隔区损毁对兔海马氨基酸类递质和 P3波的影响

虞乐华* 吴南顺** 吴宗耀 (第三军医大学附属西南医院康复科) 重庆, 400038

提 要 目的: 研究隔区损毁对兔海马 Glu、GABA、Asp、Tau和 P3波的影响,并探讨相关机制。方法: 隔区电损毁,并按不同时相记录听 Oddball刺激获得的兔 P3波,结合测定相应海马 Glu、GABA、Asp、Tau含量,分析递质变化与 P3波改变的相关性。结果: 隔区损毁后 P3a、P3b波潜伏期、电压振幅分别呈不同程度的延长、衰减。海马 Glu逐渐降低,并与 P3a、P3b波潜伏期延长呈一定意义负相关。GABA下降则与 P3b波振幅变化呈一定意义正相关。海马 Asp、Tau无明显变化。结论: 隔区损毁后,海马 Glu降低,可能与 P3a、P3b波潜伏期延长有关, GABA下降,则可能为 P3b波振幅衰减的原因。

关键词 P3波;海马;隔区损毁;氨基酸递质
中图法分类号 R322.81

临床与动物实验结果支持海马等边缘结构是 P3波重要源区或调节结构。隔与海马有复杂的功能联系,除胆碱能系统外,还有氨基酸能纤维等。对隔损毁后在猫或兔表现为 P3波电位逐渐消失这一异常机制的解释,学者们注意到了隔海马胆碱能受损溃变是其重要原因[1]。而临床报告及一些动物实验结果却表明,仅胆碱能系统紊乱的纠正与替代治疗,其效果尚不令人满意。近来研究认为,以 P3波异常为典型特征的认知功能损害性疾病如 AD存在隔海马结构不同程度病理损害,其发病原因除胆碱能外,氨基酸类递质(特别是 Glu)紊乱可能是另一重要因素[2]。隔损毁后,海马中氨基酸类递质在 P3波异常中可能的作用迄今尚未见报道。

1 实验方法

1.1 动物及分组

健康大耳白兔(家兔) 25只,体重在 2.5~3 kg,雌雄兼用。随机分为正常组(Normal) 5只,不行处理。对照组(Control) 5只,除未电解损毁外,余处理条件同实验各组(包括隔区插针)。隔区电损毁后按第 2、3、5天分别为 Lesion(2 d)、Lesion(3 d)、Lesion(5 d)各实验组,各组均为 5只。

1.2 隔区损毁及 P3波记录方法

电极固定及损毁手术: 用 3%戊巴比妥钠按 2~3 ml/kg体重经耳缘静脉注射麻醉动物,将家兔固定在江湾Ⅰ型通用立体定位仪上。常规消毒后,在每只家兔的颅顶中央(前囟后 5 mm,矢状缝左侧 2 mm)钻 1 mm左右小孔,将不锈钢螺丝(直径 1~1.5 mm)紧固于颅骨内(Pz点)作为 P3波电位记录电极。损毁电极用直径为 0.48 mm的不锈钢针灸针制成,针体绝缘,尖端裸露 0.5~1 mm,将损毁电极推入隔中区(AP-4 LP0 H-1)。直流电阳极接在损毁电极上,阴极置于皮下组织。通电流量 5 mA,时间 40 s。待各实验组完成电生理测试及海马取材后,其脑标本用 1%亚铁氰化钾和 10%福尔马林混合液固定 2周,取出后行厚连续切片以核实损毁部位。

P3波记录: 将兔固定于保定盒内,用奇异方案(Oddball paradigm)刺激。总刺激为 200个短声,其中 500 Hz短声为规律刺激,占 85%,100 Hz短声作为稀有刺激,占 15%,为靶刺激,随机分布于 500 Hz短声中,两种短声的持续时间均为 100 ms,间隔 2 s,扬声器置于兔头前上方 30 cm处用 Danten公司 Neuromatic 2000 C型肌电图-诱发电位仪记录。参考电极置鼻根,地电极置耳尖。电极阻抗小于 5 kΩ,带通 0.5~100 Hz,灵敏度 20μV/格,扫描时间 1 000 ms,叠加 30次,重复测试至少 1次。峰潜伏期及峰-峰值波幅均以游标测定。

