

扣带回前部内脏伤害感受神经元的生物电活动

吴敏范^{1)*} 吴春福¹⁾ 张桦²⁾ 滕国玺²⁾

(¹⁾沈阳药科大学药学院药理教研室, 沈阳 110016; ²⁾中国医科大学脑研究所神经生理研究室, 沈阳 110001)

摘要 为了从神经元水平探讨大脑皮层内脏伤害感受的特性及机制, 应用玻璃微电极细胞内电位记录技术, 研究 18 只猫扣带回前部 312 个神经元的自发生物电活动, 及其对电刺激同侧内脏大神经的诱发反应。其中, 82 个为内脏伤害感受神经元, 其自发生物电活动有 5 种主要形式。根据诱发反应的潜伏期等特性, 内脏伤害感受神经元分为特异性内脏伤害感受神经元 (76 个, 92.68%) 和非特异性内脏伤害感受神经元 (6 个, 7.32%)。内脏伤害性诱发反应分为兴奋性 (65.86%)、抑制性 (17.07%) 及混合性反应 (17.07%) 3 种。结果提示内脏大神经的传入通路投射到同侧扣带回前部; 扣带回前部神经元具有内脏伤害感受作用, 存有特异性与非特异性内脏伤害感受神经元, 为痛觉特异性学说提供了新的实验依据。

关键词 扣带回前部, 细胞内电位, 内脏痛, 伤害性感受神经元

学科分类号 Q424

在近年痛觉研究中, 扣带回前部 (anterior cingulate gyrus, ACG) 已成为关注的焦点。有人报道, ACG 存有躯体伤害性感受神经元^[1], ACG 在痛觉感受中有重要的作用^[2], 是痛觉的重要整合中枢^[3], 参与痛情绪的编码活动^[4]。但 ACG 与内脏痛觉的关系及其神经元的生物电活动特性尚未见报道。内脏痛觉主要由内脏大神经 (greater splanchnic nerve, GSN) 中的传入纤维传导。关于 GSN 传入路是否投射到同侧 ACG 尚未见报道。本文利用强电流刺激 GSN 作为内脏伤害性刺激, 用在体微电极细胞内电位记录技术, 记录 ACG 神经元细胞内电位反应, 验证 ACG 是否存有 GSN 代表区, 是否存有内脏伤害感受神经元, 并观察其生物电活动特性, 从单细胞机能特性的角度, 探讨内脏痛觉传导的皮层内感觉机制, 为 ACG 皮层在内脏痛觉感受中的作用提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康猫 18 只, 雌雄不拘, 体重 2.0~3.5 kg。

1.2 记录 ACG 神经元生物电活动

右前肢局麻条件下行静脉插管, 建立给药途径。戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 静脉麻醉, 暴露气管, 插入气管套管, 保持呼吸通畅或备人工呼吸。于左侧背部腹膜外暴露 GSN, 结扎其外周端, 于其中枢端放置双极银丝保护刺激电极 (极间距离 2.5 mm)。置神经蜡和明胶海绵以防止周围组织液使电短路并吸收体液, 防止神经干燥及刺激电流外溢。将头部

固定于立体定位仪, 参照 Snider 猫脑定位图谱^[5], 暴露左侧 ACG (AP: 17.0~19.0 mm; RL: 0.3~2.7 mm; H: 8.5~12.0 mm), 并用 50℃ 固定熔点的蜡覆盖脑表面以防脑干燥及脑波动。做小脑延髓池引流以降低脑压与减少脑波动。实验过程中, 动物是在不用肌松剂制动的自然呼吸条件下记录 ACG 神经元细胞内电位^[6], 每小时静脉注射 1% 戊巴比妥钠 1 ml 以补充麻醉药控制动物肢体的活动; 保持动物直肠温度在 37~38℃ 范围。

将尖端直径 $\leq 0.5 \mu\text{m}$ 、内充 3 mol/L KCl 溶液、电极电阻 30~50 M Ω 的玻璃微电极经推进器逐渐推入 ACG。当微电极插入神经元看到静息电位并待其稳定后, 电刺激 GSN (刺激参数为单脉冲方波, 强度 1.0 mA, 波宽 0.5 ms)。此刺激足以使 GSN 中 A δ 和 C 纤维兴奋, 产生瞳孔散大、血压升高等痛反应。观察诱发反应。重复刺激 3 次, 选反应稳定、静息电位绝对值 $\geq 40 \text{ mV}$ 、膜电位稳定 5 min 以上的神经元进行观察, 不符合条件者舍弃。将引导的细胞内电位经 MEZ-8201 生物电放大器输入 VC-10 示波器, 观察神经元的电活动同时做磁带记录, 再输入 ATAC-350 数据处理机处理, 并由 X-Y 记录仪描记实验结果。

