

高频电刺激改变神经元锋电位的波形*

朱玉芳 封洲燕** 王兆祥 余颖 郭哲杉

(浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 生物医学工程教育部重点实验室, 杭州 310027)

摘要 为了正确检测和研究高频电刺激(high frequency stimulation, HFS)期间神经元的动作电位发放活动, 进而深入揭示深部脑刺激治疗神经系统疾病的机制, 本课题研究 HFS 期间锋电位波形的变化. 在麻醉大鼠海马 CA1 区的输入神经通路 Schaffer 侧支上, 施加 1~2 min 时长的 100 或者 200 Hz 顺向高频刺激(orthodromic-HFS, O-HFS), 利用微电极阵列采集刺激下游神经元的多通道锋电位信号, 并获得由 O-HFS 经过单突触传导激活的中间神经元的单元锋电位波形及其特征参数. 结果表明, O-HFS 使得锋电位的幅值明显减小而半高宽明显增加, 以基线记录为基准计算百分比值, O-HFS 期间锋电位的降支幅值和升支幅值分别可减小 20%和 40%左右, 半高宽则增加 10%以上. 并且, 在大量神经元同时产生动作电位期间, 或者在比 200 Hz 具有更大兴奋作用的 100 Hz 刺激期间, 锋电位波形的改变更多, 幅值的减小可达 50%, 宽度的增加可达 20%. 可以推测, 高频电刺激对于神经元的兴奋作用可能升高细胞膜电位, 从而改变细胞膜离子通道的活动特性, 导致动作电位波形的改变. 这些结果支持深部脑刺激具有兴奋性调节作用的假说, 对于正确分析高频电刺激期间神经元锋电位活动具有指导意义, 也为进一步研究深部脑刺激(DBS)治疗脑神经系统疾病的机制提供了重要线索.

关键词 深部脑刺激, 锋电位波形, 幅值, 半高宽, 群峰电位, 兴奋性

学科分类号 R338, R318

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0142

深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)对于帕金森氏症、肌张力障碍和震颤等脑神经系统疾病的控制具有独特的疗效^[1-2], 同时对于某些药物难以治疗的癫痫等病症的调控也具有令人瞩目的应用前景^[3-4]. 但是, DBS 研究的关键问题之一——电刺激对于其作用区域的神经元究竟是兴奋还是抑制, 依然没有定论^[5]. 有些研究表明, DBS 可以增加受刺激部位神经元的动作电位发放^[6]. 另有研究表明, DBS 可以减少和抑制神经元的活动, 或者通过增强抑制性突触的功能, 来降低神经网络的兴奋性, 从而阻碍兴奋活动的传递和扩散^[7-8]. 还有研究表明 DBS 可以诱发受刺激神经元及其网络产生新的同步活动, 来取代并消除病态的神经元发放模式, 从而抑制异常的病理性活动^[9-10]. 可见, DBS 可能具有兴奋、抑制和调制等多种作用, 亟待深入研究来揭示其中的机制. 要明确 DBS 对于神经元活动的作用和影响, 必须正确地获取相关数据, 跟踪 DBS 期间各个神经元的动作电位发放情况.

利用微电极阵列技术, 可以在脑组织同时记录和检测多个神经元的细胞外动作电位, 即锋电位(spike)^[11]. 根据动作电位产生的“全或无”特性以及来自同一个神经元的锋电位的相似性, 可以甄别和研究各个神经元的动作电位发放活动^[12]. 但是, DBS 通常采用高频电刺激(high frequency stimulation, HFS). 在检测和识别 DBS 期间的锋电位信号时, 除了需要消除大幅值刺激伪迹的影响之外^[13], 还要考虑刺激期间锋电位波形的动态变化. 已有文献提到, DBS 会导致锋电位的幅值减小, 减小的程度甚至可能达到折半^[14]. 而且, 随着 DBS 的持续, 这些变化具有动态特性^[14-15]. 但是, 对于 DBS 期间锋电位波形的变化特性至今还没有深入

* 国家自然科学基金(30970753)和国家重点基础研究发展计划(973计划)(2011CB504400)资助项目.

** 通讯联系人.

E-mail: fengzhouyan@139.com

收稿日期: 2016-04-22, 接受日期: 2016-06-16

的研究报道。

为了正确获取 DBS 期间的神经元活动信息, 本文将研究高频电刺激期间海马区神经元锋电位的波形变化规律。由于脑内海马区是难治性颞叶癫痫的常见病灶部位, 常用于 DBS 治疗癫痫的研究^[3, 16], 因此, 以海马区作为研究对象, 研究大鼠海马 CA1 区的输入神经纤维通路 Schaffer 侧支上施加 HFS 时, 神经元单细胞锋电位的变化。本文的研究结果不仅有助于 HFS 期间锋电位的正确检测和识别, 还可以为揭示 DBS 的作用机制提供重要的线索。

1 材料与方法

1.1 动物手术和神经电信号记录

实验数据采集自成年 Sprague-Dawley 大鼠 (240~330 g, 购于浙江省医学科学院实验动物中心), 共 8 只。用 1.25 g/kg 乌拉坦的剂量, 腹腔注

射麻醉大鼠之后, 将其固定于大鼠脑立体定位仪上。在鼻骨上钻两个小孔安放参考电极和接地电极, 并在头部去除部分颅骨, 用于植入记录电极和刺激电极。

记录电极采用美国 NeuroNexus Technologies 公司(Ann Arbor, MI 48108, USA)生产的 16 通道微电极阵列(型号为 Poly2)。刺激电极使用美国 FHC 公司(Bowdoin, ME 04287, USA)生产的双极同心电极(型号为 CBCSG75)。

