



海马区锥体神经元轴突高频电刺激 对胞体的影响*

徐义鹏¹⁾ 封洲燕^{1)**} 袁月¹⁾ 胡一凡¹⁾ 叶翔宇¹⁾ 王兆祥^{1,2)}

(¹⁾ 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; ²⁾ 之江实验室, 杭州 311100)

摘要 目的 深部脑刺激 (deep brain stimulation, DBS) 利用持续的电脉冲高频刺激 (high-frequency stimulation, HFS) 调控神经元的活动, 可望用于治疗更多脑疾病。为了深入了解 HFS 的作用机制, 促进 DBS 的发展, 本文研究轴突 HFS 在引起轴突阻滞期间神经元胞体的改变。**方法** 在麻醉大鼠海马 CA1 区的锥体神经元轴突上施加脉冲频率为 100 Hz 的 1 min 逆向高频刺激 (antidromic high-frequency stimulation, A-HFS)。为了研究胞体的响应, 利用线性垂直排列的多通道微电极阵列, 记录刺激位点上游 CA1 区锥体神经元胞体附近各结构分层上的诱发电位, 包括 A-HFS 脉冲诱发的逆向群峰电位 (antidromic population spike, APS) 以及 A-HFS 期间施加的顺向测试脉冲诱发的顺向群峰电位 (orthodromic population spike, OPS), 并计算诱发电位的电流源密度 (current-source density, CSD), 用于分析 A-HFS 期间锥体神经元胞体附近动作电位的生成和传导。**结果** 锥体神经元轴突上的 A-HFS 会减小胞体对于逆向和顺向兴奋的传导速度。并且, 这种胞体变化的发生和恢复都比 A-HFS 诱导的轴突阻滞要缓慢。**结论** 轴突上的持续高频刺激可以引起胞体产生变化, 这种变化可能是胞体附近细胞膜电位改变所致。此发现有助于深入揭示脑神经系统电刺激的作用机制。

关键词 高频刺激, 群峰电位, 电流源密度, 锥体神经元, 传导速度

中图分类号 R338, R318

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0242

深部脑刺激 (deep brain stimulation, DBS) 利用持续的电脉冲高频刺激 (high-frequency stimulation, HFS) 治疗某些脑疾病, 对于控制帕金森病和肌张力障碍等疾病具有独特的疗效^[1-2]。理论上, 通过这种细胞外施加的电刺激改变神经元活动, 可以对脑神经系统产生各种调控作用, 以治疗更多脑疾病。但是, 目前 DBS 的应用范围还很有限。深入了解电刺激对于神经元的作用, 可以为拓展 DBS 的应用提供线索。

DBS 的作用机制尚无定论, 它所采用的大于 50 Hz 的高频脉冲刺激对于神经元及其网络可以产生兴奋、抑制和去同步等调控作用, 其中由轴突响应而产生的神经网络效应起着重要作用^[1, 3]。在胞体、树突和轴突等神经元的组成结构中, 轴突比其他结构更容易被 DBS 所采用的窄脉冲电刺激所激活^[4-5]。这意味着, DBS 激活神经元时, 动作电位 (action potential, AP) 通常始于轴突。即便刺激电极位于胞体聚集的神经核团部位, 除了少数胞体紧

贴刺激电极的神经元以外, 由于轴突的兴奋阈值较低, 其他神经元上刺激诱导的 AP 都会先始于轴突。轴突上产生的 AP 可以沿轴突向两侧传导出去, 对于更大范围的神经网络产生作用。传向轴突末梢被称为顺向传导, 经此传导的 AP 可以激活轴突末梢的突触, 进而兴奋或者抑制突触后的神经元。而传向胞体被称为逆向传导, AP 会途经轴丘, 再到达胞体, 甚至还可以继续传向树突^[6-7]。DBS 所采用的持续 HFS 期间的逆向兴奋传导对于胞体是否会产生影响, 尚不清楚。

神经元轴突对于持续 HFS 的响应与对于单个或少量脉冲刺激的响应不同。HFS 会逐渐引起轴突的去极化阻滞, 使轴突无法跟随每个脉冲, 只能间歇地跟随部分脉冲产生 AP^[8-9], 因此逆向传导至胞

* 国家自然科学基金 (30970753) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13515711296, E-mail: fengzhouyan@zju.edu.cn

收稿日期: 2022-05-26, 接受日期: 2022-07-27

体的AP频率会降低,每个脉冲能够诱发胞体发放的神经元数量也减少。例如,DBS常用脉冲频率为90~185 Hz^[10-11],属于此范围的100 Hz持续刺激期间,逆向诱发的神经元数量可以减少至初始值的~20%^[12-13]。在这种轴突阻滞的情况下,HFS是否还会引起胞体变化尚不明了。之前的研究表明,持续的轴突HFS结束之后,随着轴突阻滞的逐渐消除,胞体响应轴突兴奋的恢复过程有“快”和“慢”两个阶段^[13-14]。这两种恢复的机制尚不清楚。推测除了直接受刺激的轴突以外,慢恢复可能与持续轴突刺激引起神经元其他结构的改变有关,包括胞体附近的改变。

为了验证上述推测,阐明持续轴突HFS对于胞体的影响,在麻醉大鼠海马CA1区的锥体神经元轴突上施加高频脉冲刺激,采用多通道微电极阵列,记录锥体神经元胞体附近各结构分层上的诱发电位。并利用电流源密度(current source density, CSD)分析法^[6, 13],考察轴突HFS期间胞体附近动作电位的生成和传导的变化,从电生理角度,揭示轴突上施加的HFS对于神经元胞体的影响。虽然轴突在脑组织中的总体容积占比较大,但它非常细小,纯粹的轴突刺激及其响应的记录在许多脑区难以实现。而海马脑区的神经元排列整齐,轴突、胞体和树突各自位于清晰的分层之中,且排列紧密,有利于实现轴突刺激以及神经元各结构信号的记录和分析。此外,海马区是癫痫和阿尔茨海默病等的主要病灶脑区,是DBS治疗这些疾病的潜在刺激目标之一^[15-16]。因此,本文选择海马脑区作为实验对象。研究结果有助于深入揭示HFS的作用机制,为促进DBS的发展提供信息。

1 方 法

1.1 动物手术和电极植入

本文的动物实验方案经浙江大学动物保护与伦理委员会批准。成年Sprague-Dawley大鼠(250~350 g)腹腔注射氨基甲酸乙酯(urethane, 1.25 g/kg)麻醉后,固定于大鼠脑立体定位仪(Stoelting Co., USA)。切开头部皮肤,揭除左侧部分颅骨。将一根16通道记录电极阵列(NeuroNexus Technologies, USA)插入左脑海马CA1区(前囟后3.5 mm,旁开2.7 mm,深~2.5 mm),用于记录CA1区锥体神经元产生的诱发电位(图1a的记录电极(recording electrode, RE))。再将两根同芯双极电极(CBCSG75, FHC Inc., USA)分别插入

