

证候表型组学的理论问题与应用构想

魏盛^{1,2}, 孙鹏^{1,2}, 王杰琼¹, 宋春红¹, 陈刚³, 陈家旭⁴, 乔明琦^{*}

(1. 山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室, 山东省济南市长清区大学科技园大学路 4655 号, 250355; 2. 山东中医药大学脑行为分析实验室; 3. 南京中医药大学中医脑病研究重点实验室; 4. 北京中医药大学基础医学院)

摘要 动物行为分析是判定模型动物证候归属并理解中医证本质的核心关键技术。通过对现代动物行为学思路和方法进展的梳理与总结, 提出证候/病证结合动物模型行为评价中的证候表型组学概念。通过分析这一学科领域中的若干关键理论问题, 提出证候表型组学技术应用于中医药领域的若干构想, 包括基因操纵技术的联合应用有望带来学科领域的大发展、长时程行为监控笼具是未来动物行为分析的可能趋势、对动物模型行为的结构分析有助于更好地理解证候表征的复杂内涵, 为解决动物模型的证候属性判别、揭示中医证候的复杂内涵提供思路与方法。

关键词 证候表型组学; 动物模型; 行为分析; 行为表征技术; 中医证型

目前突变系动物模型的建立及中枢神经系统药物的开发都要求对动物进行大量临床前行为评估, 然而动物行为分析却仍处于进展缓慢阶段。“证候”作为中医理论基点和核心被定为一组互有联系的症状和体征组合, 而对所制备动物模型进行“辨证分型”“对证用药”都离不开对模型动物行为表征的精细量化和分析。目前, 虽然行为表征技术在分子遗传学等领域已得到广泛应用, 但传统动物行为分析手段效率低下且工作量大, 无法胜任解释动物行为复杂内涵的要求^[1]。近年来出现的各种复杂和快速行为表征工具有望从概念和技术上扩展传统行为分析的视角, 也给中医证候/病证结合动物模型证候判别提供了方法。

1 证候表型组学概念的提出及论证

一般认为, 大脑的最终功能输出是行为, 因此行为分析有可能揭示任何环路或任何脑的神经生物学过程的功能改变^[2], 然而诸多实际操作上的问题限制了行为表征技术的有效性。通常动物的行为测试耗时巨大, 操作人员经常应用数量极其有限的行为测试技术过多关注行为的特定方面, 这样做的后果使有助辨别模型动物证候属性的行为信息采集不全或引起信息偏倚, 造成错误解读, 极大限制了行为分析技术辨识模型证候属性的应用。目前越来

越多的实验人员认为用于评价模型最好是采用一组行为测试^[3]。那么评价模型到底要用多少数量行为测试呢? 这些行为测试又应包含哪些种类呢? 尤其是对于现今日渐流行的基因突变动物模型, 复杂突变系动物可诱导不可预知的脑功能改变, 而运用有限行为测试无法捕获完整行为轮廓。更为复杂的是, 动物的行为表型(演出型)是基因型和环境型交互作用的呈现, 考虑到基因型和环境型影响因子的复杂程度, 无法也不必揭示模型动物的完整表型。因此, 对判定模型证候属性所必须进行的行为测试的数量进行妥协是必要的。事实上, 神经科学领域有一些行为测试组方法已逐步得到公认, 如 CANTAB (the cambridge neuropsychological test automated battery) 系统包含了一些巧妙设计的计算机化行为范式, 允许用户比较多个物种的行为^[4]。如何组织和设计测试组其焦点则在于是否要用标准的或专门设计的测试^[5-7]。标准化的好处是便于各个实验室间进行结果比对分析^[8], 但标准化测试的固化程序却又不利于评估特定基因的独特遗传学效应^[9]。基于此, 最终达成的共识认为应用行为组测试应包含标准化测试作为参照基准点, 也应包含有创造性思维的特殊设计的其他行为测试方法^[8]。但仍有大量问题^[8]有待探讨, 如行为测试组中各种测试的顺序如何影响行为测试结果? 一种测试是否会干扰另一种测试? 此外, 各实验室独特的环境因素和受试主体基因型间相互作用也受到了

