

神经元对于高频电刺激的动态响应*

黄璐 封洲燕** 王兆祥

(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 深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)在许多神经系统疾病的临床治疗上都展现出良好的应用前景,然而,其作用机制尚不明确。常规 DBS 采用高频刺激(high frequency stimulation, HFS)的脉冲序列,这种窄脉冲最容易激活神经元结构中的轴突部分,通过轴突的投射,将 HFS 的作用传播至下游神经元。因此,为了探讨 DBS 的作用机制,并鉴于海马脑区是治疗癫痫和痴呆等疾病的重要靶点,我们研究了海马区轴突 HFS 对于下游神经元的作用。对麻醉大鼠的海马 CA1 区传入神经通路 Schaffer 侧支施加 1 min 的 100 Hz 高频刺激,记录并提取下游 CA1 区锥体神经元和中间神经元的单元锋电位。计算锋电位的发放率,以及它们与刺激脉冲之间的锁相值(phase-locking value, PLV)和潜伏期,以定量分析 HFS 期间神经元动作电位发放的变化趋势。结果显示,在传入轴突上施加 HFS 时,初期会诱发下游神经元群体同步产生动作电位(即群峰电位)。在 HFS 后期(群峰电位消失之后),两类神经元的单元锋电位发放仍然持续,并且发放率较稳定。但是,锋电位与刺激脉冲之间的锁相性逐渐减弱、潜伏期逐渐延长。而且,与中间神经元相比较,锥体神经元锋电位的锁相性更弱、潜伏期更长。这些结果表明,持续的轴突 HFS 可以诱导下游神经元产生非同步的活动,高频脉冲刺激引起的不完全轴突传导阻滞可能是导致该现象产生的主要原因。本文的研究为揭示脑刺激的作用机制提供了重要信息。

关键词 高频刺激, 单元锋电位, 潜伏期, 锁相性, 动态变化

学科分类号 R338, R318

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0360

深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)通过植入相关脑区的电极施加 100 Hz 左右的电脉冲高频刺激(high frequency stimulation, HFS),可用于控制和治疗多种神经系统疾病和精神疾病。例如, DBS 已广泛用于临床治疗帕金森病,并且在肌张力障碍、难治性癫痫、难治性抑郁症、阿尔茨海默病等治疗上也展现出良好的应用前景^[1-4]。与药物干预和手术切除病灶组织等其他治疗方法相比, DBS 具有起效迅速、效果可逆、副作用小、参数可调等优点,因而在临床和脑科学研究领域都受到广泛关注和重视。然而, DBS 所采用的 HFS 的作用机制至今尚未完全明确^[5],这阻碍了 DBS 应用的快速发展和推广。

早期的研究认为, HFS 会抑制目标神经元的发放或者使目标神经元失活^[6-7]。然而许多研究表明,在 HFS 期间,下游神经元并非处于静息状态,有时它们的动作电位发放甚至比电刺激前的基础水平还要高^[8-10]。还有研究表明, HFS 可以改变受刺激

区域内轴突纤维的功能,产生不完全的轴突传导阻滞,而 HFS 中包含的电脉冲又可以通过这种不彻底的传导阻滞,对下游神经元产生适当的兴奋作用,从而调制下游神经元产生非同步发放,取代病理性的同步发放^[11-13]。

相比于胞体、树突等神经元的其他组成部分,承担信息传导功能的轴突纤维在脑内空间的占比最大,而且轴突对于 HFS 中的窄脉冲刺激较敏感,兴奋阈值较低,更易被电刺激激活^[14]。因此, HFS 可能首先激活电极附近的轴突纤维^[15],然后,轴突将兴奋传导至末梢的突触,再经过突触的传递间接地激活下游神经元群体^[16-17],由此将刺激的作用投射至广泛的脑区。DBS 治疗的有效 HFS 频率范围

* 国家自然科学基金资助项目(30970753)。

** 通讯联系人。

E-mail: fengzhouyan@139.com

收稿日期: 2017-09-14, 接受日期: 2018-01-22

是 80 ~ 185 Hz^[18]. 这种高频刺激的初期, 轴突等神经元的组成部分还能够跟上刺激节奏. 但是, 随着刺激的持续, 轴突、突触等结构的功能可能发生变化^[13, 17], 出现障碍, 如轴突传导阻滞等. 因此, 神经元产生的动作电位与刺激脉冲之间的关系会随着刺激时间的延续而改变, 即下游神经元对于 HFS 的响应可能存在动态变化. 研究这种动态过程有助于深入了解 DBS 的作用机制, 也可以为 DBS 新刺激模式的开发提供信息. 因此, 本文在体研究大鼠海马 CA1 区神经元对于传入轴突纤维上 HFS 的动态响应.

在 CA1 区的传入轴突纤维 Schaffer 侧支上施加 100 Hz 的 HFS^[19], 考察锥体神经元(pyramidal cell)和中间神经元(interneuron)的动作电位, 即单元锋电位(single unit activity, SUA)的发放情况. 探讨的问题是: 随着 HFS 的进行, 位于刺激下游的两类神经元所产生的锋电位与刺激脉冲之间的关系(即锁相性和潜伏期)的变化.

由于海马脑区与学习记忆、情绪控制和毒品成瘾等密切相关, 是癫痫、阿尔茨海默病等疾病的常见病灶区, 因此, 海马脑区的电刺激研究对于开发治疗某些神经系统疾病(如难治性癫痫、记忆障碍、抑郁症、药物成瘾等)的 DBS 新技术具有重要意义^[3-4, 20-21].

1 材料与方法

1.1 动物手术与电极植入

雄性成年 Sprague-Dawley 大鼠 16 只(体重 240 ~ 360 g, 购自浙江省医学科学院实验动物中心). 腹腔注射乌拉坦(urethane, 1.25 g/kg)麻醉后, 固定于大鼠脑立体定位仪上. 切开头部皮肤, 除去部分颅骨以置入电极^[11, 22].

