

# 乌拉坦对大鼠海马 CA1 区锥体神经元自发放电的抑制作用\*

雷霆<sup>1)</sup> 阎睿<sup>1)</sup> 李雅堂<sup>1)</sup> 杨卓<sup>2)\*\*</sup> 张涛<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071; <sup>2)</sup>南开大学医学院, 天津 300071)

**摘要** 为了深入研究麻醉药乌拉坦对大鼠海马 CA1 锥体神经元自发放电的作用及其机制, 分析了 10 mmol/L 乌拉坦对自发放电、电压门控钠通道、电压门控钾通道的作用. 从自发放电信号中计算了放电频率、提取了峰峰间隔序列(ISI)并利用样品熵和去趋势波动法对 ISI 进行了非线性分析. 结果表明, 乌拉坦不仅抑制了自发放电的频率, 而且降低了自发放电 ISI 序列的复杂度并弱化了其长时程相关性. 离子通道研究结果表明, 乌拉坦显著地抑制了钠通道电流( $I_{Na}$ ), 对延迟整流钾通道电流( $I_K$ )和瞬时外向钾通道电流( $I_A$ )虽然也有抑制作用但无统计学意义. 由于乌拉坦不影响突触传递, 因此它可能通过抑制  $I_{Na}$  使自发放电的阈值升高而降低放电频率, 同时, 由于参与的通道数量或活性降低而使得 ISI 的复杂度下降, 长时程相关性弱化.

**关键词** 乌拉坦, 自发放电, 钠通道, 钾通道, 复杂度, 长时程相关

**学科分类号** Q424, R338

已经有大量的研究发现麻醉药可以降低神经元的自发放电频率<sup>[1,2]</sup>. 但是, 对自发放电非线性特征的影响以及作用机制的研究却鲜有报道.

乌拉坦是动物实验的常用麻醉药. 目前以大鼠视皮层锥体神经元为标本的研究发现, 临床浓度的乌拉坦对神经元突触传递不产生影响, 表现为, 不论是兴奋性的还是抑制性的受体电流, 乌拉坦作用后不发生变化<sup>[3]</sup>. 但有研究发现乌拉坦降低了神经元的兴奋性, 如 Sceniak 等<sup>[4]</sup>认为乌拉坦可以通过增强钡离子依赖的钾通道使大鼠视皮层锥体神经元的连续动作电位的频率降低, Shiraishi 和 Harris<sup>[5]</sup>的研究发现乌拉坦可以抑制表达于爪蟾卵母细胞的 Nav1.2 型钠通道, Mercer 等<sup>[6]</sup>报道了乌拉坦可以明显抑制在体的海马神经元单位放电频率.

自发放电的产生源于细胞自身的活动以及所处网络中的突触活动<sup>[6]</sup>. 而乌拉坦对突触传递没有明显的影响, 所以对自发放电的影响应该归结于神经元的自身活动. 对神经元自身而言, 兴奋性依赖于其静息电位和放电阈值, 自发放电的产生就是由于膜电位的振荡, 即当膜电位振荡到阈电位时产生动作电位, 形成自发放电<sup>[7]</sup>. 在海马, 当用阻断剂阻断了所有的突触传递后, 发现电压门控的钠和钾通道的激活和失活都参与了自发放电的放电阈值的调控<sup>[8]</sup>.

由于早期的研究是基于乌拉坦对神经元自发放电线性特征变化的探讨, 缺乏基于线性和非线性两方面特征变化的乌拉坦抑制作用的研究. 本文以大鼠海马 CA1 锥体神经元为研究对象, 通过对自发放电峰峰间隔(inter spike interval, ISI)序列的非线性分析以及放电频率和 ISI 直方图的计算, 并结合电压门控钠和钾通道的实验研究, 探讨乌拉坦影响锥体神经元自发放电的潜在生理机制.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验部分

参考南开大学生物活性材料教育部重点实验室的方法<sup>[9]</sup>, 选用出生后 14~18 天的 Wistar 大鼠. 断头取脑, 将大脑迅速放置于 0℃ 氧饱和的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中, 冷却 5 min. ACSF 的成分是(mmol/L): NaCl 126, KCl 2.5, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26 和

\* 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB914803)和国家自然科学基金(30870827)资助项目.

