文章编号:1000-5404(2008)06-0499-04

论著

蝇蕈醇小脑齿状-中位核微注射对豚鼠经典眨眼条件反射建立的影响

林 曦[1],胡 波[2],杨 丽[1],隋建峰[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室;[2]西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 观察小脑齿状-中位核在豚鼠经典眨眼条件反射建立过程中的作用。**方法** 采用500 ms正弦波纯音和100 ms束状氧气流的配对刺激,训练豚鼠建立经典眨眼条件反射。在条件反射训练的第4~6天,向豚鼠双侧小脑齿状-中位核微注射蝇蕈醇。整个实验过程中,使用高分辨率的张力换能器检测豚鼠的眨眼反应。**结果** ①蝇蕈醇注射组豚鼠训练第4~6天的条件反应率均显著低于第3训练日水平($P_1=0.005$,$P_2=0.004$,$P_3=0.010$);②蝇蕈醇注射组豚鼠训练第7、8天条件反应率仅分别相当于对照组豚鼠第4、5训练日水平($P_1=0.061$,$P_2=0.669$);③在此过程中,蝇蕈醇注射组豚鼠非条件眨眼反应的幅度和峰潜伏期均无显著变化($P_1=0.926$,$P_2=0.939$)。**结论** 小脑齿状-中位核是运动性学习神经回路的重要组成部分,控制着眨眼条件反应的获得和表达。

关键词: 小脑;齿状-中位核;眨眼;条件反射;蝇蕈醇
中图法分类号: R-33;R338.23;R338.61 **文献标识码:** A

Microinjection of Muscimol into cerebellular dentate-interpositus nuclei affects acquisition of classical eyeblink conditioning in guinea pigs

LIN Xi[1], HU Bo[2], YANG Li[1], SUI Jian-feng[1] ([1]Department of Physiology, College of Medicine; [2]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of cerebellar dentate-interpositus (D-I) nuclei during acquisition of classical eyeblink conditioning in guinea pigs. Methods A 500 ms tone conditioned stimulus (CS) was paired with a 100 ms corneal oxygen-puff unconditioned stimulus (US) in a delay paradigm. Guinea pigs were trained daily to acquire the classically conditioned eyeblink responses. Micorinjections of Muscimol into bilateral cerebellar D-I nuclei were performed during the 4 – 6 day of training session. A high-resolution potentiometer was used to detect the eyeblink responses. Results The conditioned response (CR) rates of Muscimol-injected group on session 4 – 6 were significantly lower than their rates on session 3 ($P_1=0.005$, $P_2=0.004$, $P_3=0.010$); Their rates on session 7 and 8 were as the same level as those without microinjection on session 4 and 5 ($P_1=0.061$, $P_2=0.669$). However, there was no significant difference on their amplitude and peak latency of unconditioned responses (URs) during the entire course of training ($P_1=0.926$, $P_2=0.939$). Conclusion The cerebellar D-I nucleus is actively involved in the neural circuitry of motor learning, which is essential for both acquisition and performance of the classically conditioned eyeblink responses.

Key words: cerebellum; dentate-interpositus nuclei; eyeblink; conditioning; Muscimol

传统观念认为,小脑是重要的皮层下运动调节中枢。近期的研究提示,小脑还可能参与运动性学习过程。如小脑皮层在经典眨眼条件反射建立过程中发挥重要作用[1],但小脑深部核团,特别是齿状-中位核(dentate-interpositus nuclei)在上述过程中的作用仍存在较大争议[2,3]。研究证实,小脑深部核团主要接受来自小脑皮层蒲氏细胞的GABA能纤维投射,并有高密度的$GABA_A$受体表达[4,5]。药物研究则显示,$GABA_A$受体激动剂蝇蕈醇可以增加神经元胞体和树突的氯离子通透性,暂时抑制表达$GABA_A$受体的神经元活动[6]。为了确定小脑齿状-中位核在经典眨眼条

