

· 基础研究 ·

血管性痴呆小鼠认知功能及事件相关电位 P300 测定的研究

王雪笠 吕佩源 于曾洋 陶冉 闫佳兰 贺银方

【摘要】目的 建立小鼠事件相关电位的模型、测定方法及其参考值,探讨具有认知功能改变的血管性痴呆小鼠 P300 电位的变化特征。**方法** 选择雄性昆明小鼠 48 只,随机分为正常组、假手术组和模型组。应用双侧颈总动脉线结反复缺血-再灌注法制备血管性痴呆小鼠模型,采用跳台试验和水迷宫试验观测其行为学改变,测定模型组 N2、P3 的潜伏期及波幅,并与正常组、假手术组进行比较。**结果** 模型组小鼠学习、记忆成绩较假手术组差 ($P < 0.05$), N2、P3 潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)。**结论** 血管性痴呆小鼠 P300 电位各波潜伏期显著延长,同时学习、记忆成绩下降。非麻醉状态下经头皮记录小鼠事件相关电位 P300 可为动物实验研究提供客观、无创、定量和有价值的电生理检测手段。

【关键词】 血管性痴呆; P300 电位; 认知功能

Study of the cognitive function and event related potential P300 in mice with vascular dementia WANG Xue-li*, LÜ Pei-yuan, YU Zeng-Yang, TAO Ran, YAN Jia-lan, HE Yin-fang. *Neurology Department, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Corresponding author: LÜ Pei-yuan, Email: ukpeiyuanlu@yahoo.com

【Abstract】 Objective To built up the ERP model, measure mode and P300 potential reference standard in mice with vascular dementia (VD), and characterize the P300 potential in mice with VD. **Methods** Forty-eight mice were randomly divided into a normal group, sham operation group and a VD group. The mice in the Vd group were subject to repetitive ischemia and reperfusion by using the ligation of bilateral common carotid arteries so as to establish the VD model. The behavioral abnormalities were investigated by step-down test and water maze test. The N2 and P3 components of P300 potentials were also recorded. **Results** It was shown that the learning and memory abilities as reflected by the step down test and water maze test scores were decrease in mice in the VD group when compared with those in the normal group and sham operation group ($P < 0.05$). The N2 and P3 latencies significantly prolonged ($P < 0.01$) and P3 amplitudes decreased ($P < 0.05$) in VD group as well. **Conclusions** In VD mice, there is a significant prolongation of the P300 potential latency and a significant decrease of learning and memory abilities. Recordings of P300 from unanesthetized mice could be an objective, non-invasive, quantitative and valuable electrophysiological method for studying the cognitive function of VD mice.

【Key words】 Vascular dementia; P300 potential; Cognitive function

事件相关电位(event related potential, ERP)中的 P300 又称认知电位,是评定认知功能的一项指标。P300 是大脑在对刺激信息进行认知加工的过程中,通过诱发电位仪在头皮上记录到的一种长潜伏期电位,与复杂的认知过程有关,反映大脑对刺激的判断、记忆提取、比较和识别的过程,是感觉、知觉、理解、判断和推理等心理过程的反映^[1]。对于人类和大鼠 P300 电位的测定已有较多报道,但对于小鼠 P300 电位的测定鲜见报道。本研究通过跳台试验和水迷宫试验观测血管性痴呆(vascular dementia, VD)

小鼠的行为学改变,测定其 N2、P3 的潜伏期及波幅,建立小鼠 ERP 的模型、测定方法及其参考值,探讨具有认知功能改变的 VD 小鼠 P300 电位的变化特征,以为动物实验研究提供客观、无创、定量和有价值的电生理检测手段。

材料与方法

一、仪器

LW-II 型小鼠水迷宫试验装置、小鼠电刺激跳台仪由中国医学科学院药物研究所提供,肌电图诱发电位测定仪为加拿大 Xltek 公司产品。

二、动物分组

实验动物选用 3 月龄雄性昆明小鼠 48 只,购自河南华兴实验动物养殖中心,体重 (32.5 ± 2.5) g。适应

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学神经病学教研室(王雪笠);河北省人民医院神经内科(吕佩源);白求恩国际和平医院神经内科(于曾洋、陶冉、闫佳兰、贺银方)

