论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0406-03

清醒无制动豚鼠经典眨眼条件反射的建立及其习得规律研究

李 蕊[1],刘宏亮[1],隋建峰[2],范郑丽[2],黄率帅[2],万子兵[3],赵红梅[3] (第三军医大学:[1]西南医院康复理疗科;[2]基础医学部生理学教研室;[3]基础医学部教学实验中心,重庆 400038)

摘 要:目的 以眼肌电记录法记录在清醒无制动豚鼠建立经典眨眼条件反射(conditioned reflex,CR)并分析其习得规律。**方法** 采用金属电极埋植技术及简易"随动"气流给气刺激装置,以声音作为条件刺激(conditioned stimulus, CS),气流作为非条件刺激(unconditioned stimulus, US),以眼肌电判断其眨眼行为,在清醒无制动的豚鼠上进行经典眨眼条件反射的训练。**结果** 可顺利于豚鼠的内眦采集并记录到眨眼肌电信号,动物可成功建立经典眨眼条件反射,其第4天,第7天,第10天的CR习得率分别可达31%、61.33%、82.67%,第15天,第20天的CR保持率可达到81.33%和82.33%。**结论** 应用眼肌电记录技术及"随动"给气刺激方法可以在清醒无制动豚鼠建立经典眨眼条件反射实验。操作简单,方法可靠,成功率高,可用于对体型较大,不易固定动物的条件性眨眼行为研究。

关键词: 眨眼条件反射;豚鼠;眼肌电;习得率

中图法分类号: R322.91; R337.5; R338.61 **文献标识码:** A

Establishment of classical eyeblink conditioned reflex model in conscious and unfixed guinea pigs and study of related acquisition rule

LI Rui[1], LIU Hong-liang[1], SUI Jian-feng[2], FAN Zheng-li[2], HUANG Lu-shuai[2], WAN Zi-bing[3], ZHAO Hong-mei[3] ([1]Department of Rehabilitation and Physical Therapy, Southwest Hospital; [2]Department of Physiology, [3]Experimental Center of Experimental Teaching, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a model of classical eyeblink conditioned reflex (EBCR) in conscious and unfixed guinea pigs and to analyze the related acquisition rule. **Methods** With the aid of metal electrode embedding technique and simple follow-up air puff stimulus facility, conscious and unfixed guinea pigs were trained to performed EBCR with tone as conditioned stimulus (CS) and air puff as unconditioned stimulus (US). The eyeblink behavior was evaluated through electromyography (EMG) of musculi oculi. **Results** The eyeblink EMG signal of musculi oculi were successfully collected, and the classical eyeblink conditioning was obtained. The acquisition rate in the 4th, 7th, and 10th day were 31%, 61.3% and 82.7% respectively, and the maintain rate in the 15th and 20th day were 81.3% and 82.3%. **Conclusion** Conscious and unfixed guinea pigs can be trained to obtain EBCR with the techniques of musculi oculi EMG signal recording and follow-up air puff stimulating method. It is an easy, convenient, feasible, and reliable method with high achievement ratio. It could be applied to study conditioned eyeblink behavior of animals with big body type, or animals uneasy to be fixed.

Key words: eyeblink conditioned reflex; guinea pigs; eyeblink electromyography; acquisition rate

经典的眨眼条件反射(classical eyeblink conditioning)一直被广泛地用于联合型学习的神经生物学机制研究[1-3]。该反射基本训练过程是:条件刺激(conditioned stimulus,CS)与非条件刺激(unconditioned stimulus,US)反复配对呈现,训练动物学会对条件刺激产生行为条件反映(conditioned reflex,CR)[4]。为方便刺激和记录,传统的训练方法要求对动物头部甚至全身制动,这在体型较大且清醒的动物身上不易实现。本研究运用眼肌电记录及"随动"气流给气刺激装置,成功在清醒无制动的豚鼠上建立经典眨眼条件反射,并分析其习得及保持规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康豚鼠12只,雌雄不拘,体质量600~700 g(由第三军医大学实验动物中心提供),听力良好,无明显外耳道疾病,抽

