

激光皮层平均诱发电位与脑辅酶*

沈 政 林庶芝 谢家农

(北京大学心理系与信息科学中心, 北京 100871)

提 要

由光导纤维将氮分子激光($40\mu\text{J}/\text{脉冲}$, $3\text{脉冲}/\text{s}$)导入 6 只大白鼠脑左侧皮层, 联机叠加记录右侧相应皮质区的诱发电位。然后, 利用 HPLC 法对大鼠 6 个脑区的四种生物活性物质同时测定。结果表明, 激光诱发的 N_{200} 波和 P_{300} 波波幅增高, 可能与其加速脑能量代谢率并降低脑内生物活性物质代谢率有关。

关键词 激光皮层平均诱发电位, 光导纤维, 脑辅酶, 高效液相色谱 (HPLC)

一、引 言

氮-氩激光照射头皮或脑表面能影响 大脑自发脑电活动, 引起动物^[1]脑电 (EEG) 活动的同步化。相反, 也有报道^[2]氮-氩激光照射兔的感觉运动区皮层引起 EEG 的失同步化。还有报道, 激光不同波长对猴视觉平均诱发电位产生颜色特异性影响^[3]。我们曾报道^[4]以光导纤维导入脑深部结构的低功率激光易化了一种特殊的诱发反应——光促现反应 (photic driving response) 这种照射还影响了脑内一些结构的单胺类物质含量^[5], 二核苷酸类辅酶 NADH 的含量^[6], 且有明显的行为效应^[7]。这些事实表明, 激光在脑内引起的生物效应是复杂的多样的。本文在以前研究的基础上, 以探讨激光在脑内做为刺激因素, 引起的平均诱发电位及其与脑代谢之间的关系。

二、材料与方 法

大白鼠 12 只 ($200\pm 25\text{g}$) 随机地平均分为两组, 一组动物在其两眼正前方 30cm 处, 给以 70lm 的闪光刺激 ($3\text{次}/\text{s}$) 记录其平均诱发反应; 另一组以光导纤维将弱的脉冲 ($40\mu\text{J}/\text{脉$

冲) 激光导入大脑皮层表面一侧, 然后测定并分析对侧半球相应皮层区的平均诱发反应。两组动物在正式试验之前, 均用巴比妥麻醉, 在脑立体定位仪上实施记录电极和尼龙套管的埋藏手术。记录平均诱发电位的电极植于前囟后 6mm 与中缝右外 3mm 的交点处; 参考电极位于前囟前 2mm 与中缝右外 2mm 的交点处; 待插光导纤维的尼龙套管植于前囟后 6mm 与中缝左外 3mm 的交点处。记录电极和尼龙套管以牙科水泥固定于颅骨上, 插入深度为 1mm, 不损伤颅骨下之脑组织。手术后休息一日, 实验时将大鼠固定于实验板上, 放入隔音与电屏蔽的实验柜中, 将鼠头之电极与 Nihon Kohden 电生理仪连接, 将光导纤维远端沿鼠脑上之尼龙套管插入大脑皮层表面。对照组动物与实验组动物相比, 仅仅不导入激光, 其它处置完全相同。光导纤维近端与氮分子激光器 (北京市光电技术所研制的 QJB-9 型, 输出功率为 $150\mu\text{J}/\text{脉冲}$, 波长为 337nm 的紫外激光) 经一分束镜和石英玻璃凸透镜耦合, 使光导纤维远端输出的光脉冲为 $40\mu\text{J}/\text{脉冲}$ (用中国科学院物

* 国家自然科学基金资助项目。

理所研制的 LPE-1 型激光功率能量计测定)。在激光器输出端的分束镜处耦合一硅光电池并与十进制数字频率计相联,用以监测激光脉冲频率,使之在实验期间保持在 3 次/s。利用 DAT1100 型专用叠加仪(Nihon Kohden 公司)对脑电诱发反应连续地联机采样叠加 10 次。以 X-Y 函数记录仪(日本 Rikadanki 公司)将叠加后的平均诱发电位描记在纸上,事后分析其 N_{200} 波和 P_{300} 波的潜伏期和波幅。

