



高频电刺激对大鼠海马脑片癫痫样放电特性影响的研究*

张康辉¹⁾ 李成双¹⁾ 东 磊²⁾ 王慧泉¹⁾ 郑 羽^{1)**}

(¹⁾ 天津工业大学生命科学院, 天津 300387; ²⁾ 天津大学精密测量技术与仪器国家重点实验室, 天津 300072)

摘要 本文采用电极阵列检测技术, 在大鼠海马脑切片上诱导出稳定的癫痫样放电, 分析、研究 130 Hz 的高频电刺激 (high-frequency stimulation, HFS) CA3 区时, 海马切片在癫痫发作间期放电 (inter-ictal discharges, IID) 和发作期放电 (ictal discharges, ID) 的各项参数、癫痫样放电地起始位点、传播方向和传输速率以及各频段的功率谱密度. 结果显示: 高频电刺激可以有效地降低癫痫发作期的幅值、减少持续时间、增长潜伏时间、抑制癫痫样放电由 IID 向 ID 的转变等. 提示高频电刺激抑制癫痫的作用机制是通过促进神经元之间的抑制性传输系统, 并且抑制海马神经元之间的兴奋性连接, 从而达到抑制效果.

关键词 高频电刺激, 癫痫样放电, 海马切片, 电极阵列

中图分类号 R338.8, R742.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0273

癫痫是一种脑群神经元异常同步化放电导致的间歇性神经退行性疾病^[1]. 癫痫发作时, 通常在脑电图上表现为间歇或连续的棘波节律^[2], 婴儿痉挛症主要表现为高幅失律^[3]. 流行病学调查显示, 癫痫的发病率与年龄息息相关, 儿童的发病率是成年人的 10~15 倍^[4], 大约有 60% 以上的癫痫患者最初发病于儿童时期^[5-6].

高频电刺激属于深部脑刺激术, 具有可调性和可逆性的优点, 在治疗癫痫方面已经取得了一定的成就^[7]. 在使用电刺激治疗癫痫的过程中, 刺激靶点尤为重要. 研究显示, 刺激中央梨状皮层对癫痫有明显的抑制作用^[8], 电刺激小脑顶核则抑制效果不明显^[9], 电刺激结节乳头核反而会加重癫痫^[10]. 对于靶点的选择主要出现了两种观点: 一是刺激远离病灶区且存在神经联系的核团从而间接控制癫痫; 二是对癫痫病灶区直接刺激从而达到治疗效果.

海马是颞叶癫痫起源地之一^[11], 是最容易产生癫痫样活动的脑区之一, 并且由于具有明确的片层化结构^[12], 海马被广泛应用于癫痫样活动的研究. 研究显示, 给予海马高频电刺激 1 周, 可以显

著提高后放电阈值, 增加后放电潜伏期, 减少后放电持续时间^[13]. 临床试验发现, 高频电刺激海马区域对癫痫发作有显著的抑制作用, 是安全有效的治疗方法^[14-15]. Pollo 和 Villemure 对 5 名癫痫患者进行为期 5 个月到 3 年的杏仁核和海马刺激治疗后发现, 患者的癫痫发作强度降低了 50%~90%^[16]. 目前高频电刺激抑制癫痫的作用机制尚不清楚^[17], 因此研究高频电刺激对癫痫放电特性的影响具有十分重要的意义, 有助于了解高频电刺激抑制癫痫的作用机制.

电极阵列能够同时记录多个位点^[18-19], 被广泛应用于神经生物学、神经信息学以及离子通道药物高通量筛查等领域. 其应用于海马切片已经有 30 多年历史^[20]. 与传统电生理方法相比, 电极阵列能够同步对比海马不同区域的电生理信号, 对研究海马神经网络的连接与信号的传递具有重要意义.

* 国家自然科学基金(62071329, 61871288), 天津市自然科学基金(20JCYBJC00130)和载人航天工程航天医学实验领域项目(HYZHXM03003)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 18222128406, E-mail: zhengyu@tiangong.edu.cn

收稿日期: 2020-07-30, 接受日期: 2021-03-26

为了探究高频电刺激对幼年大鼠海马切片癫痫样放电特性的影响, 本文使用电极阵列记录低镁人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 灌流条件下脑片神经元的自发放电活动, 并对传输速度、动作电位发放特性、功率谱密度以及神经网络放电等进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18 只 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 (手术时 8~12 d) 从中国医学科学院放射医学研究所购买 (中国天津; 认证号 SCXK- [PLA] 2014-0001)。每只大鼠饲养在一个单独的笼子里, 12 h 光/暗循环 (灯在 07:00 打开, 19:00 关闭), 恒定的温度 (25 ± 2) °C 条件下饲养, 可以随意获得食物和水。所有实验均在白天 (9:00 ~ 18:00) 进行。所有动物实验程序经中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员会批准。实验方案尽量减少动物的痛苦以及使用动物的数量。所有切片随机分配给对照组或实验组, 以尽量减少主观偏差。

1.2 电极阵列和刺激系统

使用电极阵列记录系统 MEA2100 获得神经电生理数据。在 MEA 平台上, 通过探头连接玻璃电极, 将检测到的脑片电生理信号传输到计算机。灌流系统持续给被测脑片灌流 ACSF (图 1a)。ACSF 需要通入 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气, 灌流持续 10 min 以上, 以保证脑片保持很好的活性及正常代谢能力; 温度控制器分别控制 MEA 平台和灌流液的温度保持在 35~37°C。采用 8×8 的 IR-ITO 电极, 共有 60 个记录电极点, 电极直径为 30 μm , 间距为 200 μm 。使用 MC-rack 显示并同时记录 60 个通道的脑片电生理信号, 采样频率 20 k/s。

刺激系统如图 1b 所示。高频电刺激由 MASTER-8 (AMPI 公司, 以色列) 产生, 经由 ISO-FLEX 刺激隔离器 (格罗贝尔公司, 美国) 精确控制其电流, 使用同心双极电极 (FHC, 美国) 精准地刺激脑片靶点。对大鼠海马脑片的目标脑区进行高频电刺激。高频电刺激的信号由频率为 130 Hz、电流 100 μA 、占空比 50% 的 900 个脉冲串组成。刺激电极总长 100 mm, 尾部 25 mm 被热缩

