

光照对麻醉大鼠海马节律的影响 *

谢康宁¹ 罗二平¹ 申广浩^{1△} 田 越¹ 郑丽娟²汤 池¹ 闫一力¹ 吴小明¹ 孙 涛¹ 刘 娟¹

(1 第四军医大学 生物医学工程学院 陕西 西安 710032 2 空军临潼航空医学训练鉴定中心 陕西 西安 710600)

摘要 目的:研究光照刺激对麻醉大鼠海马节律的影响。方法:对乌拉坦麻醉大鼠,在海马中植入电极,通过神经信号放大器记录场电位。重复对大鼠进行视觉刺激,刺激 10s,并给予 20s 的恢复期。与经典掐尾实验进行对比。结果:乌拉坦麻醉大鼠的掐尾实验能够将海马场电位从“大不规则波”(LIA)变成 theta 波。LIA 到 theta 的转变通常只需 1s,掐尾结束后 3s 后 theta 返回 LIA。光刺激造成了在 5-8s 后 LIA 消失,光刺激撤离后 4-6s LIA 返回,并没有引发 theta。结论:本文结果提示视觉通路 with 触觉通路有不同的优先级和行为特性。

关键词 大鼠;海马;节律;光刺激

中图分类号 Q95-33 **文献标识码** A **文章编号**:1673-6273(2012)15-2839-03

Effects of Light Stimulation on the Hippocampal Rhythm of Anaesthetized Rats*

XIE Kang-ning¹, LUO Er-ping¹, SHEN Guang-hao^{1△}, TIAN Yue¹, ZHENG Li-juan²,TANG Chi¹, YAN Yi-li¹, WU Xiao-ming¹, SUN Tao¹, LIU Juan¹

(1 School of Biomedical Engineering Biomedical Engineering, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032; 2 Lintong Aviation Medical Evaluation and Training Centre of Chinese Air Force, Xi'an, 710600)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of light stimulation on hippocampal rhythm of anaesthetized rats. **Methods:** The rats were anaesthetized with urethane and implanted with electrodes in the hippocampus, from which neural local field potentials (LFPs) were recorded. Light stimulation were applied to the rats repetitively with 10s duration and additional 20s delay for recovery, which was compared with the classical tail-pinch experiment. **Results:** The tail-pinch of urethane-anesthetize rat could change the LFPs in hippocampus from large irregular activity (LIA) into theta wave, which indicated that a sensory input could cause the animal being 'active'. The transition of LIA to theta wave is within 1s, and that theta wave back to LIA is approximately 3s after pinch's removal. We found that light can eliminate LIA but not elicit theta wave, with much longer delay, 5-9s for LIA disappearing after light onset and 4-6s for LIA'S back. **Conclusions:** This may suggest that under urethane-anesthetized condition visual input is less sensitive and with lower priority comparing with tactility.

Key words: Rat; Hippocampus; Rhythm; Light stimulation

Chinese Library Classification: Q95-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2839-03

前言

海马属于大脑边缘系统,是哺乳动物大脑的组成部分。呈左右对称,处在颞内侧。动物的海马是记忆形成的关键性结构^[1]。海马发挥的作用包括信息巩固和空间导航两个方面。O'Keefe 等人 1971 年发现大鼠海马中的神经元发放活动与大鼠在环境中的位置有关,揭开了海马空间导航研究的序幕^[2]。

乌拉坦麻醉大鼠的海马胞外场电位记录能够出现 2 种主要的模式。一种是 theta 节律,频率范围在 3-12Hz,也称为节律性慢波(rhythmical slow activity, RSA);另一种是大幅值的不规则活动(large amplitude irregular activity, LIA),具有比较宽的频率成分(0.5-25Hz)^[3,4]。根据乌拉坦麻醉的不同水平,场电位包

含不同的 LIA 和 theta 波的组合。轻度麻醉 LIA 和 theta 波交替出现;中度麻醉场电位主要是 LIA,掐尾实验能够引起 theta 波;深度麻醉掐尾实验很难引起 theta 波^[5]。本文研究了光刺激对乌拉坦麻醉大鼠的海马 LIA 和 theta 的产生、抑制和延时,并对可能的机制作了初步的讨论。