电极植入位置如图 1 所示。记录电极植入到海马 CA1 区胞体层, 定位于前囟后 3.5 mm, 旁开 2.7 mm, 由大脑皮层表面逐渐向下推进约 1.8~2.3 mm, 直至记录到稳定发放的 CA1 区神经元锋电位。刺激电极植入到大脑海马 CA1 区的输入通路 Schaffer 侧支, 定位于前囟后 2.2 mm, 旁开 2.0 mm, 深度约 2.5~3.0 mm。

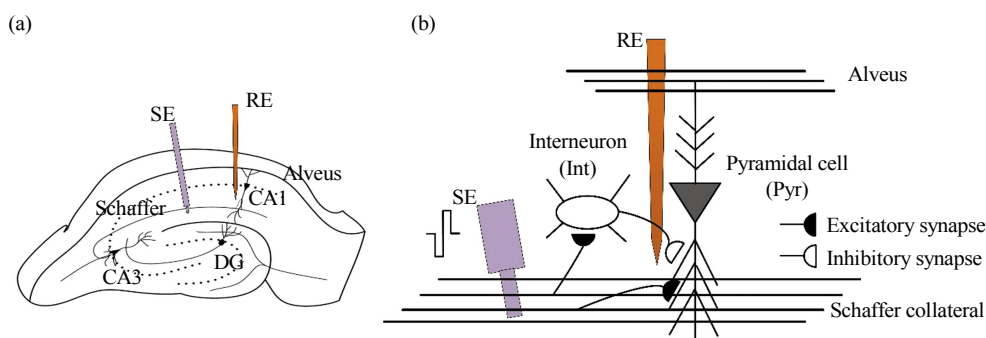


Fig. 1 Schematic diagram of electrode placements and neuronal network in rat hippocampus

(a) Locations of the stimulation electrode (SE) in the Schaffer collaterals and the recording electrode (RE) in the CA1 pyramidal layer of rat hippocampus. (b) Afferent fibers (i.e., Schaffer collaterals) innervate of pyramidal cells (Pyr) and interneurons (Int) in the CA1 neuronal network.

海马 CA1 区的主神经元(即锥体神经元)排列紧密, 从上至下清晰地分成基树突层、胞体层和顶树突层等结构。Schaffer 侧支上的电脉冲刺激可以在各个结构层次上诱发出独特的突触电位和群峰电位波形。根据 16 通道微电极阵列记录的电刺激诱发波形的变化, 可将刺激电极和记录电极微调至正确的位置^[17]。

记录电极采集的神经电信号首先通过 3600 型 16 通道放大器(A-M Systems Inc.)放大 100 倍, 频率范围设为 0.3~5 000 Hz, 然后用 PowerLab 数据采集系统(AD Instruments Inc.)以 20 kHz 的采样频率进行 A/D 转换, A/D 转换分辨率为 16 位。最后将采样数据存入硬盘, 用于离线分析。

刺激信号为 0.1 ms 宽度的双相恒流脉冲, 由 2100 刺激隔离器(A-M Systems Inc.)产生。高频刺激的脉冲频率为 100 Hz 或 200 Hz, 刺激电流的强度为 0.1~0.5 mA。

1.2 锋电位的检测和分类

本文使用测量点双列排布的型号为 Poly2 电极阵列, 记录海马 CA1 区胞体层的电信号, 并利用电极上 4 个相邻通道所记录的 4 通道信号来检测锋电位。为了获得 HFS 期间来自单细胞的单元锋电位(single unit spikes), 首先要去除宽频带(0.3~5 000 Hz)记录信号中的刺激伪迹和低频局部场电位(local field potential, LFP), 然后再进行锋电位检测和分类。下面分别介绍这些信号处理的方法。

去刺激伪迹: 利用斜率阈值法识别记录信号中刺激伪迹的起始点, 然后将此起始点开始的 0.5 ms 长度的数据作为伪迹去除, 并用线性插值法计算得到的新数据替换被去除的数据^[18]. 由于 0.1 ms 窄脉冲所产生的刺激伪迹的斜率绝对值远大于神经电信号, 因此, 可以方便地选择合适的阈值, 正确检出刺激伪迹, 无误检和漏检.

去 LFP: 对于已去刺激伪迹的信号, 利用 LabChart 7 软件(AD Instruments Inc.)的数字高通滤波器(截止频率为 500 Hz)去除低频 LFP, 即可获得多细胞产生的多单元信号(multiple unit activity, MUA).

锋电位的检测: 在 MUA 信号中利用多通道阈值法检测并提取锋电位波形^[19], 阈值设置为 MUA 信号标准差的 5 倍.

锋电位分类: 首先计算每个通道锋电位的幅值(下降支与上升支高度的平均值, 记为 Height)和第一主成分(the first principal component analysis, PCA1), 作为锋电位分类的特征量. 然后, 利用 SpikeSort3D 软件(Neuralynx Inc.), 使用 4 个通道的共 8 个特征量对锋电位波形进行聚类, 获得单元锋电位序列(single unit activity, SUA). 最后, 根据每类锋电位的波形特征以及锋电位发放的时间间隔直方图(inter spike interval, ISI), 将其甄别为锥体神经元(pyramidal cell, Pyr)或中间神经元(interneuron, Int)的锋电位^[20]. 本文研究中间神经元的锋电位在 HFS 期间的波形变化.

1.3 锋电位波形参数的定义和计算

在细胞外紧邻神经元胞体部位记录的锋电位波形呈现负峰形状, 主要由下降支(简称降支)和上升支(简称升支)构成, 两者分别对应于动作电位的去极化相和复极化相. 因此, 本文将分别计算锋电位叠加平均后波形的降支和升支高度, 称为降支幅值和升支幅值, 来研究锋电位波形的变化.

