

• 基础医学 •

文章编号:1002-0217(2018)06-0511-05

夹尾刺激对大鼠背外侧前额叶和杏仁核神经网络振荡的影响

张忠楠^{1,2}, 王美美^{1,2}, 江楠^{1,2}, 孙睿琦^{1,2}, 王邦安¹, 汪萌芽¹

(皖南医学院 1.细胞电生理研究室; 2.启明星小组 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的:同步记录大鼠背外侧前额叶(DLPFC)和杏仁核(amygdala)细胞外电活动和外周生理指标,分析神经网络振荡和探究伤害性刺激的影响。方法:取成年SD大鼠12只,同步记录DLPFC亚区岛叶无颗粒皮质背部(AID)和杏仁核亚核基底外侧杏仁核(BLA)的细胞外电活动、心电和呼吸肌肌电,分析神经网络振荡并观察夹尾刺激后各项指标的变化。结果:①夹尾刺激时AID和BLA的放电频率可逆性升高($P < 0.05$);②夹尾刺激时AID和BLA的低频振荡(delta, theta)能量减弱($P < 0.05$),高频振荡(gamma fast)能量仅有增强趋势($P > 0.05$),且都在刺激后恢复;③夹尾刺激后两核团间delta、theta、fast振荡的相位锁值都比刺激前降低($P < 0.05$);④夹尾刺激加快了心率($P < 0.05$)、呼吸频率($P < 0.01$),刺激后呼吸频率逐渐恢复。结论:夹尾刺激能使AID和BLA的兴奋性增强,但使两核团间的相位同步程度减弱,这可能与伤害性刺激引起的负性情绪有关。

【关键词】背外侧前额叶; 杏仁核; 神经网络振荡; 伤害性刺激

【中图分类号】R 338.2; R-332 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.06.001

Effects of tail pinch-induced stimulus on neural network oscillation in the dorsolateral prefrontal cortex and amygdala of rats

ZHANG Zhongnan, WANG Meimei, JIANG Nan, Sun Ruiqi, WANG Bang'an, WANG Mengya

Cell Electrophysiology Laboratory, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To simultaneously record the extracellular electrical activities and peripheral physiological indexes in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and amygdala of rats for observing the effects of nociceptive stimulation on neural network oscillation. **Methods:** Indexes were simultaneously maintained on the extracellular electrical activities in the dorsal agranular insular area (AID) in DLPFC and basolateral amygdala (BLA) in amygdala in adult SD rats ($n = 12$) as well as their electrocardiogram and electromyography of respiratory muscles following tail pinch-induced stimulus and the stimulation on neural network oscillation was observed and analyzed. **Results:** ①The discharge rate was reversibly increased in AID and BLA during the tail pinch stimulation ($P < 0.05$); ②The tail pinch stimulation reduced the power at delta and theta rhythm ($P < 0.05$), whereas increased the power at gamma and fast rhythm to some extent ($P > 0.05$), and the power changes were all reversible; ③The phase locking values were significantly reduced after the stimulation at the delta, theta and fast rhythm compared to pre-stimulation values ($P < 0.05$); ④The tail pinch stimulation not only increased the heart rate ($P < 0.05$), but also reversibly increased the respiratory frequency ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tail pinch-induced stimulus may increase the excitability in AID and BLA, yet weaken strength of phase coupling between AID and BLA, which may be related to negative emotion caused by nociceptive stimulation.

【Key words】 dorsolateral prefrontal cortex; amygdala; neural network oscillation; nociceptive stimulation

神经振荡是大脑内有节律的放电现象,各脑区间的神经网络振荡在大脑执行高级功能时起重要作用^[1],且神经振荡可以调节脑区间的信息交流强度^[2]。背外侧前额叶(dorsolateral prefrontal cortex,

DLPFC)和杏仁核(amygdala)^[3]是情绪调节的重要核团,两核团的神经振荡在情绪调控中的作用还未见相关报道。因此,我们参照脑内双核团和外周生理指标同步记录技术^[4],记录夹尾刺激前后DLPFC

基金项目:国家自然科学基金项目(31271155);安徽省大学生创新创业训练计划项目(AH201610368068)

收稿日期:2017-11-23

作者简介:张忠楠(1996-),男,2014级医学影像学专业本科生(电话)18196548273(电子信箱)2434776833@qq.com;

