



虚拟视觉刺激引起幼年斑马鱼捕食行为放弃的研究*

张翔宇 柴宇明 齐珂心** 温泉**

(中国科学技术大学, 生命科学与医学部, 合肥 230027)

摘要 目的 当动物重复某种行为以逃避危险或获取奖励而无法成功时, 会产生放弃。放弃是一种常见且基本的行为, 在小鼠等模式动物中已经被广泛研究, 但是其部分神经机制仍未被阐明。幼年斑马鱼适合进行全脑光学成像, 是神经科学领域的重要模式生物。已经有研究者通过持续电击等消极刺激诱发斑马鱼放弃行为, 然而奖励刺激能否引起斑马鱼放弃尚无报道。本文对奖励刺激引起的斑马鱼放弃行为进行了探究。方法 通过给予斑马鱼虚拟的食物视觉刺激, 检验斑马鱼对虚拟食物的捕食情况, 比较斑马鱼捕食频率和单次捕食时长随时间的变化。结果 虚拟的食物视觉刺激可以引起斑马鱼的捕食行为, 接受 25 min 虚拟刺激后, 8 日龄以上斑马鱼的捕食频率和单次捕食时长均出现显著下降。结论 此研究丰富了斑马鱼放弃行为的研究范式, 实验结果表明, 缺失真实奖励的虚拟食物刺激可以诱导斑马鱼放弃捕食行为, 这将进一步加深对动物放弃行为的理解, 推动对其神经机制的研究。

关键词 幼年斑马鱼, 放弃行为, 捕食行为

中图分类号 Q6, Q95

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0318

动物在面对持续无法摆脱的厌恶刺激, 或者多次尝试趋近某种偏好刺激而失败时, 会放弃当前的行为, 表现为行为频率减少和持续时间缩短。多数情况下放弃是一种精明的行为, 它可以帮助动物调整行为方式, 保存体力, 保护动物短时间内安全, 让其有更多精力做更有价值的事情。研究者目前主要从习得性无助的角度来研究动物的放弃行为, 这可以追溯到 1967 年^[1]。研究者将狗囚禁在无法逃脱的笼子里, 通过铃声响起给狗施加无法逃避的电击, 经过训练, 当只有铃声时, 狗的表现也如同受到了电击, 即使打开笼子, 狗也不会逃跑。这种即使出现摆脱厌恶环境的机会, 动物也仍然选择放弃摆脱该环境的心理和行为被称为习得性无助。其他关于习得性无助的研究还可以通过电击^[2-4]、穿梭箱实验^[5]、热箱实验^[6-7]等方式在斑马鱼、小鼠、果蝇、蜜蜂等动物上展开。习得性无助的动物表现出逃避行为/攻击性减少、焦虑和恐惧增加等现象^[8]。但是习得性无助实验中, 引发动物行为的刺激往往是厌恶刺激或者中性刺激, 动物面对可能

获得奖励的积极刺激也会产生放弃^[9], 但是相关研究较少。

斑马鱼作为常见模式动物, 单次产卵能达到三四百颗, 编码蛋白质的基因有 69% 和人类同源^[10], 而且脑体积较小, 便于进行全脑水平的研究^[11]。捕食行为开始于斑马鱼受精后的第 5 天 (5 days post fertilization, 5 dpf), 用于代替卵黄, 为机体供能^[12]。这一行为包含追踪、吞食两个阶段, 斑马鱼通过游动和转向调整身体, 快速靠近食物并将其吞食^[13]。其中追踪阶段伴随着双眼汇聚角度的增大和以 J-turn 为代表的小幅摆尾行为的发生。2011 年 Bianco 等^[14]通过投射在虚拟屏幕上的小光点, 引起了斑马鱼的捕食行为, 这种可控的食物刺激对斑马鱼捕食行为的研究提供了可靠的实验范式, 为后来者从事斑马鱼捕食行为相关研究提供了

* 国家自然科学基金 (32071008) 资助项目。

** 通讯联系人。

齐珂心 Tel: 0551-63606857, E-mail: kexinqi@mail.ustc.edu.cn

温泉 Tel: 0551-63606857, E-mail: qwen@ustc.edu.cn

收稿日期: 2022-07-09, 接受日期: 2022-08-31

指导^[15-17]。虚拟食物刺激对于斑马鱼是一个积极刺激,能够引起斑马鱼的趋近行为,却不能提供真实食物奖励,通过虚拟刺激引起的捕食行为能否使斑马鱼产生放弃,目前尚未可知。本研究通过虚拟食物刺激引起斑马鱼捕食行为,比较了不同日龄斑马鱼在接受刺激不同时期的捕食行为表现,探究了奖励缺失的虚拟食物刺激对斑马鱼捕食行为的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲养

本实验使用的斑马鱼品系为Nacre品系,为AB品系斑马鱼(获赠于中国科学技术大学生命科学学院胡兵教授实验室)和Casper品系斑马鱼(购自国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center)),经过杂交传代,并依据眼球巩膜和体表色素的有无等表观特征筛选得到,在保证幼鱼成活率的同时减少了体表黑色素对实验的干扰。斑马鱼饲养用水pH 6.8~7.4,电导率500~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$,饲养环境温度常年控制在26~28 $^{\circ}\text{C}$,光周期为14 h光照/10 h黑暗环境,幼年斑马鱼用E2胚胎培养液培养,幼鱼从5 dpf开始投喂草履虫饲养。实验过程中废弃的斑马鱼统一用冰浴法处理。本研究中动

物的饲养和行为训练均经中国科学技术大学动物实验伦理委员会批准(许可证号:USTCACUC1103013)。

1.2 实验装置

1.2.1 硬件装置

斑马鱼自由行为平台主要分为斑马鱼活动场、相机、光源、电脑4个部分(图1a)。4个部分被统一安装在小型暗室中(图1b),暗室以铝合金面包板为底座,以工业铝型材为框架,四周和顶部覆盖有黑色不透明亚克力板。

a. 斑马鱼活动场:在70 mm \times 50 mm \times 1.5 mm的碳纤维板中间挖出直径20 mm的圆形孔洞,上下方用盖玻片封住形成空腔,填充斑马鱼胚胎培养液,形成活动场。

b. 工业相机(Basler acA2000-165 um NIR)位于活动场下方,搭配长焦镜头(尼康,50 mm,1:1.8,2/3)。

c. 光源:在虚拟刺激实验中,活动场上方覆盖一个像素密度为428像素每英寸(pixel per inch, ppi)的手机屏幕,以提供虚拟视觉刺激,并减少屏幕发热对实验的影响。在真实草履虫刺激实验中,使用峰值波长940 nm的红外LED灯提供照明。

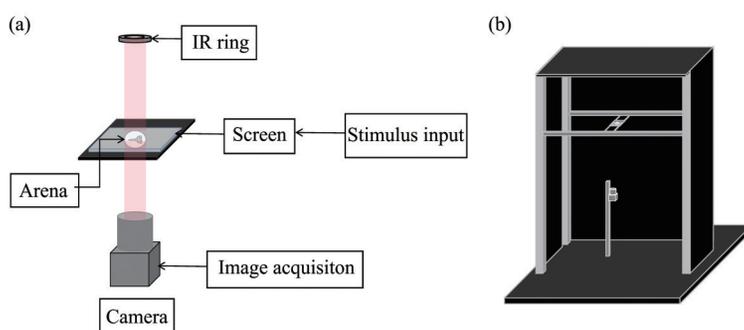


Fig. 1 Virtual reality and behavioral system

(a) Schematics of the virtual reality setup and the optical system for recording fish behavior. Red columnar shade indicates an infrared optical path.
(b) 3D view of the darkroom structure.