此外, 本文还采用锋电位的半高宽. 计算方式如下: 找到锋电位降支的中间位点, 以此为起点作水平直线, 找到与升支的交点, 两点之间的时间差, 即为锋电位的半高宽.

统计数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示. 百分比数值均是 HFS 刺激前的基线记录相应数据的比值. 采用 SPSS 19.0 软件的配对 *t* 检验(paired *t*-test)、单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Post hoc Bonferroni test 检验各组数据之间差异的显著性. *n* 表示实验次数、神经元个数或者锋电位个数.

2 结 果

2.1 高频刺激期间锋电位的聚类与甄别

在大鼠海马 CA1 区的输入通路 Schaffer 侧支上施加顺向高频脉冲刺激(orthodromic-HFS, O-HFS)时, 位于下游 CA1 区胞体层的记录电极可以采集到神经元的响应. 去刺激伪迹和高通滤波处理之后, 获得的 MUA 信号如图 2a 所示. 利用电极阵列上相邻 4 通道的记录信号, 经过锋电位检测和分类, 从图 2a 所示信号中获得 3 类锋电位, 即图 2b 所示的 Neuron 1、Neuron 2 和 Neuron 3. 这 3 个神经元的锋电位幅值(Height)在刺激期间都随时间变化(图 2b 左上角). 由于每类锋电位的变化在 4 个通道中保持一致, 都呈现幅值减小(图 2a), 因此, 仍然可以聚成同一类, 并且在 Height 与 PCA1 的二维聚类图中呈现连续的轨迹(图 2b 右上角), 表明类内的锋电位来自同一个神经元.

根据 HFS 前基线记录的锋电位波形宽度和发放的时间间隔直方图(图 2c)可以识别锥体神经元和中间神经元^[20]. 由于中间神经元兴奋阈值比较低, 容易被激活^[21], 而且, Schaffer 侧支上的 HFS 可以通过兴奋性的单突触传导, 直接作用于中间神经元(图 1b). 因此, 本文下面通过考察 CA1 区的中间神经元, 来研究锋电位波形在 HFS 期间的变化. 为了提高锋电位识别的可靠性, 所采用的中间神经元的锋电位幅值较大, 基线记录的幅值均大于 0.2 mV, 平均幅值为 (0.33 ± 0.13) mV ($n = 12$ 个中间神经元).

图 2d 所示是图 2a 信号所包含的某个中间神经元的锋电位波形变化. 可见, 4 个通道的锋电位在 HFS 期间均减小, 并且 HFS 初期包含群峰电位(population spikes, PS)时(图 2a), 锋电位波形的减小更显著. 刺激结束之后, 锋电位的波形又恢复至刺激前的水平, 表明锋电位波形的改变是由 HFS 引起的. 其中通道 3 的大幅值锋电位将用于定量分析.

2.2 高频刺激期间锋电位波形的变化

上述锋电位的检测和分类采用高通滤波得到的 MUA 信号. 为了避免高通滤波对于锋电位波形的影响^[22], 在下面定量分析锋电位波形变化时, 根据已分类锋电位的时间信息, 从原始宽频带记录信号中提取波形(图 3a). 如图 3b 所示, 2 min 时长的 100 Hz O-HFS 使得锋电位原始波形的幅值明显减小. 刺激前 30 s 基线记录的锋电位幅值为

