文章编号:1000-5404(2011)11-1103-03

论著

硬脑膜上微电极植入并记录家猫视皮层电活动

刘 娜[1],石卫卫[2],陈丽峰[1],侯文生[2],阴正勤[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心[1];400004 重庆,重庆大学生物工程学院生物流变科学与技术教育部重点实验室[2])

【摘要】 目的 建立初级视皮层区硬脑膜上柔性微电极阵列记录视皮层电活动的方法,比较黑白棋盘格图形和黑白闪烁刺激在诱发视觉诱发电位(visual evoked potential,VEP)方面的差异。**方法** 成年健康家猫 5 只,静脉持续麻醉,肌松、呼吸机人工通气,采用自行设计的柔性微电极阵列,微创植入并固定于视皮层定位区的硬脑膜上。比较无视觉刺激和有视觉刺激的视皮层电活动,验证是否能记录到 VEP;给予闪光和图形视觉刺激,记录和比较视觉诱发电位的峰值和潜伏期。**结果** 通过微创手术将微电极阵列植入并固定在视皮层定位区的硬脑膜外;在硬脑膜外微电极阵列可记录到有效 VEP;黑白棋盘格图形刺激与黑白闪烁刺激相比,前者诱发的 VEP 谷峰值显著高于后者($P<0.01$),而诱发的 VEP 波谷潜伏期较后者长($P<0.05$),且波峰潜伏期则显著长于后者($P<0.01$)。**结论** 在视皮层定位区硬脑膜外首创的微创植入并固定柔性微电极阵列的方法适用性、重复性好,黑白棋盘格图形刺激优于黑白闪烁刺激,经硬脑膜外利用微电极阵列记录诱发电位是可行的。

【关键词】 硬脑膜外;微创手术;柔性微电极阵列;视皮层假体;视觉诱发电位
【中图法分类号】 R338.25;R338.8 **【文献标志码】** A

Recording visual cortex electrical activity through flexible microelectrode array implanted on duramater endocranium of cats

Liu Na[1], Shi Weiwei[2], Chen Lifeng[1], Hou Wensheng[2], Yin Zhengqin[1] ([1] Center of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2] Key Laboratory of Biorheological Science and Technology of Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400004, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a new experiment method for recording visual cortex electrical activity through flexible microelectrode array being implanted on the duramater endocranium above visual cortex, and compare the difference between the visual evoked potential (VEP) evoked by black and white flare and that evoked by black and white checker. **Methods** A total of 5 health adult cats of both sexes were anesthetized, and artificially ventilated by breathing machine. Then flexible microelectrode array designed by our group was implanted on the epidural area outside of visual cortex location region. The results of visual cortex electrical activity evoked by without any visual stimulus or with visual stimulus was compared in order to record VEP. Then flash (black and white flare, F) and graphic (black and white checker, P) visual stimuli were given to record VEPs. **Results** The microelectrode array was implanted on the epidural area outside of visual cortex location region by the minimally invasive surgery. Valid VEP records were obtained by flexible microelectrode array in the epidural area. The valley-peak value of P-VEP was higher than that of F-VEP ($P<0.01$). The delitescence of valley and peak of P-VEP was longer than that of F-VEP ($P<0.05, 0.01$). **Conclusion** Our microinvasive surgery procedure to implant and fix flexible microelectrode array on the duramater endocranium above visual cortex is of good adaptivity and reproducibility. The array is feasible to record VEP. VEPs evoked by black and white checker stimuli is better than those by flash light stimuli.

【Key words】 epidural area; microinvasive surgery; flexible microelectrode array; visual cortex prosthesis; visual evoked potential

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program, 2007AA04Z324). Corresponding author: Yin Zhengqin, Tel: 86-23-68754401, E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn

视觉假体,亦称“电子眼”,是使失明患者复明最有希望的治疗方法。依其微电极阵列置于视觉通路的部位,分为视网膜假体、视神经假体、视皮层假体。其中视皮层假体因其旁路了视网膜、视神经等视觉通路,最为广泛地适用于盲人。

既往的视皮层假体,其重要组成部分微电极阵列

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(863 计划,2007AA04Z324)
【通信作者】 阴正勤,电话:(023)68754401,E-mail:qinzyin@yahoo.com.cn