1.2.2 软件装置

斑马鱼虚拟刺激程序:自主编写的C++程序。相机曝光时间1500 μs ,帧率为100帧/s(frame per second, fps),根据实验范式给予视觉刺激的同时记录图像。程序可以在<https://github.com/Wenlab/virtual-visual-stimulus>获得。

1.3 实验过程

实验动物统一经过饥饿处理:在实验前一天傍晚,挑出大约20条身体发育正常,且运动活跃的斑马鱼,转移到干净的斑马鱼培养液中,不进行任何投喂,放在28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中待用。

每次实验前,用巴氏吸管吸取一条运动活跃的

斑马鱼，放在斑马鱼活动场中，加入新鲜的实验用水，排出活动场中的空气，确保相机可以记录到完整的斑马鱼自由行为图像。

1.3.1 虚拟视觉刺激的生成

随机运动的虚拟草履虫由一段MATLAB code生成的20 000帧的视频提供。初始化一张2 000像素×2 000像素的白色图像作为背景，并添加随机运动的黑色圆点作为刺激。通过观察真实草履虫在水中的运动情况，拟定虚拟草履虫的运动参数。虚拟运动由随机布朗运动和随机方向的运动相加得到。对于一个虚拟的草履虫，首先随机初始化它在图像中所处的位置、运动方向和运动速度，并逐帧生成虚拟草履虫的运动轨迹。在这条运动轨迹上添加一些随机性，如速度的随机变化和运动方向的随机偏转等，再叠加一个布朗运动，即为一个虚拟草履虫的最终运动轨迹。实验中，虚拟草履虫数量为240条，通过对比真实草履虫在相机中的尺寸，将虚拟草履虫直径设置为2 pixel。

1.3.2 虚拟刺激下斑马鱼捕食实验

在活动场上方，放置手机屏幕，通过spacedesk软件，将电脑屏幕内容复制到手机的高分辨率屏幕上，调节视觉刺激窗口位置，使之正好

覆盖住斑马鱼活动场，开始实验。实验分为空白期I (Blank I)、训练期 (Training)、空白期II (Blank II)、测试期 (Test) 4个阶段 (图2)。

a. 空白期I: 提供无虚拟草履虫的空白背景，让斑马鱼熟悉环境并进行自由探索，持续时间1 min。

b. 训练期 (Training): 通过屏幕提供虚拟草履虫图像刺激，持续时间25 min。

c. 空白期II: 同空白期I，让斑马鱼能够休息，为Test期做准备，持续时间5 min。

d. 测试期 (Test): 给予斑马鱼和Training期相同的视觉刺激，持续时间10 min。

1.3.3 对照实验

对照组刺激条件和实验组类似，只将Training时期的虚拟草履虫刺激改为空白背景。

1.3.4 斑马鱼捕食真实草履虫实验

将虚拟刺激实验的屏幕移除，使用红外LED灯照明。首先将斑马鱼置于黑暗环境中20 min，同时添加真实草履虫，检验在黑暗环境中斑马鱼对于草履虫的捕食情况。然后使用白光将环境照亮，使得斑马鱼可以看见草履虫，检验这种情况下斑马鱼对于草履虫的捕食情况。

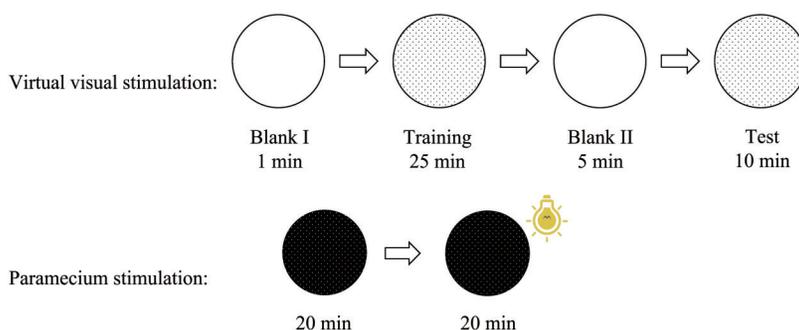


Fig. 2 Behavioral paradigm for virtual paramecium presentation

The black and white dots indicate paramecium in light and dark environments, respectively.

1.4 斑马鱼行为分析

1.4.1 头部信息提取

为了分析斑马鱼双眼汇聚角度和运动距离变化，首先需要提取斑马鱼头部关键位置信息。头部信息由自主编写的C++程序提取。主要分为背景建模、幼鱼检测、头部和眼部关键点识别3部分。

a. 背景建模: 图像中幼鱼所占的面积较小，且幼鱼可活动区域很大，背景变化不明显，故采用平均背景建模。取视频前3 000帧的平均图像作为背

景，并随分析的进行，每10帧更新一次背景。如果幼鱼长时间不动，则不更新背景，防止幼鱼被背景减除减掉。

b. 幼鱼检测: 将减背景之后的图像二值化处理后，提取所有区域的轮廓，将所有轮廓中最长轮廓判定为幼鱼。若最长轮廓长度与该日龄段幼鱼的平均轮廓长度差距过大，则认为该帧检测失败，采用上一帧的轮廓作为幼鱼，轮廓的重心为幼鱼在图像中的位置。

c. 头部关键点提取: 使用基于卷积神经网络的关键点检测工具 DeepLabCut^[18-19] 训练了一个神经网络作为关键点检测器。由于整个图像较大 (896 pixel×896 pixel), 检测到幼鱼重心位置后, 以该点为中心, 取 140 pixel×140 pixel 大小的感兴趣区域 (ROI) 作为网络输入, 以降低处理所需时间。网络输出为头部 (head) 和尾部 (tail) 的坐标和对应的置信度, 如果置信度低于 0.95, 即认为这一帧检测失败, 使用上一帧检测的结果 (图 3a)。

d. 眼部关键点提取: 以头部坐标为中心取 50 pixel×50 pixel 的 ROI, 为提高检测精度, 将图像放大至 750 pixel×750 pixel, 作为第 2 个 DeepLabCut 神经网络的输入。网络输出为 4 个眼部关键点, 左眼最前方 (left eye anterior, lea)、左眼最后方 (left eye posterior, lep)、右眼最前方 (right eye anterior, rea)、右眼最后方 (right eye

posterior, rep) (图 3a)。

上述检测信息储存在 .yaml 文件中用于后续分析。斑马鱼头部信息提取程序可以在 <https://github.com/Wenlab/virtual-visual-stimulus> 获得。

1.4.2 双眼汇聚界定

根据 Bianco 等^[14] 的研究成果, 斑马鱼在进行捕食时双眼汇聚角度会从 20° 提高到 57°, 还会发生 J-turn 或者类似的小幅摆尾, 摆尾幅度在 10°~20° 之间, 因此将捕食行为判定为: 在双眼汇聚的前提下, 发生 J-turn 或者小幅摆尾行为。本研究将斑马鱼左、右眼睛前后端连线记为视线方向, 分别为连接左眼最前端和最后端的左视线 (left line, LL) 和连接右眼最前端和最后端的右视线 (right line, RL), 两线夹角为汇聚角 (convergence angle, CA), 汇聚角超过 40° 判定为汇聚, 汇聚时长为汇聚角在 40° 及以上的时间 (图 3b)。

