

黑质致密部神经元的反应性与放电型式的关系

刘国鹏¹, 胡三觉¹, 樊爱琳², 韩 晟¹, 王晓斌¹

(第四军医大学 1. 神经科学研究所; 2. 唐都医院介入放射科, 陕西 西安 710032)

摘要: 通过研究黑质致密部(substantia nigra compacta, SNc)神经元的放电型式与其对谷氨酸、多巴胺及缺氧敏感性的关系, 探讨“非周期敏感”现象在神经系统的普遍性。在幼鼠的脑片胞外记录 SNc 神经元的自发放电, 比较周期与非周期放电神经元对该三种刺激反应的敏感性, 并对非周期放电神经元的动作电位峰峰间期序列(interspike interval, ISI)进行非线性动力学分析。结果表明, 非周期放电神经元比周期放电神经元对上述三种刺激更敏感; 非周期放电神经元的放电 ISI 序列含有非稳定周期轨道族, 提示非周期放电存在确定的动力学机制。

关键词: 黑质致密部; 自发放电; 谷氨酸; 多巴胺; 缺氧; 非稳定周期轨道

中图分类号: Q421 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0645-07

神经元对外界刺激反应的敏感性受到细胞膜上的受体、通道、细胞内信使等因素的影响。最近, 我们在受损的背根节发现具有确定性混沌特征的非周期放电神经元对刺激的反应较周期放电神经元显著敏感, 称之为“非周期敏感”现象^[1,2]。随后, 又在正常的中枢黑质致密部(substantia nigra compacta, SNc)神经元对去甲肾上腺素的反应中也观察到了同一现象(刘国鹏等), 因此推测这种“非周期敏感”现象可能反映可兴奋细胞的一种基本反应特性^[1,2]。为了进一步论证“非周期敏感”现象在神经系统的普遍性, 本文在幼鼠脑薄片记录 SNc 神经元的自发放电, 观察神经元对谷氨酸(Glutamate, Glu)、多巴胺(Dopamine, DA)及缺氧等不同类型刺激的敏感性与其放电型式之间的关系, 并检测非周期放电时间序列的非线性动力学特性。

1 材料和方法

1.1 脑片制备及放电记录

出生 10 天的 SD 幼鼠(体重 25-30g), 雌雄不拘。幼鼠断头并迅速取脑, 快速置于 0-4℃ 经 95% O₂、5% CO₂ 混合气饱和的蔗糖人工脑脊液中(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)。蔗糖 ACSF 的成分为(mmol/L): 蔗糖 250, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgSO₄ 2, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25。待脑完全冷却后, 对所在脑区进行修块, 然后用震动切片机(美国 Campden 公司)制备厚度为 300μm 的含 SNc 的水平中脑脑片, 并置于 26℃ 的充以 95% O₂、5% CO₂ 的 ACSF 中孵育。脑片孵育 2h 后, 移至记录槽, 用尼龙网及 U 形铂丝框加以固定, 并以 1-2 mL·min⁻¹ 的速度灌流 32℃ 的充以 95% O₂、5% CO₂ 的 ACSF。ACSF 的成分为(mmol/L): NaCl 125, KCl 3, CaCl₂ 2, MgSO₄ 2, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25, 葡萄糖 10。根据大鼠脑图谱在解剖镜下分辨 SNc, 对 SNc 神经元进行胞外记录。记录电极由

收稿日期: 2001-04-16

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(30030040)

作者简介: 刘国鹏, 1972 年生, 硕士, 电话: (029) 3374564, E-mail: guoplu@sina.com.

PP-83 电极控制器(日本 Narishige 公司)控制,尖端开口约 $2\mu\text{m}$,电极内充以 ACSF,电极阻抗为 $3\sim 7\text{M}\Omega$,单细胞的胞外放电信号经膜片钳放大器 Axopatch 200A 放大并输入到计算机,利用生物电信号采集程序记录动作电位的峰峰间期(interspike interval ISI)序列及放电频率直方图(第四军医大学物理学教研室提供)。实验中所用的 Glu、DA 等药品溶于人工 ACSF 中,灌流脑片观察药物的作用。用 95% N_2 、5% CO_2 混合气饱和人工 ACSF,灌流脑片观察缺氧的作用。