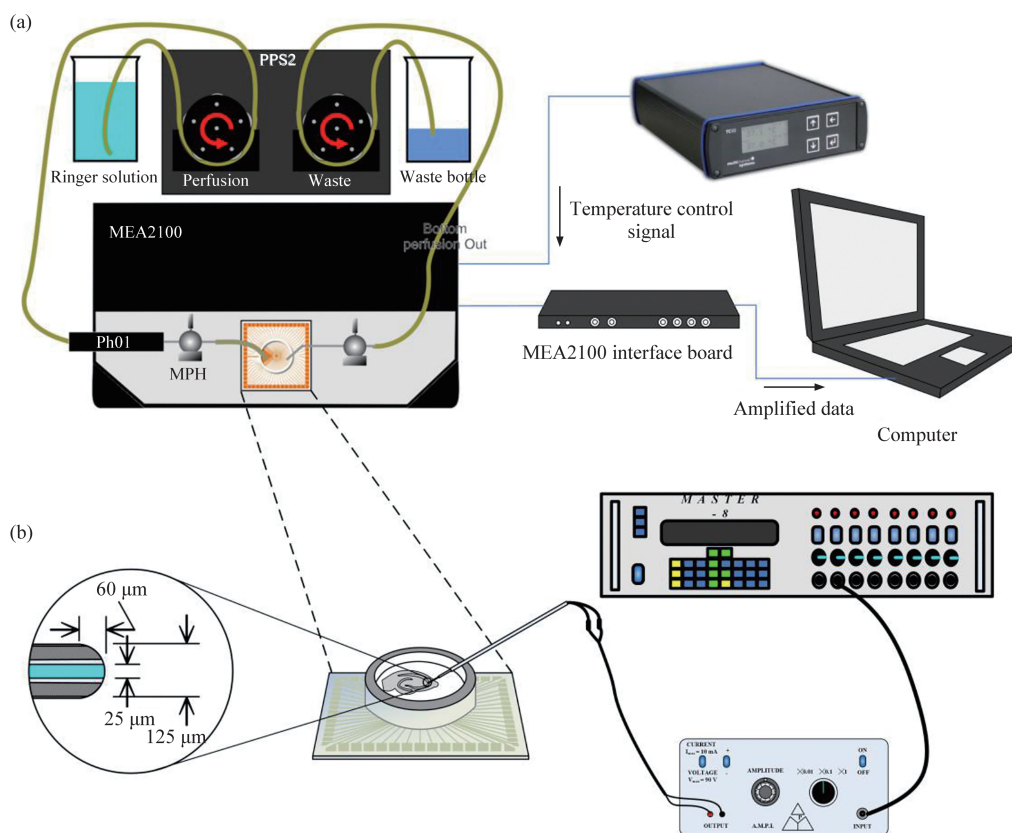


Fig. 1 Data recording device and high-frequency stimulation system

(a) The recording system included an electrode array recording system, a temperature control device, and a perfusion system. (b) The high-frequency stimulation system consists of a stimulation generating device, a stimulation isolator, and concentric bipolar electrodes.

管包围,并在尾端分别引出正负极,头部有3 mm的突起,在突起部分又延伸出更加精密的尖端.图1b左侧展示了电极尖端的放大图,电极的尖端是一个弧形(直径125 μm),中间为正极(直径25 μm),正极由负极包裹,在电极的正负极之间存在着厚度为25 μm 的绝缘材料.

1.3 海马切片

实验大鼠按照0.4 ml/100 g,腹腔注射浓度为10%的水合氯醛,使其深度麻醉.在4°C的环境下迅速断头取脑.在通入95% O_2 和5% CO_2 混合气体的4°C ACSF (124.0 mmol/L NaCl, 25.0 mmol/L NaHCO_3 , 3.5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mmol/L CaCl_2 和10.0 mmol/L 葡萄糖)中静置冷却3 min.待大鼠脑代谢降到很低时,使用琼脂将其固定在模具上,放入切片机中切出带有海马的脑切片.挑选出CA1区、CA3区、DG区、丘脑均完整的脑片,在28°C的ACSF中孵育至少2 h.

孵育完成后,脑片活性与代谢基本恢复,将其转移至电极的孵育槽中,通过灌流无镁ACSF降低 Mg^{2+} 浓度,减弱 Mg^{2+} 对NMDA受体的阻断作用,导致N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体大量开放,从而诱导海马神经元的同步化放电活动^[21],成功制备癫痫模型.

1.4 数据分析

脑片自发放电信号的峰值超过背景标准差的4倍,且放电时间超过300 ms的事件确定为癫痫样放电.持续300 ms至2 000 ms的癫痫样放电事件被定义为IID (inter-ictal discharges),持续时间2 000 ms及以上的事件被定义为ID (ictal discharges).依据各个电极点记录的,对应各场电位第一个峰值的时间,判断癫痫样放电地起始位点和传播方向,通过电极点之间的距离与起始时间差计算传输速率.对原始信号1~500 Hz的成分进行频谱分析,使用50 Hz陷波器去除工频干扰,观察并分析癫痫样放电信号在频域上的功率密度变化.

采用MATLAB (Math Works Inc., USA)和Origin 9.0软件 (OriginLab, USA)处理和统计分析信号.使用SPSS 15.0的单因素方差分析(ANOVA)检查组间差异. $\bar{x} \pm \text{SD}$ 用于表示结果. $P < 0.05$ 被认为在各组中具有统计学意义.

2 结 果

2.1 无镁ACSF诱导的癫痫样放电

持续灌流无镁ACSF 10~15 min后,可在电极阵列系统记录到海马CA1区、CA3区和DG区锥体细胞层的异常同步化癫痫样放电逐渐进入稳态.癫痫样放电由于实验标本的不同和记录条件的差异也存在不同的标准.在离体癫痫模型上,癫痫样放电在胞外记录到的信号是叠加在场电位上成串发放的动作电位,且不同区域同步发放^[22].多电极阵列可以记录海马和齿状回的大部分区域(图2a).图2b展示了电极阵列记录到的数据.图2c展示了58通道记录到的一段稳定发放的数据,并逐次放大其中的一段癫痫样放电,结果显示,在每一次ID之前均存在数量不等的IID.

2.2 癫痫样放电的特性

图3a为图2c中一段癫痫样放电内,动作电位的放电时间序列与持续时间的分析结果.在一段癫痫样放电中,动作电位的发放主要集中在起始时间段,而在发作期将要结束时则比较稀疏.58通道多段癫痫样放电内动作电位之间的时间间隔(inter-spike interval, ISI)统计分析(图3b)显示,ISI呈指数分布.虚线代表95%的ISI在虚线对应的时间内.插图是ISI的对数呈指数分布.在培养的海马神经元以及在体记录的海马锥体细胞上的研究显示了同样的结果^[23-24].在癫痫样放电中95%的ISI值小于15.79 ms ($I_{95}=15.79$ ms).对6个脑片记录的癫痫样放电分析、计算得出 $I_{95}=(14.48 \pm 1.94)$ ms.用场电位(field potentials, FP)对癫痫样放电的起始位置进行分析,分别选取电极阵列同步记录到的CA1、CA3和DG区的场电位,根据波形判断得出该位点放电的起始时间,然后比较不同位点场电位的起始时间,判断出其癫痫样放电的起始位点.结果显示癫痫样放电起始于68通道,对应海马脑片的CA3区,并分别向CA1区和DG区传播,且传播延时与距起始位点的距离成正相关(图3c).这与先前的研究结果一致^[18, 25].定义CA3区到CA1区传播的方向为逆行传输,CA3区到DG区传播的方向为顺行传输.图3d展示了IID和ID的传输速度,发现IID和ID之间没有显著性的差异($P > 0.05$, $n=6$),但是顺行传输与逆行传输之间存在显著性差异($P < 0.05$, $n=6$).