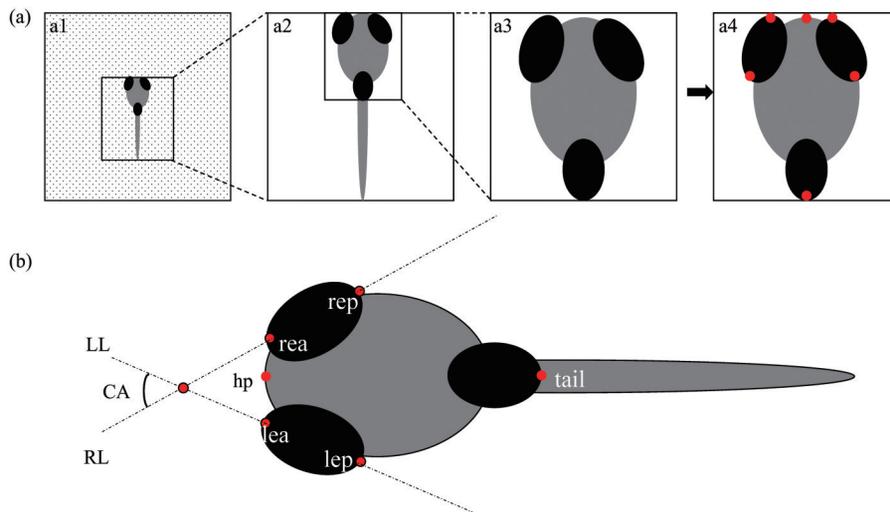


Fig. 3 Behavioral analysis of larval zebrafish

(a) Extraction of head and eye coordinates: a1, original image; a2, identify zebrafish from background; a3, extract head contour; a4, anchor points on zebrafish head and eyes are marked. (b) Identification of head and eye movements: lea, left eye anterior; hp, head position; rea, right eye anterior; lep, left eye posterior; rep, right eye posterior; LL, left line; RL, right line; CA, convergence angle.

1.4.3 疲劳性检验

通过比较斑马鱼 Training 时期和 Test 时期, 单位时间内的运动距离判断斑马鱼疲劳与否。由于已经通过头部信息提取, 得到斑马鱼头部位置坐标 (hp), 因此可以通过头部位置坐标的变化轨迹得到斑马鱼的运动距离。若 Test 时期, 运动距离显著变短, 则认为斑马鱼后期疲劳, 否则认为斑马鱼在整个实验期间没有疲劳。

1.5 统计学分析

1.5.1 双眼汇聚显著性检验

在进行统计学分析时, 首先使用 MATLAB 软件的 rmoutliers 函数做异常值判断, 并将离群值定义为超过 3 倍经过换算的中位数绝对偏差 (median absolute deviation, MAD) 的值, 排除异常数据, 然后通过秩和检验计算显著性和标准误。

1.5.2 捕食行为显著性检验

按照之前描述的对捕食行为界定的标准, 从已

经检测出双眼汇聚的视频中，筛选出发生捕食行为的游泳回合，统计捕食次数、所在游泳回合双眼汇聚时长的显著性差异，及其随日龄的变化情况，通过秩和检验计算显著性和标准误。

2 结 果

2.1 虚拟视觉刺激可以引起斑马鱼捕食行为

通过对比斑马鱼对真实草履虫的捕食行为，发

现斑马鱼面对虚拟刺激时可以表现出相同的双眼变化和摆尾行为，虚拟刺激可以引起斑马鱼捕食行为。草履虫和斑马鱼的相对位置的不同，捕食行为也有差异：当草履虫距离斑马鱼较近，位置更靠近鼻侧，斑马鱼的摆尾幅度更小，反之则摆尾幅度更大。图4展示了斑马鱼受到虚拟刺激时产生的捕食行为。通过统计不同日龄斑马鱼在发生双眼汇聚时进行捕食的概率，发现虚拟刺激诱发的斑马鱼捕食概率为22%~36%（表1）。

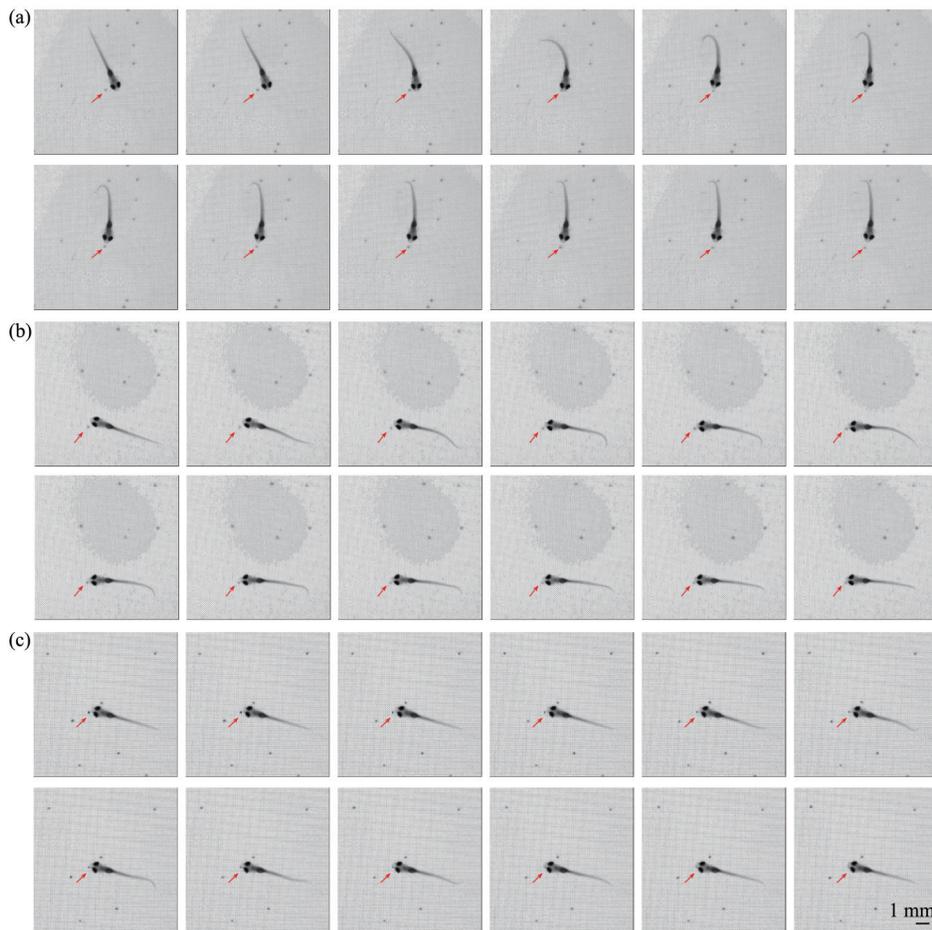


Fig. 4 Predatory behavior of zebrafish in the presence of virtual stimuli

(a, b) Predatory behavior with J-turn. (a) The paramecium was on the temporal side, and the zebrafish made a large tail swing. (b) The paramecium was on the nasal side, and the tail swing is smaller. (c) Predatory behavior with a small tail swing, but not J-turn. Each image represents one frame. The interval between two frames is 10 ms, the red arrows indicate the location of the paramecium.