1.3 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验统计处理, 统计学差异在 $P < 0.05$ 时被认为有显著性意义。

* 通讯联系人, 沈阳医学院生理学教研室, 沈阳 110034

Tel: 024-62215682, E-mail: minfanwu0594@sina.com.cn

收稿日期: 2002-04-17, 接受日期: 2002-05-29

2 结 果

实验共记录 312 个神经元的细胞内电位，静息电位 (resting potential, R_p) 平均值为 (-54.79 ± 15.65) mV。根据神经元对刺激 GSN 是否发生反应，分为刺激相关神经元即对刺激 GSN 产生诱发反应的神经元 (92/312, 29.49%)，与非相关神经元即不产生诱发反应的神经元 (220/312, 70.51%)。前者的 R_p 平均值 (-45.61 ± 7.08) mV 明显低于后者的 R_p 平均值 (-58.64 ± 16.65) mV ($P < 0.01$)。在 92 个相关神经元中，根据诱发反应的性质，将对伤害性刺激产生长潜伏期反应 (潜伏期 ≥ 50 ms)^[7] 的神经元，称为内脏伤害感受神经元 (visceral nociceptive neurons, VNNs, 占 89.13%)；仅产生短潜伏期反应 (潜伏期 < 50 ms) 的神经元，则称为内脏非伤害感受神经元 (non-visceral nociceptive neurons, NVNNs, 占 10.87%)。VNNs 又可分为仅产生长潜伏期反应的特异性内脏伤害感受神经元 (specific visceronociceptive neurons, SVNNs, 占 92.68%) 与既产生长潜伏期反应又产生短潜伏期反应的非特异性内脏伤害感受神经元 (non-specific visceronociceptive neurons, NSVNNs, 占 7.32%)^[8]。

2.1 VNNs 自发生物电活动的特性

由图 1 可见，不同 VNNs 的自发生物电活动形式不同，但主要有静息无放电 (占 60.98%)、突触

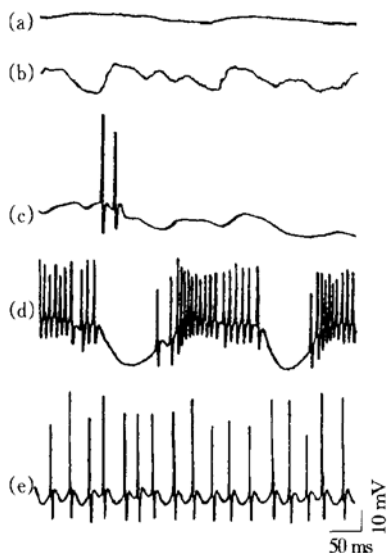


Fig. 1 Modes of spontaneous biological electric activities of VNNs in ACG

(a) no-discharges in resting state. R_p : -59 mV; (b) synaptic activities. R_p : -47 mV; (c) occasional discharges. R_p : -54 mV; (d) rhythmic high frequency discharges. R_p : -65 mV; (e) continuous tonic discharges. R_p : -53 mV.

电活动 (占 14.63%)、偶发性锋电位放电 (占 7.32%)、紧张性锋电位放电 (占 14.63%) 和节律性高频放电 (占 2.44%) 等 5 种模式。VNNs 自发放电频率各异，低频放电频率为 1~12 次/s，高频放电频率为 20~60 次/s；自发放电幅值为 15~60 mV。

2.2 阈强度

根据 NSVNNs 对不同强度刺激 GSN 产生反应的观察，发现刺激强度为 0.3~0.4 mA 时，NSVNNs 只产生短潜伏期诱发反应，随刺激强度的增加，产生长潜伏期诱发反应，当强度达到 0.5~0.6 mA 以上时，诱发反应不再变化 (图 2)，说明内脏痛伤害性反应阈值为 0.5~0.6 mA。本实验均采用 1.5 倍阈上电流刺激 GSN 作为内脏痛伤害性刺激。

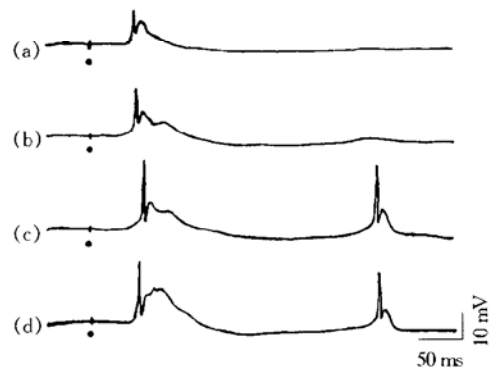


Fig. 2 Evoked responses of NSVNNs to different intensity of GSN stimulus

(a) 0.3 mA; (b) 0.5 mA; (c) 0.7 mA; (d) 1.0 mA.

