

鸟类学习记忆研究进展

孟 玮, 廖素群, 肖 鹏, 李东风
(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要: 在学习记忆研究中, 需根据不同的实验目的选用不同的实验动物和模型。鸟类在生物进化上具有独特的地位, 由此决定了其在认知科学研究中的价值。现已建立了鸣禽鸣唱学习、鸟类空间学习及视觉分辨学习等重要实验模型, 并开展了一系列的学习记忆机制研究。文章对近年来鸟类学习记忆研究的进展, 从鸟类鸣唱行为、海马功能以及神经递质作用等方面做了回顾。

关键词: 鸟类; 学习记忆; 鸣唱; 海马; 神经递质
中图分类号: Q959.7

1 引 言

学习与记忆是动物和人类生存与进化中的一种高级神经活动。它们是两个相互联系的过程, 也是脑的基本功能之一。揭示学习与记忆的神经机制已成为认知神经科学领域的一个重要研究方向。学习记忆的神经处理过程极其复杂, 不同种类动物的学习记忆以及不同类型的学习记忆均有着不同的神经基础。因此, 在对学习记忆神经机制的研究中, 难以从某一种动物模型中获得具有普遍意义的结论。鸟类是对学习记忆神经机制进行研究的常用实验动物之一, 从已建立的鸟类实验模型中获得了一批有价值的理论成果。近年与学习记忆相关的鸟类鸣唱行为、海马功能和神经递质作用等方面都取得了进展。

2 鸟类鸣唱行为与学习记忆

自然界中, 许多动物能通过复杂的发声进行交流, 但这些发声信息很少是历经学习记忆而产生的。以往的研究表明, 鸣禽的鸣唱是一种习得行为, 这提示, 鸣禽是除了人类以外极少数具有发声信号学习能力的动物, 并由此决定了其鸣唱控制神经系统是对感觉认知机制进行研究的理想模型^[1]。

鸣唱的产生由鸣禽脑中一套离散且又相互联系的神经核团所控制, 包括一个发声运动通路 (vocal motor pathway, VMP) 和一个与鸣唱习得及维持有关的前端脑通路 (anterior forebrain pathway, AFP)。VMP 由高级发声中枢 (high vocal

center, HVC) 直接投射至古纹状体粗核 (the robust nucleus of the archistriatum, RA), 再由 RA 支配舌下神经气管鸣管亚核 (nXIIts) 以控制鸣肌运动。AFP 则由基底神经节的 X 区 (X area)、丘脑的背外侧核 (the dorsolateral part of the medial thalamus, DLM) 和前脑的新纹状体巨细胞核外侧部 (the lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum, LMAN) 构成环路, 再由 LMAN 向 RA 发出纤维投射, 将 AFP 与 VMP 联系起来。HVC 亦可通过纤维投射至 X 区, 再经 AFP 环路间接与 RA 发生联系^[2,3]。

行为学研究表明, 听觉反馈对正常鸣曲习得至关重要。在感觉学习期, 幼鸟须听见亲鸟的教习曲并对其产生记忆, 在之后的感觉运动期, 再依赖听觉反馈使其鸣唱逐渐与记忆中的鸣曲模板相匹配, 因此, 鸣唱控制系统与听皮层之间必然存在着复杂联系。在 HVC、RA 及 AFP 环路中各级核团内均证实有特异选择性听神经元的存在。这些神经元对自身鸣曲 (bird's own song, BOS) 表现出高度特异的选择性, 并对鸣曲结构的时序性反应敏感。LMAN、DLM 和 X 区中的鸣曲选择性神经元特性与 HVC 内的相似, 提示 AFP 环路内的听觉输入可

收稿日期: 2004-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370197), 教育部科学技术研究重点项目 (01062) 和中国科学院视觉信息加工重点实验室基金资助项目

