

糖尿病大鼠内嗅皮层神经元放电与场电位相干性研究*

谢康宁¹ 申广浩¹ 田越² 刘娟¹ 闫一力¹ 罗二平¹ 许全盛^{3△}

(1 第四军医大学 陕西 西安 710032 2 第四军医大学 西京医院 陕西 西安 710032 ;

3 燕山大学电气工程学院 河北 秦皇岛 006004)

摘要 目的 通过分析神经元放电与场电位的相干性 探讨内嗅皮层神经元放电与场电位的关系。方法 10 只成年大鼠随机分 2 组, 一组糖尿病建模, 另一组作为对照, 记录对照组和糖尿病组大鼠的内嗅皮层神经元放电锋电位和场电位, 利用点过程谱分析方法对神经元放电与场电位相干性进行分析对比。结果 糖尿病大鼠麻醉神经元放电与场电位的相干性明显低于对照组($P<0.01$)。结论 糖尿病大鼠内嗅皮层神经元功能受到损害。

关键词 糖尿病 相干 内嗅皮层

中图分类号: Q95-33 R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)16-3071-03

The Spike-field Coherence Analysis of Neural Signals From Entorhinal Cortex of Diabetic Rats*

XIE Kang-ning¹, SHEN Guang-hao¹, TIAN Yue², LIU Juan¹, YAN Yi-li¹, LUO Er-ping¹, XU Quan-shen^{3△}

(1 School of Biomedical Engineering, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2 Xijing Hospital, Xi'an, The Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China;

3 Yanshan University, Qinhuangdao, 066004, China)

ABSTRACT Objective: To study neural signal coordination of diabetic rats by analyzing the spike-field coherence (SFC). **Methods:** The 10 adult rats were divided randomly into two groups: 5 in control group and 5 in diabetic group. Local field potentials and neuronal spikes were recorded from the entorhinal cortex. Using the spectrum analysis method of point process, the SFC was conducted for signals from entorhinal cortex in both groups. **Results:** The SFC was significantly lower in diabetic group than in control group ($P<0.01$). **Conclusion:** The results suggest the impairment of neural functioning for diabetic rats.

Key words: Diabetes; Coherence; Entorhinal cortex

Chinese Library Classification (CLC): Q95-33, R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3071-03

前言

大脑中的 theta 节律对于大脑的记忆等功能具有重要的作用。Green 等发现海马中存在特异性的电生理慢波, 被称为 theta 节律^[1]。早期的电生理研究发现, 海马中的 theta 节律场电位也能在内嗅皮层记录到^[2]。有证据表明, 海马中的 theta 节律来自于中内嗅皮层(medial entorhinal cortex, MEC)^[3]。

临床上糖尿病(Diabetes)定义为高血糖水平且机体无法对其进行调节的一类疾病。对糖尿病病因学分类有很多, 例如饮食性糖尿病或医源性糖尿病。研究发现糖尿病对人的大脑具有损伤作用, 能引起认知障碍^[4]。对海马的研究表明糖尿病能够损伤其功能, 引起突触连接强度的变化, 造成学习和记忆功能紊乱^[5,6]。前人的研究表明, 癫痫和大麻都可能损坏海马功能, 造成震荡模式异常^[7,8]。例如, 癫痫大鼠的位置细胞相位进动(Phase precession)异常^[8]。

我们发现, 糖尿病能够影响海马的神经协同性, 神经元放电与海马中的低频节律之间的相干性降低^[9]。鉴于海马中的

theta 节律来源于内嗅皮层^[3], 我们关心糖尿病大鼠在麻醉状态下内嗅皮层中神经元发放与场电位 theta 节律之间的关系。将神经元放电锋电位看成点过程, 通过一定的处理, 能够在领域中与连续过程一样估计功率谱和相干^[10,11]。通过上述方法, 我们的目的是验证糖尿病对内嗅皮层神经元放电协同性有损伤作用。

1 材料和方法

1.1 糖尿病大鼠模型

10 只 SD 大鼠, 由第四军医大学动物中心提供, 雄性, 体重 250-300g, 随机分为正常对照组(Control 组, $n=5$)和糖尿病组(Diabetic group, $n=5$)。实验前, 大鼠在温湿度控制良好的室内习服。大鼠能够自由获取水和食物。糖尿病模型采用每日注射链脲霉素(streptozotocin, STZ)构建, 剂量为 60mg/kg 体重^[5]。对照组注射相同容积的生理盐水。链脲霉素注射后尾部采血测量血糖浓度。本实验符合中国实验动物相关制度。

