论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1732-04

不同眼轮匝肌活动记录方法对豚鼠痕迹性眨眼条件反射建立的影响

杨 丽,胡 波,范郑丽,黄率帅,陈 浩,隋建峰 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 比较不同眼轮匝肌活动记录方法对豚鼠痕迹性眨眼条件反射建立的影响。**方法** 采用350 ms正弦波纯音和100 ms束状氧气流的配对刺激,训练豚鼠建立痕迹性眨眼条件反射。在此过程中,分别使用张力换能器和金属微电极记录眼轮匝肌活动,并使用我室编制的Matlab软件分析眨眼行为数据。**结果** 2种记录方法条件下,豚鼠均能建立痕迹性眨眼条件反射,但应变片组动物条件眨眼反应的习得速率相对于肌电图组更快($P<0.05$)。此外,条件反射训练第10天,应变片组动物条件反应峰潜伏期显著迟于肌电图组($P<0.05$)。**结论** 相对于肌电图记录法,应变片记录法是一种更适合于豚鼠联想型学习神经生物学机制研究的记录方法。

关键词: 痕迹性条件反射;眨眼;眼轮匝肌;豚鼠
中图法分类号: R33-33;R337.5;R339.141 **文献标识码:** A

Effects of different recording methods for orbicularis oculi muscle activity on acquisition of trace eyeblink conditioning in guinea pigs

YANG Li, HU Bo, FAN Zheng-li, HUANG Lu-shuai, CHEN Hao, SUI Jian-feng (Department of Physiology, College of Basic Medicine Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different recording methods for orbicularis oculi muscle activity on the acquisition of trace eyeblink conditioning in guinea pigs. **Methods** A 350 ms tone conditioned stimulus (CS) was paired with a 100 ms corneal oxygen-puff unconditioned stimulus (US). The guinea pigs were trained for 10 consecutive sessions of trace eyeblink conditioning. During the experiments, a spring-return potentiometer or a metal microelectrode was used to detect the activity of orbicularis oculi muscle. Homemade software written under the Matlab environment was used to quantitatively analyze the behavioral data. **Results** Both groups of guinea pigs acquired the trace conditioned eyeblink responses (CRs). However, the animals using the spring-return potentiometer acquired the trace CRs more quickly compared with the animals using the microelectrode ($P<0.05$). In addition, the CR peak latency of the animals with potentiometer was significantly later than that of the animals with metal microelectrode on session 10 ($P<0.05$). **Conclusion** Relative to the orbicularis oculi electromyogram, the spring-return potentiometer is more suitable for studying the neurobiological mechanisms underlying associative learning in guinea pigs.

Key words: trace conditioning; eyeblink; orbicularis oculi muscle; guinea pigs

痕迹性眨眼条件反射(trace eyeblink conditioning, TEBC)模型广泛运用于联想型学习(associative learning)的神经生物学机制研究[1]。精确记录受试动物眼轮匝肌活动是这类研究中的关键技术。常用的眼轮匝肌活动观测方法主要包括应变片记录法和肌电图记录法[2]。实验者可根据实验动物解剖和生理特点的不同,选择相对理想的记录方法。例如,使用家兔的研究中多选择应变片记录法,而使用小型啮齿类动物的研究则常选用肌电图记录法。目前,这2种记录方法对同种动物TEBC建立的观察效果是否存在差异尚不清楚。本课题组近期成功地建立了豚鼠TEBC模型[3,4]。在此,我们将进一步比较不同眼轮匝肌活动记录法对

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: 杨 丽,女,山西省运城市人,助理实验员,主要从事学习和记忆的神经生物学方面的研究。电话:(023) 68752253, E-mail: tmmuyangli@sina.com
通信作者: 隋建峰,电话:(023) 68753704, E-mail: jfsui2003@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-01-08;**修回日期:** 2009-02-22

豚鼠 TEBC 建立的影响,为后期联想型学习过程中神经元信息编码机制研究确定合适的眼轮匝肌活动记录方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物