基金项目: 国家自然科学基金(81573854)

* 通讯作者: qmingqi@163.com, (0531) 89628595

广泛关注^[8]，且已有研究指出行为测试中假阳性或假阴性结果应归因于不恰当的实验室环境和/或受试对象遗传背景控制^[10-11]。最后，还应从动物生态学及生物利用角度增进对个体生态相关行为范式的理解^[12-14]，这样做的好处是可以催生更多的具有实用价值的概念上的行为测试范式^[13]，促进学科进步。尽管还存在争议，行为测试组思路为全面、精细描述动物行为表型提供了合理的方法。

基于以上理论分析，证候表型组学可定义为：采用特定的行为测试组技术进行动物行为表型描计用以判断模型动物证候属性的理论及技术的综合学科。其所涵盖的学科门类包括动物生态学、动物行为学、行为分析学、行为药理学、中药药理学、神经生理学、心理生理学等。构成证候表型组学技术支撑的行为测试组的基本原理为各行为测试间的分层组织，即实验操作人员应从更宽泛、较少特异性测试开始以了解一般性的、尽可能多的表型改变，随后采用越来越多的专业化测试，最后梳理出脑功能性改变的行为表型细节^[1]。例如，如果要开发一种针对性治疗阿尔茨海默病的药物，则动物行为测试组一定要包含认知的主要领域，如注意力、短程和长程记忆和执行功能，就如同临床上检查患者类似行为症状一样。

2 证候表型组学的技术实现

从以上分析可发现，行为测试组技术本身也面临极大挑战。首要是操作层面上的问题。动物行为测试及分析是空间和时间密集型的，要耗费大量人力、物力，如何才能从合理的时空范围内收集到所有的行为表征信息用以判定证候归属，并进而评估基因表达调控异常到底影响了哪一方面大脑机能？解决上述问题的具体策略：一是增加可并行运行的测试仪器数量；二是增加从单一行为测试中用以评估大脑机能的参数数目，如旷场实验中用以评价动物活动能力的参数可增加至数十个；三是增加测试设备的灵活性，如对行为仪器进行二合一或三合一等改造，将原来二件或三件仪器功能集成到一件仪器上^[14]，以便能挖掘到广谱的大脑机能信息，如有设备整合了旷场、十字迷宫和明暗箱装置^[17]。现今先进的具有更快处理速度和更大内存容量的计算机设备的出现使得电脑控制多种动物行为监控设备并一次性采集海量行为参数成为可能，如美国 MED 公司开发的商用系统运用力传感技术可一次监控 8 个实验舱，并可通过编程记录许多行为变量^[18]。更为复杂并得到广泛应用的是基于视频图

像的行为分析技术，例如由美国 PsychoGenics 和荷兰 Noldus 公司开发的系统可实现对自由移动大鼠、小鼠 3D 图像的识别和量化^[19]，其基本原理即是将动物的完整行为流拆分成离散的行为要素，这些行为要素的量化工作都由计算机自动完成而不必采用传统的人工分析视频和手动标记。其他的采用应答器技术的商用系统也已面世，如瑞士 New Behavior 公司开发的 Intellicage 可同时监控一个鼠笼中多只动物活动情况^[1]，其实现途径是向动物体内植入商用微型芯片，随后通过计算机监控系统区分、跟踪不同动物活动状况，虽然这一系统分辨率尚待提升，但可最大限度模拟动物群体的自然生长环境，对分析多只动物的社会交互行为尤为适宜^[20]。

