

6-OHDA 帕金森病大鼠快动眼睡眠状态下 皮层脑电及基底节场电位的异常变化*

常晓赞 葛顺楠 杨 晨 李 敏 井晓容 朱俊玲 王学廉[△] 高国栋[△]

(第四军医大学唐都医院神经外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:了解帕金森病(PD)模型大鼠在快动眼睡眠状态下皮层脑电和基底节场电位的异常变化。方法:用6-羟基多巴胺(6-OHDA)脑内两点注射法建立PD大鼠模型,并经阿扑吗啡注射诱发旋转对模型进行评价。通过多导宏电极在体电生理记录技术结合视频录像,对正常大鼠和6-OHDA大鼠PD模型进行苍白球场电位和皮层M1、M2区脑电的多部位24小时同时记录。功率谱分析和相干分析用于揭示快动眼睡眠状态下各记录位点信号的频率成分以及不同记录位点神经元集群之间的变化。结果:与正常大鼠相比,6-OHDA帕金森病模型大鼠在REM期间的皮层脑电在 θ 和 γ 频段上都有变化。初级运动皮质M1区的 θ 频段成分消失,辅助运动区M2的 θ 频段成分略有增加,患侧苍白球的 θ 频段成分增大显著,M1区的 γ 频段成分增大,而 γ 频段成分在苍白球基本没有变化。结论:6-OHDA对中脑多巴胺能神经元的损害可造成大鼠双侧皮层M1区 θ 节律的消失和 γ 节律的增强,以及对侧M1-M2区之间在 γ 节律上的同步被显著增强,而 γ 节律在苍白球没有变化。这些异常电活动可能是由于VTA受损引起从而与帕金森病的快动眼睡眠行为障碍有关。

关键词 帕金森病 大鼠 快动眼睡眠 皮层脑电 基底节场电位

中图分类号 Q95-3 R68 R318.01 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)10-1813-04

Abnormalities of EcoG and Field Potential of Basal Ganglia in 6-OHDA-lesioned Rats with Parkinson's Disease during Rapid Eye Movement Sleep*

CHANG Xiao-zan, GE Shun-nan, YANG Chen, LI Min, ING Xiao-rong, ZHU Jun-ling, WANG Xue-lian[△], GAO Guo-dong[△]

(Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710038)

ABSTRACT Objective: To investigate altered features of the electrocorticogram (ECoG) and local field potential of the globus pallidus of Parkinson disease (PD) rat models during rapid eye movement sleep (REM). **Methods:** Sprague-Dawley rats with unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions were used as the model of PD. Apomorphine induced contralateral rotations in PD rat models were examined to assure proper lesioning. Continuous video, local field potential (LFP) of the globus pallidus (GP), Electrocorticogram (ECoG) of primary motor cortex (M1) and the secondary motor cortex (M2) were detected simultaneously for 24 hours or more. Power spectral densities (PSD) were computed to decompose distinct frequency components of signals recording at each electrode positions. Coherence analysis was used to assess the coupling or synchronization of brain activity between distributed neuronal populations at each electrode position. **Results:** Compared with the saline-treated rats, 6-OHDA-lesioned rats showed some differences during rapid eye movement sleep: rhythm in the ECoGs of primary motor cortex (M1) disappeared; rhythm in the ECoGs of the secondary motor cortex (M2) and rhythm in LFP of GP on the injected side increased; rhythm in the ECoGs of primary motor cortex (M1) increased; rhythm in the LFP of GP did not change. **Conclusion:** 6-OHDA lesions of midbrain dopaminergic neurons of rat can induce the disappearance of rhythm and enhanced rhythm in the ECoGs of M1 and increase contralateral rhythm synchronization between the ECoGs of M1 and M2. These abnormal rhythms may be induced by the damage of ventral tegmental area (VTA) and have relationships with rapid eye movement sleep behavior disorder of PD.