通讯作者:吕佩源, Email: ukpeiyuanlu@yahoo.com

性饲养 1 周后随机分为正常组、假手术组和模型组,每组 16 只。

三、模型制备

采用颈总动脉线结反复缺血-再灌注法制备模型^[2]。小鼠仰卧位固定,用 10% 水合氯醛以 350 mg/kg 体重腹腔注射麻醉,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,并套以 4 号丝线备用,拉紧丝线扣,阻断血流 20 min,同时尾部放血 0.3 ml,热凝止血,松开丝线扣恢复血流 10 min,再次阻断血流 20 min,如此重复 3 次,第 3 次缺血再灌注后 30 min,如小鼠呼吸、心跳正常,即可缝合皮肤。假手术组仅暴露双侧颈总动脉而不结扎,且尾部不放血。正常组常规饲养,不行上述操作。

四、行为学检查

术后第 29 天,各组分别进行跳台试验和水迷宫试验^[2,3],记录学习成绩,术后第 30 天再次进行跳台试验和水迷宫试验,记录记忆成绩。

1. 跳台试验:测试装置为被动回避反应箱,记录小鼠首次受电击后跳上安全台所需时间(反应时间)、5 min 内跳下圆台次数(错误次数),作为学习成绩。24 h 后重复上述测试,记录小鼠首次从安全台跳至铜栅所需时间(潜伏时间)、5 min 内跳下圆台次数(错误次数),作为记忆成绩。

2. 水迷宫试验:采用小鼠水迷宫试验装置,盲端有自动感应装置,自动控制记录仪记录数据。记录其游完全程时间、进入盲端次数(错误次数),作为学习成绩。24 h 后重复测试,上述指标作为记忆成绩。

五、P300 电位测定

将小鼠固定在自制立体定位仪上,剃除耳后、头顶及额部毛,用 75% 酒精消毒皮肤,用 0.5 寸毫针刺入矢状缝与两外耳道连线交点头皮下,斜向前约 2 ~ 3 mm,作为记录电极;参考电极置于耳后下方;接地电极置于前额部。应用加拿大 Xltek 公司产肌电图诱发电位测定仪,实验采用短声刺激,靶刺激频率为 2000 Hz,概率 20%,非靶刺激频率为 1000 Hz,概率 80%,刺激声强为 120 dB,分析时间 500 ms,叠加 300 次,记录 N2 潜伏期、P3 潜伏期及波幅等。测定重复 3 次,取平均值^[4]。

六、统计学分析

各组计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,应用 SPSS 12.0 版统计软件进行处理。先用 F 检验对两组方差齐性进行检验,方差齐,运用两样本比较的 t 检验;方差不齐,采用 t' 检验。

结 果

一、跳台试验成绩

与正常组、假手术组比较,模型组 VD 小鼠学习阶段的反应时间明显延长,记忆阶段潜伏时间明显缩短($P < 0.05$),错误次数明显增加($P < 0.05$),说明模型组学习成绩和记忆成绩较正常组、假手术组差,见表 1。

表 1 各组小鼠跳台试验的学习和记忆成绩比较

组 别	n	学习阶段		记忆阶段	
		反应时间	错误次数	潜伏时间	错误次数
		(s)	(次)	(s)	(次)
正常组	16	55.60 ± 25.52	1.40 ± 0.81	115.81 ± 36.89	0.81 ± 0.44
假手术组	16	51.24 ± 21.63	1.27 ± 0.43	147.37 ± 27.22	0.33 ± 0.72
模型组	16	86.21 ± 14.68 ^a	3.72 ± 0.32 ^a	77.38 ± 36.34 ^a	1.71 ± 0.52 ^a