通讯作者: 李东风, 电话: (020)85215208,

传真: (020)85212078, E-mail: dfliswx@eyou.com

能源自 HVC 听神经元, 基本的鸣曲选择性也可能来自 HVC^[4,5]。且有研究表明, 这种鸣曲特异的选择性可能仅限于鸣唱相关核团, 但前脑 Field L 等听区中神经元亦具有初步的声音选择性, 可能此处为特异选择性产生的中间处理阶段^[6-8]。AFP 环路在发育早期即起作用, 遍布于其内的特异选择性听神经元最终投射至 VMP 的 RA 核团, 推测其作用之一是为鸣曲学习提供听觉反馈信号, 致使感觉运动相匹配^[9]。

不仅正常鸣曲形成有赖于听觉反馈, 幼鸟成年后其鸣曲稳定维持的过程也需要听觉反馈的参与^[9]。某些种类的鸣禽在其出生后第一年内即形成了完整的鸣曲库, 且鸣曲在成年期一旦固化便高度稳定。传统观点认为, 此种类型的鸣禽成年后鸣曲的维持并不依赖听觉反馈的作用。但近期研究发现, 这类鸣禽中的斑胸草雀 (zebra finch) 和白腰文鸟 (bengalese finch) 在致聋后, 其已固化的鸣曲模式均逐渐发生或快或慢的改变, 证明持续听觉输入对于已习得鸣曲的维持必不可少^[10,11]。若在鸣曲改变前损毁基底神经节前脑回路, 则能阻断这种由致聋造成的对鸣曲维持的有害影响, 提示听觉反馈的缺失可能会产生一个激活鸣曲非适应性改变的指导信号, 而此信号即由基底神经节前脑回路产生或由其传达^[12]。

听觉反馈的作用机制至今未明, 因此是未来研究的一个重要方向。目前, 对鸟鸣学习记忆机制的研究已发展为神经生物学的一个特色领域, 其涉及突触联系的重排、大脑分区的特征、细胞死亡及神经发生、经验依赖性的神经系统可塑性以及性别分化等诸多方面, 在一些特殊的理论问题上有待深入研究。

3 鸟类海马结构与学习记忆

哺乳动物的海马在某些学习形式中起着重要的作用, 而鸟类海马位于端脑背中部后端, 被认为与哺乳动物的海马同源。对鸟类海马的连接、递质分布及其发育的研究结果均支持这一观点, 并且经研究证实鸟类海马在空间飞行和食物储存等记忆中起关键作用。海马体积与其它需要空间记忆参与的行为之间也有同样的关系。海马损毁将导致空间记忆能力的缺陷, 尤其是在迷宫学习任务中。但对非空间学习任务并不产生影响^[13]。由此可见, 与哺乳动物的海马一样, 鸟类海马是与空间和其他某些类型

记忆相关的一个重要神经结构。

突触传递长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 现象是在哺乳类海马中发现的兴奋性突触可塑性形式的典型代表。从大鼠实验获得的数据表明, 海马 LTP 与空间定位记忆密切相关。现正对其机制进行广泛深入的探索^[14,15]。1991 年, Wieraszko 等^[16]发现, 20 Hz 的串刺激同样能促使一岁龄雌性歌雀 (*Melospiza melodia*) 海马脑片中的诱发电位持续增强约两小时, 由此证实, 鸟类海马存在与哺乳类海马相似的 LTP 现象, 但其与哺乳类海马 LTP 不同的是, 无需 NMDA 受体的激活^[17]。此后, Margrie 等^[18]的工作更表明, 与哺乳类海马内苔状纤维至 CA3 区锥体细胞中 LTP 现象相似, 突触后钙离子内流可能对鸟类海马突触 LTP 的激发并不重要。在哺乳类海马中, NMDA 受体依赖型 LTP 占主导地位, 非 NMDA 受体依赖型 LTP 则主要存在于苔状纤维至 CA3 区锥体细胞的突触中。而目前发现的鸟类海马中 LTP 却主要是非 NMDA 受体依赖型。根据以上的研究结果, 鸟类海马的长时程突触可塑性似乎分别具有哺乳类海马齿状回和 CA1、CA3 区的部分属性, 其相应于哺乳类海马各部解剖学边界的划分仍有待解决。这些结果不仅显示了两类海马的异同, 并预示着作为学习机制的一种新的突触可塑性形式可能存在于鸟类海马中。

