DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.034
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

[J]. Physiol Sin, 1998, 50(3): 355—358.
[5] Alford S, Ferrguelli B G, Schofield J G. Characterization of Ca^{2+} signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synapticactivation of NMDA receptors[J]. J Physiol, 1993, 469(1): 693—716.
[6] He J, Deng C Y, Chen R Z, *et al*. Long-term potentiation induced by nicotine in CA1 region of hippocampal slice is Ca^{2+}-dependent[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(5): 429—432.
[7] Seki K, Kudoh M, Shibuki K. Long-term potentiation of Ca^{2+} signal in the rat auditory cortex[J]. Neurosci Res, 1999, 34(3): 187—197.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2003)03-0265-02

技术方法

小型动物清醒无肌松头颅固定方法的建立和应用

Establishment and application of the head fixation on awake animals without muscle relaxation

高 洁,隋建峰,熊 鹰,黎海蒂 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种小型动物清醒状态下不使用肌松剂的头颅固定方法。方法 设计和制作了前后桥型有孔头颅支架,并安装于动物前囟及后囟周围,再以螺丝、牙科水泥坚固。结果 运用该固定方法成功进行了听觉诱发电位、细胞外单位放电、长时程增强等实验,效果满意。结论 该固定方法简便易行,稳定性好,可用于脑研究的急、慢性实验,尤其有利于进行动物清醒状态下的听觉认知功能研究。

在进行脑功能研究的在体动物实验中,常需要对动物进行清醒状态下的头部固定,过去常用的方法是使用肌松剂加气管插管和人工呼吸对动物进行清醒制动,这虽可以实现动物清醒状态的在体研究,但对动物损伤大,且利用率低,只能用于急性实验。另外在应用脑立体定位仪固定动物头部时,需用耳杆顶住外耳道,这种固定方法显然不利于进行听觉相关研究。

为保证动物清醒、无肌松且不使用耳杆条件下的头颅固定,我们设计和制作了用于小型动物的头颅固定支架,实现了在体实验动物的清醒固定。并用该法进行了清醒豚鼠的听觉诱发电位,听觉分辨认知中豚鼠海马神经元放电和清醒大鼠海马长时程增强(Long-term potentiation, LTP)的记录,均取得良好效果。

1 材料与方法

1.1 桥形固定支架的制作

取日用金属片(硬度要大)于电热炉加热变软,弯成"Ц"形,再用电动钻头在桥身和桥臂处对称打孔。桥身孔和桥臂孔的大小分别依照配套螺丝杆粗细和耳杆尖端粗细而定,两桥身孔间距约6 mm。桥身长短和宽窄可根据动物头颅大小加工,将桥形支架表面打磨光滑,桥身应仿颅骨弧度弯成弧形,使其可与颅骨表面可靠接触,见图1。

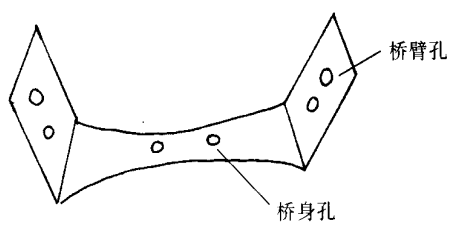


图1 小型头颅固定支架

1.2 支架的安装

取动物(大鼠、豚鼠或家兔均可),例如豚鼠,体重500~600 g(由第三军大学实验动物中心提供),以30 mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,用脑立体定位仪固定。将豚鼠眼后到耳间区域对应头皮剪掉(头皮损伤区域尽可能小),在前囟前4 mm和实验区域周围(如海马)5 mm,中缝左右旁开3 mm处各钻两椭圆小孔,将小型螺杆的帽端反旋入颅骨内,注意勿损伤皮层。将支架从桥身孔处穿过螺杆并贴近颅骨面,将螺母旋紧螺丝即可固定支架。根据实验区域和平衡原理以同法安装后支架,再用牙科水泥强化固定。最后,对拟记录区的去颅骨部分注意覆盖,抗菌保护,以备后用。动物休息3 d后进行实验。

1.3 动物清醒无肌松固定方法

动物安装支架3 d后进行实验。在动物清醒状态下将脑立体定位仪(Narishige SN-1)前后两对耳杆分别插入前、后桥臂的左右孔,通过四点对顶使头颅稳妥固定。动物身体置于悬吊的网兜或小盒内,以减小挣脱力。为方便固定,后耳杆需进行加工改进,使其头端与桥臂孔的相对位置可以调适,见图2。