1 材料和方法

1.1 动物准备

4 只成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(体重 250-300g)。实验室温度和湿度控制良好,大鼠能够自由得到食物和水。符合中国动物伦理委员会指导原则。

1.2 手术

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31000491)

作者简介:谢康宁(1976-),男,硕士,主要研究方向:生物医学工程

△通讯作者:申广浩,男,副教授,电话:0298774849, E-mail: ghlulu@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2012-03-15 接受日期:2012-04-12)

大鼠用 20% 的乌拉坦 (0.6mL/100g 体重) 麻醉。固定在立体定位仪 (美国)。在大鼠头骨上开 2mm×2mm 的窗口 (坐标, ML:2.2mm, AP:3.6mm)。用微推进器 (美国 FHC 公司) 缓慢将 16 通道镍铂电极 (中国北京尤科奇) 慢速推入海马的 CA1 区。实验结束后, 选两个通道接通电流 (直流 10 μ A) 烧灼, 4% 的福尔马林溶液灌注。大脑去除后在 20% 的蔗糖溶液中保存, 冰冻切片后施行 HE 染色, 确定电极的位置。

1.3 实验范式

光照刺激前, 先做常规的掐尾实验。用镊子夹大鼠的尾巴 10s, 恢复 20s。使用发光二极管手电做光源 (4.5klx) 固定在大鼠眼睛前方 10cm 处。光刺激 10s, 恢复 20s。

1.4 数据采集和处理

场电位信号由 TDT system3 系统 (美国 Tucker-Davis Technologies 公司) 采集并放大, 采样率为 24kHz。原始信号是连续的信号, 通过滤波器将其分为两个部分, 300Hz 以下的低频部分是场电位, 反映了神经元集体的活动, 300Hz 以上为动作电位 (锋电位)。麻醉状态下场电位频率较低, 集中在 0-20Hz, 在此通过低通滤波器获取 0-20Hz 慢波信号。功率谱估计采用 Welch 法 (窗宽 4s, 重叠 2s)。短时傅里叶变换 (Short-time Fourier Transform) 得到时频特性。

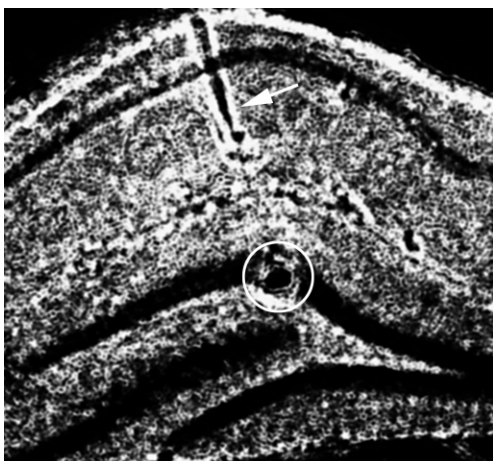


图 1 大鼠海马切片显示电极位置

Fig.1 Electrode position illustrated in the Hippocampal slice

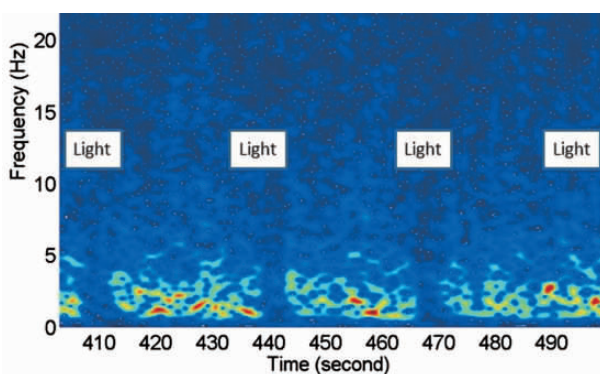


图 3 光照实验短时傅里叶变换

Fig.3 Short Time Fourier Transform of light stimulation experiment

2 结果

2.1 电极定位

实验结束后, 电极的位置用病理切片的方式确定。通过电极输入直流对电极信号记录部位进行损毁。电极拔出后用生理盐水灌注, 福尔马林固定。冰冻切片后镜下观察。如图 1 所示, 电极损毁点位于白色圆圈内。白色箭头指向的是电极植入的轨迹。