3 证候表型组学的任务

从以上对证候表型组学基本定义及技术实现方案的分析，我们认为服务于中医药领域的证候表型组学的基本学科任务应当包括如下三个方面。

3.1 为判定证候/病证结合模型动物的证候属性提供可靠依据

证候/病证结合模型动物的证候属性判别一直困扰着中医药学界，成为证候机制揭示和药物开发的瓶颈。近年来，从事动物模型工作的相关专家对于这一关键问题提出了各种解决方案，如提出“建立中医证候模型评价量表”^[21]，开发“人类疾病动物模型制备效果评价软件”^[22]，建立“大鼠、小鼠常见证候计量化辨证方法”^[23]，各自从不同角度丰富和深化了证候/病证结合动物模型评价的思路及方法体系。但由于动物证候表型可以采集量化指标，故应用量表或专家评价方法显得无甚必要；模型动物的计量化四诊与辨证方法公认性不强，缺乏必要的方法学支撑^[24]。积极借鉴和引入证候表型组学的思路和方法可为解决这一问题提供可能的切入点。可行的思路之一即是对所制备的动物模型先进行一般性的、尽可能多的表型测试，采用生物信息挖掘结合专家判别归类成可能的证候维度，随后应用特异性专业化测试证实第一步中的可能证候维度，最终得出模型动物证候归属结论。如果将以上的表面效度检验再结合微观指标检测的结构效度检验及药物反证的预测效度检验进行综合分析，可使模型证候属性判定的结果更为可靠和可信。

3.2 为筛选具有精神、神经活性的中药及其有效成分提供方法学参考

现今中枢神经系统药物开发因缺乏明晰的神经病理学机制，以及情感和认知类疾患本身的复杂性

而极大地限制了行为动物模型的应用^[25-27]。几种单一行为测试只能识别药物极为狭窄的效应谱,通过行为模型体内筛选中药单体成分的能力被极大限制。证候表型组学技术的出现使得解决以上困扰成为可能,借助高通量和可靠的行为测试组及生物信息挖掘技术作为体内筛选程序可有效鉴定中药及其活性成分治疗精神、神经系统疾病的潜能,也可用于发现中药已知功效外的其他用途^[28]。

3.3 为揭示证候及病证复杂中枢机制提供技术支持

揭示藏象功能机制及其活体结构,实现藏象学说由现象描述向本质阐明的飞跃,是我们提出的以藏象学说为代表的中医理论发展的途径与目标^[29]。证候及病证的深层发病机制可能只是影响了相应中枢脑区,要试图理解并揭示证候及病证的复杂微观机制,只能从揭示其脑中中枢功能改变入手。证候表型组学对实现这一目标的作用主要有二:一是鉴别模型动物证候归属,为目标实现提供适宜的实验对象和载体;二是证候测试组和行为分析技术的运用可直接锁定特征性行为异常改变可能受累的特定脑区及其下的神经回路。

4 证候表型组学的应用构想

尽管目前已对表型组学所涉及的技术及方法做了很多尝试和探索,但对于其基本组织原则、详细技术途径及可能应用构想尚未深入讨论。我们从表型组学理论及方法中提炼出较为契合中医药发展的相关内容进行如下论述。

4.1 基因操纵技术的联合应用

转基因及基因操纵动物模型是动物模型领域未来的发展趋势和潮流,中医证候/病证结合动物模型应当积极适应和借鉴。寻求与疾病特异性表现相关靶基因并鉴定其功能是动物模型领域的主要任务之一。对于中医证候/病证结合动物模型来说,利用成熟的基因操纵技术屏蔽或增加特定靶基因后,应用证候表型组学方法评价模式动物的非特异性及特异性行为表征,再利用生物信息挖掘技术将以上信息进行证候属性归类,结合专家判别鉴定模型动物的证候归属,这种制备动物模型的思路及方法可能更有利于找到与证候/病证发病相关联的特异性生物标记物,明晰证候/病证发生的靶点及可能机制,有望带来相关学科领域的大发展。