被植入视皮层内[1-4]或置于视皮层表面[5-7]，植入及操作带来了很多严重的并发症，比如对皮层组织的直接损伤、神经组织的排斥反应、脑脊液漏、感染等，并且更换非常不易。本研究小组将微电极阵列置于视皮层对应区的硬脑膜上，规避了以上风险，同时使电极更换更加容易。既往的微电极阵列植入和固定的方法多集中在视皮层内或其表面，在硬脑膜上植入固定柔性微电极阵列鲜见报道。视觉诱发电位（visual evoked potential，VEP）是刺激视网膜时在大脑视皮层内产生的生物电，按刺激光形态的不同可以将视觉诱发电位分为闪光视觉诱发电位（F-VEP）和图形视觉诱发电位（P-VEP）。F-VEP是指用非图形的闪光作为视觉刺激诱发的视皮层电反应，P-VEP是指用图形（如棋盘格、条栅、随机点等）作为视觉刺激诱发的视皮层电反应，其中以棋盘格图形翻转视觉诱发电位可重复性高、易记录、波形易分析，所以应用最为广泛[8-9]。本实验应用自行设计并加工的微电极阵列植入并固定于硬脑膜外观察是否能记录到有效的视觉诱发电位，从而为硬脑膜外视皮层假体的研究奠定实验基础。

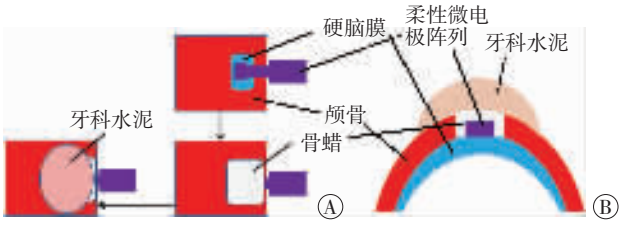
1　材料与方法

1.1　动物准备及麻醉

成年家猫（$n=5$，体质量2.0～3.0 kg）同等条件下喂养，实验前精神、食欲好，无腹泻、打喷嚏等症状。实验动物及实验使用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。以速眠新Ⅱ（氟哌啶醇、保定宁、双氢埃托啡等药物制成的复方制剂，中国长春军需兽医研究所出品，0.3 ml/kg，肌肉注射）为诱导麻醉药，并予以硫酸阿托品注射液（0.2 mg/kg，皮下注射）减少腺体分泌，地塞米松注射液（1.5 mg/kg，肌肉注射）减少脑组织水肿。实验过程中静脉通道泵入：乌拉坦溶液[20 mg/（kg·h）]、三碘季胺酚溶液[10 mg/（kg·h）]。气管插管，呼吸机维持呼吸。吸入气体为O_2∶CO_2（95%∶5%）气体，潮气量13.57 ml/kg。猫的心率、心电图、肛温持续监测，保证动物在实验过程中生命体征平稳。实验结束后，予以30%的乌拉坦溶液静脉推入以安乐死。

1.2　手术操作

猫固定于立体定位仪上，头顶部手术区备皮、消毒。正中线切开头皮、分离筋膜，充分暴露颅骨，立体定位仪定位出猫右侧（本实验的柔性微电极阵列均植入的右侧初级视皮层对应区的硬脑膜外）初级视皮层硬脑膜外投射区域的开颅区，医用电动骨钻磨去开颅区四边线颅骨至硬脑膜，弯嘴钳取走游离骨，特别注意保护其下的硬脑膜完整。在开颅区同侧的头皮上开口，将柔性微电极阵列焊靶端留于头皮外，体部走行于皮下，电极端植入硬脑膜表面，以骨蜡填充覆盖、压平，使电极端贴在硬脑膜上，骨蜡上及其周边颅骨涂牙科水泥，使其与周边颅骨黏贴、固定（图1）。猫的双眼佩戴隐形角膜接触镜，保护角膜。检影镜验光后用镜片矫正屈光不正，双眼视网膜投影于正前方的视觉刺激显示屏上，调节显示屏位置和高度，使黄斑区投影位于显示屏中央部。



A：俯视图；B：侧视图

图1　植入柔性微电极阵列的示意图

1.3　柔性微电极阵列及视觉刺激

柔性微电极阵列为4个电极点，材料为：基于聚酰亚胺的柔性芯片，电极端外观大小：2.5 mm×5.5 mm，每个电极直径：250 μm，已通过组织相容性及安全性实验验证其可靠性[10]。

本实验选择LabVIEW虚拟仪器软件设计视觉刺激器。用LabVIEW设计刺激图形：黑白闪烁翻转刺激：翻转频率1 Hz，对比度98%；黑白棋盘格翻转刺激图形，参数：空间频率为1°，翻转频率1 Hz，对比度98%。

1.4　信号记录与分析

采用多通道电生理记录仪进行视觉诱发电位的记录。多通道记录通道参数：生物电灵敏度（20 μV）、走纸（扫描）速度（800 ms/d）、采样频率（1 kHz）、带通滤波（1～100 Hz）。参考电极为不锈钢针型电极，刺入前额中央皮下，地电极为不锈钢针型电极，刺入实验动物左耳皮下。USB6008作为同步信号的输出装置。本实验均记录的是猫双眼的情况。