\*\* 通讯联系人. Tel: 022-23500237

杨卓. E-mail: zhuoyang@nankai.edu.cn

张涛. E-mail: zhangtao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2008-04-08, 接受日期: 2008-08-18

D-glucose 10, pH 为 7.4. 取半脑剥出海马, 并用振动切片器(Leica, VT1000S, 德国)做厚度为 350  $\mu\text{m}$  的海马切片. 切片后, 将脑片转移到通以 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  的氧饱和 ACSF 中, 在室温条件下 (25 $^\circ\text{C}$ ) 孵育 1 h.

实验记录时将脑片转移至容积为 1 ml 的记录浴槽, 并在实验过程中以 2~3 ml/min 速度灌流经氧饱和的 ACSF. 记录电极由 PIP5 型拉制仪 (HEKA, 德国) 分两步拉制而成, 充灌电极内液后阻抗在 4~7 M $\Omega$ . 记录钠通道电流 ( $I_{\text{Na}}$ ) 的含 TEA 的 ACSF 成分 (mmol/L): NaCl 95, KCl 5.6,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{MgCl}_2$  5, glucose 11,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{NaHCO}_3$  25 和 TEA-Cl 20, pH 7.4. 记录  $I_{\text{Na}}$  的电极内液的成分 (mmol/L): NaCl 5.8, CsCl 134,  $\text{MgCl}_2$  1, EGTA 3, HEPES 10, pH 7.3. 记录钾通道电流时在 ACSF 添加 1  $\mu\text{mol/L}$  TTX 阻断钠通道电流, 0.1 mmol/L  $\text{CdCl}_2$  阻断钙通道电流. 记录延迟外向整流钾通道电流 (delayed rectifier potassium current,  $I_{\text{K}}$ ) 时加入 5 mmol/L 的 4-AP, 记录瞬时外向钾通道电流 (transient outward potassium current,  $I_{\text{A}}$ ) 时加入 35 mmol/L 的 TEA. 记录自发放电和钾通道电流的电极内液成分为 (mmol/L): KCl 144, NaCl 5,  $\text{MgCl}_2$  1, EGTA 3, HEPES 10, ATP- $\text{Na}_2$  2, pH 7.3. 参照前人的实验, 选择 10 mmol/L 为乌拉坦的实验浓度<sup>[9]</sup>, 直接配入 ACSF 灌流液形成 10 mmol/L 的终浓度.

海马 CA1 锥体神经元的可视观察在红外微分干涉显微镜 (Olympus, BX51WI, 日本) 下进行, 图像经 CCD (DVC, 710M-T1, 美国) 采集后在显示器上显示, 选择健康、饱满的细胞进行实验. 当电极尖端与神经元的细胞膜之间形成高阻抗封接 (大于 1 G $\Omega$ ) 后, 负压破膜, 形成全细胞记录模式, 再切换为电流钳模式, 记录自发放电. 记录 15 min 后, 10 mmol/L 乌拉坦通过灌流给药, 再记录 15 min. 而记录  $I_{\text{Na}}$ 、 $I_{\text{K}}$  和  $I_{\text{A}}$  时, 用电压钳模式, 膜电位钳制在 -70 mV. 在破膜 5 min 待电流稳定后, 记录基础值, 然后通过灌流液给予乌拉坦, 作用 5 min 后再次记录.

信号由膜片钳放大器 (HEKA, EPC-10, 德国) 和 Pulse 软件采集, 低通滤波频率为 2.9 kHz, 采样频率为 10 kHz. 以上所有实验在室温 (25 $^\circ\text{C}$ ) 下完成, 所有数据储存于电脑以作日后分析.

## 1.2 ISI 序列采集和计算

神经元自发放电信号经膜片钳系统数据处理软

件提取动作电位的 ISI 序列. 计算 ISI 序列的非线性指标选择了反映时序复杂度的样品熵 (sample entropy, SampEn) 和反映时序分形特征的去趋势波分析法 (detrended fluctuation analysis, DFA).

样品熵的概念是 Richman 等<sup>[10]</sup>在 2000 年提出的, 本身是对近似熵的一种改进. 跟近似熵相比, SampEn 是一种无偏估计, 而且对数据长度有更好的鲁棒性. 熵值越高, 复杂度也越高. 其中 SampEn 的算法参考我们已发表的论文<sup>[11]</sup>, 其具体算法如下: a. 对于给定时间序列  $\{x(i): i=1, 2, \dots, N\}$ , 选取嵌入维  $m$  构成  $N-m+1$  个矢量  $\{X_m(i)=x(i), x(i+1), \dots, x(i+m-1): 1 \leq i \leq N-m+1\}$ ; b. 定义  $X_m(i)$  和  $X_m(j)$  之间的距离为最大范数, 给定容忍度  $r$ , 对每个  $i \leq N-m$  统计  $d(X_m(i), X_m(j))$  小于  $r$  的数目, 记为  $B_i^m$ ; c. 增加维数为  $m+1$ , 重复 a~b; d. 样品熵的定义为  $\text{SampEn} = \lim_{N \rightarrow \infty} \ln \frac{\sum_{i=1}^{N-m} B_i^m}{\sum_{i=1}^{N-m} B_i^{m+1}}$ . 在样品熵的计算过程中, 选择  $m=2$  和  $r=0.2\sigma$ , 其中  $\sigma$  是 ISI 序列的标准差.