汪萌芽,男,教授,硕士生导师(电子信箱)wangmy@wnmc.edu.cn,通信作者。

亚区岛叶无颗粒皮质背部(agranular insular area , AID) [5]和杏仁核基底外侧杏仁核(basolateral amygdala ,BLA) 的细胞外电活动,以及心电、呼吸肌肌电,观察和比较夹尾刺激前后核团神经振荡的特征和外周生理指标的变化,为进一步研究伤害性刺激引起的负性情绪变化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 12 只,体质量 260~350 g,由南京青龙山动物繁殖场提供。

1.2 仪器和药品 脑立体定位仪(瑞沃德 68000 系列)、保温毯系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)、电生理屏蔽罩、防震台、PowerLab 八通道生理信号采集系统及其 Chart Pro 分析软件(AD Instruments ,Australia)、生物电放大器(美国 A-M Systems ,MODEL 1800)、玻璃微电极和金属参考电极、20%乌拉坦、3%双氧水等。

1.3 实验方法

1.3.1 动物麻醉 用 20%乌拉坦麻醉大鼠(1.5 g/kg ip),直至夹捏刺激无明显反应。麻醉稳定后,将大鼠俯卧位固定于电生理屏蔽罩内的防震台上的脑立体定位仪上,下面垫保温毯,温度设置为 37 ℃。

1.3.2 外周生理指标记录[4] 大鼠右前肢腕关节、左后肢踝关节上部的皮下分别插入针式电极,记录标准肢体 II 导联心电图,右后肢针式电极接地。将两根针式电极插入大鼠右侧腋中线第 9 肋下缘肋间外肌,记录呼吸肌肌电图。

1.3.3 脑内双核团细胞外记录[4] 使大鼠咬合门齿杆并插入耳杆呈左右对称,固定大鼠头部使之不能移动,用手术刀切开头皮,3%双氧水反复擦拭直至暴露颅骨前窗、人字缝,调节前窗和人字缝至同一水平面。定位:BLA 为前窗后 1.56~3.36 mm,右旁开 3.90~4.60 mm,硬脑膜表面以下 7.80~8.82 mm;AID 为前窗前 2.52~4.20 mm,右旁开 2.40~4.20 mm,硬脑膜表面以下 4.40~5.40 mm[6]。用牙科钻钻颅开窗,以冷光源照明,用弯针头挑破硬脑膜、蛛网膜和软脑膜,玻璃电极(内充电极液) 在操作臂的牵引下紧贴脑组织,安置好参考电极及接地电极,记录电极接入记录放大系统并下至目标脑区后寻找合适、明确的细胞外放电信号,待 AID、BLA 及各项外周生理指标信号稳定后,记录基础数据 20 min 并存盘。

1.3.4 伤害性刺激[7] 使用充分绝缘的血管钳夹持大鼠尾巴中末 1/3 处,以后肢抽动为宜,5 s 后撤离刺激,持续观察并记录刺激前 20 min 和刺激后

40 min 的各项信号。

1.3.5 信号采集参数设置[7-8] 各项信号由 Chart 5 软件进行采集、存盘,采样频率 4 kHz,心电为低通 200 Hz、高通 10 Hz,呼吸肌肌电为低通 200 Hz、高通 0.1 Hz,AID 和 BLA 为高通 1 Hz、低通 5000 Hz。

1.3.6 记录位点鉴定 实验结束,大鼠断头取脑于 4%甲醛溶液内固定后,进行冠状面切片,观察胫胺天蓝标记位置,以鉴定记录位点。仅将记录位点正确的样本纳入结果的统计和分析。

1.4 记录信号分析

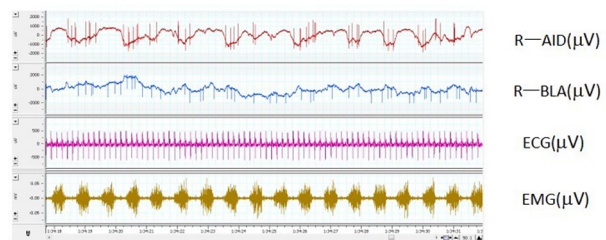
1.4.1 放电频率和神经振荡分析 对核团电信号高通 80 Hz 数字滤波[8]以分析放电频率。对核团放电原始数据带宽滤波得各神经振荡信号:delta(1~4 Hz),theta(4~10 Hz),beta(10~30 Hz),gamma(30~80 Hz),fast(80~200 Hz) [1],用 FFT 功能分析各神经振荡的能量。将各神经振荡信号另存为 TXT 格式文件,将两核团相同神经振荡的数据(TXT 文件) 导入 MATLAB R2010b 软件里,用 Hilbert 功能提取数据的相位信息,按照计算相位锁值(PLV) 的公式进行编程[9]和分析。