记录好闪光(对照组)或激光(实验组)诱发的平均诱发电位后,立即将动物断头取脑,把脑组织分为六区:皮层、海马、尾状核、间脑、小脑和脑干。应用高效液相色谱法^[8]对各脑区 NADH、FAD、喋呤、生物喋呤等四种生物活性物质进行同时测定。简言之,用 YWG-C₁₈H₃₃ 无定型硅胶(天津化学试剂二厂)做固定相,15% 甲醇水溶液为流动相,在高效液相色谱仪(岛津公司 LC-3A 型)中分离四种物质,由岛津 RF530 型荧光检测器检测,上海大华仪表

厂的 XWT-164 型台式自动平衡记录仪记录色谱图。以峰值高度计算脑内还原型辅酶 I(NADH)、黄素辅酶(FAD)、生物喋呤(biopterin)、喋呤(pterin)等四种物质的含量(图 1)。这四种标准样品均系国外进口,均为分析纯,适于高效液相色谱分析使用。

三、实验结果

分析平均诱发电位发现,两组动物中尽管 N_{200} 波和 P_{300} 波的波幅和潜伏期有一定的个体差异(如图 2)但它们总比其它成分更经常出现。我们对比了两组动物 N_{200} 波和 P_{300} 波的差异。其结果如表 1。以光导纤维导入脑皮层的脉冲

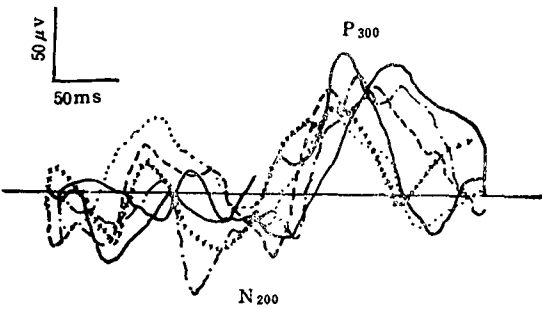


图 2 6 只麻醉鼠中的激光平均诱发电位 (LEP)
Fig. 2 Laser evoked potentials (LEP) in six anesthetic rats

叠加次数: 10; 延缓时间: 43.75 ms; 分析时间: 400ms
Times of averaging: 10; Delayed time: 43.75 ms; Analyzing time: 400 ms

激光,在对侧相应皮层区诱发出 N_{200} 波和 P_{300} 波,其波幅总是显著高于两眼闪光刺激在皮层中诱发出相应成分,激光刺激组 N_{200} 波和 P_{300} 波出现的潜伏期虽亦短于对照组,但因个体差异较大,在统计学上未达到显著性水平。

将对照组(闪光刺激组)动物六个脑区四种生物活性物质的浓度做为 100%, 分别求出实验组六个脑区中四种生物活性物质浓度和与其对应的正常值之比。将这一结果用直方图表示(如图 3),激光对皮层的照射使六个脑区的 NADH 和 FAD 含量普遍下降,对 NADH 而言,除大脑皮层以外的脑结构均显著地降低;对 FAD 而言,除脑干以外的脑结构含量降低均达

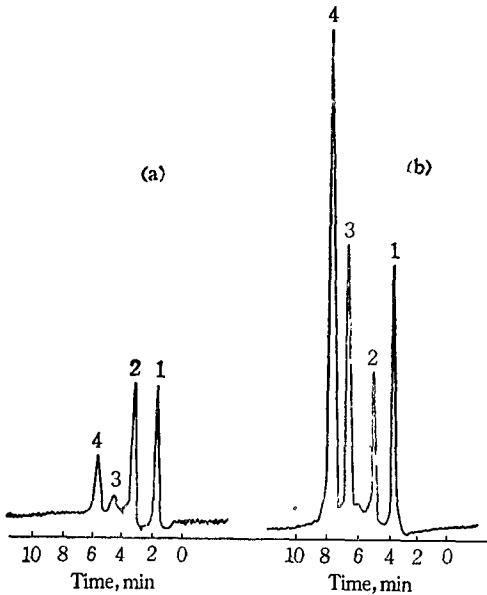


图 1 脑样品色谱图(a)和外标准溶液色谱图(b)
Fig. 1 Chromatogram of brain sample (a) and external standard solution (b)