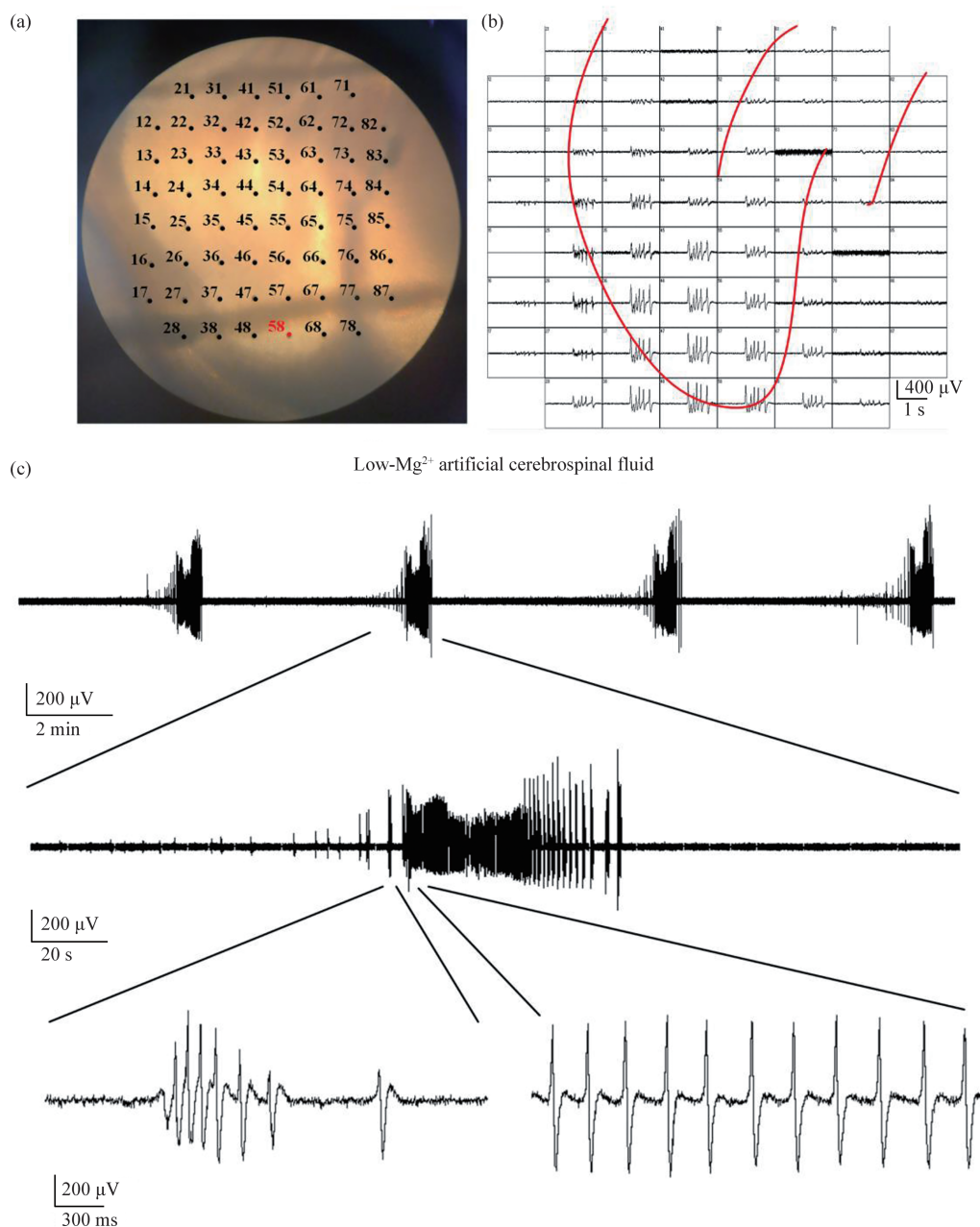


Fig. 2 Low Mg^{2+} ACSF-induced epileptiform discharges

(a) One hippocampal slice of 2-week-old SD rat laying on MEA. The black dots were 60 recording electrodes. Several strips crossed the slice were a part of nylon mesh to keep better contact with electrodes. (b) Low Mg^{2+} ACSF perfusion signal recorded on the MEA after 30 min of epileptiform discharge. (c) Amplifying the electrophysiological signals of the recorded brain slices step by step.

2.3 高频电刺激癫痫样放电特性的影响

由前文中的实验结果可知,海马的癫痫样放电起始于CA3区.因此待无镁ACSF诱导出的海马脑片能够稳定产生癫痫样放电20 min后,在CA3区施加高频电刺激.图4a展示脑片在多电极记录系统下的状态以及高频电刺激的位点.图4b为高频电刺激的方法,每次刺激由900个脉冲组成,刺激频率

是130 Hz,占空比50%,图4c展示的是图4a的脑片在图4b的刺激下所记录到的第77通道的场电位(50 min).可以观察到,在电刺激后,IID数量明显增多,随着时间的推移,IID数量逐渐减少.

