.89	19.22±5.87	0.90±1.91	100
	20%	982.36±765.07	88.40±47.77	11.94±5.33**	0.50±1.27	70
	30%	1030.25±535.18*	91.80±41.10*	7.96±5.75***	0.30±0.95	70
第三天	NS	574.60±592.02	27.70±25.60	20.29±6.82	0.40±0.84	100
	20%	1025.75±886.86**	88.30±50.39**	14.69±6.55	0.10±0.32	70
	30%	1166.19±750.80	97.89±36.11***	12.58±6.11*	0.00±0.00	70
第四天	NS	402.83±1188.15	32.10±54.44	18.80±8.42	0.20±0.42	100
	20%	1098.98±801.77**	83.50±49.52	15.30±6.99	0.20±0.63	80
	30%	1207.58±730.33**	99.30±40.93	10.51±5.27*	0.00±0.00	70
第五天	NS	493.14±520.74	38.50±39.65	18.40±11.32	0.00±0.00	100
	20%	1396.45±666.01**	96.00±37.19**	14.40±4.47	0.80±1.87	70
	30%	1018.23±581.87*	99.30±34.92**	10.87±5.73	0.00±0.00	70

与正常组比较,* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

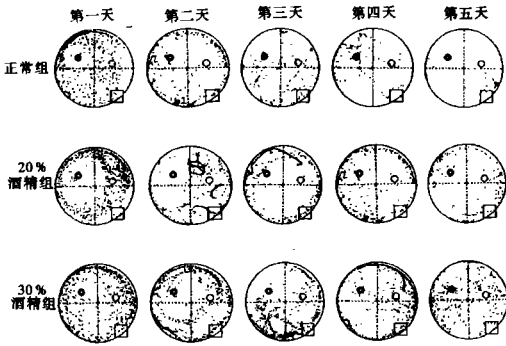


图 2 酒精对小鼠学习记忆能力的影响
——圆形水迷宫运动轨迹分布图

◎-实平台 ○-虚平台 □-起始区域

后能明显引起小鼠在圆形水迷宫中的空间方位觉的判断能力障碍,表现为寻找平台的时间延长、游程增加及游泳速度减慢,运动轨迹分布图一直呈致密状(与对照组比较)。由于各组动物 70%以上均能在规定时间(120 s)

内找到平台,故到达平台的动物数无统计学上的意义。40%的酒精连续 ig 7 d 引起步态不稳等醉酒状态,而不适宜于动物空间方位觉能力的判断(实验数据略)。

4 讨论与结论

由于圆形迷宫中测试箱体为圆形,平台又不可见,小鼠在迷宫内寻找平台时无任何提示,它只能通过多次偶然的碰撞和反复探索,利用水迷宫周围的物体进行空间定位来寻找掩藏于黑色水面下的平台。因此,圆形迷宫相对于其它各种迷宫而言,是一种很敏感的检测动物的空间定位能力的手段^[1],已为国际药学界采用进行学习记忆研究、寻找益智药物的一种重要方法^[6,7]。我们利用国际上新兴的计算机自动控制、图像分析处理、多媒体视频等多种新技术,对动物在圆形水迷宫的行为表现进行视频跟踪,将寻找平台的过

程以实验活动图像嵌入计算机系统界面并显示出运动轨迹图,对获得的信息资源采用计算机综合分析后,除提取出现有仪器^[2,5]所获的%和 Times 等指标外,还由运动距离、速度以及运动轨迹分布密度图组成的一系列指标评价体系更准确客观、科学地反映出动物在圆形迷宫内的学习记忆过程;由于软件程序可允许实验者在圆形迷宫平面内任意区域开始进行实验,这就使得该系统的起步区有多个点可供选择,更进一步优化了圆形水迷宫测试动物空间学习记忆能力的敏感程度;游泳距离和游泳速度的量化测定对动物运动能力的评价首次提供了具体可供评价的定量指标,这两项指标在抗衰老及抗疲劳药物研究中将具有很高的应用价值;加上对摄像背景(水

面颜色)和采集方式进行了改进,实验操作得以简化;数据采集、处理和统计分析一体化,提高了实验的自动化程度。从而为益智中草药研究提供了一种规范客观、获取信息量大、符合国际标准的计算机自动控制和图像分析处理系统及相应的指标评价体系。

参考文献

- 1 Morris R. J Neuroscience Methods, 1984, 11: 47
- 2 Victor HD, *et al.* Physio Behav, 1991, 50(4): 8573
- 3 刘新民, 等. 中国实验动物学报, 1994, 1: 43
- 4 刘新民, 等. 中国医学科学院学报, 1995, 6: 427
- 5 张均田, 等. 药物分析杂志, 1991, 11(1): 23
- 6 Brandeis R, *et al.* Int J Neurosci, 1989, 23: 145
- 7 Morris R G M, *et al.* Nature, 1986, 319: 744

(1997-05-16 收稿

1997-11-26 修回)

The Establishment of Computer-based Auto-Controlling and Image-Analysing Processing System of Circle Water-Maze for Studying Nootropic Drugs from Traditonal Chinese Medicinal Herbs

Liu Xin-min Chen Shan-guang** Wang Sheng-ping Meng Hui**, *et al.* (Institute of Medicinal Plant Development, CAMS, PUMC, Beijing, 100094 ** Insitute of Space Medico-Engineering)

Abstract By making use of the dominant position in pharmacy, electronic engineering and computer sciences, and by converting learning and memory behavior of mice in circle Water-Maze into locus patterns of real time with the techniques of photography, multimedia and computer-based auto-controlling, a computer-aided auto-controlling and image-analysing processing system for studying animal spatial discrimination in circle Water-Maze have been set up. Experimental results with normal mice and dementia animals induced by 20-30% alcohol showed that the system can provide more information including time to find the platform of circle Maze, the scores of their performance, their speed of swimming in the Maze and the number of mice to reach the destination, and the scattering atlas of mouse locus moving in the circle Water-Maze of mouse. The system have been proved to be more systematic, scientific and reasonable for the judgment of spatial discrimination of the tested animal in circle Water-Maze, and can be regarded as an advanced tool for pharmacological study of nootropic Chinese Medicinal herbs with high degree of automation.

Key words Nootropic Traditional Chinese Medicinal herbs Mice Circle Water -Maze Computer-aided auto-controlling technology Imageanalysing and processing technology Multimedia technology