4.2 长时程行为监控笼具

除了和其他技术联合应用外,证候表型组学的另一项发展推力来自于行为监控笼具的发明及应用,这项技术极大克服了传统行为表征方法的局限

与不足。旷场实验、十字迷宫实验等经典行为学评价方法已受到越来越多的质疑^[30-32],甚至有研究指出,不同实验相同行为测试间结果不一致的情况相当普遍^[33]。对不同实验室的行为学实验结果进行的分析显示,各实验结果存在差异,而旷场实验的一般运动情况参数是相对可靠的指标^[34]。行为测试参数的变异性可归因于各种影响因素,其中之一是动物的适应时长应当以小时或天数计算而不是一直沿用的分钟计算^[35]。本质上以上标准行为实验都是基于特定场景应激下对动物展现特异性行为表现的测量,其独特价值无法否认,但大多数操作人员应用以上经典方法评价模型动物情绪行为时持续时间短则数分钟、长则几十分钟,如此短暂的适应时间无法真正揭示动物的行为异常改变,且如果测量的数分钟至几十分钟时长恰好处于动物的表现稳定期,根本不足以揭示模型动物和对照动物的行为表型差异^[35]。

以上传统经典行为测试的弊端成为寻求更好行为分析方法的开端^[36],为了让动物尽量处于自然或半自然环境,并对动物进行长时程(通常是5天)监控,催生出了“行为监控笼具”^[37]。通常一个典型的“家笼(homecage)”行为监控笼具应当包含如下部件:一个足够大的活动空间(尤其监控动物的社会交互行为),一个庇护所,适量的玩具^[38]。监测时间一般为5天左右。我们可以自行定义动物的行为谱(一种动物正常行为的全部记录或名录),应用手动视频分析或计算机技术描述各行要素出现的频率、潜伏期及持续时间,随后进行多维统计分析,以挖掘行为表型的复杂内涵。长时程行为监控笼具最大限度模拟了动物的自然生活状态,且大幅延长了动物对陌生环境的适应期,所得信息更为可靠和全面,适用于筛选动物行为表征及对药物反应的个体差异,应用于不同遗传背景动物的中医体质类型区分尤为适宜,成为未来动物行为分析的可能趋势。

4.3 对动物模型行为的结构分析

除了发展出适合的有效行为监控工具外,证候表型组学的发展推力还来自于对采集所得行为表征的定量分析技术的应用。经典的动物行为分析理论倾向于将一个延绵不断的动物行为流分割成一段段孤立的行为要素来理解和分析,这也是探讨动物行为问题可行的切入角度。行为流和行为要素的关系正如语句和单词的关系一样,语句的意义并非从组成句子单词的长度和频率中提取,而是依赖于单词的排列顺序。因此,我们要理解动物行为的复杂内

涵,就有必要认真分析组成动物行为轮廓的各单一行为要素的顺序结构。正如已有实验结果中所揭示的,模型动物与正常动物或不同遗传背景动物的行为表型差异并不体现于行为要素的种类和频率,而是体现于不同种类行为要素的出现时间的先后顺序即行为结构^[9-41]。基于以上理论分析及实验检验,2014 年罗格斯大学、爱因斯坦医学院、希尔斯堡行为仪器、BIOOBSERVE 公司共同开发了小鼠专用的行为表型分析仪^[42],其基本原理即是集合视频与振动分析,对可通过检测探头采集的所有可得的动物行为进行详尽描计并进行行为的定量分类,以行为谱图的方式将量化结果予以直观展示。为检测系统的可靠性,将针对同一观测对象的系统所得行为定量分析结果与通常公认的“金标准”——手动视频分析结果进行直接比对分析,结果发现两者相关系数超过 0.97,证实了这一系统作为一种全自动和易扩展仪器设备的稳定性和可靠性^[42]。随着类似仪器设备的不断问世,相信对证候/病证结合动物模型行为的结构分析并配合生物信息挖掘技术将有助于更好地理解证候表征的复杂内涵,带来相关学科领域的发展与进步。