注:与正常组、假手术组比较,^a $P < 0.05$

二、水迷宫试验成绩

与正常组、假手术组比较,模型组 VD 小鼠学习阶段和记忆阶段游全程时间明显延长($P < 0.05$),错误次数明显增加($P < 0.05$),说明模型组学习成绩和记忆成绩较正常组、假手术组差,见表 2。

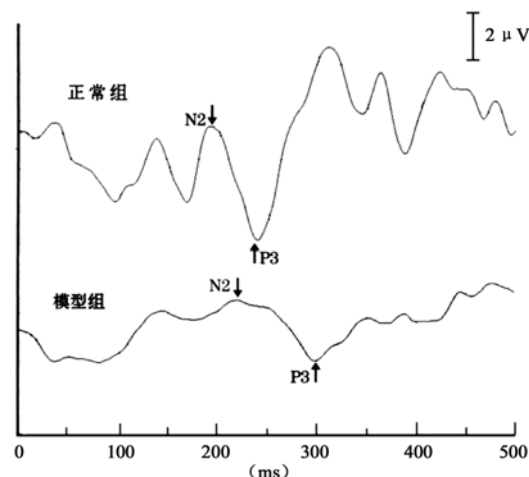
表 2 各组小鼠水迷宫试验的学习和记忆成绩比较

组 别	n	学习阶段		记忆阶段	
		游全程时间	错误次数	游全程时间	错误次数
		(s)	(次)	(s)	(次)
正常组	16	99.36 ± 50.50	16.93 ± 8.93	85.86 ± 36.98	9.06 ± 12.45
假手术组	16	87.47 ± 33.94	17.06 ± 9.59	65.54 ± 28.46	9.83 ± 8.87
模型组	16	146.75 ± 35.64 ^a	33.57 ± 13.81 ^a	136.38 ± 43.62 ^a	20.18 ± 11.48 ^a

注:与正常组、假手术组比较,^a $P < 0.05$

三、P300 测定结果

模型组 VD 小鼠的 N2 潜伏期、P3 潜伏期明显较正常组和假手术组长($P < 0.01$);P3 波幅明显低于正常组和假手术组($P < 0.05$)。见表 3,图 1。



注:模型组 VD 小鼠的 N2 潜伏期、P3 潜伏期较正常组长,P3 波幅较正常组低

图 1 正常组与模型组 P300 检测结果

表 3 各组小鼠 N2 潜伏期、P3 潜伏期、P3 波幅的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	N2 潜伏期 (ms)	P3 潜伏期 (ms)	P3 波幅 (μV)
正常组	16	147.41 $\pm$ 56.90	244.40 $\pm$ 63.15	4.79 $\pm$ 2.07
假手术组	16	165.12 $\pm$ 60.66	222.50 $\pm$ 59.65	5.35 $\pm$ 2.23
模型组	16	235.03 $\pm$ 64.61 ^a	339.12 $\pm$ 42.26 ^a	3.51 $\pm$ 1.68 ^b

注:与正常组、假手术组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

讨 论

ERP 主要由易受物理刺激影响的“外源性成分”(如 P1、N1、P2)和不受物理刺激影响的“内源性成分”(N2、P3)组成。现在研究最多、临床应用最广泛的是 P300 电位。

本实验对小鼠进行双侧颈总动脉反复结扎-再灌注,制成 VD 小鼠模型,并对正常组、假手术组及模型组进行学习、记忆功能及 ERP 内源性成分 N2、P3 的测定,结果发现 VD 小鼠无论是学习、记忆能力,还是电生理参数值,与正常组和假手术组小鼠比较,差异均有统计学意义。模型组 VD 小鼠的 N2、P3 潜伏期显著延长,P3 波幅明显减低,提示 VD 小鼠造模后认知功能减退,说明 P300 电位对评价小鼠认知、记忆功能有重要的参考价值。