Table 1 Predatory probability of zebrafish under eye convergence condition

	Time						
	6 dpf	7 dpf	8 dpf	9 dpf	10 dpf	11 dpf	12 dpf
Number of eye convergence	942	1068	791	766	697	632	556
Number of predatory behaviors	238	233	233	203	237	229	181
Predation probability	25%	22%	29%	27%	34%	36%	33%

Predation probability is the ratio of the number of predatory behaviors to the number of eye convergence. 6 dpf, 7 dpf, 8 dpf, 9 dpf, $n=20$; 10 dpf, $n=21$; 11 dpf, $n=23$; 12 dpf, $n=18$.

2.2 斑马鱼双眼汇聚次数和时长随时间下降

为了探究 25 min 虚拟视觉刺激对于斑马鱼捕食行为的影响, 对斑马鱼眼部关键点位置坐标进行提取, 得到左右眼视线方向并计算双眼汇聚角度,

将双眼汇聚角度超过 40° 判定为发生双眼汇聚, 统计了不同日龄斑马鱼在 Training 时期和 Test 时期平均 10 min 的双眼汇聚次数和平均汇聚时长 (图 5)。

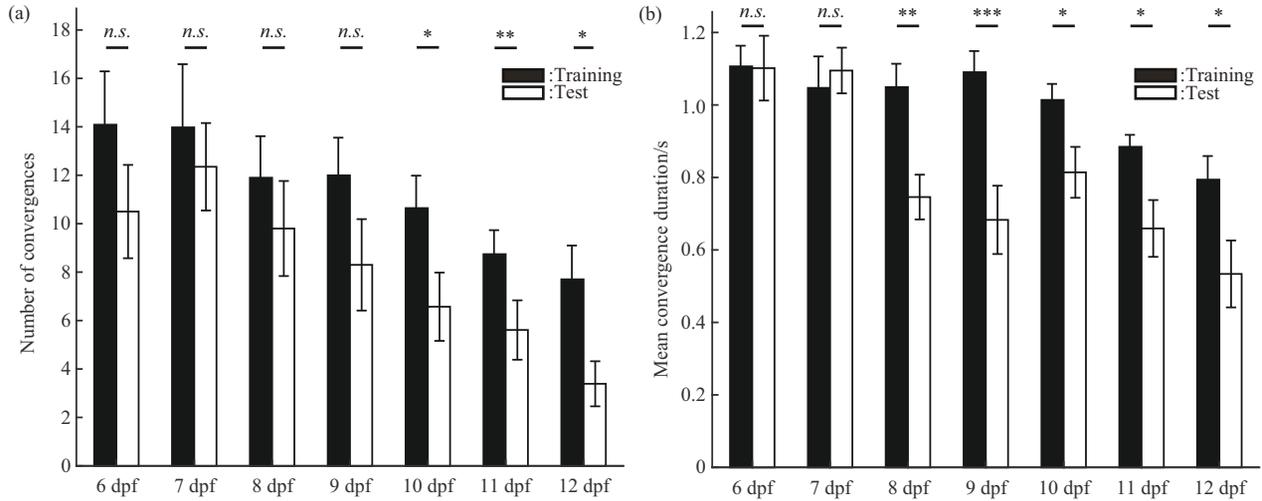


Fig. 5 Changes in the number of convergence and average convergence duration with fish ages during training and test periods

(a) Changes in the number of convergences with zebrafish ages during the training and test periods. (b) Changes in the mean convergence duration with zebrafish ages during the training and test periods. n.s. no significance, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. 6 dpf, 7 dpf, 8 dpf, 9 dpf, $n=20$; 10 dpf, $n=21$; 11 dpf, $n=23$; 12 dpf, $n=18$. The error bars show the standard error of the mean (SEM).

统计结果表明, 从 10 dpf 开始, 斑马鱼在 Test 时期的汇聚次数相比 Training 时期显著下降, 而平均汇聚时长的显著性下降早在 8 dpf 就开始显现, 显著性都不随着斑马鱼日龄的增长而增长。

因此, 在给予 25 min 的移动光点虚拟视觉刺激之后, 幼年斑马鱼确实可以表现出对于这种刺激响应减弱, 汇聚次数的减少落后平均汇聚时长的缩短 2 d。

2.3 斑马鱼捕食次数和平均汇聚时长随时间下降

双眼汇聚是进行捕食的前提条件, 并不意味着捕食行为的发生。因此为了比较斑马鱼捕食行为的差异, 需要将捕食行为从汇聚行为中筛选出来。本文进行了两种尝试, 首先参照已有的研究成果, 对斑马鱼的游泳回合进行分类, 找到捕食相关的游泳回合^[20], 然而该方法在本研究中并未达到文献中描述的效果, 因此决定将斑马鱼发生双眼汇聚的时段从视频中筛选出来, 通过人工对比斑马鱼捕食真实和虚拟草履虫行为相似性, 筛选出发生捕食行为的游泳回合, 进行统计分析。

图 6 反映的是不同日龄斑马鱼在不同时期的捕食次数和平均汇聚时长的变化情况。可以看出, 斑

马鱼从 8 dpf 开始, 相比 Training 时期, Test 期的捕食次数和平均汇聚时长出现显著性下降, 捕食次数比汇聚次数提前两天表现出显著性下降。而正是从此时开始, 斑马鱼捕食次数和平均双眼汇聚时长变化时间一致。由此可知, 随着日龄的增长, 斑马鱼在经历过 25 min 虚拟视觉刺激之后, 更少的可能会进行捕食。

2.4 斑马鱼捕食行为减少由虚拟刺激引起

斑马鱼自由行为结果显示, 捕食行为不仅仅发生在面对虚拟刺激时。当斑马鱼面前有杂质、气泡或者甚至在空白背景下, 也会出现捕食行为。

为了排除斑马鱼自发行为对实验的影响, 做了黑暗环境下捕食真实草履虫实验。在实验前期, 活动场中只通过红外光进行照明, 斑马鱼不具有红外视觉, 相当于处在黑暗环境中, 无法观察到草履虫, 而斑马鱼和草履虫可以同时被相机记录下来, 捕食行为可以被实验人员直接观察到。实验后期, 通过在活动场中提供额外的白光照明, 草履虫对于斑马鱼清晰可见, 斑马鱼可以进行正常捕食行为。结果显示, 无白光照明的黑暗环境中, 斑马鱼没有出现捕食行为, 在有白光照明的环境中, 斑马鱼发

