论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1826-05

老年小鼠与青年小鼠眨眼条件反射双任务模型中行为学参数的比较

杨 艺[1],赵传东[2],李 轩[3],吴广延[3],姚 娟[3],隋建峰[1] (400038 重庆,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[1],基础医学教学实验中心[3];250031 济南,济南军区总医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 研究老年昆明小鼠在眨眼条件反射双任务模型中的行为学特征参数变化。**方法** 老年(15月龄)昆明小鼠组($n=5$)及青年(3月龄)昆明小鼠组($n=5$),采用不同音频(3、1 kHz)的正弦波纯音作为条件刺激(conditioned stimulus,CS),声音强度为70 dB。以持续时间100 ms压强3 psi(1 psi=6.895 kPa)的束状氧气流作为非条件刺激(unconditioned stimulus,US)进行CS-US配对训练,观察2组动物在双任务眨眼条件射模型训练中其行为学参数的差异,包括眨眼条件反应(eyeblink conditioned responses, CR)、峰幅度(amplitude of peak, AP)、潜伏期(latency of peak,TP)。**结果** 经过12 d配对训练:老年组与青年组在痕迹性眨眼条件反射和延迟性眨眼条件反射模式中,CR习得率均随训练天数增加而增加,组间CR习得率均从第10天起出现显著差异($P<0.05$);在痕迹性眨眼条件反射模式中,2组间峰幅度从第10天起出现显著差异($P<0.05$),在延迟性眨眼条件反射模式中2组间峰幅度在第6天和第12天有显著差异($P<0.05$);2组组内高音频(3 kHz)CS对应的TEBC模式其习得率都要高于低音频(1 kHz)CS的DEBC模式其CR习得率。**结论** 老年昆明小鼠较青年昆明小鼠而言不能很好地学习双任务眨眼条件反射,说明老化对于小鼠的联想型学习记忆有着直接影响。

[关键词] 眨眼条件反射;双任务;小鼠;老化

[中图法分类号] R-332;R338.61;R339.34 [文献标志码] A

Behavioral parameters in aging *vs* young mice during dual-task eyeblink conditioning

Yang Yi[1], Zhao Chuandong[2], Li Xuan[3], Wu Guangyan[3], Yao Juan[3], Sui Jianfeng[1] ([1]Department of Physiology, [3]Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Neurosurgery, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan, Shandong Province, 250031, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the changes of behavioral parameters during dual-task eyeblink conditioning in aging Kunming mice. Methods A total of 5 15-month-old mice (aged group) and 5 3-month-old mice (young group) were assigned to receive paired training of tone (intensity of sound 70 dB) conditioned stimulus (CS) in different audio frequency (3 kHz and 1 kHz) and a 100-ms comeal oxygen-puff unconditioned stimulus (US). Behavioral parameters, including eyeblink conditioned responses (CR), amplitude of peak (AP) and latency of peak (TP) were observed, and the results were compared between the 2 groups. Results After 12 days' pairing training, CR% in trace eyeblink conditioning (TEBC) and delay eyeblink conditioning (DEBC) was increased with the elapse of training days in both aged mice group and young mice group. CR acquisition rate between the 2 groups appears significantly different from the tenth day ($P<0.05$). There was significant difference in AP between the 2 groups from the tenth day in TEBC ($P<0.05$), and also on the sixth day and the twelfth day in DEBC ($P<0.05$). Surprisingly, acquisition rate of TEBC which trained with 3-kHz-CS was obviously higher than the DEBC with 1-kHz-CS in 2 groups. Conclusion Aged Kunming mice can not learn dual-task eyeblink conditioning well compared with young ones, which indicating that aging affects the association learning in mice directly.