Key words: Parkinson disease; Rat; Rapid eye movement sleep; Electrocorticogram; motor cortex

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R68 R318.01 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)10-1813-04

* 基金项目 国家自然科学基金重点项目 (30930095)

作者简介 常晓赞(1986-),男,硕士研究生,医师,研究方向 微创功能神经外科。Email: molecharles@qq.com

△通讯作者 王学廉 Email:wangxuelian@fmmu.edu.cn

高国栋 Email:ggudong@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-02-21 接受日期 2011-03-16)

前言

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人常见的神经系统变性疾病。随着电生理学和 DBS 以及信号分析技术的发展,一些研究表明基底节皮层环路同步增强是帕金森电活动的特征,并且与帕金森病运动障碍有密切的关系^[1,2]。实际上,PD 患者还经受许多非运动症状的困扰,如睡眠障碍,也同样严重影响 PD 患者的生活质量,越来越引起人们的关注和研究兴趣。其中快动眼睡眠行为障碍(Rapid eye movement sleep behavior disorder, RBD)发生率较高,有研究指出 PD 患者中 RBD 的发生率为 15%~47%^[3]。RBD 是一种深睡状态,特征是 REM 期间与梦有关的复杂行为。RBD 的多导睡眠扫描(Polysomnographic, PSG)记录显示 REM 期完全或间歇地丧失肌肉失张力状态,以及过度的位相性的肌电活动。目前,PD 相关的 RBD 的发生机制仍不清楚。因此,有必要对 PD REM 时期的异常电活动进行研究。

本研究利用多导宏电极在体电生理记录技术,结合视频录像,研究 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)PD 模型大鼠,在 REM 睡眠期间,苍白球场电位和皮层脑电的异常改变,以期对深入认识 PD 的异常电生理机制有一定帮助。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

选用清洁级健康 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠 40 只,质量 300 ± 20 g,由第四军医大学实验动物中心提供。安静环境饲养,动物自由取食饮水。随机选取 30 只大鼠制作 PD 模型,其余 10 只作为对照。

1.2 仪器与试剂

包括立体定位仪(Narishige ST-7)、自制金属电极、日本光电数字化脑电图机 JE-921A 型、10 μ l 微量注射器(上海精密仪器制造厂)、冷冻切片机(Leica CM1900)、牙科水泥(青浦尼康齿科器械厂)、6-OHDA (Sigma)、阿扑吗啡(Apomorphine, APO)等。

1.3 PD 大鼠模型制备

预先经大鼠腹腔注射氨苄青霉素 5 万 U 后以 7% (质量浓度)戊巴比妥按大鼠体质量 4 ml/kg 腹腔注射麻醉,以颅平位将其固定于立体定位仪上,常规去毛发、消毒,切开头皮约 20 mm,剥离皮下组织及骨膜,暴露前后囟,调整前后囟高度于同一水平面上,确定前囟坐标,参照 Paxinos 等^[4]大鼠脑立体定位图谱,确定右侧黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)和中脑腹侧被盖区(ventra tegmental area, VTA)的坐标位置^[5] SNc 为前囟后(5.2 $\pm$ 0.2) mm,矢状缝右侧(1.8 $\pm$ 0.1) mm,硬脑膜下(7.6 $\pm$ 0.1) mm, VTA 为前囟后(4.6 $\pm$ 0.1) mm,矢状缝右侧(0.9 $\pm$ 0.1) mm,硬脑膜下(7.4 $\pm$ 0.1) mm。两点分别为前囟后(3.6 $\pm$ 0.1) mm,矢状缝右侧(1.8 $\pm$ 0.1) mm,硬脑膜下(8.4 $\pm$ 0.1) mm,前囟后(4.0 $\pm$ 0.1) mm,矢状缝右侧(1.6 $\pm$ 0.1) mm,硬脑膜下(8.0 $\pm$ 0.1) mm。30 只 PD 模型组大鼠注射 6-OHDA。6-OHDA 溶于含 0.2% 抗坏血酸的生理盐水中。用手动牙科钻钻透颅骨,按确定坐标将 10 μ l 微量器缓慢进针到预定深度,以 0.5 μ l/min 的速度向两点各注射 6-OHDA 3 μ l,注射完毕留针 10 min 后以 1 mm/min 速度匀速缓慢退针,达 5 mm 后缓慢退出针头,钻孔处填以明胶海绵,彻底止血后缝合皮肤,用碘伏消毒。术后每只大鼠腹

腔注射氨苄青霉素 5 万 U/d,持续 4 d 以防感染。

术后第 2~8 周开始进行行为学检测。按大鼠体质量 0.5 mg/kg 经腹腔注射 APO (溶于无菌注射用水中)以诱发大鼠向左侧(健侧)旋转,每周重复检测 1 次。于每次注射 5 min 后开始记录 30 min 内的旋转圈数,如大鼠身体首尾相接恒定转向左侧,且平均转速 > 7 r/min,视为制模成功。30 只模型组大鼠中共有 21 只制模成功,进入后续电生理实验。对照组大鼠按同法注射含 0.2% (质量浓度)抗坏血酸的生理盐水。