基金项目: 国家自然科学基金(30672255)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672255)
作者简介: 林 曦,男,重庆市渝中区人,硕士研究生,主要从事学习和记忆的神经生物学方面研究。E-mail: linxi_120@163.com
通信作者: 隋建峰,电话:(023)68753704
收稿日期: 2007-10-23;**修回日期:** 2007-12-20

件建立过程中的作用,本研究采用药物定量微注射的方法,利用蝇蕈醇可逆性失活双侧小脑齿状-中位核,观察豚鼠经典眨眼条件反射的建立情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选用健康雄性英国种豚鼠 12 只,体质量 350 ~ 450 g(由重庆医科大学实验动物中心提供),随机分为 2 组:①蝇蕈醇注射组(n = 6):在经典眨眼条件反射训练第 4 ~ 6 天注射蝇蕈醇(Muscimol,购于 Sigma 公司);②人工脑脊液注射组(n = 6):在经典眨眼条件反射训练第 4 ~ 6 天注射人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, aCSF)。实验期间,所有动物单笼饲养,自由饮水和进食,饲养环境保持 12 h 循环灯照。

1.2 手术

使用速眠新(0.3 ~ 0.4 ml/kg)肌肉注射麻醉动物,将其头部固定于脑立体定向仪上(SR-6N, Narishige, Japan)。常规消毒后,沿颅骨中线切开皮肤和皮下组织,切开范围为眼后至耳间的区域。在暴露的颅骨上钻开 6 个左右对称、直径约1.0 mm 的小孔(坐标:孔 1 和 2:前囟前 2.0 mm,双侧旁开 2.0 mm;孔 3 和 4:前囟后 8.0 mm,双侧旁开 2.0 mm;孔 5 和 6:前囟后 16.0 mm,双侧旁开 3.0 mm)。分别用 4 颗已消毒的不锈钢螺丝钉(直径:1.0 mm,螺距:400 μm,质量:0.3 g)反旋入 1-4 号小孔内。将 2 根 12 号注射器针头(长度:7.0 mm)制成的导管分别经 5、6 号小孔植入预定区域上方约 1.0mm 的位置(导管尖端深度约为硬膜下 4.0 ~ 4.5 mm)。牙科水泥固定导管基部,将经过修整并消毒的 6 号注射器针头(长度:5.0 mm)插入导管,封闭和保护导管末端。将矩形头部固定支架(大小:1.0 cm × 1.0 cm × 0.4 cm;材料:有机玻璃;重量:0.5 g)嵌合在 4 颗不锈钢螺丝之间,用牙科水泥固定。最后,采用 4 号手术缝线,在动物左侧上眼睑游离端缝一小结。术后给予动物必要的抗感染措施。恢复 1 ~ 2 周后,全身和眨眼状况恢复良好的动物进行行为训练。

1.3 行为训练

行为训练在隔光、隔音的屏蔽柜内进行。完整的训练周期包括 2 d 适应期和 10 d 训练期。适应期内,豚鼠被放置于有机玻璃制成的长方体固定盒(20 cm × 8 cm × 5 cm)中,通过固定盒前端孔洞将其头颈部露在盒外。使用四根耳杆顶住头颅固定支架,将豚鼠头部固定在脑立体定位仪(SN-1, Narishige, Japan)上。适应时间约 30 min,在此期间不给动物施与任何刺激。

训练期在适应期结束后 1 d 开始,连续进行 10 d。训练前,豚鼠固定方法同适应期。将气流喷嘴放置于正对豚鼠左侧眼角膜的位置,距离 1.0 cm。非条件刺激(unconditional stimulus, US)为一个持续 100 ms、压强为 3psi 的束状医用氧气流。条件刺激(conditional stimulus, CS)为持续 500 ms 的 2 kHz 正弦波纯音(声压强度:80 ~ 90 dB;升降时间:5 ms),由静电扬声器播放,并可触发视听分辨行为自动训练系统按照设定的参数释放医用氧气流[7]。配对训练时,CS 开始 400 ms 后,对左眼角膜施与 US,CS 和 US 同时结束。动物每天连续进行 5 组 CS 和 US 结合的配对训练,每组 10 次,每次配对训练间隔时间为 20 ~ 40 s(平均为 30 s)。