参考文献

- [1] GERLAI R. Phenomics: fiction or the future? [J]. Trends Neurosci, 2002, 25(10): 506-509.
- [2] GERLAI R. Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems [J]. Behav Brain Res, 2001, 125(1): 269-277.
- [3] CRAWLEY JN, PAYLOR R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice [J]. Horm Behav, 1997, 31(3): 197-211.
- [4] ROBBINS TW, JAMES M, OWEN AM, et al. Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB): a factor analytic study of a large sample of normal elderly volunteers [J]. Dementia, 1994, 5(5): 266-281.
- [5] VAN DER STAAY FJ, STECKLER T. The fallacy of behavioral phenotyping without standardisation [J]. Genes Brain Behav, 2002, 1(1): 9-43.
- [6] WAHLSTEN D. Standardizing tests of mouse behavior: reasons, recommendations, and reality [J]. Physiol Behav, 2001, 73(5): 695-704.
- [7] WÜRBEL H. Behavioral phenotyping enhanced-beyond (environmental) standardization [J]. Genes Brain Behav, 2002, 1(1): 3-8.
- [8] MCILWAIN KL, MERRIWEATHER MY, YUVA-PAYLOR LA, et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history [J]. Physiol Behav, 2001, 73(5): 705-717.
- [9] CRABBE JC, WAHLSTEN D, DUDEK BC. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment [J]. Science, 1999, 284(5420): 1670-1672.
- [10] LATHE R. Mice, gene targeting and behaviour: more than just genetic background [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(5): 183-186.
- [11] GERLAI R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(5): 177-181.
- [12] GOULD JL. Genetics and molecular ethology [J]. Z Tierpsychol, 1974, 36(1-5): 267-292.
- [13] HEINRICHS SC. Mouse feeding behavior: ethology, regulatory mechanisms and utility for mutant phenotyping [J]. Behav Brain Res, 2001, 125(1): 81-88.
- [14] WIMER R, WIMER C. Animal behavior genetics: a search for the biological foundations of behavior [J]. Annu Rev psycho, 1985, 36(1): 171-218.
- [15] CHEN G, CHEN KS, KNOX J, et al. A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Nature, 2000, 408(6815): 975-979.
- [16] RAMOS A, PEREIRA E, MARTINS GC, et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial [J]. Behav Brain Res, 2008, 193(2): 277-288.
- [17] FRASER LM, BROWN RE, HUSSIN A, et al. Measuring anxiety-and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests [J]. Psychopharmacology, 2010, 211(1): 99-112.
- [18] FITCH T, ADAMS B, CHANEY S, et al. Force transducer-based movement detection in fear conditioning in mice: a comparative analysis [J]. Hippocampus, 2002, 12(1): 4-17.
- [19] BUMAA M, VAN LOCHERN P, ROUSSEAU J, et al. Automatic recognition of behavioral patterns of rats using video imaging and statistical classification [J]. Behav Pharma, 1998, 9(Suppl 1): 20-21.
- [20] WEISSBROD A, SHAPIRO A, VASSERMAN G, et al. Automated long-term tracking and social behavioural phenotyping of animal colonies within a semi-natural environment [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2018. doi: 10.1038/ncomms3018.
- [21] 王少贤, 白明华, 陈家旭, 等. 关于建立中医证候模型评价量表的思考 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 531-534.
- [22] 刘志学, 余琛琳, 蔡丽萍, 等. 人类疾病动物模型制备效果评价软件应用评测 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10): 28-32.
- [23] 方肇勤. 大鼠/小鼠辨证论治实验方法学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 86-114.
- [24] 魏盛, 孙鹏, 张惠云. 证候动物模型质量考核的思路与方法 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10): 2607-2610.