在测定反映认知功能的 P300 电位时,通常要求患者处于清醒状态下,且需集中注意力,这就为动物实验中 P300 电位的测定设置了一定障碍。曾有学者在人全身麻醉状态下进行过 P300 电位的测试^[5]。梁勇等^[6]将正常青年人置于被动状态下测定其 P300 电位,发现主动和被动模式均可记录到相似的 P300 电位,差别在于主动模式下各波的潜伏期较被动模式短,波幅更大,故认为 P300 电位的测定可应用于无法合作的患者(如严重痴呆、精神分裂症、昏迷等严重认知损害者)或动物,即当主动测试相关条件不具备时,被动测试也可作为一种检测手段而应用于临床研究及动物实验。本研究中,各小鼠均是在清醒状态下采用被动模式进行 P300 电位的测定。

在对动物认知功能进行测定时,多数测定方法需将电极插入脑实质内,为有创检查,容易造成动物较大的创伤,不利于其生存,也不利于下一步实验的顺利进行。本实验改进了这种方法,采取皮下插入电极的方法测定小鼠 P300,具有无创、操作方便等优点。Yamazaki 等^[7]利用偶极子定位方法进行 P300 电位的测定,得出海马结构是 P300 起源的结论。Halgren 等^[8]首先利用深部电极对癫痫患者进行 P300 电位的测定,发现在海马结构和杏仁体内可记录到波幅较大

的 P300 电位,其潜伏期与特性均与头皮记录的 P300 电位相似。本研究采取皮下插入电极的方法测定小鼠的 P300 电位,对痴呆动物模型是一种可行性较强的认知功能测定方法。

在 P300 电位测定的基础研究中,绝大部分是选用大鼠作为实验动物,小鼠 P300 电位测定的报道极少。本研究选用小鼠作为模型,为认知、记忆功能的电生理检测研究拓宽了应用范围,同时提供了正常小鼠、假手术小鼠及 VD 模型小鼠 N2、P3 的参考值。本研究的 P300 电位测定,是在小鼠清醒状态下采用被动模式进行,动物体积小,难以固定,故测定难度更大,但仍为研究脑的高级生理和心理活动提供了一种可靠、经济和有意义的检测方法。

总之,P300 电位是一种能较为客观地反映大脑功能状况的电生理参数,涉及从刺激到认知加工的过程,不包括反应决定和反应执行,是对刺激进行识别和编码后形成新的信息并储存的过程,可以作为辅助诊断精神、神经性认知功能损害性疾病(如临床早期及亚临床期痴呆等),评估病程、疗效及预后的重要指标。本研究证实,选用小鼠在非麻醉状态下采取皮下插入电极的方法进行 P300 电位的测定,亦可作为动物实验研究中客观、无创、定量和有价值的电生理检测手段。

参 考 文 献

- [1] 汪波,张莉莉. 30 例老年性痴呆患者脑 CT 与 P300 的检测报告. 临床神经电生理学杂志,2005,14:171-172.
- [2] 吕佩源,王伟斌,尹昱,等. 石杉碱甲对血管性痴呆小鼠额叶皮层和海马 cAMP 水平的影响. 中华神经科杂志,2005,38:325-327.
- [3] Luo J, Yin JH, Wu HZ, et al. Extract from Fructus cannabidis activating calcineurin improved learning and memory in mice with chemical drug-induced dysnesia. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24:1137-1142.
- [4] 赵莘瑜. 大鼠事件相关电位 P300 和行为学测试. 郑州大学学报(医学版),2005,40:74-76.
- [5] Van Hooff JC, de Beer NA, Brunia CH. Event-related potential measures of information processing during general anesthesia. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1997, 103:268-281.
- [6] 梁勇,王正敏. 听觉事件相关电位 P300 的主动与被动模式记录比较. 临床耳鼻咽喉科杂志,2000,14:296-298.
- [7] Yamazaki T, Kamijo K, Kiyuna T, et al. Multiple dipole analysis of visual event-related potential during oddball paradigm with silent counting. Brain Topogr, 2001, 13:161-168.
- [8] Halgren E, Squires NK, Wilson CL, et al. Endogenous potentials generated in the human hippocampal formation and amygdala by infrequent events. Science, 1980, 210:803-805.

(收稿日期:2007-09-27)

(本文编辑:吴 倩)