至CA1区的输入轴突通路Schaffer侧支(前囟后2.2 mm,旁开2.0 mm,深~2.8 mm)和输出轴突纤维Alveus(前囟后4.8 mm,旁开2.7 mm,深~2.0 mm)。通过这两根刺激电极(图1a的顺向刺激电极(orthodromic-stimulation electrode, OSE)和逆向刺激电极(antidromic-stimulation electrode, ASE)),可以分别顺向和逆向激活CA1区锥体神经元。电极插入的过程中,在线性垂直排列的间距50 μ m的16个记录通道上,可以记录海马CA1区各分层上独特的诱发电位波形以及神经元自发的锋电位信号^[6]。根据这些信号,调节3个电极的位置,将电极推入至正确的位点。实验数据采集期间,电极位置保持不变。

1.2 刺激与记录

刺激脉冲由多通道可编程刺激器(Model 3800, A-M Systems Inc., USA)产生,是每相脉宽为0.1 ms的先负后正的双相对称电流方波脉冲。脉冲强度为0.3~0.4 mA,使得单个脉冲诱发的群峰电位的幅值达到可诱发最大幅值的3/4左右。在CA1区的Alveus上施加逆向高频刺激(antidromic high-frequency stimulation, A-HFS),脉冲频率设为DBS常用频率90~185 Hz^[10-11]范围内的100 Hz(即脉冲间隔为10 ms),时长为1 min。A-HFS结束后以10 s间隔施加单脉冲测试。各脉冲逆向诱发的群峰电位(antidromic population spike, APS)用于考察A-HFS期间神经元状态的变化以及A-HFS结束后的恢复过程。

在部分A-HFS的后期,即最后20 s,每隔20个脉冲(即0.2 s)插入一个延长一倍的间隔(gap=20 ms),共计插入100个gap,用于考察短促恢复后神经元活动的变化。在另一部分A-HFS期间,每隔5 s在Schaffer侧支上施加一个顺向测试刺激(orthodromic test stimulation, OTS),其顺向诱发的群峰电位(orthodromic population spike, OPS)用于考察A-HFS对于锥体神经元胞体响应顺向输入的影响。

记录电极采集的神经电信号用16通道放大器(Model 3600, A-M Systems Inc., USA)放大100倍,频率范围设为0.3~5 000 Hz。再用PowerLab数据采集仪(Model PL3516, AD Instruments Inc., Australia)进一步放大,并以每个通道20 kHz的频率采样数据。

1.3 数据分析

本文利用CSD分析神经元对于脉冲刺激的响

应, 定量描述神经元群体的跨膜电流变化^[17]。利用胞外空间上记录的局部场电位 (local field potential, LFP) 计算 CSD^[18-19]: 设 t 时刻胞外位点 (x, y, z) 记录的 LFP 为 $V(t, x, y, z)$, 且 x 、 y 和 z 这 3 个方向的电导率分别为 σ_x 、 σ_y 和 σ_z ; 那么, t 时刻位点 (x, y, z) 处的 CSD 为:

$$\text{CSD}(t, x, y, z) = -[\sigma_x \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \sigma_y \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} + \sigma_z \frac{\partial^2 V}{\partial z^2}] \quad (1)$$

CSD 小于 0 表示电流流向胞内, 在胞外形成电流穴 (sink); 大于 0 则表示电流流出细胞, 在胞外形成电流源 (source)。在神经元的排列具有清晰分层结构的脑区, 如海马 CA1 区 (图 1b), 可以计算沿神经元轴向 (即 z 方向) 的一维 CSD, 用于分析神经元群体同步活动期间各分层上的跨膜电流。此外, 胞外空间电导率的变化对 CSD 的影响很小, 可看作常数^[6, 19]。而且, 本文使用 CSD 的相对值, 因此, 计算中省略电导率。这样, 海马 CA1 区的一维 CSD (t, z) 的计算可简化为如下二阶差分:

$$\text{CSD}(t, z) = \frac{[2V(t, z) - V(t, z + N\Delta z) - V(t, z - N\Delta z)]}{(N\Delta z)^2} \quad (2)$$

式中, $V(t, z)$ 是 t 时刻 z 深度的 LFP。 Δz 为垂直排列的微电极阵列中两相邻记录通道的间距, 为 50 μm , 它也是 CSD 计算的空间分辨率。 N 取 2, 使计算 CSD 的 LFP 采样间距为较合适的 100 μm ^[17]。在 16 个通道的记录信号中, 选取位于胞体层上和下各 200 μm 范围内的共 9 个通道的记录信号, 用于计算 CA1 区从基树突 (S. ori.)、胞体 (Pyr.) 到顶树突 (S. rad.) 的各分层上的 CSD (图 1b)。

APS 及其 CSD 电流穴在胞体附近为最大^[6], 据此确定位于 CA1 区胞体层的记录通道, 并将此通道的位置设为 $z=0$ 。位于胞体以上的轴丘和基树突的记录通道的 z 值为负, 而胞体以下顶树突区域的为正。

此外, 计算群峰电位诱发波 (APS 和 OPS) 的幅值 (amplitude), 用于比较脉冲激活的锥体神经元数量^[20-21]。其中, APS 幅值为下降相的电位差, OPS 的幅值为下降相与上升相的平均电位差。并且, 计算 APS 和 OPS 及其 CSD 电流穴的潜伏期 (latency), 分别为刺激脉冲与诱发波的负峰谷点或者与电流穴谷点之间的时间差, 用于考察神经元群体响应脉冲刺激的速度。并计算 CSD 电流穴的谷点在 $z=-50\sim+50\mu\text{m}$ 之间的传导速度, 用于考察锥

体神经元胞体附近的动作电位传导速度^[22-23]。

由于 A-HFS 期间的 APS 迅速减小, 为了提高信噪比, 除了首个诱发波之外, 其余时间对于 APS 及其 CSD 电流穴的计算, 都采用每秒的平均值。也就是, 先将每秒刺激诱发的 100 个电位波形叠加平均, 再计算各指标, 作为该秒末的数据。同样, 对于 A-HFS 后期插入 100 个 gap (20 ms) 的前、后的诱发波也分别进行叠加平均, 再计算各指标。A-HFS 期间 OTS 诱发的 OPS 波以及 A-HFS 结束后测试脉冲诱发波的指标都独立计算。

统计数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差, “ n ” 表示实验次数, 即大鼠个数。使用重复测量方差分析 (ANOVA) 和事后两两比较 (post-hoc Bonferroni test) 来检验多组数据之间差异的显著性。使用配对 t 检验 (paired t -test) 判断配对数据组之间差异的显著性。

2 结 果

2.1 A-HFS期间APS的幅值和潜伏期的变化进程不一致

为了考察轴突 A-HFS 期间锥体神经元胞体附近电活动的变化, 在此类神经元的轴突, 即海马 CA1 区的 Alveus 上, 施加持续 1 min 的 100 Hz 刺激。在胞体层的记录信号中, 刺激起始时的每个脉冲都可以诱发大幅值 APS (图 1b)。随后 APS 迅速衰减, 约 5 s 之后变成小幅值 APS, 直至刺激结束。结束后约 2 min, 测试脉冲诱发的 APS 恢复至基线水平 (图 1b 右上所示的各期 APS 叠合图)。在 APS 幅值的总变化量中 (图 1c 左图), 起始 0~5 s 期间的变化量占比 (92 $\pm$ 4.3) % 显著大于 5~30 s 的 (5 $\pm$ 3.0) % 和 30~60 s 的 (3 $\pm$ 2.0) % (图 1c 右图, ANOVA, $P<0.01$, $n=10$)。同时, APS 的潜伏期随着刺激的持续而不断延长 (图 1d 左图)。在其总变化量中, 起始 0~5 s 期间的变化量占比 (56 $\pm$ 5.6) % 也显著大于 5~30 s 的 (32 $\pm$ 6.5) % 和 30~60 s 的 (12 $\pm$ 3.7) %, 后两者之间也存在显著差别 (图 1d 右图, ANOVA, $P<0.01$, $n=10$)。