1.4 药物微注射

药物微注射在条件反射训练第 4 ~ 6 天进行。注射前,豚鼠固定方法同适应期。颅骨表面及导管周围进行常规消毒。取出左侧导管中的 6 号针头,在推进器控制下将已消毒的 1 μl 微量注射器针头缓慢插入左侧导管,至硬膜下 4.0 mm 开始注射药物。药物注射剂量为 1.75 ~ 2.25 μg 蝇蕈醇(溶于 0.7 ~ 0.9 μl 的 aCSF 中)或等体积的 aCSF,注射速度为 0.2 μl/min,留针 5 min。注射完毕后,将已消毒的 6 号针头重新放回导管中。右侧药物注射方法同左侧。双侧微注射结束 30 min 后开始行为训练。

1.5 眨眼测量

训练时,末端带有尼龙细线的蛙心夹夹住豚鼠左侧上眼睑游离缘的小结。尼龙细线另一端连接肌肉张力换能器(JZ101, XH, China)。眨眼活动引起的张力变化转换为电位波动,可以反映左侧上眼睑的活动情况。肌肉张力换能器转换的电信号与条件刺激信号由用多道电生理信号记录仪(Powerlab/4sp, ADInstrument, Australia)同步记录,采样频率为 20 kHz,采样软件为 Chart5。数字信号存储于微机中,并使用 Matlab 软件编制的程序处理和分析眨眼行为数据。显著的眨眼活动满足以下 2 标准:① 上眼睑活动值(时刻 t) ≥ 眼睑活动基线值 + 1 mV;②满足条件①的时间总和超过 15 ms。条件眨眼反应(conditioned response, CR)定义为 US 开始出现前 200 ms 这一阶段发生的显著眨眼活动。非条件眨眼反应(unconditioned response, UR)相关参数的定义如下:①UR 幅度:UR 曲线最大值与眼睑活动基线值之差。②UR 峰潜伏期:US 开始时刻与 UR 曲线最大值出现时刻之间的时间间隔。

1.6 定位

10 d 训练实验结束后,用戊巴比妥钠将豚鼠深度麻醉。将钨丝微电极推至导管尖端,用 1 mA 的直电流作用 30 s。麻醉动物经心脏灌注生理盐水 250 ml,再用 4% 多聚甲醛 500 ml 作灌注固定,取出小脑并置于 20% 蔗糖溶液中沉底,4 ℃保存。脑组织沉底后,作连续的冠状位冰冻切片,尼氏染色观察电损毁部位以确定药物注射位点。

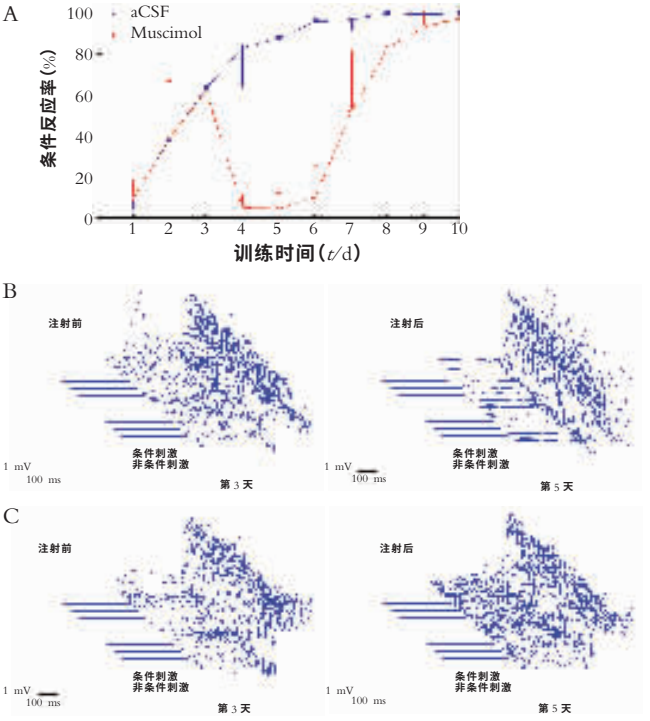
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件,多组样本间均值比较采用单因素方差分析,两组样本间均值比较采用独立样本或配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 小脑齿状-中位核失活对条件反应获得和表达的影响