记录电极(recording electrode, RE)采用美国 NeuroNexus Technologies 公司生产的 16 通道微电极阵列(2 × 8 线性双列, 记录位点间距 50 μ m), 植入至海马 CA1 区, 定位于前囟后 3.5 mm, 旁开 2.7 mm, 由皮层表面向下约 2.5 mm, 直至记录到明显的 CA1 区锋电位信号为止. 顺向刺激电极(orthodromic stimulating electrode, OSE)采用美国 FHC 公司的同芯双极不锈钢电极, 植入至记录电极上游的 CA1 区输入通道(即轴突纤维束 Schaffer 侧支), 用于施加高频脉冲刺激. 定位于前囟后 2.2 mm, 旁开 2.0 mm, 由皮层表面向下约 2.8 mm. 根据 OSE 上施加单脉冲刺激时在 RE 上记录到的

顺向诱发群峰电位(population spike, PS)的波形, 微调两电极至最佳位置^[23].

1.2 信号采集与刺激模式

记录电极采集的信号经 16 通道放大器(3600 型, A-M Systems Inc., 美国)放大 100 倍(频率范围设定为 0.3 ~ 5 000 Hz), 然后使用 ML880 PowerLab 16/30 型多通道信号采集系统(ADInstruments Inc., 澳大利亚), 以 20 kHz 的采样率采样(A/D 转换分辨率为 16 位), 并将数据存入硬盘, 用于离线分析.

施加的电刺激是脉宽为 0.1 ms 的双相电流型脉冲, 由 3800 型刺激器(A-M Systems Inc., 美国)产生. HFS 的脉冲频率设定为 100 Hz, 刺激持续时间为 1 min, 刺激的电流强度设定为单脉冲刺激能够诱发的 PS 为最大幅值的 75%时的电流值, 约为 0.3 ~ 0.5 mA.

1.3 锋电位检测与分类

在 16 通道记录信号中, 选择位于 CA1 区胞体层的 4 路相邻通道所记录的信号来检测 HFS 期间的神经元锋电位. 信号处理过程与文献[12]相似, 简述如下: 首先, 应用线性插值法去除原始记录信号中的刺激伪迹(stimulation artifacts, SA)^[24]. 然后, 对去除 SA 后的宽频带信号(0.3 ~ 5 000 Hz)进行高通滤波, 截止频率设定为 500 Hz, 以去除低频的局部场电位(local field potential, LFP), 获得多单元锋电位信号(multiple unit activity, MUA). 最后, 应用阈值法检测 4 路 MUA 信号中的锋电位, 并提取锋电位的幅值等特征值用于分类, 进而获得单元锋电位信号.

海马 CA1 区胞体层记录到的锋电位来自锥体和中间两种神经元. 利用锋电位波形特征和发放特性来区分不同神经元的锋电位: 从宽频带记录信号中提取同类锋电位, 计算其平均波形的后半波的宽度. 若宽度大于 0.7 ms, 则归为锥体神经元的锋电位; 若宽度小于 0.4 ms, 则归为中间神经元的锋电位^[25]. 此外, 再根据基线记录时锋电位的发放特性进一步验证神经元类型: 锥体神经元为爆发式发放, 且发放率较低; 而中间神经元的发放则较均匀, 且发放率较高^[25].

1.4 数据处理和分析

为了研究 HFS 期间两种神经元锋电位的发放与刺激脉冲之间关系的动态变化, 本文将 1 min 时长的 HFS 分为前、后各 30 s. 其中, 前 30 s 内可能存在神经元的同步发放(即 PS 波), 会干扰单元锋电位信号的提取^[12], 因此, 在考察锋电位变化时,

本文分析 HFS 的后 30 s. 并将后 30 s 平均分为 3 个时区, 各 10 s. 分别计算这 3 个时区中锋电位的平均发放率, 并利用刺激后时间直方图 (peri-stimulus time histogram, PSTH)、锁相值和潜伏期, 来定量分析锋电位的发放与刺激脉冲之间的关系.

本文采用的 HFS 脉冲频率为 100 Hz, 因此, PSTH 的时间坐标为 0~10 ms, 分辨率为 0.05 ms (即原始信号的采样周期). PSTH 图呈现单峰分布, 为了定量描述此锋电位分布峰的集中程度, 计算 PSTH 中锋电位的锁相值 (phase-locking value, PLV), 其定义为^[26-27]:

$$PLV = \frac{1}{n} \left| \sum_{i=1}^n e^{j\alpha_i} \right| \quad (1)$$

式中, α_i 和 $e^{j\alpha_i}$ 分别是第 i 个锋电位发放时间点在 PSTH 周期中的相位角和单位矢量, $j = \sqrt{-1}$. n 为锋电位个数. PLV 无量纲, 取值为 0~1. PLV = 1 时, 表示锋电位与 HFS 的刺激脉冲完全锁相; PLV = 0 时, 表示锋电位的发放与 HFS 的刺激脉冲之间无锁相关系.

刺激脉冲在轴突上产生兴奋并导致下游神经元产生动作电位所需的时间称为锋电位的潜伏期. 利用 PSTH 数据可以计算每个锋电位与其前导脉冲之间的时间差, 但此时间差并不一定是潜伏期. 由于 HFS 期间刺激脉冲的周期性特点, 各神经元锋电位的平均潜伏期需要利用圆分布统计学的算法来计算^[28]. 也就是, 计算 PSTH 数据的圆分布平均角, 再将求得的角度转化为时间数值, 才能得到平均潜伏期. 此外, 如果由此计算获得的平均潜伏期小于 5 ms, 而且锋电位的 PSTH 波峰呈现跨周期分布, 那么, 则认为激发该锋电位发放的刺激脉冲不是本周期的前导脉冲, 而是再前一个脉冲, 因此, 将该神经元的潜伏期数值增加一个周期的时长 (即 10 ms).

文中统计数据均表示为“均值 ± 标准差”. HFS 期间锥体和中间两种神经元数据之间差异的显著性用 t 检验来评价; 而 HFS 期间不同的 2 个时区数据之间差异的显著性则用配对 t 检验来评价.

此外, 为了直观显示 HFS 期间锋电位发放与刺激脉冲之间的关系随时间发生变化, 本文还采用二维彩色光栅图来描述各个神经元的锋电位发放序列在 100 Hz 刺激的 10 ms 周期中的分布. 光栅图的两个坐标分别是 HFS 的持续时间 (0~60 s) 和刺

激脉冲的周期 (0~10 ms). 图中每条“光栅”序列是每秒 HFS 所包含的 100 个刺激周期的叠加, 光栅点的颜色表示该点上锋电位的个数.