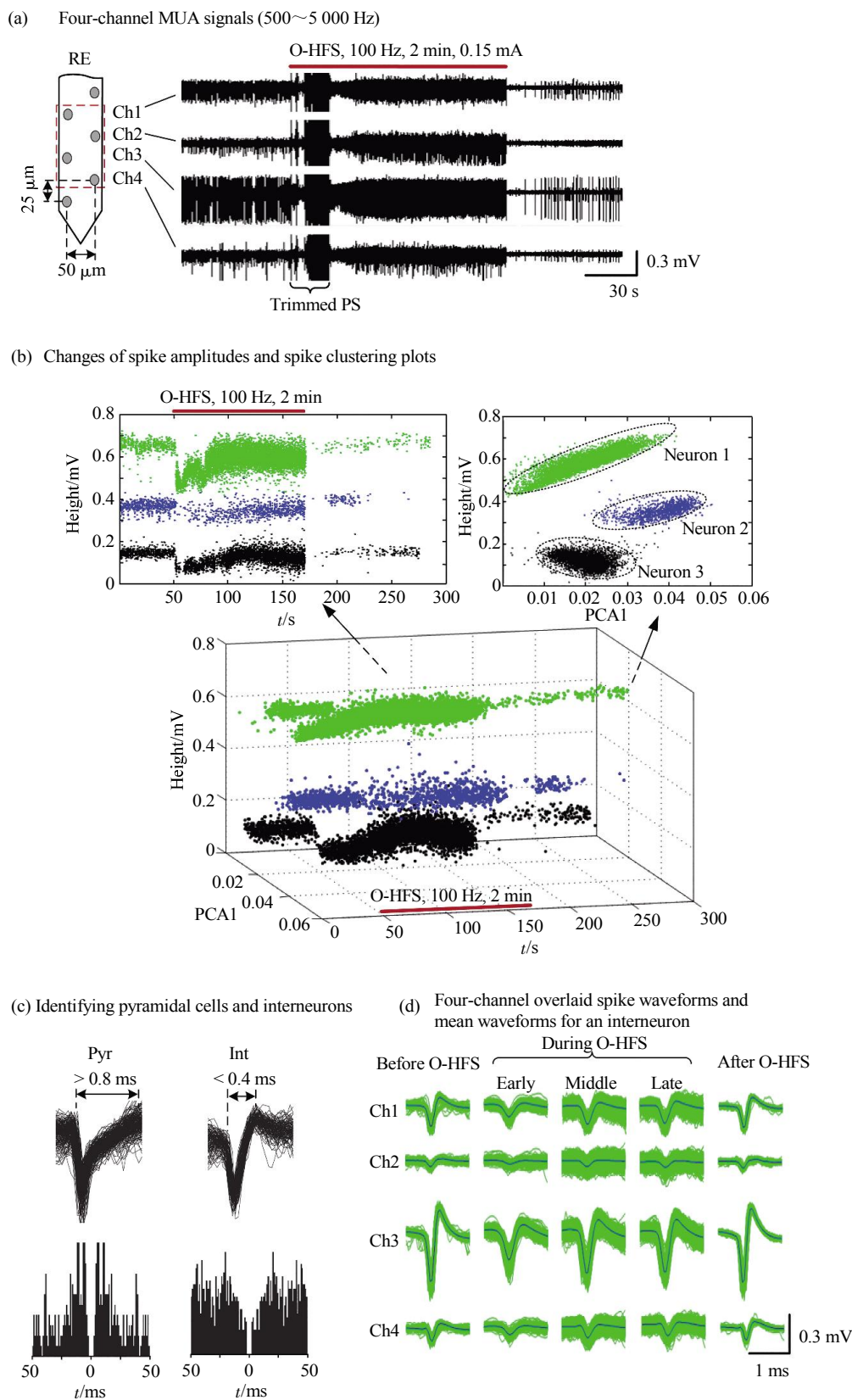


Fig. 2 Spike detecting and sorting during periods including O-HFS

(a) Four-channel multiple unit activity (MUA) obtained after stimulus artifact removing and high-pass filtering. (b) Plots of spike amplitudes (i.e., Height) of 3 sorted neurons against the coordinates of time and the first principal component analysis (PCA1). Red bars indicate the duration of 2 min 100 Hz O-HFS. (c) Identifying spikes from pyramidal cells (Pyr) and interneurons (Int) according to the widths of spike waveforms (up) and the histograms of inter-spike-intervals (down). (d) Four-channel overlaid spike waveforms and mean waveforms of an interneuron in the periods before O-HFS, during 2 min O-HFS and after O-HFS.

(0.54 ± 0.057) mV ($n = 236$ 个锋电位). 在 O-HFS 的前期 10 s 内(包含 PS 波)迅速减小至(0.19 ± 0.11) mV ($n = 247$ 个锋电位), 经过 60 s 后, 在 O-HFS 的后期 50 s 锋电位幅值为(0.42 ± 0.071) mV ($n = 4286$ 个锋电位). O-HFS 刺激结束后, 锋电位幅值恢复为(0.53 ± 0.05) mV ($n = 124$ 个锋电位). 可见, 在

HFS 期间锋电位幅值发生明显的变化, 且前期包含 PS 波时锋电位的幅值可减小 50% 以上.

比较 HFS 前与 HFS 期间的锋电位平均波形(图 3c), 可见, HFS 期间的锋电位不仅幅值变小, 而且波形的后正峰几乎消失, 波形宽度增加.