•: artifact of stimulation.

2.3 VNNs 诱发反应的特性

2.3.1 VNNs 诱发反应的形式：同一 VNNs 基本相同，但不同 VNNs 的反应形式不同，可分为兴奋性反应 (65.86%)、抑制性反应 (17.07%) 及混合性反应 (17.07%) 三类。兴奋性反应包括刺激 GSN 诱发的兴奋性突触后电位 (EPSP)、或其上锋电位发放、或诱发锋电位、或原有自发放电频率的增加，即增频反应。抑制性反应包括抑制性突触后电位 (IPSP)、或锋电位抑制、或原有自发放电频率的降低，即减频反应。混合性反应包括先兴奋后抑制或先抑制后兴奋，即 EPSP-IPSP 序列或 IPSP-EPSP 序列等 (图 3)。

2.3.2 VNNs 诱发反应的潜伏期：同一 VNNs 的诱发反应潜伏期较为恒定，但不同 VNNs 的不尽相

同。按照潜伏期的长短, 诱发反应可分为 4 种: 第一种为短潜伏期反应, 其潜伏期在 20~ 45 ms 之间, 平均值为 (23.33 ± 5.77) ms ($n = 6$); 第二种的潜伏期在 50~ 95 ms 之间, 平均值为 (63.96 ± 11.13) ms ($n = 48$); 第三种的潜伏期在 100~ 200 ms 之间, 平均值为 (147.08 ± 40.37) ms ($n = 24$); 第四种的潜伏期在 205~ 370 ms 之间, 平均值为 (275.63 ± 51.37) ms ($n = 16$), 后三种为长潜伏期反应。不同的 VNNs 可有一种或多种不同的诱发反应。

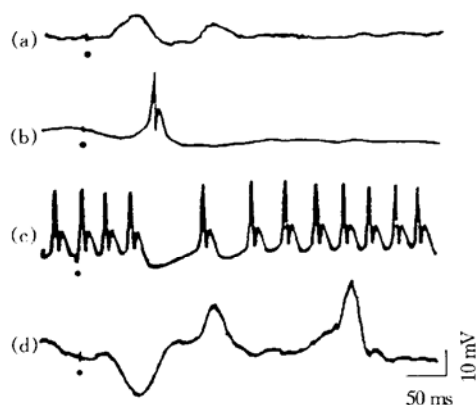


Fig. 3 Various patterns of responses in different VNNs evoked by stimulating GSN

(a) double EPSPs; (b) single spike; (c) discharges discontinued by IPSPs; (d) single IPSP-double EPSPs. •: artifact of stimulation.

2.4 静脉注射吗啡对 VNNs 诱发反应的影响

静脉注射吗啡 1 mg/kg 体重, 2 min 后, 长潜伏期兴奋性反应消失, 28 min 后, 反应恢复; 而短潜伏期的诱发反应不被吗啡抑制。共观察 5 例。说明 VNNs 长、短潜伏期的诱发反应是由 GSN 中不同类型神经纤维传导的不同性质的反应; 长潜伏期的诱发反应属于伤害性反应, 而短潜伏期的诱发反应为非伤害性反应。

3 讨论

3.1 ACG 存有 GSN 代表区和 VNNs

GSN 中传导速度不同的纤维, 在脊髓的不同部位上行, 到达中枢神经系统的不同区域^[9]。猫 GSN 中传导速度不同的纤维投射到丘脑后腹核的不同单位^[10]。目前, 还没有见到关于 GSN 投射到同侧 ACG 的报道。本实验利用电刺激 GSN, 在同侧 ACG 记录到潜伏期不同的诱发反应, 说明 GSN 的传入通路间接投射到同侧 ACG, ACG 存有 GSN