2 结 果

2.1 轴突高频电刺激调节下游神经元的活动

与已有研究结果相似^[11-12], 在海马 CA1 区的 Schaffer 侧支上施加 1 min 时长的 HFS (图 1a), 在 HFS 起始的数秒内会诱发下游神经元同步发放动作电位, 从而产生大幅值的 PS 活动 (图 1b 上图). 而随着 HFS 的持续, PS 逐渐消失, 但是, 多单元锋电位信号 (MUA) 继续存在 (图 1b 下图). 这表明 HFS 的刺激脉冲不再同步诱发神经元群体产生动作电位. 下面研究 PS 消失后神经元发放的锋电位与刺激脉冲之间关系的变化.

图 1c 所示是二维光栅图, 显示了图 1b 信号中某个中间神经元在 HFS 的脉冲间隔间的锋电位发放分布. 可见, PS 活动刚消失时 (约 HFS 的 15 s 时, 图 1c~e 红色虚线所示), 锋电位的发放较集中, 发放率为 84 spikes/s, 锋电位与刺激脉冲之间的锁相比较明显 (PLV=0.99), 且潜伏期较短 (5.4 ms). 在 HFS 的后续 15~60 s 期间, 发放率较稳定 (图 1c 红色曲线), 而 PLV 逐渐减小 (图 1d), 且潜伏期逐渐延长 (图 1e). 在 HFS 的 50~60 s 期间, 锋电位平均发放率为 (76.3 ± 5.8) spikes/s; 锁相值 PLV 为 (0.96 ± 0.01) , 潜伏期为 (6.7 ± 0.1) ms, $n = 763$ 个锋电位.

此结果表明, 随着输入轴突上 HFS 的持续, 下游神经元的动作电位发放与刺激脉冲之间的锁相性会逐渐减弱, 而潜伏期则逐渐延长. 由于下游 CA1 区的局部神经网络中存在两类神经元, 即兴奋性的锥体神经元和抑制性的中间神经元, 且两者响应兴奋性输入的阈值不同, 中间神经元的阈值较低^[29]. 为了揭示它们对于 HFS 响应的差别, 下面分析和比较两者的锋电位发放在 HFS 期间的变化规律.

2.2 高频刺激期间锥体神经元和中间神经元锋电位发放的动态变化

本文在 16 只大鼠的实验中共分析了 66 个锥体神经元和 20 个中间神经元的锋电位. 在 1 min 时长的 100 Hz HFS 期间, 避开前 30 s 可能出现 PS 活动的时区. 在 HFS 的后 30 s 内, 两种神经元的平均发放率均高于基线期 (表 1). 为了考察此 30 s 内神经元的发放与 HFS 之间的关系是否随时间变化,

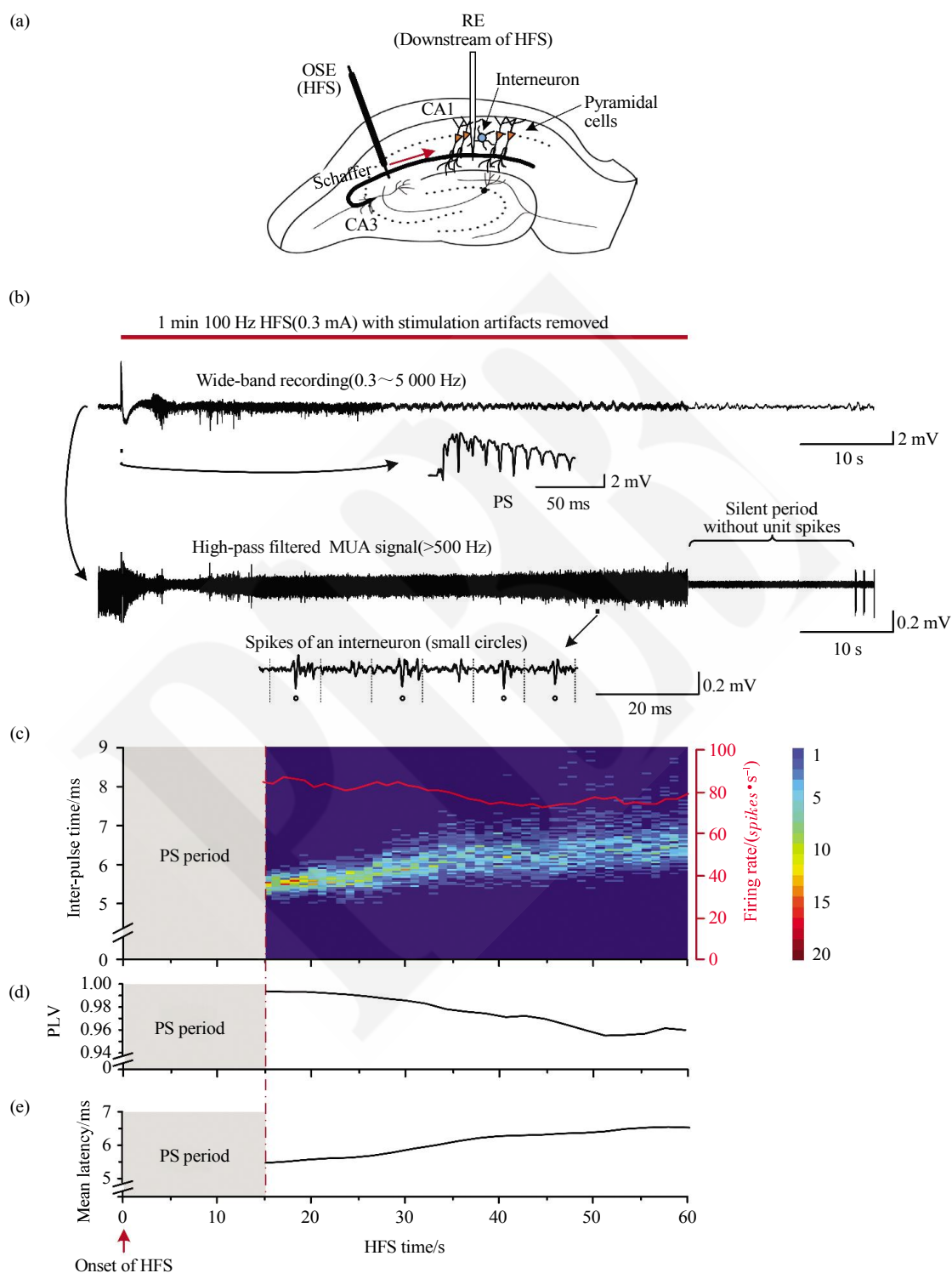


Fig. 1 Dynamic responses of downstream neurons to the HFS trains in the hippocampal CA1 region