条件反射训练前 3 天,Muscimol 注射组动物 CR 率与 aCSF 注射组无显著差别(t = −0.071, P_1 = 0.945; t = 0.055, P_2 = 0.958; t = −0.072, P_3 = 0.944),如图 1 所示,两组动物平均 CR 率在第 3 训练日均超过 60%。



A:小脑齿状-中位核 Muscimol 和 aCSF 微注射对眨眼条件反应率的影响; B:Muscimol 注射前后条件反应表达的对比;C:aCSF 注射前后条件反应表达的对比

图 1　小脑齿状-中位核 Muscimol 和 aCSF 微注射对眨眼条件反应的影响

条件反射训练第 4 ~ 6 天,Muscimol 注射组动物的 CR 率均低于第 3 天($t = -4.725$,$P_1 = 0.005$;$t = -4.909$,$P_2 = 0.004$;$t = -4.038$,$P_3 = 0.010$),如图 1 所示,下降程度分别为 57.0%、57.7% 和 52.0%,且这 3 d 内的 CR 率没有显著变化[$F(2,15) = 0.498$,$P = 0.618$]。相反,尽管 aCSF 注射组动物第 4 训练日的 CR 率较该组动物第 3 训练日的增加没有统计学意义($t = 2.421$,$P = 0.060$),但 CR 率仍增长了 20.0%;第 5、6 训练日的 CR 率则已显著高于第 3 训练日($t = 2.755$,$P_1 < 0.040$;$t = 3.796$,$P_2 < 0.013$),如图 1 所示,增加程度分别为 24.7% 和 32.7%。同时,aCSF 注射组动物第 4、5、6 训练日的 CR 率均显著高于 Muscimol 注射组动物相应训练日的 CR 率($t = -9.103$,$P_1 < 0.001$;$t = -10.863$,$P_2 < 0.001$;$t = -12.561$,$P_3 < 0.001$)。

条件反射训练第 7 天,Muscimol 注射组动物 CR 率相较于第 3 天 CR 率无统计学差别($t = -1.247$,$P = 0.268$),与 aCSF 注射组动物第 4 训练日 CR 率($t = -2.106$,$P = 0.061$)也无显著区别,但低于 aCSF 注射组动物训练第 7 天 CR 率($t = -3.627$,$P = 0.014$)。条件反射训练第 8 天,Muscimol 注射组动物 CR 率与 aCSF 注射组动物第 5 训练日 CR 率无显著区别($t = -0.441$,$P = 0.669$)。条件反射训练第 9、10 天,Muscimol 注射组动物 CR 率略低于 aCSF 注射组,但无统计学差别($t = -1.582$,$P_1 = 0.145$;$t = -1.400$,$P_2 = 0.220$)。

2.2　小脑齿状-中位核失活对非条件反应表达的影响

如图 2A 所示,不论是 aCSF 注射组还是 Muscimol 注射组动物,UR 幅度在 10 d 训练过程均无显著变化[$F(9,50) = 0.952$,$P_1 = 0.490$;$F(9,50) = 0.406$,$P_2 = 0.926$]。类似地,如图 2-B 所示,aCSF 注射组和 Muscimol 注射组动物 UR 峰潜伏期在 10 d 训练过程中也均无显著变化($F(9,50) = 0.888$,$P_1 = 0.542$;$F(9,50) = 0.381$,$P_2 = 0.939$)。