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:李 蕊,女,湖南省长沙市人,硕士研究生,主要从事康复理疗学方面的研究。E-mail: 463036433@qq.com
通信作者:刘宏亮,电话:(023)68753704
隋建峰,电话:(023)68753704
收稿日期:2008-07-09;修回日期:2008-09-22

签法随机分为正常组(无配对组)和配对组,每组 6 只。动物单笼饲养,自由进水、进食,饲养环境保持干燥通风,自然光照。

1.2　方法

1.2.1　参考电极的埋植　　用速眠新 0.2 ~ 0.4 ml/kg 肌注对豚鼠进行全身麻醉后,将动物头部固定于脑立体定位仪上,常规备皮消毒,于头颅正中平坦处沿颅骨中线切开皮肤和皮下组织,长度约 1 cm, 暴露左侧颅骨。以牙科钻钻深度约 1 mm,直径约 2 mm 的小孔(坐标:前囟后 1.5 cm,旁开 3 mm)。用已消毒去除尖端的不锈钢螺钉 (直径:2 mm,螺距:500 μm,质量:0.3 g)旋入孔内,并用牙科水泥加固螺钉与颅骨的接触面,以防螺钉脱落,用无绝缘层的电极丝缠绕于螺帽前端作为参考电极的延长。此螺钉除可以作为参考电极和金属记录电极的固定支点外,还可以作为给气支架的固定点。

1.2.2　记录电极的埋植　　将直径为的 20 μm 两根绝缘金属电极,穿入 6 号金属针头并经头部切口处进针引至左侧眶上皮下,用针头刺破皮肤,将电极引出,退出金属针头。将引出的电极末端剥掉长约 1 mm 外部绝缘层,用显微镊将其弯曲成钩状,后由金属针头刺破处拉回,钩挂于软组织内,以确保金属电极在训练过程中不会因豚鼠的一般活动而位置发生改变。电极另一端缠绕于头部螺钉,并用 502 胶水粘固以防滑脱,尾部剥掉约 1 cm 外部绝缘漆后缠绕于去除尖端的 6 号金属针头上,作为记录系统的连接端。术后恢复 5 ~ 7 d,全身和眨眼情况恢复良好的豚鼠进行行为训练。

1.2.3　US 及"随动"给气刺激装置　　刺激气流由医用纯氧瓶提供高压纯氧,经减压阀严格调整至所需气压后输出至视听分辨行为自动训练系统[5],由该系统按照实验要求控制气流输出时间点及输出时程,气流管道经自制简易头部"随动"装置延伸至角膜前方。简易"随动"装置是由一可随意弯曲但有一定硬度的金属丝和固定夹焊接组成,实验时只需将固定夹夹在头部固定螺钉上,将金属丝弯曲成一定弧度至角膜前方,并将给气软管固定于金属丝上,沿金属丝走行直达角膜前方约 5 mm 处。

1.3　训练

行为训练在屏蔽柜内进行,训练周期包括适应期(2 d)和训练期(10 d)。豚鼠于清醒状态被置于屏蔽柜内的自制鼠箱中,安装"随动"给气刺激装置及连接信号采集记录线至记录系统,每天适应约 30 min,期间不给与任何刺激。适应期结束次日开始行为习得训练,连续 10 d,并于第 15、20 天进行 CR 保持的测试。条件刺激(CS):采用自编持续时间 350 ms,升降时间 5 ms 的正弦波纯音,CS 间隔在 15 ~ 30 s 之间随机变化,声压强度校正至 80 db,;非条件刺激(US):持续时间 200 ms,延搁时间 150 ms,气流强度校正为 3 psi 的纯氧气流。

2 组动物每天训练 50 次单声,正常组(无配对)的 CS、US 通过视听分辨行为自动训练系统[5]设置为各自随机出现,不配对;配对组在 CS 出现 150 ms 后给与 US,即 CS、US 配对出现。

以眶上电极作为记录电极,与 RM6280 型多道电生理信号采集系统(↖)连接,记录豚鼠眨眼肌电信号。信号采集与记录参数:带通 8 Hz 至 3 kHz,采样频率 10 kHz,扫描速度 80 ms/div,记录系统同步采集声音与气流信号,存储于电脑中。