APS 幅值的大小反映了同步发放动作电位的锥体神经元胞体数量的多少^[20-21]。A-HFS 初期 APS 幅值的迅速减小是由于轴突发生了去极化阻滞, 致使胞体发放量减少^[8, 12-13]。轴突阻滞也会降低兴奋的传导速度^[22, 24], 使 APS 潜伏期变长。但是, 将幅值和潜伏期的变化相比较, 在 A-HFS 的 5~60 s 期间, 潜伏期变化的占比 (44 $\pm$ 5.1) % 显著大于幅

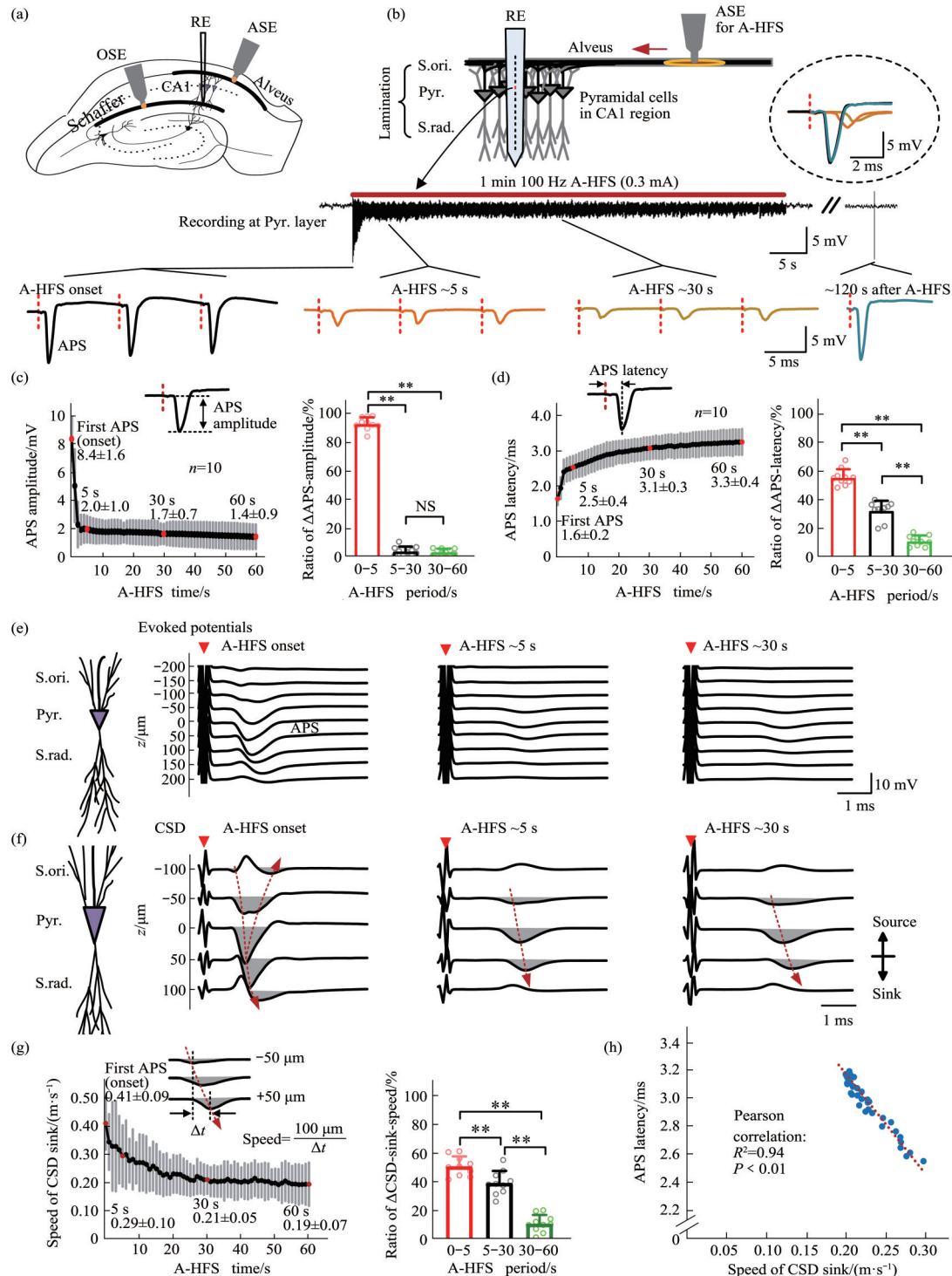


Fig. 1 Changes of the APS potentials and their CSD during 100 Hz A-HFS

(a) Schematic diagram of the locations of recording electrode (RE) in hippocampal CA1 region, antidromic-stimulation electrode (ASE) in the alveus and orthodromic-stimulation electrode (OSE) in the Schaffer collaterals. (b) Schematic diagram of A-HFS application (upper) and an example of recording in the CA1 pyramidal layer (lower) during 1 min of 100 Hz A-HFS with a pulse intensity of 0.3 mA (denoted by the red bar). The APS waveforms at 0 s (onset), ~5 s and ~30 s of A-HFS as well as ~2 min after A-HFS are expanded in the insets with red dotted lines indicating the removed stimulation artifacts. The APS waveforms at these four time points are also overlapped in the upper right corner. (c, d) Changes of the APS amplitudes (c, left) and APS latencies (d, left) during the A-HFS as well as the ratio of Δ APS-amplitude (c, right) and the ratio of Δ APS-latency (d, right) during the three different periods of 0–5, 5–30 and 30–60 s of A-HFS. (e) Examples of 9 channels of evoked potentials around the CA1 pyramidal layer recorded simultaneously by the recording contacts with a 50 μ m interval at the three different time points of A-HFS. The red inverted triangles denote the stimulation artifacts. (f) Current source density (CSD) profiles derived from the evoked potentials shown in (e). The CSD sinks are shaded. The red dotted curves with an arrow denote the propagation of the trough of CSD sinks. (g) Changes of the propagation speeds of CSD sinks (left) and the ratio of Δ CSD-sink-speeds (right) during three different periods of A-HFS. (h) Pearson correlation of the mean APS latencies per second with the mean propagation speeds of CSD sinks per second during the 5–60 s period of A-HFS (56 pairs of data from (d) and (g)). The coefficient R^2 was 0.94 ($P < 0.01$). In (c), (d) and (g): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS, not significant; one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni test, $n = 10$.