1.2 手术过程

* 基金项目 国家自然科学基金(31000491)

作者简介: 谢康宁, 男, 硕士, E-mail: tocooper@hotmail.com

△ 通讯作者: 许全盛, Tel: 18611578910, E-mail: xuquansheng@ysu.edu.cn

(收稿日期: 2012-03-06 接受日期: 2012-04-05)

所有记录都是在 STZ 或生理盐水注射后 12 周以后进行。配制 20%(0.6 ml/100g 体重)的乌拉坦麻醉大鼠,在立体定位仪(深圳 RWD 生命科学公司)上固定头部,去毛,剪开头皮,用电钻开 1 mm× 2 mm 骨窗。液压微推进器(美国 FHC 公司)将镍镉金属电极丝慢慢送入,尖部达内嗅皮层区域。实验结束后,电极通直流电烧灼(10μA, 20s),4%福尔马林灌流,做冰冻切片,尼氏染色,获得电极的准确位置。

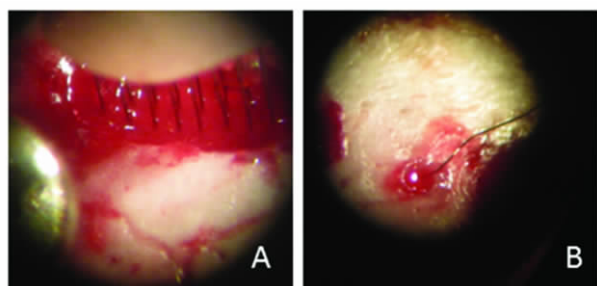


图 1 电极植入过程 A 电极阵列 B 参考电极

Fig. 1 Electrode implantation. A. The electrode array. B. The reference electrode

1.3 信号记录和预处理

信号采集设备采用 TDT 公司(美国 TDT)的 RX5。原始信号经过 headstage 前级放大,采样(25kHz),高通滤波器设置为 0.5Hz。只保留高信噪比(3/1)的神经元放电锋电位,通过在线阈值法获取。锋电位离线分类算法采用 offline sorter 软件完成。所有的相干分析都是基于同一个电极记录到的锋电位与场电位。对采集到的场电位采用带通滤波器(0.5-100Hz)滤波。数据表达为 mean± SEM。

1.4 相干分析

锋电位 - 场电位相干(Spike-field coherence)是一种在频域分析神经元锋电位与场电位之间相关性的方法^[10]。通常为了提高此方法的效能,使用 multitaper 法对其进行估计^[12]。平稳随机离散过程 a(n)和平稳随机连续过程 b 之间的相干定义为:

$$MC_{ab} = \frac{|MS_{ab}(f)|}{\sqrt{MS_a(f)MS_b(f)}}$$

其中 $MS_a(f)$ 与 $MS_b(f)$ 是自功率谱,是互功率谱。

$$MS_a(f) = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^M a(n)h_m(n)e^{-2\pi jfn}$$

$$MS_b(f) = \int y(t)h(t)e^{-2\pi jft} dt$$

其中 $h_m(n)$ 和 $h(t)$ 分别是窗函数(taper)。

MC_{ab} 取值在 0 和 1 之间,0 表示没有相关,1 表示相干性最大。图 2 显示了锋电位 - 场电位的原理。另外,使用 Jackknife 法得到显著性水平。

2 结果

2.1 动物的一般情况

每两天测量动物的体重和血糖含量。在检测的 12 周内血糖含量稳定,糖尿病组血糖含量大约 30 mmol/L,远远高于对照组(图 2)。糖尿病组的体重保持稳定,大约为 220± 26g(mean±