2.2 掐尾实验

对掐尾实验海马 LFPs 做短时傅里叶变换, 分析其时频特性。图 2 显示, 当大鼠的尾巴被镊子掐住时呈现明显的窄带 theta 频率 (4-6Hz); 松开后频率散开, 在 0-20Hz 内弥散分布, 呈典型的 LIA 活动。LFPs 与掐尾动作基本同步, 延时很短。

2.3 光刺激实验

对光刺激实验海马 LFPs 做短时傅里叶变换, 分析其时频特性。图 3 显示, 当大鼠接受光刺激时, 经过短暂延时, LIA 彻底消失, 光刺激消除后经过一定的延时 LIA 恢复。

2.4 光刺激反应延时特性

大鼠海马 LFPs 对光刺激的反应有延时, 光刺激 "on" 状态的反应延时 (7.35 ± 2.42 , Mean $\pm$ SD) 比光刺激 "off" 的反应延迟 (2.55 ± 2.43 , Mean $\pm$ SD) 高 (见图 4)。

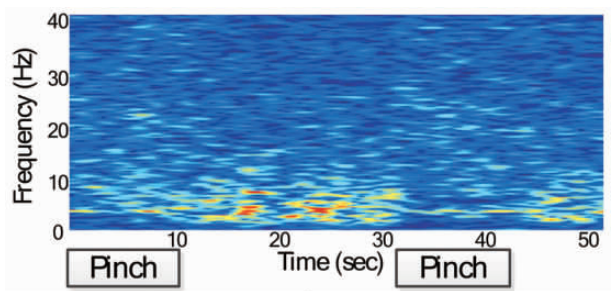


图 2 掐尾实验短时傅里叶变换

Fig.2 Short Time Fourier Transform of tail-pinch experiment

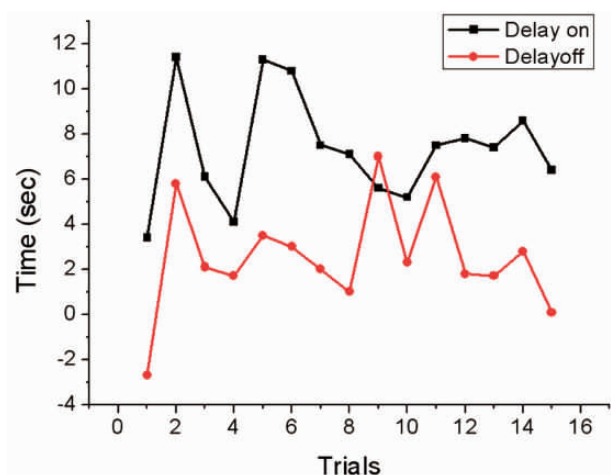


图 4 光刺激反应延时

Fig.4 Response delay to light stimulation

3 讨论

动物的海马是记忆形成的基础, 其作用包括信息巩固

和空间导航两个方面^[1]。O'Keefe 等人 1971 年发现大鼠海马中的神经元发放活动与大鼠在环境中的位置有关,发现了位置细胞的存在^[2],随后发现了位置细胞神经元发放与场电位之间的相位提前效应(phase precession)^[6]。

研究表明 theta 节律与很多行为有关联^[7]。通常认为海马中的 theta 节律有两类,一类是与运动相关,另一类与警惕有关^[8]。Kramis 等人提出在大鼠的海马中有两种不同的 theta 节律,分别与不同的行为和神经机制相对应^[10]。第一类 theta 节律对硫酸阿托品不敏感,常常在移动等自主行为中出现,频率约为 7-12Hz。另一种是与硫酸阿托品相关的 theta 节律,在静止状态出现,或者在乌拉坦麻醉状态下出现,频率约为 4-7Hz,大剂量硫酸阿托品的腹腔注射或者肌肉注射能够阻断第二类 theta 节律的出现。第二类 theta 节律在非麻醉状态下的大鼠中比较少见,不过当天敌侵犯时也能诱发第二类 theta 节律^[11,12]。

Adey 认为 theta 节律可能反映了功能处理和记忆巩固的过程^[13]。虽然海马活动与行动相关联,但存在多种解释(转移,刺激过程,学习,记忆,动机等)。很多学者倾向于将其与记忆过程相关联^[14-16]。

