论著

文章编号:1000-5404(2005)19-1924-04

豚鼠海马锥体细胞在视觉分辨任务中放电时相变化的初步研究

胡 波,隋建峰,黄 维,罗 峻 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 设计有效、简便的锥体细胞放电时相检测程序,并检测豚鼠海马CA1区锥体细胞在视觉分辨任务中放电时相的变化。**方法** 对执行视觉分辨任务的5只豚鼠进行在体单细胞外记录。利用小波变换对豚鼠海马锥体细胞放电信号进行处理,提取单个锥体细胞放电信号,并根据时间关联获得锥体细胞的放电时相。**结果** 海马CA1区锥体细胞在视觉分辨任务前1~5 s的放电时相(172°±1.8°)明显早于任务后6~10 s的放电时相(189°±3.7°)($P<0.01$)。而任务后1~5 s和11~15 s的放电时相(177°±6.0°,172°±3.5°)则没有明显变化($P>0.05$)。**结论** 程序可以有效、简便地检测锥体细胞的放电时相。海马CA1区锥体细胞在视觉分辨任务执行过程中的放电时相存在有规律的移动。

关键词:锥体细胞;小波变换;θ节律;峰电位

中图法分类号:R338.26;R338.8;R339.146 **文献标识码**:A

Change of discharge phase of guinea pig hippocampal pyramidal cells during visual discriminative task

HU BO, SUI Jian-feng, HUANG Wei, LUO Jun (Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the change of discharge phase of guinea pig hippocampal CA1 pyramidal cells during visual discriminative task with an effective and convenient program we designed. Methods Five guinea pigs were performed by extracellular single unit recording *in vivo* when they were performing visual discriminative task. Discharge signals of individual pyramidal cells were extracted from different frequency signals by wavelet transform (WT), which made it feasible to calculate discharge phase of pyramidal cells in terms of time correlation between discharge and θ rhythm. Results The discharge phase of CA1 pyramidal cells in the 1- to 5-s interval before visual discriminative task (172°±1.8°) was obviously earlier than that in the 6- to 10-s interval after visual discriminative task (189°±3.7°) ($P<0.01$), whereas the discharge phases in the 1- to 5-s and 11- to 15-s interval after visual discriminative task were of no significant difference ($P>0.01$). Conclusion The program we designed is capable of detecting discharge phase of pyramidal cells. Regular shift of discharge phase of hippocampal CA1 pyramidal cells emerges before and after performing visual discriminative task.

Key words: pyramidal cell; wavelet transforms; θ rhythm; spike potential

海马在啮齿类动物空间记忆(spatial memory)和情景记忆(episodic memory)中发挥重要作用[1,2]。尽管已经知道海马结构(hippocampal formation)的解剖组成,但海马参与空间和情景记忆的详细机制仍然不得而知。传统观念认为,神经冲动所包含的信息是由神经元的放电频率所编码。但是仅仅基于单个神经元放电频率来编码信息的效率非常低下,不能适应中枢神经系统高效信息处理的要求。研究表明[3],海马位置细胞可能通过放电时相(discharge phase)和瞬时放电频率(instant firing rate)分别编码通过位置野的距离和速度。这提示海马中的锥体细胞编码信息的方式并不单一,可能存在频率编码和放电时相编码等多种方式。近期发现猴海马中某些锥体细胞参与视觉分辨任务的习得[4],那么视觉分辨任务中的锥体细胞是否也存在放电时相的变化呢?本研究旨在建立豚鼠视觉分辨的模型,设计有效、简便的放电时相检测程序,并初步研究海马CA1区锥体细胞在视觉分辨任务前后的放电时相变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选用5只健康雄性豚鼠,体质量(232±22)g,由第三军医大学实验动物中心提供。根据豚鼠脑立体定位图谱[5]于左侧海马对应区域钻孔(Bregma P:3.0 mm, L:2.5 mm),并按文献[6]的方法在豚鼠颅顶安装固定支架。术后豚鼠单独饲养

作者简介:胡 波(1981-),男,江西省新余市人,硕士研究生,主要从事学习记忆电生理方面的研究。电话:(023)68752254,E-mail:tmmu-hubo@sina.com

通讯作者:隋建峰,电话:(023)68753717,E-mail:jfsui2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-04-25;修回日期:2005-05-22