实验选用健康雄性英国种白化豚鼠 14 只,体质量 400 ~ 500 g[由重庆医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2007-0001],按随机抽签法分为 2 组:应变片组(n = 7),肌电图组(n = 7)。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

用 1% 戊巴比妥钠(0.6 ml,腹腔注射)和速眠新Ⅱ(0.1 ml,肌肉注射)复合麻醉动物,并将其头部固定于脑立体定向仪上(SR-6N,Narishige 公司,日本)进行手术。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。对于应变片组动物,在暴露的颅骨上钻开 4 个左右对称、直径约 1.0 mm 的小孔(坐标:孔 1 和孔 2:前囟前 2.0 mm,双侧旁开 2.0 mm;孔 3 和孔 4:前囟后 8.0 mm,双侧旁开 2.0 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 号小孔内作为牙科水泥固定的支点。矩形头部固定支架(1.0 cm × 1.0 cm × 0.5 cm,有机玻璃,质量 0.5 g)嵌合在 4 颗不锈钢螺丝之间,用牙科水泥固定。对于肌电图组动物,将 1 根尖端裸露 0.5 mm、直径 100 μm 的金属微电极埋置在左侧上眼睑皮下。在颅骨枕部钻开 1 个直径约 1.0 mm 的小孔(坐标:前囟后 5.0 mm,右侧旁开 2.0 mm),并用 1 颗已消毒的不锈钢螺丝钉反旋入颅骨作为参考电极。最后,牙科水泥覆盖伤口。术后给予动物必要的抗感染措施。休息 1 周后,对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固定盒中,通过固定盒前端孔洞将其头颈部露在盒外。对于应变片组动物,使用 4 根耳杆顶住头颅固定支架,将其头部固定在脑立体定位仪上。对于肌电图组动物,其头部活动相对自由。适应时间约 30 min,在此期间不给动物施予任何刺激。

训练期在适应期结束后 1 d 开始。训练时,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(unconditioned stimulus, US)为 1 个持续 100 ms、压强为 20 kPa 的束状医用氧气流。条件刺激(conditioned stimulus,CS)为 1 个持续 350 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,并可触发智能通气控制系统按照设定的参数释放医用氧气气流[5]。配对训练时,CS 结束 250 ms 后,对左眼角膜施予 US。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　眼轮匝肌活动记录

应变片组动物训练时,末端带有尼龙细线的蛙心夹夹住豚鼠左侧上眼睑。尼龙细线另一端连接肌肉张力换能器(JZ-101,北京新行)。眼轮匝肌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。肌电图组动物训练时,金属微电极可以记录眼轮匝肌活动引起的肌电图信号变化,以此反映左侧上眼睑的活动情况。左侧上眼睑活动信号、CS 信号以及 US 信号用多道电生理信号记录仪(PowerLab/4SP,AD-Instrument 公司,澳大利亚)同步记录,采样频率为 20 kHz,采样软件为 Chart 5.4.2。眼肌电信号采样的带通(band pass)为 100 ~ 3 000 Hz。数字信号存储于微机中,并使用 Matlab 6.5 软件编制的程序处理和分析眨眼行为数据。

1.5　数据分析

肌电信号的转换方法参考文献[6]。显著的眨眼活动满足以下标准:① 上眼睑活动值(时刻 t)≥眼睑活动基线值 + 4 倍眼睑活动基线值标准差;② 满足条件①的时间总和超过15 ms。条件眨眼反应(conditioned eyeblink response,CR)和非条件眨眼反应(unconditioned eyeblink response,UR)分别定义为 US 开始前或开始后 500 ms 这一阶段发生的显著眨眼活动。眨眼参数定义:① CR 峰潜伏期:CS 开始与 CR 最大时刻之间的时间间隔;② CR 持续时间:CR 开始与结束之间的时间间隔;③ UR 峰潜伏期:US 开始与 UR 最大时刻之间的时间间隔;④ UR 持续时间:UR 开始与结束之间的时间间隔。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。2 组之间条件反应习得率的比较采用混合设计的双因素方差分析,眨眼反应拓扑学参数的比较采用独立样本 t 检验。