代表区。诱发反应潜伏期的不同, 可能与 GSN 中不同直径、不同传导速度的纤维兴奋, 及中枢内存有结构与功能不同的突触有关。说明 GSN 中不同类型的纤维投射到 ACG 不同的神经元。有些神经元对电刺激 GSN 产生多种不同潜伏期的诱发反应, 说明 GSN 中不同类型的纤维会聚性地共同投射于同一 ACG 神经元。GSN 中传导痛觉的纤维为 A δ 纤维和 C 纤维。根据神经元反应潜伏期及刺激与记录部位间的距离估算, 第二种潜伏期的反应可能由 GSN 中的 A δ 纤维兴奋所引起, 第三种和第四种潜伏期的反应可能由 GSN 中的 C 类纤维兴奋所引起。而第一种潜伏期的反应可能为非痛觉反应成分^[8, 11]。

有报道^[12], ACG 存有特异性与非特异性躯体伤害感受神经元。目前, 还没有见到关于 ACG 存有 VNNs 的报道。本文观察到电刺激 GSN 在 ACG 产生的诱发反应潜伏期长, 并产生散瞳等痛反应, 此反应可被吗啡抑制, 说明此反应具有内脏伤害感受性质, ACG 存有 VNNs。VNNs 分为 SVNNs 与 NSVNNs 两种类型。ACG 中 SVNNs 的被发现为痛觉的特异性学说提供了新的实验科学依据。

3.2 ACG VNNs 的生物电活动特性

ACG 神经元具有复杂的自发生物电活动。有些神经元显示跨膜电位自发去极化和超级化的阈下振荡, 即 EPSP 和 IPSP 所构成的突触噪声的变化, 而偶发放电是在突触噪声的基础上形成的。另一些神经元显示跨膜电位周期性去极化, 达到阈电位水平时便转变为动作电位, 从而形成规则的紧张性自发放电, 此种形式放电可能是维持大脑皮层兴奋性的基础, 用以及时反应突触冲动的传入。而神经元本身兴奋性的周期性变化^[13], 或神经元接受兴奋性和抑制性冲动的交替传入, 可能是节律性高频放电形成的机制^[14]。

长期以来, 国内外常用刺激外周神经在中枢神经系统记录神经元诱发反应的方法进行痛觉研究, 并按神经元诱发反应潜伏期的不同, 进行反应分类^[15]。杨焕乔等^[7]观察了刺激腓神经在猫丘脑束旁核神经元的诱发反应, 反应分为短潜伏期反应 (20~ 40 ms)、长潜伏期反应 (> 50 ms)、短-长潜伏期反应及自发放电抑制反应 4 种类型。后三类反应属于痛反应。本实验结果与此类似: VNNs 长潜伏期的诱发反应具有阈值高、易受吗啡抑制的特点, 表明该反应具有伤害性反应的性质。而 NSVNNs 和 NVNNs 中的短潜伏期诱发反应, 兴奋

阈值低,且不易被吗啡抑制,推测其可能与非伤害性冲动有关。

电刺激 GSN 在 ACG 产生的诱发反应比较复杂,主要表现为兴奋性、抑制性和混合性反应三种形式。类似的反应在猫 S I 区、S II 区等部位的神经元都观察到^[16,17]。它们可能是感觉传入通路中大脑皮层神经元对伤害性刺激反应的主要形式。不同的神经元只有通过不同的神经网络才表现出不同的生物电活动^[18]。因此我们推测:与 ACG VNNs 相联系的神经网络比较复杂,VNNs 在内脏痛觉感受及调制中的作用比较复杂。SVNNs 对强刺激起反应,可能伺服伤害信息的感受;而 NSVNNs 对弱刺激也能产生反应,可能与痛觉产生的警觉和情绪反应有关^[19]。

总之,本实验结果提示,GSN 传入纤维投射到同侧 ACG。ACG 存有 VNNs,分为 SVNNs 和 NSVNNs 两种。该结果为痛觉特异性学说提供了新的理论资料,但仍需形态学资料的进一步证实。