1.4　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。多组样本间的均值比较采用多因素方差分析。

2　结果

金属电极均无脱落,可成功在眶上记录到眨眼肌电信号(图 1、2)。正常组(CS、US 无配对)在 US 后有明显的非条件反射(unconditioned reflex,UR)眨眼信号,该反应的出现与 CS 的出现无关;CS、US 配对组在行为训练的第 4 天即比第 1 天有明显多的 CR(先于 US 出现的主动眨眼活动)出现。随训练时间增加,CR 明显增加,于训练的第 10 天,CR 习得率达到 > 80%,眨眼条件反射成功建立,至第 15 天、第 20 天,CR 仍保持较高水平(图 3)。即配对组的 CR 习得率随时间的而升高,而无配对组则无相应规律。另外,2 组均可偶见动物对声音的早期惊吓反应,称之为 α 反应(α wave),其特点是潜伏期短,一般出现在声音起始后的 80 ms 以内,与声音的强度有关。

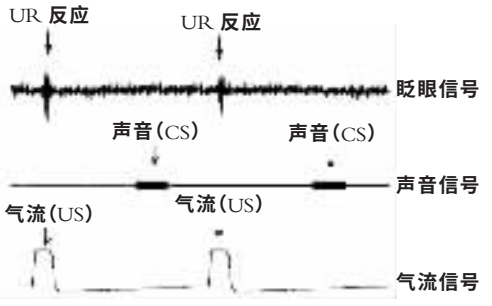


图 1　非配对组记录到的眨眼信号

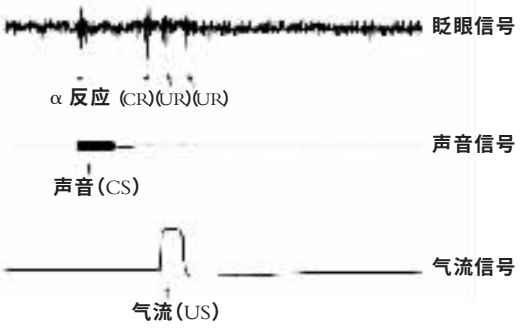


图 2　配对组记录到的眨眼条件反射

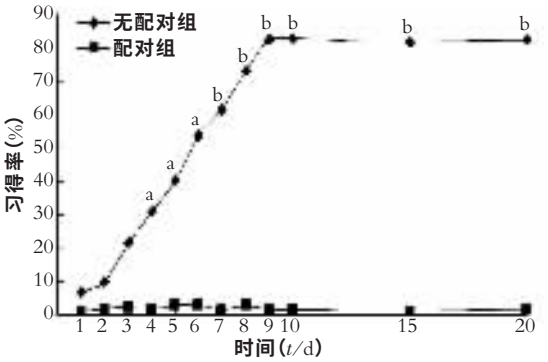


图 3　2 组豚鼠眨眼条件反射习得率的比较

统计结果显示:配对组与非配对组比较,CR 习得率在第 4~20 天均有显著或非常显著差异($P<0.05$,$P<0.01$);在配对组内部,与训练第 1 天的成绩相比,第 4 天开始有显著性差异($P<0.05$),第 7 天后开始有非常显著性差异($P<0.01$)。

3 讨论

经典眨眼条件反射模型在小脑运动学习研究领域被广泛采用[4],眨眼是一个重要的行为模型[6]。目前对眨眼行为的测量有很多方法,如采用图像分析测量、磁性感应线圈直接测量[7,8],但这 2 种方法对实验条件要求高、操作复杂、重复性差。目前最常采用的一种方式是张力传感器法,即利用张力换能器将眨眼活动引起的肌肉活动转换为电位波动后记录,虽然该方法能直观地反应眨眼行为,但由于张力换能器的体积较大、质量相对较大,不易在清醒无制动的小动物头部安装可以"随动"的张力换能器,故采用张力换能器记录眨眼信号时多要求动物头部制动,采用外置法(安装在动物体外的实验台上)固定张力换能器[6]。这使得动物处于非生理状态,实验结果存在干扰;另一方面,为实现将眨眼活动通过张力换能器采集,需采用蛙心夹夹住动物眼睑,长时间的实验过程易造成眼睑水肿等损伤,影响实验进程及结果。最后,张力换能器与蛙心夹之间的连接线的自身张力及频繁牵拉的影响,也可能造成实验测量的误差。