SD,下同)。而对照组大鼠体重持续增加,从 520± 33g 增加到 520± 12g。

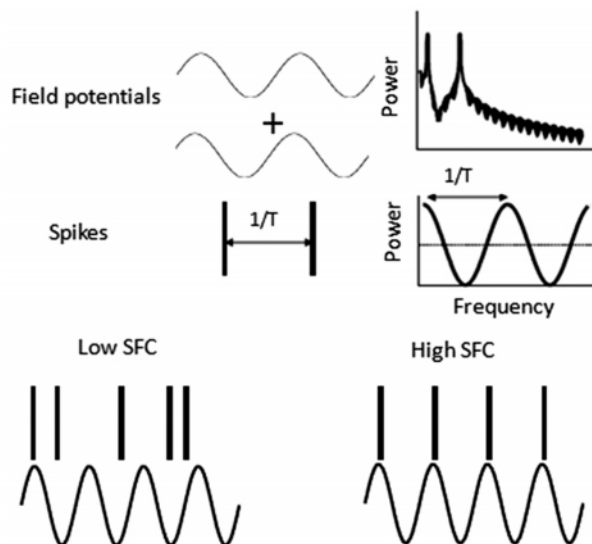


图 2 锋电位 - 场电位相干示意图

Fig. 2 Schematic diagram of Spike-field coherence(SFC)

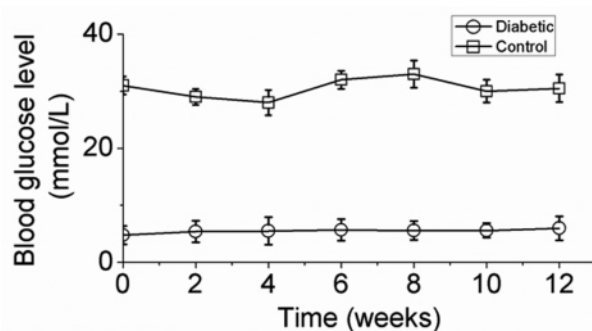


图 3 糖尿病造模后大鼠血糖变化

Fig. 3 Changes of blood glucose after STZ injection

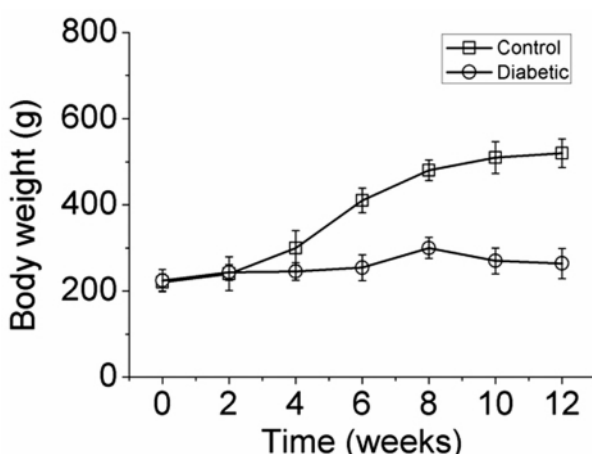


图 4 糖尿病造模后大鼠体重变化

Fig. 4 Changes of body weight after STZ injection

2.2 场电位与神经元放电

典型的场电位与锋电位发放见图 5 所示。图中上部是经过滤波的场电位,呈大约 1-4Hz 的慢波震荡。下部是锋电位,其发放时间与场电位波形有一定的对应关系。锋电位发放对应于场电位波形的波谷,有比较稳定的相位锁定关系。

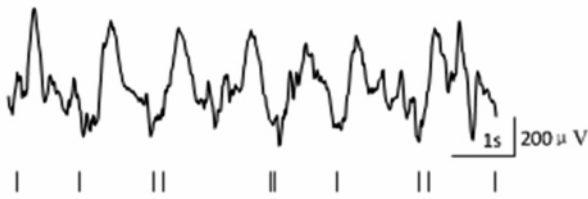


图5 场电位波形和锋电位
Fig. 5 Local field potential and spikes

2.3 锋电位与场电位相干

从上面的分析可以看到,时域分析能够大体看出神经元放电的与场电位的协同性,但不够细致准确,我们需要更为精确的频域方法。由于锋电位的发生时间是点过程,场电位是连续过程。在此适用于点过程和连续过程的相干估计法。用 Jackknife 法计算显著性水平,将得到的相干值与显著性水平对比,如果大于显著性水平的认为是有效(positive detection)。详细的数据见表 1。

表 1 对照组与糖尿病组对比

Table 1 Comparisons between Control and Diabetic group

Group	Number of animals	Number of recording site	SFC(mean± SEM)	Positive detection
Control	5	27	0.782± 0.035	55.6%(15/27)
Diabetic	5	23	0.366± 0.031*	52.2%(12/23)

Note: *P<0.001 vs. control (AVOVA)

