

实验方法

无线神经遥测技术在阿尔茨海默病转基因小鼠恐惧学习记忆活动中的应用——海马Theta节律观察

胡梦明, 闫旭东, 张秀敏, 白羽, 赵芳, 祁金顺*

山西医科大学生理学系, 太原 030001

摘要: APP/PS1/tau三转基因(3xTg)小鼠是国际公认的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)动物模型, 其6月龄时即可表现出与海马相关的认知活动障碍及电生理指标异常, 但同步记录AD小鼠行为学和脑电活动的研究仍鲜有报道。近年来, 无线遥测技术的发展为同步记录小动物行为和脑电活动创造了条件。本研究利用无线神经遥测技术, 结合行为学检测手段, 同步记录了3xTg AD小鼠在恐惧记忆活动过程中的行为学表现和海马Theta节律变化, 以期揭示AD时认知功能障碍与Theta节律的关系。结果显示: (1)恐惧学习训练阶段, 3xTg小鼠与野生型(wild type, WT)小鼠相比, 行为学和脑电活动均无明显差异; (2)记忆检测阶段, 3xTg小鼠因条件刺激(conditioning stimulus, CS)引起的僵直比率显著低于WT小鼠; (3)条件刺激前(Pre-CS)与CS期间3xTg小鼠海马Theta节律的峰值功率均明显低于WT小鼠; (4) CS可有效提高WT小鼠海马CA1区Theta节律的峰值频率, 而这一刺激对3xTg小鼠无效。以上结果表明, 3xTg小鼠在认知行为障碍即恐惧学习记忆能力下降的同时, 伴有海马CA1区Theta节律的发放频率与发放功率降低。据此推测, Theta节律活动的衰减与3xTg小鼠恐惧记忆行为障碍有关, 增强海马Theta节律可能有助于认知行为的改善。

关键词: 无线神经遥测; APP/PS1/tau转基因小鼠; 行为电生理; 恐惧记忆; Theta节律

中图分类号: Q4-33

Application of wireless neuronal recording system in fear conditioning of Alzheimer's disease mice — hippocampal Theta oscillation observation

HU Meng-Ming, YAN Xu-Dong, ZHANG Xiu-Min, BAI Yu, ZHAO Fang, QI Jin-Shun*

Department of Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: APP/PS1/tau triple transgenic (3xTg) mouse is a classical animal model of Alzheimer's disease (AD), which has abnormalities in recognition and electrophysiological properties at early 6-month-old age. However, few studies were performed by using simultaneously recording cognitive behavior and brain electrical activity in the conscious 3xTg mice. By using a new wireless recording system, we recorded hippocampal Theta oscillations in 3xTg mice during the process of fear conditioning test. The results showed that: (1) in training session, no significant difference in the fear behavior and hippocampal Theta activity was found between 3xTg mice and WT mice; (2) in test session, 3xTg mice showed a significant decrease in freezing ratio compared with WT mice when they were exposed to conditioning stimulus (CS); (3) the 3xTg mice showed lower peak power in Theta oscillation in both Pre-CS and CS duration compared with WT mice; (4) CS effectively induced an increase in the peak frequency of Theta oscillation in WT mice, but not in 3xTg mice. These results indicated that the impairment of cognition behavior in 3xTg mice was accompanied with the decreased peak power and peak frequency of Theta oscillation in the hippocampus, suggesting that a decline in Theta oscillation might be involved in the impairments of the fear conditioning, and the enhanced hippocampal Theta oscillation may be beneficial for improving AD cognitive function.

Key words: wireless neuronal recording; APP/PS1/tau 3xTg mouse; behavioral electrophysiology; fear memory; Theta oscillation

Received 2018-03-24 Accepted 2018-05-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31271201 and 31471080).

