

豚鼠经典眨眼条件反射双任务模型的建立

尚经轩¹ 虞璟² 隋建峰³ 范蕊 虞乐华 (重庆医科大学附属第二医院康复理疗中心,重庆 400010)

【摘要】目的 在同一豚鼠体上建立痕迹性和延迟性眨眼条件反射双任务模型,为研究认知过程中前额叶与其他脑区信息编码机制提供模型。方法 以经典的眨眼条件反射为基础,采用1 kHz和3 kHz正弦波纯音分别配对压强为20 kPa的束状氧气流对豚鼠左侧眼角膜进行刺激,利用肌肉张力换能器采集豚鼠眨眼活动,用眨眼条件反射行为特征传感器信号分析软件V2.2版分析眨眼数据。结果 经过10 d的配对训练后,6只豚鼠均建立了痕迹性和延迟性眨眼条件反射双任务。实验发现,与痕迹性眨眼条件反射相比,豚鼠更容易建立延迟性眨眼条件反射。结论 利用同一豚鼠首次成功建立了痕迹性和延迟性眨眼条件反射双行为模型。

【关键词】 痕迹性眨眼条件反射;延迟性眨眼条件反射;双任务模型

(中图分类号) R338.61 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2012)22-4925-04;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2012.22.034

Establishment of a dual task model of classical eyeblink conditioning in guinea pigs

SHANG Jing-Xuan, YU Jing, SUI Jian-Feng, et al.

Center of Physical Medicine and Rehabilitation, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

【Abstract】 Objective To establish a dual task model of trace and delay eyeblink conditioning in the same guinea pigs, which offering a model for the relationship study of the frontal cortex and other brain regions in cognitive process. **Methods** On the basis of the classical eyeblink conditioning, 1 kHz and 3 kHz tone conditioned stimulus (CS) were separately paired with a 20 kPa corneal oxygen-puff unconditioned stimulus (US) to stimulate the left cornea of the guinea pigs. Blink activity in guinea pig was collected with muscle tension transducer, and eyeblink conditioning behavior feature sensor signal analyzing software V2.2 was used to analyze the data of eyeblink. **Results** After 10 days' pairing training, all 6 guinea pigs had established the dual task model of trace and delay eyeblink conditioning. Compared to trace eyeblink conditioning, it was easier for the guinea pigs to establish delay eyeblink conditioning. **Conclusions** It is first reported that the same guinea pigs could also obtain trace and delay eyeblink conditioning, which provides a reliable model for studying the exact role of pre-frontal cortex in the cognitive processes.

【Key words】 Trace eyeblink conditioning; Delay eyeblink conditioning; Dual task model

经典眨眼条件反射(EBC)一直是研究联合型学习记忆神经生物学机制的重要模型^[1,2]。其基本训练过程是:条件刺激(CS,如声音或光)与非条件刺激(US,如向角膜吹气或眶周电击)反复配对呈现,训练动物学会对条件刺激产生行为条件反应(CR)。根据该反射训练时条件刺激与非条件刺激之间的时间关系的不同,EBC又分为延迟性眨眼条件反射(DEBC)和痕迹性眨眼条件反射(TEBC)。所谓DEBC是指:条件刺激的起点与非条件刺激的起点有一定时间间隔,即US在CS出现之后延迟一定时间才出现,但与CS同时终止;与DEBC相比,TEBC的最大不同点是CS的终点与US的起点之间有段无任何刺激的时间间隔。前额叶在眨眼条件反射中的作用成为研究的热点,需要建立TEBC和DEBC模型,分析在学习与记忆中前额叶与其他结构的作用关系^[3]。目前有学者利用豚鼠成功建立了听觉识别训练模型,采用CS与US配对分别刺激两组豚鼠成功