1.4 皮层脑电及苍白球场电位记录

对 PD 模型组和对照组大鼠进行皮层电极和深部电极植入。以 1% (质量浓度)戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠后,以颅平位将其固定于立体定位仪上,沿中线切开头皮暴露出颅骨,用双氧水清理干净颅骨表面。

深部场电位电极 按照 Paxinos 等图谱^[4]确定双侧苍白球的坐标位置(前囟后 0.92 mm,矢状缝旁 2.8 mm,硬脑膜下 6.4 mm)。用牙科钻打孔后,经微推进器分别将 2 个自制金属宏电极缓慢推至两侧苍白球。皮层脑电电极 根据图谱,在大鼠双侧主运动皮层 M1 区(前囟前 2.0 mm,矢状缝旁 2.25 mm)、双侧第二运动皮层 M2 区(前囟前 4.0 mm,矢状缝旁 2.25 mm)共植入 4 个不锈钢螺丝电极。参考电极 在前囟前 10.0 mm 处置入不锈钢螺丝电极作为参考电极。皮层加深部共 7 个电极植入后,用牙科水泥固定。术后给予大鼠腹腔注射青霉素(10 万 U/kg, 2 次/d)3 d 抗感染,单笼饲养,恢复至少 4 d。

记录系统为日本光电数字化脑电图机 JE-921A 型,共记录左右主运动皮层 M1 区和第二运动皮层 M2 区皮层脑电(Fp1、Fp2、F3、F4 导联)和左右苍白球场电位(C3、C4 导联)6 个通道信号,采样频率为 500 Hz,滤波器通带为 0.15~70 Hz。每只大鼠连续记录视频脑电和场电位至少 2 d。记录时,人工昼夜节律(12 h/12 h),大鼠可自由取食、饮水和活动。以视频录像回放明确记录信号所对应大鼠的各种行为和状态。

1.5 组织学定位

电生理数据记录完毕后,大鼠经乌拉坦深度麻醉,给予双侧苍白球直流电毁损(0.3 mA, 30 S)记录位点的标记。剪开胸腔,暴露心脏,经左心室进入主动脉灌注生理盐水 200 mL,随后用 4% 多聚甲醛 200 mL 灌注固定,取脑,固定 4 h,再置于含 30% 蔗糖的多聚甲醛溶液中过夜。行连续冠状冷冻切片(40 μ m)。对含苍白球的切片进行 Nissl 染色以验证深部电极的记录位置,剔除电极位置不正确的个体。

1.6 数据分析方法

使用功率谱分析技术可以计算各导联信号在不同频率的相对或绝对功率,获得信号中所包含的频率成分及其强弱的频域信息也可反映局部神经元的同步程度。相干分析(coherence analysis)是一种测量不同脑区功能连接的传统方法。通过计算两个导联信号之间的相干系数来反映相应两个记录位点神经元集群之间的耦合或同步,进而间接反映两记录位点分布的神经元集群之间的联络程度。相干系数取值范围在 0、1 之间。相干系数越大,表示导联所在位点的神经元集群之间的同步程度越高、联络越强。

2 结果

与正常大鼠相比,REM 期间,6-OHDA PD 模型大鼠的皮

层脑电在 θ 和 γ 频段上都有变化。

2.1 REM 期间皮层脑电和苍白球场电位的时域特征

初级运动皮质 M1 区的 θ 频段成分消失, 辅助运动区 M2 的 θ 频段成分略有增加, 健侧苍白球的 θ 频段成分变化不大, 患侧苍白球的 θ 频段成分增大显著。初级运动皮质 M1 区的 γ 频段成分增大, 健侧辅助运动区 M2 的 γ 频段成分也有增大, 而 γ 频段成分在苍白球基本没有变化。(图 1 和图 2)

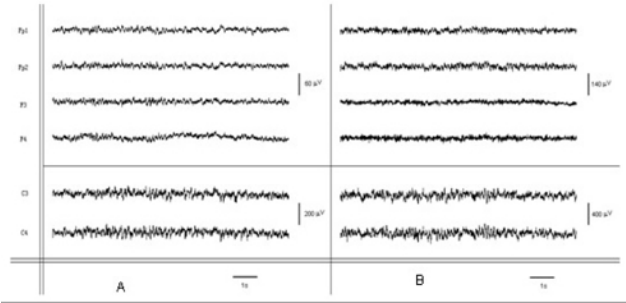


图 1 REM 期间皮层脑电和苍白球场电位的时域特征(A: 正常大鼠,B: PD 大鼠,Fp1、Fp2 分别为左右侧 M2 区皮层脑电,F3、F4 为左右侧 M1 区皮层脑电,C3、C4 为左右侧苍白球场电位)

