

海马 CA1 区 ripple 节律相关高频放电中间神经元

王莹, 张栌, 潘璟玮, 谢琨, 李世琪, 王智如, 林龙年*

华东师范大学 脑功能基因组学教育部重点实验室, 上海 200062

* 联系人, E-mail: lnlin@brain.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-10; 接受日期: 2007-10-16

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2003CB716606)、国家自然科学基金(批准号: 30570584)、上海市科委重点(批准号: 05DJ14007)资助项目

摘要 通过在清醒小鼠(*Mus musculus*)大脑同步记录海马区单神经元放电和场电位, 发现在海马 CA1 区存在两类与慢波睡眠时海马特征场电位“ripple”高频振荡(100~250 Hz)相关的高频放电中间神经元. 这两类神经元在慢波睡眠时的放电与 ripple 在时间上有高度同步性, 对应每个 ripple 振荡波, 它们都有一串高频放电. 其中一类中间神经元(类型 I)在一个 ripple 振荡波的每个子振荡周期基本有 1 个放电, 而另一类中间神经元(类型 II)则有 1~2 个放电. 在 ripple 振荡波时段, 这两类中间神经元的峰值放电频率分别高达 310 ± 33.17 Hz(类型 I)和 410 ± 47.61 Hz(类型 II). 动物清醒活动时, 这两类中间神经元的放电与海马场电位的 theta 节律有锁相关关系, 它们的最大放电概率在 theta 节律的波谷段. 给予动物摇晃刺激时, 这两类中间神经元的放电频率均会短促增加. 这些研究结果显示, 海马 CA1 区的这种高频放电中间神经元参与调节海马神经网络的整体活动状态.

关键词

海马体(Hippocampus)

ripple 高频振荡

theta 节律

中间神经元

大脑中存在各种模式的脑电振荡(oscillation), 这些具有不同频率范围的振荡被认为是为脑中群体神经元表征、处理、储存和提取信息时提供一种时间同步 [1-3]. 啮齿类动物海马结构中存在的脑电场电位振荡主要包括 theta 节律(4~12 Hz), gamma 振荡(40~100 Hz), 以及 ripple 高频振荡(100~250 Hz) [4-8]. 其中 ripple 高频振荡是动物慢波睡眠时在海马脑区出现的特征波形, 其振幅在 CA1 区锥体细胞层处最大 [3,9,10]. 它被认为可能是一种脑内长时程突触增强(LTP)的刺激模式, 参与了记忆痕迹巩固有关的突触修饰过程 [6,11,12]. 有研究者认为 ripple 的发生可能与海马内不同种类的中间神经元以及锥体细胞引起的前馈兴奋有关 [13,14], 但具体神经机制仍不太清楚. 我们通过在自由活动的小鼠脑内, 同时记录海马 CA1 区的神经

元活动和场电位变化, 发现 2 类高频放电中间神经元, 它们的放电活动与 ripple 高频振荡有高相关性.

1 材料与方 法

1.1 海马神经元放电及场电位在体记录

实验在 7 只成年(6~10 个月)雄性 C57BL/6J 小鼠(25~33 g)上进行. 用戊巴比妥钠(腹腔注射, 40 mg/kg 体重)麻醉动物, 暴露顶部头骨, 除去上面的肌肉和结缔组织, 根据小鼠脑图谱, 在背侧海马上方颅骨(十字缝(bregama)向后 2.3 mm, 左右两侧各 2.0 mm)用微型牙科手钻开 2 个小洞, 将准备好的 2 束独立可调的 12 根四电极分别植入双侧海马背部皮层, 用石蜡封闭颅骨手术野, 再用牙科水泥将整个电极帽固定于小鼠颅骨. 待动物清醒后, 让其自由恢复 48~72

h, 开始观察记录. 每组记录四电极由 4 根 $13\ \mu\text{m}$ 的镍铬合金丝缠绕而成 (California Fine Wire, Grover Beach, CA), 每根电极丝的尖端镀金以降低电极阻抗至 $500\sim 800\ \text{k}\Omega$.