为了充分了解海马区癫痫样放电的特性,我们利用电极阵列在研究海马神经元网络方面的优势,将每一个电极点记录到的数据进行分析,如图5b

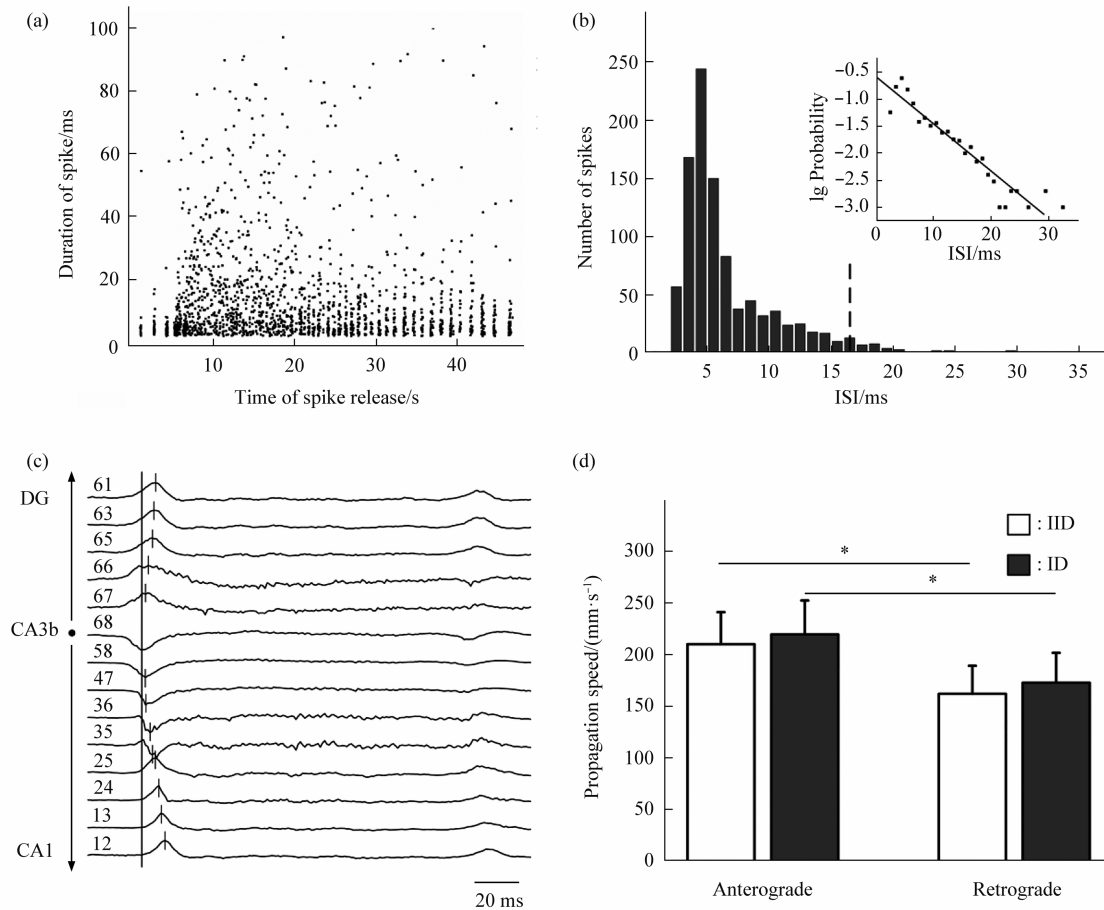


Fig. 3 Space-time characteristics of epileptiform discharges

(a) Time sequence and duration of action potentials. Each point represents an action potential, where the abscissa represents the firing time of the action potential, and the ordinate represents the duration of the action potential. (b) The ISI mainly centered at 3–7 ms, and 95% of the ISI was at 15.79 ms. (c) The initiation of synchronous field potentials at recording sites along stratum pyramidale from CA3b to CA1 distal region. Each vertical bar represents the start time of the synchronization field potential. The number in the upper left corner of the field potential is the electrode number. (d) By comparing the start time of FP and the recording position of FP, the transfer rate is obtained.

(电刺激前)和图5c(电刺激后)所示,每一个圆对应一个电极点,颜色代表动作电位的发放频率,大小代表幅值.圆之间连线的颜色代表癫痫样放电数据的相关系数,且仅显示相关系数不小于0.5的部分(由于部分电极点记录到的数据不属于海马区,因此不进行相关性分析).结果显示:无论是动作电位的发放频率还是幅值在CA3区均具有较高的水平,且在向CA1和DG区传递时逐渐衰减;CA1区和DG区的幅值虽然相近,但是动作电位发放的频率却存在很大差别;CA3区各电极点间存在很高的相关性,DG区具有相同的现象,且海马锥体细胞层之间的相关性也很高(图5b).在电刺激后,各个区域的放电幅值和动作电位发放的频率均有明显的下降.而各电极点之间的相关系数却没

有明显的变化.有趣的是,在图5b中,34号电极点与53号电极点、32号电极点与61号电极点之间也存在相关系数较高的现象,其中32号和34电极点在CA1区,53号和61号电极点在DG区.

将CA3区大致等分为CA3a、CA3b、CA3c三个亚区(图5a).对比电刺激前后各区域锥体细胞层及DG颗粒细胞层的动作电位发放频率的变化(表1)可见:在电刺激以后,各区域动作电位的发放频率均出现不同程度的降低.其中CA3b和CA3c的下降程度最为明显,分别下降了20.94%和20.23%.幅值降低程度最明显的为CA3b区,下降了24.25%.在其他5个脑片上也观察到了类似的结果.

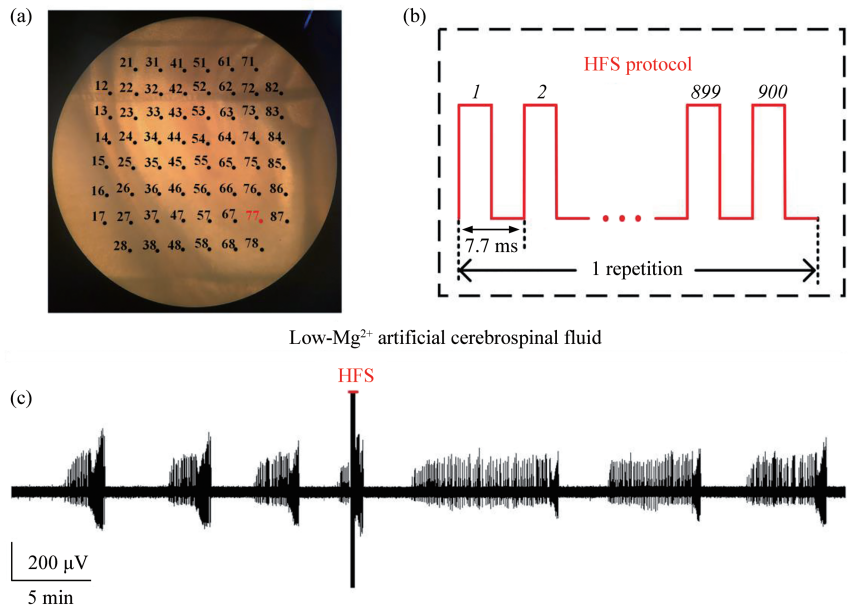


Fig. 4 High-frequency stimulation of hippocampal CA3 region

(a) One hippocampal slice of 2-week-old SD rat laying on MEA. (b) High-frequency stimulation protocol, a total of 900 cycles, the duration of each cycle is 7.7 ms, and the percentage of duty cycle in the square wave is 50%. (c) The electrophysiological signals of the recorded brain slices were amplified step by step.