1.3 海马氨基酸递质测定

电生理测试后,快速取出的一侧海马组织,精确称重,置样品于冰镇玻管中,加入 10%磺基水扬酸钠(2 ml/100 mg),冰浴下,以玻璃匀浆器匀浆。组织匀浆置低温冰箱待测。检测仪器为 Beckman-6300黄金系统氨基酸分析仪和 601黄金系统色谱工作站。

1.4 统计学分析

所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计算机进行 t检验。

2 结果

所有动物在实验过程中,无明显行为异常。总体实验完成处死动物,海马取材后,其厚切片兰斑染色定位表明电解损毁位中隔区。结果可靠。

2.1 隔区损毁对兔 P3波的影响

本实验在被动条件下,成功地记录到了潜伏期在 300 ms左右的双峰阳性大电位,按顺序-极性命名法,分别为 P3a、P3b波。隔区损毁后 P3a波潜伏期逐渐延长,在第 3天即为显著差异($P<0.05$),第 5天达非常显著差异($P<0.01$)。P3a电压振幅也表现为逐渐降低,但仅第 5天才具非常显著差异($P<$

* 虞乐华,男,35岁,主治医师,博士,现在附属新桥医院康复科 重庆, 400037
** 重庆市第九人民医院 重庆, 400700

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

0.01)。P3b波在隔区损毁后,潜伏期逐渐延长,在第 3天显示显著差异($P < 0.05$)。P3b波电压振幅,在第 2天,显著降低($P < 0.05$),但第 3天,其振幅却较第 2天有显著的增大($P < 0.05$),第 5天,P3b波消失。见表 1,图 1 A~ D。

表 1 隔区损毁对兔 P3波的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 P3 changes after septal lesion in rabbit($n = 5, \bar{x} \pm s$)

	Control	Lesion(2 d)	Lesion(3 d)	Lesion(5 d)
P3a				
L(ms)	265.20± 20.67	290.80± 25.95	323.20± 22.83*	411.20± 37.74**
A(μV)	12.00± 4.52	10.68± 4.72	8.88± 2.10	4.24± 1.80**
P3b				
L(ms)	361.60± 31.83	398.8± 27.26	447.20± 29.99*	–
A(μV)	9.64± 2.11	4.60± 1.47*	9.56± 2.09△	–

L: Latency, A: Amplitude; *: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ each group *vs* control; △: $P < 0.05$ Lesion(3 d) *vs* Lesion(2 d)

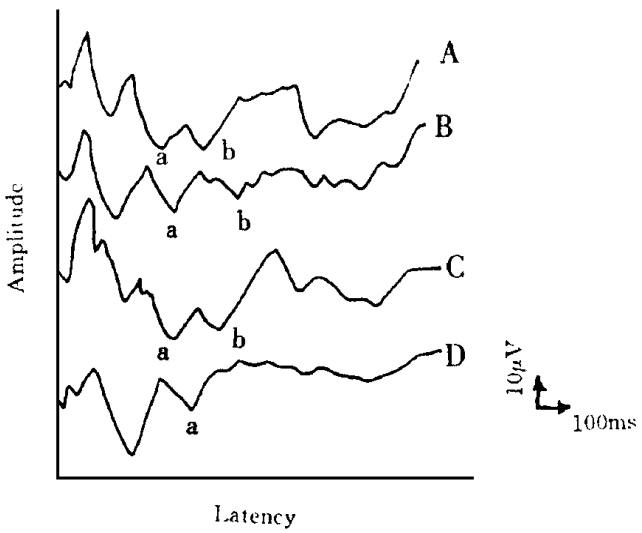


图 1 隔区损毁后 P3波的变化

Fig 1 P3 changes after septal lesions

A: Normal; B: Lesion(2 d); C: Lesion(3 d); D: Lesion(5 d)