于标准环境（室温 20～25 ℃，24 h 昼夜循环光照，自由摄食饮水），并给予必要的抗感染措施。休息 1 周后，状况良好的豚鼠进行行为训练。

1.2　行为训练

在黑暗环境中，按参考文献[6]的方法将豚鼠固定在脑立体定位仪（Narishige SN-1）上。两个 5 V 二极管光源位于豚鼠左前方 15 cm 处，左右相距 6 cm。以左侧灯光闪烁为阳性条件刺激[positive conditional stimulus, CS(+)]，右侧灯光闪烁为阴性条件刺激[negative conditional stimulus, CS(−)]，CS(+)占条件刺激总次数的 25% 随机出现。每 1 次闪烁持续 4 s，间隔 10 s。在 CS(+)出现后 3.2 s，以持续 200 ms 的较强短促气流（200～400 g/cm^2）喷向左侧角膜，作为非条件刺激（unconditional stimulus, US），引起豚鼠左侧眼睑眨动。反复训练豚鼠学会在 CS(+)下自动眨眼，习得视觉空间分辨任务。训练装置为本教研室自行研制的视听分辨智能系统。每日训练 120 次，分两组进行。训练 1 个月后，CS(+)反应率大于 80%，而 CS(−)反应率低于 20% 的豚鼠作为视觉分辨认知模型。

1.3　电信号的采集和处理

电生理记录在豚鼠视觉分辨模型建立后进行。依据相关方法[6]对豚鼠进行清醒无肌松头颅固定。在解剖显微镜下掀开钻孔处硬脑膜，待豚鼠平静后，用微电极推进器将充灌有 1 mol/L 醋酸钠加 2% 滂胺天蓝（pontamine sky blue）溶液的玻璃微电极缓慢推入海马（Bregma P：3.0 mm，L：2.5 mm，H：4.0～5.0 mm）。电极尖端直径约 1 μm，直流电阻 10～20 MΩ。首先记录海马神经元自发放电（10 min），然后记录海马神经元在视觉分辨过程中的放电活动。微电极引导的电活动经前置信号放大器（NIHON KOHDEN MEZ-7200）放大后，用 Power lab4/sp（AD Instrument）系统采集，采样频率为 20 kHz，同步监听放电信号。海马电位和神经元放电信号的带通（bang pass）分别为 1～100 Hz 和 10～5 000 Hz。信号采集使用 CHART4.1 软件。

1.4　采集信号的处理

提取单个锥体细胞放电信号的方法参照本实验室既往的研究[7]。这里，我们利用小波变换能够对信号进行多分辨率分析的特点[8]，选用高阶消失矩较低的正交小波函数来对信号进行分解变换，从海马电位信号中获取精度较高的海马 θ 节律（4～8 Hz），并通过时间关联计算获得锥体细胞的放电时相。

1.5　锥体细胞放电时相的分析

电生理记录的数据均被存入计算机以用于后期的分析。利用本教研室自编软件包计算和比较 CS(+)出现前 5 s 和出现后 15 s 锥体细胞的放电时相，作直方图表示，直方图采样 bin 宽 5 s。编程使用 Matlab6.1 软件。

1.6　形态学观察

电生理记录完毕后，微电泳（10 μA 阴极电流，10 min），标记最后 1 个记录点。实验后，豚鼠在戊巴比妥钠（pentobarbital，30～40 mg/kg）麻醉下，经心脏灌注生理盐水 250 ml，在用 4% 多聚甲醛 500 ml 作灌注固定。取出脑组织并置于 20% 蔗糖溶液中沉底，4 ℃保存。脑组织沉底后，作连续的冠状位冰冻切片，Nissl 染色确定记录点位置。

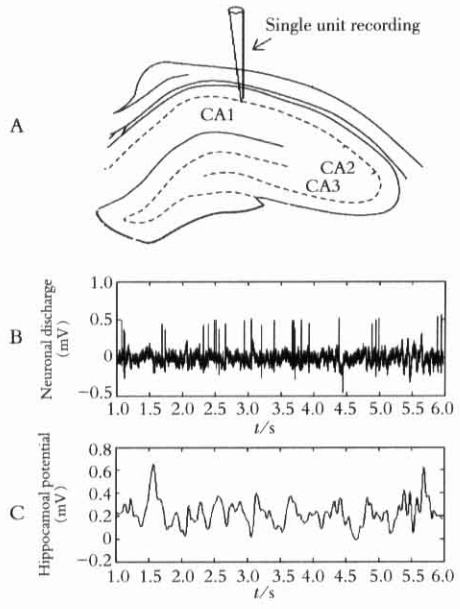
1.7　统计学处理

符合记录部位要求，且信噪比（signal to noise ratio）大于 3∶1 的数据被用于统计分析，统计分析使用 SPSS10.0 软件。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Scheffe 法检验豚鼠 CA1 区锥体细胞在视觉分辨任务前后各阶段放电时相的差异。