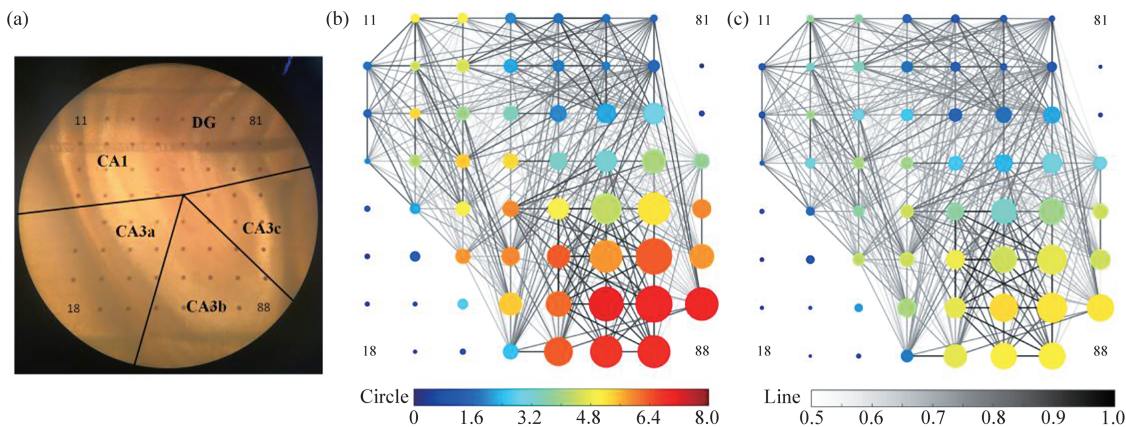


Fig. 5 Neural network discharge analysis of hippocampal slices

(a) The hippocampal slice of a 2-week-old SD rat was placed on the MEA. DG, CA1, and CA3 were labeled, and the CA3 region was equally divided into three subfields (CA3a, CA3b, and CA3c). (b, c) Contrast of the firing frequency, amplitude, and correlation coefficient of action potentials before and after HFS.

Table 1 Comparison of action potential firing frequencies in different regions of hippocampus before and after stimulation

Area	Spike rate/Hz		Amplitude/ μ V	
	Pre-HFS	Post-HFS	Pre-HFS	Post-HFS
CA1	5.24 $\pm$ 1.14	4.36 $\pm$ 0.84	91.83 $\pm$ 17.02	73.64 $\pm$ 16.84
CA3a	7.28 $\pm$ 1.36	5.96 $\pm$ 1.41	154.50 $\pm$ 30.74	123.27 $\pm$ 31.67
CA3b	7.64 $\pm$ 1.74	6.04 $\pm$ 1.28	296.83 $\pm$ 17.98	224.84 $\pm$ 22.94
CA3c	6.82 $\pm$ 1.68	5.44 $\pm$ 1.07	205.64 $\pm$ 57.04	164.14 $\pm$ 41.73
DG	2.44 $\pm$ 0.78	2.13 $\pm$ 0.64	80.72 $\pm$ 16.90	68.04 $\pm$ 13.48

本研究对电刺激后癫痫样放电的起始位置以及传播方向和速率进行研究分析(图6)。电刺激后癫痫样放电依然起始于CA3区, 且分别向DG区和CA1区传播。这表明电刺激并没有改变癫痫样放电的起始位置和传播方向。另一方面, 对比电刺激前

后癫痫样放电在顺行传输和逆行传输时的传输速度发现, 电刺激没有明显地改变其传输速度。这也从侧面验证了电刺激对脑片自身的信息传输没有显著性影响, 说明电刺激并不是通过阻断脑片的神经传输功能从而达到抑制效果的。

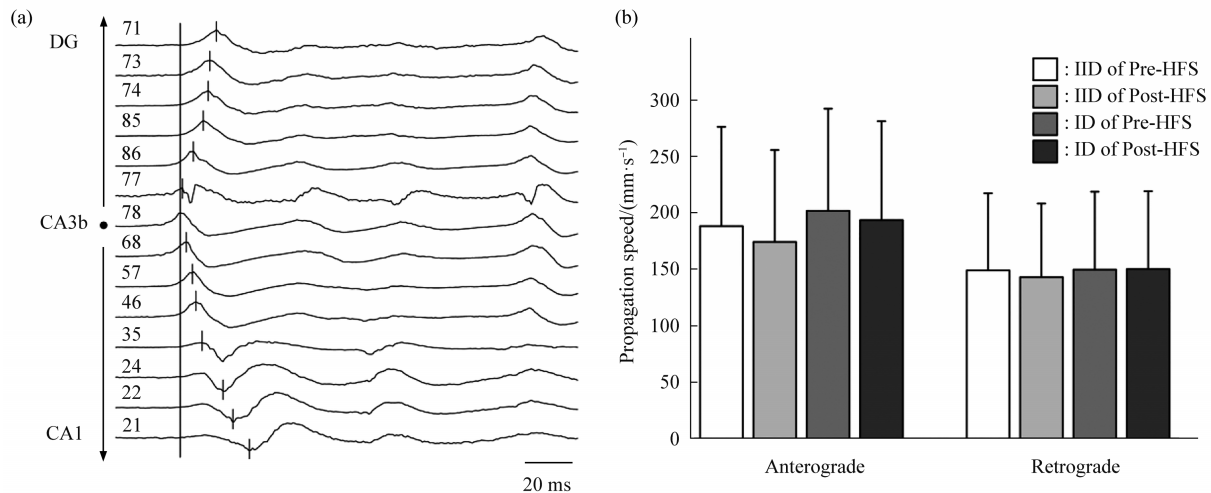


Fig. 6 Effect of high-frequency stimulation on transmission rate

(a) The initiation of synchronous field potentials at recording sites along stratum pyramidale from CA3b to CA1 distal region. (b) Comparison of the transfer rate of IID and ID before and after HFS.

将记录到的场电位信号以 HFS 为时间节点分为 Pre-HFS 和 Post-HFS 两组, 对两组信号的 IID 与 ID 各项参数进行统计分析(图7)。IID 出现的频率增长了 248.76% (图7a), 然而电刺激对 IID 的幅值却没有显著性的影响(图7b)。同时, 本研究分析了 6 个脑片上 IID 出现的频率均出现增长 (220.73 ± 47.69)%。定义 Pre-HFS 和 Post-HFS 两组中前一段发作期的 ID 结束时间到后一段发作期的 ID 起始时间为潜伏时间, 同一段发作期中 ID 的起始时间到结束时间为持续时间。统计结果显示: 在电刺激后 ID 的潜伏时间增长了 47.62% (图7c), 持续时间降低了 21.09% (图7d), 峰值降低了 30.40% (图7e)。在其他 5 个脑片上也得到了类似的结果, 其中 ID 的潜伏时间增长了 (57.96 ± 16.75)%, 持续时间减少了 (24.85 ± 10.33)%, 峰值降低了 (36.85 ± 15.01)%。

定义癫痫样放电 8~12 Hz 的低频成分为场电位的组成部分, 反映较大范围内同步化的突触活动; 100~150 Hz 频率范围内的成分为 ripples 振荡, 反映了相对较广范围内的同步化突触活动; 200~500 Hz 频率范围内的成分为 fast ripples (FRs) 高