[**Key words**] eyeblink conditioning; dual-task; mice; aging

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171249). Corresponding author: Sui Jianfeng, Tel: 86-23-68753704, E-mail: jfsui2003@yahoo.com.cn

随着社会老龄化形势不断严峻,脑老化问题日益引起医学界的广泛关注。长期以来,国内外关于认知老化的研究主要聚焦在工作记忆和空间记忆方面[1-2],很少涉及联想学习记忆。但临床上确有部分患者患有联想学习功能障碍[3],这给他们的健康以及

[基金项目] 国家自然科学基金(81171249)

[通信作者] 隋建峰,电话:(023)68753704,E-mail: jfsui2003@yahoo.com.cn

生活质量带来极大的影响。脑老化后大脑组织结构、功能、形态逐渐出现的衰退老化现象并表现为一定程度的脑高级功能障碍,其中认知功能减退是其重要特征之一[4]。近来有研究[5]指出脑老化后前额叶是最易受到损伤的区域、海马胆碱能纤维的长度较正常的短[6]、海马 Glu 水平下降[7]、细胞表达神经元性一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)活性降低[8]等,这些也都对学习记忆过程产生影响。而关于脑老化对联想学习记忆的影响的机制研究目前还很少。

经典眨眼条件反射(eyeblink classical conditioning,EBC)是被广泛应用于研究联想学习记忆的动物模型。EBC 是指当条件刺激(conditioned stimulus, CS)和非条件刺激(unconditioned stimulus, US)的反复配对一定次数后,动物在 CS 之后 US 之前的保护性眨眼条件反应(conditioned responses, CR)。根据 CS 和 US 在时间上是否重叠,EBC 又可分为延迟性眨眼条件反射(delay eyeblink conditioning, DEBC)和痕迹性眨眼条件反射(trace eyeblink conditioning, TEBC)。根据针对同一动物 DEBC 与 TEBC 是单一任务训练还是混合训练又分为单任务 EBC 与双任务 EBC。在眨眼条件反射研究中,大都以豚鼠、家兔、大鼠等作为实验动物,而关于小鼠的眨眼条件反射的研究较少,但相对其他动物而言,小鼠有着其独特的优势,特别是各种转基因小鼠、快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)等的出现,更便于深入探讨脑老化对联想学习记忆的影响的分子和网络机制。EBC 的双任务模型[9]与单任务模型的不同之处在于,训练时需采用 2 种不同音频的纯音作为 CS 进行混合训练,其优点是可以在同一动物上实现 TEBC 和 DEBC 的直接比较,避免了动物个体差异因素的影响,同时有利于充分利用动物资源,减少实验动物数量。本实验研究了老年昆明小鼠与青年小鼠相比,其眨眼条件反射行为学特征参数的变化,为后期利用快速老化小鼠进一步研究脑老化相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物选用老年昆明小鼠和青年昆明小鼠各 5 只,雌性,体质量分别为 45 ~ 60 g,20 ~ 30 g[第三军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号: SCXK(渝)2007-0003]。实验期间,所有动物单笼饲养,给予自由进食和饮水,饲养环境保持12 h 循环灯照。

1.2 手术

用3%的戊巴比妥钠(SERVA,丹麦进口分装)麻醉小鼠,剂量 50 mg/kg,待麻醉成功后其将头部固定在脑立体定向仪上(SR26N,Narishige,日本)进行手术。小鼠头部常规消毒后,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 3 个直径约 0.5 mm 的小孔,小孔坐标分别为:孔 1:前囟前 1.0 mm,右侧旁开 1.0 mm;孔 2、3:后囟前 1.0 mm,双侧旁开 3.0 ~ 4.0 mm。分别用 3 颗已消毒的不锈钢螺丝钉(直径:1.6 mm,螺距:300 μm,质量:0.1 g)反旋入 1 ~ 3 号小孔作为齿科水泥固定的支点。将一硬质塑料管(长度:8.0 mm,直径 0.25 cm)水平嵌合在 3 颗不锈钢螺丝钉之间,用齿科水泥和 502 胶水调和物将其固定于小鼠颅骨上,作为训练时的固定支架。术后给予动物必要的抗感染措施。恢复 1 周,状态良好,无听觉及眨眼障碍的小鼠进行行为训练。