本研究结果提示采用眼肌电记录及随动给气训练方法同样可以使动物成功习得经典眨眼条件反射,其 CR 习得率与传统张力传感器法接近。值得注意的是,实验中 CR 习得率的高低受众多因素包括 US 大小、时程、潜伏期、给气管位置、下眼睑是否牵拉等影响,另外肌电信号分析处理程序中对眨眼的认定标准也可大大影响实验结果。所以,在不同实验参数条件下习得率有一定差异,结果的比较应该在严格控制各实验参数的前提下进行。

采用眼肌电记录眨眼行为的方法,其优点在于:首先,金属电极质量轻体积小,仅仅使用小号注射针头就可将其埋植,手术创伤的范围和程度大大降低,减少了感染机会,且不会导致动物眼睑水肿等损伤,为成功建立经典眨眼条件反射创造了条件。其次,在电极固定于实验动物眼睑后的较短时间内,动物就会对其逐渐适应,保证动物处于一种相对自然的生理状态。最重要的是,采用眼肌电记录时记录过程不受动物头部活动的影响,实现了清醒无制动记录。但其缺点在于:电极直接置于眼轮匝肌内,电极的位置有可能会随动物的眨眼活动或头部活动发生移位甚至脱落。本实验采用弯曲电极尖端的方法,将电极钩挂在软组织内,使移位的发生概率大大减小,从而能稳定长时间地记录眨眼条件反射的眨眼肌电信号。另一缺点是采用眼肌电信号判定眨眼幅度不够直观,需后期将肌电信号进行转换和叠加处理为直观的"收缩"曲线,以便比较。

在实现动物头部的自由活动不影响信号记录的基础上,为保证动物的眨眼 CR 训练成功,还需要解决另一问题——气流对角膜的刺激不能受头部活动的影响,即实现"随动"的气流给气刺激。我们采用自制给气支架,成功解决了这一问题。该装置制作简单,体积小,重量轻,不易脱落,安装简易,无需手术,随时拆卸。可根据动物的大小调节支架的弯曲度、长度及给气气管的长度,实现随动物头部的活动的"随动"气流刺激。应用中要严格掌握气流大小,并可靠固定给气支架,否则对实验结果例如 CR 习得率易造成较大影响。

本研究实现了眨眼信号记录和惩罚刺激装备均可完全"随动"的实验要求,相关技术也可用于高级哺乳类清醒无制动实验动物(如灵长类动物)的研究。

参考文献:

[1] Nokia M S, Penttonen M, Korhonen T, *et al*. Hippocampal theta (3 – 8 Hz) activity during classical eyeblink conditioning in rabbits[J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 90(1): 62 – 70.

[2] Linden D J. Neuroscience. From molecules to memory in the cerebellum[J]. Science, 2003, 301(5640):1682 – 1685.

[3] Johnson T B, Stanton M E, Goodlett C R, *et al*. Eyeblink classical conditioning in the preweanling lamb[J]. Behav Neurosci, 2008, 122(3): 722 – 729.

[4] 韩太真,吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1998:191 – 203.

[5] 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.

[6] 马原野,王建红. 认知神经科学原理和方法[M]. 重庆:重庆出版社,2003:365 – 367.

[7] Thompson LT, Moyer J R Jr., Akase E, *et al*. A system for quantitative analysis of associative learning. Part 1. Hardware interfaces with cross-species applications[J]. J Neurosci Methods, 1994, 54(1):109 – 117.

[8] Bour L J, Aramideh M, de-Visser B W. Neurophysiological aspects of eye and eyelid movements during blinking in humans[J]. J Neurophysiol, 2000, 83(1):166 – 176.

(编辑 汪勤俭)