技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1828-03

清醒豚鼠眨眼反射信号的提取与分析方法的研究

吴广延[1],范郑丽[1],甘 平[2],柴 东[2],万子兵[1],赵红梅[1],隋建峰[3]
(1.第三军医大学学员旅三队,重庆 400038;2.重庆大学通讯学院实验中心,重庆 400030;3.第三军医大学基础部教学实验中心,重庆 400038)

【摘 要】目的:介绍一种从清醒豚鼠眨眼反射记录中有效地提取并分析其惊吓性眨眼反射(Eyeblink startle response,EBSR)、条件性眨眼反射以及非条件眨眼反射(Eyeblink unconditionel response,EBUR)波形的方法。方法:采用正弦波纯音和束状医用氧气流分别作为条件刺激和非条件刺激先后作用于豚鼠,训练豚鼠建立眨眼条件反射(Eyeblink conditioned response,EBCR),在此过程中利用高分辨率、低扭矩的肌肉张力换能器测量眨眼活动,并通过基线计算与文件取舍等步骤分析这些测量数据。结果:该方法可以快速准确地对眨眼反射记录进行有效提取和分析,并与其它方法的相关报道一致。结论:该眨眼反射测量方法操作和分析过程简单,结果准确,可用于研究小型啮齿类动物 EBCR 训练中眨眼活动的拓扑学参数变化。

【关键词】豚鼠;眨眼反射;张力换能器;信号;基线
【中国图书分类法分类号】Q811.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-09-02

Study of the methods of extracting and analyzing characteristic signal of eyeblink response in conscious guinea pigs

WU Guang-yan, et al
(*the Third Team of Cadet Brigade, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To introduce a method which can effectually extract records of eyeblink response and analyze wave shape of eyeblink startle response, eyeblink conditioned response and eyeblink unconditioned response in conscious guinea pigs. *Methods*: Sine wave sounds and medical oxygen flow bundle were used successively as conditioned stimulus and unconditioned stimulus to train guinea pigs, to establish eyeblink conditioned response. High-resolution and low-torque muscle tension transducers were used to measure eyeblink activity in the process, and through the baseline calculation, document selection and other steps, these measurements were analyzed. *Results*: The method could rapidly and accurately extract and analyze records of eyeblink response, and was consistent with other reported. *Conclusion*: The eyeblink response measurement method and analyzing process are simple and the result is accurate. The method can be used to study the change of eyeblink activity topology parameter in training process of eyeblink conditioned response in small rodents.

【Key words】Guinea pig; Eyeblink response; Tension transducers; Single; Baseline

经典的眨眼条件反射被广泛用于联合型学习与记忆的神经生物学机制研究[1,2],该反射的基本训练过程是:条件刺激(Conditioned stimulus,CS)例如声音,与非条件刺激(Unconditioned stimulus,US)例如角膜吹气,二者反复配对呈现,训练动物学会对 CS 产生眨眼条件反射(Eyeblink conditioned response,EBCR)。常用的 EBCR 记录方法有张力传感器法[3-5]、肌电记录法[6,7]、红外线图像分析法[8,9]、磁性感应线圈测量法[10]等等,目前最常用的仍然是第一种方法,即利用张力换能器将眨眼活动引起的肌肉运动转换为电位波动并加以记录和分析,这种方法对眨眼行为的反映直观而准确,但是经张力换能器记录到的信号是低频的时变信号,信号检测时受动物全身活动、自发眨眼行为及测量装置干扰(如连接线松弛)等多种因素的影响,记录中往往会出现基线漂移,自发波干扰等情况,这对眨眼行为的判断和分析带来困难。如何借助计算机程序快速准确地对实验数据进行有效地提取和准确分析将大大影响实验结论的判断。本文介绍了从清醒豚鼠眨眼条件反射记录中有效地提取和分析其惊吓性眨眼反射(Eyeblink startle response,EBSR)、EBCR 以及非条件眨眼反射(Eyeblink unconditioned response,EBUR)波形的方法。