频振荡, 反映了局部范围内的神经元发放动作电位的叠加^[26-27]。取海马切片的 CA3 区锥体层对应同一个电极点上记录的放电信号, 电刺激前后各取 7 次放电, 计算 8~12 Hz、100~150 Hz 及 200~500 Hz 的功率谱密度曲线下面积 (area under curve, AUC) 的均值, 然后对数据进行归一化处理。图 8b 是对图 8a 功率谱密度进行计算得出的结果; 在图 8b 的基础上, 计算电刺激前后各 5 次放电中 8~12 Hz、100~150 Hz 及 200~500 Hz 频段的 AUC, 归一化处理后, 电刺激对各频段的影响如图 8c 所示。结果显示: 电刺激后 8~12 Hz 的 AUC 均值仅下降了 3.78%, 与电刺激前无显著性差异; 100~150 Hz 的 AUC 均值下降了 34.09%, 具有显著性差异; 200~500 Hz 的 AUC 均值下降了 26.66%, 具有显著性差异。对其他 5 个脑片进行同样的计算分析, 结果显示: 8~12 Hz 的 AUC 均值下降了 (3.63 ± 2.71)%, 不具备统计学意义; 100~150 Hz 的 AUC 均值下降了 (30.86 ± 11.62)%; 200~500 Hz 的 AUC 均值下降了 (27.08 ± 8.75)%。这些结果表明, 在电刺激后, 海马脑片神经元的自发放电活动及神经元之间的突触活动被明显抑制。

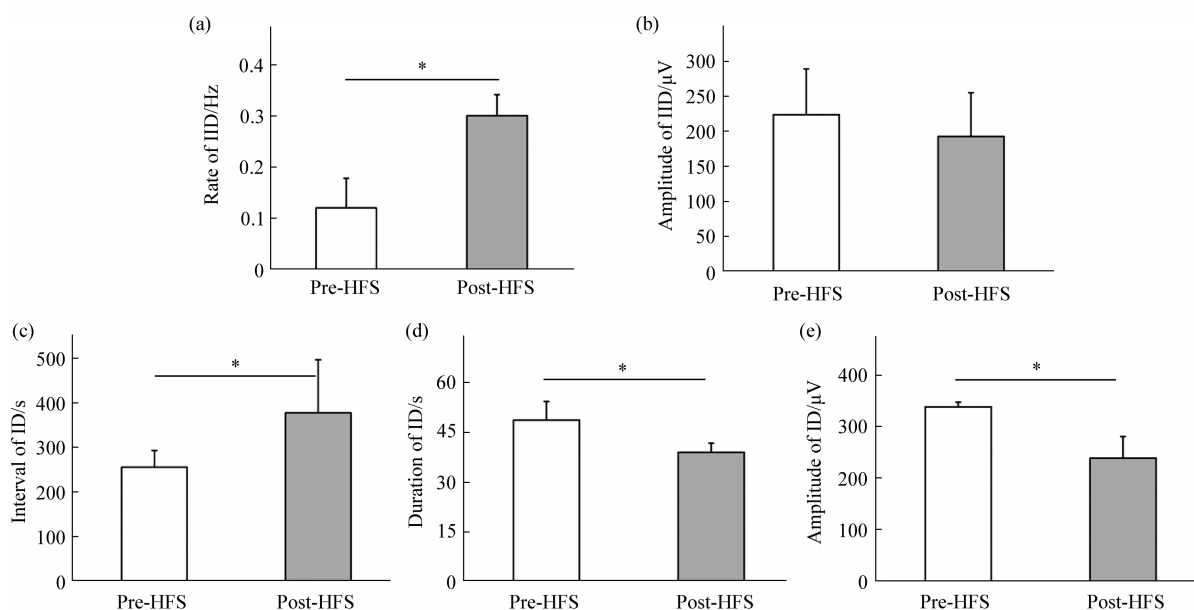


Fig. 7 Effect of high-frequency stimulation on epileptiform discharges

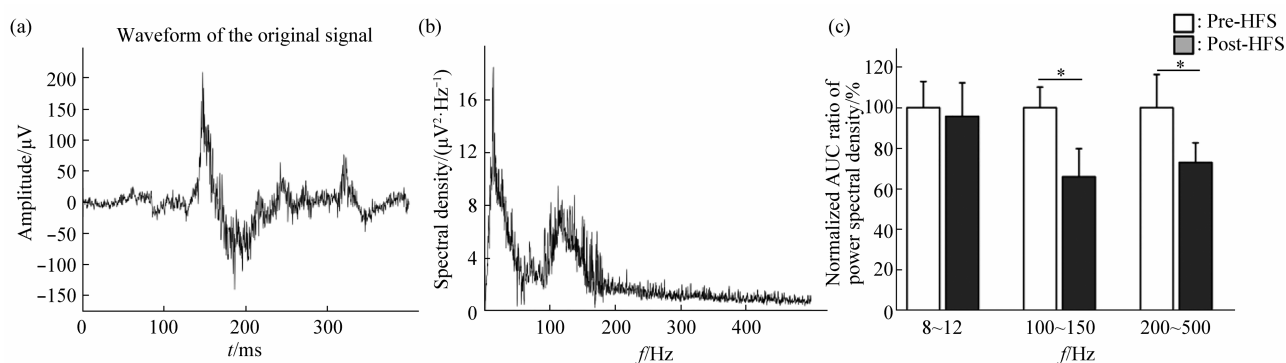


Fig. 8 Power spectral analysis of epileptiform discharges

(a, b) The original waveform and power spectral density of IID. (c) Modulation of the power spectrum of epileptiform discharges by HFS.

3 讨 论

癫痫发作的电生理本质是神经元异常同步放电, 机制十分复杂, 迄今为止还不能完全阐明. 目前比较公认的观点是中枢神经兴奋性传输系统与抑制性传输系统失衡. 兴奋性传输系统是以谷氨酸为主的兴奋性神经递质使细胞膜上的 Na^+ 、 Ca^{2+} 通道开放, 导致神经元去极化引起兴奋性突触后电位; 抑制性传输系统则是抑制性神经递质GABA作用于突触后膜的GABA_A受体, 促进 Cl^- 通道开放, 提高神经元的兴奋阈值. 正常情况下兴奋性传输系统与抑制性传输系统保持着动态平衡, 此时神经元产

生节律性的低频自发放电活动. 而当这种平衡被打破, 导致兴奋性传输系统被促进或抑制性传输系统被抑制时, 则会引起神经元过度去极化, 从而产生癫痫样放电. 使用高频电刺激治疗癫痫的作用机制目前仍在探究. 早在1952年就有人发现使用电刺激能够将患者从失控、狂暴状态恢复到温和、平静的“具有幸福感”的状态^[28]. 有人认为电刺激的作用机制是通过促进电刺激下游的神经细胞去极化并释放GABA从而抑制神经元的发放^[29]; 另一种观点是电刺激阻断了神经活动的传递, 从而抑制电刺激下游的神经组织^[30]; 还有观点认为电刺激抑制了刺激电极附近的所有脑组织, 包括轴突和神经