长时程相关 (long-range temporal correlations, LRTC) 反映了动力学系统的分形特征. 由 Peng 等<sup>[12]</sup>提出的 DFA 被广泛用于检测非稳定时间序列的长时程相关性. 相对于常用的分形分析方法, 其优点在于能探测出陷入在表面看来为非平稳时间序列中的 LRTC, 并能够避免检测出由于外在趋势而导致的明显的自相似性. DFA 的计算方法参考我们的论文<sup>[13]</sup>, 具体算法如下: a. 对于给定时间序列  $\{x(i): i=1, 2, \dots, N\}$  进行积分, 定义轮廓序列为

$$Y(i) = \sum_{k=1}^i x_k - \langle x \rangle, \text{ 这里 } \langle x \rangle \text{ 指的是 } x \text{ 序列的平均值};$$

b. 将轮廓序列分成长度为  $s$  的  $N_s = \text{int}(N/s)$  个不相交的窗口. 由于长度  $N$  并不一定是  $s$  的整数倍, 这样轮廓序列的末端就会保留. 为了使这部分末端不被忽略, 可以从相反的方向重复相同的步骤, 这样就会得到  $2N_s$  个窗口; c. 用最小二乘拟合每个窗口的局部线性趋势定义为  $p_s(i)$ , 然后定义长度为  $s$  的去趋势时间序列  $Y_s(i) = Y(i) - p_s(i)$ ; d. 计算  $2N_s$  个窗口中的去趋势时间序列平方均值:  $F_s^2(v) =$

$$\frac{1}{s} \sum_{i=1}^s (Y_s(i))^2; \text{ e. 求所有窗口中去趋势时间序列平方均值的均值平方根即为波动函数: } F(s) =$$

$$\sqrt{\frac{2N_s}{s} \sum_{i=1}^{2N_s} F_s^2(v) / 2N_s}. \text{ 如果时间序列是长时程关联的,}$$

波动函数应该以幂律方式增加:  $F(s) \propto s^\alpha$ .  $\log F(s)$  和  $\log s$  的拟合斜率称为标度指数  $\alpha$ , 它可以量化自相关函数的衰减程度.

### 1.3 数据处理

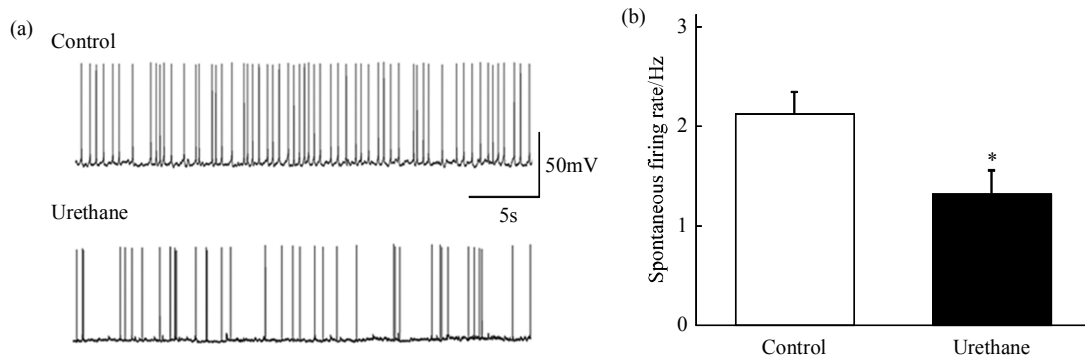
通道电流的数据由 Igor 5.01 和 Origin 7.5 采集和分析. 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 给药前后的统计差异用  $t$  检验.  $P < 0.05$  表示差异显著.