1.3 行为训练

小鼠的行为训练在隔音、避光的屏蔽柜内进行。完整的训练周期包括 1 d 适应期和连续 12 d 的训练期。适应和训练过程中,将小鼠置于自制圆柱形固定筒(长 12 cm,直径 3 cm)内,通过筒前端孔洞将其头颈部露在筒外。用脑立体定位仪(成都仪器厂)两根侧梁上的耳杆顶住头颅固定支架,并用脑立体定位仪的前端嘴固定器夹住小鼠嘴部,以减少训练过程中因小鼠身体晃动对实验数据带来的影响。

适应期间,动物固定给予 CS 但不给予 US(非配对训练)。训练期在适应期结束后次日开始。训练时每天给予 10 组,每组 10 次,共计 100 次的配对训练。配对训练时,由静电扬声器随机播放高音频(3 kHz,250 ms)和低音频(1 kHz,350 ms),2 种 CS 是按照 50% 的比例随机出现,强度均为 70 dB,升降时间为 5 ms。其中高音频对应 TEBC 训练,低音频对应 DEBC 训练。TEBC 配对训练时,CS 开始 500 ms 后,对左侧眼角膜施予 US;DEBC 配对训练时,CS 开始 250 ms 后,对左侧眼角膜施予 US。US 为一个持续时间为 100 ms、压强为 3 PSI 的束状干燥氧气流。每次配对训练的间隔时间为 20 ~ 40 s(平均 30 s)。训练过程中,CS 出现的同时触发“SBO-1 眨眼条件反射和识别学习行为自动训练系统”(第三军医大学,重庆大学),按照设定的参数释放医用氧气流[10],并触发 RM6280BD 型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)进行数据采集。具体模式见图 1。

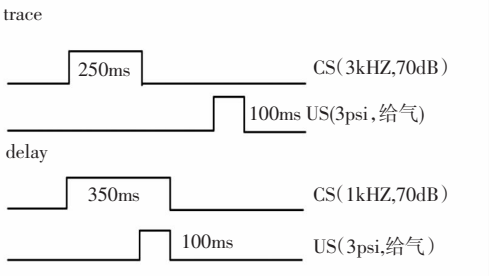
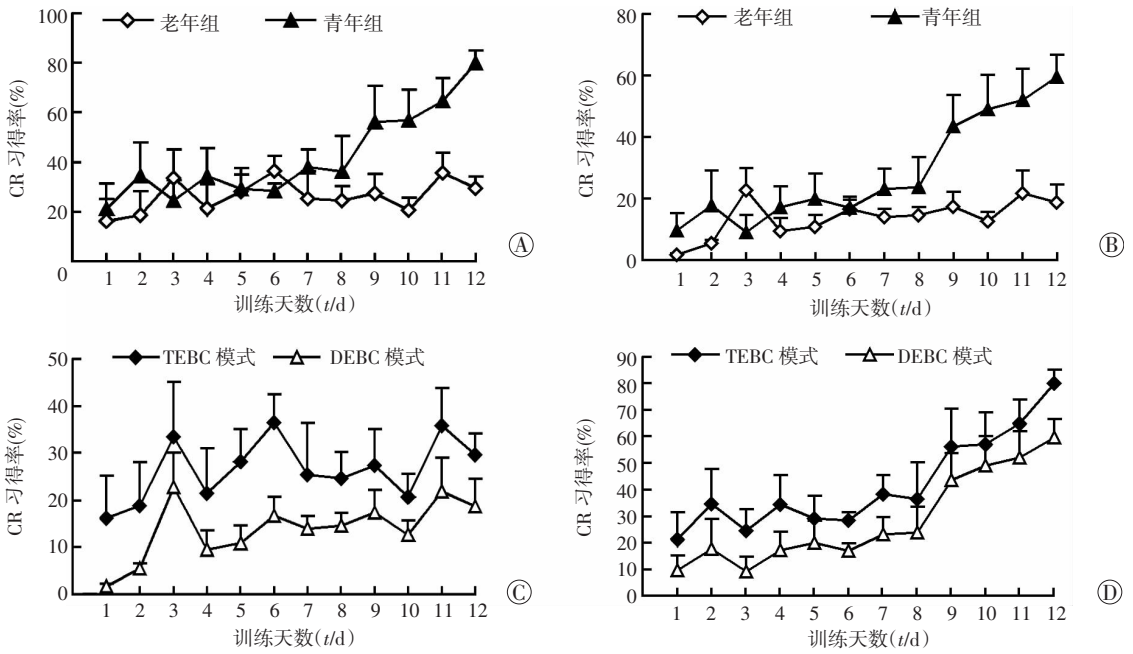