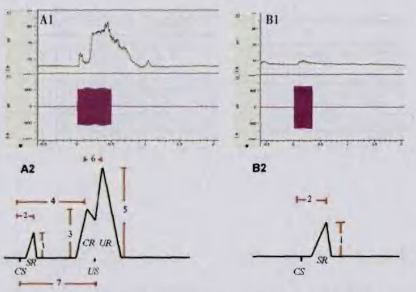
作者介绍:吴广延(1988-),男,
研究方向:学习与记忆的神经生物学。
通讯作者:隋建峰,男,教授,E-mail:jfsui2003@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30771769)。

1 材料与方法

1.1 基线运算与文件取舍

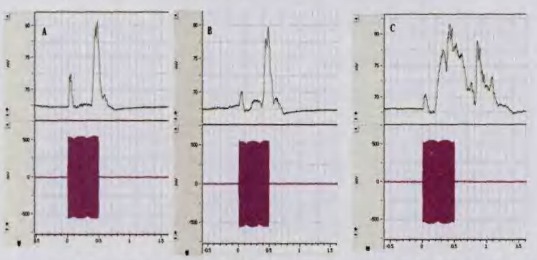
1.1.1 信号采集 根据相关方法采集记录清醒豚鼠眨眼条件反射信号,通过 POWERLAB 生物信号处理系统采集数据。采样频率 20 kHz,即每毫秒 20 个数据点,其中一通道记录眨

眼行为信号,分为 EBSR、EBCR 和 EBUR 反应波形。二通道记录声音(CS)信号,每次 CS 持续时间 350 ~ 500 ms,2 次 CS 之间间隔 20 ~ 40 s,高低声随机出现,其中高声 CS 持续 500 ms,共 50 次,低声 CS 持续 350 ms,共 50 次;三通道记录角膜吹气(US)信号,US 只与高声 CS 配对,US 持续时间100 ms,且与 CS 与 US 同时结束(见图 1)。动物每天训练 100 次,每 1 次训练(包含 3 个通道的全部数据)存储为 1 个子文件。经过系统训练的动物多数会从第 2 d 开始习得条件性眨眼行为,并在第 9、10 d 达到习得率高峰(见图 2)。编程工具为 MATLAB。



A1、B1 分别代表实际采集到的高声和低声部分图像;A2、B2 是实际采集图像的模式图,其中 1 代表 EBSR 峰幅度,2 代表 EBSR 峰潜伏期;3 代表 EBCR 峰幅度;4 代表 EBCR 峰潜伏期;5 代表 EBUR 峰幅度;6 代表 EBUR 峰潜伏期;7 代表 CS 和 US 的刺激间期

图 1 眨眼反射训练过程中的相关参数



A 图是训练早期的记录,EBSR,EBUR 波明显,但 EBCR 波的基本上记录不到;B 图是训练中期的记录,EBSR 波的幅度有所下降,EBCR 波的幅度增加;C 图是训练晚期的记录,EBSR 波的幅度进一步下降,EBCR 波的幅度进一步增加,偶尔会出现 EBUR 双峰波现象

图 2 高声训练不同时期的记录

1.1.2 用众数法计算基线值:M(base) 对每个子文件,对一通道每毫秒采集的 20 数据点求平均值,即每毫秒计算 1 个均值(下称"毫秒"值),参与下面计算。提取从记录起始点(统一设置为 -1 000 ms)到给声起始点(统一设置为零点)共 1 000 ms 内的"毫秒"值,忽略水平至 0.1 mV,通过四舍五入的方法,并统计其每个"毫秒"值对应的频数,以频数最大的"毫秒"值作为基线值 M(base)。频数统计时应设定大致的允许范围,默认范围为 65 ~ 70 mV,超过此范围的"毫秒"值不参与作为基线值的频数统计(见图 3)。此法不具体评估零点前 15 ms 的关键期,而是判断单个子文件零点前所有的"毫秒"值。