实验记录系统由美国 Plexon 公司的 96 通道在体记录系统组成, 每根电极记录到的神经电信号经微电极放大器放大后分为两路, 一路用来记录单个神经元的放电活动, 另一路用来记录海马脑区的场电位. 通过调节电极帽上的微型螺杆, 可以缓慢推进电极的记录位置. 微型螺杆转一圈, 电极可以前进 $280\ \mu\text{m}$, 一般每天调节微型螺杆 $1/4$ 至 $1/2$ 圈, 可使记录电极前进 $70\sim 140\ \mu\text{m}$. 根据场电位的波形特征可推测记录电极是否到达海马 CA1 区域. 实验结束后, 用尼氏染色法对鼠脑进行组织学检查, 以确定记录电极的位置 [15].

1.2 单个中间神经元放电与海马特征场电位的甄别

由 Plexon 公司 96 通道在体记录系统实时采集、记录每根记录电极上的神经元放电波形和场电位, 然后运用 Offline Sorter 2.0 软件 (<http://www.plexon.com>, Dallas, TX) 对每个四电极上记录到的所有放电波形进行聚类分析, 区分出单个海马神经元的放电. 组织学研究表明, 在啮齿类动物海马 CA1 区域存在两类神经元, 一类是兴奋性的锥体细胞 (pyramidal cells), 另一类是抑制性的中间神经元 (interneurons). 这两类神经元在形态、所含神经递质, 以及分布特点上均有所不同. 运用在体记录技术, 我们在小鼠海马的 CA1 区能同时记录到这两种神经元的放电. 已有研究显示, 这两种神经元的在体放电特征有所不同, 可以根据记录到神经元胞外动作电位的波形、放电频率、放电间隔直方图等特征, 将这两类神经元加以区分. 一般来说, 锥体细胞胞外动作电位的波形较宽、放电频率较慢, 而中间神经元胞外动作电位的波形较窄、放电频率较快 [15-19]. 在本实验中, 主要参考 Csicsvari 等人 [19] 介绍的方法来区分锥体细胞和中间神经元的放电. 因我们重点考察海马中间神经元的在体放电特性, 所以对记录到的锥体细胞未加以分析研究.

为了从场电位信号中提取 ripple 高频振荡, 我们

先将原始场电位信号进行 $100\sim 250\ \text{Hz}$ 的带通滤波, 然后以 $10\ \text{ms}$ 长度的窗口, $1\ \text{ms}$ 的移动步长, 计算滤波信号的均方根 (root mean square, RMS). 当某一窗口均方根的计算值与均值的差大于 5 倍的标准差值时, 认为该窗口时间段为 ripple 发生段, 再以该窗口时间段为中心, 前后搜寻 ripple 的起始和结束段 (2 倍标准差值) [3,19]. theta 节律的提取也是先将原始场电位信号进行 $4\sim 12\ \text{Hz}$ 的带通滤波, 然后以 $2\ \text{s}$ 长度的窗口、 $400\ \text{ms}$ 的移动步长, 计算滤波信号 theta 频段 ($4\sim 12\ \text{Hz}$) 与原始场电位信号 delta 频段 ($2\sim 4\ \text{Hz}$) 的能量之比, 当至少连续 6 个窗口比值大于 4 时, 认为该段滤波信号是在 theta 节律状态 [3,19,20].

1.3 小鼠摇晃刺激行为模式

运用自行研制的计算机程控系统, 通过改装旋涡混合器 (QL-901 Vortex, 其林贝尔仪器制造公司), 我们自行研制了小鼠摇晃刺激系统, 通过该系统可以给小鼠施以突发性的模拟地震摇晃刺激. 摇晃刺激的持续时间和强度由计算机系统程序控制.