2　结果

2.1　海马电位和神经元放电信号的获得

我们利用玻璃微电极记录海马电信号（图 1A），采样频率为 20 kHz。信号经过前置放大器放大后，在经过 2 个带通不同的通道输出，即可分别获得海马电位和神经元放电信号，并且二者在时间上完全对应（图 1B，C）。根据相关标准[8]判断该神经是否参与视觉分辨任务。我们共稳定记录了 31 个神经元，其中 12 个参与视觉分辨任务。



A：Site of extracellular single unit recording *in vivo*（Bregma P：3.0 mm，L：2.5 mm，H：4.0－5.0 mm）；B：Discharge signals of hippocampal neurons，band-pass filtered at 10－5 000 Hz；C：Hippocampal potential，band-pass filtered at 1－100 Hz

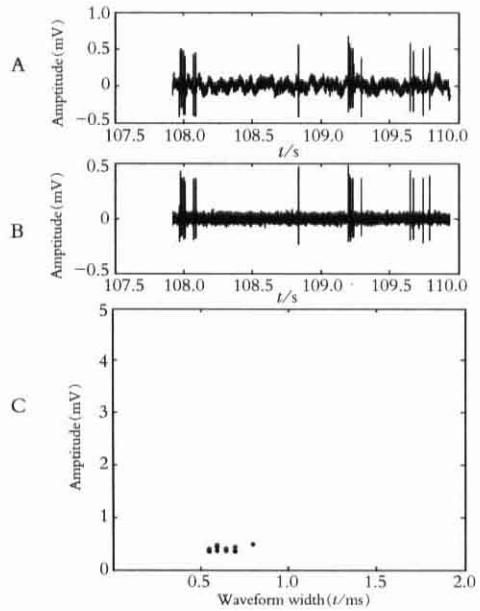
图 1　海马神经元放电信号和海马电位的记录

Fig 1　Recording of hippocampal neuronal discharge signals and hippocampal potential

2.2　海马锥体细胞放电的筛选和识别

原始的神经元放电信号由于在记录过程中的各种因素而受到干扰，表现为基线漂移和噪声明显（图 2A）。这显然影响对神经元动作电位特性的判定。神经元放电信号在 2^1 尺度下经过小波变换后，噪声和基线漂移得到了有效地消除（图 2B）。根据海马锥体细胞与中间神经元的判别标准[9][主峰电位波宽（w）小于 250 μs，频率（r）>（0.04 w −3.5）是中间神经元；而主峰电位波宽（w）大于 250 μs，频率（r）<（0.04 w −3.5）是锥体细胞]，我们判定图中信号（放电频率：8.43 Hz，主峰波宽：0.65 ms）属于锥体细胞放电。为了获得锥体细胞放电，相同的处理被用于前已鉴定的视觉分辨相关神经元。在选出锥体细胞之后，通过观察它们的动作电位幅值和时程的相似程度，即可筛选出单个锥体细胞的放电信号（图 2C）。我们共选出了

10/12 锥体细胞，并获得和单独保存了它们的放电信号。



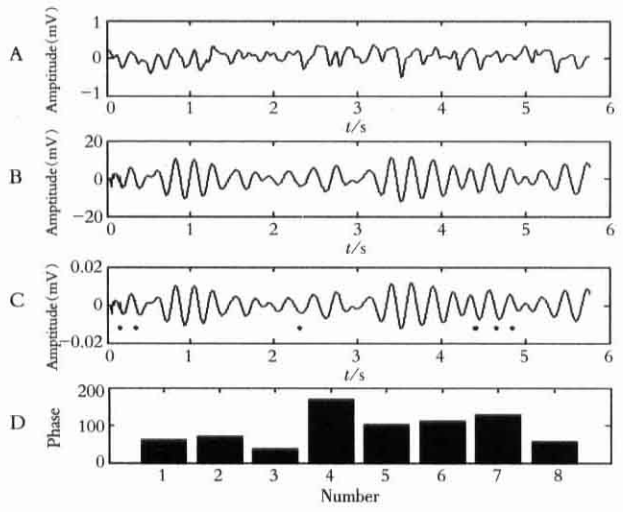
A: Original discharge signals of pyramidal cell; B: Discharge signals of pyramidal cell at scale 2^1; C: Filter of individual pyramidal cell discharge signals