1.1.3 取舍子文件 通过频数统计确定每个子文件的 M(base)后,如果在 0.1 mV 的忽略水平上,M(base)的最大频数仍小于 100,意味着本此记录的波动实在太大。另外,如果统计超过 70 mV 的"毫秒"值的总频数大于总"毫秒"值频数的40%,

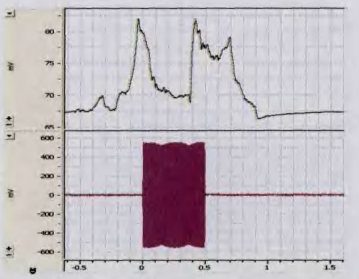


图 3 该子文件从起始到零点之间,出现"毫秒"值过大的点,不参与统计

意味着本次声音出现前动物眼睑过度活动,但这种情况的发生率很低。发生上述情况后,既可以选择程序自动删除该子文件,也可以选择人机对话显示相关子文件的全图后来评估曲线的去留。

1.2 *声音的识别和分类*

识别高声子文件,其子文件(或其序号)形成子集"H",余下为低声子文件,形成子集"L"。记下"H"、"L"子集中的子文件个数,分别代表当日的高低声训练次数。具体的识别方法有很多且易于做到。如读出每个子文件的声音输入通道的数据,满足以下(1)(2)两条件为高声→"H",否则为低声→"L"。(1)在 380 ms 后取 20 点(单数据点,即 1 ms 内的全部点,没有计算均值),其最大值小于 450 mV;其最小值大于 -450 mV;(2)最后在 480 ms 以后再取 20 点,同上计算。

1.3 *各种波形的分析和处理:高、低声子集的处理过程类似*

1.3.1 高声子集 H 的处理

1.3.1.1 惊吓反射的识别与其反应发生率 ± s、峰幅度值 ± s、峰潜伏期 ± s 的计算 对于每个高声子文件,在其 35 ~ 100 ms 之间,共 65 个"毫秒"值点,其幅度记为 A(35 ~ 100)i ,保留小数点后 1 位数,即忽略水平采用 0.1;峰潜伏期包括绝对和相对潜伏期,绝对潜伏期等于 CS 开始点与该峰对应的时刻之间的时间差,相对潜伏期等于该峰对应的时刻与 US 开始点之间的时间差。

将每天内的每个子文件所有的 A(35 ~ 100) i 分别与该子文件的 M(base)比较,找出 A(35 ~ 100)i-M(base)大于等于 1 的"毫秒"值点,并记下每个子文件在该段内的最大"毫秒"值点,记为 Max A(35 ~ 100)i,有多个相同最大值时,取出现最早的"毫秒"值点,建立 EBSR 子集。然后确定 Max A(35 ~ 100)i 是否是"峰"点:如果该"毫秒"值点的幅度大于或等于其前和其后各 5 个"毫秒"值点的相应幅度,则该 Max A(35 ~ 100)i − M(base)就是该子文件的峰幅度值,记为 Max A。否则,继续在该子文件的 100 ~ 150 ms 内,同上法判断最大值是否有"峰"点,如果有"峰"点,则记下该点的 Max A(100 ~ 150)i,并以该 Max A(100 ~ 150)i − M(base)作为该子文件的 Max A(见图 4);如果仍然没有"峰"点,则该子文件只参加当日 EBSR 发生率的统计,不参与当日 EBSR 波 Max A 均值和峰潜伏期均值的统计。

最后,求出 EBSR 子集中的所有有效的峰幅度值的均值和标准差,作为当日全部高声训练 EBSR 波的峰幅度值和标准差,求出 EBSR 子集中的所有有效的峰幅度值对应的绝对及相对峰潜伏期的均值和标准差,作为当日全部高声训练的 EBSR 波的绝对及相对峰潜伏期的均值和标准差。计算 EB-