图 1 双任务眨眼条件反射中 TEBC 和 DEBC 模式图

1.4 眨眼活动测量

动物训练时,以末端栓有尼龙细线的蛙心夹夹住小鼠左侧上眼睑。尼龙细线另一端连接肌肉张力换能器(JZ-101, XH)[11]。眨眼对眼轮匝肌活动引起的张力变化通过换能器转换为电位波动 (1 mV 的电位波动与 0. 25 mm 的眨眼幅度变化相对应)。张力换能器信号与 CS 声音信号由 RM6280BD 型多道生理信号采集处理系统同步记录,采样频率为 10 kHz,灵敏度 5 mV,行为采样带通为直流 ~ 100 Hz。数字信号存储于电脑中,并使用 VC + + 软件编制的专用程序处理和分析实验数据。



A:老年和青年组 TEBC 模式中 CR 习得率比较;B:老年和青年组 DEBC 模式中 CR 习得率比较;C:老年组内 TEBC 和 DEBC 模式中 CR 习得率比较;D:青年组内 TEBC 和 DEBC 模式中 CR 习得率比较

图2 老年与青年小鼠在 DEBC 和 TEBC 模式中 CR 发生率的比较

1.5 数据分析

显著的眨眼活动满足以下2个标准:①上眼睑活动值≥眼睑活动基线值0.5 mV;②满足条件①的时间总和超过15 ms。条件性眨眼反应(conditioned eyeblink response, CR)定义为:US 开始前的200 ms 内发生的显著眨眼活动。眨眼反应的特征参数定义如下:①CR 峰潜伏期:CS 起点与 CR 最大时刻之间的时间间隔;②CR 峰幅度:CR 最大幅值与基线值之间的差值;③基线期(baseline period):定义为 CS 开始前1~800 ms 这一阶段。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计软件中的重复测量方差分析、拆分重复测量单因素方差分析进行统计学处理,多重比较用 LSD。

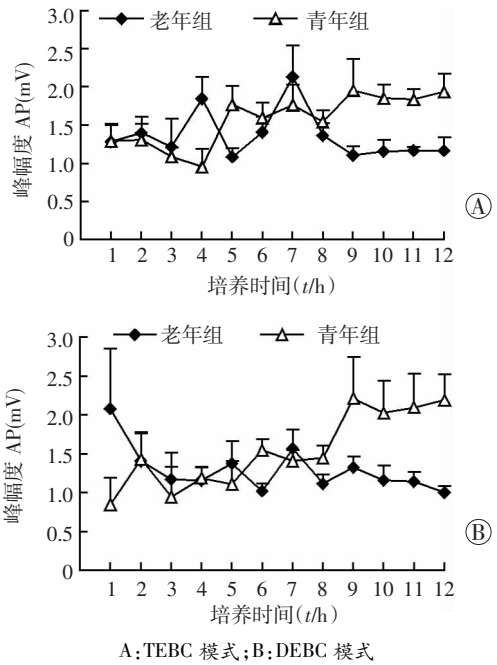
2 结果

2.1 条件反射习得率

经过12 d 双任务模式的眨眼条件反射训练后,老年组与青年组 CR 习得率有显著差异。TEBC 模式:青年组($n=5$)和老年组($n=5$)CR 习得率均随训练天数增加而增加($P<0.05$),此增长随组别不同而不同($P<0.05$),2组间习得率从第10天起出现显著差异($P<0.05$),见图2A。DEBC 模式:青年组($n=5$)和老年组($n=5$) CR 习得率均随训练天数增加而增加($P<0.05$),此增长随组别不同而不同($P<0.05$),2组间习得率从第10天起出现显著差异($P<0.05$),见图2B。虽然老年组和青年组各自组内的 DEBC 和 TEBC 模式的 CR 习得率比较未做统计学分析,但从结果看出不管老年组还是青年组高音频 CS 的 TEBC 模式均比低音频 CS 的 DEBC 其 CR 习得率都要高,见图2C、D。