2.2 隔区损毁前后海马氨基酸递质含量测定结果

在隔区电损毁后各时相组,Glu逐渐下降,在第 3天为显著性差异($P < 0.05$),第 5天达非常显著性差异($P < 0.01$)。Asp、Tau的变化各组均无统计学意义。而 GABA浓度,在隔区电损毁后第 2天与对照组比较即出现非常显著降低($P < 0.01$)。在隔区损毁后第 3天,与第 2天比较,GABA递质浓度有显著上升($P < 0.05$)。隔区损毁后第 5天,GABA又呈非常显著降低($P < 0.01$),见表 2。

2.3 海马 Glu、GABA含量变化与 P3a、P3b波异常的相关性比较

2.3.1 兴奋性 Glu、抑制性 GABA与 P3a、P3b波潜伏期的相关性 统计学相关性检验显示,隔区损毁后海马 Glu含量变化与 P3a潜伏期变化相关系数为 $R = -0.54315$, $P < 0.05$,表明为显著性负相关。与 P3b波潜伏期变化相关系数为 $R = -0.61199$,同样表明显著性负相关。隔区损毁后 GABA递质变化与 P3波潜伏期延长并不一致。海马区 GABA含量变化,与 P3a潜伏期变化相关系数为 $R = -0.2660$, $P > 0.05$无明显统计学意义,与 P3b波潜伏期变化相关系数为 $R = -0.19054$, $P > 0.05$,显示无显著相关。

2.3.2 兴奋性 Glu、抑制性 GABA与 P3a、P3b波电压振幅的相关性 隔区损毁后,海马区 Glu浓度下降与 P3a波振幅降低似有一致性相关,但统计检验得相关数 $R = 0.29917$, $P > 0.05$表明其并无意义。Glu的变化与 P3b波振幅的变化无显著相关性($R = 0.1515$, $P > 0.05$)。隔区损毁后海马抑制性递质 GABA含量变化与 P3b波振幅的变化有良好的相关性,相关系数 $R = 0.56036$, $P < 0.05$,为显著正相关。而 GABA浓度的改变与 P3a波振幅的下降,相关系数 $R = 0.1800$, $P > 0.05$,示并无显著意义。

表 2 隔区损毁对海马 Glu、ASP、Tan、GABA改变的影响(nmol/g, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of Septal Lesions on the changes of hippocampal amino acids (nmol/g, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

	Normal	Control	Lesion(2 d)	Lesion(3 d)	Lesion(5 d)
Glu	11.2790± 1.6770	10.8068± 1.3546	9.8717± 1.4065	7.4592± 1.3025*	6.5350± 1.5722**
Asp	1.9402± 0.9577	1.6855± 0.3299	1.9110± 0.6234	1.7315± 0.6725	1.0067± 0.5119
Tau	1.9681± 0.3651	2.0423± 0.9786	1.9882± 0.2623	1.9469± 0.2563	1.9698± 0.7341
GABA	1.9568± 0.2260	1.8842± 0.1046	1.3504± 0.1511**	1.7733± 0.1774△	0.9047± 0.3953**

*: $P < 0.05$**: $P < 0.01$ each group *vs* control; △: $P < 0.05$ Lesion(3 d) *vs* Lesion(2 d)

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

3 讨论

实验结果表明,隔区损毁后兔 P3a P3b波潜伏期逐渐延长, P3b波消失后, P3a波潜伏期更加延长,并伴有电压振幅的降低。海马兴奋性 Glu含量下降与 P3a P3b波潜伏期的延长呈明显负相关,与该两波振幅变化无明显相关。海马重要的抑制性递质 GABA含量变化显示出与 P3b小压振幅改变有显著正相关。海马中另外两种递质 Asp Tau在隔区损毁后未显示出有意义的改变。