1.2 数据处理

1.2.1 反应敏感性的判定

以放电频率增大或减少百分数作为分析指标,其计算公式如下:

$$\text{放电频率增大或减少百分数} = (\text{最大反应频率} - \text{基础频率}) / \text{基础频率} \times 100\%$$

基础频率为反应前 3min 的平均放电频率,最大反应频率为反应期间,放电数增加或减少到最大值后 1min 的平均放电频率^[1]。

1.2.2 非线性动力学分析

利用 Pual SO 的 SoUPO 程序对非周期放电的 ISI 序列进行非稳定周期轨道(unstable period orbits, UPO)的检测,以确定非周期放电是否存在确定性^[3]。

2 结 果

2.1 神经元的自发发电类型

在 30 只幼鼠脑片的 SNc 胞外记录了 520 个神经元的自发发电。发电类型分为两类:第一类为周期发电,其 ISI 基本相等,ISI 分布较集中,周期发电神经元占自发发电神经元总数的 85% (442/520)。第二类为非周期发电,其 ISI 显著不等,ISI 分布分散,非周期发电神经元占自发发电神经元总数的 15% (78/520)(图 1)。

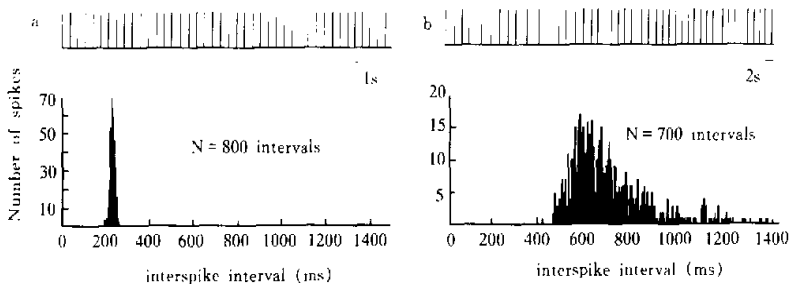


Fig.1 Firing pattern of SNc neurons. (a)Periodic firing. (b)Non-periodic firing. Upper trace: Spike trains. Lower trace: ISI distribution histogram corresponding to spike trains. Note the ISI distribution of non-periodic firing is wider than that of periodic firing

2.2 不同浓度 GLU 对周期及非周期放电神经元的兴奋作用

10% (3/30) 的周期放电神经元、93% (14/15) 的非周期放电神经元对 $0.2\mu\text{mol/L}$ Glu 产生兴奋反应。观察了 12 个周期及 10 个非周期放电神经元对 0.2 、 1 、 $5\mu\text{mol/L}$ Glu 的兴奋反应,其放电频率随 Glu 浓度升高而增大。但是,非周期放电神经元对不同浓度 Glu 的反应程度均比周期放电神经元大,其浓度-效应曲线较周期放电神经元显著左移($P < 0.01$, t 检验,图