多通道电生理记录仪所测得的原始波形数据用MatLab软件处理分析。采用SPSS 13.0统计学软件进行分析：2组数据之间比较采用独立样本t检验。

2　结果

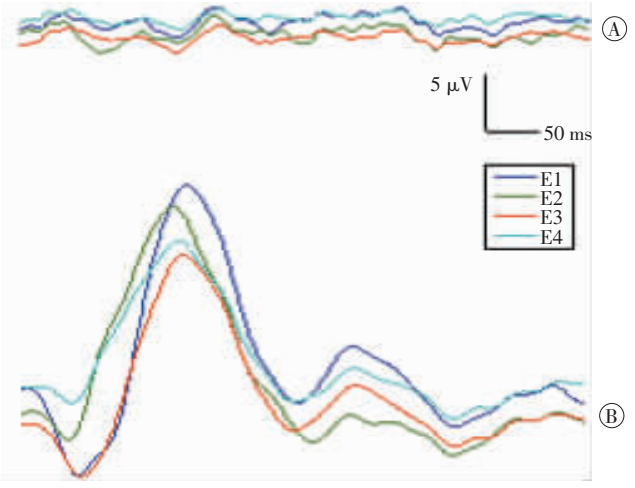
2.1　实验动物麻醉与麻痹

在实验过程中采用诱导麻醉联合静脉持续麻醉、麻痹，麻醉起效快、持续时间长，动物在整个实验中状态平稳、肌电干扰极少，可进行较长时间的实验。准确的插管、有效的人工通气和适量的麻醉、麻痹药物剂量是保证动物生命体征平稳的关键。

2.2　硬脑膜外记录视觉诱发信号的可行性

2.2.1　硬脑膜外微电极阵列微创植入效果　本实验首创视皮层对应区硬脑膜外微创植入并固定柔性微电极阵列，所有实验微电极阵列植入时都能保证硬脑膜的完整，采用骨蜡及牙科水泥固定，不会过度压迫视皮层，同时又能使各电极点很好地与硬脑膜接触，能记录到视皮层诱发电位。

2.2.2　硬脑膜外记录视觉诱发电位　通过对比未给予刺激时和给予刺激（黑白闪烁、黑白棋盘格）时记录到的电位波形（图2），可以看到在硬脑膜外可以记录到视觉诱发电位。在5只猫上进行了对比，均得到同样的结果，重复有效性为100%。黑白闪烁诱发的猫视觉诱发电位较不稳定，而黑白棋盘格诱发的猫视觉诱发电位较稳定：黑白闪烁诱发的电位谷峰值（10.2±2.2）μV较黑白棋盘格诱发时（37.8±4.5）小，有显著差异（$P<0.01$）：黑白闪烁诱发的电位波谷潜伏期（54.2±6.7）ms和波峰潜伏期（89.4±3.6）ms均短于黑白棋盘格诱发时[（72.6±13.1）ms，（193.6±28.9）ms]，波谷的潜伏期比较有显著差异（$P<0.05$），波峰潜伏期比较有显著差异（$P<0.01$）。



A：没有给予任何的视觉刺激，此时猫的双眼被完全遮盖；B：给予黑白棋盘格翻转刺激，此时猫的双眼无遮盖；E1～E4 分别表示柔性微电极阵列上的 4 个电极点

图 2　柔性微电极阵列在硬脑膜外对皮层电活动的记录情况

2.2.3　记录到的视觉诱发电位的谷峰值范围　5 只猫微电极阵列 4 个电极点记录到的棋盘格视觉诱发电位的谷峰值分别比较，其中 1 只猫的谷峰值较其他的差异稍大，考虑是否存在视皮层大小变异的情况，予以排除后，再进行了 4 只猫记录到的谷峰值比较，诱发电位的幅值较稳定、变异性小、重复性好。见表 1。

表 1　棋盘格刺激下硬脑膜上记录的 VEP 稳定性比较

电极	5 只		4 只	
	$\bar{x} \pm s$	变异系数(*CV*)	$\bar{x} \pm s$	变异系数(*CV*)
电极 1	37.7688 ± 4.5366	0.1201	39.7610 ± 0.9912	0.0249
电极 2	33.2342 ± 7.3285	0.2205	36.0383 ± 4.3808	0.1216
电极 3	29.1110 ± 7.5483	0.2593	31.6953 ± 5.6077	0.1769
电极 4	28.9418 ± 6.7896	0.2346	31.6793 ± 3.3922	0.1071