1.4.2 外周生理指标分析[7] 使用直接计数法对呼吸频率进行统计。使用记录一段时间内心率的平均值代表心率值。

1.5 统计分析 结果以均数±标准误表示,用 SPSS 18.0 软件进行数据的统计分析,刺激前后数据比较用配对 t 检验分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

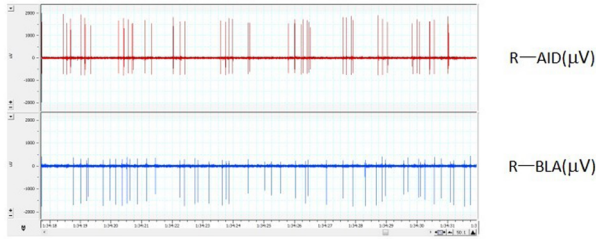
2 结果

2.1 脑内双核团细胞外电活动和外周生理指标同步记录 对 AID 和 BLA 细胞外电活动、呼吸肌肌电(EMG)、心电(ECG) 的同步记录(图 1),经高通 80 Hz 滤波可得到单位放电记录(图 2),而分波段进行带宽滤波则得到各神经振荡记录(图 3)。

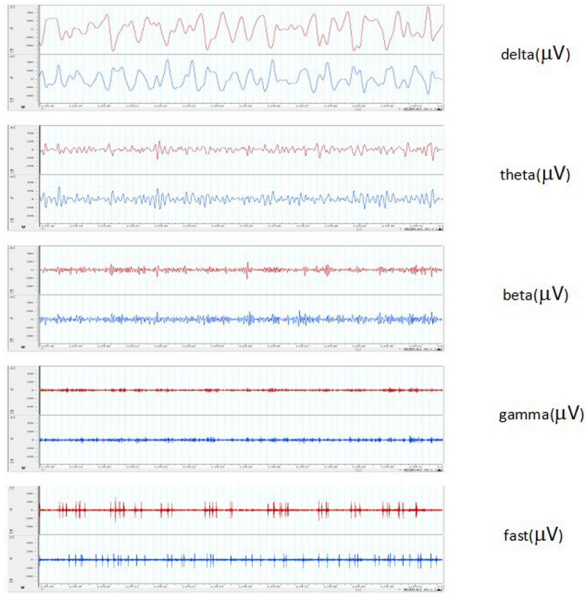


从上往下依次为右侧岛叶无颗粒皮质背部(R-AID, μV)、基底外侧杏仁核(R-BLA, μV) 电信号,心电(ECG, μV),呼吸肌肌电(EMG, μV)。

图 1 大鼠双核团细胞外电活动和外周生理指标同步记录



从上往下依次为右侧 AID、BLA 的单位放电(μV)。
图 2 大鼠双核团单位放电记录

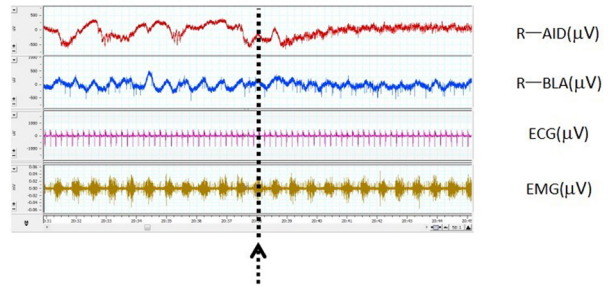


从上到下依次为 delta、theta、beta、gamma、fast 神经振荡(μV)。
图 3 大鼠双核团神经振荡记录

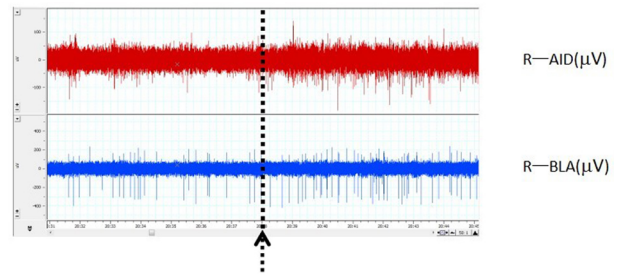
2.2 夹尾刺激对大鼠 AID、BLA 放电活动的影响

2.2.1 放电频率变化 夹尾刺激对大鼠双核团放电和外周生理指标、双核团单位放电及双核团神经振荡的典型影响分例示于图 4、5、6。分析 12 只大鼠 AID、BLA 刺激前 2 min、刺激时 5 s、刺激后 2 min 放电频率显示,夹尾刺激显著升高了 AID 和 BLA 的放电频率 [AID: 差值(16.62 ± 3.31) Hz, $t = 5.007$, $P < 0.001$; BLA: 差值(14.80 ± 3.27) Hz, $t = 4.528$, $P < 0.01$],刺激后均逐渐恢复(图 7)。