图2 单个锥体细胞放电信号检测

Fig 2 Detection of individual pyramidal cell discharge signals

2.3 海马锥体细胞放电时相的检测

初始记录到的海马电位明显不规则，仍包含大量其它频率的信号和噪声，无法观察到海马电图中的θ节律（图3A）。经过小波变换，我们获得了高频率精度的θ波（图3B）。通过锥体细胞放电与θ节律的时间对应（图3C），我们精确计算了锥体细胞每个动作电位的放电相位（图3D）。



A: Original hippocampal potential; B: Hippocampal θ rhythm gotten by wavelet transform; C: Time correlation between pyramidal cell discharge and θ rhythm; D: Phase of every action potential

图3 海马锥体细胞放电时相的检测

Fig 3 Detection of discharge phase of hippocampal pyramidal cells

2.4 海马锥体细胞放电时相在视觉分辨任务执行前后的变化

视觉分辨任务前1～5 s的锥体细胞放电时相（172°±1.8°）明显早于任务后6～10 s的放电时相（189°±3.7°）（$P<0.01$）。前1～5 s的放电时相（172°±1.8°）与任务后1～5 s的放电时相（177°±6.0°），以及任务后11～15 s的放电时相（172°±3.5°）差异则不显著（$P>0.05$）。

3 讨论

海马θ波是一种高幅、低频的脑电波，通常在动物进行一些学习相关的行为时出现。O'Keefe 等[10]发现，大鼠海马中位置相关锥体细胞的发放就与海马θ节律有系统的相位关系，这种系统的相位关系可以反映大鼠与位置野的相对位置。近期的诸多研究中也都发现了类似的结果[11,12]。最近，Huxter 等[3]发现海马位置相关锥体细胞通过放电时相和瞬时放电频率分别编码通过位置野的距离和速度，并认为这种同时编码时间发生地点和内容的双重编码机制为海马参与空间和情景记忆提供了神经基础。临床上，在患者的许多新皮质区都发现了θ电活动[13]，这就提示使用频率和时相同时编码多种信息的能力可能是皮层锥体神经元的一种普遍特性。已经知道海马中某些锥体细胞参与视觉、听觉分辨任务[4,14]，但这些分辨任务中的锥体细胞是否也存在放电时相的变化却少见报道。本研究的目的在于建立豚鼠视觉分辨的模型，设计有效、简便的放电时相检测程序，并初步研究豚鼠海马CA1区锥体细胞在视觉分辨任务前后放电时相的变化。

在本实验中，我们首先成功建立了豚鼠视觉分辨模型。在此基础上，同步记录了视觉分辨模型豚鼠海马CA1区神经乐团的放电和海马电位信号。选择参与视觉分辨任务的神经元作为研究对象，将它们的放电信号在2^1尺度上做小波变换，消除噪声干扰和基线漂移，区分锥体细胞和其它种类神经元。根据动作电位特征，区分多个锥体细胞放电成分，从而得到单个锥体细胞放电信息。对海马电位进行小波变换获得高频率精度的θ节律，利用与同步记录的θ节律的时间关联，计算动作电位发放的相位。我们发现：海马CA1区锥体细胞在视觉分辨任务前、后的放电平均时相有明显的、有规律的位移。实验结果说明豚鼠海马CA1区锥体细胞在认知学习过程中存在与海马θ节律密切联系的放电时相变化，并可能通过这些放电时相变化编码动物所处环境的某些信息。

本实验利用小波变换，能成功地将单个锥体细胞放电信号提取出来，并有效地检测锥体细胞的放电时相，为研究空间记忆神经机制提供了一种方法，对小波变换在生理信号中的应用做了有益的尝试。