2 结果

2.1 海马 CA1 区 ripple 相关高频放电中间神经元的放电模式

在不同的行为状态下, 小鼠海马 CA1 区场电位具有不同的活动规律. 在慢波睡眠期, 场电位呈不规则波形, 并伴随 ripple 高频振荡 ($100\sim 250\ \text{Hz}$); 在快波睡眠期, 场电位呈典型的 theta 节律 ($4\sim 12\ \text{Hz}$); 在清醒活动时, 场电位以 theta 节律为主, 并伴有 gamma 振荡 ($40\sim 100\ \text{Hz}$).

我们在小鼠海马 CA1 区一共记录到 68 个中间神经元, 其中有 12 个中间神经元在慢波睡眠时的放电与 ripple 振荡有高相关性. 具体表现为在每个 ripple 高频振荡波发生时, 这些神经元都会有一串高频放电. 其中一类中间神经元 (类型 I) 对应 ripple 高频振荡波的每个子振荡周期基本有 1 个放电, 而另一类中间神经元 (类型 II) 则有 $1\sim 2$ 个放电, 因此在放电序列间隔直方图中, 类型 I 为单峰, 而类型 II 显示为双峰 (图 1). 计算显示, 类型 I 中间神经元在 ripple 高频振荡波时的放电频率峰值可达 $310\pm 33.17\ \text{Hz}$ (计算窗口 $10\ \text{ms}$, 神经元数 $n=5$), 类型 II 中间神经元的放电频

率峰值则高达 410 ± 47.61 Hz(计算窗口 10 ms, 神经元数 $n=7$).