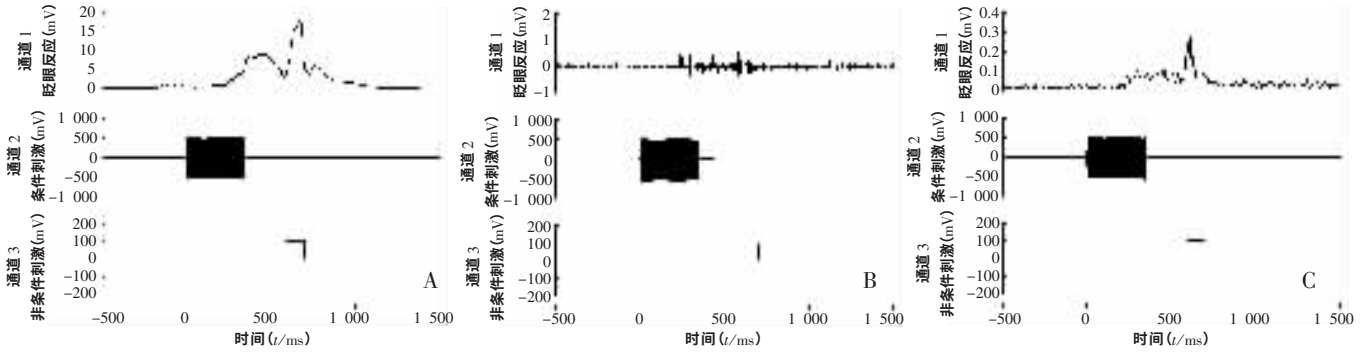
2　结果

2.1　豚鼠眼轮匝肌活动的记录效果

图 1 显示了应变片组和肌电图组豚鼠在痕迹性眨眼条件反射训练过程中的头部固定。实验过程中,动物对固定适应良好。实验结果显示,2 种眼轮匝肌活动记录法都可记录豚鼠的眨眼反应,且记录信号的信噪比较高。图 2A、B 分别显示了应变片法和肌电图法记录的眨眼反应信号(通道 1)、纯音条件刺激信号(通道 2)和角膜吹气非条件刺激信号(通道 3)。时刻 0 表示条件刺激开始的时刻。由于肌电信号不能直接显示眨眼反应的拓扑学特征,因此在数据分析前必须将肌电信号进行转换。图 2C 则显示了图 1B 中眼肌电信号的转换图像(通道 1)。

2.2　不同眼轮匝肌活动记录方法对条件反应习得率和眨眼反应拓扑学参数的影响

条件反射训练第 10 天,应变片组动物 CR 率为(80.0 ± 4.3)%,而肌电图组动物 CR 率为(60.3 ± 2.4)%。这些结果表明,2 组动物经过 10 d 的训练均可建立稳定的痕迹性眨眼条件反射,但应变片组动物 CR 的习得速率较肌电图组更快[P = 0.011,图 3]。表 1 进一步比较了 2 种方法在训练第 10 天记录的眨眼反应拓扑学参数的差异。结果显示,2 种方法记录的 UR 拓扑学参数和 CR 持续时间并无显著区别,但应变片组动物 CR 峰潜伏期显著迟于肌电图组[P = 0.036,表 1]。应当指出,由于 2 种方法记录眨眼反应幅度的单位差异,故未能在此处对二者进行比较。