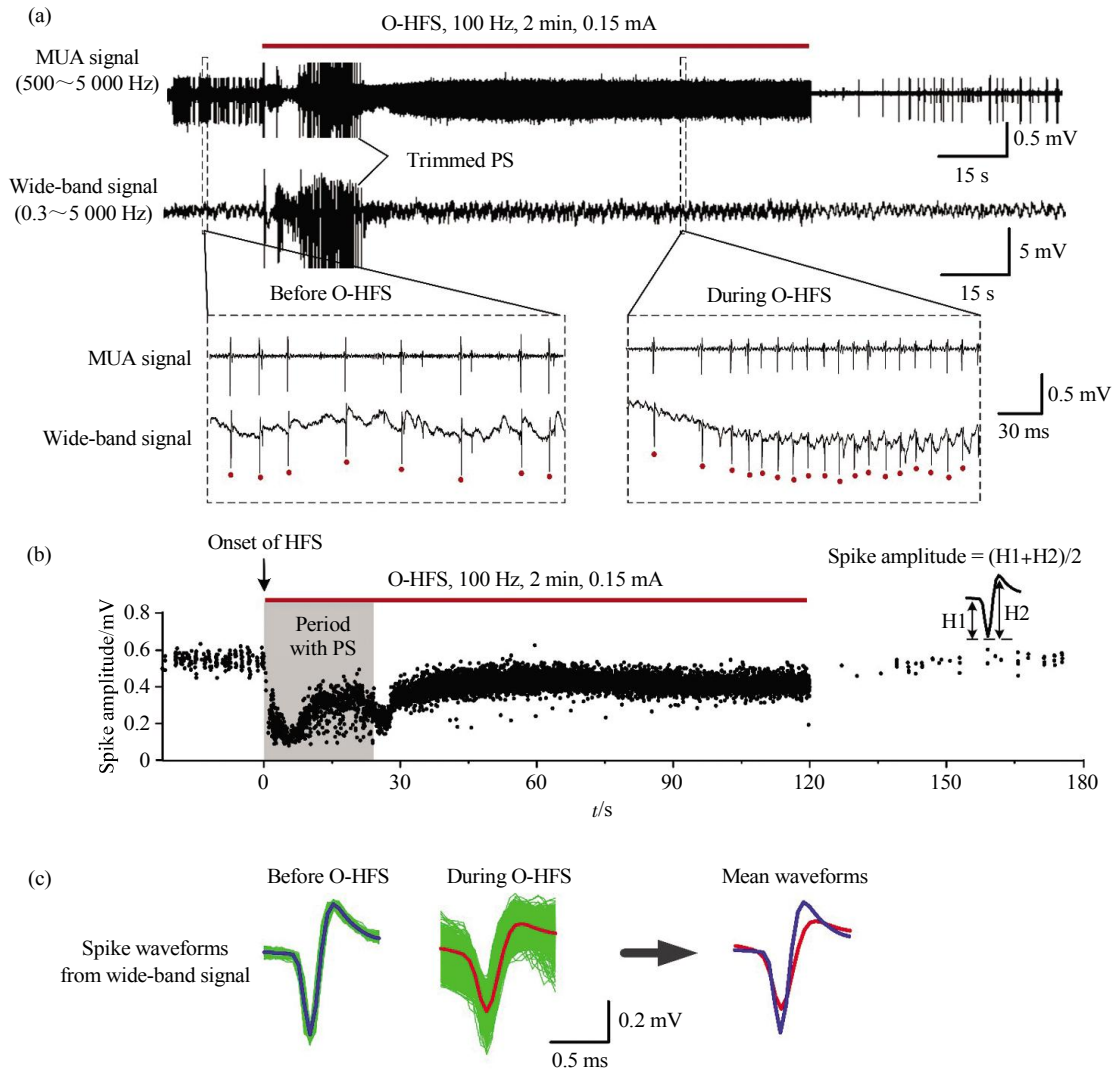


Fig. 3 Changes of spike waveforms during O-HFS

(a) Spikes in MUA signals and in corresponding wide-band signals. Red dots in the expanded insets indicate the spikes of a same neuron. (b) Changes of spike amplitudes of the wide-band signal during O-HFS. (c) Comparison of the overlaid spike waveforms and mean waveforms from the wide-band signal between the two periods: before O-HFS and during O-HFS.

8 只大鼠实验的统计数据表明(图 4a~c): 与刺激前相比较, 时长为 1 min 或 2 min 的 100 Hz O-HFS 刺激期间, 锋电位的降支幅值减小至(78.3 ± 15.2)%, 升支幅值减小至(60.7 ± 15.8)%, 半高宽则增至(116.2 ± 9.3)%. 这些变化都具有统计学意义

(one-way ANOVA, $F > 7$, $P < 0.002$; Post hoc Bonferroni test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元). 而且, 锋电位升支的降幅显著大于降支(paired t -test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元). HFS 结束后, 锋电位波形恢复, 与刺激前无显著差别.

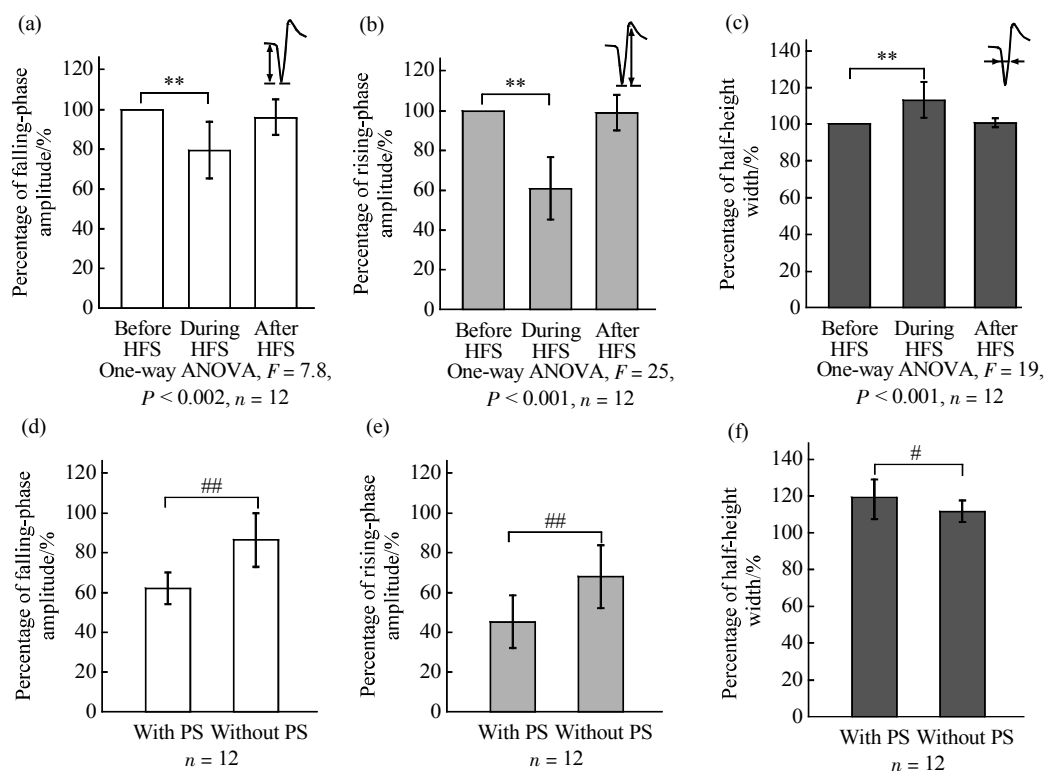


Fig. 4 Changes of spike waveform parameters induced by 100 Hz O-HFS

Percent ratios of falling-phase amplitudes (a), rising-phase amplitudes (b) and half-height widths (c) of spikes during different periods to the corresponding baseline values before HFS. The insets on the upper right corners indicate the definition of the spike parameters. Percent ratios of falling-phase amplitudes (d), rising-phase amplitudes (e) and half-height widths (f) of spikes during two different HFS periods with PS and without PS to the corresponding baseline values before HFS. ** $P < 0.01$, Post hoc Bonferroni test; ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$, paired t -test.