这两类中间神经元在动物不同行为状态下的平

均放电频率统计见表 1, 计算放电频率时, 我们对同一神经元在同一行为状态下分别取 7 个时间段, 每段 100 s 进行平均, 作为该神经元在该状态下的平均放

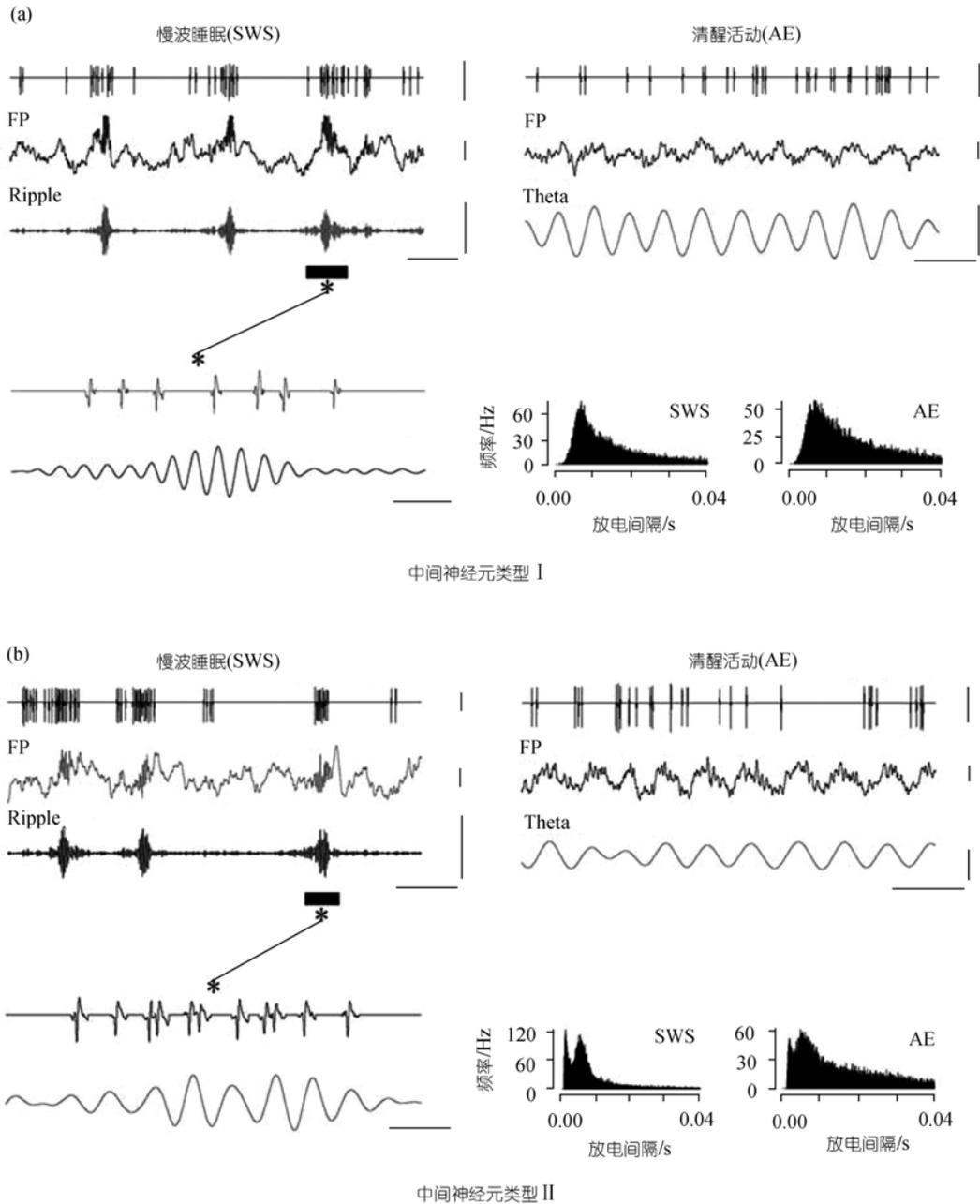


图 1 ripple 节律相关中间神经元的在体放电模式

两类 ripple 节律相关中间神经元在慢波睡眠与清醒活动时的放电模式。由上至下的 3 条波形线分别是原始胞外放电记录, 同一记录电极下的原始场电位(FP)记录和原始场电位经 ripple 或 theta 频段滤波后的波形, 水平标尺为 200 ms, 垂直标尺为 0.25 mV。星号显示的是一个 ripple 事件在时间轴上的放大图, 其水平标尺为 10 ms。各图的右下部分别为这两类神经元在慢波睡眠和清醒活动时的放电间隔直方图, 窗口时间为 0.1 ms。(a)为中间神经元类型 I, (b)为中间神经元类型 II。

电频率. 可见这两类中间神经元的平均放电频率均在清醒活动状态下最高, 快波睡眠次之, 慢波睡眠最低.

2.2 中间神经元放电与场电位相位同步分析

以连续发生的 400 个 ripple 高频振荡波为参考事件, 对这两类中间神经元的放电分别做事件触发频率叠加直方图(peri-event histogram), 显示在 ripple 高频振荡波的最大振幅处, 这两类中间神经元的放电概率也达到最大. 且在 ripple 高频振荡波的每个子振

荡周期, 这两类中间神经元都有对应放电(图 2), 因 ripple 的振荡频率为 100~250 Hz, 故这两类中间神经元在 ripple 段的放电频率也极高. 提示这两类中间神经元的高频放电与 ripple 高频振荡波有高相关性.

把一个 theta 节律周期(360°)按度数分成 18 等分(每等分 20°), 分析这两类中间神经元在 theta 节律段的放电相位, 图 2 显示它们的放电与 theta 节律有锁相关系, 趋向于在 theta 节律波的波谷放电. 两类中间神经元的最大放电概率分别在 theta 周期波谷 354.4°±21.8°(类型 I)和 6.0°±20.8°(类型 II).

表 1 两种中间神经元在不同状态下的平均放电频率/Hz

	慢波睡眠	快波睡眠	清醒活动
类型 I (n=5)	24.26±5.57	25.80±4.22	38.48±16.07
类型 II (n=7)	29.26±11.44	37.82±12.73	55.68±12.47