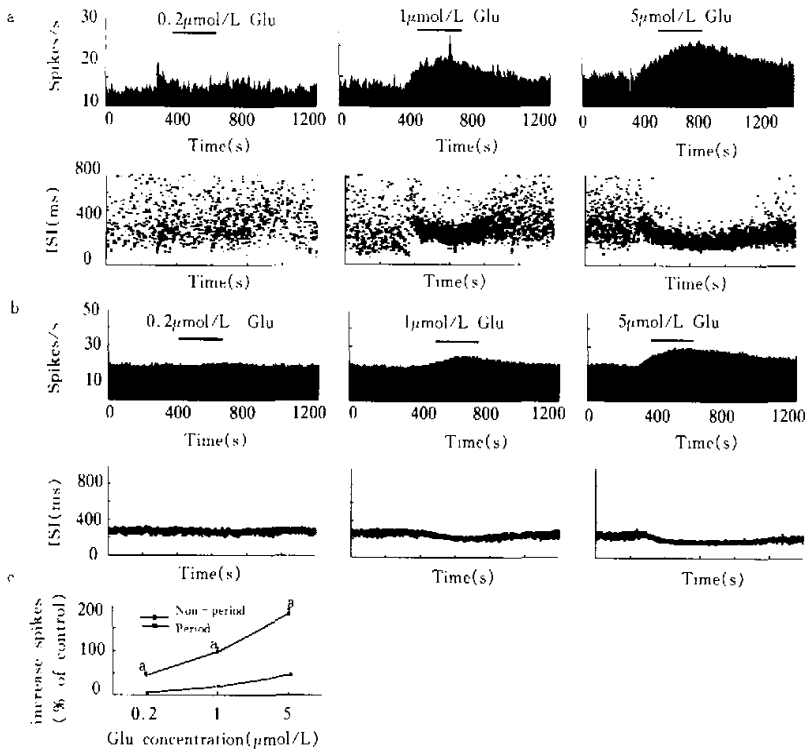


Fig. 2 Comparison of excitatory effect of Glu with different concentration on periodic firing and non-periodic firing neurons. (a) The non-periodic firing neuron exhibited obvious excitatory response to Glu, and the response increased gradually when the concentration of Glu increased from 0.2 μmol/L (left panel) to 1 μmol/L (middle panel) and 5 μmol/L (right panel). (b) The periodic firing neuron only responded obviously to 5 μmol/L Glu (right panel). (c) Summary of dose-response relationship of Glu on neurons. Note that the curve of Non-periodic firing neuron ($n = 10$) is significantly shifted to the upper left compared to that of periodic firing neuron ($n = 12$, $*P < 0.01$)

2), 表明非周期放电神经元比周期放电神经元对 Glu 的兴奋作用更敏感。

2.3 不同浓度 DA 对周期及非周期放电神经元的抑制作用

17% (6/35) 的周期放电神经元、85% (11/13) 的非周期放电神经元对 0.5 μmol/L DA 产生抑制反应。观察了 13 个周期及 9 个非周期放电神经元对 0.5、2、10 μmol/L DA 的抑制反应, 其放电频率随 DA 浓度升高而减少。但是, 非周期放电神经元对不同浓度 DA 的反应程度均比周期放电神经元大, 其浓度-效应曲线较周期放电神经元显著左移 ($P < 0.01$, t 检验, 图 3), 表明非周期放电神经元比周期放电神经元对 DA 的抑制作用更敏感。