进一步将 HFS 期分为含有 PS 波的前期和无 PS 波的后期(图 4d~f), 那么, 在 PS 期间锋电位的降支幅值和升支幅值分别下降至 $(61.9 \pm 8.0)\%$ 和 $(45.7 \pm 13.2)\%$, 与无 PS 期间的 $(86.4 \pm 13.5)\%$ 和 $(68.2 \pm 15.7)\%$ 具有显著差异(图 4d, e, paired t -test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元). PS 期间锋电位的半高宽 $(118.4 \pm 11.1)\%$, 与无 PS 期间的半高宽 $(111.9 \pm 6.0)\%$ 也存在显著差异(图 4f, paired t -test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元). 可见, 神经元群体同时发放动作电位导致大幅值 PS 波时, 锋电位波形的变化更大.

2.3 不同频率高频刺激对于锋电位波形的影响

在 O-HFS 期间, CA1 区中间神经元的锋电位发放率显著增加(图 2a 和图 5a). 100 Hz O-HFS 期间, 发放率从刺激前的 (13.3 ± 3.8) counts/s 显著增加至 (59.4 ± 15.4) counts/s (paired t -test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元); 200 Hz O-HFS 期间, 发放率也

从刺激前的 (12.5 ± 4.5) counts/s 显著增加至 (27.1 ± 7.3) counts/s (paired t -test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元), 表明海马 CA1 区 Schaffer 侧支的 O-HFS 刺激对于下游神经元具有兴奋作用. 而且, 虽然两种频率 O-HFS 之前基线记录的神经元发放率无显著差异, 但是, 100 Hz 刺激期间神经元的发放率却显著高于 200 Hz 刺激期间 (paired t -test, $P < 0.01$, $n = 12$ 个神经元). 可见, 100 Hz 频率的刺激对于下游神经元的兴奋作用更强.

而且, 不同频率的刺激对于神经元锋电位波形的影响也不同. 虽然 100 Hz O-HFS 期间锋电位的降支幅值 $(78.3 \pm 15.2)\%$ 与 200 Hz 时的 $(76.0 \pm 12.5)\%$ 无显著差异, 但是, 100 Hz O-HFS 期间锋电位的升支幅值 $(60.7 \pm 15.9)\%$ 却显著小于 200 Hz 时的 $(70.5 \pm 14.4)\%$ (图 5b, paired t -test, $P < 0.05$, $n = 12$ 个神经元), 100 Hz O-HFS 期间锋电位的半高宽 $(116.2 \pm 9.3)\%$ 也显著大于 200 Hz 时的 $(109.6 \pm 5.3)\%$

(图 5c, paired t -test, $P < 0.05$, $n = 12$ 个神经元). 可见, 具有较大兴奋作用的 100 Hz 刺激对于锋电

位幅值和宽度的影响更大.

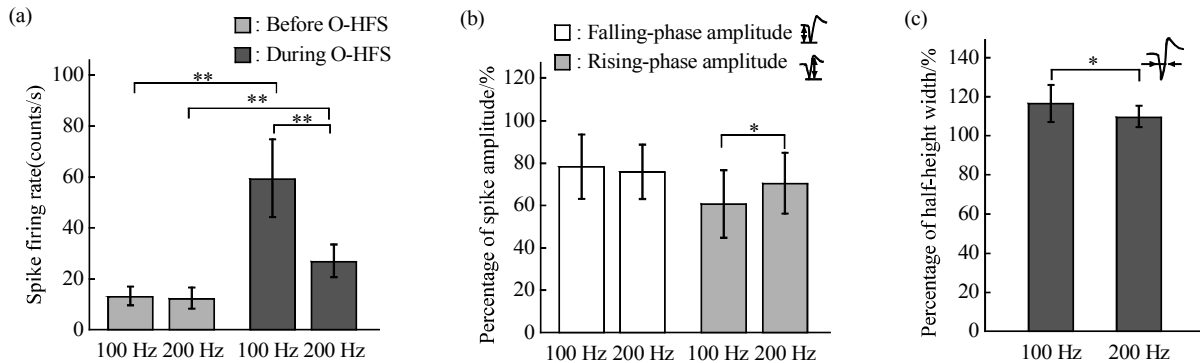


Fig. 5 Effects of O-HFS with different stimulation frequencies on spike firing rates and spike waveforms

(a) Comparisons of spike firing rates in the periods before O-HFS and during O-HFS (100 and 200 Hz). (b) Percent ratios of the spike amplitudes during O-HFS (100 and 200 Hz) to the corresponding values before O-HFS, including the amplitudes of falling-phase and rising-phase. (c) Percent ratio of the half-height widths of spike waveforms during O-HFS (100 and 200 Hz) to the corresponding values before O-HFS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, paired t -test, $n = 12$.

3 讨 论

本文的麻醉动物在体研究结果表明, 大鼠海马 CA1 区传入神经通路的高频脉冲刺激(HFS)可以使下游神经元的锋电位波形发生变化, 波形变宽、幅值变小, 特别是升支的幅值变小更多. 而且, 100 Hz 刺激期间比 200 Hz 刺激减小得更明显. 由于这些锋电位波形的变化在多通道记录信号中保持一致, 并且, 一旦 HFS 结束, 锋电位波形恢复刺激前的状态. 故可排除记录电极移位引起锋电位波形变化的可能性. 此外, 处于 HFS 前、中、后的锋电位在聚类图上形成连续的变化轨迹, 可以聚成同类锋电位(图 2b), 因此也不可能是来自不同神经元的锋电位. 我们推测锋电位波形在 HFS 期间发生的变化可能源于轴突电刺激对于下游神经元的兴奋作用.