A:应变片记录图;B:肌电图记录图;C:肌电图信号整合图

图 2　豚鼠痕迹性眨眼条件反射训练时的多通道信号记录



A:应变片组;B:肌电图组

图 1　豚鼠在痕迹性眨眼条件反射训练时的头部固定

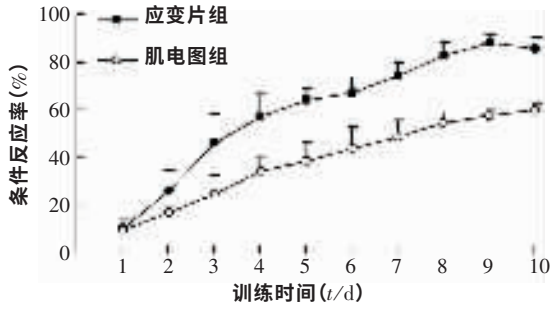


图 3　不同眼轮匝肌活动记录方法对豚鼠痕迹性眨眼条件反射习得率的影响

表 1　不同眼轮匝肌活动记录方法对训练第 10 天豚鼠眨眼反应拓扑学参数的影响（ms,$n=7$, $\bar{x}\pm s$）

组别	CR 峰潜伏期	CR 持续时间	UR 峰潜伏期	UR 持续时间
应变片组	398.9 ± 20.7[a]	389.3 ± 24.5	58.9 ± 4.9	353.7 ± 37.2
肌电图组	339.4 ± 14.3	395.4 ± 28.5	60.0 ± 5.1	370.7 ± 40.9

a: $P<0.05$,与肌电图组比较

3　讨论

应变片监测的是一个与眼睑位置相对应的电压,而眼肌电图监测的是眼睑肌的肌电活动而非眼睑的位置。由于眼睑肌的收缩是使上眼睑闭合唯一的力,因而在眼睑闭合时眼肌电图与眼睑的运动是关联的[2]。目前,2 种技术均是评判、估计眼轮匝肌活动的常用方法。本研究的目的就在于比较此 2 种眼轮匝肌活动记录方法对痕迹性眨眼条件反射观察效果的异同。

经典眨眼条件反射(classical eyeblink conditioning,EBC)的训练过程如下:CS(声音信号)与 US(角膜吹气)反复配对出现。训练初期,动物仅能被 US 诱导出 1 个反射性的 UR。训练后期,动物逐渐能够被 CS 诱导出 1 个 CR。CR 的生物学意义在于减轻有害刺激造成的伤害,保护眼角膜[1]。作为一种协调性反应,CR 的拓扑学特征表现出较大的可塑性,如其幅度和持续时间随训练次数增加而增高或延长,其峰潜伏期也逐渐向 US 开始时刻位移。本研究结果显示:①相对于肌电图组,使用应变片记录法的豚鼠更容易习得眨眼条件反射;②训练第 10 天,应变片组豚鼠 CR 的峰潜伏期比肌电图组更加靠近 US 的开始时刻,表现出了更好的时间适应性。

根据 CS 和 US 出现时间上是否重叠,EBC 又可以分为延迟性眨眼反射(delay eyeblink conditioning, DEBC)和痕迹性眨眼反射(trace eyeblink conditioning, TEBC)。在 DEBC 中,CS 先于 US 出现,并与 US 同时结束;而在 TEBC 中,CS 结束与 US 开始出现之间存在 1 个刺激间隔期[1]。一般认为,DEBC 建立依赖于小脑[7,8]。但是,刺激间隔期的存在增加了中枢神经系统将 CS 和 US 联系起来的难度,因此 TEBC 的建立还需要前脑结构(如海马和前额叶皮层)的参与[9-11]。研究表明,意识在 TEBC 的建立过程中发挥重要作用[12]。已有文献报道应变片系统会干扰眼睑运动[2]。因此,我们推测可能是由于应变片对眼睑的机械牵拉所造成的动

物不适,使动物提高意识水平,从而更容易发现CS和US之间的关联。综上所述,尽管存在一定的缺陷,应变片记录法仍更适于对某些动物(如豚鼠)痕迹性眨眼条件反射建立的观察。