对得到的相干数值进行 ANOVA 分析,比较对照组和糖尿病组的差异。取相干的峰值在两组中做比较,见图 6。两组差异显著(t 检验, P<0.05)。

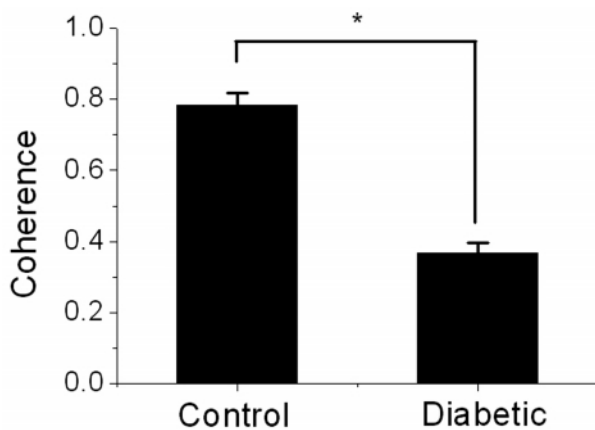


图 6 糖尿病组合对照组相干性比较

Fig. 6 Comparison of coherence between the Control and Diabetic group

3 讨论

糖尿病能够对突触可塑性造成影响,强化长时程抑制(Long-term depression)过程,从而对记忆造成损伤^[5,6]。内嗅皮层与海马直接相连,在记忆的形成过程中发挥了重要作用^[13],海马和内嗅皮层是空间认知的重要脑区。海马通过位置细胞(place cell)与海马场电位 theta 节律之间的特定相位关系对空间进行编码^[14,15];内嗅皮层通过格细胞和内嗅皮层的场电位 theta 节律之间的类似相位关系对空间进行编码^[16]。其中,theta 节律发挥了类似于时钟的作用^[17]。

锋电位与场电位的协同性研究有时采用时域的方法,分析锋电位发放时间点对应于场电位的相位^[18]。取相位点做统计学分析。本文提出的频域相干分析法有以下的优势,一是频域的方法能够得到 0-1 之间的归一化的值,便于不同大鼠之间进行对比;二是频域的方法能方便的使用 Jackknife 等方法得到统计学显著水平,利于作出统计学推断。

我们前期在海马中工作已经证明,海马中的神经元放电锋电位与场电位相干性降低^[9]。本文对麻醉状态下糖尿病大鼠的内嗅皮层神经元放电与场电位之间的相干关系进行了研究,发现糖尿病大鼠内嗅皮层神经元放电锋电位与场电位相干性与对照组相比显著降低。验证了糖尿病对内嗅皮层神经系统具有损伤作用,与海马的影响类似。

参考文献(References)

- [1] Green JD, Arduini AA. Hippocampal electrical activity in arousal [J]. Journal Of Neurophysiology, 1954, 17(6): 533-557
- [2] Andersen P, Holmqvist B, Voorhoeve P. Entorhinal activation of dentate granule cells [J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1966, 66(4): 448-460
- [3] Mitchell SJ, Ranck JB. Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats [J]. Brain Research, 1980, 189(1): 49-66
- [4] Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging [J]. Neurobiology of Aging, 2005, 26(1S): 26-30
- [5] Artola A, Kamal A, Ramakers GJM, et al. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus [J]. European Journal of Neuroscience, 2005, 22(1): 169-178
- [6] Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons [J]. Nature Neuroscience, 2008, 11: 309-317
- [7] Lenck-Santini PP, Holmes GL. Altered Phase Precession and Compression of Temporal Sequences by Place Cells in Epileptic Rats [J]. Journal of Neuroscience, 2008, 28(19): 5053-5062
- [8] Robbe D, Montgomery SM, Thome A, et al. Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function [J]. Nature Neuroscience, 2006, 9: 1526-1533
- [9] Liu K, Xie KN, Qiao ZM, et al. Impaired neural coordination in hippocampus of diabetic rat [J]. Acta Physiologica Sinica, 2009, 61(5): 417-423
- [10] Jarvis MR, Mitra PP. Sampling Properties of the Spectrum and Coherency of Sequences of Action Potentials [J]. Neural Computation, 2001, 13(4): 717-749

(下转第 3079 页)

参考文献(References)