前人的研究已表明, 高频刺激可以引起轴突传导的阻滞, 但是, 这种阻滞并不彻底, 残余的兴奋作用仍然可以到达下游神经元^[5, 23]. 本文 100 和 200 Hz HFS 期间神经元发放率均增加, 也证实了这点. 可以推测, 轴突上 HFS 的脉冲所诱发的这种持续的兴奋作用可以传导至轴突末梢, 不断激活突触(图 1b), 通过单突触的传递, 在突触后中间神经元上不断产生兴奋性突触后电位, 突触后电位的

电紧张扩布会影响细胞膜各种离子通道的状态, 从而改变动作电位波形.

细胞膜上包含 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 在内的多种离子通道, 动作电位的波形与这些离子通道的动态特性有关^[24]. 当细胞膜电位向去极化方向升高时, 会使得部分 Na^+ 离子通道进入失活状态^[25]. 这样, 由于参与的 Na^+ 离子通道数量的减少, 产生动作电位的幅值就会减小, 从而出现本文所示的锋电位幅值减小的现象(图 4). 此外, 细胞膜电位的升高还会导致 K^+ 离子外流增加, 使得胞外 K^+ 离子浓度升高, 降低细胞膜复极化的速度^[26], 导致锋电位的升支幅值减小更甚, 且波形变宽^[24]. 当然, 这些推测的证实还有待于进一步实际测量钾离子浓度等指标的改变.

本文的结果还表明, CA1 区下游神经元的兴奋性越高, 锋电位的波形改变越多. 在 HFS 的前期, 神经元的兴奋性较高, 存在大量神经元同步发放的大幅值 PS 波, 此时锋电位波形改变更多(图 4d~f). 而且, 100 Hz 与 200 Hz 的 HFS 相比较, 较低频率的 100 Hz 刺激所引起的轴突阻滞程度较小^[27], 对于下游神经元的兴奋作用较大, 因而, 锋电位波形改变也较多(图 5). 这些结果进一步表明, HFS 期间锋电位波形的改变可能由兴奋作用引起.

已有报道显示, 丘脑底核的高频电刺激会引起神经元锋电位波形的动态变化, 幅值的减小可达50%左右^[14-15]. 而本文的结果表明, 海马CA1区在高频刺激诱发群峰电位期间, 锋电位升支幅值的减小也可以超过50%(图4e), 并且, 锋电位波形的变化随着刺激期间神经元兴奋性的变化而动态变化. 这表明, 高频电刺激对于神经元动作电位波形的影响可能在各种脑区普遍存在. 此外, 本文进一步对于锋电位降支幅值、升支幅值和半高宽等参数进行深入分析, 并且对于HFS不同时期和不同刺激频率进行研究, 提出了锋电位波形改变的兴奋性作用机制, 支持DBS对于神经元具有兴奋性调制作用的假说^[28-29]. 此外, 本文的结果来自正常麻醉动物, 今后对于帕金森病和癫痫等模型动物的研究, 可以进一步揭示和验证深部脑刺激治疗神经系统疾病中轴突高频脉冲刺激的兴奋性作用机制.

4 结 论

本研究表明, 高频脉冲电刺激可以通过兴奋性作用使得神经元的动作电位波形发生变化, 幅值减小而宽度增加. 此结果为正确研究神经元在DBS期间的响应特性提供了方法上的指导, 也为进一步研究DBS治疗脑神经系统疾病的机制提供了线索.