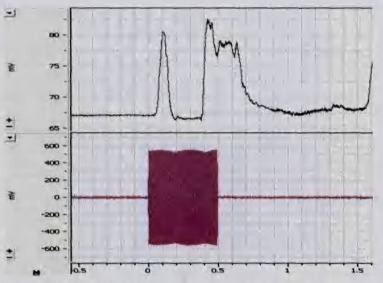


图 4 EBSR 在 100 ~ 150 ms 内出现,属延迟现象

SR 发生率(EBSR 中的子文件个数 ÷ 全部高声子文件个数)和标准差。注意没能找出"峰"的 EBSR 波只参加 EBSR 发生率的统计。

1.3.1.2 条件反射发生率 ± s、峰幅度值 ± s、峰潜伏期 ± s 的计算 原理同 EBSR 的处理。将每个子文件 200 ~ 380 ms 之间的峰幅度值比较,依照前述条件建立 EBCR 子集。EBCR 峰幅度值取其最大值即可,不需确认"峰"的存在。计算当日的 EBCR 峰幅度值的均值和标准差、绝对及相对峰潜伏期均值和标准差、EBCR 发生率和标准差。

1.3.1.3 非条件反射峰幅度值 ± s、峰潜伏期 ± s 的计算 统计 410 ~ 450 ms 之间的最大值,记为 Max A(35 ~ 100)i,依照前述条件建立 EBUR 子集。按前述方法计算当日的 EBUR 峰幅度值的均值和标准差、绝对及相对峰潜伏期均值和标准差、EBUR 发生率和标准差。

1.3.2 低声子集 L 的处理 基本同 H 子集的处理。但有以下不同:(1)分析 EBCR 的发生率、峰幅度值 ± s、峰潜伏期 ± s 时,虽然无 US,但因动物对声音判断错误而导致的 EBCR,其 EBCR 出现时间也按有 US 的情况发生,计算时段同样限制在 200 ~ 380 ms 内;(2)因无 US,不计算 EBUR。

2 结 果

2.1 总体结果输出格式

原文件名 XXX、处理日期 XXXX

程序删除的子文件及序号(个数):例如 002,023,(2)

人工删除的子文件及序号(个数):例如 008,(1)

高/低声子文件总个数及序号:高声 --(n-H):XXX、XXX、XXX;低声 --(n-L):XXX、XXX、XXX

按下表填写高低声 EBSR、EBCR、EBUR 的反应发生率 ± s、绝对及相对峰幅度值 ± s 和峰潜伏期 ± s 等。

3 讨 论

关于基线确定及文件取舍问题:文件取舍是必须的。由于存在基线飘移、自发眨眼的干扰等问题,故必须先定下基线才能做后续判读和取舍工作[11-13]。确定基线采用程序自动处理容易误判,尤其对于一些特殊情况,人工判读更为准确,程序则显机械,但人工判读影响速度。既要考虑到运算速度也要考虑到准确度,本文介绍的方法以程序判读为主,基本不需人工判读,设计简单,虽运算量大,但实质的程序执行速度可以接受。对特殊情况进行人工判读以提高准确性。

关于文件取舍这里推荐的方法是由程序判断有无足够长度的平稳段,或超过 70 mV 的数据点的量是否大于一定比例,并辅以人工判读。另外,还可以考虑重点判读"-15 ~ 0 ms"之间的"毫秒"值有无大的偏移。计算"-15 ~ 0 ms"之间的"毫秒"值均值 M(-15)i,如果 M(-15)i—M(base)大于 1,则给出小图,供人工取舍。不能全部删除这部分文件的理由是:并非零点前的抬高一定影响结果,如果其后续的反应波可能更高,这种情况对结果毫无影响,所以需要人工灵活判读。此法的缺点是太慢,因为每日的训练中大约有 5%,即大约有 10 次需人工判读 EBCR。