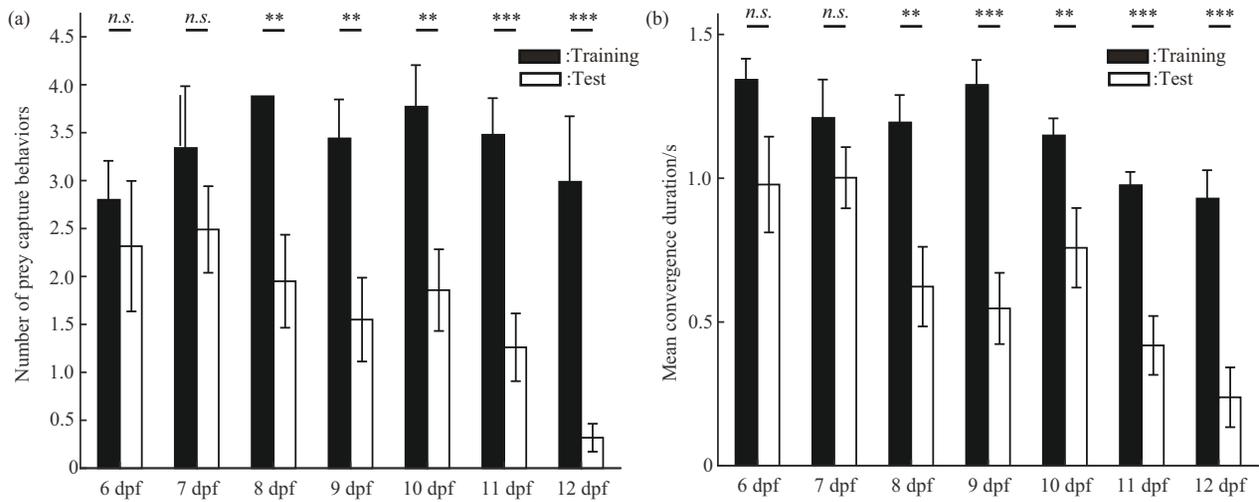


Fig. 6 Changes in the number of hunting behaviors and the corresponding average convergence duration with zebrafish ages during training and test periods

(a) Changes in the number of prey capture behaviors with zebrafish ages during the training and test periods. (b) Changes in the mean convergence duration with zebrafish ages during the training and test periods. *n.s.* no significance, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

生捕食草履虫的行为 (图7), 由此证明虚拟刺激实验中, 空白背景下斑马鱼的捕食行为不是自发行

为, 而是斑马鱼对未被相机记录的杂质产生了捕食行为。

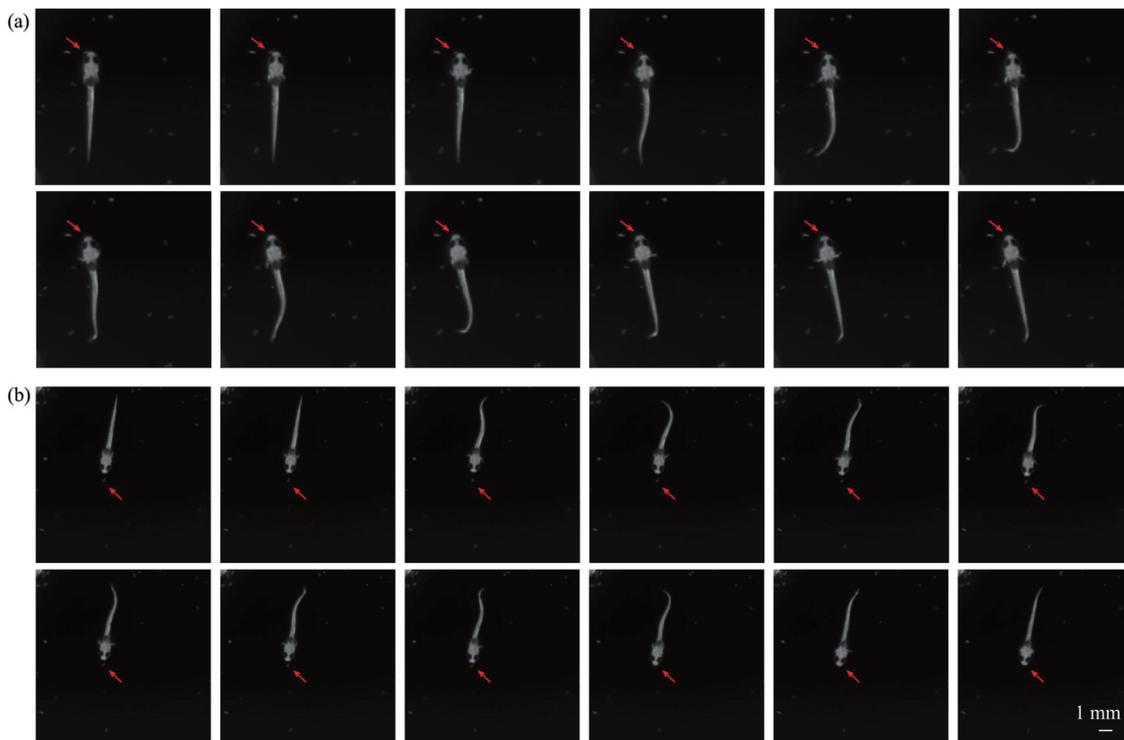


Fig. 7 Zebrafish predatory-like behavior in an environment illuminated by white light

(a) Predatory behavior with J-turn. (b) Predatory behavior with a small tail swing, but not J-turn. Each image represents one frame. The interval between two frames is 10 ms. The red arrows indicate the location of the paramecium.

为了分析空白背景下斑马鱼捕食行为对结果的影响, 设置对照实验。将 Training 时期提供的虚拟草履虫改为空白背景进行训练, 再比较测试期斑马鱼对虚拟刺激响应情况。结果如图 8 所示,

25 min 空白背景没有使斑马鱼表现出捕食行为的下降, 部分日龄的斑马鱼表现出捕食行为的显著上升。

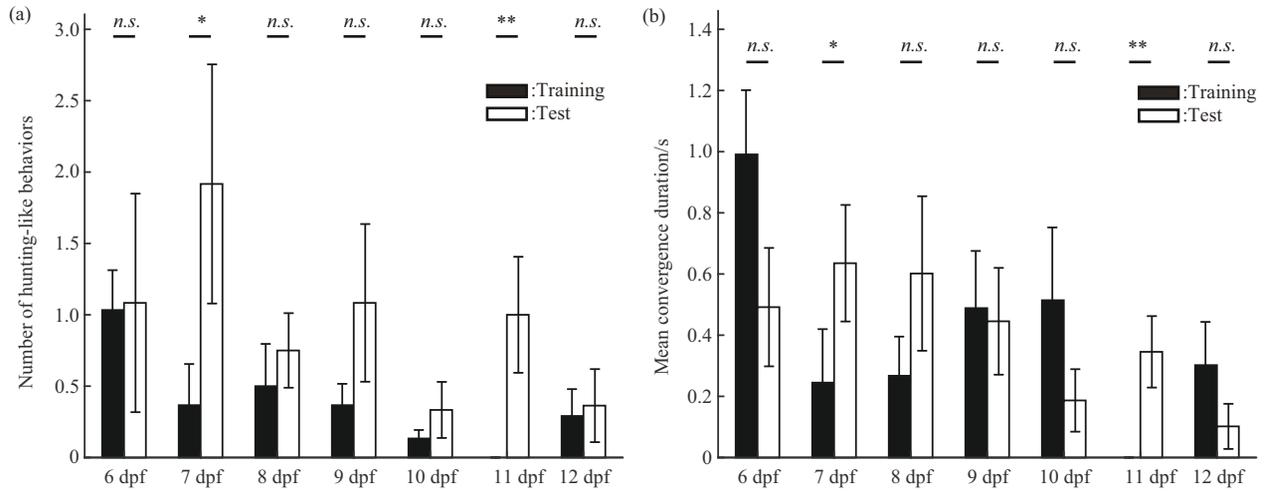


Fig. 8 Statistics of hunting-like behaviors in an environment without virtual paramecium