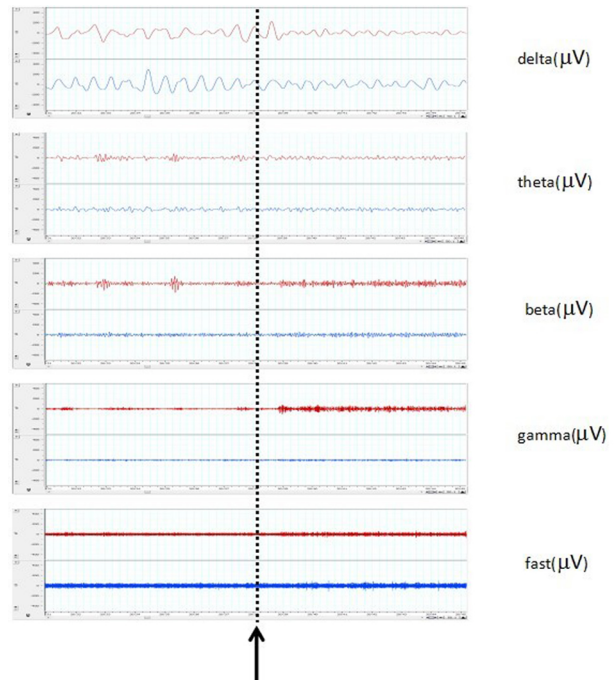
2.2.2 神经振荡的能量变化 分析大鼠夹尾刺激前后各神经振荡的能量,结果刺激时两核团 delta 和 theta 振荡的能量减弱($P < 0.05$),gamma 和 fast 振荡的能量有增强趋势($P > 0.05$),且都在刺激后恢复(图 8)。



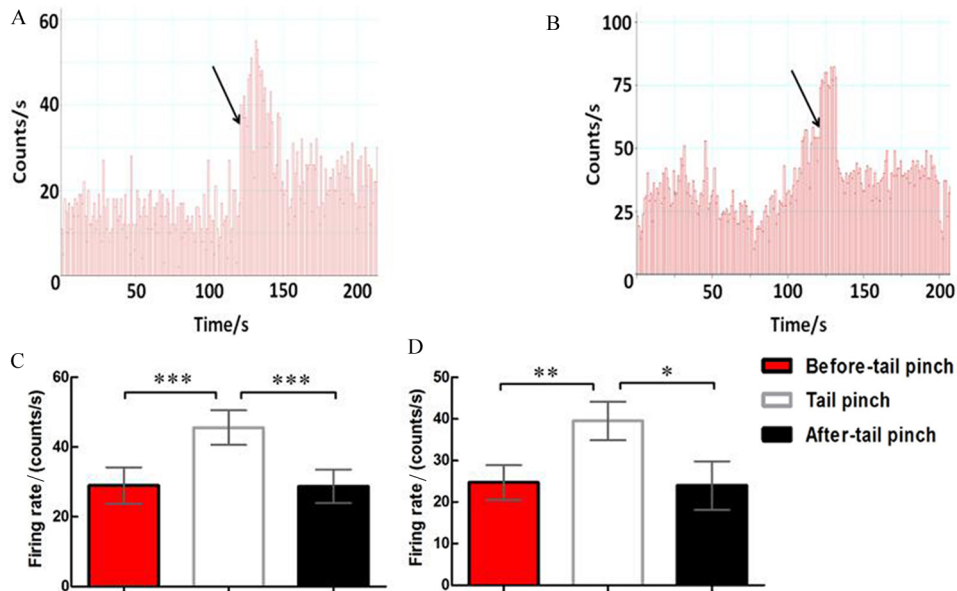
从上往下依次为右侧 AID、BLA 电信号(μV),心电(ECG, μV),呼吸肌肌电(EMG, μV);箭头表示夹尾刺激的开始,持续 5 s。
图 4 夹尾刺激对大鼠双核团细胞外电活动和外周生理指标的影响