*Corresponding author. Tel: +86-351-4135091; E-mail: jinshunqi2009@163.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 多发于老年人, 是一种以进行性认知功能障碍、记忆减退和精神行为异常为特征的神经退行性疾病, 其严重影响老年人的身心健康与生活质量, 对家庭和社会构成极大负担。AD 的主要病理改变包括脑内出现高密度的老年斑 (senile plaque, SP) 和神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NT), 前者以淀粉样 β 蛋白 (amyloid- β , A β) 为核心, 后者是过度磷酸化 tau 蛋白的聚集体。值得注意的是, 在 SP 和 NT 这些病理改变出现之前, 脑内的神经环路活动以及受其支配的神经行为已经出现异常。脑内突触活动的改变和脑电活动 (如海马局部场电位 Theta 节律) 的紊乱与认知记忆障碍的关联度可能比 SP 和 NT 本身更为密切^[1]。因此, 早期发现 AD 患者脑内突触活动改变引起的脑电变化特别是伴随行为改变出现的脑电活动异常可能具有特殊的意义。近年来, 可供清醒动物脑电记录的无线神经遥测技术和 Oddo 等^[2]建立的 APP/PS1/tau 三转基因 (3xTg) AD 模型小鼠为研究 AD 时认知障碍和脑电活动异常创造了条件, 但基于无线遥测技术同步记录 AD 小鼠行为学和脑电活动的研究仍鲜有报道。本研究利用无线神经遥测技术观察并同步记录了 6 月龄 3xTgAD 小鼠条件恐惧记忆活动过程中的行为学表现和海马 Theta 节律变化, 以期揭示 AD 时认知功能障碍与 Theta 节律发放之间可能的内在联系。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 6 月龄 SPF 级的雄性 APP/PS1/tau 3xTg AD 模型小鼠 (The Jackson Laboratory, 美国) 和同龄 C57 野生型 (wild type, WT) 小鼠, 共 20 只, 分为 3xTg 实验组 ($n = 10$) 和 WT 对照组 ($n = 10$)。两组小鼠的体重为 25~27 g, 饲养在具有 IVC 独立送风笼具的专用动物室中, 每笼 4~5 只, 自由饮食、饮水。笼中温度为 20~25 °C, 湿度为 30%~50%, 光照/黑暗周期为 12 h/12 h。动物饲养和使用均严格遵守国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》和卫生部发布的《医学实验动物管理实施细则》, 实验方案获得山西医科大学实验动物中心动物伦理委员会批准。所有的动物手术及操作流程均根据山西省动物伦理协会指导原则执行。

1.2 无线神经遥测系统 无线神经遥测系统 (W16) 购于美国 Triangle BioSystem International (TBSI) 公司。该系统的主要组成和连接包括: 脑内植入电

极 → 微型前置放大 (Headstage) → 无线发射 → 无线接收 → 功率放大 → 计算机处理等 (图 1)。采集到的神经电信号经系统自带软件 NeuroWare 实时采集和初步处理。

1.3 动物手术及电极植入 用 5% 水合氯醛 (8 mL/kg 体重) 将小鼠麻醉后, 颅骨开孔并用眼科镊小心去除脑膜。在三维脑立体定位仪指引下, 将 3 根自制的不锈钢记录电极 (尖端直径均为 0.1 mm, 阻抗 50~100 k Ω) 以紧密排列形式插入小鼠海马 CA1 区 (电极尖端到达位置的坐标为: 前囟点后 2.5 mm, 中线旁开 1.8 mm, 深度 1.5~1.8 mm), 并将参比电极固定于对侧相应部位的颅骨内侧。电极的另一端通过转接口连接至放大器, 观察电极下插过程中记录到的场电位信号。当给予夹尾刺激后出现明显的 Theta 节律时表明电极已到达海马^[3], 此时用牙科水泥将电极与周围颅骨固定。电极植入完成后, 将记录系统与电极脱开, 待牙科水泥凝固后用碘伏消毒伤口, 腹腔注射青霉素, 以防术后感染。

1.4 恐惧记忆的行为学检测 电极埋置手术后一周, 开始同步进行恐惧记忆行为学实验和电生理信号检测。恐惧记忆行为学测试采用恐惧学习记忆训练箱 (Panlab, 西班牙) 足底电刺激模式。箱底安装有压力感应装置, 用于检测小鼠处于安静或活动状态时发生的压力变化。压力经换能、放大后, 可在计算机上显示为随时间变化的压力曲线。通过设定压力阈值并借助软件分析, 系统可自动识别小鼠所

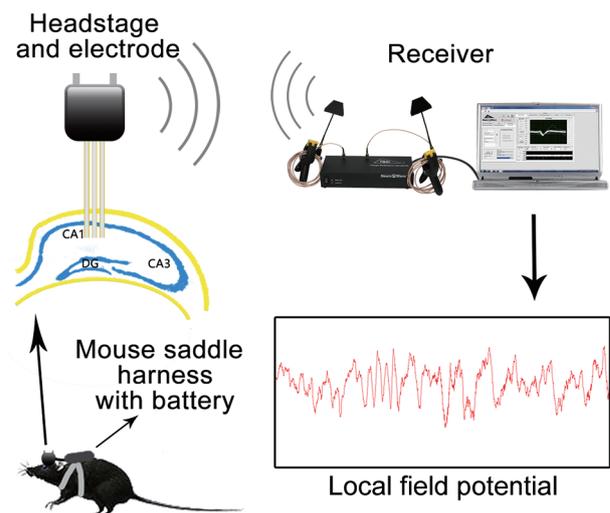


图 1. 无线神经遥测系统的主要装置和连接示意图
Fig. 1. Schematic of the components and connection of wireless neuronal system.