参 考 文 献

- [1] Miocinovic S, Somayajula S, Chitnis S, *et al.* History, applications, and mechanisms of deep brain stimulation. *JAMA Neurol*, 2013, **70**(2): 163-171
- [2] Odekerken V J, Boel J A, Schmand B A, *et al.* GPI vs STN deep brain stimulation for Parkinson disease: Three-year follow-up. *Neurology*, 2016, **86**(8): 755-761
- [3] Fridley J, Thomas J G, Navarro J C, *et al.* Brain stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurosurgical focus*, 2012, **32**(3): E13
- [4] Thomas G P, Jobst B C. Critical review of the responsive neurostimulator system for epilepsy. *Med Devices: Evidence & Research*, 2015, **8**: 405-411
- [5] Udupa K, Chen R. The mechanisms of action of deep brain stimulation and ideas for the future development. *Prog Neurobiol*, 2015, **133**: 27-49
- [6] Reese R, Leblois A, Steigerwald F, *et al.* Subthalamic deep brain stimulation increases pallidal firing rate and regularity. *Exp Neurol*, 2011, **229**(2): 517-521
- [7] Lafreniere-Roula M, Kim E, Hutchison W D, *et al.* High-frequency microstimulation in human globus pallidus and substantia nigra. *Exp Brain Res*, 2010, **205**(2): 251-261
- [8] Chiken S, Nambu A. High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow through the pallidum by GABAergic inhibition. *J Neurosci*, 2013, **33**(6): 2268-2280
- [9] Medeiros D D C, Moraes M F D. Focus on desynchronization rather than excitability: A new strategy for intracranial electrical stimulation. *Epilepsy Behav*, 2014, **38**: 32-36
- [10] Florence G, Sameshima K, Fonoff E T, *et al.* Deep brain stimulation: more complex than the inhibition of cells and excitation of fibers. *Neuroscientist*, 2015, **27**(3): 726-739
- [11] Buzsáki G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci*, 2004, **7**(5): 446-451
- [12] Joshua M, Elias S, Levine O, *et al.* Quantifying the isolation quality of extracellularly recorded action potentials. *J Neurosci Methods*, 2007, **163**(2): 267-82
- [13] Heffer L F, Fallon J B. A novel stimulus artifact removal technique for high-rate electrical stimulation. *J Neurosci Methods*, 2008, **170**(2): 277-284
- [14] Hashimoto T, Elder C M, Okun M S, *et al.* Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neurosci*, 2003, **23**(5): 1916-1923
- [15] Moran A, Stein E, Tischler H, *et al.* Dynamic stereotypic responses of Basal Ganglia neurons to subthalamic nucleus high-frequency stimulation in the parkinsonian primate. *Front Syst Neurosci*, 2011, **5**(21): 1-11
- [16] Jin H, Li W, Dong C, *et al.* Hippocampal deep brain stimulation in nonlesional refractory mesial temporal lobe epilepsy. *Seizure*, 2016, **37**: 1-7
- [17] 封洲燕, 光磊, 郑晓静, 等. 应用线性硅电极阵列检测海马场电位和单细胞动作电位. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(4): 401-407
Feng Z Y, Guang L, Zheng X J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(4): 401-407
- [18] 封洲燕, 肖乾江, 胡振华. 电刺激期间神经细胞单元锋电位的检测. *中国生物医学工程学报*, 2013, **32**(4): 403-410
Feng Z Y, Xiao Q J, Hu Z H. *Chin J Biomedical Engineering*, 2013, **32**(4): 403-410
- [19] 王静, 封洲燕. 多通道神经元锋电位检测和分类的新方法. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(5): 641-647
Wang J, Feng Z Y. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(5): 641-647
- [20] Barthó P, Hirase H, Monconduit L, *et al.* Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *J Neurophysiol*, 2004, **92**(1): 600-608
- [21] Buzsáki G. *Rhythms of the brain*. New York: Oxford University Press, 2006: 61-79
- [22] 封洲燕, 王静, 汪洋, 等. 神经元锋电位信号滤波频率的选择. *浙江大学学报工学版*, 2012, **46**(2): 351-358
Feng Z Y, Wang J, Wang Y, *et al.* *J Zhejiang Univ Sci*, 2012, **46**(2): 351-358
- [23] Jensen A L, Durand D M. High frequency stimulation can block axonal conduction. *Exp Neurol*, 2009, **220**(1): 57-70
- [24] Gold C, Henze D A, Koch C. Using extracellular action potential recordings to constrain compartmental models. *J Comput Neurosci*, 2007, **23**(1): 39-58
- [25] Nicholls J G, Martin A R, Fuchs P A, *et al.* *From neuron to brain*.

- Fifth Edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 2012: 113–129
- [26] Meeks J P, Mennerick S. Selective effects of potassium elevations on glutamate signaling and action potential conduction in hippocampus. *J Neurosci*, 2004, **24**(1): 197–206
- [27] Feng Z Y, Zheng X J, Yu Y, *et al.* Functional disconnection of axonal fibers generated by high frequency stimulation in the hippocampal CA1 region *in vivo*. *Brain Res*, 2013, **1509**(7): 32–42
- [28] Montgomery E B Jr, Gale J T. Mechanisms of action of deep brain stimulation (DBS). *Neurosci Biobehav Rev*, 2008, **32**(3): 388–407
- [29] Dorval A D, Kuncel A M, Birdno M J, *et al.* Deep brain stimulation alleviates parkinsonian bradykinesia by regularizing pallidal activity. *J Neurophysiol*, 2010, **104**(2): 911–921

High Frequency Stimulation Changes The Waveforms of Neuronal Action Potentials*

ZHU Yu-Fang, FENG Zhou-Yan**, WANG Zhao-Xiang, YU Ying, GUO Zhe-Shan
(College of Biomedical Engineering and Instrumentation Science, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Education Ministry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract In order to detect and investigate neuronal firing activity during high-frequency stimulation (HFS), thereby to reveal the mechanisms of deep brain stimulation (DBS) in the treatment of neurological diseases, this project studied the changes of spike waveforms during HFS. Orthodromic-HFS (O-HFS) trains with a duration of 1~2 min and a frequency of 100 or 200 Hz were applied to the afferent fibers (*i.e.*, the Schaffer collaterals) of the hippocampal CA1 region of anesthetized rats. Multi-channel spike signals were recorded in the downstream area of HFS by a microelectrode array. The features of the spike waveforms, such as amplitude and half-height width, were extracted from the sorted unit spikes of interneurons activated by HFS through single synaptic transmissions. The results show that the spike amplitudes decreased and the half-height widths increased significantly during HFS. The percent ratios of the waveform features, compared to their baseline values, show that the amplitude of falling-phase and the amplitude of rising-phase decreased by ~20% and ~40%, respectively, while the half-height widths increased by more than 10%. In addition, the decrease of amplitudes (up to 50%) and the increase of half-height widths (up to 20%) were enhanced during synchronized firings of a large population of neurons or during the O-HFS trains of 100 Hz, a stimulation frequency causing greater excitation to neurons than 200 Hz. Presumably, the excitation of O-HFS could elevate the membrane potentials of downstream neurons and change the kinetics of the ionic channels of the membrane, thereby result in the waveform changes of action potentials. The results support the hypothesis that DBS has excitatory modulation effect on neurons. The study provides guidance for accurately analyzing neuronal unit spike activity during high-frequency stimulation and also provides important clues for revealing the mechanisms underlying the treatment of brain diseases by DBS.

Key words deep brain stimulation, spike waveforms, amplitude, half-height width, population spike, excitability

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0142

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30970753) and National Basic Research Program of China (2011CB504400).

**Corresponding author.

E-mail: fengzhouyan@139.com

Received: April 22, 2016 Accepted: June 16, 2016