## 2 实验结果

### 2.1 乌拉坦对自发放电的作用

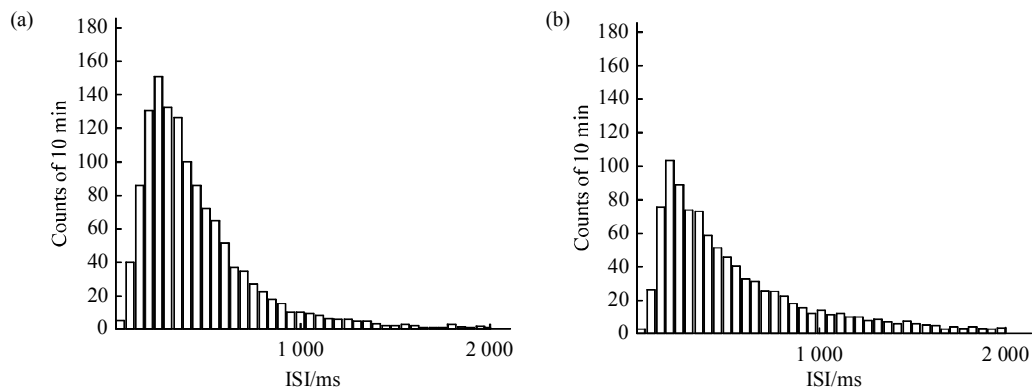
图 1a 给出了乌拉坦作用前后大鼠海马 CA1 锥

体神经元自发放电的信号轨迹. 其自发放电的频率范围为 1~3 Hz, 其中乌拉坦作用之前的平均放电频率为  $(2.13 \pm 0.22)$  Hz, 作用后降为  $(1.33 \pm 0.23)$  Hz ( $P < 0.05$ ,  $n=13$ , 图 1b), 显示给药后放电频率明显降低. 为了判断乌拉坦对自发放电的模式的影响, 图 2 给出了自发放电的 ISI 分布直方图. 从图 2 中看出, 不论是乌拉坦作用前还是作用后, 主峰都分布在 0~1s 之内, 但乌拉坦作用后 ISI 在这部分的分布个数减少, 而 ISI 大于 1s 的分布增多.



**Fig. 1** Inhibitive effect of 10 mmol/L urethane on spontaneous firings of hippocampal CA1 pyramidal neurons in rats

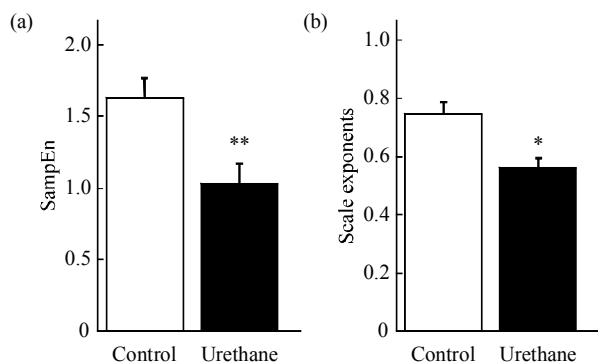
(a) Representative section of original traces in the spontaneous firing of a CA1 pyramidal neurons in rats before and after 10 mmol/L urethane. (b) Group values of spontaneous firing rates before and after performing urethane,  $*P < 0.05$  ( $n=13$ ), comparison between the baseline and urethane state. Error bars represent the standard error ( $SE=SD/\sqrt{n}$ , where  $n$  is the number of subjects).



**Fig. 2** Distributions of mean ISI obtained before (a) and after (b) applying 10 mmol/L urethane  
ISI lasting > 2000 ms were ignored.

对自发放电 ISI 的非线性动力学分析表明, 乌拉坦作用后 ISI 的熵值显著降低, 即从  $(1.63 \pm 0.10)$  降低到  $(1.03 \pm 0.13)$  ( $P < 0.001$ ,  $n=13$ , 图 3a), 表明其复杂度显著下降. DFA 分析的结果说明, 表征其

时序 ISI 的长时程相关性的指标, 即标度指数(scale exponents)在乌拉坦作用后明显降低. 其中基础值的标度指数为  $(0.74 \pm 0.04)$ , 而乌拉坦作用后降为  $(0.56 \pm 0.03)$  ( $P < 0.05$ ,  $n=13$ , 图 3b).