(a) Locations of the orthodromic-stimulation electrode (OSE) in the Schaffer collaterals and recording electrode (RE) in the CA1 pyramidal layer. (b) An example of 1 min artifact-removed signal with 100 Hz HFS (top) and the corresponding MUA signal (bottom). The red bar on the top of signals denotes HFS duration. (c) Raster plot of unit spikes generated by an interneuron together with the firing rate (the red curve) during the late HFS period without PS activity. The red dashed line denotes the end of PS activity. (d) The PLV curve and (e) the latency curve of the spikes in (c) calculated in a time resolution of 1 s.

将 30 s 分成 3 个 10 s 时区, 比较头尾 2 个时区, 即 HFS 的 30~40 s 和 50~60 s 这 2 个时区之间的差别. 如表 1 所示, 同类神经元在这 2 个时区的平均发放率并没有显著差异(paired *t*-test, $P > 0.45$). 这表明神经元动作电位的发放已稳定.

此外, 中间神经元的平均发放率显著高于锥体神经元的平均发放率(*t*-test, $P < 0.01$). 但是, 无论锥体和中间神经元, 它们的发放率均小于刺激的脉冲频率(100 Hz), 表明两类神经元都不能完全跟随每个刺激脉冲产生动作电位.

Table 1 Firing rates of SUA during the late 30 s period of 1 min 100 Hz HFS

Neuron type	Neuron number	Mean firing rates in different periods/(spikes·s ⁻¹)			
		Baseline	Late 30 s HFS	30~40 s of HFS	50~60 s of HFS
Pyramidal cells	66	1.56 ± 2.24	6.76 ± 7.28 ^{ab}	6.53 ± 7.28 ^a	6.81 ± 7.77 ^a
Interneurons	20	12.5 ± 10.9	34.4 ± 24.6 ^a	34.4 ± 27.0	34.9 ± 24.8

*Pyramidal cells *vs.* interneurons (*t*-test, $P < 0.01$). ^aLate 30 s HFS *vs.* baseline (paired *t*-test, $P < 0.01$).

在这 3 个时区(Zone1: 30~40 s; Zone2: 40~50 s; Zone3: 50~60 s)中, 虽然第 1 与第 3 个时区的锋电位发放率没有显著变化, 但是, 锋电位与刺激脉冲之间的锁相值和潜伏期都存在显著差异. 例如, 由图 2a 的锥体神经元示例可见, 锋电位序列在二维光栅图上存在明显的移动(图 2a-1). 在 Zone1(图 2a-2), 锋电位的锁相值 PLV 为 0.90, 平均潜伏期为 8.8 ms. 而到了 Zone3(图 2a-3), 锋电位在 PSTH 的分布峰后移, 其平均潜伏期延长为 10.4 ms, 而 PLV 也降为 0.68. 同样地, 由图 2b 的中间神经元示例可见, 锋电位序列在二维光栅图上的移动更明显(图 2b-1). 比较 Zone1(图 2b-2)与 Zone3(图 2b-3)的 PSTH 图可见, 锋电位的分布峰后移且峰值减小(趋于平坦). 期间, 该中间神经元锋电位的平均潜伏期由 6.1 ms 延长为 6.9 ms, 而 PLV 由 0.97 降为 0.94.

2.3 锋电位锁相值和潜伏期的统计分析

由锁相值 PLV 的统计数据可见(图 3a): 对于锥体神经元, 第 1 时区(Zone1, 30~40 s)到第 3 时区(Zone3, 50~60 s), PLV 从(0.73 ± 0.18)显著减小至(0.56 ± 0.20)($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 66$), 且在第 1 与第 3 时区的 PLV 散点图上可见(图 3a-2), 第 1 时区的 PLV 多数均大于第 3 时区(大多数的数据点分布于对角线以上区域). 而第 2 时区(Zone2, 40~50 s)的平均 PLV 为(0.62 ± 0.23), 与第 1 时区和第 3 时区的平均 PLV 都差异显著($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 66$), 但相对于图 3a-2, 在第 2 与第 3 时区的 PLV 散点图上(图 3a-3), 位于对角线下方的数据点增多. 这表明在这 3 个时区内, 锥体神

经元的 PLV 持续减小. 对于中间神经元, 第 1 时区到第 3 时区, PLV 从(0.87 ± 0.07)显著减小至(0.83 ± 0.07)($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 20$). 且在两时区的 PLV 散点图上数据点几乎都位于对角线上方(图 3a-4). 而第 2 时区的平均 PLV 为(0.84 ± 0.10), 与第 1 时区的平均 PLV 差异显著($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 20$), 而与第 3 时区的平均 PLV 无显著差异($P = 0.68$, paired *t*-test, $n = 20$). 第 2 与第 3 时区的 PLV 散点图上的数据点围绕对角线分布也表明了同样的结果(图 3a-5).