值的 $(8 \pm 2.5) \%$ (paired *t*-test, $P < 0.01$, $n = 10$)。这表明, 在神经元发放量较为稳定时, 潜伏期仍然有较大增加。这种变化可能是胞体附近电活动的传导速度变慢引起。为了验证此推测, 下面考察胞体附近的CSD电流穴及其传导速度。

利用胞体层上下9个通道记录的A-HFS各期的诱发电位(图1e)计算CSD(图1f), 其电流穴的传导反映动作电位的传导。A-HFS首个诱发电位的电流穴始于胞体层上方($z = -100 \mu\text{m}$), 即轴丘附近; 然后向下, 依次向胞体和顶树突传导, 同时也通过胞体向上传向基树突(图1f左图)。这种传导与前人的研究结果一致^[6]。A-HFS持续~5 s后(图1f中图和右图), 电流穴减小。但是, 电流穴的起始位置和传导方向保持不变, 始终从轴丘经胞体传向树突。而电流穴的传导速度减慢(图1g左图), 其变化量的占比显示(图1g右图), 5~60 s期间为 $(51 \pm 6.9) \%$, 显著大于APS幅值的变化量占比 $(8 \pm 2.5) \%$ (paired *t*-test, $P < 0.01$, $n = 10$)。而且, 在此期间, 电流穴的每秒平均传导速度与APS每秒平均潜伏期呈显著的负相关(图1h, $R^2 = 0.94$, Pearson correlation, $P < 0.01$)。此结果表明, A-HFS后期APS潜伏期的继续增大可能部分源于胞体附近电流穴传导速度的减小, 而且, 这两者的变化要比APS幅值的变化发生得慢, 由此推测, 它们的恢复速度也有区别。下面考察锥体神经元的变化在刺激间隙和刺激结束后的恢复。

2.2 A-HFS引起的锥体神经元胞体变化的恢复

为了考察胞体变化是否可以快速恢复, 在1 min的100 Hz A-HFS后20 s期间, 每隔20个脉冲删除1个脉冲, 等效于插入延长的gap=20 ms(图2a)。gap后(Post-gap)的首个脉冲诱发APS的幅值要比gap前(Pre-gap)的大数倍。在A-HFS初始2 s之内的APS衰减期找到幅值相当于Post-gap的APS, 记为“Same-amp”APS。“Post-gap”APS之后诱发的APS又会迅速回复到Pre-gap时的水平(图2a第二行)。图2a左下角是A-HFS起始诱发APS、“Same-amp”APS、“Pre-gap”APS和“Post-gap”APS以及A-HFS结束~2 min时的APS的波形叠合图, 可见它们的变化。

如图2b所示, Post-gap APS的幅值 $(5.6 \pm 1.7) \text{ mV}$ 显著小于A-HFS首个脉冲(Onset)诱发的APS幅值 $(10.0 \pm 2.4) \text{ mV}$, 但显著大于Pre-gap的APS幅值 $(1.8 \pm 0.5) \text{ mV}$ (ANOVA, $P < 0.01$, $n = 10$)。这种Post-gap APS的部分恢复与之前报道

的“快恢复”一致^[13]。虽然Post-gap恢复的幅值与A-HFS初期Same-amp时的 $(5.5 \pm 1.7) \text{ mV}$ 相似, 但是, Post-gap的APS潜伏期 $(3.0 \pm 0.23) \text{ ms}$ 却显著大于Same-amp的 $(2.2 \pm 0.30) \text{ ms}$, 而与Pre-gap的 $(3.2 \pm 0.30) \text{ ms}$ 无显著差别(图2c, ANOVA, $P < 0.01$, $n = 10$), 无明显的“快恢复”。间隙gap后APS幅值恢复了变化量的 $(47 \pm 8.2) \%$, 而其潜伏期仅恢复了变化量的 $(13 \pm 3.5) \%$ 。这表明, 神经元发放数量的恢复较快, 而兴奋传导速度的恢复较慢。

根据A-HFS各期(Onset、Same-amp、Pre-gap和Post-gap)的胞体层上、下范围内9个通道记录的诱发电位(图2d), 计算CSD(图2e)。Pre-gap时的CSD电流穴很小, 但经过20 ms的gap后, Post-gap的CSD电流穴恢复许多, 与Same-amp时的大小相似。不过, Post-gap电流穴传导速度 $(0.28 \pm 0.08) \text{ m/s}$ 显著小于Same-amp的 $(0.38 \pm 0.12) \text{ m/s}$, 而与Pre-gap的 $(0.25 \pm 0.05) \text{ m/s}$ 没有显著差别(ANOVA, $P < 0.05$, $n = 10$) (图2f)。间隙gap后CSD传导速度仅恢复了变化量的 $(13 \pm 6.7) \%$ 。这表明, 胞体附近兴奋传导速度的恢复也比兴奋数量的恢复要慢。

A-HFS结束后, 每隔10 s在Alveus上施加单脉冲刺激(图2a第一行), 用于测试APS和CSD的刺激后恢复。A-HFS末与结束后10 s时相比较, APS幅值从 $(1.7 \pm 0.5) \text{ mV}$ 恢复至 $(5.1 \pm 1.5) \text{ mV}$, 为总变化量的 $(39.7 \pm 8.1) \%$ (图2g, $n = 10$); 潜伏期从 $(3.2 \pm 0.3) \text{ ms}$ 恢复至 $(2.4 \pm 0.3) \text{ ms}$, 为总变化量的 $(44.6 \pm 8.5) \%$ (图2h, $n = 10$); CSD电流穴传导速度从 $(0.25 \pm 0.05) \text{ m/s}$ 恢复至 $(0.30 \pm 0.08) \text{ m/s}$, 为总变化量的 $(30.0 \pm 21.2) \%$ (图2i, $n = 10$)。这表明, A-HFS结束后10 s时3个指标的恢复量占比已没有显著差别(ANOVA, $P > 0.05$, $n = 10$)。至A-HFS结束后~2 min时, 它们的恢复均超过90%。

将A-HFS结束后10 s与前述20 ms间隙后的恢复量作比较, 幅值的恢复量占比没有增加, 反而有所回落, 这与之之前报道的结果一致^[12]。而潜伏期和传导速度的10 s恢复量均显著大于20 ms间隙后(图2j, paired *t*-test, $P < 0.05$, $n = 10$)。这些结果表明, 与幅值相比, 潜伏期和胞体CSD传导速度在短间隙内的快恢复较少, 刺激撤除10 s后其恢复量才接近于幅值的恢复量。