食物存储型鸟能将其食物隐藏在许多地方, 并能准确回忆起这些隐藏点。海马即参与了这些空间位置记忆的形成。与非食物存储型鸟类相比, 食物存储型鸟类的空间记忆能力更强, 并且其海马更大, 然而对其神经机制却知之甚少。研究表明, 黑冠山雀 (*Poecile atricapillus*) 的海马体积会随食物存储的季节周期性变化而变化^[19], 且其中表达即早基因 c-Fos 及 ZENK 等的神经元数量与记忆能力正相关^[20]。这些结果暗示, 海马能通过招募更多的活化神经元形成网络以处理复杂信息。在哺乳动物中, 大麻类 CB1 受体的阻断能提升空间记忆及联合记忆能力, 而阻断黑冠山雀海马内大麻类 CB1 受体同样能增强其长时空间记忆能力, 提示海马内大麻类信号对长时记忆的形成起重要作用^[21]。

Patel 等^[22]通过斑胸草雀的一次性联合记忆任务 (one-trial associative memory task) 训练, 对海马损毁后神经移植的作用进行了研究。海马损毁的结果表明, 海马背侧的小部分损毁可显著削弱空间记忆能力。胚胎海马组织移植的结果显示, 神经

移植能够在鸟脑内存活, 并且海马损毁所造成的空间记忆缺失能被同源海马移植所逆转。

Hampton 等^[23]发现, 鸟类海马复合体的损毁将削弱方位记忆, 而对同一个体的色彩记忆无影响。Papadimitriou 等^[24]亦发现, 鸽海马的损毁削弱了其空间学习能力, 但与图形学习无关。Colombo 等^[25-27]则通过对鸽海马和旁海马区域 (the hippocampus and area parahippocampalis, Hp-APH) 双侧损毁后的视觉辨别和空间训练实验证实, 鸽 Hp-APH 对纯粹的视觉信息记忆的处理和维持影响不大, 但在空间记忆的处理中起重要作用。更有趣的是, Fremouw 等^[28]发现海马损毁会削弱鸽对迷宫中食物隐藏位置的记忆, 但当用一信号标明食物隐藏位置时, 海马损毁则不产生影响。另外, Strasser 等^[29]通过实验发现, 损毁鸽海马组织不会削弱其对已知目标的长时记忆, 但会显著削弱其对返回该目标的空间信息的利用; 他们^[30]还发现, 信鸽海马组织参与了对鸽房附近标志的空间记忆, 使其能够正确辨认鸽房的方位。由此可见, 鸟类海马在空间辨认中起重要作用, 而通常对工作记忆不起作用。

综合上述的研究结果, 我们可以推断, 鸟类的海马具有与哺乳类动物尤其是啮齿类动物海马相似的功能, 主要为鸟类空间学习记忆所必需。

4 神经递质与鸟类学习记忆

谷氨酸是在中枢神经系统中分布最为广泛的兴奋性神经递质。代谢型谷氨酸受体 (mGluRs) I 和 II 与 LTP 和学习记忆的形成有关。中间内侧上纹状体 (the intermediate medial part of the hyperstriatum ventrale, IMHV) 位于鸟类前脑部分, 它为早期学习所必需。在学习过程中, IMHV 内会产生氨基酸递质水平上调及其受体激活等变化。在一日龄小鸡的一次性被动回避 (one-trial passive avoidance) 学习任务中, 训练前 30 min 给小鸡注射 mGluRs 拮抗剂将导致记忆的缺失, 并可使 IMHV 脑片中的谷氨酸释放量显著增加。表明 mGluRs I 和 II 与记忆形成的早期阶段有关, 并且 mGluRs 拮抗剂的应用能够干扰 mGluRs 的作用。尽管其机制未明, 但上述结果暗示 mGluRs 拮抗剂可能通过调节谷氨酸的释放参与 mGluRs 的作用过程^[31]。