(a) Changes in the number of hunting-like behaviors with zebrafish ages during the training and test periods. (b) Changes in the mean convergence duration with zebrafish ages during the training and test periods. *n.s.* no significance, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

在排除了这些背景因素下发生的捕食行为之后, 虚拟刺激引起的斑马鱼捕食行为结果如图 9 所示。可以看出, 虚拟刺激引起的斑马鱼的捕食次数

和平均捕食时长都从 8 dpf 开始出现显著性下降。因此, 斑马鱼捕食行为减少是虚拟刺激引起的。

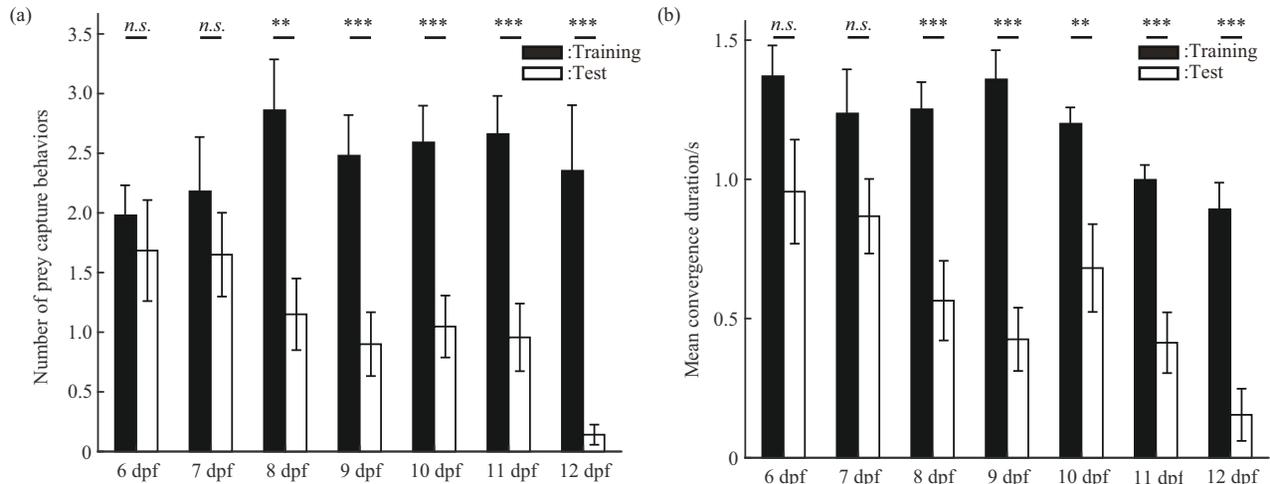


Fig. 9 Statistics of prey capture behaviors in response to virtual paramecium

(a) Changes in the number of prey capture behaviors with zebrafish ages during the training and test periods, only those triggered by virtual paramecium were counted. (b) Changes in the mean convergence duration with zebrafish ages during the training and test periods. *n.s.* no significance, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.5 斑马鱼捕食次数下降不是受疲劳的影响

为了排除疲劳对于实验结果的影响,统计了不同时期斑马鱼的头部运动距离,比较了相同时间内斑马鱼运动距离差异。结果如图10所示,实验组

和对照组(区别在于Training时期提供虚拟草履虫还是空白背景),Training时期和Test时期斑马鱼运动距离没有显著性差异,因此斑马鱼捕食行为减少与疲劳无关。

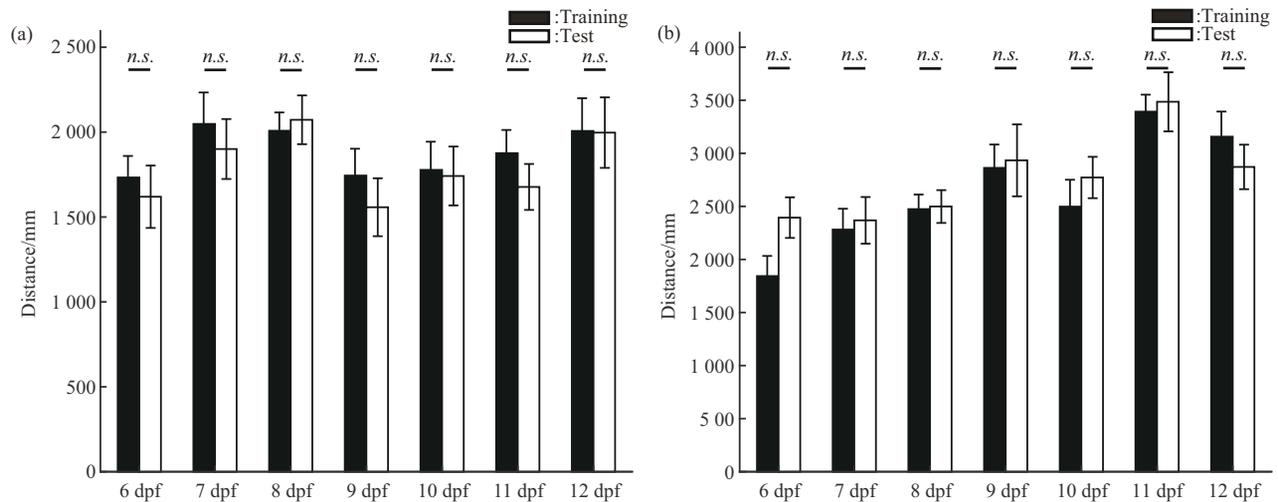


Fig. 10 Statistics of zebrafish locomotion with ages during training and test periods

(a) Experimental group. (b) Control group. Distance is defined as the total moving distances. n.s. no significance.

3 讨论

随着虚拟视觉刺激在斑马鱼行为及其神经机制研究中的应用,该方法已经逐渐成为研究斑马鱼视觉相关行为的重要方式。本研究通过虚拟食物刺激,引起斑马鱼的捕食行为。对于一个持续时间25 min,且没有奖励反馈的虚拟食物,斑马鱼会减少对其捕食,这种现象最早在斑马鱼8 dpf的时候开始显现,且捕食行为的减少和疲劳因素无关,是一种奖励缺失引起的放弃。

3.1 虚拟食物刺激可以引起斑马鱼捕食行为的减少

在本实验中,提供虚拟刺激的是一块428 ppi的手机屏幕。由于屏幕紧贴着斑马鱼活动场,不得不考虑发热问题。相比于其他屏幕,这种手机屏幕的发热之小是其他商业屏幕无法比拟的。相比于投影仪,这块屏幕提供的虚拟草履虫分辨率更高,草履虫图像更加清晰,形态大小和真实草履虫更加接近。结合Bianco等^[14]在虚拟食物刺激实验中的判定标准,同时参考斑马鱼对真实草履虫的捕食行为,实验中对于斑马鱼捕食行为的判定更加准确。本实验排除了斑马鱼在空白背景和面对杂质、气泡等产生的捕食行为,确保了所有被统计的捕食行为

都是虚拟刺激引起的。同时,本实验也探讨了斑马鱼的捕食行为是否是自发行为,以及非虚拟刺激下的捕食行为对于本实验结论可能造成的影响。结果验证了一开始的猜想,即在空白背景下斑马鱼发生的捕食行为,是由于斑马鱼看到了一些相机无法记录下来的物质。而这种空白背景因素并不影响准确结果的得出,虚拟视觉刺激引起的捕食行为使斑马鱼产生放弃。