3　讨论

视觉假体是治疗失明当前最有希望的解决途径，其中视皮层假体的适应证最广，但因其微电极阵列植入途径及位置的特殊性，对人体造成的伤害很大，因此在此基础上，本实验中用到了硬脑膜外柔性微电极阵列植入的假设并研究其可行性，并说明将视皮层假体植入并固定到皮层对应区的硬脑膜外是可行性的，同时能记录到有效的视觉诱发电位。

实验中采用持续静脉麻醉联合持续静脉麻痹的方式，实验过程中用呼吸机替代动物的自主呼吸，保证了动物在整个实验中的状态稳定、减少动物痛苦和死亡，避免单纯基础麻醉麻醉时间短而追加麻药导致的动物死亡，同时最大程度地减少了肌电对脑电的干扰[12]。

在柔性微电极阵列植入时用到的骨蜡具有良好的组织相容性，不会损伤硬脑膜组织，同时骨蜡具有良好的可塑性，能很好地使电极点与硬脑膜接触，且骨蜡覆盖在微电极阵列上再用牙科水泥固定，既能很好地固定电极又能避免牙科水泥直接与电极接触而损伤电极。实验用的柔性微电极阵列为本实验组设计，根据实验要求，其植入端(2.5 mm × 5.5 mm)小于开颅区(约 3.5 mm × 6 mm)，保证了电极阵列的大小不超过初级视觉皮层区域[13]。

本实验选择黑白闪烁和黑白棋盘格作为刺激图形，发现黑白棋盘格较适合用于该实验，能诱发出较稳定的视觉诱发电位，这与既往的研究[14]相吻合，视觉系统神经元的对比反应是非常明显的，黑白对比的棋盘格或亮暗条纹能最大程度地激活这种反应，这为进一步研究硬脑膜外视皮层假体的刺激图形选择提供依据。

实验中通过视觉刺激，在初级视皮层对应区的硬脑膜外能记录到视觉诱发电位，其波形较以往的猫视觉诱发电位波形相似，但因为记录位置的不同，没有进行进一步对比。同时发现，微电极阵列的 4 个电极点之间记录到的诱发波形的形状相似，但幅值不同，考虑为不同电极对应的视皮层区域不同，表现出了不同的反应，这与视皮层不同相吻合，初步说明了记录到的视皮层诱发电位的正确性。

参考文献：

[1] Tehovnik E J, Slocum W M. Phosphene induction by microstimulation of macaque V1[J]. Brain Res Rev, 2007, 53(2): 337 – 343.
[2] Normann R A, Greger B, House P, *et al*. Toward the development of a cortically based visual neuroprosthesis[J]. J Neural Eng, 2009, 6(3): 035001.
[3] Troyk P R, Rush A D. Inductive link design for miniature implants[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2009, 2009: 204 – 209.
[4] Schmidt E, Bak M, Kufta C, *et al*. On" Visual prosthesis "by Schiller and Tehovnik(2008)[J]. Perception, 2010, 39(3): 433 – 436.
[5] Dobelle W H. Artificial vision for the blind by connecting a television camera to the visual cortex[J]. ASAIO J, 2000, 46(1): 3 – 9.
[6] Chowdhury V, Morley J W, Coroneo M T. Surface stimulation of the brain with a prototype array for a visual cortex prosthesis[J]. J Clin Neurosci, 2004, 11(7): 750 – 755.
[7] Chelvanayagam D K, Vickery R M, Kirkcaldie M T, *et al*. Multichannel surface recordings on the visual cortex: implications for a neuroprosthesis[J]. J Neural Eng, 2008, 5(2): 125 – 132.
[8] 刘明明，秦伟，谢汉平，等. 大鼠视皮层硫化软骨素粘多糖降解对闪光诱发电位的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(10)：1031 – 1033.
[9] 李海生，潘家普. 视觉电生理的原理和实践[J]. 上海：上海科学普及出版社，2002.
[10] 潘映福. 临床诱发电位学[J]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1999：279 – 346.
[11] Chen L F, Hu N, Liu N, *et al*. The design and preparation of a flexible bio-chip for use as a visual prosthesis, and evaluation of its biological features[J]. Cell Tissue Res, 2010, 340(4): 421 – 426.
[12] Priebe N J, Lampl I, Ferster D. Mechanisms of direction selectivity in cat primary visual cortex as revealed by visual adaptation[J]. J Neurophysiol, 2010, 104(5): 2615 – 2623.
[13] Choudhury B P. Visual cortex in the albino rabbit[J]. Exp Brain Res, 1987, 66(3): 565 – 571.
[14] Schmidt K E, Singer W, Galuske R A. Processing deficits in primary visual cortex of amblyopic cats[J]. J Neurophysiol, 2004, 91(4): 1661 – 1671.

(收稿 2011-03-09 修回 2011-04-05)
(编辑　张　维)