Daisley 等^[32]利用在体微量渗析技术, 对小鸡

一次性被动回避训练期间 IMHV 细胞外氨基酸水平变化情况进行了监测。实验动物被分为两组, 一组用味苦的化学试剂氨基苯甲酸甲酯 (methylantranylate) 对其进行被动回避训练, 另一组用水对其进行啄训练。检测结果发现, 在训练期间, 两组小鸡的细胞外谷氨酸水平皆提高, 而氨基苯甲酸甲酯训练组的谷氨酸释放量要高于水训练组, 并且其它被检测的氨基酸未表现出显著变化。训练后的检测结果发现, 细胞外谷氨酸和牛磺酸水平在两组小鸡中均有显著提高。由此可见, 在利用氨基苯甲酸甲酯或水作为刺激的啄训练中, IMHV 中的细胞外谷氨酸水平都会提高, 而用小鸡厌恶的味道作为嗅觉刺激能够更显著地增强谷氨酸水平。进一步的研究^[33]证明, 训练后 30 min, 脑片中 IMHV 双侧均出现钙依赖性谷氨酸释放的增加。在 IMHV 左侧, 谷氨酸释放增强持续 1 h 后, 钙依赖性 GABA 释放亦变得明显。在 IMHV 右侧, 谷氨酸的释放在训练后 3 至 6.5 h 中出现增强, GABA 则在训练后 6.5 h 开始出现增强, 这与长时记忆形成的晚期过程相对应。这些结果证实了谷氨酸和 GABA 以一种钙依赖性方式从 IMHV 释放, 并且这两种氨基酸释放量的改变与一日龄小鸡对一次性学习任务记忆的形成相关。

去甲肾上腺素的释放与记忆的巩固有关, 而通过脑内给药途径施加去甲肾上腺素能够起到稳定记忆的作用。在脑中, 去甲肾上腺素受体 (AR) 有 9 种不同的亚型, 其中任何一种受体亚型均能被去甲肾上腺素激活。然而 AR 亚型激活是有选择性的, 这种选择性可能与各种 AR 亚型的空间位置、相对密度以及亲和力不同有关, 并且在记忆形成的过程中会有不同的 AR 被激活。有证据表明, IMHV 的 $\beta 2$ -AR 和 $\beta 3$ -AR 以及旁嗅球叶 (LPO) 的 $\alpha 2$ -AR 在记忆的巩固中起重要作用。相反, IMHV 中 $\alpha 1$ -AR 的激活能够抑制记忆的巩固, 而 $\beta 1$ -AR 对记忆的巩固无影响, 只在短期记忆中起作用^[34]。去甲肾上腺素所产生的效果除与其受体不同亚型的作用有关外, 还会依剂量的不同而发生变化。中等剂量能巩固记忆, 而高剂量则阻碍记忆的巩固。研究还表明, 低剂量去甲肾上腺素的作用与 $\beta 3$ -AR 有关, 而中等剂量的去甲肾上腺素则通过 $\beta 2$ -AR 起作用。虽然 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 两种 AR 都能促进记忆的巩固, 但它们在记忆形成各阶段中的作用却不相同。若施以更高剂量的去甲肾上腺素, 将引起由 $\alpha 1$ -AR 介导的对记忆巩固的抑制作用^[35]。

神经解剖学研究的结果显示,多巴胺在高级学习和感觉运动处理过程中有独特作用,而对初级感觉处理的影响较小。与哺乳动物一样,鸟类的多巴胺与感觉运动整合、注意力和觉醒以及学习和工作记忆密切相关。因此,尽管鸟类和哺乳类前脑的解剖学结构有显著区别,但其多巴胺能系统的结构与功能是非常相似的^[6]。新近利用多巴胺激动剂脱水吗啡测试的结果发现,多巴胺对被动回避学习可能具有抑制作用。Hale等^[7]通过一日龄小鸡被动回避实验证实,在训练后立即注射多巴胺 D1 受体激动剂 SKF38393、D2 受体激动剂 quinpirole 和 D4 受体激动剂 PD168077 都不能对记忆的巩固起阻断作用,而注射了多巴胺 D3 受体激动剂 7-OH-DPAT 的小鸡在训练后 90 min 表现出记忆减弱现象。用多巴胺 D3 受体拮抗剂 U99194 进行预处理能够消除由 7-OH-DPAT 引起的记忆障碍。上述结果暗示多巴胺与记忆形成的晚期阶段有关,并且 D3 受体的作用至关重要。