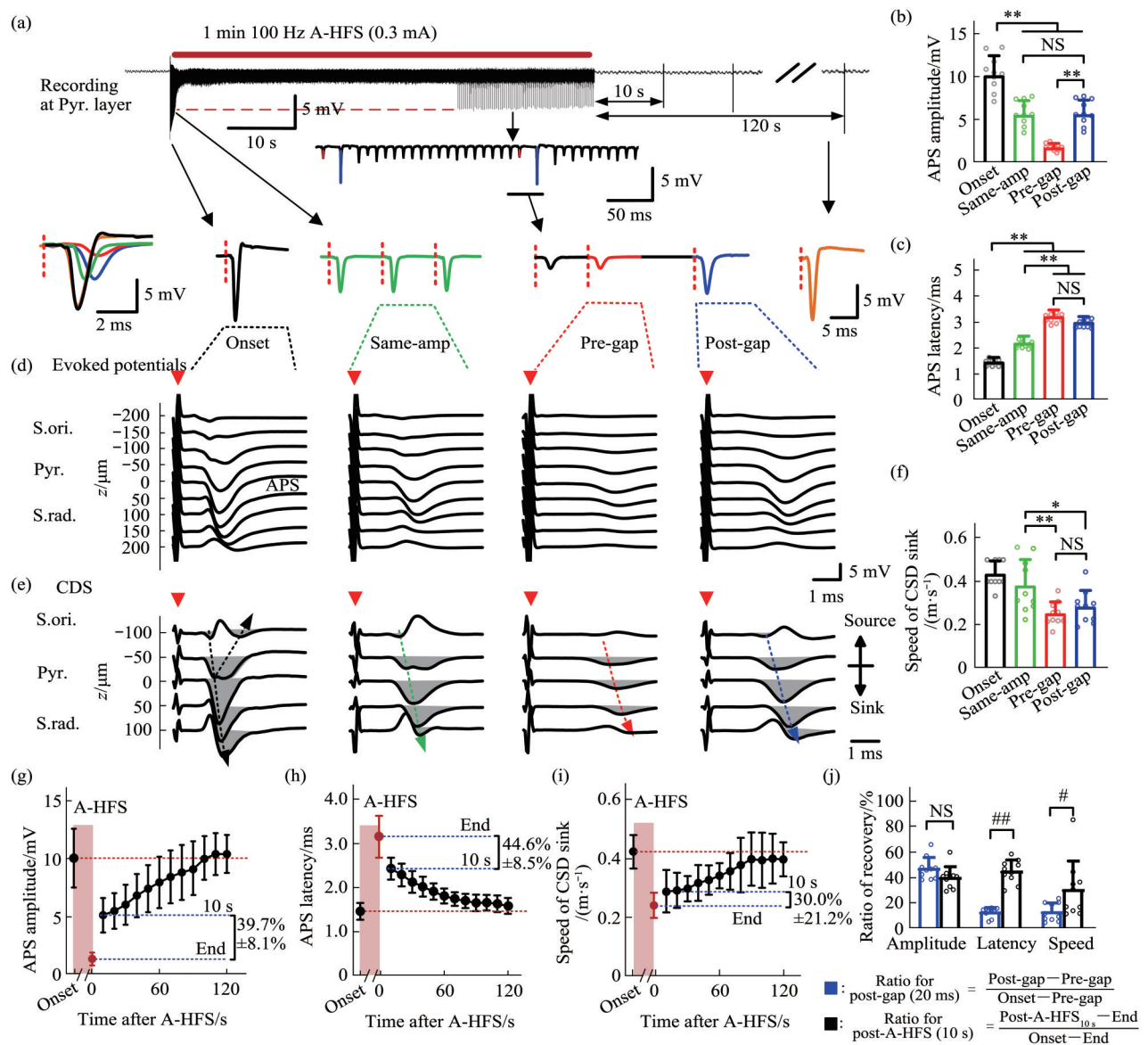


Fig. 2 Comparisons of recovery of APS potentials and their CSD in a short gap and following A-HFS

(a) Example of a recording in the CA1 pyramidal layer during 1-min 100 Hz A-HFS with prolonged gaps (20 ms) inserted every 20 pulses in the late 20 s. The APS waveforms at onset (0 s), Same-amp, preceding a gap (Pre-gap) and post a gap (Post-gap) during A-HFS as well as ~2 min after A-HFS are expanded in the insets. The Same-amp APS was an APS chosen in the initial 2 s of A-HFS with an amplitude similar to the Post-gap APS. The APS waveforms at the five time points are overlapped in the lower left corner. (b, c) Comparisons of the APS amplitudes (b) and the APS latencies (c) among the four time points. (d) Examples of 9 channels of evoked potentials around the CA1 pyramidal layer at the four time points, respectively. (e) CSD profiles derived from the evoked potentials shown in (d). (f) Comparisons of the propagation speeds of CSD sinks among the four time points. (g-i) Changes of the APS amplitude (g), the APS latency (h) and the propagation speed of CSD sinks (i) following the A-HFS. The pink shadows denote the 1-min A-HFS period with the onset data of first A-HFS pulse in the left side and the end data (in red) of last 1-s A-HFS in the right side. (j) Comparison of recovery ratios of amplitude, latency, and speed of CSD sinks after 20 ms gap and after 10 s of A-HFS end. In (b), (c) and (f): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS, not significant, one-way ANOVA with post-hoc Bonferroni test, $n = 10$. In (j): # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, paired t -test, $n = 10$.

上述结果表明, A-HFS可以降低胞体附近逆向兴奋的传导速度, 那么, 胞体的变化是否也会改变锥体神经元对于树突上顺向兴奋输入的响应速度呢? 为解答此问题, 下面进一步考察 A-HFS 期间

顺向诱发电位的变化。

2.3 A-HFS减慢锥体神经元胞体对于树突上顺向输入的响应速度

在 1 min 的 100 Hz A-HFS 期间, 同时在 CA1 区

输入通路 Schaffer 侧支上每隔 10 s 施加一个顺向测试脉冲 OTS, 可在胞体层诱发顺向群峰电位 OPS (图 3a)。A-HFS 期间诱发的 OPS 幅值与基线时没有显著差别 (图 3b)。而 OPS 的潜伏期却显著延

长, 由基线时的 (5.5 ± 0.91) ms 延长至 A-HFS 末的 (6.5 ± 1.21) ms (图 3c, ANOVA, $P<0.01$, $n=10$), A-HFS 结束后约 2 min 时 OPS 潜伏期恢复至基线水平。