多个皮层下核团被认为与 theta 节律的产生有关。这些核团释放神经递质,使海马中的网络震荡成为可能。Broca 斜带(MS-DBB)神经元的毁损消除了所有大脑结构中的 theta 节律,被认为是 theta 节律的产生器^[17]。MS-DBB 与 supramammillary 区域反向链接,是 theta 节律产生的第二重要结构^[18,19]。一些间接证据表明,theta 节律与突触可塑性相关。大量离体和 in vivo 研究报道当刺激处在 200ms 间隙时长时程增强(Long-term potentiation)效果最佳^[20,21]。

大鼠在麻醉状态下保持了一定的对外界环境的警醒反应。LIA 对应于大鼠处在相对轻松的状态,而 theta 节律则被认为是对警醒的反应。因此可以根据场电位记录判断大鼠处在放松还是警惕状态。试验中,我们得到的结果是触觉刺激能够将海马场电位从 LIA 激发成为 theta 节律,印证了大鼠处在警惕状态。然而,光照刺激的反应与触觉刺激不同。光照将 LIA 全部去除,体现了一种非放松状态,但并没有产生 theta 节律。另外,对触觉的反应几乎没有延时,体现了对环境的警惕,但对视觉的反应延时较长。结果提示视觉刺激反应与触觉刺激反应具有不同的特性。

参考文献(References)

- [1] Mark L, Daniels D, Naidich T, et al. The hippocampus [J]. American Journal Of Neuroradiology, 1993, 14(3): 709-712
- [2] 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
- [3] Bland BH, Oddie SD. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1998, 22(2): 259-273
- [4] Bland BH, Sainsbury RS, Creery BL. Anatomical correlates of rhythmical slow wave activity (theta) in the hippocampal formation of the cat [J]. Brain Res, 1979, 161(2):199-209
- [5] Wolansky T, Clement EA, Peters SR, et al. Hippocampal slow oscillation: a novel EEG state and its coordination with ongoing neocortical activity [J]. Journal of Neuroscience, 2006, 26(23): 6213-6229
- [6] O'Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm [J]. Hippocampus, 1993, 3(3): 317-330
- [7] Buzsáki G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory [J]. Hippocampus, 2005, 15(7):827-840
- [8] Bland BH. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms [J]. Progress in Neurobiology, 1986, 26(1): 1-54
- [9] Buzsáki G. Theta Oscillations in the Hippocampus [J]. Neuron, 2002, 33(3):325-340
- [10] Kramis R, Vanderwolf C, Bland B. Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital [J]. Experimental Neurology, 1975, 49(1):58-85
- [11] Sainsbury RS, Heynen A, Montoya CP. Behavioral correlates of hippocampal type 2 theta in the rat [J]. Physiology & behavior, 1987, 39(4):513-519
- [12] Sainsbury RS, Harris JL, Rowland GL. Sensitization and hippocampal type 2 theta in the rat [J]. Physiol Behav, 1987, 41(5):489-493
- [13] Adey W, Dunlop C, Hendrix C. Hippocampal slow waves: distribution and phase relationships in the course of approach learning [J]. Archives Of Neurology, 1960, 3(1):74-90
- [14] Miller R. Cortico-hippocampal interplay: Self-organizing phase-locked loops for indexing memory [J]. Psychobiology, 1989, 17(2):115-128
- [15] Lisman JE, Idiart M. Storage of 7+/-2 short-term memories in oscillatory subcycles [J]. Science, 1995, 267(5203):1512-1515
- [16] Raghavachari S, Kahana MJ, Rizzuto DS, et al. Gating of human theta oscillations by a working memory task [J]. The Journal of neuroscience, 2001, 21(9): 3175-3183
- [17] Petsche H, Stumpf C, Gogolak G. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells [J]. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 1962, 14(2): 202-211
- [18] Vertes R, Kocsis B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus [J]. Neuroscience, 1997, 81(4): 893-926
- [19] Borhegyi Z, Freund TF. Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat [J]. Brain Research Bulletin, 1998, 46(5):453-459
- [20] Larson J, Wong D, Lynch G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation [J]. Brain Research, 1986, 368(2):347-350
- [21] Greenstein YJ, Pavlides C, Winson J. Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity [J]. Brain Research, 1988, 438(1-2): 331-334