3.2 斑马鱼的捕食行为减少是奖励缺失引起的

之前关于放弃的研究主要聚焦于厌恶刺激或者中性刺激引起的动物行为,如电击使狗希望摆脱被电击的环境,适应视动反应(optomotor responses, OMR)环境的斑马鱼由于无法通过尾部摆动引起环境变化而放弃。但是放弃行为不仅包括上述现象,多次尝试获得奖励而失败,同样可以引起斑马鱼的放弃。相比于前两种刺激,这种刺激之所以能够引起斑马鱼的行为,是斑马鱼因为饥饿而主动靠近食物的结果。本实验中,虚拟的食物既不能根据斑马鱼的行为提供运动反馈,又不能真正让斑马鱼获得食物奖励。因此,这是一种无法提供真实奖励的奖励刺激,即奖励缺失引起的刺激。

本实验将相同日龄的斑马鱼作为一个整体进行分析,并没有分析单个斑马鱼在Training时期和

Test时期的变化情况, 在这里就会产生一个问题: 单个斑马鱼是否随着受到刺激次数的增加, 而表现出更少的捕食行为? 行为学数据表明, 斑马鱼对于虚拟刺激的捕食情况, 具有明显的个体差异。斑马鱼可能在整个实验中都不会发生捕食行为, 也可能在 10 min 内发生多达 10 次捕食行为。就发生捕食行为的时间序列看, 斑马鱼的捕食行为既可能在整个实验周期均匀分布, 又可能集中在 5 min 之内, 其他时间基本不发生。由于实验中提供的 240 个虚拟食物是随机分布在活动场中的, 平均每 2 mm² 即有一个虚拟食物, 而斑马鱼可以注意到自身视野 3 mm 范围以内的物体, 因此理论上斑马鱼一直受到食物刺激。为了量化斑马鱼受刺激情况, 比较了不同时期每 10 min 斑马鱼双眼 3 mm 半径内没有虚拟食物的时间, 都在 40~60 s 之间且没有显著差异, 因此认为不同时期斑马鱼受刺激情况相同, 而是否发生捕食行为则取决于斑马鱼的个体差异。Bianco 等^[14] 的实验结果也表明, 虚拟视觉刺激引起的斑马鱼捕食行为概率为 22%, 因此将单个斑马鱼受到虚拟食物刺激的次数, 作为评判斑马鱼是否产生放弃的标准, 似乎并不完美。所以本实验将相同日龄的斑马鱼作为整体进行统计分析, 而不区分每条斑马鱼受到刺激的次数对于其放弃的影响。

4 展 望

目前关于动物放弃行为的研究, 主要从习得性无助入手, 通过实验探究并构建相关理论, 揭示背后的神经环路机制。预先物理损毁杏仁核的中缝背核 (dorsal raphe nucleus, DRN) 脑区的动物, 在经历过电击后无法出现逃避缺陷 (逃避次数减少或反应时间增加)^[21-23]。习得性无助的动物, DRN 脑区五羟色胺能神经元基因表达水平比正常动物更高^[24-26], 其无法通过激活腹内侧前额叶到 DRN 脑区的谷氨酸能神经元调节逃避行为^[27]。因此最新理论认为, 学习行为激活腹内侧前额叶中的谷氨酸能神经元, 下行投射到杏仁核的 DRN 脑区, 抑制该区域五羟色胺能神经元的活动, 使动物在习得性无助实验中表现出正常的逃避行为^[28]。

以往主要通过厌恶刺激诱发的习得性无助研究动物放弃行为, 集中在对于五羟色胺能神经元的研究^[23], 而多巴胺能神经元对于厌恶刺激敏感度较低^[29], 因此对于多巴胺能神经元在奖励刺激相关放弃行为中作用的研究较少。奖赏预测错误 (reward prediction error) 理论认为, 多巴胺能神经

元编码动物对于奖励的预期^[30-32]。如果奖励高于预期, 则多巴胺能神经元活动增强, 反之, 则多巴胺能神经元活动被抑制。面对需要被动应对的厌恶刺激和需要主动应对的偏好刺激, 伏隔核的多巴胺释放也存在差异^[33]。相信随着虚拟食物刺激引起的捕食行为下降在斑马鱼中被发现, 多巴胺系统在动物面对奖励缺失引起放弃行为中的功能也将被更加全面地揭示, 这将对全面理解动物放弃行为提供借鉴。

关于习得性无助的研究也发现, 通过视动反应引起的斑马鱼习得性无助行为, 涉及内侧纵向束到后脑运动神经元中的去甲肾上腺素能神经元和星形胶质细胞的作用^[34]。最新的自由行为斑马鱼全脑成像平台, 可以实现对斑马鱼实时行为追踪和全脑钙活动成像^[35]。通过分子生物学技术构建特定神经元表达品系, 借助该平台研究斑马鱼在经历 25 min 虚拟食物刺激前后的全脑神经活动, 可以揭示奖励缺失引起的斑马鱼放弃行为中, 不同类型神经元的作用, 从而构建起对于不同类型神经元在动物放弃行为中功能的全面理解。

5 结 论

本研究通过搭建自由行为斑马鱼虚拟食物刺激平台, 对斑马鱼响应虚拟刺激的行为进行了分析。首先验证了本平台可以引起斑马鱼的捕食行为。接着通过比较刺激前后斑马鱼对于虚拟食物的捕食行为变化, 发现经过刺激处理的斑马鱼会表现出对虚拟食物汇聚次数减少、汇聚时长缩短以及捕食次数减少、捕食时长缩短的行为。接着通过黑暗环境下对真实草履虫的捕食行为成像和空白背景对照实验, 验证了斑马鱼的捕食行为不是自发行为, 而且空白背景对斑马鱼的捕食行为的下降并不产生影响, 从而证明了斑马鱼捕食行为的下降确实是虚拟食物刺激导致的。本研究构建了奖励缺失下斑马鱼放弃行为的研究范式, 对奖励缺失条件下斑马鱼放弃行为的深入研究提供了一种研究方式和思路。

参 考 文 献

- [1] Seligman M E, Maier S F. Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol*, 1967, **74**(1): 1-9
- [2] Dinges C W, Varmon C A, Cota L D, *et al.* Studies of learned helplessness in honey bees (*Apis mellifera ligustica*). *J Exp Psychol Anim Learn Cogn*, 2017, **43**(2): 147-158
- [3] Batsching S, Wolf R, Heisenberg M. Inescapable stress changes walking behavior in flies—learned helplessness revisited. *PLoS*