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] 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.
[3] Hu B, Lin X, Xiong Y, *et al*. Activity of single granule cell in the dentate gyrus of guinea pig during the consolidation of trace eyeblink conditioned responses[J]. Prog Biochem Biophys, 2006, 33(11): 1051-1060.
[4] 林 曦, 胡 波, 万子兵, 等. 一种简易的豚鼠眨眼反应测量方法[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2340-2342.
[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] Knuttinen M G, Parrish T B, Weiss C, *et al*. Electromyography as a recording system for eyeblink conditioning with functional magnetic resonance imaging[J]. Neuroimage, 2002, 17(2): 977-987.
[7] Linden D J. Neuroscience. From molecules to memory in the cerebellum[J]. Science, 2003, 301(5640): 1682-1685.
[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] Green J T, Arenos J D. Hippocampal and cerebellar single-unit activity during delay and trace eyeblink conditioning in the rat[J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 87(2): 269-284.
[10] Tseng W, Guan R, Disterhoft J F, *et al*. Trace eyeblink conditioning is hippocampally dependent in mice[J]. Hippocampus, 2004, 14(1): 58-65.
[11] McLaughlin J, Skaggs H, Churchwell J, *et al*. Medial prefrontal cortex and pavlovian conditioning: trace versus delay conditioning[J]. Behav Neurosci, 2002, 116(1): 37-47.
[12] Shors T J. Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness[J]. Trend Neurosci, 2004, 27(5): 250-256.

(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2009)18-1735-01

个案与短篇

手足口病并发症21例临床分析

杨桂芝[1],伍欲荣[2],韦艳芬[2] ([1]柳州医学高等专科学校护理系,广西 柳州 545006; [2]柳州市工人医院手足口病专科病房,广西 柳州 545005)

手足口病是由多种肠道病毒引起的常见传染病,主要侵犯5岁以下的婴幼儿。大多数患儿症状轻微,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要特征,多数患者可以自愈。少数患儿并发无菌性脑膜炎、脑炎、肺水肿、肺出血、呼吸道感染和心肌炎等[1],个别重症患儿病情进展快,易发生死亡。柳州市工人医院自2008年3月至2009年3月共收治手足口病患儿228例,出现重症并发症的21例,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

21例手足口病并发症患儿,男性17例,女性4例,年龄最大4岁1个月,最小为10个月,平均1岁9个月。入院后常规做心电图、心肌酶、免疫球蛋白、胸片等检查,对有神经系统症状者做脑电图、头颅MRI检查。21例患儿并发肠炎者7例;心肌酶异常者3例,提示并发心肌炎;胸片示支气管肺炎2例;CT检查提示单纯肺水肿5例,肺出血并肺水肿3例;脑电图异常者1例,提示并发脑水肿。

作者简介:杨桂芝,女,河北省青龙县人,硕士,副教授,主要从事护理学方面的研究,发表论文22篇。电话:(0772)2614072, E-mail: yangguizhi55@163.com

收稿日期:2009-04-22;修回日期:2009-06-10

1.2 临床特点

21例手足口病患儿均在5岁以下,病情均较重,大多起病急,体温38.7~40.2(39.23±0.51)℃;发热至出现并发症时间1~4(2.45±0.92)d,热型不规则。本组病例均出现不同程度面色苍白或发灰,四肢发凉,口周、口唇、手指和脚趾发绀,脉搏浅速或减弱。皮疹为斑丘疹和疱疹,主要分布在手掌食指内侧、双侧足底、臀部等部位。窦性心动过速。呼吸急促18例(85.71%),表现为呼吸急促、心率增快、鼻翼扇动、三凹征明显;呼吸缓慢3例(14.29%)。血压升高9例(42.86%),下降或测不到11例(52.38%)。口腔黏膜出现散在的疱疹18例(85.71%),可见咽部充血,年长儿自诉咽部疼痛;口腔两峡部未见明显红斑及丘疹3例(14.29%);双下肢可见大理石样花纹1例(4.76%)。呕吐17例(80.95%),呕吐物为胃内容物,非喷射性,其中1例呕吐物为咖啡色液体。自诉头痛或头痛表现7例(33.33%);患儿表现为哭吵或嗜睡、易惊、肢体抖动,甚至惊厥和肌张力增高15例(71.43%),查体有颈部抵抗感、腱反射减弱、病理征阳性;出现昏迷和抽搐1例(4.76%),尿酮体增高2例(9.52%)。

1.3 治疗方法

给予干扰素抗病毒治疗;短期强的松龙冲击疗法,抑制炎症反应;静脉输注免疫球蛋白,应用甲氰吡酮注射液,改善心脏

(下转1739页)