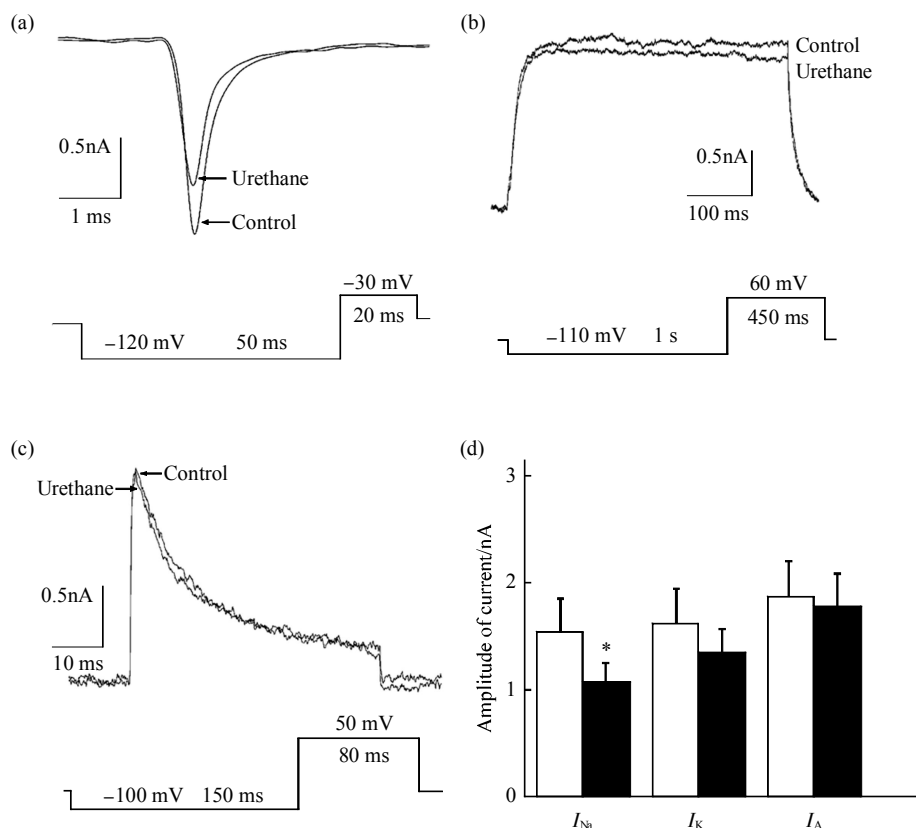


**Fig. 3 Inhibitive effects of 10 mmol/L urethane on nonlinear characteristics of spontaneous firing of hippocampal CA1 pyramidal neurons in rats**

(a) Group values of SampEn of ISI before and after applying 10 mmol/L urethane,  $**P < 0.001$  ( $n=13$ ), comparison between the baseline and urethane state. (b) Group values of scale exponents of DFA before and after using 10 mmol/L urethane,  $P < 0.05$  ( $n=13$ ), comparison between the baseline and urethane state. Error bars represent the standard error ( $SE=SD/\sqrt{n}$ , where  $n$  is the number of subjects).

### 2.2 乌拉坦对通道电流的作用

将细胞的膜电位钳制在  $-70$  mV, 先给  $50$  ms 的  $-120$  mV 超极化刺激后给  $20$  ms 的  $-30$  mV 去极化刺激记录  $I_{Na}$ , 当给予  $10$  mmol/L 乌拉坦后,  $I_{Na}$  从  $(1.54 \pm 0.32)$  mV 降低到  $(1.07 \pm 0.18)$  mV, 减小了  $(30.64 \pm 3.02)\%$  ( $P < 0.05$ ,  $n=12$ , 图 4a). 将细胞的膜电位钳制在  $-70$  mV, 先给  $1$  s 的  $-110$  mV 超极化刺激后给  $450$  ms 的  $+60$  mV 去极化刺激记录  $I_K$ , 在给予了  $10$  mmol/L 乌拉坦后,  $I_K$  从  $(1.62 \pm 0.32)$  mV 降到  $(1.34 \pm 0.22)$  mV, 减小了  $(16.59 \pm 4.02)\%$ , 但差异不明显 ( $P > 0.05$ ,  $n=10$ , 图 4b). 将细胞的膜电位钳制在  $-70$  mV, 先给  $150$  ms 的  $-110$  mV 超极化刺激后给  $80$  ms 的  $+50$  mV 去极化刺激记录  $I_A$ , 发现, 在  $10$  mmol/L 乌拉坦作用下所记录的  $6$  个神经元中,  $I_A$  从  $(1.87 \pm 0.34)$  mV 变为  $(1.78 \pm 0.31)$  mV, 仅减小了  $(4.34 \pm 1.12)\%$  ( $P > 0.05$ ,  $n=6$ , 图 4c). 图 4d 给出了以上  $3$  种离子通道电流  $I_{Na}$ ,  $I_K$  和  $I_A$  在乌拉坦作用前后的统计学变化.