建立TEBC和DEBC,但实验结果往往会受动物状态等因素的干扰^[4,5]。因此,在同一豚鼠体上建立TEBC和DEBC双任务模型,对于应用EBC准确分析前额叶在认知过程中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用健康8~10周龄雄性英国种白化豚鼠6只,350~450 g/只,由重庆医科大学实验动物中心提供,饲养于温度为20℃~25℃的动物室内,24 h循环灯照,自由进食、饮水,并适当给予维生素C补充。在饲养笼内铺以木屑,以保持环境干燥。实验在上午9:00~下午5:00进行。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠头部小型头颅固定装置的安装 用1%戊巴比妥钠(0.1 ml/100 g,腹腔注射)和速眠新II(0.1 ml,肌肉注射)复合麻醉动物,并将其头部固定于脑立体定向仪上(SR-6N, Narishige, Japan)。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。在暴露的颅骨上钻开4个直径约1.0 mm的小孔(坐标:孔1和2:前囟后2.0 mm,双侧旁开2.0 mm;孔3和4:前囟后12.0 mm,双侧旁开2.0 mm)。分别用4颗已消毒的不锈钢螺丝钉(直径:1.0 mm,螺距:400 μm,重量:0.3 g)反旋入1~4号小孔内。将矩形头部固定支架(大

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30771769)

1 重庆城市管理职业学院 2 重庆医科大学临床学院

3 第三军医大学基础医学部生理学教研室

通讯作者:虞乐华(1963-),男,主任医师,教授,博士,主要从事物理医学与康复科学的研究。

第一作者:尚经轩(1977-),男,讲师,硕士,主要从事物理医学与康复科学的研究。

小: 1.0 cm × 1.0 cm × 0.4 cm; 材料: 有机玻璃, 重量: 0.5 g) 嵌合在 1~4 孔不锈钢螺丝之间, 后用 502 强力胶拌牙科水泥固定。术后给予必要的抗感染措施。恢复 1 w 后, 全身和眨眼状况恢复良好的动物进行行为训练。

1.2.2 行为训练方法 行为训练在隔光、隔音的屏蔽柜内进行, 保持实验环境处于安静状态。完整的训练周期包括 2 d 适应期和 10 d 训练期。适应期内, 豚鼠被放置于有机玻璃制成的长方体固定盒 (20 cm × 8 cm × 5 cm) 中, 通过固定盒前端孔洞将其头颈部露在盒外, 使用耳杆顶住头颅固定支架, 将豚鼠头部固定在脑立体定位仪上。适应时间约 50 min, 在此期间不给动物施予任何刺激。

行为训练在适应期结束后第 1 天开始, 每天每只训练一次, 连续进行 10 d, 豚鼠固定方法同适应期。将气流喷嘴放置于正对豚鼠左侧眼角膜的位置, 距离 1.0 cm。非条件刺激 (US) 为一个持续 100 ms、压强为 20 kPa 的束状氧气流; 条件刺激 (CS) 为持续 500 ms 的 1 kHz 低频声和持续 300 ms 的 3 kHz 高频声组成的正弦波纯音 (声压强度: 80~90 dB; 升降时间: 5 ms)。高频声 (H-CS) 70 次, H-CS 约占刺激总数的 50% 左右, 低频声 (L-CS) 次数随机。高、低频声随机出现, 由静电扬声器播放, 并可触发“SBO-1 条件反射与识别学习行为自动训练系统”, 按照设定的参数释放氧气流, 具体的训练流程见图 1。

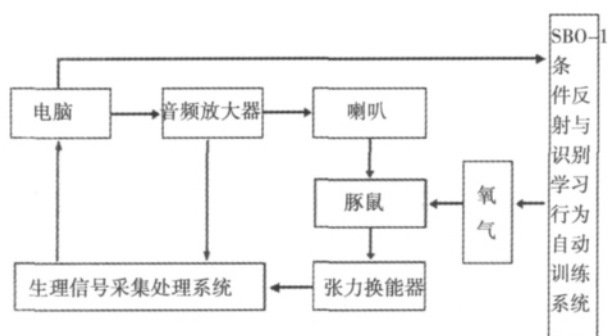


图 1 双任务训练流程示意图

DEBC 配对训练时, 低频声 CS 开始 400 ms 后, 对左眼角膜施予 US, CS 和 US 同时结束; 而在 TEBC 配对训练时高频声 CS 开始 600 ms 后, 对左眼角膜施予 US。每只动物每天训练 1 次, 每次配对训练间隔时间为 15~30 s (平均为 20 s)。