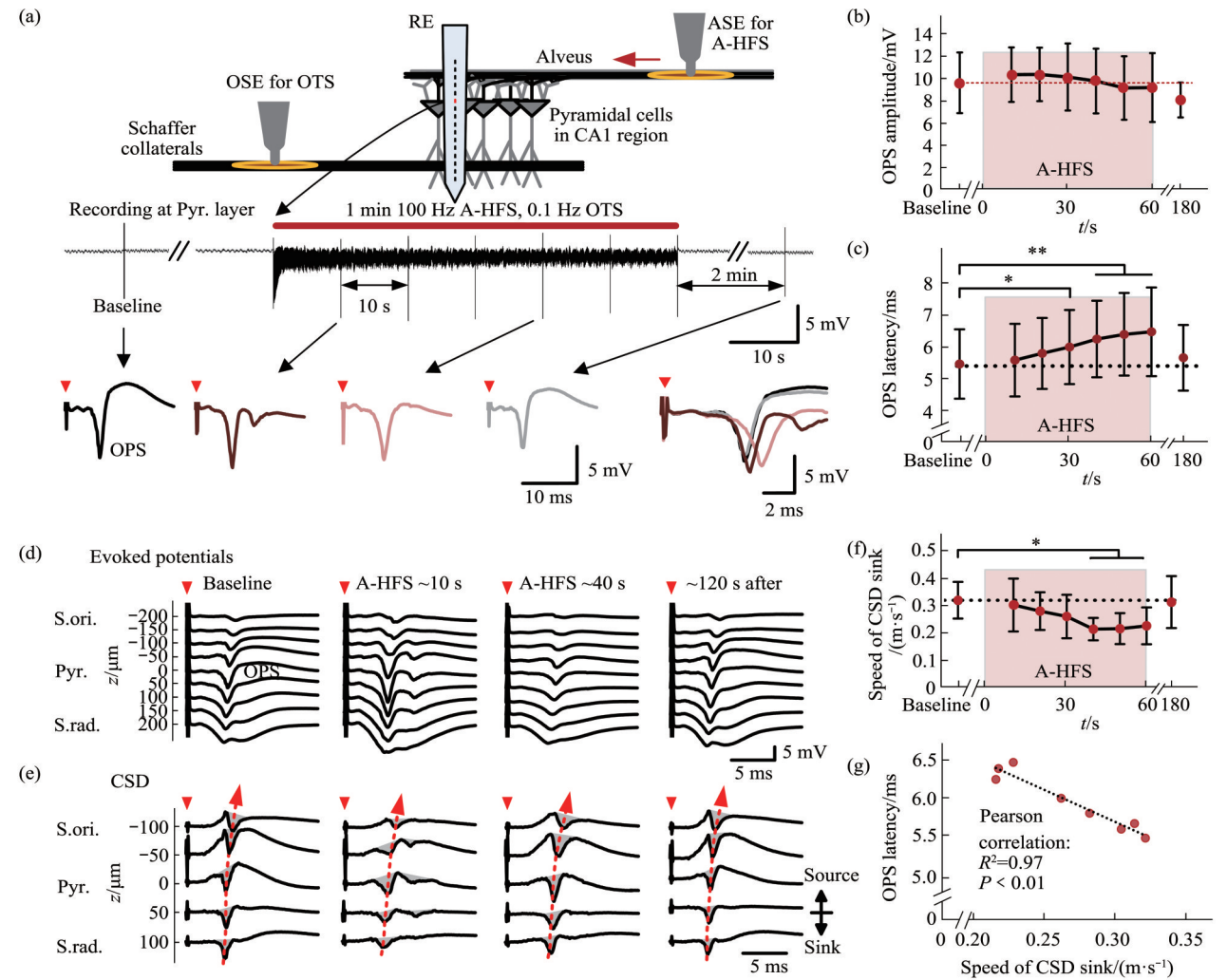


Fig. 3 Responses of CA1 pyramidal cells to orthodromic test stimulations during A-HFS

(a) Schematic diagram of the application of 100 Hz A-HFS with orthodromic test stimulations (OTS) per 10 s (upper) as well as an example of recording in the CA1 pyramidal layer (lower). The expanded insets show the OTS-evoked OPS in baseline before A-HFS, in 10 and 40 s of A-HFS and 2 min following A-HFS. The OPS waveforms at the four time points are also overlapped in the lower right corner. (b, c) Changes of the OPS amplitude (b) and latency (c) before, during and following A-HFS. Pink shadows denote the A-HFS duration. (d) Examples of 9 channels of OTS-evoked potentials around the CA1 pyramidal layer at the four time points, respectively. (e) CSD profiles derived from the evoked potentials shown in (d). (f) Changes of the propagation speeds of CSD sink before, during and following A-HFS. (g) Pearson correlation of the OPS latencies with the propagation speeds of CSD sinks of OPS potentials evoked in the different periods (8 pairs of data from (c) and (f)). The coefficient R^2 was 0.97. In (c) and (f): * $P<0.05$, ** $P<0.01$, repeated-measure ANOVA with post-hoc Bonferroni tests, $n=10$.

根据 CA1 区胞体层上、下范围内 9 个通道记录的顺向诱发电位 (图 3d), 计算胞体层附近的 CSD (图 3e)。顺向诱发电位的 CSD 电流穴都起源于顶树突部位 ($z=100\ \mu\text{m}$), 然后依次传向胞体、轴丘和基树突。其在胞体处的传导速度在 A-HFS 期间

逐渐减小, 由基线时的 (0.32 ± 0.07) m/s 显著减小至 A-HFS 40 s 时的 (0.22 ± 0.04) m/s (图 3f, ANOVA, $P<0.05$, $n=10$), 并维持至 A-HFS 结束。A-HFS 结束后~2 min 时恢复至基线水平。而且, 电流穴传导速度与 OPS 潜伏期呈显著的负相关

(图3g, $R^2=0.97$, Pearson correlation, $P<0.01$)。这表明,轴突上的A-HFS虽然没有显著影响胞体响应顺向激活的能力,但使胞体传导顺向兴奋的速度显著减小。

3 讨 论

本文的大鼠在体海马CA1区实验结果表明,在持续的A-HFS期间,虽然直接受到高频脉冲刺激的是轴突,且轴突阻滞已削减锥体神经元胞体的激活量,但胞体的状态还是会发生变化。CSD电流穴的分析表明,胞体传导逆向和顺向兴奋的速度均减小,使得胞体响应的潜伏期增加。与轴突阻滞减少神经元发放量的快速发生相比,这种胞体传导速度变化的发展较为缓慢,刺激结束后的恢复也较慢。其中的可能机制和潜在的意义分析如下。

首先,本文的结果表明,A-HFS期间APS的幅值和潜伏期的变化进程不一致(图1c, d)。APS幅值在初期迅速衰减之后趋于稳定,而潜伏期虽然初期变化也较快,但后期仍持续增大。APS幅值的降低源于轴突传向胞体的兴奋减少,而不是胞体无法产生动作电位,因为此时胞体仍然可以响应来自Schaffer侧支的树突上顺向激活而产生与基线相似的发放量(图3a, b),这与之前的报道一致^[12]。轴突上兴奋传导的减少可能源于轴突阻滞,刺激初期高频脉冲使得轴突细胞膜不断去极化并产生动作电位,导致膜外钾离子迅速累积,使得轴突膜持续去极化^[25],进而导致膜上部分钠离子通道失活^[26-27],产生间歇性(或部分性)去极化阻滞,轴突无法跟随每个刺激脉冲产生动作电位,传向胞体的兴奋也就减少。钠离子通道失活引起的去极化阻滞也会降低轴突响应刺激的速度^[22, 24],这可能是A-HFS初期APS潜伏期快速增加的主要原因。本文发现,A-HFS期间胞体附近的兴奋传导速度持续减慢,且与APS潜伏期的持续延长显著相关(图1h),因此,胞体响应的延时可能是导致APS潜伏期持续延长的原因。

其次,胞体对于逆向和顺向激活的响应速度均减慢(图1g, 3f),这可能是由于刺激期间胞体细胞膜处于超极化的低兴奋状态所致。脑神经回路中承担信息传递任务的主神经元都受到局部抑制性回路的调控,海马CA1区的主神经元——锥体神经元也是如此。它们受到由中间神经元构成的前馈和反馈局部抑制回路的调控^[28]。CA1区Alveus的兴