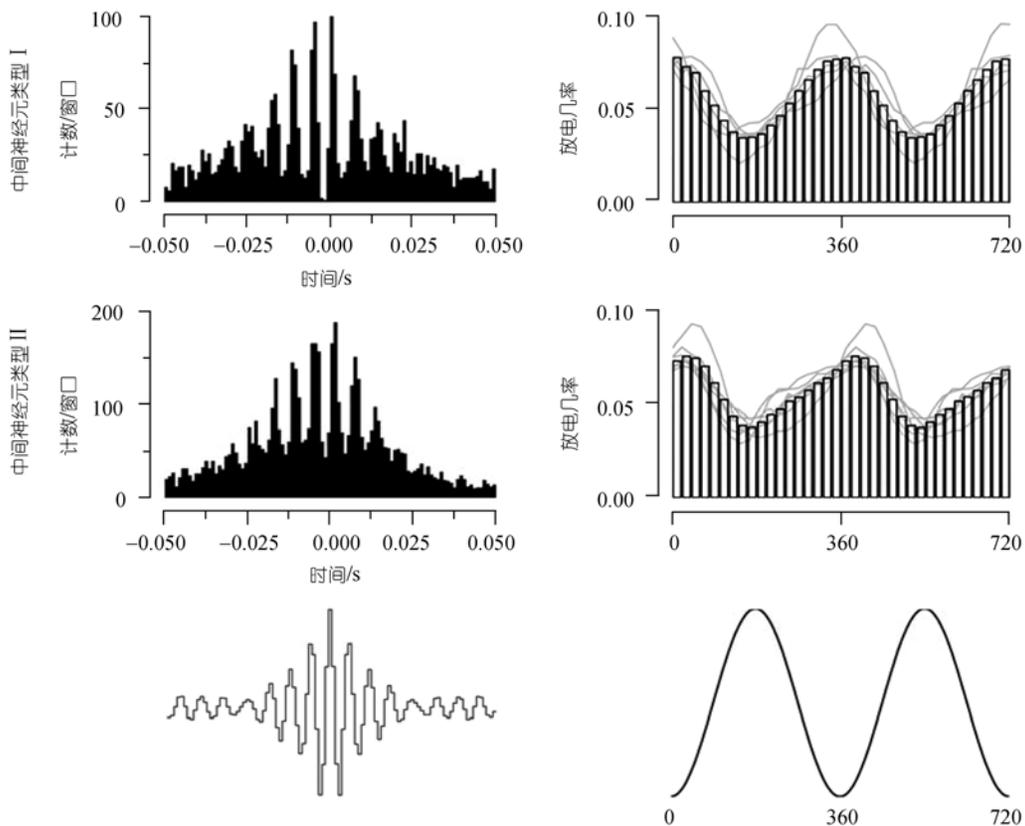


图 2 两类中间神经元放电与场电位的相位关系

两类中间神经元与 ripple 高频振荡(图左)和 theta 节律(图右)的相位关系. 右图中的灰线为单个神经元与 theta 节律的相位关系. 左图的窗口时间为 1 ms

2.3 中间神经元对摇晃刺激的反应

为进一步了解两类中间神经元在外界刺激作用下的活动情况, 我们对每只实验小鼠分别进行 7 次摇晃刺激, 每次刺激持续时间为 500 ms. 图 3 显示的是在同一只小鼠上同时记录到的一个类型 I 和一个类

型 II 中间神经元, 在摇晃刺激期的事件触发频率叠加直方图, 可见摇晃刺激对这两类中间神经元的放电都有影响, 其动态变化为短时增加. 统计显示, 刺激前 2 s, 类型 I 和一个类型 II 神经元的平均放电频率分别是 25.64 ± 10.77 和 43.86 ± 20.18 Hz, 刺激后 2 s 分别是 58.00 ± 6.73 和 76.50 ± 9.63 Hz.