Fig.1 Features of ECoG and LFP of BG recorded simultaneously from rats during rapid eye movement sleep (A: Control rats,B:PD rats,Fp1 and Fp2 are ECoGs of M2, F3 and F4 are ECoGs of M1, C3 and C4 are LFPs of GP)

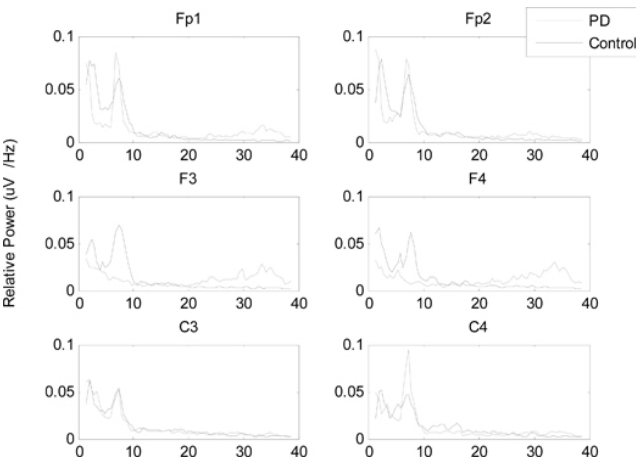


图 2 REM 睡眠状态下,正常 /PD 大鼠各导联信号的相对功率谱(Fp1、Fp2 分别为左右侧 M2 区脑电功率谱,F3、F4 为左右侧 M1 区脑电功率谱,C3、C4 为左右侧 GP 场电位功率谱)

Fig.2 PSD of ECoG and LFP from control rats and 6-OHDA-lesioned rats during rapid eye movement sleep (Fp1 and Fp2 are PSDs of ECoGs of M2, F3 and F4 are PSDs of ECoGs of M1, C3 and C4 are PSDs of LFPs from GP)

2.2 REM 期苍白球 - 皮层及皮层两两脑区之间的区域间同步性

由于模型大鼠 M1 区的 θ 频段成分消失, 故 M1 与 M2 之间、M1 与苍白球之间在 θ 频段上的同步性也就消失, 而 M2 和苍白球之间在 θ 频段上的同步性基本不变, 患侧略有增加。健侧 M1 与 M2 之间 γ 频段上的同步性增大的最为显著; 健侧 M2 和苍白球之间 γ 频段上的同步性也有增大, M1 与苍白球之间在 γ 频段上的同步性在双侧都有增加。(图 2 和图 3)

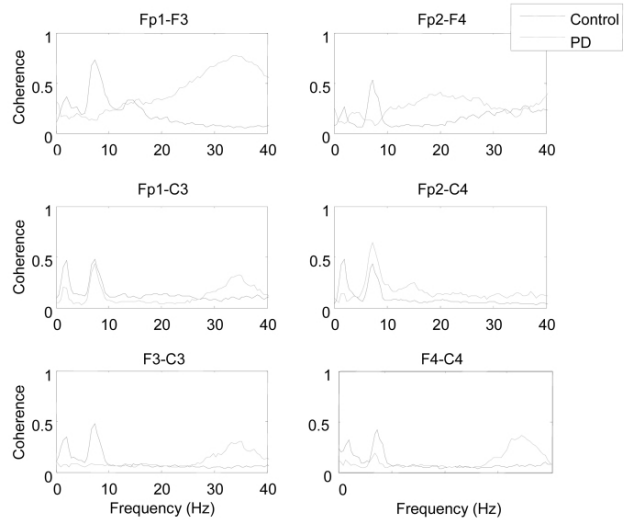


图 3 REM 睡眠状态下,正常 /PD 大鼠导联间信号的相干性(Fp1-F3 为左侧 M2-M1 之间的相干性,Fp2-F4 为右侧 M2-M1 之间的相干性,Fp1-C3 为左侧 M2-GP 之间的相干性,Fp2-C4 为右侧 M2-GP 之间的相干性,F3-C3 为左侧 M1-GP 之间的相干性,F4-C4 为右侧 M1-GP 之间的相干性)