由潜伏期的统计数据可见(图 3b): 对于锥体神经元, 第 1 时区到第 3 时区, 平均潜伏期从(9.6 ± 1.8) ms 显著延长至(10.3 ± 2.0) ms($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 66$); 且在第 1 与第 3 时区的潜伏期散点图上可见(图 3b-2), 第 1 时区的潜伏期多数均小于第 3 时区(大多数的数据点分布于对角线以下区域). 而第 2 时区的平均潜伏期为(9.9 ± 1.9) ms, 与第 1 时区和第 3 时区的平均 PLV 均差异显著($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 66$), 但相对于图 3b-2, 第 2 与第 3 时区的潜伏期散点图上的数据点向对角线上方移动(图 3b-3). 对于中间神经元, 第 1 时区到第 3 时区, 潜伏期从(7.3 ± 0.71) ms 显著延长至(7.8 ± 0.70) ms ($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 20$). 且在两时区的潜伏期散点图上数据点几乎都位于对角线下方(图 3b-4). 而第 2 时区的平均潜伏期为(7.6 ± 0.68) ms, 与第 1 时区和第 3 时区的平均 PLV 均差异显著 ($P < 0.01$, paired *t*-test, $n = 66$), 但相对于图 3b-4, 第 2 与第 3 时区的潜伏期散点图上的数据点向对角线上方移动(图 3b-5). 可见, 在 HFS 的

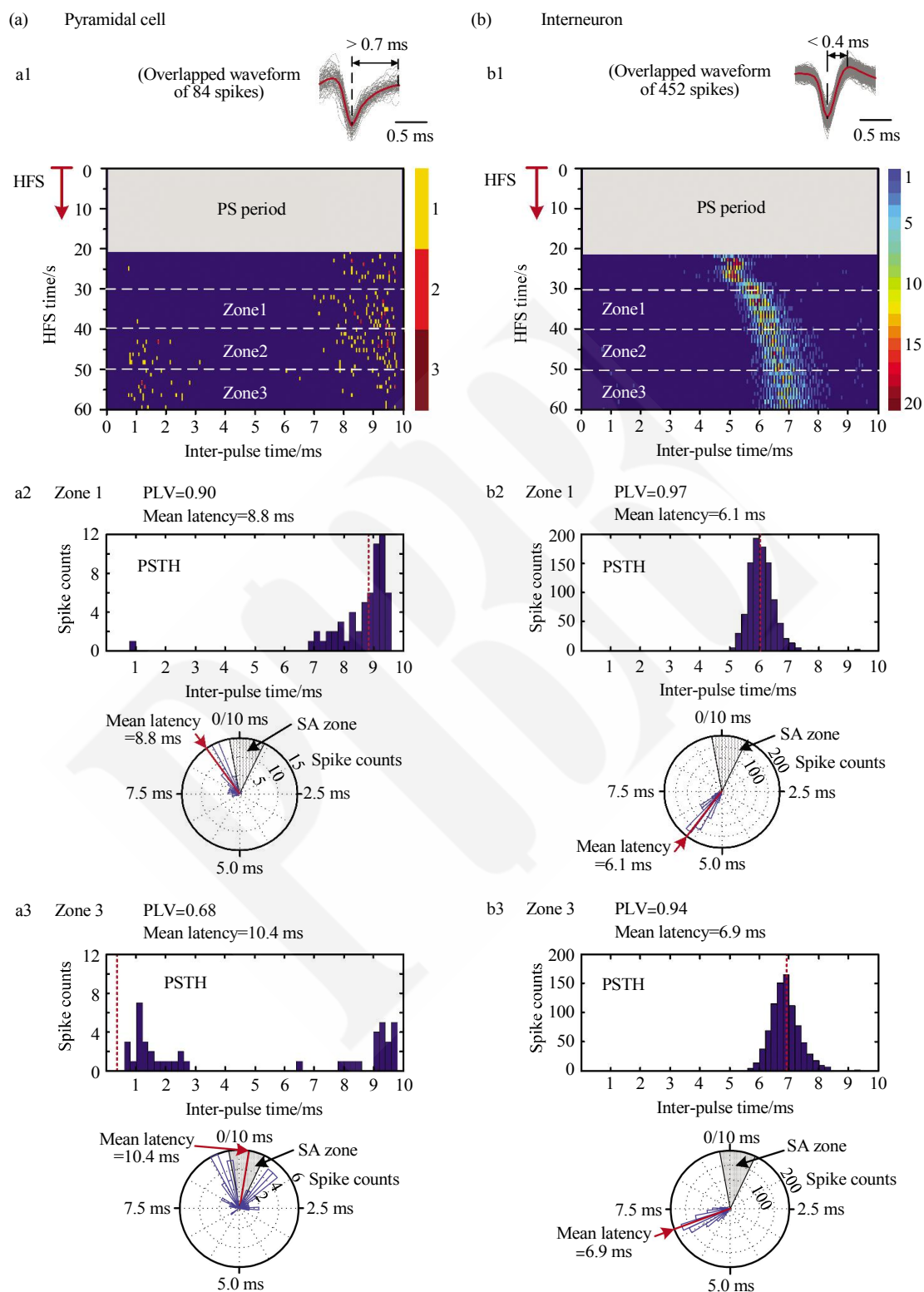


Fig. 2 Raster plots and PSTH plots during HFS for spikes of typical pyramidal cell and interneuron

(a) Data for a typical pyramidal cell. a1: 2-D raster plot of the spikes shows the distribution changes of firing timing in the inter-pulse-intervals during late HFS period. Overlapped waveforms of the unit spikes from the pyramidal cell are showed above the plot. The red waveform denotes the average waveform. a2 and a3: PSTH plots with rectangular coordinates (top) and polar coordinates (bottom) during the 30~40 s period of HFS (a2, Zone1) and 50~60 s period of HFS (a3, Zone3). The bin widths of PSTH plots are 0.2 ms. Mean latencies of the spikes were calculated based on the circular statistics. (b) Data for a typical interneuron. b1, b2 and b3 are similar to a1, a2 and a3.