关于 EBSR 波识别的有效时间段的设定问题:EBSR 起始潜伏期的程序判读运算量太大,也不易判断准确,故用其峰潜伏期(即找高点)为宜,后述的 EBCR 判读也采用峰潜伏期法。有效的 EBSR 多在 35 ~ 100 ms 时间段内发生和结束,少数延长至 150 ms。35 ms 之前的 EBSR 峰不能算是真正的 EBSR,因 EBSR 与 EBUR 不同,声音导致眨眼的通路并非直接通路,具体的反射潜伏期应该长于 EBUR[14]。从我们实际的测试中未发现短于 35 ms 的 EBSR 峰。但在训练后期,常见 100 ~ 150 ms 内出现的 EBCR 与 EBSR 的融合,这会影响对 EBSR 峰幅度值的判断,导致其高点多被判读在 100 ~ 150 ms 处,实为融合波,并无典型孤立的 EBSR 波峰存在,而是延续到 EBCR 波峰,这大大影响了对 EBSR 峰幅度值的判读。考虑到必须使用 EBSR 的发生率和高度变化信息用于判断动物注意功能等,而"融合"导致了高度的判断失准,但又不能判读为无 EBSR,故对于 EBSR 无"峰"值出现的情况,程序需自动判读为"融合"出现了,并在随后的统计中做出相应调整,即融合后的 EBSR 只参加 EBSR 发生率的统计,而不参加 EBSR 波幅度和潜伏期的统计,以免对波幅造成虚高,潜伏期太长的假象。也可考虑重找此峰之前的第二波峰做统计,但难度较大,对融合这一情况的发生率也可加以统计。

关于 EBCR 识别的有效时间段设定在 200 ~ 380 ms 的问题:有时候,EBSR 反应的恢复性下降导致的拖尾可持续至 150 ms,个别情况甚至更长,故此段时间内的波形显然不能判断为 EBCR;另外在 100 ~ 200 ms 内即使有独立于 EBSR 的 EBCR,也是无保护功能的 EBCR,因为此段时间距 US 的开始尚早,"EBCR"无任何保护意义,至少是发生时间不准的无效 EBCR,且此段时间内常有 EBSR 反应的恢复性下降,对判读此间的 EBCR 造成影响,故 EBCR 识别的有效时间段设定 200 ~ 380 ms;实质测量的图形显示,大多数的 EBCR 峰幅度值在 200 ~ 380 ms 之间,且越在训练后期越靠近 EBUR。取 380 ms 而不是 400 ms,因从实质波形的多次人工的测量发现,在 400 ms 处的 US 起始的振荡或起始时间的误差常导致 EBUR 提前 20 ms 出现,故此 20 ms 不易列入 EBCR 计算期内。

在低声的分析时,EBCR 计算的实质上是动物的错误反应(误判),即动物没区分出高低声而把实际的低声误判为高声,在 380 ms 之前发出了错误的 EBCR,故虽然此次训练没有给予 US,但偶尔可记到错误的 EBCR。

总之,眨眼行为结果分析看似简单实质非常复杂,不经过仔细研究的自动化分析常常带来不全面甚至完全错误的结果和结论,使科研工作大打折扣。必须在兼顾自动化与准

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1831-05

TK6 人类淋巴母细胞 TK 突变体生长慢相关基因分离和鉴定

张 勇,赵 勇,练雪梅,李继斌,王应雄
(重庆医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:分离 TK6 人类淋巴母细胞慢生长突变体中与慢生长表型相关的基因并进行初步功能鉴定。方法:根据目标基因与胸苷激酶(Thymicline kinase,TK)基因连锁的特性,采用人类全基因组表达芯片检测全基因的表达情况,由此确定慢生长相关基因的位置和表达性质,以缩小筛选范围,最后通过基因功能检索,确定目标基因,并通过 RT-PCR 对目标基因进行初步验证。结果:慢生长细胞整体表达水平下调,但少数染色体尤其以 17 号染色体局部区域呈高表达状态。而在 TK 位点到端粒这一区域,TK 以及毗邻的染色盒同源物(Chromobox homoloy,CBX2),CBX4,CBX8 均呈高表达状态,功能检索发现 CBX 与转录抑制有关,功能验证实验中 CBX4 表达水平与细胞倍增时间呈正向相关。结论:TK6 慢生长表型与 17 号染色体 q 臂近端粒位置的 CBX 基因相关,但仍需更多证据确认 CBX 是慢生长表现最直接相关的基因。