- [5] AGID Y, BUZSÁKI G, DIAMOND DM, et al. How can drug discovery for psychiatric disorders be improved? *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(3): 189-201.
- [6] PANGALOS MN, SCHECHTER LE, HURKO O. Drug development for CNS disorders: strategies for balancing risk and reducing attrition *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(7): 521-532.
- [7] NESTLER EJ, HYMAN SE. Animal models of neuropsychiatric disorders *Nat Neurosci*, 2010, 13(10): 1161-1169.
- [8] KAFKAFI N, MAYO CL, ELMER GI. Mining mouse behavior for patterns predicting psychiatric drug classification *Psychopharmacology*, 2014, 231(1): 231-242.
- [9] 乔明琦. 肝藏象现代研究总体思路、基本目标及主要进展 *山东中医药大学学报*, 2005, 29(2): 91-94.
- [10] BENJAMINI Y, LIPKIND D, HOREV G, et al. Ten ways to improve the quality of descriptions of whole-animal movement *Neurosci Biobehav Rev*, 2010, 34(8): 1351-1365.
- [11] KAFKAFI N, BENJAMINI Y, SAKOV A, et al. Genotype-environment interactions in mouse behavior: a way out of the problem *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(12): 4619-4624.
- [12] MANDILLO S, TUCCI V, HÖLTER SM, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study *Physiol Genomics*, 2008, 34(3): 243-255.
- [13] RICHTER SH, GARNER JP, ZIPSER B, et al. Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behavior: a multi-laboratory study *PLoS One*, 2011, 6(1): e16461.
- [14] WAHLSTEN D, METTEN P, PHILLIPS TJ, et al. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction *J Neurobiol*, 2003, 54(1): 283-311.
- [15] SPRUIJT BM, PETERS SM, DE HEER RC, et al. Reproducibility and relevance of future behavioral sciences should benefit from a cross fertilization of past recommendations and today's technology: "Back to the future" *J Neurosci Methods*, 2014, 234: 2-12. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.03.001.
- [16] GOLANI I. The developmental dynamics of behavioral growth processes in rodent egocentric and allocentric space *Behav Brain Res*, 2012, 231(2): 309-316.
- [17] OHAYON S, AVNI O, TAYLOR AL, et al. Automated multi-day tracking of marked mice for the analysis of social behaviour *J Neurosci Methods*, 2013, 219(1): 10-19.
- [18] SPRUIJT BM, DEVISSER L. Advanced behavioural screening: automated home cage ethology *Drug Discov Today Technol*, 2006, 3(2): 231-237.
- [19] SPRUIJT B, GISPEN W. Behavioral sequences as an easily quantifiable parameter in experimental studies *Physiol Behav*, 1984, 32(5): 707-710.
- [20] ESPEJO EF. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety *Behav Brain Res*, 1997, 86(1): 105-112.
- [21] LINO-DE-OLIVEIRA C, DE LIMA TC, DE PÁDUA CAROBREZ A. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test *Behav Brain Res*, 2005, 158(2): 243-250.
- [22] BRODKIN J, FRANK D, GRIPPO R, et al. Validation and implementation of a novel high-throughput behavioral phenotyping instrument for mice *J Neurosci Methods*, 2014, 224: 48-57. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.12.010.

Theoretical Problems and Application Conception of Syndrome Phenomics

WEI Sheng^{1,2}, SUN Peng^{1,2}, WANG Jieqiong¹, SONG Chunhong¹, CHEN Gang³, CHEN Jiaxu⁴, QIAO Mingqi¹

(1. Classical Chinese Medicine Theory Key Laboratory of Ministry of Education, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan, 250355; 2. Brain Behavior Analysis Laboratory, Shandong University of Chinese Medicine; 3. Chinese Medicine Encephalopathy Research Key Laboratory, Nanjing University of Chinese Medicine; 4. Basic Medical College, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Animal behavior analysis is the key important technology to decide model animal syndrome and understand the essence of Chinese medicine "syndrome". By summarizing the thinking and method development of modern animal ethology, the authors put forward the concept of syndrome phenomics in syndrome/disease-syndrome combination animal model behavior evaluation. By analyzing several important theoretical problems in this subject field, the authors point out several assumptions of syndrome phenomics technology applied to the field of Chinese medicine, including possible great development of subject field brought by joint application of gene manipulation techniques, as well as long term behavior monitoring cage which might be the possible trend of animal behavior analysis in the future. This article provides ideas and methods for solving the syndrome attribute decision of animal model and revealing the complex connotation of Chinese medicine syndrome.

Keywords syndrome phenomics; animal model; Chinese medicine syndrome type

(收稿日期: 2016-06-02; 修回日期: 2016-07-14)

编辑: 焦爽