进样量: 10μl, 1. 还原型辅酶 I, 2. 黄素辅酶, 3. 生物喋呤, 4. 喋呤
Samples injected: 10 μl, 1. NADH, 2. FAD, 3. bipterin, 4. pterin

表1 N_{200} 波和 P_{300} 波的比较
Table 1 Comparison in N_{200} , P_{300} waves

组别 Group	动物数N	N_{200}		P_{300}	
		潜伏期 Latency(ms)	波幅 Amplitude(μV)	潜伏期 Latency(ms)	波幅 Amplitude(μV)
激光照射皮层组 Laser radiation on cortex	6	189.1 ± 32.9	$-85.8 \pm 30.3^{1)}$	268.9 ± 29.4	$176.7 \pm 35.4^{1)}$
眼前闪光组 Flashes on eyes	6	200 ± 29.8	-12.2 ± 3.9	296.7 ± 28.7	13.0 ± 6.5

¹⁾ $P < 0.01$ by student's t-test

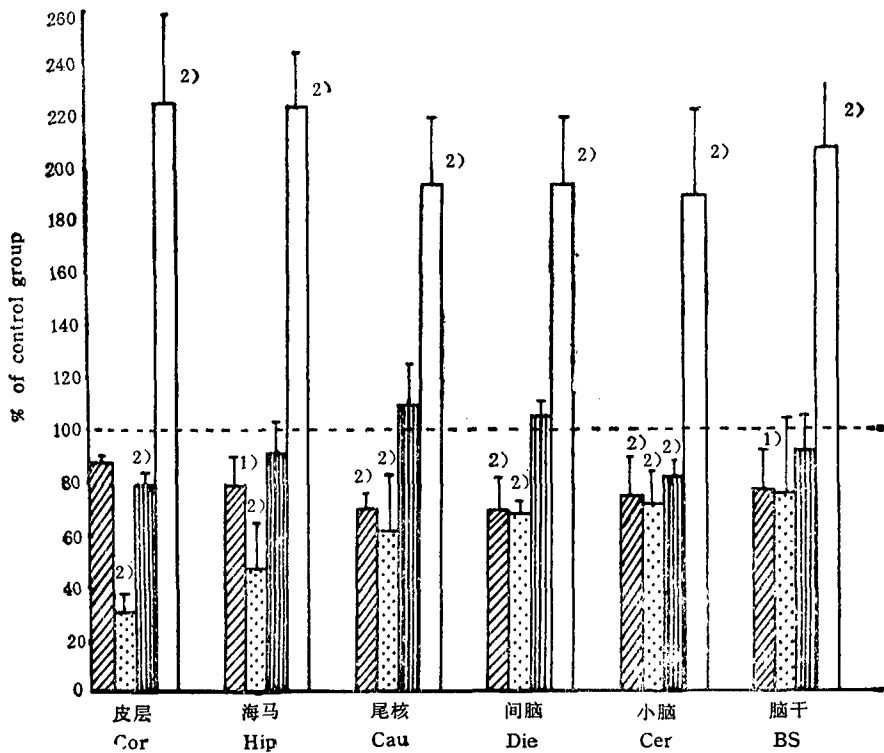


图3 实验组(6只)和对照组(6只)之间四种物质脑含量的差异

Fig. 3 Differences in four substances between experimental (6) and control (6) group

斜线 辅酶 I NADH 点状 黄素辅酶 FAD 方格 生物喋呤 biopterin 空白 喋呤 pterin

Cor: cortex; Hip: hippocampus; Cau: caudate nucleus; Die: diencephalon; Cer: cerebellum;

BS: brain stem ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ by student's t-test

非常显著性水平。激光照射使喋呤的含量在六个脑区中均非常显著性增高。而生物喋呤的含量却变化不明显,在尾状核和间脑中有轻度增高,但未达统计学显著性水平,其余四个脑区中生物喋呤含量稍降低,只有大脑皮层和小脑内的含量降低,在统计学上达显著性水平。