综上所述,某些神经递质能够影响大脑对记忆的存储,而学习记忆的水平也能够改变某些神经递质的释放量,并且根据受体的不同,神经递质的作用亦不相同。

5 展 望

必须指出,在目前的学习记忆研究中,依据其目的的不同,所用的动物模型也就不同。鸟类与哺乳类同属高等脊椎动物,都具有复杂的神经系统,亦有其独特的结构与功能,感官发达,行为多样,因此在科学研究中的地位为其它动物所不能替代。在认知科学某些领域研究中,鸟类往往成为理想的研究模型,例如鸣唱学习、空间学习及视觉分辨学习等,已得到大量颇有价值的理论成果,并预期有新的实验模型建立。尽管近年与学习记忆相关的鸟类鸣唱行为、海马功能和神经递质作用等方面都取得了长足进展,但是对于学习记忆的机制还有许多未知奥秘。如鸣唱学习初期的基因表达、新生神经元与鸣唱学习、鸟脑的长时程增强(LTP)现象等亦是研究热点问题。相信随着研究的不断深入,这些机制将逐一被揭示。

参考文献:

[1] Funabiki Y, Konishi M. Long memory in song learning by zebra finches. *J Neurosci*, 2003,23(17):6928-6935

- [2] 李东风. 鸣禽发声学习记忆的神经机制. 自然科学进展, 2001, 11(3):225-231
- [3] 孟 玮, 李东风. 鸟鸣及其鸣唱控制系统发育可塑性研究进展. 生命科学研究, 2003,7(3):203-207
- [4] Margoliash D. Preference for autogenous song by auditory neurons in a song system nucleus of the white-crowned sparrow. *J Neurosci*, 1986,6(6):1643-1661
- [5] Doupe AJ, Konishi M. Song-selective auditory circuits in the vocal control system of the zebra finch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88(24):11339-11343
- [6] Amin N, Grace JA, Theunissen FE. Neural response to bird's own song and tutor song in the zebra finch field L and caudal mesopallium. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 2004,190(6):469-489
- [7] Grace JA, Amin N, Singh NC, Theunissen FE. Selectivity for conspecific song in the zebra finch auditory forebrain. *J Neurophysiol*, 2003,89(1):472-487
- [8] Theunissen FE, Amin N, Shaevitz SS, Woolley SM, Fremouw T, Hauber ME. Song selectivity in the song system and in the auditory forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, 2004,1016:222-245
- [9] Woolley SM. Auditory experience and adult song plasticity. *Ann N Y Acad Sci*, 2004,1016:208-221
- [10] Nordeen KW, Nordeen EJ. Auditory feedback is necessary for the maintenance of stereotyped song in adult zebra finches. *Behav Neural Biol*, 1992,57(1):58-66
- [11] Woolley SM, Rubel EW. Bengalese finches *Lonchura Striata domestica* depend upon auditory feedback for the maintenance of adult song. *J Neurosci*, 1997,17(16):6380-6390
- [12] Brainard MS, Doupe AJ. Interruption of a basal ganglia-forebrain circuit prevents plasticity of learned vocalizations. *Nature*, 2000,404(6779):762-766
- [13] Watanabe S. Spatial memory and hippocampus in aves. *Shin-rigaku Kenkyu*, 2000,71(2):144-156
- [14] Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 1994,78(4):535-538
- [15] Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993,361(6407):31-39
- [16] Wieraszko A, Ball GF. Long-term enhancement of synaptic responses in the songbird hippocampus. *Brain Res*, 1991, 538(1):102-106
- [17] Wieraszko A, Ball GF. Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Synapse*, 1993,13(2):173-178
- [18] Margrie TW, Rostas JA, Sah P. Long-term potentiation of synaptic transmission in the avian hippocampus. *J Neurosci*, 1998,18(4):1207-1216
- [19] Smulders TV, Shiflett MW, Sperling AJ, DeVoogd TJ. Seasonal changes in neuron numbers in the hippocampal formation of a food-hoarding bird: the black-capped chickadee.