2.2 条件反射峰幅度(AP)

经过12 d 双任务模式的眨眼条件反射训练后,对老年组与青年组 CR 峰幅度比较发现,TEBC 模式:青年组和老年组统计分析峰幅度均不随训练天数增加而增加($P>0.05$),但时间效应随组别不同而不同($P<0.05$),2组间峰幅度从第10天起出现显著差异($P<0.05$),见图3A。DEBC 模式:青年组和老年组比较,统计分析峰幅度也都不随训练天数增加而增加($P>0.05$),时间效应随组别不同而不同($P<0.05$),2组间峰幅度在第6天和第12天有显著差异($P<0.05$),见图3B。

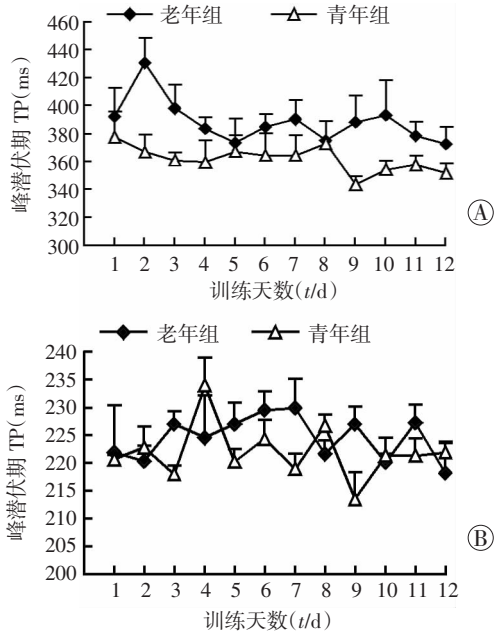


A:TEBC 模式;B:DEBC 模式

图3 老年与青年小鼠 TEBC 和 DEBC 模式中 CR 峰幅度的比较

2.3 条件反射峰潜伏期(TP)

分析老年组与青年组TEBC和DEBC模式的CR峰潜伏期(TP)后发现,青年组和老年组比较,其峰潜伏期均不随训练天数增加而增加,2种模式中2组间峰潜伏期均不存在显著差异,亦未具有统计学意义的变化,见图4。



A:TEBC模式;B:DEBC模式

图4 老年与青年小鼠DEBC和TEBC模式中CR峰潜伏期的比较

3 讨论

本研究结果可归纳为:①经过12 d CS-US配对训练,老年组与青年组昆明小鼠在TEBC和DEBC模式中,CR习得率均随训练天数增加而增加;②青年组较老年组小鼠具有更好的CR习得率和更高的CR峰幅度,提示老年小鼠相对于青年小鼠而言更难建立双任务眨眼条件反射;③无论是在DEBC还是在TEBC模式中,各组CR峰潜伏期无显著变化,提示年龄因素可能不会对CR峰潜伏期造成影响;④无论老年组还是青年组高音频CS对应的TEBC模式均比低音频CS的DEBC模式其CR习得率都要高,提示可能是双任务模式中高音频CS会影响低音频CS对应的条件反射的学习。