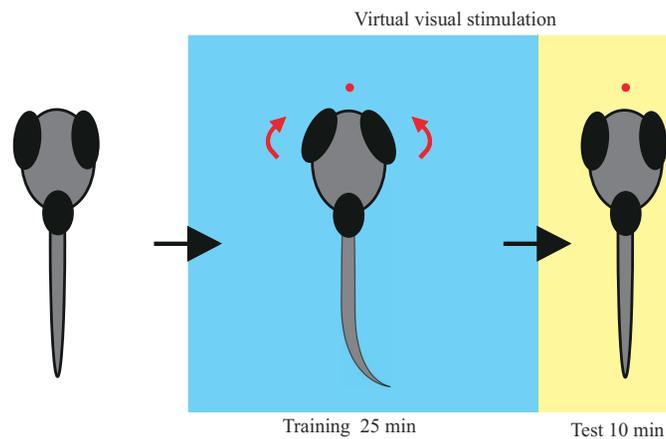
- One, 2016, **11**(11): e0167066
- [4] Kim J Y, Yang S H, Kwon J, *et al.* Mice subjected to uncontrollable electric shocks show depression-like behaviors irrespective of their state of helplessness. *Behav Brain Res*, 2017, **322**(Pt A): 138-144
- [5] Nascimento G, Walsh-Monteiro A, Gouveia A Jr. A reliable depression-like model in zebrafish (*Danio rerio*): learned helplessness. *Psychol Neurosci*, 2016, **9**(3): 390-397
- [6] Yang Z, Bertolucci F, Wolf R, *et al.* Flies cope with uncontrollable stress by learned helplessness. *Curr Biol*, 2013, **23**(9): 799-803
- [7] 杨继华, 胡鹏博, 刘力, 等. 果蝇习得性无助影响空间位置记忆. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(5): 937-948
Yang J H, Hu P B, Liu L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(5): 937-948
- [8] Maier S F, Watkins L R. Stressor controllability, anxiety, and serotonin. *Cognitive Ther Res*, 1998, **22**(6): 595-613
- [9] Salamone J D, Correa M, Yohn S, *et al.* The pharmacology of effort-related choice behavior: dopamine, depression, and individual differences. *Behav Processes*, 2016, **127**: 3-17
- [10] Howe H B, McIntyer P B, Wolman M A. Adult zebrafish primarily use vision to guide piscivorous foraging behavior. *Behav Processes*, 2018, **157**: 230-237
- [11] Muto A, Kawakami K. Calcium imaging of neuronal activity in free-swimming larval zebrafish. *Methods Mol Biol*, 2016, **1451**: 333-341
- [12] Muto A, Kawakami K. Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Front Neural Circuits*, 2013, **7**(110): 110
- [13] Mcelligott M, O'malley D. Prey tracking by larval zebrafish: axial kinematics and visual control. *Brain Behav Evol*, 2005, **66**(3): 177-196
- [14] Bianco I H, Kampff A R, Engert F. Prey capture behavior evoked by simple visual stimuli in larval zebrafish. *Front Syst Neurosci*, 2011, **5**(101): 101
- [15] Avitan L, Pujic Z, Mölter J, *et al.* Spontaneous and evoked activity patterns diverge over development. *Elife*, 2021, **10**: e61942
- [16] Babkiewicz E, Bazala M, Urban P, *et al.* The effects of temperature on the proxies of visual detection of *Danio rerio* larvae: observations from the optic tectum. *Biol Open*, 2020, **9**(7): bio047779
- [17] Bianco I H, Engert F. Visuomotor transformations underlying hunting behavior in zebrafish. *Curr Biol*, 2015, **25**(7): 831-846
- [18] Mathis A, Mamidanna P, Cury K M, *et al.* DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci*, 2018, **21**(9): 1281-1289
- [19] Nath T, Mathis A, Chen A C, *et al.* Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat Protoc*, 2019, **14**(7): 2152-2176
- [20] Marques J C, Lackner S, Felix R, *et al.* Structure of the zebrafish locomotor repertoire revealed with unsupervised behavioral clustering. *Curr Biol*, 2018, **28**(2): 181-195. e185
- [21] Maier S F, Grahn R E, Kalman B A, *et al.* The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav Neurosci*, 1993, **107**(2): 377-388
- [22] Andalman A S, Burns V M, Lovett-Barron M, *et al.* Neuronal dynamics regulating brain and behavioral state transitions. *Cell*, 2019, **177**(4): 970-985. e920
- [23] Amo R, Fredes F, Kinoshita M, *et al.* The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron*, 2014, **84**(5): 1034-1048
- [24] Graeff F G, Guimarães F S, De Andrade T G, *et al.* Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996, **54**(1): 129-141
- [25] Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, *et al.* Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*, 2019, **44**(4): 721-732
- [26] Herculano A M, Maximino C. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: towards a paradox. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, **55**: 50-66
- [27] Maier S F. Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. *Neurobiol Stress*, 2015, **1**: 12-22
- [28] Maier S F, Seligman M E. Learned helplessness at fifty: insights from neuroscience. *Psychol Rev*, 2016, **123**(4): 349-367
- [29] Fiorillo C D. Two dimensions of value: dopamine neurons represent reward but not aversiveness. *Science*, 2013, **341**(6145): 546-549
- [30] Schultz W, Dayan P, Montague P R. A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 1997, **275**(5306): 1593-1599
- [31] Bayer H M, Glimcher P W. Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal. *Neuron*, 2005, **47**(1): 129-141
- [32] Stauffer W R, Lak A, Kobayashi S, *et al.* Components and characteristics of the dopamine reward utility signal. *J Comp Neurol*, 2016, **524**(8): 1699-1711
- [33] Cabib S, Puglisi-Allegra S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neurosci Biobehav R*, 2012, **36**(1): 79-89
- [34] Mu Y, Bennett D V, Rubinov M, *et al.* Glia accumulate evidence that actions are futile and suppress unsuccessful behavior. *Cell*, 2019, **178**(1): 27-43. e19
- [35] Cong L, Wang Z, Chai Y, *et al.* Rapid whole brain imaging of neural activity in freely behaving larval zebrafish (*Danio rerio*). *Elife*, 2017, **6**: e28158

Giving up Prey Capture Behavior in Zebrafish Larvae Induced by Virtual Visual Stimuli*

ZHANG Xiang-Yu, CHAI Yu-Ming, QI Ke-Xin**, WEN Quan**

(Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Giving up arises when an animal repeats a behavior to avoid danger or to obtain reward without success. It is a common and fundamental behavior that has been extensively studied in model animals such as mice, but the underlying neural mechanisms have not yet been well elucidated. Zebrafish larvae are important model organisms in neuroscience due to their suitability for whole brain imaging. Negative stimuli such as continuous electric shock have been used to induce giving up behavior in zebrafish, however, whether reward stimuli can induce giving up in zebrafish has not been reported. **Methods** By presenting larval zebrafish visual stimuli of paramecium, the hunting behavior of zebrafish on virtual food was examined, and the changes of the zebrafish predation frequency and predation duration over time were compared. **Results** Virtual visual stimulation of food can induce the predatory behavior of zebrafish. After receiving virtual stimuli for 25 min, the predation frequency and single predation duration of over 8 days post fertilization (dpf) zebrafish decreased significantly. **Conclusion** Our study enriches the paradigm of zebrafish give up behavior. The experimental results show that virtual food stimuli lacking real rewards can induce zebrafish to abandon predation. The current behavioral paradigm provides a new method to study animal give up behavior and the underlying neural mechanisms.

Key words zebrafish larvae, give up behavior, prey capture behavior

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0318

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32071008).

** Corresponding author.

QI Ke-Xin. Tel: 86-551-63606857, E-mail: kexinqi@mail.ustc.edu.cn

WEN Quan. Tel: 86-551-63606857, E-mail: qwen@ustc.edu.cn

Received: July 9, 2022 Accepted: August 31, 2022