处的相对活跃 (active) 和僵直 (freezing) 状态 (图 2A)。训练和检测阶段的刺激方式见图 2B。在训练阶段 (training session), 首先让小鼠在训练箱中自由活动 90 s, 然后给予声波刺激 (频率 2 900 Hz、强度 90 dB、持续时间 30 s), 声波刺激的最后 2 s 给予持续直流电刺激 (电流强度 0.3 mA, 持续时间为 2 s) 进行强化 (reinforce)。声波刺激 + 直流电刺激重复 5 次, 间隔 90 s。训练过程中连续记录小鼠的活动情况, 统计每 30 s 内的僵直时间占比, 即僵直比率 (freezing ratio), 比较两组小鼠之间僵直比率的差异。强化训练完成后 24 h, 转入恐惧记忆检测阶段 (testing session)。这时, 将小鼠放于与之前训练箱颜色不同的新训练箱中, 先让动物适应 150 s, 并记录这时的活动状况, 作为条件刺激反应的对照; 然后给予 150 s 的条件刺激 (conditioning stimulus, CS), 即不加电刺激强化的声波刺激 (声波频率和强度与训练阶段相同), 记录 CS 期间的活动状况。分别计算小鼠在条件刺激前 (pre-CS) 150 s 和 CS 期间 150 s 的僵直比率, 比较组间差异。

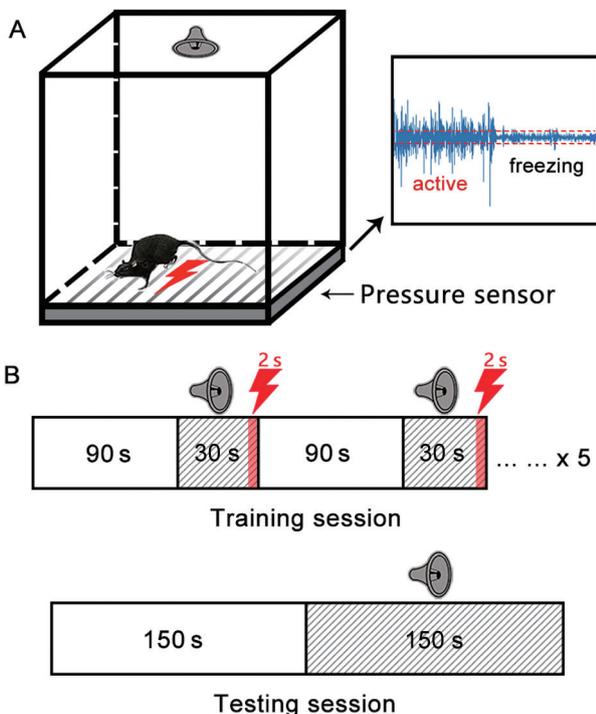


图 2. 恐惧记忆行为学检测模式图

Fig. 2. Schematic of fear conditioning test. A: A diagram showing a pressure-sensing device at the bottom of fear testing box and a sample pressure trace with active and freezing status decided by two threshold lines in red. B: Schematic illustration of the fear conditioning test protocol.

1.5 海马局部场电位 (local field potential, LFP) 的遥测记录与处理

恐惧学习记忆检测前, 先将小鼠麻醉 (异氟烷, 3% 诱导, 1.5% 维持), 给其腰部佩戴电池, 记录电极接上发射装置 Headstage (图 1), 并接通电源。待动物清醒后适应 15~20 min, 开启信号处理系统 NeuroWare, 将接收器检测到的神经信号按照 LFP 特征进行采样 (采样频率 3 000 Hz, 带通 0.1~500 Hz) 和实时记录观察。LFP 原始数据用 NeuroExplorer 5 进行离线时频图及功率谱分析。

1.6 数据统计与分析

实验数据均以 mean \pm SEM 表示, 使用 SPSS 18 软件处理, 采用配对样本 *t* 检验、双因素方差分析和 LSD 事后检验处理, $P < 0.05$ 表示两组之间有显著差异。

2 结果

2.1 3xTg小鼠恐惧记忆能力下降

如图 3A 和 B 所示, 在训练阶段, 随着强化次数的增加, WT 小鼠与 3xTg 小鼠僵直比率均逐渐增加, 分别由第一次强化前的 (25.655 6 \pm 1.847 0)% 和 (24.758 3 \pm 1.003 2)% 增加到第五次强化后的 (79.911 1 \pm 2.293 5)% 和 (85.300 0 \pm 2.641 2)%。训练开始与结束时 3xTg 小鼠与 WT 小鼠之间的僵直比率无明显差异, 表明 3xTg 小鼠恐惧学习过程没有受到影响。但在第二天恐惧记忆检测中两组小鼠表现不同。如图 3C 和 D 所示, 3xTg 小鼠由 CS 诱发的僵直比率 [(55.349 0 \pm 3.075 7)%] 较 WT 小鼠的 [(79.134 0 \pm 3.188 3)%] 明显降低 (配对 *t* 检验, $t_{(18)} = 11.543$, $P < 0.001$)。图 3E 显示了不同组别的小鼠典型的压力感受曲线, 可见 3xTg 小鼠给予 CS 后保持冻结的时间明显短于 WT 小鼠。以上实验表明, 3xTg 小鼠的 24 h 恐惧记忆受到明显伤害。