Fig.3 Coherence between ECoG and LFP of GP from rats during rapid eye movement sleep (Fp1-F3 left side ECoG of M2 and M1, Fp2-F4: right side ECoG of M2 and M1, Fp1-C3: left side ECoG of M2 and LFP of GP, Fp2-C4: right side(injected side) ECoG of M2 and LFP of GP; F3-C3: left side ECoG of M1 and LFP of GP, F4-C4 right side ECoG of M1 and LFP of GP)

3 讨论

黑质和 VTA 是脑内多巴胺通路的两个起源点。PD 的主要病理包括黑质和 VTA 多巴胺能神经元的缺失^[6]。故本实验也在 SNc 和 VTA 两点进行 6-OHDA 注射造 PD 大鼠模型。传统认为, 黑质纹状体通路主要涉及运动功能, 黑质 DA 的损害与运动损害相关, 其 DA 变性是帕金森氏病僵硬震颤和运动不能等症状的基础。而 meso-limbic-cortical 通路涉及认知和情感, VTA DA 受损与情感障碍和智力受损相关, 通路的机能失调涉及精神分裂症, 多动症, 抽动秽语综合征及抑郁症。

PD RBD 主要与黑质还是 VTA 有关, 本实验结果显示 PD 大鼠模型 REM 期电活动异常主要发生在皮层, 此异常电活动主要与 VTA 受损有关。其可能原因如下 (1) 大脑皮层投射直接对皮层神经元起作用, 而黑质 DA 受损是通过黑质 - 苍白球 - 丘脑皮层环路间接对皮层起作用。而睡眠时, 椎体外系旁路与皮层活动失去联系, 黑质 DA 受损只能影响基底节局部电活动。本研究结果中所显示出的 REM 期间同侧 GP 的 θ 节律增强就是基底节局部电活动异常的体现。(2) 已有文献报道, 6-OHDA 注入 VTA 抑制了 REM 期皮层 EEG 的 θ 频率活动^[7], 已经可以说明 PD 大鼠模型 REM 期皮层 θ 节律的消失与 VTA DA 受损有关。(3) REM 期皮层 γ 节律的增强则可能是由于 VTA 区 DA 神经元的变性死亡解除了多巴胺系统对皮层神经元活动的抑制作用。文献报道 VTA 局部注入多巴胺引起多数前额叶皮层神经元自发活动的抑制。

分布在脑区内和脑区间的神经元集群存在同步性振荡活动是大脑神经网络所具有的基本特性。神经元活动的同步和振荡已经被认为是神经元的一种捆绑形式从而实现功能上的协同,提供各种认知和运动功能^[8-13]。目前的研究认为 θ 节律主要与学习和记忆有关,而 γ 节律的功能意义众多,如感知、认知、工作记忆、智力、睡梦、运动等。研究显示运动准备、运动,以及姿势维持期间都存在 γ 节律的同步^[14]。初级躯体感觉皮层场电位的 γ 节律功率在大鼠探索性活动开始前100 ms达到最大^[15]。手动开始前后 γ 节律活动有一个短暂增加^[16,17]。猴子进行精确把握任务时,其初级运动皮层的成对神经元之间存在 γ 节律同步^[18]。人类在强的自主收缩期间,肌肉活动与对侧运动皮层的局部MEG也存在大约40 Hz的线性相关。而 γ 节律与睡梦和运动的关系特别值得我们注意。Lee KH等^[19]提出 γ 脑波与睡梦有关。Voss U等^[20]提出,清醒梦(lucid dreaming)期间,额部皮层的EEG在 γ 节律频带范围上的功率增加。Mima T等^[21]提出皮层 γ 活动的功能之一就是促使肌肉活动。静态力条件下的皮层运动区与肌肉活动之间的同步在 β 节律(15-30 Hz)范围,动态力条件下皮层运动区与肌肉活动之间的同步则主要在 γ 节律(30-45 Hz)范围^[22,23]。而RBD是REM时期出现的与梦境内容相关的一种行为失控,因此可以推测PD大鼠REM期皮层运动区 γ 节律的增强,可能正是PD RBD发生的电生理机制所在;VTA DA变性死亡可能正是PD RBD的病理生理机制所在。这样也可以合理解释有些PD病人RBD可以先于运动症状出现,其VTA的DA神经元可能先与黑质DA神经元开始变性死亡,或者其VTA DA神经元的死亡数目先达到RBD症状出现的程度。当然,要想明确这一推测,还需进一步的实验加以验证。