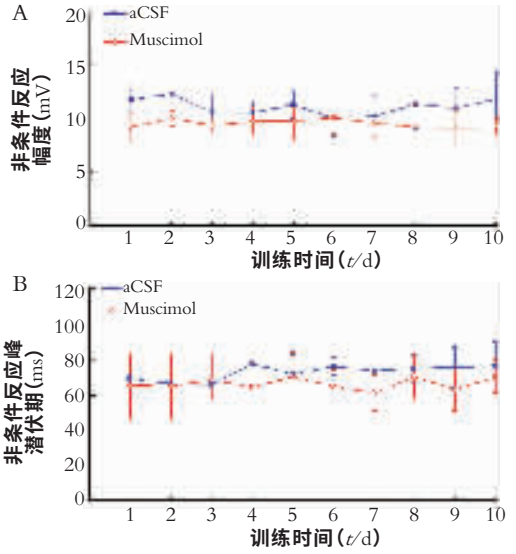
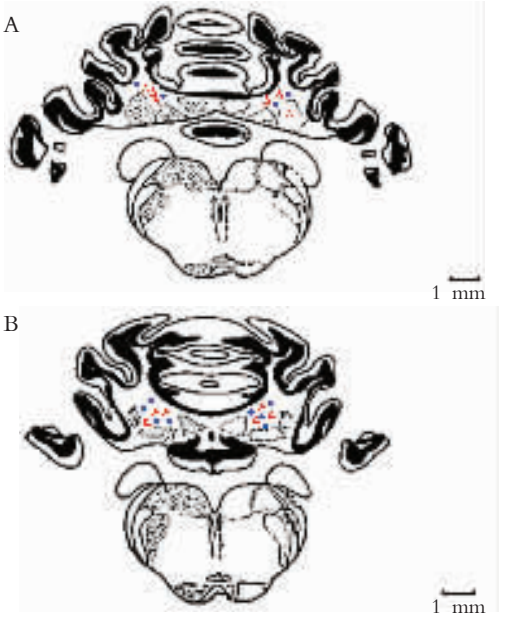


图 2　小脑齿状-中位核 Muscimol 和 aCSF 微注射对非条件反应幅度(A)和峰潜伏期(B)的影响

2.3　蝇蕈醇和人工脑脊液注射部位的定位

本实验利用组织学染色的方法鉴定注射导管尖端的位置。图 3 示意了所有动物注射导管尖端位置的分布。结果显示,导管尖端均处于预定部位。



A:前囟后 16.0 mm;B:前囟后 16.4 mm

Δ:Muscimol 注射组导管尖端位置;●:aCSF 注射组导管尖端位置

图 3　Muscimol 和 aCSF 注射部位的定位示意图

3 讨论

在学习和记忆的脑机制研究中,经典眨眼条件反射被广泛地用来探索与运动性学习功能有关的脑区及其机制。这是因为,在经典眨眼条件反射中,反映学习过程的条件反应和表现运动能力的非条件反应十分明确且便于分析。

研究表明,小脑齿状-中位核参与经典眨眼条件反射建立过程[8-10]。但是,齿状-中位核在经典条件反射建立过程中发挥何种作用仍存在较大争议。部分研究者认为,齿状-中位核是眨眼条件反射建立的关键位点之一,控制着眨眼条件反应的获得和表达[2,11,12]。但也有部分研究则显示,齿状-中位核不是运动性学习发生的部位,其作用仅限于运动信号输出,控制着眨眼反应的幅度[3,13]。诸多研究结果的不一致,可能是由于:①自由活动动物的使用限制了核团定位的精确度;②具有失活作用的药物的注射剂量较小,可能导致药物失活范围的过于局限(如仅限于核团的前部或后部);③具有失活作用药物的注射时间窗差异较大,不利于所得结果的比较。