2.2 3xTg小鼠恐惧记忆伤害伴随着海马 Theta 节律异常

在进行恐惧记忆检测实验的同时, 我们同时记录了小鼠海马 CA1 区的 LFP。图 4A 显示了 WT 小鼠和 3xTg 小鼠在 Pre-CS 和 CS 期间典型的 LFP 变化曲线。我们将原始的 LFP 用 NeuroExplorer 5 软件做了频谱分析, 重点比较了两组动物的 Theta 节律 (4~10 Hz)。图 4B 显示了检测阶段实验中 Pre-CS 和 CS 期间各 150 s 内代表性的小鼠行为活动记录 (上图) 和相应的海马 CA1 区场电位时频图 (下图), 图 4C 显示了 LFP 的频率功率谱, 图 4D 和 E 比较了两组小鼠 Theta 节律的峰值频率 (peak frequency,

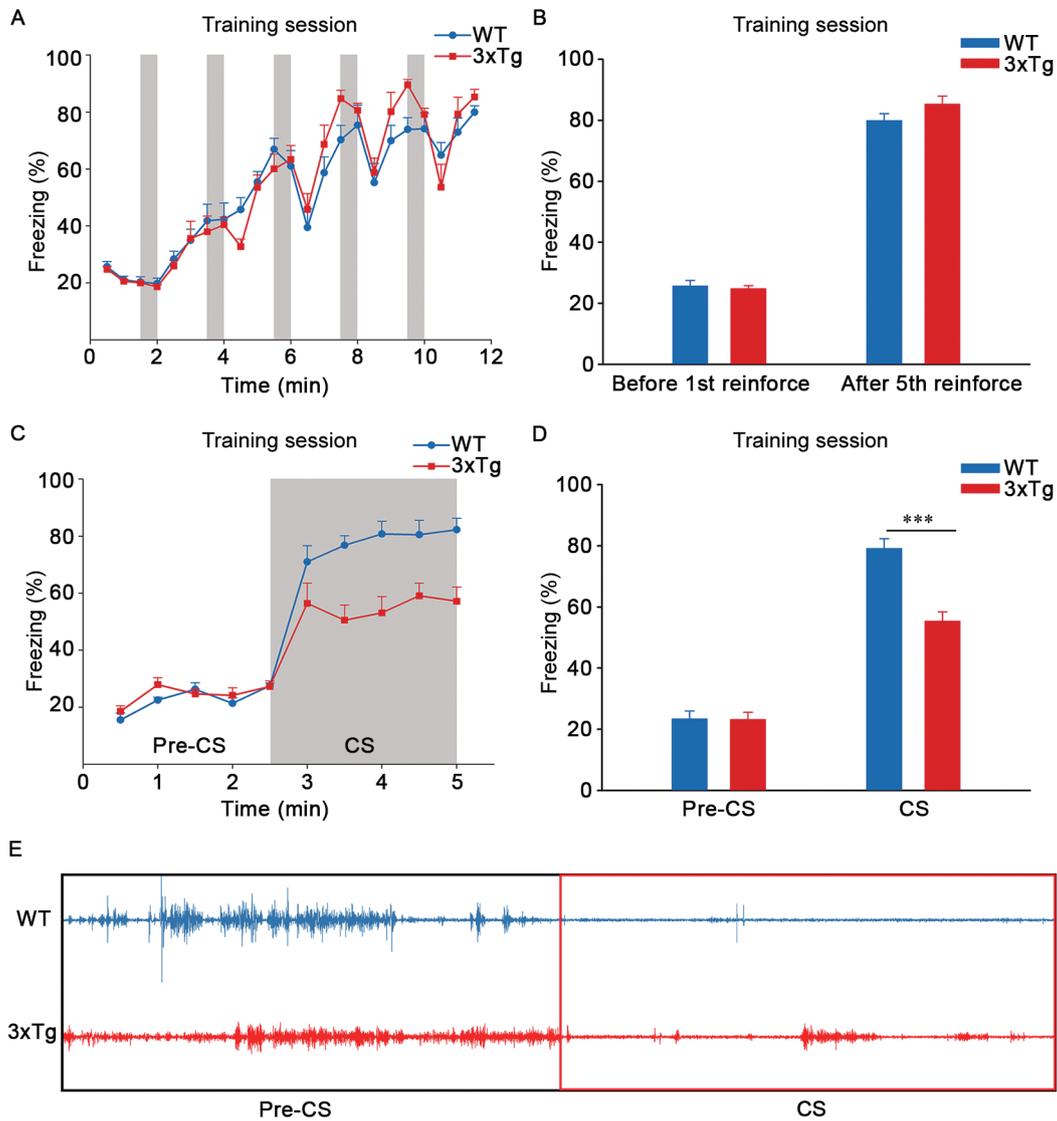


图 3. WT小鼠与3xTg小鼠在恐惧记忆的训练与检测阶段僵直比率比较

Fig. 3. Comparison of freezing ratio between WT and 3xTg mice in training and testing session. *A*: Freezing behavior plots showing the changes in freezing ratio during training session in WT and 3xTg mice. Grey bars represents paired auditory stimulus and foot shock. *B*: Histograms showing the freezing percentages in both two groups before the 1st reinforce and after the 5th reinforce. *C*: Freezing behavior plots showing the changes of