- [1] Kumar P, Mishra B. Colon targeted drug delivery systems-an overview [J]. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5(3):186-198
- [2] Pinto JF. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon [J]. *Int J Pharm*, 2010,395(1-2): 44-52
- [3] Shah N, Shah T, Amin A. Polysaccharides: a targeting strategy for colonic drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8 (6): 779-796
- [4] Kietzmann D, Moulari B, Bé duneau A, et al. Colonic delivery of carboxyfluorescein by pH-sensitive microspheres in experimental colitis [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(2):290-295
- [5] Khan MZ, Stedul HP, Kurjaković N. A pH-dependent colon-targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. II. Manipulation of drug release using Eudragit L100 and Eudragit S100 combinations[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, 26(5):549-554
- [6] Jain D, Panda AK, Majumdar DK. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2005, 6(1): E100-E107
- [7] Sancin P, Caputo O, Cavallari C, et al. Effects of ultrasound-assisted compaction on Ketoprofen/Eudragit S100 mixtures [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 7(3):207-213
- [8] Kalani, M.; Yunus, R. Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review [J]. *Int. J. Nanomedicine*, 2011, 6: 1429-1442
- [9] Mishima, K. Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas [J]. *Adv. Drug. Deliv. Rev*, 2008, 60(3): 411-432
- [10] 陈岚, 乔培, 高丹丹, 等. 超临界流体强化溶液分散法制备 L-聚乳酸微粒[J]. *中国医药工业杂志*, 2011, 42(3):193-197
Chen Lan, Qiao Pei, Gao Dan-dan, et al. Preparation of poly (L-lactide acid) microparticles using SEDS process [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2011, 42(3):193-197
- [11] Hu DD, Lin CC, Liu L, et al. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids [J]. *J Food Eng*, 2011, 109 (3):545-552
- [12] Kang Y, Yin G, Ouyang P, et al. Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS)[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2008,322(1):87-94
- [13] Kröber H, Teipel U. Materials processing with supercritical antisolvent precipitation: process parameters and morphology of tartaric acid [J]. *J Supercrit Fluids*, 2002, 22(3): 229-235
- [14] Cocero MJ, Ferrero S. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch effect of operating conditions [J]. *J Supercrit Fluids*, 2002, 22(3):237-245
- [15] Patomchaiwivat V, Paeratakul O, Kulvanich P. Formation of inhalable rifampicin-poly (L-lactide) microparticles by supercritical antisolvent process [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2008, 9(4):1119-1129
- [16] Reverchon E, Marco ID. Supercritical antisolvent precipitation of cephalosporins [J]. *Powder Technol*, 2006, 164(3):139-146
- [17] He WZ, Suo QL, Hong HL, et al. Supercritical antisolvent micronization of natural carotene by the SEDS process through prefilming atomization [J]. *Ind Eng Chem*, 2006, 45(6):2108-2115
- [18] Bleich J, Kleinebudde P, Müller BW. Influence of gas density and pressure on microparticles produced with the ASES process[J]. *Int J Pharm*, 1994, 106(1): 77-84
- [19] Reverchon E. Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nano-particles [J]. *J Supercrit Fluids*, 1999, 15(1): 1-21
- [20] Reverchon E, Della PG, Falivene MG. Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation[J]. *J Supercrit Fluids*, 2000, 17 (3):239-224

(上接第 3073 页)

- [11] Thomson DJ. Spectrum estimation and harmonic analysis [J]. *Proceedings of the IEEE*, 1982, 70(9): 1055-1096
- [12] Womelsdorf T, Fries P, Mitra PP, et al. Gamma-band synchronization in visual cortex predicts speed of change detection [J]. *Nature*, 2005, 439(7077): 733-736
- [13] Fyhn M, Hafting T, Witter MP, et al. Grid cells in mice [J]. *Hippocampus*, 2008, 18(12): 1230-1238
- [14] O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat [J]. *Exp Neurol*, 1976, 51(1): 78-109
- [15] O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat [J]. *Brain Res*, 1971, 34(1): 171-175
- [16] Moser EI, Kropff E, Moser MB. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system [J]. *Annual Reviews*, 2008, 31: 69-89
- [17] Lubenov EV, Siapas AG. Hippocampal theta oscillations are traveling waves [J]. *Nature*, 2009: 534-539
- [18] Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA. Prefrontal Phase Locking to Hippocampal Theta Oscillations [J]. *Neuron*, 2005, 46(1): 141-151