**Fig. 4 Effects of 10 mmol/L urethane on  $I_{Na}$ ,  $I_K$  and  $I_A$**

(a)  $I_{Na}$ . (b)  $I_K$ . (c)  $I_A$ . (d) Group values of  $I_{Na}$  ( $n=12$ ),  $I_K$  ( $n=10$ ) and  $I_A$  ( $n=6$ ) before and after applying  $10$  mmol/L urethane,  $*P < 0.05$ , comparison between the baseline and urethane state. □: Control; ■: Urethane.

### 3 讨 论

本文从线性和非线性两个方面探讨了乌拉坦对 Wistar 大鼠海马 CA1 锥体神经元自发放电的抑制作用和潜在的生理机制。首先, 乌拉坦使神经元自发放电的频率明显降低, 这与 Mercer 等<sup>[5]</sup>在 1978 年研究发现的乌拉坦抑制在体海马神经元自发放电频率的结果是一致的。

乌拉坦对自发放电频率的抑制可能是通过对钠通道的抑制实现的。已有文献报道, 乌拉坦对突触传递并没有作用<sup>[3]</sup>, 所以神经元自发放电主要由其自身特性所影响。其中, 电压门控钠通道和钾通道都参与了自发放电的调控。Shuai 等<sup>[4]</sup>也有类似的实验结果, 在 ACSF 中用“无钙离子”造成突触传递的抑制, 则自发放电完全由自身引起, 这时钠通道和钾通道的任何变化都会引起海马 CA1 锥体神经元自发放电频率的改变, 增加内向的钠电流或降低外向的钾电流都会使放电的频率升高。本研究对钠、钾电流的检测证明, 10 mmol/L 乌拉坦可以有效地抑制  $I_{Na}$ , 但对  $I_K$  和  $I_A$  的抑制作用不显著, 所以对自发放电频率的抑制可能主要与  $I_{Na}$  的降低密切相关, 即通过降低  $I_{Na}$  提高了放电的阈值。

传统观点认为, 放电频率携带着自发放电的信息, 平均放电频率的高低表示信号的强弱, 而放电串中动作电位 ISI 的变异被认为是噪声<sup>[15]</sup>, ISI 序列常常被认为是随机序列。因此, 分析神经元放电的 ISI 序列往往仅基于统计学手段。随着非线性动力学在神经科学领域的广泛应用, 已经发现神经元放电的节律表现出复杂的非线性动力学特性<sup>[6]</sup>。本文的研究结果也证明了这一点。首先, 对 ISI 序列的非线性动力学分析结果指出, 在 10 mmol/L 浓度的乌拉坦作用下 ISI 序列的熵值明显变小, 说明麻醉药使自发放电时间序列的复杂度显著降低。已有的文献报道了在麻醉药作用下某些重要的生理参数的变化, 其结论与我们的有相似之处。如有研究发现当给予麻醉药后脑电信号的熵值显著下降, 而且熵值的变化对从清醒状态转为非清醒状态非常敏感<sup>[7]</sup>。我们认为, 在乌拉坦的作用下神经元自发放电时序的复杂度降低, 可能是由于在麻醉作用后参与自发放电的离子通道(如钠通道)的活动数量减少, 或作用水平降低等多种因素所致, 从而导致对应的动力学系统复杂度的降低。这类似于 Gifani 等<sup>[8]</sup>对人脑电信号的研究, 他们发现, 给予麻醉药后熵值显著降低, 而且认为熵的降低是因为麻醉药

作用后, 脑部激活的部位跟清醒状态相比数量上有所减少或者活动状态有所下降所引起的。在清醒状态下, 活动的部位比较多, 所以神经元活动所对应的动力学系统的复杂度相对较高; 而当麻醉药起作用后, 活动的部位减少, 或者活动力下降, 从而导致熵值降低。