freezing ratio in WT and 3xTg mice during pre-CS and CS in testing session. *D*: Histograms showing a significant decrease in freezing behavior in 3xTg mice during 150 s of CS in testing session. *E*: Representative pressure sensing traces in testing session. Mean \pm SEM, *** $P < 0.001$, $n = 10$ for each group.

Hz) 和峰值功率 (peak power, dB)。可见, 给予 CS 之后, WT 小鼠的行为活动由 Pre-CS 期间的活跃状态迅速改变为持续冻结状态, 而 3xTg 小鼠 CS 期间的行为冻结时常被出现的行为活跃所打断 (图 4B)。与行为记录对应的 LFP 时频图和频率功率谱显示了 CS 前后不同时间点 LFP 各个节律发放的峰值频率和功率分布及变化情况。可见, 给予 CS 后, WT 小鼠的 Theta 节律峰值频率较 Pre-CS 明显升高

(图 4B~D), 由 CS 前的 (4.2767 ± 0.1125) Hz 增加到 CS 期间的 (5.5765 ± 0.2711) Hz ($P < 0.05$), 而 3xTg 小鼠 Theta 节律的峰值频率在 CS 前后没有明显变化。同时, 3xTg 小鼠 CS 期间 Theta 节律发放的峰值频率 [4.5702 ± 0.2550 Hz] 明显低于 WT 小鼠 [5.5765 ± 0.2711 Hz] (图 4D, 双因素方差分析与 LSD 事后检验, 3xTg: $F_{(1,39)} = 4.5499$, $P < 0.05$; CS: $F_{(1,39)} = 12.2373$, $P < 0.05$; 交互作用:

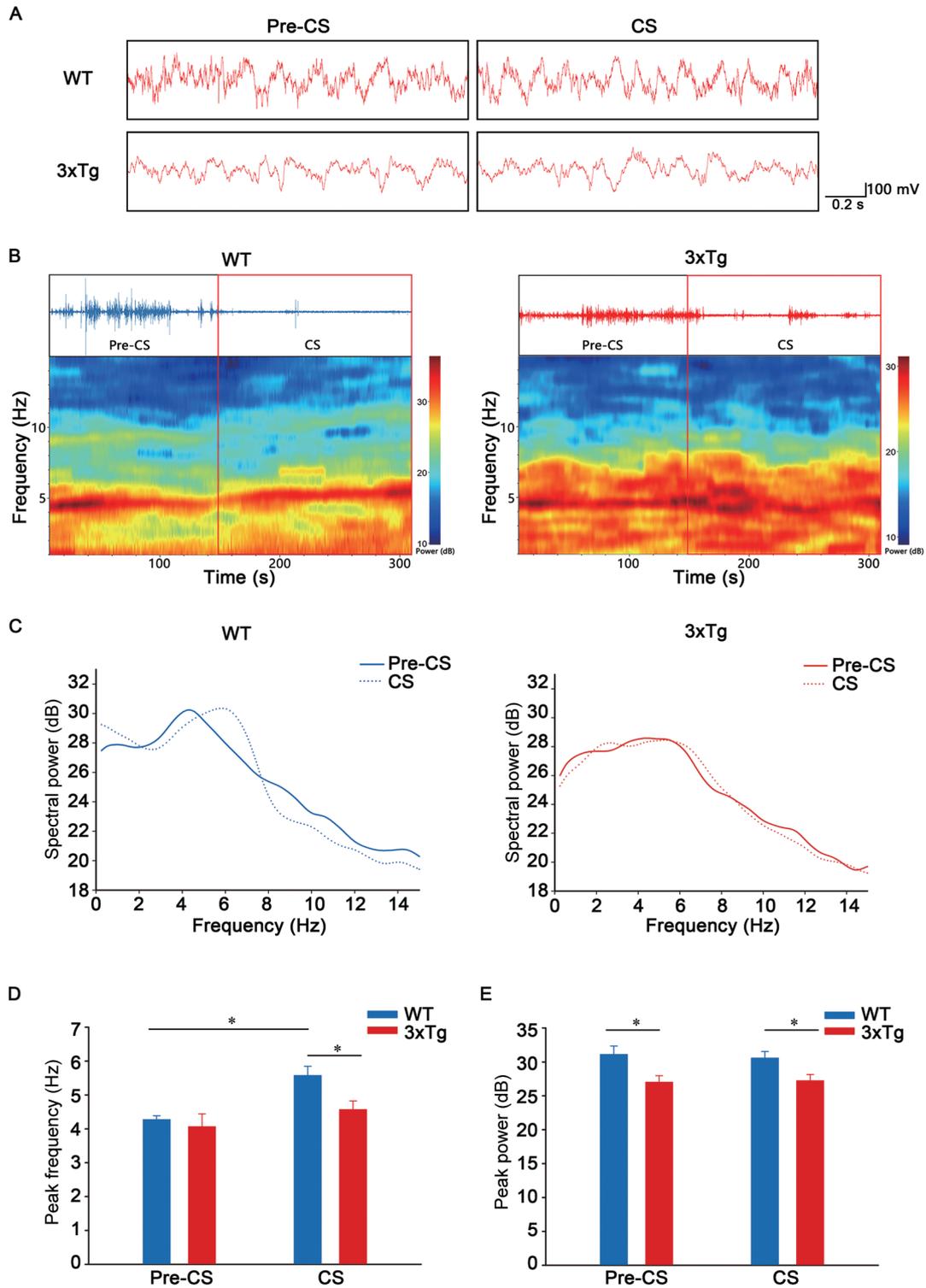


图 4. 小鼠恐惧记忆检测阶段压力测定和海马CA1区LFP的同步记录

Fig. 4. Simultaneous recording of the cognitive behavior and hippocampal electrical activity in the conscious 3xTg mice during fear conditioning test. *A*: Representative simultaneously recorded LFP of different session in WT and 3xTg mice. *B*: Representative LFP time-frequency spectrogram in 3xTg and WT mice during testing session. Notice the difference in the color scale of power. *C*: Representative LFP power spectrum in 3xTg and WT mice in different phases of testing session. *D* and *E*: Histograms showing the peak frequency (*D*) and peak power (*E*) of Theta oscillation in CA1 during testing session. Data were expressed as mean \pm SEM, * $P < 0.05$, $n = 10$ for each group.

$F_{(1,39)} = 2.7134$, $P > 0.05$); 3xTg 小鼠 Theta 节律的发放峰值功率无论在 CS 前 $[(27.0332 \pm 0.9362)$ dB]、还是 CS 后 $[(27.2440 \pm 0.8981)$ dB] 都明显低于 WT 小鼠 $[(31.1152 \pm 1.2345)$ dB 或 (30.5691 ± 0.9712) dB](图 4B 和 E, 双因素方差分析与 LSD 事后检验, 3xTg: $F_{(1,39)} = 9.7760$, $P < 0.05$; CS: $F_{(1,39)} < 1$, $P > 0.05$; 交互作用: $F_{(1,39)} < 1$, $P > 0.05$).

此外, 我们还注意到 3xTg 小鼠海马 LFP 中另一个与认知活动相关的脑电节律即 Gamma 节律 (30~40 Hz) 的改变。无论在 Pre-CS (图 5 左) 还是 CS (图 5 右) 期间, 3xTg 小鼠海马 CA1 区的 Gamma 节律功率都比 WT 小鼠要低。这提示, Gamma 节律的变化可能也参与 AD 动物认知行为的调控, 但其变化规律可能与 Theta 节律有所不同。