1.2.3 眼轮匝肌活动记录 训练时, 末端带有尼龙细线的蛙心夹夹住豚鼠左侧上眼睑, 尼龙细线另一端连接肌肉张力换能器。眨眼活动引起的张力变化转换为电位波动, 可以反映左侧上眼睑的活动情况 (1 mV 电位波动与 0.25 mm 眨眼幅度变化对应)。眨眼活动信号、CS 信号由多通道电生理信号记录仪同步记录, 采样频率为 20 kHz, 数字信号存储于控制的电脑中。

1.2.4 数据分析 使用眨眼条件反射行为特征传感器信号分析软件 V2.2 版分析存储于电脑中的眨眼数字信号。显著的眨眼活动满足以下 2 个标准: ①上眼睑活动值 (时刻 t) $\geq$ 眼睑活动基线值 + 1 mV; ②满足条件①的时间总和超过 15 ms。眨眼反应参数定义: 条件性眨眼反应 (CR): 在 DEBC 配对训练模式

中 CS 开始后 200~400 ms 阶段发生的显著眨眼活动; 在 TEBC 配对训练模式中 CS 开始后 400~600 ms 阶段发生的显著眨眼活动。惊愕反应 (SR) 为由于声音而产生的惊愕反应, 其定义为 CS 开始后 35~100 ms 阶段发生的显著眨眼活动。非条件眨眼反应 (UR) 定义为 US 开始后 1~100 ms 发生的显著眨眼活动。眨眼反应参数定义如下: ①CR 峰幅度: CR 最大值与基线值之间的幅度间隔; ②SR 峰幅度: SR 最大值与基线值之间的幅度间隔。

1.3 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。使用 Separate One-Way Repeated Measures ANOVA 比较时间效应和组间差异。

2 结果

2.1 豚鼠痕迹性和延迟性眨眼条件反射建立过程中眨眼反射图像 痕迹性和延迟性眨眼条件反射建立过程中第 1 天的图像对比: TEBC 和 DEBC 都没有建立, 而在 TEBC 训练任务中 SR 反应的峰幅度较高。见图 2。

痕迹性和延迟性眨眼条件反射建立过程中第 10 天的图像对比: TEBC 和 DEBC 习得率和峰幅度保持高水平, 建立了 TEBC 和 DEBC; 而在 TEBC 中 SR 出现率及峰幅度与 DEBC 的相比, 始终保持在高水平。见图 3。