时间序列的长时程相关性与其分形特征相关, 而 DFA 方法常被用来表征 ISI 序列的长时程相关性。当 DFA 的标度指数  $\alpha$  值为 0.5 时说明序列是白噪声, 即独立过程, 当大于 0.5 而小于 1.0 时说明时间序列具有持续的长时程相关性或其对应的动力学系统是具有分形特征的<sup>[9]</sup>。其中, 在 0.5 与 1.0 之间的范围内, 标度指数的值越大, 时间序列的长时程相关性越强。乌拉坦作用前后的 DFA 标度指数都显著大于 0.5, 说明乌拉坦作用前后海马 CA1 锥体神经元的自发放电均具有长时程相关性, 或者说由自发放电信号构成的动力学系统具有分形特征。长时程相关性的存在证明了放电模式是具有某种“记忆”的或“历史”的, 即在距离相对较远的两个放电之间存在着某种关联, 或者说它们之间不是完全独立的。这个结果与 Bhattacharya 等<sup>[10]</sup>的报道一致, 在 2005 年他们首次发现了在人类海马-杏仁核部位神经元的自发放电存在长时程相关性。Lowen 等<sup>[20]</sup>报道了神经元或非神经元的细胞, 突触前膜神经递质的释放具有分形特征, 即具有长时程相关性, 并且这种属性在神经信号的传导中具有普遍意义。突触前膜神经递质释放的长时程相关性应该与神经元自发放电活动过程中的长时程相关性的产生具有一定的关联。我们在实验中发现给予乌拉坦后 DFA 显著降低, 说明乌拉坦使海马 CA1 锥体神经元自发放电活动的长时程相关性减弱。虽然已有的研究认为乌拉坦对突触传递没有影响<sup>[3]</sup>, 但并没有证据说明乌拉坦不降低突触前膜神经递质释放的长时程相关性。因此, 我们仍然可以推测乌拉坦可能在某种程度上弱化了其分形特征, 或部分地降低了其长时程相关性。与此同时, 乌拉坦明显地抑制了神经元自身, 这两种因素的整合可能导致乌拉坦对神经元自发放电活动长时程相关性的抑制。

我们已经报道了肾交感神经放电具有长时程相关性, 而且麻醉药可以使这一非线性特征显著降低<sup>[11, 13]</sup>。本文又进一步证实麻醉对中枢神经系统神经元自发放电也具有类似的作用。Goldberger 等<sup>[21]</sup>认为, 长时程相关性可以防止信号的过渡模式锁

定, 这样就可以保证机体对环境出现意外变化时的功能性应答. 因此, 我们的结果说明了麻醉状态下机体对环境变化或外部干扰的应答力出现了明显减弱的趋势.

非线性分析方法的应用, 使我们能更全面深入地了解乌拉坦对神经元自发放电规律的影响. 实验发现, 乌拉坦不仅降低了自发放电的频率, 而且对自发放电的非线性特征具有显著影响, 即降低了其复杂度, 弱化了其长时程相关性. 更进一步, 通过乌拉坦对离子通道电流影响的研究, 探讨了乌拉坦对自发放电作用的离子机制和基础, 进而更深入地了解了乌拉坦的作用机制.