作者简介:高 洁(1977—),女,山西省晋中市人,硕士研究生,主要从事学习记忆的神经生物学方面的研究。电话:(023)68752254

收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

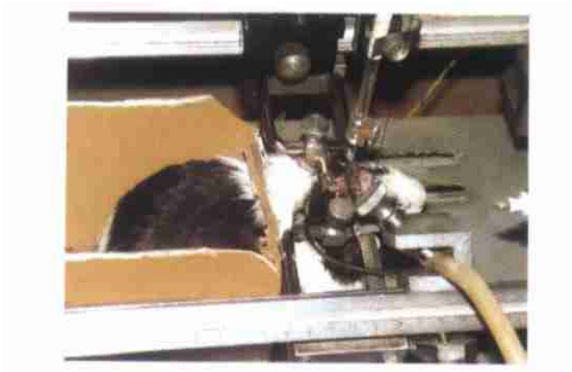


图2 执行听觉分辨任务的清醒豚鼠固定方法

2 结果

我们采用该固定方法记录了豚鼠听觉诱发事件相关电位、豚鼠完成听觉分辨任务时海马神经元认知电活动和清醒大鼠LTP。

2.1 豚鼠听觉分辨认知中海马神经元的单位放电

在解剖显微镜下掀去硬脑膜，用微电极推进器将充灌1 mol/L醋酸钠加2%滂胺天蓝溶液的玻璃微电极缓慢推入豚鼠海马CA3区(BregmaP：4，L：4.5，H：5～6 mm)，作细胞外记录。电极尖端直径约1 μm，直流电阻10～20 MΩ。微电极引导的电活动经微电极放大器(NIHON KOHDEN MEZ-7200)转换后用Power Lab/4sp(AD Instrument)系统采集分析。所用软件为CHART4.1，采样频率为10 KHz，同步监听放电信号。在无外界刺激情况下先稳定记录在300～1 000 s的自发放电，然后完成听觉分辨任务，见图3。

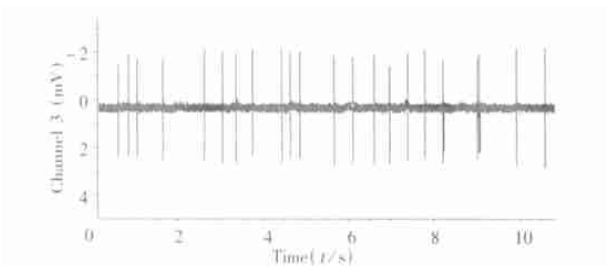


图3 豚鼠海马锥体细胞原始放电图(50 s)

2.2 豚鼠Oddball实验听觉诱发电位记录

动物清醒固定方法同上。应用Oddball实验模式：500 Hz短声为F刺激(Frequent stimulus)，占85%；1 000 Hz短声作为R刺激(Rare stimulus)，占15%。记录时参考电极置鼻根部，接地电极置耳杆，金属记录电极于海马区记录听觉诱发电位，电极阻抗小于5 kΩ，带通为0.5～100 Hz，灵敏度为100 μV，扫描时间为1 200 ms平均叠加20次[1]。采用Power Lab/4sp(AD Instrument)系统和Scope软件3.6.8采集分析。

2.3 清醒大鼠在体LTP记录

将已安装支架的清醒大鼠固定于脑立体定位仪，金属记录电极定位于海马齿状回(P：3.0 mm，L：4.5 mm，H：3.5 mm)；金属刺激电极定位于同侧海马穿行通路上(PP)(P：7.7 mm或6.8～7 mm，L：4.5 mm，H：3.0 mm)[2]。刺激信号通过电刺激器(Nikon Kohden)经刺激隔离器(Nikon Kohden SS-102J)输出，诱发电位经生物放大器(NIHON KOHDEN MEZ-7200)放大后，再经PowerLab 4 sp(AD Instrument. Australia)系统采集处理，应用Scope3.6.8软件扫描叠加，见图4。

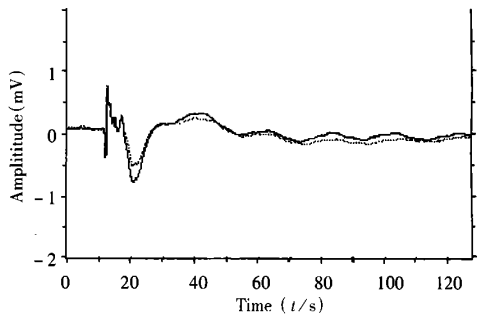


图4 清醒大鼠海马LTP

3 讨论

在行为电生理研究尤其是结合在体听觉实验研究中，需满足清醒、无肌松、不使用耳杆条件下的稳定固定，如果同时进行细胞放电记录，则对清醒固定的稳定性要求很高，目前尚无专门固定小型动物的理想方法。我们设计应用的固定法可用于大鼠、豚鼠、家兔等小型动物，能够满足清醒动物的行为电生理试验固定要求，特别适用于听觉相关实验。通过在体细胞外放电记录，在体LTP、事件相关电位记录实验等应用表明该法稳定性好、使用方便，动物痛苦小。与既往慢性P300记录方法比较，记录平稳、干扰小，可以免去数据筛选等步骤。且记录范围可灵活选择，尤其适用于作P300颅内起源探究[3]；清醒动物听觉相关LTP和细胞外记录的急、慢性实验中，在电极使用上也无限制，可在记录区域内重复盲插探寻。另外该固定方法使用材料容易获得，价格低廉，制作和使用简便。但对于清醒在体细胞内记录试验，考虑到稳定性的特殊要求本方法的应用尚在摸索之中。

关键词：头颅固定；诱发电位；长时程增强；自发放电
中图法分类号：R-332 文献标识码：B

参考文献：

[1] 林 坚，王子栋. 大鼠认知电位(类P3)的研究[J]. 中国病理生理杂志，1999，15(5)：408－410.
[2] 饶 燕，高 洁，赖世隆，等. D-半乳糖合并Meynert基底核损毁对海马长时程增强和突触形态的影响[J]. 中国应用生理杂志，2002，18(1)：18－22.
[3] Shinba T. Neuronal firing activity in the dorsal hippocampus during the auditory discrimination oddball task in awake rats：relation to event-related potential generation[J]. Cognitive Brain Res，1999，8(3)：241－250.

(编辑 郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net