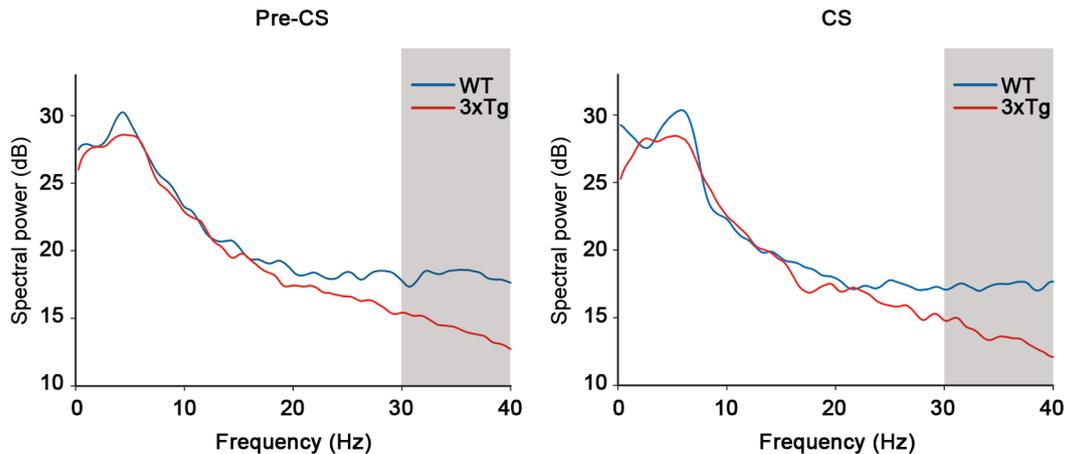


图 5. 3xTg 小鼠海马 CA1 区的 Gamma 节律 (30~40 Hz) 发放功率明显降低

Fig. 5. Representative spectral power distribution for 0–40 Hz oscillation in the hippocampal CA1 region in WT and 3xTg mice. Compared with WT, the power of Gamma oscillation (30–40 Hz) in 3xTg mice had significant decreases during pre-CS (left) and CS (right).

3 讨论

AD 患者早期即可出现认知功能障碍, 包括各种形式的学习和记忆能力的下降。认知障碍的病理学基础已有广泛报道, 包括脑内出现以 $A\beta$ 为核心的 SP、以过度磷酸化 tau 蛋白形成的 NT 和胶质细胞广泛参与的神经炎症等。这些 AD 病理改变的发生与认知行为之间具有一定的联系, 如 tau 蛋白的磷酸化程度已经被认为与 AD 患者痴呆程度呈正相关。本研究采用的 3xTg 小鼠无论在脑病理特征还是认知行为上都被证实能够反映 AD 患者的各种表型^[2]。然而, 脑功能活动的最直接表现是神经电活动, 在 AD 发生和发展过程中, 脑电活动的改变不仅仅是伴随病理特征的出现而出现, 很可能在病理损害和行为紊乱之前就已经更早地表现出来。因为, 正常的脑功能活动是通过大量突触联系, 并以区域性或全脑性神经网络电活动的形式集中展现的。因此有人认为, 脑电图 (electroencephalogram, EEG) 可以作为一种 AD 的早期诊断方法^[4]; 甚至有最新报

道试图通过改变脑电活动的特征性节律以改善 AD 的脑病理特征^[5]。然而, 不同脑区的神经网络活动具有各自的特征和意义, 海马 LFP 与各种认知行为之间可能具有更好的相关性, 这正是本研究利用无线神经遥测技术和行为学手段, 同步记录 3xTg 小鼠海马 Theta 节律和行为学表现的意义所在。

一般认为, 恐惧记忆的形成由杏仁核、海马和运动皮层共同参与^[6,7]。而海马在恐惧记忆中主要负责记忆的检索^[8]。本研究的恐惧记忆训练过程中, WT 小鼠与 3xTg 小鼠经过 5 次电刺激强化后都表现出较高的僵直比率。这表明, 两组小鼠的恐惧学习能力没有显著差异。但在随后的恐惧记忆检测实验中, 3xTg 小鼠表现出对 CS 的反应性 (僵直比率) 下降, 比 WT 小鼠明显降低。这说明 3xTg 小鼠在 6 月龄即可出现恐惧记忆能力障碍。我们实验室最近的研究表明, 9 月龄 3xTg 小鼠在其他认知功能如水迷宫、Y 迷宫等学习记忆相关的行为学检测中, 可表现出学习记忆能力下降^[9]。这些结果表明, 3xTg 小鼠的海马相关认知功能包括恐惧记忆均有

不同程度的损伤, 但不同记忆损伤出现的时间是否有差别仍需在同批动物上同时检测方能获知。

本研究重点是同步观察恐惧记忆行为与海马 Theta 节律的改变, 以期了解两者之间可能存在的内在联系。Theta 节律被认为是海马功能活动在电信号上的重要体现, 与学习记忆、运动、空间定位等活动均有关联^[10]。当人进行学习和空间定位等活动时, 海马脑电波中 1~4 Hz 部分的发放会增强^[11], 而鼠类清醒时进行类似活动时检测到的是 4~10 Hz 的 Theta 节律^[12, 13], 麻醉大鼠上也能记录到频率偏低 (3~4 Hz) 的 Theta 节律^[14]。Theta 节律频率会受多种因素影响而发生改变, 例如, 移动速度增加会导致 Theta 节律频率升高^[15]; 空间定位时, 随着动物对环境的熟悉, Theta 节律发放频率会逐渐升高^[16]。