元, 且这种抑制作用随着距离的增加而削弱^[31]。

本文采用多电极记录实现对海马脑片较大范围和较长时间的癫痫样放电的检测与分析, 记录位点较多, 解决了电极数目不足带来的记录范围和精度问题, 且操作简单, 对研究海马神经元网络具有很大优势. 不仅可以观察癫痫样放电的起始位置, 还可以由各个电极点检测到的癫痫样放电时间差和空间距离研究时空特性. 利用电极阵列研究海马癫痫样放电的神经网络, 发现电刺激后幅值和动作电位的数量明显降低, 但是电极点之间的相关系数并没有发生明显变化. 这说明高频电刺激抑制癫痫样放电是通过某种方式激活了抑制性传输系统, 促使GABA_A受体被激活, Cl⁻大量进入神经元, 从而增大了细胞内外的电位差, 促使幅值降低, 且提高神经元兴奋阈值促使动作电位发放的数量减少. 高频电刺激对各个电极点之间的相关系数几乎没有影响, 说明海马区信号的传输功能并没有受到电刺激的影响. 动作电位的发放频率和幅值在CA3区向CA1区和DG区传递时出现不同程度衰减, 这也许与传输通路及传输距离有关. 而CA1区与DG区个别电极点之间也存在相关系数高的现象, 这可能是因为癫痫样放电从CA3分别传递至CA1和DG时, 由传输通路和传输距离共同导致的衰减作用效果相同导致的.

Wittner等^[32]将海马CA3区大致划分为CA3a、CA3b、CA3c三个区域, 并对豚鼠海马切片CA3区进行生理学和解剖学分析, 发现使用荷包牡丹碱致痫模型下豚鼠海马脑片的癫痫样放电起始于CA3a区并传递到CA3b区. 癫痫样放电的起始位点可能与致痫方式有关, Colom和Saggau^[33]分别对高钾、4-AP和BIC-PTX模型下豚鼠、小鼠和大鼠海马脑片癫痫样放电的起始位置进行了研究, 结果表明, 豚鼠的起始位置总是在CA2-CA3a区, 而小鼠和大鼠的起始位置主要集中在CA3b-CA3c区. CA3区的锥体神经元具有极高的内在兴奋性, 且CA3区的递归侧枝能够异化临近神经元的同步化活动^[34], 这可能是CA3区成为癫痫样放电的起始位点的原因. 这些研究虽然确定了癫痫样放电起始于CA3区, 但是并没有对传输速度和传递方向等进行报道. 本文研究结果显示, 高频电刺激对癫痫样放电的起始位点和传输速度并没有明显的影响, 说明电刺激仅仅是抑制了脑片的放电能力, 并不会损害脑片放电的机制, 且这种抑制并不是通过阻断神经活动的传递达到抑制效果的.

有研究显示, GABA_A受体与癫痫样放电密切相关, 其活性可抑制从IID到ID的转变^[35-36]. 本文结果表明, 电刺激后, 癫痫样放电中IID数量明显增多, 说明电刺激后癫痫样放电从IID到ID的过渡期明显增长. 推断电刺激抑制了IID向ID的转变, 进一步可以认为电刺激是通过某种方式促进了GABA_A受体的活性从而达到抑制癫痫的效果. 然而通过电刺激后每一簇ID放电前IID的数量来看, 电刺激抑制IID向ID转变的作用会随着时间逐渐减弱. 另一方面, 当GABA_A受体被激活, 导致Cl⁻大量进入胞内, 从而产生抑制作用^[37], 因此参与癫痫样放电的神经元数量减少, 导致记录到的ID幅值降低、潜伏时间增加、持续时间减少. 然而IID的幅值在电刺激后并没有被降低, 这也许与产生IID和ID的具体位置不同有关, 目前其机制并未完全阐明.

功率谱密度分析结果显示, 癫痫样放电成分在8~12 Hz和100~150 Hz两个频段出现峰值. 虽然200 Hz以上的成分较少, 但是有研究发现癫痫样放电的高频振荡主要集中在癫痫病灶附近的几个微电极上^[26, 38]. 高频振荡产生的基础是锥体神经元之间兴奋性连接的增强, 且高频振荡都发生在海马的CA3a区, 并通过CA1区单向传递到内嗅皮质区^[39], 提示高频振荡的起源和传播可能是癫痫发作的根本原因. 电刺激对8~12 Hz的AUC没有显著影响, 但是明显抑制了100~150 Hz和200~500 Hz的AUC. 由此可以推断电刺激抑制了海马神经元之间的兴奋性连接, 提示电刺激抑制了脑片的兴奋性传输系统. 然而电刺激是通过促进脑片的抑制性传输系统进而产生负反馈导致脑片的兴奋剂传输系统被抑制, 还是通过某种未知的方式产生的抑制效果, 目前并不能完全阐明.

参 考 文 献

- [1] Brodie M J, Shorvon S D, Canger R, *et al.* Commission on european affairs: appropriate standards of epilepsy care across europe. *Epilepsia*, 1997, **38**(11): 1245-1250
- [2] McCormick D A, Contreras D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annual Review of Physiology*, 2001, **63**(1): 815-846
- [3] 杨梅华, 吕胜青, 张琴, 等. 结节性硬化所致婴儿痉挛症脑电图特征及术前定位探讨. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2010, **9**(5): 388-392
Yang M H, Lv S Q, Zhang Q, *et al.* *Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research*, 2010, **9**(5): 388-392
- [4] Reynolds E H. Ilae/ibe/who global campaign "out of the shadows":