2.4 不同时间缺氧对周期及非周期放电神经元的抑制作用

观察了 30s、60s、90s 三个缺氧时间段对 20 个周期及 13 个非周期放电神经元的抑制作

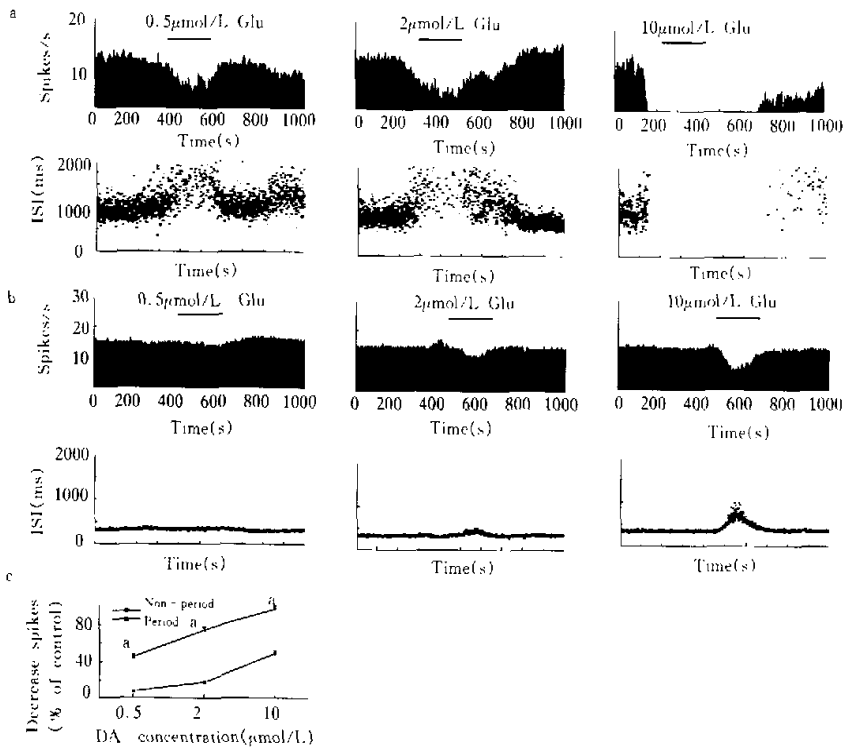


Fig.3 Comparison of suppressive effect of DA with different concentration on periodic firing and non-periodic firing neurons. (a) The non-periodic firing neuron exhibited obvious suppressive response to DA, and the response increased gradually when the concentration of DA increased from $0.5\mu\text{mol/L}$ (left panel) to $2\mu\text{mol/L}$ (middle panel) and $10\mu\text{mol/L}$ (right panel). (b) The periodic firing neuron only responded obviously to $10\mu\text{mol/L}$ DA (right panel). (c) Summary of dose-response relationship of DA on neurons. Note that the curve of Non-periodic firing neuron ($n=9$) is significantly shifted to the upper left compared to that of periodic firing neuron ($n=13$). $P<0.01$

用,随着缺氧时间的延长抑制作用逐步加强。但是,非周期放电神经元对不同时间缺氧的反应程度均比周期放电神经元大,其时间-效应曲线较周期放电神经元显著左移($P<0.01$, t 检验,图4),表明非周期放电神经元比周期放电神经元对缺氧的抑制作用更敏感。

2.5 放电序列的 UPO 检测

对5例非周期放电神经元的 ISI 序列进行 UPO 检测。在3例 ISI 序列中检测到了非稳定周期1、周期2及周期3轨道,在2例 ISI 序列中检测到了非稳定周期1、周期2轨道。在二维空间中所有周期1轨道都位于对角线上,周期2轨道是以对角线呈镜像对称的一对点,周期3轨道是呈三角对称的三重点(图5)。对于 UPO 的成功检测说明非周期放电神经元的放电序列具有确定性的动力学机制,即非周期放电具有混沌特性。

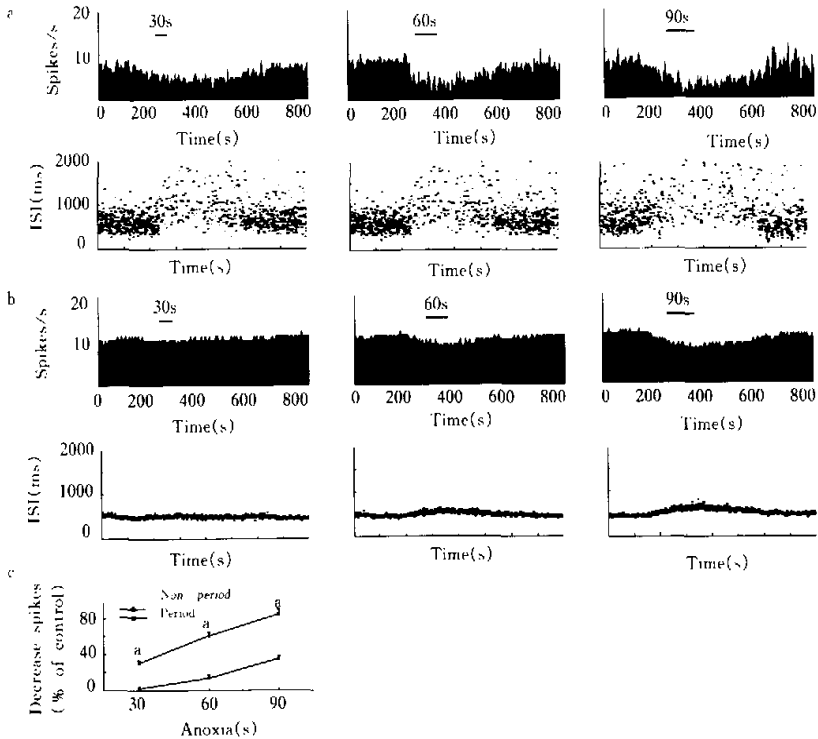


Fig.4 Comparison of suppressive effect of anoxia with different time on periodic firing and non-periodic firing neurons. (a) The non-periodic firing neuron exhibited obvious suppressive response to anoxia, and the response increased gradually when the time of anoxia increased from 30s (left panel) to 60s (middle panel) and 90s (right panel). (b) The periodic firing neuron only responded obviously to anoxia with 90s (right panel). (c) Summary of dose-response relationship of anoxia on neurons. Note that the curve of Non-periodic firing neuron ($n=13$) is significantly shifted to the upper left compared to that of periodic firing neuron ($n=20$, $^*P<0.01$)