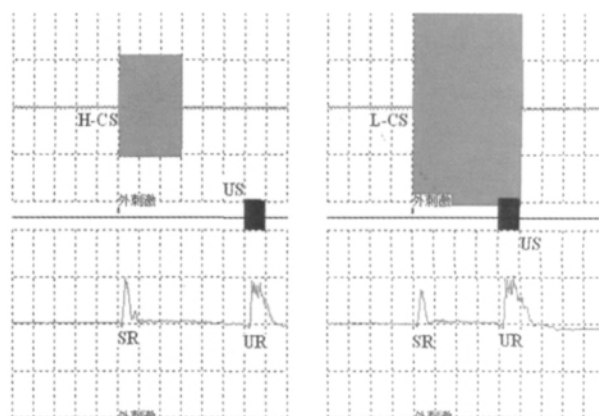


图 2 第 1 天 TEBC 和 DEBC 训练

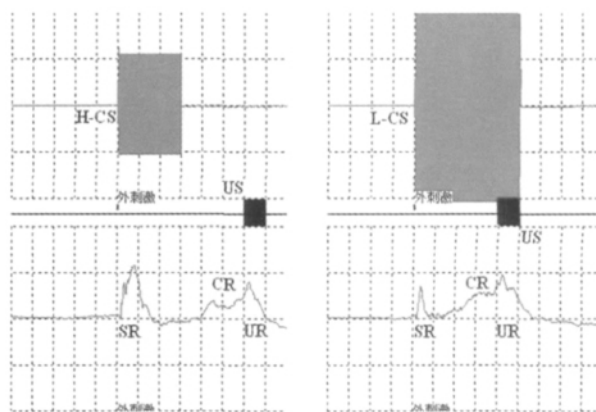


图 3 在第 10 天 TEBC 和 DEBC 训练

2.2 痕迹性和延迟性眨眼条件反射建立过程中各项参数的动态变化

2.2.1 CR 习得率 在痕迹性眨眼条件反射训练的第1~10天,CR 习得率随训练天数的增加而逐渐增加,训练第10天CR 习得率 $(84.87 \pm 4.09)\%$ 显著高于训练的第一天 $(5.55 \pm 2.89)\%$ ($P < 0.05$); 同样,在延迟性眨眼条件反射训练的第1~10天,CR 习得率随训练天数的增加而逐渐增加,训练第10天CR 习得率 $(91.77 \pm 1.18)\%$ 显著高于训练的第1天 $(7.25 \pm 2.32)\%$ ($P < 0.05$)。DEBC 习得率显著高于TEBC 习得率($P < 0.05$)。见图4。

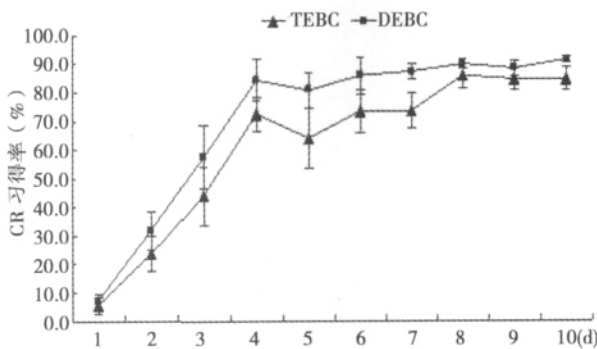


图4 TEBC 和 DEBC CR 习得率动态变化

2.2.2 CR 峰幅度 在痕迹性眨眼条件反射训练的第1~10天,CR 峰幅度随训练天数的增加而逐渐升高,训练第10天CR 峰幅度 (3.08 ± 0.25) mV 显著高于训练第一天的峰幅度 (1.23 ± 0.45) mV ($P < 0.05$); 同样,在延迟性眨眼条件反射训练的第1~10天,CR 峰幅度随训练天数的增加而逐渐升高,训练第10天CR 峰幅度 (3.20 ± 0.30) mV 显著高于训练第一天的峰幅度 (1.60 ± 0.38) mV ($P < 0.05$)。TEBC 和 DEBC 的峰幅度比较差异无统计学意义($P = 0.638$)。见图5。

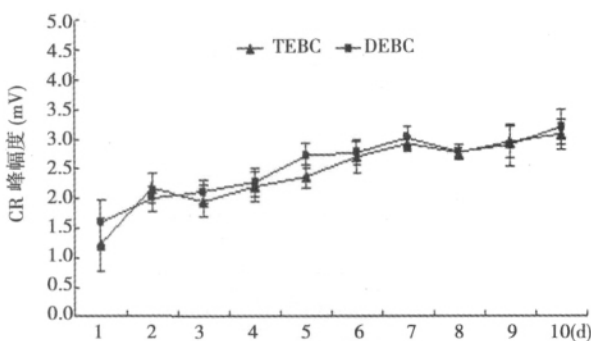


图5 TEBC 和 DEBC CR 峰幅度动态变化

2.2.3 SR 出现率 在痕迹性眨眼条件反射训练的第1~10天,SR 出现率差异无统计学意义($P = 0.334$); 在延迟性眨眼条件反射建立过程中,SR 出现率也无统计学意义($P = 0.352$)。TEBC 中SR 的出现率显著高于 DEBC($P < 0.05$)。见图6。

2.2.4 SR 峰幅度 在痕迹性眨眼条件反射训练的第1~10天,SR 峰幅度差异无统计学意义($P = 0.841$); 同样,在延迟性

眨眼条件反射训练的第1~10天,SR 峰幅度差异无统计学意义($P = 0.891$)。TEBC 中SR 的峰幅度显著高于 DEBC($P < 0.05$)。见图7。