- global and regional developments. *Epilepsia*, 2001, **42**(8): 1094-1100
- [5] Gu L, Liang B, Chen Q, *et al.* Prevalence of epilepsy in the people's republic of China: a systematic review. *Epilepsy Research*, 2013, **105**(1-2): 195-205
- [6] Casetta I, Pugliatti M, Faggioli R, *et al.* Incidence of childhood and adolescence epilepsy: a community-based prospective study in the province of Ferrara and in Copparo, Italy, 1996-2005. *European Journal of Neurology*, 2011, **19**(2): 312-316
- [7] Lin Y, Wang Y. Neurostimulation as a promising epilepsy therapy. *Epilepsia Open*, 2017, **2**: 371-387
- [8] Zhuge Z B, Zhu Y Y, Wu D C, *et al.* Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex inhibits amygdaloid-kindled seizures in sprague-dawley rats. *NeuroScience*, 2007, **146**(3): 901-906
- [9] Wang S, Wu D C, Ding M P, *et al.* Low-frequency stimulation of cerebellar fastigial nucleus inhibits amygdaloid kindling acquisition in sprague-dawley rats. *Neurobiology of Disease*, 2008, **29**(1): 52-58
- [10] Wu D C, Zhuge Z B, Yu C Y, *et al.* Low-frequency stimulation of the tuberomammillary nucleus facilitates electrical amygdaloid-kindling acquisition in sprague-dawley rats. *Neurobiology of Disease*, 2008, **32**(1): 151-156
- [11] Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, *et al.* Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system. *Progress in Neurobiology*, 2002, **68**(3): 167-207
- [12] Andersen P, Bliss T V P, Skrede K K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research*, 1971, **13**(2): 222-238
- [13] Wyckhuys T, Smedt T D, Claeys P, *et al.* High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. *Epilepsia*, 2007, **48**(8): 1543-1550
- [14] Vonck K, Boon P, Achten E, *et al.* Long-term amygdalohippocampal stimulation for refractory temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 2002, **52**(5): 556-565
- [15] Vonck K, Boon P, Claeys P, *et al.* Long-term deep brain stimulation for refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2005, **46**(s5): 98-99
- [16] Pollo C, Villemure J G. Rationale, mechanisms of efficacy, anatomical targets and future prospects of electrical deep brain stimulation for epilepsy. *Acta Neurochir Suppl*, 2007, **97**(2): 311-320
- [17] Neil K, Sandeep M. Deep brain stimulation for seizure control in drug-resistant epilepsy. *Neurosurgical Focus*, 2018, **45**(2): E4
- [18] Liu J S, Gong X W, Gong H Q, *et al.* Exploring spatiotemporal patterns of epileptiform discharge in hippocampal slice using multi-electrode arrays. *Acta Physiologica Sinica*, 2010, **62**(2): 163-170
- [19] Yang F, Gong X W, Gong H Q, *et al.* Microelectrode array recordings of excitability of low Mg^{2+} -induced acute hippocampal slices. *Neural Regeneration Research*, 2010, **5**(20): 1548-1551
- [20] Wheeler B C, Novak J L. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1986, **33**(12): 1204-1212
- [21] Traub R D, Jefferys J G, Whittington M A. Enhanced NMDA conductance can account for epileptiform activity induced by low Mg^{2+} in the rat hippocampal slice. *Journal of Physiology*, 1994, **478**(3): 379-393
- [22] Dzhala V I, Staley K J. Transition from interictal to ictal activity in limbic networks *in vitro*. *The Journal of Neuroscience*, 2003, **23**(21): 7873-7880
- [23] Chen C, Chen L, Lin Y, *et al.* The origin of spontaneous synchronized burst in cultured neuronal networks based on multi-electrode arrays. *Biosystems*, 2006, **85**(2): 137-143
- [24] Harris K D, Hirase H, Leinekugel X, *et al.* Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron*, 2001, **32**(1): 141-149
- [25] 宫新伟, 杨帆, 刘建盛, 等. 应用多电极记录技术研究海马切片癫痫样放电的起始点和传播方向. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(11): 1240-1247
- Gong X W, Yang F, Liu J S, *et al.* *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2010, **37**(11): 1240-1247
- [26] Ylinen A, Bragin A, Nadasdy Z, *et al.* Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 1995, **15**(1): 30-46
- [27] Wang Y, Zhang L, Pan J, *et al.* Ripple-associated high-firing interneurons in the hippocampal CA1 region. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, **51**(2): 120-126
- [28] Heath R G. *Studies in Schizophrenia*. Cambridge: Harvard Univ Press, 1954: 42, 46-47, 50, 560
- [29] Wyckhuys T, Smedt T D, Claeys P, *et al.* High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. *Epilepsia*, 2007, **48**(8): 1543-1550
- [30] Jensen A L, Durand D M. Suppression of axonal conduction by sinusoidal stimulation in rat hippocampus *in vitro*. *Journal of Neural Engineering*, 2007, **4**(2): 1-16
- [31] Bassar P J. Cable equation for a myelinated axon derived from its microstructure. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 1993, **31**(S1): S87-92
- [32] Wittner L, Miles R. Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *Journal of Physiology*, 2007, **584**(Pt3): 867-883
- [33] Colom L V, Saggau P. Spontaneous interictal-like activity originates in multiple areas of the CA2-CA3 region of hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 1994, **71**(4): 1574-85
- [34] Traub R D, Miles R, Jefferys J G. Synaptic and intrinsic conductances shape picrotoxin-induced synchronized after-discharges in the guinea-pig hippocampal slice. *The Journal of Physiology*, 1993, **461**(1): 525-547
- [35] Chang Y Y, Gong X W, Gong H Q, *et al.* GABA_A receptor activity

- suppresses the transition from interictal to ictal epileptiform discharges in juvenile mouse hippocampus. *Neuroscience Bulletin*, 2018, **34**(6): 113-122
- [36] Wan L, Liu X, Wu Z, *et al.* Activation of extrasynaptic gabaareceptors inhibits cyclothiazide-induced epileptiform activity in hippocampal cal neurons. *Neuroscience Bulletin*, 2014, **30**(5): 866-876
- [37] Liu Q Y, Schaffner A E, Chang Y H, *et al.* Persistent activation of GABA(A) receptor/Cl(-) channels by astrocyte-derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 2000, **84**(3): 1392-1403
- [38] Anatol B, Istvan M, Charles L W, *et al.* Local generation of fast ripples in epileptic brain. *The Journal of Neuroscience*, 2002, **22**(5): 2012-21
- [39] Chrobak J J, Buzsáki G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, 1996, **16**(9): 3056-3066

Effect of High Frequency Electrical Stimulation on Epileptiform Discharge Characteristics in Rat Hippocampal Slices*

ZHANG Kang-Hui¹⁾, LI Cheng-Shuang¹⁾, DONG Lei²⁾, WANG Hui-Quan¹⁾, ZHENG Yu^{1)**}

¹⁾School of Life Sciences, Tiangong University, Tianjin 300387, China;

²⁾State Key Laboratory of Precision Measurement Technology and Instruments, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract In this paper, stable epileptiform discharges were induced on rat hippocampal slices by using the electrode array detection technique. To analyze and study the parameters of the hippocampal slices, the starting site of epileptiform discharges, the propagation direction and transmission rate, and the power spectral density of each frequency band during the inter-ictal discharges (IID) and ictal discharges (ID) when 130 Hz high-frequency stimulation (HFS) was applied to CA3 region. The results showed that HFS could effectively reduce the amplitude and duration of seizures, increase latency time, and inhibit the transition of epileptiform discharges from IID to ID. In conclusion, HFS resists epilepsy through promoting the inhibitory transmission system and resisting the excitatory connections between hippocampal neurons.

Key words high-frequency stimulation, epileptiform discharges, hippocampal slices, electrode array

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0273

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (62071329, 61871288), the National Science Foundation of Tianjin (20JCYBJC00130) and Space Medical Experiment Project of China Manned Space Program (HYZHXM03003).

** Corresponding author.

Tel: 86-18222128406, E-mail: zhengyu@tiangong.edu.cn

Received: July 30, 2020 Accepted: March 26, 2021