- J Neurobiol*, 2000,44(4):414-422
- [20] Smulders TV, DeVoogd TJ. Expression of immediate early genes in the hippocampal formation of the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*) during a food-hoarding task. *Behav Brain Res*, 2000,114(1-2):39-49
- [21] Shiflett MW, Rankin AZ, Tomaszycski ML, DeVoogd TJ. Cannabinoid inhibition improves memory in food-storing birds, but with a cost. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 271(1552):2043-2048
- [22] Patel SN, Clayton NS, Krebs JR. Hippocampal tissue transplants reverse lesion-induced spatial memory deficits in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J Neurosci*, 1997,17(10): 3861-3869
- [23] Hampton RR, Shettleworth SJ. Hippocampal lesions impair memory for location but not color in passerine birds. *Behav Neurosci*, 1996,110(4):831-835
- [24] Papadimitriou A, Wynne CD. Preserved negative patterning and impaired spatial learning in pigeons (*Columba livia*) with lesions of the hippocampus. *Behav Neurosci*, 1999,113(4): 683-690
- [25] Colombo M, Swain N, Harper D, Alsop B. The effects of hippocampal and area parahippocampalis lesions in pigeons: I. Delayed matching to sample. *Q J Exp Psychol B*, 1997, 50(2):149-171
- [26] Colombo M, Cawley S, Broadbent N. The effects of hippocampal and area parahippocampalis lesions in pigeons: II. Concurrent discrimination and spatial memory. *Q J Exp Psychol B*, 1997,50(2):172-189
- [27] Colombo M, Broadbent NJ, Taylor CS, Frost N. The role of the avian hippocampus in orientation in space and time. *Brain Res*, 2001,919(2):292-301
- [28] Fremouw T, Jackson-Smith P, Kesner RP. Impaired place learning and unimpaired cue learning in hippocampal-lesioned pigeons. *Behav Neurosci*, 1997,111(5):963-975
- [29] Strasser R, Bingman VP. The effects of hippocampal lesions in homing pigeons on a one-trial food association task. *J Comp Physiol (A)*, 1999,185(6):583-590
- [30] Strasser R, Bingman VP, Ioale P, Casini G, Bagnoli P. The homing pigeon hippocampus and the development of landmark navigation. *Dev Psychobiol*, 1998,33(4):305-315
- [31] Salinska E, Stafiej A. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. *Neurochem Int*, 2003,43(4-5):469-474
- [32] Daisley JN, Gruss M, Rose SP, Braun K. Passive avoidance training and recall are associated with increased glutamate levels in the intermediate medial hyperstriatum ventrale of the day-old chick. *Neural Plast*, 1998,6(3):53-61
- [33] Daisley JN, Rose SP. Amino acid release from the intermediate medial hyperstriatum ventrale (IMHV) of day-old chicks following a one-trial passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*, 2002,77(2):185-201
- [34] Gibbs ME, Summers RJ. Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog Neurobiol*, 2002,67(5):345-391
- [35] Gibbs ME, Summers RJ. Separate roles for beta2- and beta3-adrenoceptors in memory consolidation. *Neuroscience*, 2000,95(3):913-922
- [36] Durstewitz D, Kroner S, Gunturkun O. The dopaminergic innervation of the avian telencephalon. *Prog Neurobiol*, 1999, 59(2):161-195
- [37] Hale MW, Crowe SF. The effects of selective dopamine agonists on a passive avoidance learning task in the day-old chick. *Behav Pharmacol*, 2002,13(4):295-301

PROGRESS ON LEARNING AND MEMORY OF BIRDS

MENG Wei, LIAO Su-qun, XIAO Peng, LI Dong-feng
(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: It is necessary to select different animal models for different purpose in studying learning and memory. Birds are special species in animal evolution and become useful experiment models in cognitive science, such as song learning, spatial learning, visual discrimination and so on. In this paper, some progress in recent years concerning learning of birdsong, function of hippocampus and effect of neurotransmitter in learning and memory of birds is reviewed.

Key Words: Birds; Learning and memory; Singing; Hippocampus; Neurotransmitter