从上往下依次为右侧 AID、BLA 的单位放电(μV);箭头表示夹尾刺激的开始,持续 5 s。
图 5 夹尾刺激对大鼠双核团单位放电的影响

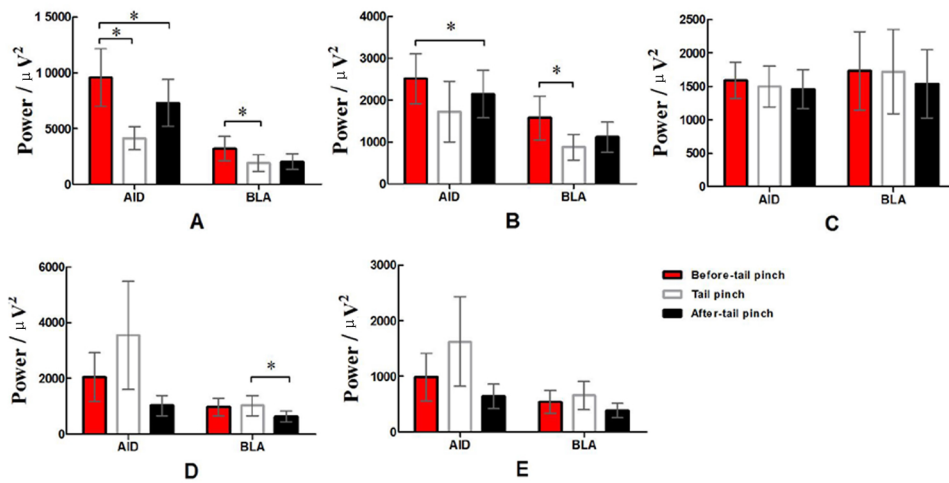


从上到下依次为 delta、theta、beta、gamma、fast 神经振荡(μV);箭头表示夹尾刺激的开始,持续 5 s。
图 6 夹尾刺激对大鼠双核团神经振荡的影响



上图为 AID (A) 和 BLA (B) 的放电频率直方图, 箭头表示刺激的开始, 持续 5 s; 下图为 AID (C) 和 BLA (D) 的放电频率统计图 ($n=12$, 配对 t 检验: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

图 7 夹尾刺激对 AID 和 BLA 放电频率的影响 (bin = 1s)

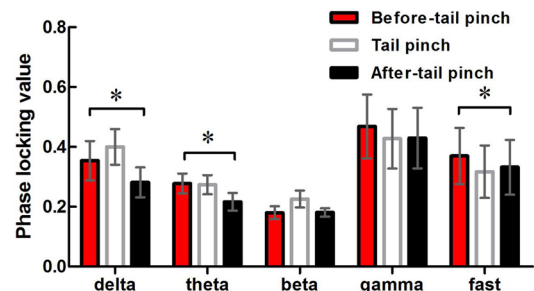


$n=12$ 配对 t 检验: * $P<0.05$ 。

图 8 夹尾刺激对两核团 delta (A)、theta (B)、beta (C)、gamma (D)、fast (E) 振荡能量的影响

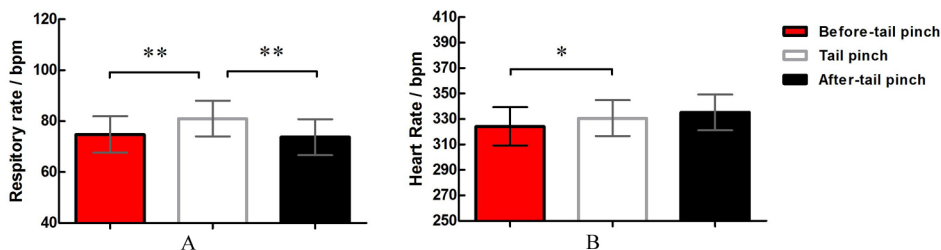
2.2.3 神经网络振荡的相位锁值变化 计算分析大鼠夹尾刺激前后两核团间各神经振荡的相位锁值, 结果刺激后两核团间 delta、theta、fast 振荡的相位锁值均降低 ($P<0.05$), 见图 9。

2.3 夹尾刺激对外周生理指标的影响 分析大鼠夹尾刺激前后的心率、呼吸频率, 显示刺激时心率升高 ($P<0.05$), 且刺激后并未立即恢复, 呼吸频率升高 ($P<0.01$), 刺激后逐渐恢复 ($P<0.01$), 见图 10。