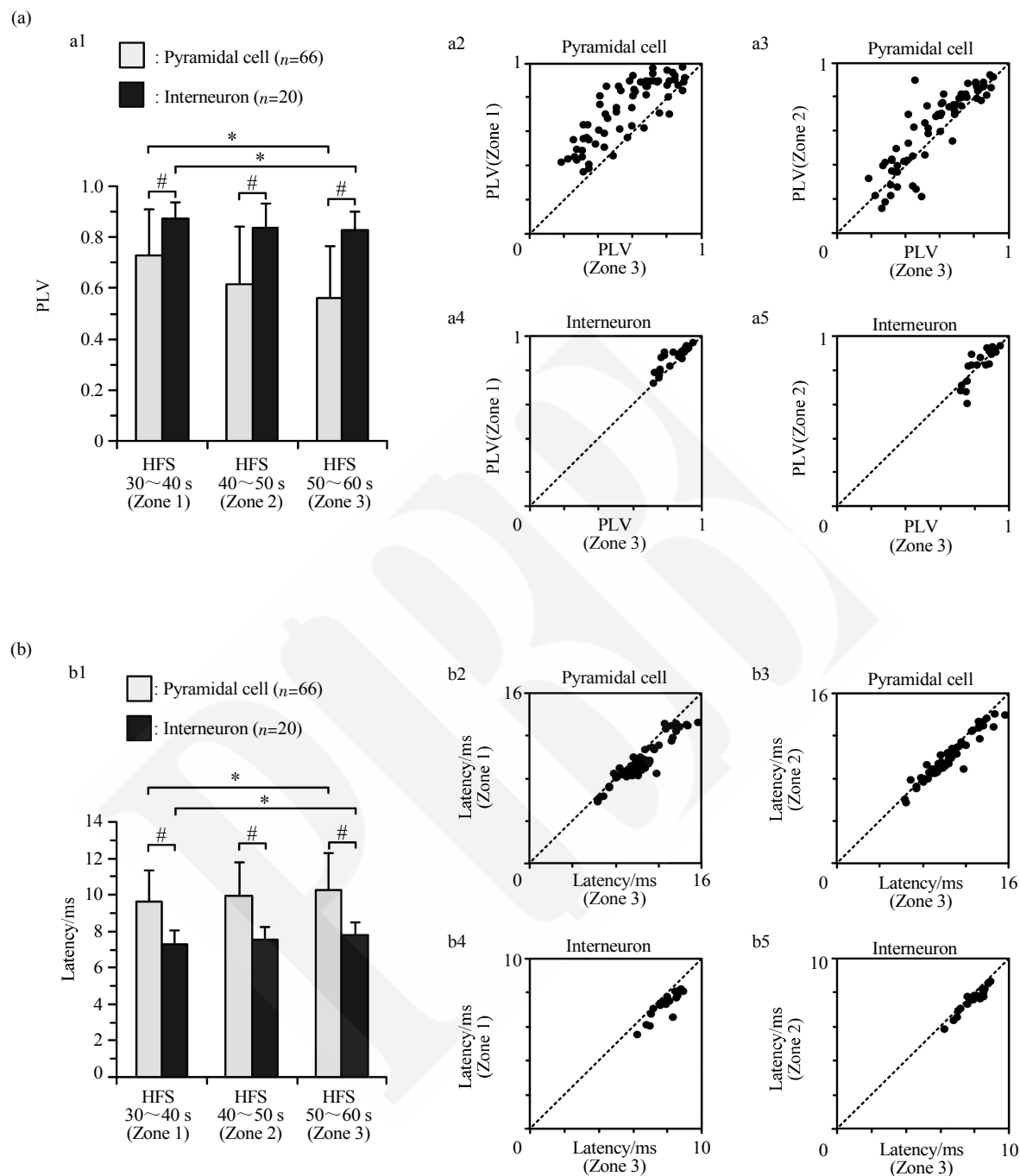


Fig. 3 Changes of phase-locking relationship between unit spikes and stimulation pulses in the progress of HFS

(a) Mean phase-locking values (PLV) of pyramidal cells and interneurons in different time zones of HFS. a1: PLV of the two types of neurons in each 10 s zone during the 30–60 s period of HFS. a2–a5: Scatter diagrams of the PLV between paired 10 s zones showing the decrease of PLV in the progress of HFS. Each point represents one neuron. The dot lines are diagonal lines. (b) Mean latencies of pyramidal cells and interneurons in different time zones of HFS. b1–b5 are similar to a1–a5. * $P < 0.01$, paired t -test; # $P < 0.01$, t -test; $n = 66$ for pyramidal cells, $n = 20$ for interneurons.

30~60 s 内, 锥体和中间神经元的潜伏期持续延长。

此外, 将 100 Hz HFS 期间同一时区的锥体神经元与中间神经元相比较, 它们的锁相值 PLV 和潜伏期均存在显著差异, 中间神经元的 PLV 显著

大于锥体神经元($P < 0.01$, t -test, 图 3a-1), 而潜伏期则显著小于锥体神经元($P < 0.01$, t -test, 图 3b-1)。而且, 在整个后 30 s 的 HFS 中, 锥体神经元 PLV 的变化量(|第 3 时区的值 - 第 1 时区的值| =

0.166 ± 0.117)显著大于中间神经元的数值(0.043 ± 0.038)($P < 0.01$, t -test).

上述结果表明, 随着高频刺激的持续, 下游神经元动作电位发放与刺激脉冲之间的锁相关系会减弱, 潜伏期会延长, 而且, 锥体神经元锋电位的锁相值变化大于中间神经元.

3 讨 论

本文研究了在体大鼠海马 CA1 区高频电脉冲刺激(HFS)持续时, 位于下游的锥体神经元和中间神经元的动作电位发放的改变. 结果表明, 除了 HFS 起始时诱发的神经元群体同步活动(即群峰电位 PS)以外, 在接下来的刺激期间, 下游的两类神经元的单元锋电位发放率都比刺激前显著增加, 但是, 它们的发放率都远小于刺激频率(表 1). 而且, 锋电位的发放与刺激脉冲之间的锁相关系逐渐减弱, 潜伏期逐渐延长. 其中的机制分析如下.

可以明确的是, HFS 期间的锋电位发放是由刺激脉冲诱发的, 不是自发的基础活动. 这是由于每当 HFS 结束时, 总是存在一段没有锋电位的静息期(图 1b), 因此, 可以确定 HFS 对于神经元的锋电位发放具有重要作用, 详见文献[12]. 而输入轴突纤维上的 HFS 引起的兴奋需要经过轴突的传导和突触的传递, 才能作用于下游的突触后神经元(图 1a), 因此, 轴突和突触性能的改变以及突触后神经元特性的不同, 都会影响刺激脉冲诱发下游神经元产生动作电位的过程和结果. 其中 HFS 引起的轴突性能的改变可能是主要原因.