参考文献(References)

- [1] Dostrovsky J, Bergman H. Oscillatory activity in the basal ganglia-relationship to normal physiology and pathophysiology[J]. Brain, 2004, 127(Pt 4):721-722
- [2] Gatev P, Darbin O, Wichmann T. Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders [J]. Mov Disord, 2006,21(10):1566-1577
- [3] Uhlhaas PJ, Singer W. Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology [J]. Neuron, 2006,52(1): 155-168
- [4] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. The 2nd Edition. USA San Diego, Academic Press, 1998, 36-40
- [5] Kuhlman WN. Functional topography of the human 1rhythm [J]. Electroenceph Clin Neurophysiol, 1978, 44(1):83-93
- [6] Patrick McNamara, Raymon Durso, and Sanford Auerbach. Dopaminergic Syndromes of Sleep, Mood and Mentation: Evidence from Parkinson's Disease and Related Disorders [J]. Sleep and Hypnosis, 2002, 4(4):119-131
- [7] Sei H, Ikemoto K, Arai R, et al. Injection of 6-hydroxydopamine into

- the ventral tegmental area suppresses the increase in arterial pressure during REM sleep in the rat[J]. Sleep Research Online, 1999,2(1):1-6
- [8] Magill PJ, Sharott A, Bolam JP, et al. Brain state-dependency of coherent oscillatory activity in the cerebral cortex and basal ganglia of the rat[J]. J Neurophysiol, 2004, 92(4):2122-2136
- [9] Thomas Boraud, Peter Brown, Joshua A, et al. Oscillations in the basal ganglia: The good, the bad, and the unexpected [J]. Advances in Behavioral Biology, 2005,56(1): 1-24
- [10] Stoffers D, Bosboom JL, Deijen JB, et al. Slowing of oscillatory brain activity is a stable characteristic of Parkinson's disease without dementia[J]. Brain, 2007,130(7): 1847-1860
- [11] Uhlhaas PJ, Singer W. Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology[J]. Neuron, 2006, 52(1):155-168
- [12] Dostrovsky J, Bergman H. Oscillatory activity in the basal ganglia-relationship to normal physiology and pathophysiology[J]. Brain, 2004, 127(4):721-722
- [13] Schnitzler A, Gross J. Normal and pathological oscillatory communication in the brain[J]. Nat Rev Neu-Rosci, 2005,6(4):285-296
- [14] Farmer SF. Rhythmicity, synchronization and binding in human and primate motor systems[J]. J Physiol, 1998,509:3-14
- [15] Hamada Y, Miyashita E, Tanaka H. Gamma-band oscillations in the 'barrel cortex' precede rat's exploratory whisking[J]. Neuroscience, 1999,88(3):667-671
- [16] Crone NE, Miglioretti DL, Gordon B, et al. Functional mapping of human sensorimotor cortex with electrocorticographic spectral analysis. II. Event-related synchronization in the gamma band [J]. Brain, 1998,121 (Pt 12):2301-2315
- [17] Popivanov D, Mineva A, Krekule I. EEG patterns in theta and gamma frequency range and their probable relation to human voluntary movement organization[J]. Neurosci Lett, 1999,267(1):5-8
- [18] Eusebio A, Pogossyan A, Wang S, et al., Resonance in subthalamo-cortical circuits in Parkinson's disease[J]. Brain, 2009, 132(8):2139-2150
- [19] Lee KH, Williams LM, Breakspear M, et al. Synchronous Gamma activity: a review and contribution to an integrative neuroscience model of schizophrenia[J]. Brain Research Reviews, 2003, 41(1):57-78
- [20] Voss U, Holzmann R, Tuin I, et al. Lucid dreaming: a state of consciousness with features of both waking and non-lucid dreaming[J]. Sleep, 2009,32(9):1191-1200
- [21] Mima T, Hallett M. Electroencephalographic analysis of cortico-muscular coherence: reference effect, volume conduction and generator mechanism[J]. Clin Neurophysiol, 1999,110(11):1892-1899
- [22] Omlor W, Patino L, Hepp- Reymond MC, et al. Gamma-range corticomuscular coherence during dynamic force output[J]. Neuroimage, 2007, 34(3):1191-1198
- [23] Andrykiewicz A, Patino L, Naranjo JR, et al. Corticomuscular synchronization with small and large dynamic force output[J]. BMC Neurosci, 2007, 8: 101-101