在认知老化的研究领域里关于联想学习记忆方面的研究甚少。但是临床上患有联想学习功能障碍的老年病人值得关注。本研究通过利用双任务眨眼条件反射这一联想学习记忆模型研究了老年昆明小鼠与青年小鼠相比较,其联想学习记忆能力及其变化。本研究发现,老年小鼠和青年小鼠对于此模式的联想学习模型都有学习能力,但越到后期老年小鼠的学习能力明显不如青年小鼠,这说明前者的联想学习能力明显下降,这一结果与临床情况相吻合。从重要的行为学参数CR习得率以及峰幅度(AP)变化情况来看,小鼠的数据不如豚鼠、家兔等动物稳定。我们通过平均值观察到两组小鼠CR习得率都出现上下波动的情况,且青年小鼠从实验中期开始其CR习得率慢慢开始高于老年小鼠,但由于个别小鼠习得率波动大,导致标准误偏大,结果统计分析从训练第10天起2组小鼠习得率才出现显著差异。这一情况是由于小鼠较其他哺乳动物更容易出现低觉醒期(quiet wakefulness),这时小鼠会出现眼睛半闭、脑电慢大,这种低觉醒状态对小鼠的眨眼条件反射有较大地影响,这一情况已被众多研究报道证实[12-15]。当然使用不同背景、种属以及不同的刺激和记录方法等对于小鼠的学习曲线都有一定影响。在结果中,2种模式的老年组和青年组其峰潜伏期均没有显著差异,这和CR习得率、AP值的变化不同,提示小鼠眨眼条件反应的峰潜伏期和CR发生率及峰幅度可能是由不同神经结构或不同机制控制。目前关于小鼠眨眼条件反射的研究指出其delay模式的神经环路是由小脑-杏仁核-前脑共同参与动态调节的,而关于trace模式其机制还不是很完善,目前研究指出它是与前额叶和海马密切相关。

值得注意的是,本实验中,无论老年组还是青年组,各组内的TEBC和DEBC模式CR习得率比较,TEBC模式中的习得率都高于DEBC模式,这与普遍研究的结果中延迟性眨眼条件反射相比痕迹性眨眼条件反射而言更容易建立[16-19]不一致。这一结果与本实验室曾经建立豚鼠双任务眨眼条件反射里的结果一致,即在声强一致的情况下,高音频CS的TEBC模式均比低音频CS的DEBC模式其CR习得率高。正如之前所猜测的,这可能是由于一种"比较效应",即非随意的选择性注意或抑制效应。实验中高音频CS与低音频CS的声音强度一致,对应的US一致,两者并存时,注意系统涉及的神经中枢会自动强化对高音频CS的信息加工,并弱化对低音频CS的注意。因此双任务模式中高音频CS会影响低音频CS对应的条件反射的学习[20]。

参考文献:

[1] Zanto T P, Toy B, Gazzaley A. Delays in neural processing during working memory encoding in normal aging[J]. Neuropsychologia, 2010, 48(1): 13-25.

[2] Shukitt-Hale B, Casadesus G, Carey A N, *et al*. Exposure to ^{56}Fe irradiation accelerates normal brain aging and produces deficits in spatial learning and memory[J]. Adv Space Res, 2007, 39(6): 1087-1092.

[3] Brambilla P. S20-02 - Associative learning and context processing abilities in bipolar disorders[J]. European Psychiatry, 2010, 25(Suppl

1): 16.
[4] 杨艺, 隋建峰. 脑老化及其相关研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2012, 43(2): 154-157.
[5] Head E. Neurobiology of the aging dog[J]. Age (Dordr), 2011, 33(3): 485-496.
[6] Ypsilanti A R, Girao-da-Cruz M T, Burgess A, *et al*. The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain[J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(11): 1666-1679.
[7] 张广伟, 闫春焕, 苗明三. 脑老化的现代研究集要[J]. 中医药学刊, 2004, 22(3): 541-542.
[8] Colas D, Gharib A, Bezin L, *et al*. Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain[J]. BMC Neurosci, 2006, 7: 81.
[9] 范蕊. 电磁辐射对豚鼠眨眼条件反射双任务模型行为学影响的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
[10] 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.
[11] 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.
[12] Toescu E C. Normal brain ageing: models and mechanisms[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1464): 2347-2354.
[13] Poulet J F, Petersen C C. Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice[J]. Nature, 2008, 454(7206): 881-885.
[14] Delgado-Garcia J M, Gruart A. Building new motor responses: eyelid conditioning revisited[J]. Trends Neurosci, 2006, 29(6): 330-338.
[15] Paylor R, Crawley J N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response[J]. Psychopharmacology (Berl), 1997, 132(2): 169-180.
[16] 陈浩, 胡波, 杨丽, 等. 延迟性和痕迹性条件反射建立过程中豚鼠眨眼反应特征参数的变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 95-98.
[17] Hu B, Lin X, Huang L S, *et al*. Involvement of the ipsilateral and contralateral cerebellum in the acquisition of unilateral classical eyeblink conditioning in guinea pigs[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(2): 141-152.
[18] Lindquist D H, Vogel R W, Steinmetz J E. Associative and non-associative blinking in classically conditioned adult rats[J]. Physiol Behav, 2009, 96(3): 399-411.
[19] 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.
[20] 李轩, 范郑丽, 范蕊, 等. 豚鼠双任务眨眼条件反射中的听觉惊吓反射特征参数及其对眨眼条件反射的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(20): 2103-2106.