四、讨 论

Rosler^[9] 根据 Donchin 等人的看法,把人类平均诱发电位分为:“两种不同的事件相关电位:外生性成分由外部事件对神经系统的刺激而引起,它们的变化主要制约于刺激的物理

参数,如刺激模式、性质强度等;另一方面,内生性成分虽然也由外部事件所触发,但它们与刺激物理参数仅部分相关,更主要的是其变化决定于这些事件对被试的意义和关系。因而,不同的物理刺激,当其对被试的意义相同,都可以引出同样的内生性成分。”Näätänen^[10]等人认为“P₃₀₀波制约于低概率呈现的事件、刺激的意义和注意状态等三个主客观变量,因而是一种内生性成分;在P₃₀₀波之前的N₂₀₀波经常为重复刺激的物理参数偏离所引起。”本实验中脉冲激光在皮层上的辐照引起N₂₀₀和P₃₀₀波波幅同时显著增高和潜伏期轻微缩短,这即是一种物理刺激,又是具有生物学意义的生理刺激。它的生物学意义值得进一步研究。

激光刺激除引起脑电活动的变化外,还同时引起四种生物活性物质的含量变化。两种二核苷酸类物质均是脑能量代谢的重要辅酶。它们在细胞呼吸链中,做为氢和电子传递体而发生作用。本实验中激光照射脑皮层,引起许多脑结构中NADH和FAD浓度同时降低,说明细胞呼吸链的氢和电子传递过程加速进行,能量代谢率提高。激光诱发的皮层平均诱发电位N₂₀₀和P₃₀₀波波幅增高,可能正是脑能量代谢率提高所造成的。

喋呤类物质是以2-氨基-4-羟喋啶为其结构基础的一类生物活性物质,以游离型和结合型两种形式存在于机体内^[11]。游离型的四氢生物喋呤是单胺类神经递质生物合成中芳香族氨基酸羟化酶的辅酶。在多巴胺、去甲肾上腺素

或5-羟色胺的生物合成过程中,四氢生物喋呤参与反应而自身被氧化成生物喋呤。所以,本实验中激光照射引起脑平均诱发电位波幅增高的同时,生物喋呤在皮层和小脑中含量下降,可能反应出此时单胺类递质合成代谢率的降低。结合型喋呤主要构成了四氢叶酸辅因子,是重要的一碳单位传递体,参与氨基酸和核酸的代谢。激光照射皮层使各脑区的喋呤含量增高,可能说明此时氨基酸和核酸的代谢增强。总之,激光照射作用主要体现于提高了脑能量代谢过程,脑平均诱发电位的波幅变化可能与能量代谢的关系更为密切。

参 考 文 献

- 1 Chechulin A S et al. In: Wolbarsht M L ed, *Laser application in medicine and biology*, Vol. 3, New York: Plenum, 1977; 70
- 2 Cutatelazhe I O Vopr. Kurortol. Fizioter. Lach. Fiz. Kult. 1976: 63
- 3 Previc F H *Avias Space Environ Med*, 1987; 58(11): 1103
- 4 Shen Zheng et al. *Kexie Tongbao*, 1985; 30(6): 1693
- 5 Shen Zheng et al. *Neuroscience Letters*, 1982; 32: 203
- 6 沈政,张运生,吕亚兵等. 红外研究, 1989; 8(5): 395
- 7 Shen Zheng et al. *Lasers in Medicine and Surgery*, 1983; 2(1): 231
- 8 林庶芝,沈政,中国药理学报,印刷中
- 9 Rosler F. In: Gaillard A W K, Ritter W eds, *Tutorials in event related potential research: endogenous components*, Amsterdam: North-Holland Publishing Comp, 1983: 9
- 10 Näätänen R, Alho K, Sams M. In: Klik F, Näätänen R, Zimmer K eds, *Psychophysiological approaches to human information processing*, Amsterdam: North-Holland Publishing Comp, 1985: 73
- 11 Nichol C A et al. *Ann Rev Biochem*, 1985; 54: 729

[本文于1989年10月30日收到]