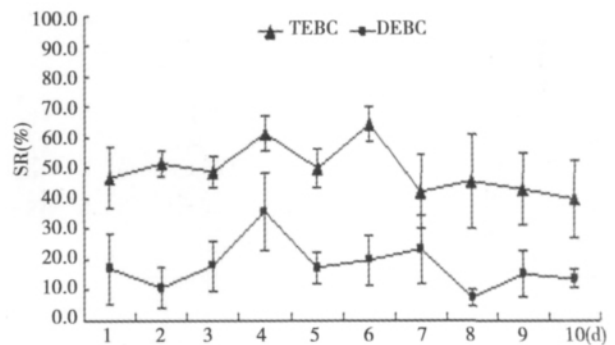


图6 TEBC 和 DEBC SR 出现率动态变化

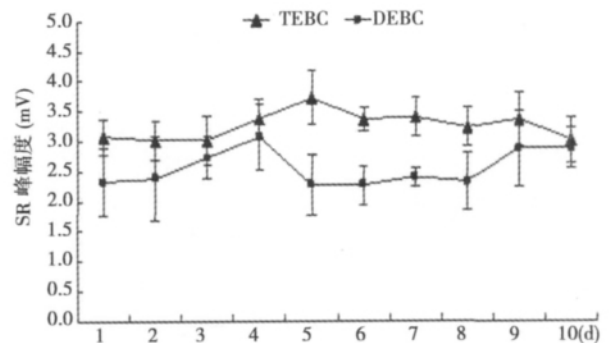


图7 TEBC 和 DEBC 中 SR 峰幅度动态变化

3 讨论

为了阐明学习与记忆发生的神经机制、信息编码过程,需要动物行为实验模型来研究这一脑认知功能过程^[6]。有文献报道,DEBC 建立依赖于小脑结构,TEBC 的建立还需要其他结构(海马、前额叶等)参与^[7]。

与大鼠相比,豚鼠性情温顺,便于使用头颅固定眨眼训练装置,无刺激时几乎没有自主眨眼,本实验前期已成功建立了豚鼠经典眨眼条件反射模型^[5]。因此,本实验采用豚鼠,意在同一动物体上建立痕迹性和延迟性眨眼条件反射双任务模型,为探索前额叶在学习与记忆中神经元活动信息编码机制提供有用的动物模型。目前,尚未见相关研究报道。

本研究结果显示:①经过连续10 d 的CS 与US 配对训练,每只豚鼠均可以习得TEBC 和DEBC,且两组CR 习得率随着训练天数的增加而增加;但它们更容易习得DEBC,表现在其有较高的CR 习得率和较快的习得速度,这与在大鼠、小鼠以及人等受试动物上的发现相似,也与利用豚鼠进行TEBC、DEBC 单任务训练结果一致^[6]。②在TEBC 和DEBC 训练中两组CR 的峰幅度随着训练天数的增加而上升,但TEBC 和DEBC 的CR 峰幅度差异不显著。③在TEBC 和DEBC 双任务建立中,SR 发生率及峰幅度存在差异,表现在TEBC 的SR 发生率及峰幅度都高于DEBC 的发生率和峰幅度,提示SR 和CR 可能是由不同神经环路或神经机制介导的。更复杂的纤维输入方式和途径可

能是建立 TEBC 所需要的训练次数要多于 DEBC 的原因^[3~7]。

在同一豚鼠体上建立 TEBC 和 DEBC 双任务模型很好地消除了实验动物的影响,准确地反映出动物对训练任务的学习情况;同时,进行两种训练任务也节省了训练时间,减少了实验对动物的需要量。总之,同一豚鼠体上可以建立 TEBC 和 DEBC 双任务模型。

4 参考文献

- 1 Nokia MS, Penttonen M, Korhonen T, *et al.* Hippocampal theta (3~8 Hz) activity during classical eyeblink conditioning in rabbits (J). *Neurobiol Learn Mem* 2008; 90(1): 62-70.
- 2 Linden DJ. Neuroscience. From molecules to memory in the cerebellum (J). *Science* 2003; 301(5640): 1682-5.
- 3 Kalmbach BE, Tatsuya O, Joy C, *et al.* Interactions between prefrontal

cortex and cerebellum revealed by trace eyelid conditioning (J). *Learn Mem* 2009; 16(1): 86-95.