(**收稿**:2012-03-21;**修回**:2012-04-10)
(编辑 张 维)

(上接1825页)

2 讨论

短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack,TIA)传统定义是指短暂的、可逆的、局部的脑血液循环障碍,症状和体征在24 h内完全消失。随着影像学的发展和临床经验的积累,逐渐发现许多TIA患者尽管在24 h内症状完全缓解,但在影像学上却存在脑梗死的证据。故TIA新定义为局限性脑或视网膜缺血所致的短暂的神经功能异常,典型的临床症状持续不足1 h,且没有急性脑梗死的明确证据。本例患者以反复发作性偏侧肢体无力为主要表现,症状持续5~100 min,均在24 h内缓解,符合传统定义的TIA。但新定义下,是否存在脑组织梗死才是TIA与脑梗死的区别所在。患者MRI弥散成像(diffusion-weighted imaging,DWI)可见新鲜梗死灶,故应诊断为脑梗死。

脑梗死可以有临床症状,也可以没有临床症状,且症状的持续时间可长可短。1987年Donnan等[1]提出内囊警示综合征(capsular warning syndrome,CWS)的概念,指的是内囊部位反复缺血所致的临床综合征。CWS表现主要为反复发作的皮层下内囊部位缺血症状,部位波及单侧面部、上肢和(或)下肢,无忽视、失语、失用等皮质受累的症状或体征[2]。多数患者头颅CT内囊部位可发现与临床症状一致的梗死灶[3]。本例患者临床表现为内囊部位受损症状的反复发作,结合头颅MRI检查,符合CWS定义。CWS短期内反复发作可能与以下因素相关:脑大血管病变,脑小血管病变,桥脑梗死,脑静脉窦血栓形成,血流动力学改变等[2]。该患者有颈动脉硬化基础,深穿支灌注不足及血管痉挛可能与症状呈反复发作性有关。其症状在24 h内反复发作达6次,临床表现似TIA,但MRI有梗死灶,此类患者罕见,临床是否溶栓治疗也无确定及推荐意见。

新定义下TIA的诊断很大程度上依赖于影像学检查。目前有多种影像学技术运用于TIA的诊断、鉴别及评价。如全脑CT灌注(CT perfusion,CTP)成像,它可以对TIA实现全面评估[4]。而目前常用的DWI技术最早可在缺血后30 min显示新病灶[5],对于TIA和与此患者表现类似的脑梗死的鉴别及治疗指导有十分重要的意义。

参考文献:

[1] Donnan G A, Bladin P F. The capsular warning syndrome: repetitive hemiplegic events preceding capsula stroke[J]. Stroke, 1987, 18: 296.
[2] 胡小辉, 郑珍珍, 姚长江. 内囊警示综合征研究进展[J]. 华西医学, 2012, 27(3): 459-462.
[3] 侍海存, 钟建国, 肖佩荣, 等. 内囊警示综合征的临床与影像学特点[J]. 临床神经病学杂志, 2001, 14(1): 41.
[4] 陈婷, 郭大静, 赵建农, 等. 全脑CT灌注成像在短暂性脑缺血发作中的初步应用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(23): 2512-2515.
[5] Crisostomo R A, Garcia M M, Tong D C. Detection of diffusion-weighted MRI abnormalities in patients with transient ischemic attack: correlation with clinical characteristics[J]. Stroke, 2003, 34(4): 932-937.

(**收稿**:2012-05-22;**修回**:2012-07-09)
(编辑 王小寒)