已有的研究表明, 高频电刺激可以改变被刺激轴突纤维的性能, 产生不完全的(或者间歇性的)轴突传导阻滞[11-13]. 这种阻滞使得 HFS 中的一部分刺激脉冲无法沿轴突传向下游, 因而无法激活下游神经元, 从而使得下游神经元的动作电位发放率远小于刺激脉冲的 100 Hz 频率(表 1). 而且, 每个神经元同时接收上游多根轴突产生的众多突触的输入[19], HFS 引起轴突阻滞时各轴突兴奋状态的不确定性, 会增加下游神经元的突触后膜电位整合结果的随机性, 由此导致神经元动作电位发放与刺激脉冲的锁相性减弱, 潜伏期延长. 轴突传导阻滞的原因可能是高频刺激导致轴突膜外的局部范围内钾离子积累、浓度升高[30], 致使轴突细胞膜持续位于一定的去极化状态, 而引起部分钠离子通道失活[31], 使得轴突的兴奋阈值升高或者无法产生动作电位, HFS 对于下游神经元的作用也就减弱, 无法以脉冲

的频率来激活神经元.

除了轴突传导障碍以外, HFS 也可能引起突触传递的障碍(如神经递质耗竭等)和突触的可塑性变化[13], 这些机制还有待深入研究. 本文的大鼠实验采用乌拉坦(urethane)作为麻醉剂, 这种麻醉剂常用于大鼠在体神经系统研究的实验. 前人的许多研究结果已表明, 乌拉坦对于神经元的动作电位发放率仅有较小的抑制作用, 对于兴奋性和抑制性突触的传递影响也很小[32]. 因此, 麻醉剂对于本文的结果不会造成明显的影响.

此外, 突触后下游神经元自身的特性也会影响其动作电位的产生. 由于中间神经元的兴奋阈值比锥体神经元低[29], 因此, 其发放率相对较高, 潜伏期较小, 与刺激脉冲之间的锁相性也高于锥体神经元.

前人的研究曾发现, 在丘脑底核施加高频电刺激期间, 位于刺激下游的苍白球神经元的单元锋电位发放也存在动态变化, 表现为潜伏期的延长和 PSTH 峰值幅度的降低[16], 与本文所观察到的海马 CA1 区 HFS 期间神经元锋电位的潜伏期延长和锁相性减弱一致. 这表明, HFS 对于下游神经元的动态调控可能普遍存在于各个脑区. 由于轴突纤维在脑内空间的占比较大, 本文的轴突电刺激实验提示这种调控很可能源于轴突机制. 此外, 神经元锋电位锁相性的减弱还反映了高频刺激可能具有去同步作用. 近年来, 这种作用已受到广泛关注, 可能是 DBS 抑制帕金森病和癫痫等疾病所导致的神经元同步活动的重要机制[33-35]. 再者, 常规 DBS 的刺激持续时间较长, 可达数小时、数天和数年. 而近来 DBS 新技术开发的热点之一是闭环刺激(或称自适应刺激), 由数秒或者数分钟的较短刺激组成[36-37]. 本文研究的 1 min HFS 反映了短刺激期神经元的动态响应, 为闭环刺激的研究提供了重要信息. 总之, 本文有关轴突刺激、去同步作用和动态响应的研究结果对于揭示脑刺激机制、开发治疗脑疾病的新技术具有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Follett K A, Weaver F M, Stern M, *et al.* Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 2010, **362** (22): 2077-2091
- [2] Hung S W, Hamani C, Lozano A M, *et al.* Long-term outcome of bilateral pallidal deep brain stimulation for primary cervical dystonia. *Neurology*, 2007, **68** (6): 457-459
- [3] Jobst B. Brain stimulation for surgical epilepsy. *Epilepsy Research*,