THE AVERAGED CORTICAL POTENTIALS EVOKED BY LASER AND BRAIN COENZYMES

Shen Zheng Lin Shuzhi Xie Jianong

(Department of Psychology and Research Center for Information Science, Peking University)

ABSTRACT

Nitrogen laser pulses (40 μJ/pulse, 3Hz) were guided by optic fiber into left cerebral cortex of six rats. The laser evoked potentials(LEP) in right corresponding cortical area were averaged on line, then, the reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), flavin adenine dinucleotide (FAD), biopterin (BP) and pterin(PT) in six brain areas were

(Continued on page 469)

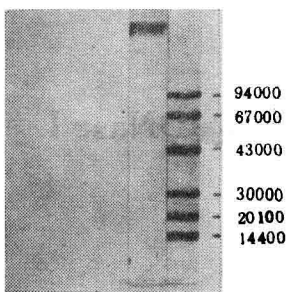


图4 纯化的免疫毒素 SDS-PAGE 图

物中的抗体竞争相应抗原。其结果是减弱了免疫毒素与靶细胞的结合，从而降低毒性。用³H-亮氨酸参入法测定 H65-Ricin 免疫毒素，经酸化-Sephrose 4B 柱纯化前与纯化后对靶细胞 Molt-4 的毒性说明了这一点(图 5)。

未经进一步纯化的 H65-Ricin 使 Molt-4 蛋白质合成抑制 50% 的浓度 $IC_{50} = 1 \times 10^{-7}$ mol/L，而经纯化的 H65-Ricin IC_{50} 为 5×10^{-11} mol/L。两者相差 20 倍。

讨 论

免疫毒素是一种有发展前途的导向药物。但制备过程比较复杂，大部分实验室的得率在 20—40% 之间。因此必须用凝胶过滤的方法纯化免疫毒素。免疫毒素的纯度，对它杀伤靶细胞的效率有很大影响。因为游离抗体的存在会封闭靶细胞上的相应抗原，使之减少与免疫毒素的结合。但由于免疫毒素的分子量与游离抗体的分子量相差不大，一般凝胶过滤方法很

难将游离抗体从结合物中完全分开；所以需要采用其它方法作进一步纯化。除去游离抗体也可采用抗蓖麻毒素的抗体亲和柱。但洗脱时往往用 pH 较低的缓冲液，会影响结合物中的抗体活性。而酸化 Sepharose 4B 或半乳糖 Sepharose 4B 柱洗脱时用 50mmol/L 半乳糖，对结合物中的抗体和毒素均无影响。

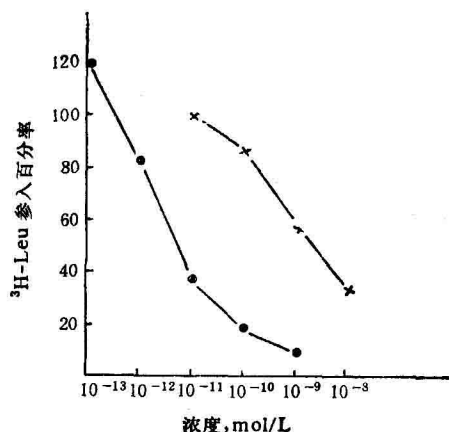


图5 未纯化的免疫毒素与经酸化的 Sepharose 4B 柱纯化的免疫毒素对靶细胞的毒性
×—×未纯化，●—●纯化

参 考 文 献

- 1 贺永怀等. 生物化学与生物物理进展, 1987; (6): 64
- 2 沈倍奋等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1985; 5(4): 209
- 3 Leaml U K et al. Nature, 1970; 227: 680
- 4 Thorpe P E et al. Immunol Rev, 1980; 62: 119

[本文于 1989 年 9 月 25 日收到]

(Continued from page 456)

simultaneously assayed by the reverse-phase high-performance liquid chromatography(HPLC). The results show that the increased amplitudes of N_{200} , P_{300} could be related to the increased metabolism rate of brain energy and the decreased biosynthesis of bioactive substances.

Key words the averaged cortical potentials evoked by laser, optical fiber, brain co-enzymes, HPLC