隔区损毁后海马内发生的顺行,逆行神经溃变除损害胆碱能外,可能还是实验所观察到海马中 Glu GABA紊乱的动因,因此参与了 P3波异常机制。据报道, P3波中 P3a波成分可能起源于扣带回、额叶等,海马则是 P3b波重要的调节区或直接电活动起源结构[3]。P3波的潜伏期主要与多环节相关神经元跨突触信息传递时程有关,这也是神经递质或调质实施对潜伏期影响的靶点。海马内兴奋性 Glu可能通过对海马内 P3b起源相关神经细胞的直接起易化作用,从而调节 P3b波潜伏期。对 P3a波潜伏期的调控可能部分是由海马扣带回这一重要的学习行为训练相关脑皮层激活通路[4]实现的。在隔区损毁后第 5天,当 P3b波消失时,除 P3a波潜伏期更加延长外,其电压振幅也明显衰减。提示隔区损毁后 P3a波异常的发生可能还与隔向扣带回等直接投射的功能纤维[5]受损溃变有关。

隔区损毁后,海马内重要的抑制性递质 GABA变化与 P3b波电压振幅的改变呈明显意义正相关。表明 GABA在海马所发生的抑制性突触后电位(IPSP)可能直接是头颅记录到的 P3b波电位重要组成,从而支持 P3波发生的 IPSP学说[6]。隔损毁 P3b波电压振幅出现的下降-上升-消失这一过程与海马 GABA含量下降-上升-再下降过程基本一致,隔损毁后 GABA代偿性增加或许是 P3b波增大的原因。另外,本实验研究发现隔区损毁,海马兴奋性氨基酸 Glu Asp并无增高,这一结果不同于脑血或脑区直接受损所表现的过多兴奋性 Glu Asp释放,起神经细胞毒性损害作用[7]。可见,隔区损毁所诱发的海马顺行,逆行溃变损害主要是由其它病理机制参与所致。

参考文献

1 Harrison J B, Stanford M, Kaseda Y. "Cat P300" disappear after septal lesions. EEG Clin Neurophysiol, 1988, 69(1): 55

2 Dona L D, Sohn Y H, Huh K. Rodent models of memory dysfunction in alzheimers disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. Life Sci, 1994, 55(23): 3037

3 Ebmier K P, Salmelin R, Jancke L. Cognitive brain potentials and regional cerebral blood flow equivalents during two and three auditory"oddbal ltasks". EEG Clin Neurophysiol, 1995, 95(41): 434

4 Michae G, Steven S. Posterior cingulate cortical lesions eliminate learning-related unit activiting in the anterior cingulate Cortex, Brain Res, 1987, 409(6): 151

5 Patrick D, Rosen I, Miles M A. The septohippocampal pathway; structure and function of a central cholinergic system. Physiol Rev, 1995, 75(2): 393

6 Thaddeus J, M. Neurochemical interpretation of cortical slow potentials as they relate to cognitive processes and a parsimonious model of mammalian brain. In: Mcallum W C, Curry S H. Slow Potential Changes in the human Brain. New York: Plenum Press, 1993. 253~273

7 Scheller D, Tegtmeier F, Heister U, *et al*. Extracellular hanges of aspartate glutamate and taurine in relation to DC changes during complete cerebral ischemia and cortical spreading depression. In: Haschke W, Roitbak A I, Spekman E J. Slow Potential Changes in the Brain. Boston: Birkhauser, 1993. 145~150

(收稿: 1999-01-30;修回: 1999-05-12)

(编辑　张大春)

Effects of septal lesions on hippocampal amino acid transmitters and P3 potentials in rabbits

Yu Lehua, Wu Nanshun, Wu Zhongyao (Department of Rehabilitation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the effects of septal lesions on the hippocampal content of Glu, GABA, Asp and Tau and P3 potentials. Methods: The septal region was eletrically damaged in rabbits. The changes

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