- 2010, **89** (1): 154–161
- [4] Herrington T M, Cheng J J, Eskandar E N. Mechanisms of deep brain stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 2016, **115** (1): 19–38
- [5] Wichmann T, DeLong M R. Deep brain stimulation for movement disorders of basal ganglia origin: restoring function or functionality? *Neurotherapeutics*, 2016, **13** (2): 264–283
- [6] Filali M, Hutchison W D, Palter V N, *et al.* Stimulation-induced inhibition of neuronal firing in human subthalamic nucleus. *Experimental Brain Research*, 2004, **156** (3): 274–281
- [7] Welter M L, Houeto J L, Bonnet A M, *et al.* Effects of high-frequency stimulation on subthalamic neuronal activity in parkinsonian patients. *Archives Neurology*, 2004, **61** (1): 89–96
- [8] Carlson J D, Cleary D R, Cetas J S, *et al.* Deep brain stimulation does not silence neurons in subthalamic nucleus in Parkinson's patients. *Journal of Neurophysiology*, 2010, **103** (2): 962–967
- [9] Ponce F A, Lozano A M. Deep brain stimulation state of the art and novel stimulation targets. *Progress in Brain Research*, 2010, **184**(c): 311–324
- [10] Reese R, Leblois A, Steigerwald F, *et al.* Subthalamic deep brain stimulation increases pallidal firing rate and regularity. *Experimental Neurology*, 2011, **229** (2): 517–521
- [11] Feng Z, Zheng X, Yu Y, *et al.* Functional disconnection of axonal fibers generated by high frequency stimulation in the hippocampal CA1 region *in vivo*. *Brain Research*, 2013, **1509**: 32–42
- [12] Feng Z, Wang Z, Guo Z, *et al.* High frequency stimulation of afferent fibers generates asynchronous firing in the downstream neurons in hippocampus through partial block of axonal conduction. *Brain Research*, 2017, **1661**: 67–78
- [13] Rosenbaum R, Zimnik A, Zheng F, *et al.* Axonal and synaptic failure suppress the transfer of firing rate oscillations, synchrony and information during high frequency deep brain stimulation. *Neurobiology of Disease*, 2014, **62**: 86–99
- [14] Ranck J B Jr. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Research*, 1975, **98** (3): 417–440
- [15] Johnson M D, McIntyre C C. Quantifying the neural elements activated and inhibited by globus pallidus deep brain stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 2008, **100** (5): 2549–2563
- [16] 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. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 2011, **5**: 21
- [17] Agnesi F, Muralidharan A, Baker K B, *et al.* Fidelity of frequency and phase entrainment of circuit-level spike activity during DBS. *Journal of Neurophysiology*, 2015, **114** (2): 825–834
- [18] Chomiak T, Hu B. Axonal and somatic filtering of antidromically evoked cortical excitation by simulated deep brain stimulation in rat brain. *Journal of Physiology*, 2007, **579** (Pt 2): 403–412
- [19] Andersen P, Morris R, Amaral D, *et al.* *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press, 2007
- [20] Sankar T, Chakravarty M M, Bescos A, *et al.* Deep brain stimulation influences brain structure in alzheimer's disease. *Brain Stimulation*, 2015, **8** (3): 645–654
- [21] Berger T W, Hampson R E, Song D, *et al.* A cortical neural prosthesis for restoring and enhancing memory. *Journal of Neural Engineering*, 2011, **8** (4): 046017
- [22] Feng Z, Yu Y, Guo Z, Cao J, *et al.* High frequency stimulation extends the refractory period and generates axonal block in the rat hippocampus. *Brain Stimulation*, 2014, **7** (5): 680–689
- [23] 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.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2007, **34** (4): 401–407
- [24] Yu Y, Feng Z, Cao J, *et al.* Modulation of local field potentials by high-frequency stimulation of afferent axons in the hippocampal CA1 region. *Journal of Integrate Neuroscience*, 2016, **15** (1): 1–17
- [25] Barthó P, Hirase H, Monconduit L, *et al.* Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *Journal of Neurophysiology*, 2004, **92** (1): 600–608
- [26] Lachaux J P, Rodriguez E, Martinerie J, *et al.* Measuring phase synchrony in brain signals. *Human Brain Mapping*, 1999, **8** (4): 194–208
- [27] McConnell G C, So R Q, Hilliard J D, *et al.* Effective deep brain stimulation suppresses low-frequency network oscillations in the basal ganglia by regularizing neural firing patterns. *Journal of Neuroscience*, 2012, **32** (45): 15657–15668
- [28] Berens P, Baclawski K, Berens P, *et al.* CircStat: a MATLAB toolbox for circular statistics. *Journal of Statistical Software*, 2009, **31** (10): 1–21
- [29] Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, *et al.* Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron*, 1998, **21** (1): 179–189
- [30] Shin D S, Samoilova M, Cotic M, *et al.* High frequency stimulation or elevated K⁺ depresses neuronal activity in the rat entopeduncular nucleus. *Neuroscience*, 2007, **149** (1): 68–86
- [31] Bellinger S C, Miyazawa G, Steinmetz P N. Submyelin potassium accumulation may functionally block subsets of local axons during deep brain stimulation: a modeling study. *Journal of Neural Engineering*, 2008, **5** (3): 263–274
- [32] Sceniak M P, MacIver M B. Cellular actions of urethane on rat visual cortical neurons *in vitro*. *Journal of neurophysiology*, 2006, **95** (6): 3865–3874
- [33] Schütt M, Claussen J C. Desynchronizing effect of high-frequency stimulation in a generic cortical network model. *Cognitive Neurodynamics*, 2012, **6** (4): 343–351
- [34] Florence G, Sameshima K, Fonoff E T, *et al.* Deep brain stimulation: more complex than the inhibition of cells and excitation of fibers. *Neuroscientist*, 2016, **22** (4): 332–345
- [35] Medeiros D D, Moraes M F D. Focus on desynchronization rather than excitability: A new strategy for intraencephalic electrical

- stimulation. *Epilepsy & Behavior*, 2014, **38**: 32–36
- [36] Sun F T, Morrell M J. Closed-loop neurostimulation: the clinical experience. *Neurotherapeutics*, 2014, **11**(3): 553–563
- [37] Grahn P J, Mallory G W, Khurram O U, *et al.* A neurochemical closed-loop controller for deep brain stimulation: toward individualized smart neuromodulation therapies. *Frontiers in Neuroscience*, 2014, **8**: 169

Dynamic Responses of Neurons to High Frequency Stimulation*

HUANG Lu, FENG Zhou-Yan**, WANG Zhao-Xiang

(Key Laboratory of Biomedical Engineering of Education Ministry, College of Biomedical Engineering and Instrumentation Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Deep brain stimulation (DBS) has shown great potential for treating various neurological disorders in clinic. However, the mechanisms of DBS are not clear yet. Regular DBS uses high frequency stimulation (HFS) of pulse sequences. The narrow pulses facilitate the activation of axon fibers most readily among all elements of a neuronal structure. Through the projection of axons, the effects of HFS can spread to downstream neurons. Therefore, to explore the mechanisms of DBS, we investigated the effects of axonal HFS on the downstream neurons in hippocampus, as it has been an important target for treating diseases such as epilepsy and dementia. One-minute HFS at 100 Hz was applied to the afferent fibers of hippocampal CA1 region (i.e., the Schaffer collaterals) in anesthetized rats. Single unit spikes of pyramidal cells and interneurons in the downstream CA1 region were recorded and analyzed. Firing rates of spikes, phase-locking values (PLV) between spikes and stimulation pulses, as well as spike latencies were calculated to quantify the changes of neuronal action potential firing during the HFS periods. Results showed that during the initial period of HFS, synchronized action potentials (i.e., population spikes, PS) generated in the population of neurons. During the late period of HFS (after the disappearance of PS events), both types of neurons continued to fire unit spikes with stable rates. However, the phase-locking relationship between spikes and stimulation pulses decreased gradually, while the latencies of spikes increased gradually. In addition, compared to interneurons, the unit spikes of pyramidal cells had smaller phase-locking values and longer latencies. These results indicate that prolonged axonal HFS can generate asynchronous activity in the downstream neurons. Partial block in axon conduction induced by high-frequency pulse stimulation might be one major cause underlying the phenomena. The present study provides important information for revealing the mechanisms of DBS.

Key words high frequency stimulation, single unit spike, latency, phase-locking, dynamic response

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0360

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30970753).

**Corresponding author.

E-mail: fengzhouyan@139.com

Received: September 14, 2017 Accepted: January 22, 2018