奋可以激活反馈抑制回路中的中间神经元,进而通过连接于锥体神经元树突和胞体上的抑制性突触,降低锥体神经元胞体的膜电位,使其处于超极化状态。此外,虽然轴突的间歇性阻滞减少了传向胞体的兴奋频率,但是,A-HFS期间APS仍然持续存在,表明胞体仍然以低于脉冲的频率,持续不断地产生动作电位,这会引起钠离子不断流入胞体并积累,从而驱使钠钾泵工作,导致动作电位发放之后的超极化^[29-30],而且该超极化的时程较长^[31]。当胞体细胞膜处于超极化状态时,胞体响应兴奋性刺激而达到动作电位发放阈值所需的时间就变长。上述抑制性突触和钠钾泵引起的超极化持续时间均较长,因而使APS潜伏期和胞体传导兴奋的速度在短间隙内难以恢复(图2c, f)。另外,刺激及其诱导的神经元活动也可能改变胞体的发放阈值,从而改变其响应速度^[32]。这些有关胞体响应速度变化的推测还有待进一步的实验验证。

最后,神经元的兴奋传导速度的改变对于神经系统活动可以产生重要影响。在脑神经系统的信息传递中,动作电位传导速度的改变会影响神经回路信息处理的结果及其发生时间,并影响脑神经活动的节律和同步性^[33-34]。轴突HFS引起的兴奋传导速度的改变可以破坏神经元群体的同步活动,从而有助于治疗脑神经系统异常同步活动所导致的疾病,如帕金森病和癫痫等^[35-36]。设计具有去同步作用的刺激模式是DBS发展的重要方向之一^[37]。

本文存在的不足是仅研究了100 Hz的脉冲刺激,锥体神经元胞体的改变与其他不同脉冲频率之间的关系尚有待进一步的深入研究。此外,大鼠实验是在氨基甲酸乙酯麻醉之下进行。该麻醉剂常用于小动物的神经电生理实验^[6-7, 20]。它会减弱突触传递,降低神经元的动作电位发放率,但这些影响并不严重^[38-39],且本文的轴突A-HFS的逆向激活不涉及突触传递,因此,该麻醉剂的使用对研究结果不会产生根本性的影响。

4 结 论

本文利用海马脑区的层状结构以及CSD分析法发现,锥体神经元轴突上的持续高频脉冲刺激在导致轴突阻滞的情况下,仍然可以影响胞体的活动状态,减慢胞体对于顺向和逆向激活的响应速度。此发现有助于深入了解DBS的作用机制,并为开发新型电刺激模式提供信息。

参 考 文 献

- [1] Krauss J K, Lipsman N, Aziz T, *et al.* Technology of deep brain stimulation: current status and future directions. *Nat Rev Neurol*, 2021, **17**(2): 75-87
- [2] 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
- [3] 封洲燕, 郭哲杉, 王兆祥. 深部脑刺激作用机制的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2018, **45**(12): 1197-1203
Feng Z Y, Guo Z S, Wang Z X. *Prog Biochem Biophys*, 2018, **45**(12): 1197-1203
- [4] Nowak L G, Bullier J. Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter. Evidence from chronaxie measurements. *Exp Brain Res*, 1998, **118**(4): 477-488
- [5] Ranck J B. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res*, 1975, **98**(3): 417-440
- [6] Kloosterman F, Peloquin P, Leung L S. Apical and basal orthodromic population spikes in hippocampal CA1 *in vivo* show different origins and patterns of propagation. *J Neurophysiol*, 2001, **86**(5): 2435-2444
- [7] López-Aguado L, Ibarz J M, Herreras O. Modulation of dendritic action currents decreases the reliability of population spikes. *J Neurophysiol*, 2000, **83**(2): 1108-1114
- [8] Jensen A L, Durand D M. High frequency stimulation can block axonal conduction. *Exp Neurol*, 2009, **220**(1): 57-70
- [9] Zheng F, Lammert K, Nixdorf-Bergweiler B E, *et al.* Axonal failure during high frequency stimulation of rat subthalamic nucleus. *J Physiol*, 2011, **589**(11): 2781-2793
- [10] Dayal V, Limousin P, Foltyniec T. Subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson's disease: the effect of varying stimulation parameters. *J Parkinsons Dis*, 2017, **7**(2): 235-245
- [11] Laxpati N G, Kasoff W S, Gross R E. Deep brain stimulation for the treatment of epilepsy: circuits, targets, and trials. *Neurotherapeutics*, 2014, **11**(3): 508-526
- [12] 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 Res*, 2013, **1509**: 32-42
- [13] Feng Z, Yu Y, Guo Z, *et al.* High frequency stimulation extends the refractory period and generates axonal block in the rat hippocampus. *Brain Stimul*, 2014, **7**(5): 680-689
- [14] Ramezani H, Akan O B. A communication theoretical modeling of axonal propagation in hippocampal pyramidal neurons. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2017, **16**(4): 248-256
- [15] Fisher R S, Velasco A L. Electrical brain stimulation for epilepsy. *Nat Rev Neurol*, 2014, **10**(5): 261-270
- [16] Deeb W, Salvato B, Almeida L, *et al.* Fornix-region deep brain stimulation-induced memory flashbacks in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 2019, **381**(8): 783-785
- [17] Pettersen K H, Lindén H, Dale A M, *et al.* Extracellular spikes and current-source density//Brette R, Destexhe A. *Handbook of Neural Activity Measurement*. New York: Cambridge University Press, 2012: 92-135
- [18] Nicholson C, Freeman J A. Theory of current source-density analysis and determination of conductivity tensor for anuran cerebellum. *J Neurophysiol*, 1975, **38**(2): 356-368
- [19] Richardson T L, Turner R W, Miller J J. Action-potential discharge in hippocampal CA1 pyramidal neurons: current source-density analysis. *J Neurophysiol*, 1987, **58**(5): 981-996
- [20] Andersen P, Bliss T, Skrede K K. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res*, 1971, **13**(2): 208-221
- [21] Theoret Y, Brown A, Fleming S P, *et al.* Hippocampal field potential: a microcomputer aided comparison of amplitude and integral. *Brain Res Bull*, 1984, **12**(5): 589-595
- [22] Chida K, Kaneko K, Fujii S, *et al.* Activity-dependent modulation of the axonal conduction of action potentials along rat hippocampal mossy fibers. *Eur J Neurosci*, 2015, **41**(1): 45-54
- [23] Huberfeld G, Menendez de la Prida L, Pallud J, *et al.* Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat Neurosci*, 2011, **14**(5): 627-634
- [24] Rama S, Zbili M, Debanne D. Signal propagation along the axon. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, **51**: 37-44
- [25] 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
- [26] Tai C, de Groat W C, Roppolo J R. Simulation of nerve block by high-frequency sinusoidal electrical current based on the Hodgkin-Huxley model. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*, 2005, **13**(3): 415-422
- [27] Bhadra N, Kilgore K L. High-frequency electrical conduction block of mammalian peripheral motor nerve. *Muscle Nerve*, 2005, **32**(6): 782-790
- [28] Freund T F, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 1996, **6**(4): 347-470
- [29] Rahman A, Reato D, Arlotti M, *et al.* Cellular effects of acute direct current stimulation: somatic and synaptic terminal effects. *J Physiol*, 2013, **591**(10): 2563-78
- [30] Moldovan M, Krarup C. Evaluation of Na^+/K^+ pump function following repetitive activity in mouse peripheral nerve. *J Neurosci Methods*, 2006, **155**(2): 161-171
- [31] Kiernan M C, Lin C S, Burke D. Differences in activity-dependent hyperpolarization in human sensory and motor axons. *J Physiol*, 2004, **558**(1): 341-349
- [32] 伊国胜, 赵强, 魏熙乐, 等. 神经元放电阈值的可变性及其意义. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(7): 1226-1242
Yi G S, Zhao Q, Wei X L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(7): 1226-1242
- [33] Popovych O V, Tass P A. Desynchronizing electrical and sensory coordinated reset neuromodulation. *Front Hum Neurosci*, 2012, **6**: 58
- [34] Wilson C J, Beverlin B, Netoff T. Chaotic desynchronization as the therapeutic mechanism of deep brain stimulation. *Front Syst Neurosci*, 2011, **5**: 50