### 参 考 文 献

- 1 Fujiwara N, Higashi H, Nishi S, *et al.* Changes in spontaneous firing patterns of rat hippocampal neurons induced by volatile anaesthetics. *J Physiol*, 1988, **402**: 155~175
- 2 Antkowiak B, Heck D. Effects of the volatile anesthetic enflurane on spontaneous discharge rate and GABA-mediated inhibition of Puiknje cells in rat cerebellar slices. *J Neurophysiol*, 1997, **77**(5): 2528~2538
- 3 Sceniak M P, Maciver M B. Cellular action of urethane on rat visual cortical neurons *in vitro*. *J Neurophysiol*, 2006, **95**(6): 3865~3874
- 4 Shiraishi M, Harris R A. Effects of alcohols and anesthetics on recombinant voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, **310**(2): 987~994
- 5 Mercer L F Jr, Remley N R, Gilman D P. Effects of urethane on hippocampal unit activity in the rat. *Brain Res Bull*, 1978, **3**(5): 567~570
- 6 Cohen I, Miles R. Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges *in vitro* hippocampus. *J Physiol*, 2000, **524**(Pt2): 485~502
- 7 MacVicar B A. Depolarizing prepotentials are Na<sup>+</sup> dependent in CA1 pyramidal neurons. *Brain Res*, 1985, **333**(2): 378~381
- 8 Fricker D, Verheugen J A, Miles R. Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 1999, **517**(Pt3): 791~804
- 9 Liu Z W, Lei T, Zhang T, *et al.* Peroxynitrite donor impairs excitability of hippocampal CA1 neurons by inhibiting voltage-gated potassium currents. *Toxicology Letters*, 2007, **175**(1~3): 8~15
- 10 Richman J, Moorman J. Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. *Am J Physiol*, 2000, **278**(6): 2039~2049
- 11 Li Y T, Qiu J H, Yan R, *et al.* Weakened long-range correlation of renal sympathetic nerve activity in Wistar rats after anaesthesia. *Neurosci Lett*, 2008, **433**(1): 28~32
- 12 Peng C K, Havlin S, Stanley H E, *et al.* Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos*, 1995, **5**(1): 82~87
- 13 Li Y T, Qiu J H, Yang Z, *et al.* Long-range correlation of renal sympathetic nerve activity in both conscious and anaesthetized rats. *J Neurosci Methods*, 2008, **171**(1): 131~136
- 14 Shuai J, Bikson M, Hahn P J, *et al.* Ionic mechanisms underlying spontaneous CA1 neuronal firing in Ca<sup>2+</sup> free solution. *Biophys J*, 2003, **84**(3): 2099~2111
- 15 Shadlen M N, Newsome W T. Noise, neural codes and cortical organization. *Curr Opin Neurobiol*, 1994, **4**(4): 569~579
- 16 Ren W, Hu S J, Xu J X. Period-adding bifurcation with chaos in the inter spike intervals generated by an experimental neural pacemaker. *Int J Bifurcation Chaos*, 1997, **7**(10): 709~712
- 17 Sleigh J W, Steyn-Ross D A, Steyn-Ross M L, *et al.* Cortical entropy changes with general anaesthesia: theory and experiment. *Physiol Meas*, 2004, **25**(4): 921~934
- 18 Gifani P, Rabiee H R, Hashemi M H, *et al.* Optimal fractal-scaling analysis of human EEG dynamic for depth of anesthesia quantification. *J Frank Ins*, 2007, **344**(3~4): 212~229
- 19 Bhattacharya J, Edwards J, Mamelak A N, *et al.* Long-range temporal correlations in the spontaneous spiking of neurons in the hippocampal-amygdala complex of humans. *Neuroscience*, 2005, **131**(2): 547~555
- 20 Lowen S B, Cash S S, Poo M, *et al.* Quantal neurotransmitter secretion rate exhibits fractal behavior. *J Neurosci*, 1997, **17**(15): 5666~5677
- 21 Goldberger A L, Peng C K, Hausdorff J, *et al.* Fractal Geometry in Biological Systems: An Analytical Approach. Boca Raton: CRC Press, 1996. 249~266

## Effects and Mechanism of Urethane on Spontaneous Firing of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in Rats\*

LEI Ting<sup>1)</sup>, YAN Rui<sup>1)</sup>, LI Ya-Tang<sup>1)</sup>, YANG Zhuo<sup>2)\*\*</sup>, ZHANG Tao<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China;

<sup>2)</sup>College of Medicine Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** To obtain more information related to the inhibitive effect of anesthetic on spontaneous firing of neurons, several kinds of experimental data were collected before and after applying 10 mmol/L urethane, which included spontaneous firing, sodium current ( $I_{Na}$ ), delayed rectifier potassium current ( $I_K$ ) and transient outward potassium current ( $I_A$ ) of hippocampal CA1 pyramidal neurons in rats. All of the experiments were performing on hippocampal slices *in vitro*. Sample entropy (SampEn) and detrended fluctuation analysis (DFA) were employed to measure the complexity and fractal property of spontaneous firing of neurons. It was found that the spontaneous firing rate was significantly decreased, the entropy of ISI sequence was obviously reduced, and the long-range temporal correlations of ISI sequence were weakened after performing 10 mmol/L urethane. Furthermore,  $I_{Na}$  was significantly inhibited, but  $I_K$  and  $I_A$  were not statistically changed for 10 mmol/L urethane. This suggests that the fractal properties and complexity of underlying dynamics of the system have been reduced by urethane. And the reduction of complexity may because of inhibition of  $I_{Na}$ . The results demonstrate that apparently random fluctuations in neuron spontaneous firing are dictated by a complex deterministic process that imparts “long-term” memory to the dynamic system.

**Key words** urethane, spontaneous firing, sodium channel, potassium channel, complexity, long range temporal correlation

---

\*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2007CB914803) and The National Natural Science Foundation of China (30870827) .

\*\*Corresponding author. Tel: 86-22-23504364

YANG Zhuo. E-mail: zhuoyang@nankai.edu.cn

ZHANG Tao. E-mail: zhangtao@nankai.edu.cn

Received: July 11, 2008 Accepted: August 18, 2008