针对上述问题,本研究选择在经典眨眼条件反射已经部分建立的时间点,对双侧小脑齿状-中位核注射较大剂量(5 μg/kg)的蝇蕈醇。这样既可以保证完全失活双侧齿状-中位核,又可以有效观察核团失活对眨眼条件反应获得和表达的影响。结果显示:①双侧小脑齿状-中位核注射蝇蕈醇使动物的 CR 率较注射前显著降低,提示已习得的条件反应的表达受到抑制;②蝇蕈醇注射组动物在停药后(即第 7 天)条件反应率仅相当于人工脑脊液注射组动物第 4 天水平,提示大剂量蝇蕈醇注射期间动物新眨眼条件反应的获得受到显著抑制。③蝇蕈醇注射组动物与人工脑脊液注射组非条件反应参数在药物注射期和无药物注射期均无显著差异,提示双侧小脑齿状-中位核注射蝇蕈醇对非条件反应的表达没有影响。④实验后,动物仅有轻微的共济失调症状,其他一般状况未见异常。以上结果提示,小脑齿状-中位核在眨眼条件反射建立过程中发挥重要作用,控制着眨眼条件反应的获得和表达,但对非条件眨眼反映的表达没有显著影响。

参考文献:

[1] Christian K M, Thompson R F. Neural substrates of eyeblink conditioning: acquisition and retention[J]. Learn Mem, 2003, 10(6): 427-455.

[2] Krupa D J, Thompson R F. Reversible inactivation of the cerebellar interpositus nucleus completely prevents acquisition of the classically conditioned eye-blink response[J]. Learn Mem, 1997, 3(6): 545-556.

[3] Jimenez-Diaz L, Navarro-Lopez Jde D, Gruart A, *et al*. Role of cerebellar interpositus nucleus in the genesis and control of reflex and conditioned eyelid responses[J]. J Neurosci, 2004, 24(4): 9138-9145.

[4] Voodg J, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum[J]. Trends Neurosci, 1998, 21(9): 370-375.

[5] Kalyuzhny A E, Dooyema J, Wessendorf M W. Opioid- and GABA(A)-receptors are co-expressed by neurons in rat brain[J]. Neuroreport, 2000, 11(12): 2625-2628.

[6] Krogsgaard-Larsen P, Johnston G A. Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds[J]. J Neurochem, 1978, 30(6): 1377-1382.

[7] 隋建峰, 高 洁, 罗 峻, 等. 适用于低等哺乳动物的视听分辨行为自动训练系统[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(1): 89.

[8] Ohyama T, Nores W L, Medina J F, *et al*. Learning-induced plasticity in deep cerebellar nucleus[J]. J Neurosci, 2006, 26(49): 12656-12663.

[9] Plakke B, Freeman J H, Poremba A. Metabolic mapping of the rat cerebellum during delay and trace eyeblink conditioning[J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 88(1): 11-18.

[10] Miller M J, Chen N K, Li L, *et al*. fMRI of the conscious rabbit during unilateral classical eyeblink conditioning reveals bilateral cerebellar activation[J]. J Neurosci, 2003, 23(37): 11753-11758.

[11] Krupa D J, Thompson J K, Thompson R F. Localization of a memory trace in the mammalian brain[J]. Science, 1993, 260(5110): 989-991.

[12] Aksenov D, Serdyukova N, Irwin K, *et al*. GABA neurotransmission in the cerebellar interposed nuclei: involvement in classically conditioned eyeblinks and neuronal activity[J]. J Neurophysiol, 2004, 91(2): 719-727.

[13] Sanchez-Campusano R, Grurat A, Delgado-Garcia J M. The cerebellar interpositus nucleus and the dynamic control of learned motor responses[J]. J Neurosci, 2007, 27(25): 6620-6632.

(编辑 王 红)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部