（致谢：感谢朱志茹博士、周光纪博士在程序设计和论文修改过程中所给予的建议和帮助。）

参考文献：

[1] Ekstrom A D, Kahana M J, Caplan J B, *et al*. Cellular networks underlying human spatial navigation[J]. Nature, 2003, 425(6954): 184-188.
[2] Suzuki W A. Episodic memory signals in the rat hippocampus[J]. Neuron, 2003, 40(6): 1055-1056.
[3] Huxter J, Burgess N, O'Keefe J. Independent rate and temporal coding in the hippocampal pyramidal cells[J]. Nature, 2003, 425(6960): 828-832.
[4] Wirth S, Yanike M, Frank L M, *et al*. Single neurons in the monkey hippocampus and learning of new associations[J]. Science, 2003, 300(5625): 1578-1581.
[5] Rapisarda C, Bacchelli B. The brain of guinea pig in the stereotaxic coordinates[J]. Arch Sci Biol (Bologna), 1977, 61(1-4): 1-37.
[6] 高 洁，隋建峰，熊 鹰，等. 小型动物清醒无肌松头颅固定方法的建立和应用[J]. 第三军医大学学报，2003，25(3)：265-266.
[7] 朱志茹，隋建峰，高 洁. 大鼠海马锥体细胞放电识别算法及程序设计[J]. 北京生物医学工程，2003，22(2)：124-126.
[8] 胡广书. 现代信号处理教程[M]. 北京：清华大学出版社，2004. 11-16.
[9] Wiebe S P, Staubli U V. Recognition memory correlates of hippocampal theta cell[J]. J Neurosci, 2001, 21(11): 3955-3967.
[10] O'Keefe J, Recce M L. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm[J]. Hippocampus, 1993, 3(3): 317-330.
[11] Harris K D, Henze D A, Hirase H, *et al*. Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in the hippocampal pyramidal cells[J]. Nature, 2002, 417(6890): 738-741.
[12] Metha M R, Lee A K, Wilson M A. Role of experience and oscillations in transforming a rate code into a temporal code[J]. Nature, 2002, 417(6980): 741-746.
[13] Kahana M J, Sekuler R, Caplan J B, *et al*. Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation[J]. Nature, 1999, 399(6738): 781-784.
[14] Christian E P, Deadwyler S A. Behavioral functions and hippocampal cell types: evidence for two nonoverlapping populations in the rat[J]. J Neurophysiol, 1986, 55(2): 331-348.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)19-1927-01

个案与短篇

玻璃酸钠关节内注射配合中药治疗膝关节慢性滑膜炎

Hyaluronic sodium injected into joint and oral administration of traditional Chinese medicine for treating chronic synovitis of knee joint

王相奇[1]，廉文隆[2]，王彦兵[3]（[1]河南省襄城县骨科医院，襄城 461700；[2]河南省武陟县木城镇卫生院，武陟 454950；[3]河南省漯河市卫生防疫站，漯河 452605）

膝关节慢性滑膜炎是临床上的常见病、多发病，多发于40岁以上成年人，具有病程长、缠绵难愈、易复发等特点，已成为骨科临床治疗中的难题。几年来，我们应用玻璃酸钠膝关节腔内注射、内服自制的中药制剂"膝痛灵"，配合手法按摩、膝关节康复训练等方法治疗膝关节慢性滑膜炎60例，疗效满意。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组60例，男26例，女34例。年龄最小24岁，最大78岁，其中40~60岁发病率最高，约占65%。单侧46例，双侧14例，病程最短30 d，最长6年，平均8个月。急性损伤者38例，慢性劳损者22例，均伴有膝关节疼痛、肿胀和关节功能障碍，关节活动时多伴有摩擦音。关节积液者37例，滑膜肥厚者23例，浮髌试验阳性者35例，X线片显示大多患者有不同程度的膝关节退行性改变。

作者简介：王相奇(1957-)，男，河南省襄城市人，副主任医师，主要从事骨伤疼痛方面的研究，发表论文30余篇。电话：(0374)3587553

收稿日期：2005-01-13；修回日期：2005-03-29

1.2 治疗方法

1.2.1 关节腔内注射玻璃酸钠 常规消毒、铺巾。可采用髌上内侧或外侧及髌下内侧或外侧4种入路，髌上入路膝关节伸直进行穿刺，针尖与额面平行，斜向髌骨与股骨关节面的间隙穿刺。髌下入路在膝关节屈曲90°位进行穿刺，针尖向中上倾斜穿刺进入关节腔。抽吸无回血，抽尽关节液，注入玻璃酸钠2 ml(20 mg)，每周1次，3次为1疗程。拔针加盖无菌纱布包扎。患肢制动5~7 d，第2天嘱患者进行股四头肌收缩锻炼，以不疲劳为度。

1.2.2 内服中药 膝痛灵：熟地30 g、丹参20 g、黄芪20 g、白芍20 g、砂仁6 g、炙甘草10 g。以上6味药共研细末，炼蜜为丸，每丸6 g，3次/d，每次2丸，黄酒或白开水冲服，3周为1疗程。

1.2.3 手法按摩 ①点穴按揉法：患者仰卧位，分别以内侧膝眼为主穴，反复施行垂直点穴[1]，达局部明显酸胀感为度，再以髌上缘两侧凹陷部，采用点按式提拉揉按法，宜轻重适度，使其周围肌肉松弛柔韧。每天1次，每次30 min，2周为1疗程。②推拿旋转法：患者仰卧，医者以拇指及四指推摩拿捏膝关节周围韧带、关节囊或粘连部位，一般10~15 min，使其恢复弹性，然后再用大鱼际肌沿髌骨做顺、逆时针旋转研磨动作，使局

（下转1934页）