- [35] Eusebio A, Thevathasan W, Doyle Gaynor L, *et al.* Deep brain stimulation can suppress pathological synchronisation in parkinsonian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, **82**(5): 569-73
- [36] Yu T, Wang X, Li Y, *et al.* High-frequency stimulation of anterior nucleus of thalamus desynchronizes epileptic network in humans. *Brain*. 2018, **141**(9): 2631-2643
- [37] 王兆祥,封洲燕,杨刚生,等. 新型深部脑刺激模式的开发及研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2021, **48**(3): 263-274
- Wang Z X, Feng Z Y, Yang G S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2021, **48**(3): 263-274
- [38] Yagishita H, Nishimura Y, Noguchi A, *et al.* Urethane anesthesia suppresses hippocampal subthreshold activity and neuronal synchronization. *Brain Res*, 2020, **1749**: 147137
- [39] Shirasaka Y, Wasterlain C G. The effect of urethane anesthesia on evoked potentials in dentate gyrus. *Eur J Pharmacol.* 1995, **282**(1-3): 11-17

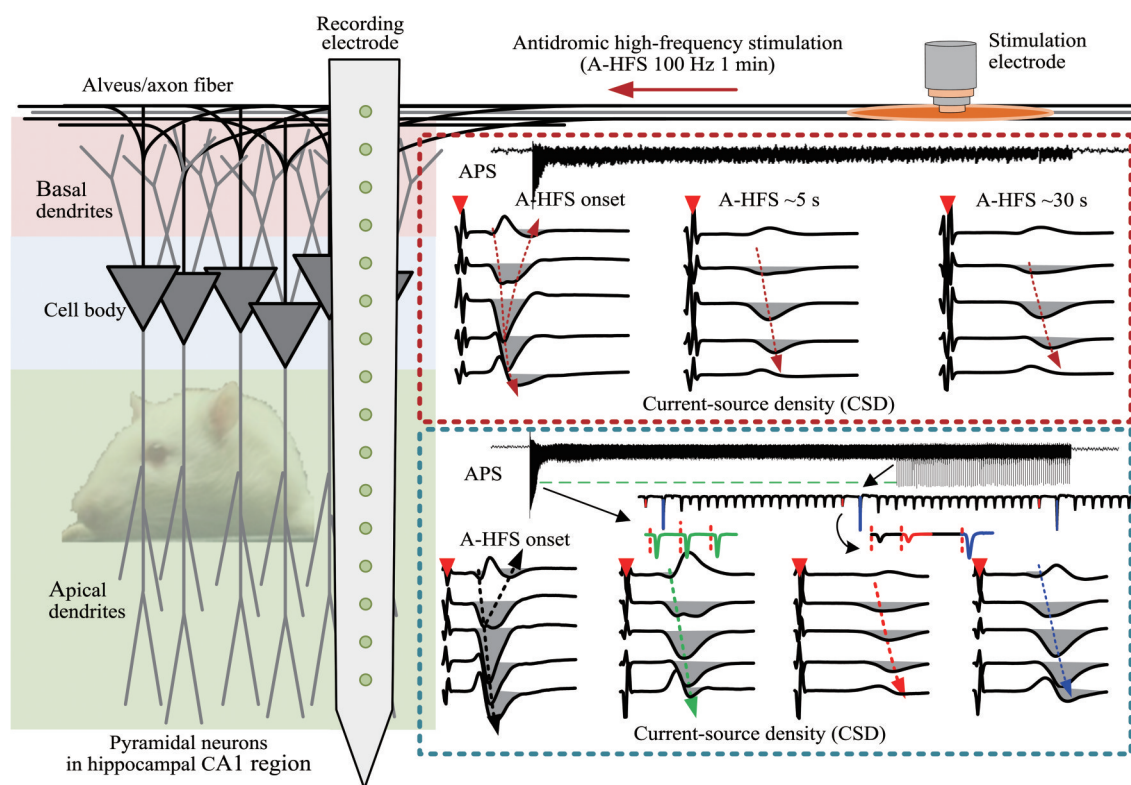
Effects on Somata by High-frequency Electrical Stimulation at The Axons of Hippocampal Pyramidal Neurons*

XU Yi-Peng¹⁾, FENG Zhou-Yan^{1)**}, YUAN Yue¹⁾, HU Yi-Fan¹⁾, YE Xiang-Yu¹⁾,
WANG Zhao-Xiang^{1,2)}

⁽¹⁾Key Laboratory of Biomedical Engineering of Education Ministry, College of Biomedical Engineering and Instrumentation Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

²⁾Zhejiang Lab, Hangzhou 311100, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Deep brain stimulation (DBS) utilizes sustained high-frequency stimulation (HFS) of electrical pulses to modulate neuronal activity. The therapy is expected to be used to treat more brain disorders. To deeply understand the mechanisms of the HFS to advance the DBS development, the present study investigates the effect of axonal HFS on neuronal somata during HFS-induced axonal block. **Methods** Antidromic high-frequency stimulation (A-HFS) with a 100-Hz pulse frequency and a 1-min duration was applied at the axons of

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

** Corresponding author.

Tel: 86-13515711296, E-mail: fengzhouyan@zju.edu.cn

Received: May 26, 2022 Accepted: July 27, 2022

pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region of anesthetized rats. To investigate the responses of somata, a multi-channel microelectrode array with a vertical linear configuration was implanted to record the evoked potentials in the lamellas around the somata of CA1 pyramidal neurons at the upstream area of stimulation site, including the antidromic population spikes (APS) evoked by the pulses of A-HFS as well as the orthodromic population spikes (OPS) evoked by orthodromic test pulses applied during the A-HFS. Current-source densities (CSD) of the evoked potentials were calculated to evaluate the generation and propagation of action potentials around the somata of pyramidal neurons during A-HFS. **Results** A-HFS on the axons of pyramidal neurons slowed down the propagation speed of both antidromic and orthodromic excitations around somata. In addition, the occurrence and recovery of the changes of somata were slower than the A-HFS-induced axonal block. **Conclusion** Axonal HFS can induce soma alterations that might be caused by changes in membrane potentials nearby somata. The finding is helpful for deeply revealing the mechanisms of electrical stimulations of brain nervous system.

Key words high-frequency stimulation, population spike, current source density, pyramidal neuron, propagation speed

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0242