- 4 黄率帅, 林 曦, 胡 波, 等. 经典眨眼条件反射建立后豚鼠小脑齿状-中位核突触超微结构的变化 (J). *第三军医大学学报* 2009; 31(6): 477-9.
- 5 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): 95-8.
- 6 Shors TJ. Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness (J). *Trends Neurosci* 2004; 27(5): 250-6.
- 7 Woodruff-Pak DS, Disterhoft JF. Where is the trace in trace conditioning (J)? *Trends Neurosci* 2008; 31(2): 105-12.

(2011-10-10 收稿 2011-12-12 修回)

(编辑 曲 莉)

开口箭总皂苷对小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤的抑制作用

黄文峰 晏传奇 邹 坤 汪蓁植

(三峡大学医学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室 湖北 宜昌 443002)

(摘要) 目的 探讨开口箭总皂苷对小鼠 H₂₂ 皮下移植瘤的影响。方法 建立 H₂₂ 细胞的小鼠肝癌移植瘤模型,灌胃给予不同浓度的开口箭总皂苷,连续 15 d,观察皮下肿瘤的生长情况,并切片观察和电镜观察。结果 与模型组相比,开口箭总皂苷能显著抑制肿瘤的生长,光镜下见瘤组织中大面积坏死,电镜下可见死亡类型以凋亡为主。结论 动物实验表明开口箭总皂苷能抑制 H₂₂ 肝癌移植瘤的生长,诱导其凋亡。

(关键词) 开口箭;皂苷;肝癌

(中图分类号) R285.5 **(文献标识码)** A **(文章编号)** 1005-9202(2012)22-4928-03;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2012.22.035

The inhibition of total saponin derived from *Tupistra chinensis* Baker on mice H₂₂ hepatocarcinoma xenograft

HUANG Wen-Feng, YAN Chuan-Qi, ZOU Kun, *et al.*

Medical College, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

(Abstract) **Objective** To study the effect of total saponins derived from *Tupistra chinensis* Baker on mice H₂₂ hepatocarcinoma xenograft. **Methods** The mice H₂₂ hepatocarcinoma xenograft animal model were made up firstly. And the mice were administrated by gavage with different concentrations of total saponins derived from *Tupistra chinensis* Baker for 15 days, and the xenograft growth conditions, histological changes and electron microscopy results were observed. **Results** Compared of model group, total saponins of *Tupistra chinensis* Baker significantly inhibited the xenograft growth. Big mass necroses were observed under the light microscope. Further electron microscope observation found that apoptosis was main. **Conclusions** Animal experiments demonstrates that saponin of *Tupistra chinensis* Baker could inhibit the growth of H₂₂ hepatocarcinoma xenograft through apoptosis.

(Key words) *Tupistra chinensis* Baker; Saponins; Hepatocarcinoma

开口箭主要分布于我国四川、湖北等南部地区,民间多以其根茎及全株入药。中医认为该属植物苦、辛,性寒,有毒;具有清热解毒、祛风除湿、散瘀止痛等功效,主治白喉、咽喉肿痛、胃痛、跌打损伤、风湿痹痛、痈肿疮毒、毒蛇及狂犬咬伤等^[1]。

本实验室前期研究发现,开口箭皂苷含量丰富,还含有多糖等其他成分,具有抗炎等多种药理活性^[2];开口箭总提物和总皂苷对体外培养的肺部肿瘤细胞有较好的抑制作用,而多糖却并不理想^[3]。很多体内实验表明,许多植物来源的总皂苷成分在体内亦具有很好的抗癌活性,如人参皂苷,而开口箭总皂苷成分在体内是否亦有抗癌活性尚不清楚。本研究拟探讨开口箭总皂苷在体内的抑瘤活性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 取开口箭根茎,粉碎后用甲醇回流提取,再以正丁醇萃取浓缩抽干即得,用水溶解备用;5-氟尿嘧啶(5-FU)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30870254)

通讯作者:邹 坤(1962-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事天然产物的研究与开发。

第一作者:黄文峰(1975-),男,博士,主要从事天然产物抗肿瘤作用研究。