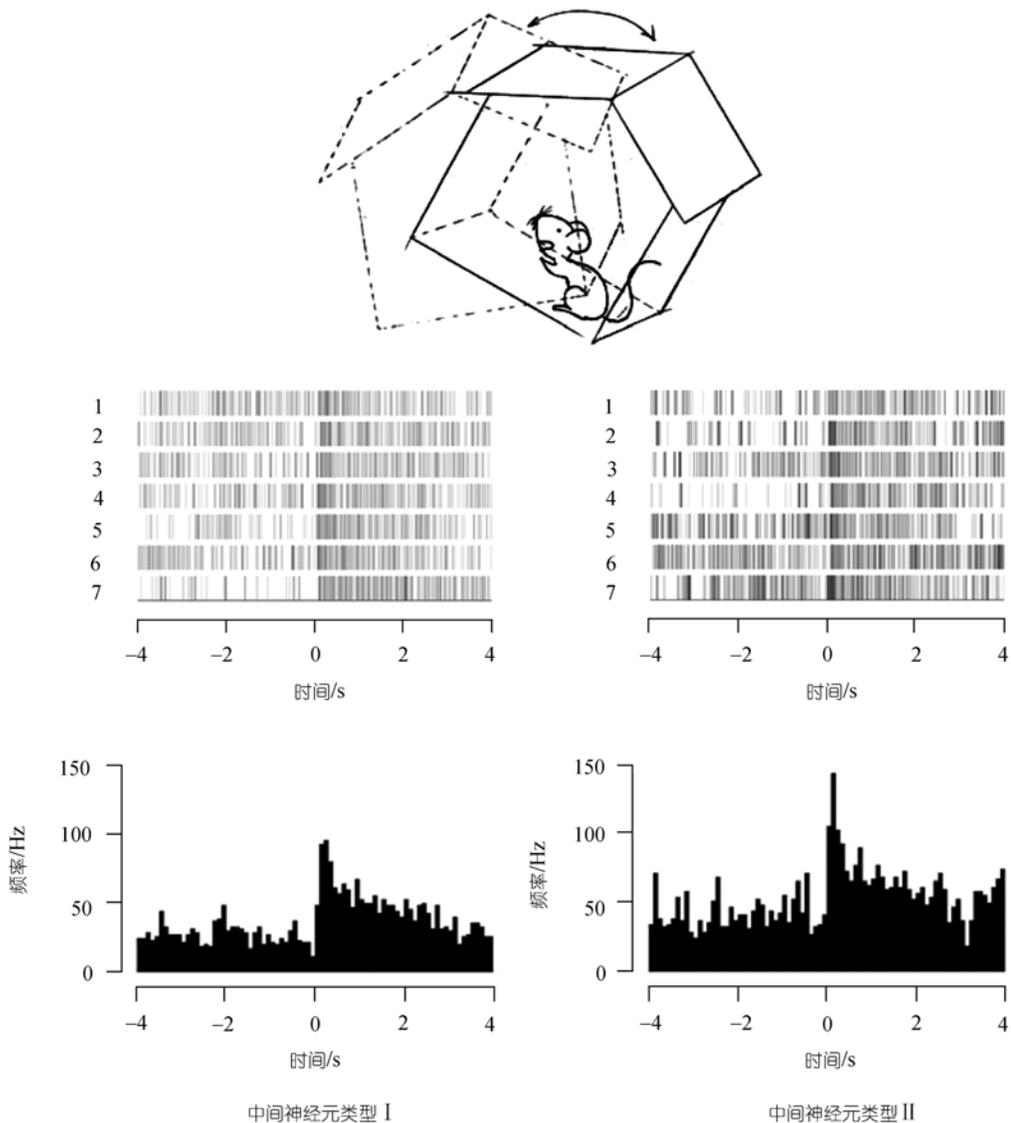


图 3 两类中间神经元对摇晃刺激的反应

两类中间神经元在 7 次摇晃刺激前后的单次放电序列图和事件触发频率叠加直方图(时间 0 处为刺激开始标记). 触发频率叠加直方图的窗口时间为 100 ms

3 讨论

脑内 100~250 Hz 的高频场电位振荡被称为“ripple”, 是啮齿类动物慢波睡眠、静止不动时, 在海马 CA1 区出现的特征场电位^[3,6,19]. 它由 5~15 个低振幅(小于 500 μ V)的正弦波组成, 每个正弦波的周期接近 5 ms(约 200 Hz)^[9,21]. 大量研究表明, 海马对长时记忆的形成有重要作用^[22,23], 这一作用主要通过海马皮层间的记忆信息巩固机制来完成, 而 ripple 被认为在这一巩固过程中可能起到一关键作用, 它可以协调海马 CA1 区锥体细胞的同步输出^[24-26]. 对于 ripple 的形成机制, 已开展了一些研究, 其中一种主要观点认为: CA1 区的 ripple 由 CA3 区的锥体细胞兴奋性触发, 产生和维持则与 CA1 区的中间神经元活动有关^[9,27]. 我们的研究支持这一观点. 我们在小鼠海马 CA1 区观察到的这两类中间神经元, 在慢波睡眠时有高频放电, 且这种高频放电与慢波睡眠时海马场电位出现的 ripple 在时间上有高同步性. 进一步分析发现, 这两类中间神经元在 ripple 的每个子振荡周期均有同步放电, 只是这两类神经元在放电频率上稍有区别, 其中类型 II 中间神经元的平均放电频率和峰值放电频率均比类型 I 神经元高. 可以推测, 这 2 类中间神经元与 ripple 的产生和维持有重要关系.

有研究报道, CA1 区锥体细胞的放电倾向于在 theta 节律的某些相位^[28,29], 我们的研究显示, 虽然这两类中间神经元的放电活动与 ripple 有高相关性, 但在动物进行探索活动海马场电位呈 theta 节律时, 它们的放电与 theta 节律周期也表现出相位锁定关系,

这提示在清醒活动状态下, 这两类中间神经元也参与海马神经网络活动的调节.

之前已有报道^[30], 惊吓情景刺激能改变小鼠海马 CA1 区群体神经元的放电模式, 我们也进一步考察了这两类中间神经元对模拟地震摇晃刺激的反应, 发现这两类中间神经元的放电频率均有增加, 而中间神经元活动的增加意味着它们对锥体细胞的抑制作用活动模式有所改变, 因此, 这反映了这两类中间神经元以特定的方式参与了海马锥体神经元对外界信息的实时编码过程.