$n=12$ 配对 t 检验: * $P<0.05$ 。

图 9 夹尾刺激对 AID 和 BLA 间神经振荡相位锁值的影响



n = 12 配对 t 检验: * P < 0.05, ** P < 0.01。

图 10 夹尾刺激对呼吸频率(A)和心率(B)的影响

3 讨论

杏仁核和背外侧前额叶都是负性情绪调控的关键脑区^[3],而夹尾刺激可引起负性情绪的变化^[7]。本实验同步记录和分析夹尾刺激前后正常大鼠 AID、BLA 的细胞外电活动、心电和呼吸肌肌电,结果刺激升高两核团的放电频率,并逐渐恢复,与之前夹尾刺激引起的变化相似^[7];刺激降低了 AID、BLA 低频段(delta、theta)的能量,而高频段(gamma、fast)的能量有增高趋势,不同的神经振荡提示不同的生理状态,一般认为低频成分降低和高频成分增多反映脑电的去同步化状态^[2],表明夹尾刺激对 AID、BLA 有激活作用。至于激活的具体通路,根据已有对 BLA、内侧前额叶(mPFC)和 DLPFC 联系的研究^[3,40],特别是有研究指出背外侧前额叶对杏仁核有自上而下的抑制作用^[3]等,提示夹尾刺激影响 AID、BLA 放电有直接或间接通路的可能性,均有待进一步研究。另外,相位同步是相同节律的神经振荡在不同脑区间相互调制的表现,与脑区间的信息交流有密切联系^[2,9],本实验中,刺激降低了 AID 和 BLA 间 delta、theta 振荡的相位锁值,说明夹尾刺激干扰了 AID 和 BLA 间低频段正常的信息交流。因此,夹尾刺激不仅改变了两核团 delta 和 theta 振荡的能量,而且还降低了核团间 delta、theta 振荡的相位锁值,同时结合反映情绪变化的外周生理指标^[11],说明 delta 和 theta 振荡可能与伤害性刺激引起的相关负性情绪变化有联系,但是具体的过程和机制需进一步探索。

本实验运用脑内双核团和外周生理指标同步记录技术^[4],记录了背外侧前额叶和杏仁核的细胞外电活动、心电和呼吸肌肌电,作为夹尾刺激引起情绪

变化的指标,并分析两核团各神经振荡的特性,结果显示夹尾刺激引起了大鼠两核团神经振荡以及心率和呼吸频率的显著变化,将负性情绪调控的关键核团^[3]的神经振荡与反应情绪变化的外周生理指标^[11]结合分析,为进一步研究神经振荡在相关负性情绪调控中的作用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] BUZSAKI G, DRAGUH A. Neuronal oscillations in cortical networks[J]. Science, 2004, 304(5679): 1926-1929.
- [2] 张力新,王发顺,王玲,等.认知功能研究中神经振荡交叉节律耦合应用研究进展[J].生理学报, 2017, 69(6): 805-816.
- [3] 刘耀中,柳昀哲,林碗君,等.抑郁障碍的核心脑机制—基于 fMRI 元分析的证据[J].中国科学:生命科学, 2015, 45(12): 1214-1223.
- [4] 刘伟,汪伟伟,黄军,等.大鼠脑内双核团电活动与多项生理指标的同步记录技术[J].皖南医学院学报, 2013, 32(5): 423-429.
- [5] 宋岳涛,王绍坤,郭连魁.大鼠杏仁体及丘脑背内侧核至额前皮质各区的纤维投射:HRP 逆行示踪研究[J].山西医科大学学报, 1997(2): 4-6.
- [6] PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 6th Edition. New York: Academic Press, 2008.
- [7] 汪伟伟,刘菊,蒋雪丽,等.不同伤害性刺激致大鼠痛感觉与痛情绪的比较[J].生命科学研究, 2014, 18(5): 411-417.
- [8] 陶宜楠,郑超,秦雯,等.心血管中枢与心血管功能的同步记录技术[J].皖南医学院学报, 2016, 35(4): 311-314.
- [9] 郑晨光.大鼠 theta 和 gamma 神经振荡参与调节突触可塑性及潜在机制探究[D].天津:南开大学, 2013.
- [10] THOMPSON JM, NEUGEBAUER V. Amygdala plasticity and pain [J]. Pain Research & Management, 2017, 2017(2): 1-12.
- [11] CRITCHLEY HD. Neural mechanisms of autonomic, affective, and cognitive integration[J]. Journal of Comparative Neurology, 2005, 493(1): 154-166.