在本实验中我们观察到, 当小鼠进行恐惧记忆检测时, CS 期间 WT 小鼠的海马 Theta 节律峰值频率比 Pre-CS 明显升高, 这反映了小鼠海马“线索提取”活动的增强, 其意义可能与提取原先保留的恐惧记忆信息有关。但对 3xTg 小鼠而言, CS 期间 Theta 节律的峰值频率没有发生明显的改变, 且无论 Pre-CS 还是 CS 期间其 Theta 节律峰值功率均小于 WT 小鼠。这可能反映了 3xTg 小鼠的海马不能有效“提取”恐惧记忆“线索”, 从而导致记忆行为缺陷。运动状态可以对 Theta 节律产生影响, 表现为小鼠运动速度越快, Theta 节律的峰值频率越高^[15]。然而, 本实验条件恐惧检测时两组小鼠的活动都是明显减少的, 尤其是 WT 小鼠几乎没有运动。所以此时小鼠特别是 WT 小鼠出现的 Theta 节律峰值频率增高不是运动所致 (如果是, 理应表现为 Theta 节律减少), 而是反映了条件反射形成后认知功能活动的增强。作为支持性证据, 有学者报道, 反映突触可塑性的重要电生理指标海马长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 在 6 月龄的 3xTg 小鼠已出现明显压抑^[2]。他们所用小鼠与本实验所用小鼠的月龄是一致的。我们最近的研究也显示, 3xTg 小鼠的海马 LTP 包括早期 LTP (early-phase LTP, E-LTP)^[17] 和晚期 LTP (late-phase LTP, L-LTP)^[18] 都伴随着空间学习记忆损伤而受到压抑。因此, 本研究观察到的小鼠海马 LFP Theta 节律改变为其同时发生的认知行为学差异提供了进一步支持性的电生理学证据。

总之, 鉴于之前研究已证实的海马在恐惧记忆中具有记忆检索功能^[8, 19] 和本研究对 3xTg 小鼠恐惧记忆行为和 LFP 的同步观察结果, 我们认为:

3xTg 小鼠海马 CA1 区 Theta 节律的频率和功率改变可能与其恐惧记忆行为障碍的发生有关。那么, 通过施加特定形式和频率的刺激以增强海马 Theta 节律的活动, 是否能改变 AD 小鼠的脑病理特征甚至改善其认知行为, 仍是一个十分有趣且亟待研究的课题。

参考文献

- Masliah E. Recent advances in the understanding of the role of synaptic proteins in Alzheimer's Disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 2001; 3(1): 121-129.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; 39(3): 409-421.
- McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 1996; 87(7): 1339-1349.
- Woon WL, Cichocki A, Vialatte F, Musha T. Techniques for early detection of Alzheimer's disease using spontaneous EEG recordings. *Physiol Meas* 2007; 28(4): 335-347.
- Iaccarino HF, Singer AC, Martorell AJ, Rudenko A, Gao F, Gillingham TZ, Mathys H, Seo J, Kritskiy O, Abdurrof F, Adaikkan C, Canter RG, Rueda R, Brown EN, Boyden ES, Tsai LH. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature* 2016; 540(7632): 230-235.
- Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 1992; 106(2): 274-285.
- Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 2011; 147(3): 509-524.
- Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 2011; 147(3): 678-689.
- Jiao JJ (焦娟娟), Hölscher C, Li T, Dong XF, Qu XS, Cao Y, Wu MN, Wang ZJ, Qi JS. GLP-1/GIP/Gcg receptor Triagonist improves the cognitive behaviors in tripletransgenic mice of Alzheimer's disease. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2017; 69(2): 135-145 (in Chinese with English abstract).
- Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 2002; 33(3): 325-340.
- Fell J, Klaver P, Elfadil H, Schaller C, Elger CE, Fernandez G. Rhinal-hippocampal theta coherence during declarative

- memory formation: interaction with gamma synchronization? *Eur J Neurosci* 2003; 17(5): 1082–1088.
- 12 Bland BH. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol* 1986; 26(1): 1–54.
- 13 Jacobs J. Hippocampal theta oscillations are slower in humans than in rodents: implications for models of spatial navigation and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1635): 20130304.
- 14 Bland BH, Colom LV. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog Neurobiol* 1993; 41(2): 157–208.
- 15 Wills TJ, Lever C, Cacucci F, Burgess N, O'Keefe J. Attractor dynamics in the hippocampal representation of the local environment. *Science* 2005; 308(5723): 873–876.
- 16 Wills TJ, Cacucci F, Burgess N, O'Keefe J. Development of the hippocampal cognitive map in preweanling rats. *Science* 2010; 328(5985): 1573–1576.
- 17 Li T, Jiao JJ, Holscher C, Wu MN, Zhang J, Tong JQ, Dong XF, Qu XS, Cao Y, Cai HY, Su Q, Qi JS. A novel GLP-1/GIP/Gcg triagonist reduces cognitive deficits and pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 2018; 28(5): 358–372.
- 18 Cao Y, Holscher C, Hu MM, Wang T, Zhao F, Bai Y, Zhang J, Wu MN, Qi JS. DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2018; 827: 215–226.
- 19 Bergstrom HC. The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2016; 71: 409–417.