多通道在体记录技术属胞外记录技术, 它虽能观察到单个神经元的放电活动, 但却不能对记录到的单个神经元进行形态学鉴定. 已有组织学研究工作显示, 在海马 CA1 区的中间神经元类型主要有篮状细胞(basket cell)、轴-轴细胞(axo-axonic cell)、枝形吊灯细胞(bistratified cell)和 O-LM 细胞(O-LM cell)等. 而且, 根据其表面的钙结合蛋白的不同, 每类中间神经元又可以分为几个亚类^[31]. 由于 O-LM 细胞的胞体分布在海马 CA1 区的始层(stratum oriens)^[32], 而根据场电位特征可判断我们的记录主要在海马 CA1 区的锥体层(stratum pyramidale), 因此基本可排除这两类高频放电神经元是 O-LM 细胞, 但它们具体在形态学上属哪类中间神经元, 则有赖研究方法的改进, 尤其是在清醒在体记录情况下, 神经元标记技术的提高.

综上所述, 我们的研究表明, 在海马 CA1 区存在与 ripple 高频振荡相关的高频放电中间神经元, 它们参与不同行为状态下海马神经网络活动的调节.

参考文献

- Engel A K, Fries P, Singer W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 704—716 [\[DOI\]](#)
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise K D, et al. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, 2003, 37: 311—322 [\[DOI\]](#)
- Klausberger T, Magill P J, Marton L F, et al. Brain-state and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons *in vivo*. *Nature*, 2003, 421: 844—848 [\[DOI\]](#)
- Vanderwolf C H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, 1969, 26: 407—418
- Buzsaki G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res*, 1986, 398: 242—252 [\[DOI\]](#)
- Ylinen A, Bragin A, Nadasdy Z, et al. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci*, 1995, 15(1): 30—46