【关键词】人类淋巴母细胞;慢生长;染色盒同源物
【中国图书分类法分类号】Q253 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-14

Isolation and identification of the slow growth TK mutants related genes of TK6 human lymphoblastoid cells

ZHANG Yong, et al
(*Department of Nutrition of Food Hygiene, School of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To isolate and identify the genes related to slow growth mutants of human lymphoblastoid cell TK6. *Methods*: Human genome expression microarray was used to measure gene expression at different levels, thereby narrowing candidate gene locations and expression properties. Target genes were identified by retrieving candidate gene functions and verified by RT-PCR.

作者介绍:张 勇(1974-),男,讲师,博士,
研究方向:营养与食品卫生。
通讯作者:王应雄,男,教授,E-mail:wyx61221@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市科委自然科学基金项目(编号:CSTC,2007 BB5286)。

确性两方面的基础上对多种特殊实验波形加以研究和判断,不断完善程序设计思路,才能减少漏判误判,达到实验结果信息利用的最大化和最优化。

参 考 文 献

[1] Goldman-Rakic P S.Cellular basis of working memory[J].Neuron,1995,14(3):477-485.
[2] Christian K M,Thompson R F.Naural substrates of eyeblink conditioning: Acquisition and retention[J]. Learn Mem,2003,10(5):427-455.
[3] McLaughlin J,Skaggs H,Powell D A. Medial prefrontal cortex and pavlovian conditioning: trace versus delay conditioning[J].Behav Neurosci,2002,116(1):37-47.
[4] Narawut P,Soyun K,Richard F T.The role of the cerebellar interpositus nucleus in short and long term memory for trace eyeblink conditioning[J]. Behav Neurosci,2009,123(1):54-61.
[5] 林 曦,胡 波,杨 丽,等.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[J].第三军医大学学报,2008,30(6):499-502.
[6] Kaori T N,Shigenori K,Yutaka K.NMDA receptor-dependent processes in the medial prefrontal cortex are important for acquisition and the early stage of consolidation during trace,but not delay eyeblink conditioning[J].Learn Mem,2005,12:606-614.
[7] Derick H, Lind Q,Richard W V,et al.Associative and non-associative blinking in classically conditioned adult rats[J]. Physio Behav,2009,96(3):399-411.
[8] Weiss C,Disterhoft J F. Evoking blinks with natural stimulation and detecting them with a noninvasive optical device:A simple,inexpensive method for use with freely moving animals[J].J Neurosci Method,2008,173(1):108-113.
[9] Glocker F X,Laukb M,Lückinga F,et al. Classical conditioning of the electrically elicited blink response in humans:a new method of data analysis[J].J Neurosci *Method*,1999,89(2):133-140.
[10] Taekwan L,KIM Jeansok J.Differential effects of cerebellar,amygdalar,and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning in rats[J].J Neurosci,2004,24(13):3242-3250.
[11] Weible A P,Oh M M, Lee G,et al.Galantamine facilitates acquisition of hippocampus-dependent trace eyeblink conditioning in aged rabbits[J].Learn Mem,2004,11(1):108-115.
[12] Morgane P J,Galler J R,Mokler D J.A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain[J]. Prog Neurobiol,2005,75(2):143-160.
[13] Halverson H E,Freeman J H.Medial auditory thalamic nuclei are necessary for eyeblink conditioning[J].Behavi Neurosci,2006,120(4):880-887.
[14] Weible A P,Weiss C,Disterhoft J F.Connections of the caudal anterior cingulate cortex in rabbit: naural circuitry participating in the acquisition of trace eyeblink conditioning[J]. Neuroscience,2007,145(45):288-302.

(责任编辑:冉明会)