参 考 文 献

- 1 Sikes R W, Vogt B A. Nociceptive neurons in area 24 of rabbit cingulate cortex. *J Neurophysiol*, 1992, **68** (5): 1720~ 1732
- 2 Talbot J D, Marrett S, Evans A C, *et al.* Multiple representations of pain in human cerebral cortex. *Science*, 1991, **251** (4999): 1355~ 1358
- 3 Melzack R, Dennis S G. Neurophysiological foundation of pain. In: Sternbach R A, ed. *The Psychology of Pain*. New York: Raven Press, 1978. 1~ 26, 96~ 103
- 4 Rainville P, Duncan G H, Price D D, *et al.* Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*, 1997, **277** (5328): 968~ 971
- 5 Snider R S, Niemer W T. *A Stereotaxic Atlas of The Cat Brain*. Chicago: University of Chicago Press, 1961.
- 6 Kang R, Herman D, Macgillis M, *et al.* Convergence of sensory input in somatosensory cortex: interactions from separate afferent sources. *Exp Brain Res*, 1985, **57** (2): 271~ 287
- 7 杨焕乔, 杨振荃. 猫丘脑束旁核神经元对电刺激外周神经与动脉注射缓激肽的放电反应. *生理学报*, 1987, **39** (5): 523~ 529
- 8 陈京红, 滕国玺. 胞内记录猫皮层体感区内脏伤害感受神经元电生理特性. *生理学报*, 1999, **51** (1): 31~ 37
- 9 Amassian V E. Fiber groups and spinal pathways of cortically represented visceral afferents. *J Neurophysiol*, 1951, **14** (3): 445~ 460
- 10 Mcleod J G. The representation of the splanchnic afferent pathways in the thalamus of the cat. *J Physiol*, 1958, **140** (3): 462~ 478
- 11 沙 磊, 丁 伟, 滕国玺. 皮层体感 I 区神经元对伤害性电刺激脏总神经的反应. *针刺研究*, 1992, **17** (3): 151~ 155
- 12 Sha L, Ding W, Teng G X. *Acupuncture Res*, 1992, **17** (3): 151~ 155
- 12 Yamamura H, Iwata K, Tsuboi Y, *et al.* Morphological and electrophysiological properties of ACCx nociceptive neurons in rats. *Brain Res*, 1996, **735** (1): 83~ 92
- 13 Linas R R. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: Insights into central neurons system function. *Science*, 1988, **242** (4486): 1654
- 14 Shepherd G M, Koch C. Introduction to synaptic circuits. In: Shepherd G M, ed. *The Synaptic Organization of The Brain*. 3rd, London: Oxford University Press, 1990. 1~ 31
- 15 Hubert K R, James A H, George F G. Response characteristics of cat spinothalamic tract neurons to splanchnic nerve stimulation. *Brain Res*, 1984, **291** (2): 383~ 387
- 16 Follett K A, Dirks B. Characterization of responses of primary somato-sensory cerebral cortex neurons to noxious visceral stimulation in the rats. *Brain Res*, 1994, **56** (1): 27~ 32
- 17 Follett K A, Dirks B. Responses of neurons in ventrolateral orbital cortex to noxious visceral stimulation in the rat. *Brain Res*, 1995, **69** (2): 157~ 162
- 18 Jahnsen H, Llinás R. Electrophysiological properties of guinea pig thalamic neurons: an *in vitro* study. *J Physiol*, 1984, **349** (1): 205~ 226
- 19 Craig A D J R, Kniffki K D. Spinothalamic lumbosacral laminar cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol (London)*, 1985, **365** (1): 197~ 221

Biological Electric Activities of Visceral Nociceptive Neurons in Cat Anterior Cingulate Gyrus Revealed by Intracellular Recording Techniques

WU Min-Fan^{1)*}, WU Chun-Fu¹⁾, ZHANG Hua²⁾, TENG Guo-Xi²⁾

¹⁾ Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

²⁾ Laboratory of Neurophysiology, Brain Research Institute, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract To explore the cerebral cortex mechanism of visceral nociceptive sensation and its characteristics on the cell level with intracellular recording techniques, spontaneous biological electric activities and evoked responses of neurons in anterior cingulate gyrus (ACG) to stimulating ipsilateral greater splanchnic nerve (GSN) in 18 cats were investigated. Among 312 neurons, 82 were visceral nociceptive neurons (VNNs), which mainly having five patterns of spontaneous biological electric activities. According to the characteristics of the evoked responses, VNNs were classified into specific visceral nociceptive neurons (SVNNs, 92.68%) and non-specific visceral nociceptive neurons (NSVNNs, 7.32%). Modes of the evoked responses could be excitatory (65.86%), inhibitory (17.07%), or mixed ones (17.07%). The results suggest that ACG may be one of the representative areas of the ipsilateral GSN afferent pathway, and there exist two kinds of VNNs in ACG, which may be differently involved in pain modulation. The results may provide new experimental data for specific theory of pain.

Key words anterior cingulate gyrus, intracellular recording, visceral pain, nociceptive neuron

* Corresponding author (Department of Physiology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China).

Tel: 86-24-62215682, E-mail: minfanwu0594@sina.com.cn

Received: April 17, 2002 Accepted: May 29, 2002