- 7 Bragin A, Mody I, Wilson C L, et al. Local generation of fast ripples in epileptic brain. *J Neurosci*, 2002, 22(5): 2012—2021
- 8 Dzhala V I, Staley K J. Mechanisms of fast ripples in the hippocampus. *J Neurosci*, 2004, 24(40): 8896—8906 [\[DOI\]](#)
- 9 Buszaki G, Horvath Z, Urioste R, et al. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science*, 1992, 256: 1025—1027 [\[DOI\]](#)
- 10 Traub R D, Draguhn A, Whittington M A, et al. Axonal gap junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Rev Neurosci*, 2002, 13: 1—30
- 11 Buzsaki G, Haas H L, Anderson E G. Long-term potentiation induced by physiologically relevant stimulus patterns. *Brain Res*, 1987, 435: 331—333 [\[DOI\]](#)
- 12 Traub R D, Schmitz D, Jefferys J G, et al. High-frequency population oscillations are predicted to occur in hippocampal pyramidal neuronal networks interconnected by axoaxonal gap junctions. *Neuroscience*, 1999, 92: 407—426 [\[DOI\]](#)
- 13 Buzsaki G, Chrobak J J. Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*, 1995, 5: 504—510 [\[DOI\]](#)
- 14 Ponomarenko A A, Korotkova T M, Sergeeva O A, et al. Multiple GABA_A receptor subtypes regulate hippocampal ripple oscillations. *Euro J Neurosci*, 2004, 20: 2141—2148 [\[DOI\]](#)
- 15 Lin L N, Chen G F, Xie K, et al. Large-scale neural ensemble recording in the brains of freely behaving mice. *J Neurosci Meth*, 2006, 155: 28—38 [\[DOI\]](#)
- 16 Buzsaki G, Leung L W, Vanderwolf C H. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res*, 1983, 287: 139—171
- 17 Wilson M A, McNaughton B L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 1993, 261: 1055—1058 [\[DOI\]](#)
- 18 Skaggs W E, McNaughton B L, Wilson M A, et al. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus*, 1996, 6: 149—172 [\[DOI\]](#)
- 19 Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, et al. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving rat. *J Neurosci*, 1999, 19: 274—287
- 20 Klausberger T, Mrton L F, Baude A, et al. Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations *in vivo*. *Nat Neurosci*, 2004, 7: 41—47 [\[DOI\]](#)
- 21 Draguhn A, Traub R D, Bibbig A, et al. Ripple (~200-Hz) oscillations in temporal structures. *J Clin Neurophysiol*, 2000, 17(4): 361—376 [\[DOI\]](#)
- 22 Gabrieli J D E, Cohen N J, Corkin S. The impaired learning of semantic knowledge following bilateral medial temporal-lobe resection. *Brain Cogn*, 1988, 7: 157—177 [\[DOI\]](#)
- 23 Zola-Morgan S M, Squire L R. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*, 1990, 250: 288—290 [\[DOI\]](#)
- 24 Wilson M A, McNaughton B L. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*, 1994, 265: 676—679 [\[DOI\]](#)
- 25 Chrobak J J, Buszaki G. High-frequency oscillations in the output network of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J Neurosci*, 1996, 16: 3056—3066
- 26 Siapas A G, Wilson M A. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron*, 1998, 21: 1123—1128 [\[DOI\]](#)
- 27 Traub R D, Bibbig A. A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons. *J Neurosci*, 2000, 20: 2086—2093
- 28 Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, et al. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving rat. *J Neurosci*, 1999, 19: 274—287
- 29 Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 2002, 33: 325—340 [\[DOI\]](#)
- 30 Lin L N, Osan R, Shoham S, et al. Identification of network-level coding units for real-time representation of episodic experiences in the hippocampus. *PNAS*, 2005, 102: 6125—6130 [\[DOI\]](#)
- 31 Freund T F, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 1996, 6: 347—470 [\[DOI\]](#)
- 32 McBain C J, DiChiara T J, Kauer J A. Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci*, 1994, 14: 4433—4445