3 讨 论

研究表明大鼠 SNc 神经元以 DA 神经元为主, DA 通过 D2 受体抑制神经元的自发电活动^[4], Glu 通过 NMDA 及非 NMDA 受体加强神经元的自发电活动^[5], 缺氧可能通过 ATP-敏感的钾通道抑制 SNc 神经元的放电^[6]。

离体的 SNc 神经元有丰富的自发放电, 并且放电型式各不相同^[7,8]。我们以前的研究曾观察到非周期放电 SNc 神经元比周期放电神经元对 NE 反应更敏感(刘国鹏等), 本文进一步比较了两种不同型式放电神经元对 Glu、DA 及缺氧的反应敏感性。结果表明, 非周期放电神经元要比周期放电神经元对上述三种刺激的反应更敏感。由于这三种刺激包括了通过特异性受体

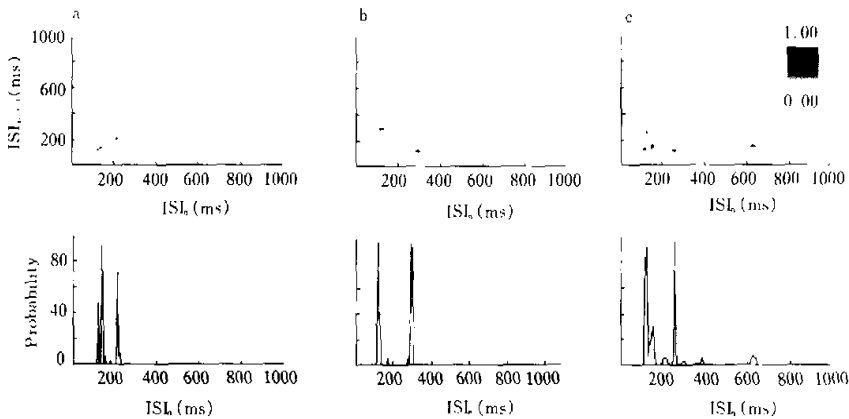


Fig. 5 Identify unstable period orbits in time series of non-period firing. Upper trace: The family of unstable period orbits. Lower trace: Maximal statistic probability of period. When the probability is greater than 95%, it indicates the period orbit is significant. (a) Unstable Period-1 orbits. Three orbits can be found, only one orbit is significant. (b) Unstable Period-2 orbits, the orbit is significant. (c) Unstable Period-3 orbits, the orbit is significant

的兴奋性(Glu)刺激、抑制性(DA)刺激以及不通过特异性受体的缺氧刺激,所以,正常SNc神经元对刺激反应的“非周期敏感”现象提示这一现象在中枢神经元可能具有普遍性,这也为我们提出的“非周期敏感”反映了可兴奋细胞的一种基本反应特性的推测^[2]提供了有力的支持。

对SNc神经元的非周期放电进行非线性动力学分析显示,非周期放电的时间序列具有混沌动力学的骨架—UPO^[1,2,3,9],提示SNc神经元的非周期放电具有混沌特性^[3,9]。混沌的主要特性之一是初始条件的敏感性,即微小的扰动可产生巨大的响应^[10],混沌的这种初值敏感性是否决定了非周期放电神经元对刺激反应的敏感性,尚需深入研究。显然,广泛存在于生物组织中的混沌现象^[11],其基本性质势必给生物组织的基本节律活动带来深刻影响,值得我们高度注意。

参考文献:

- [1] 杨红军,胡三觉,管忠. 受损背根节神经元对四乙基胺反应的敏感性与其放电型式的关系[J]. 生理学报, 2000,52(5):395-401.
- [2] Hu SJ, Yang HJ, Jian Z, et al. Adrenergic sensitivity of neurons with non-periodic firing activity in rat injured dorsal root ganglion[J]. *Neuroscience*, 2000,101:689-698.
- [3] 韩晟,管忠,胡三觉. 大鼠视上核神经元自发放电节律的确定性机制[J]. 生物物理学报,2000,16(3):493-500.
- [4] Lacey MG, Mercuri NB, North RA. Dopamine acts on D2 receptor to increase potassium conductance in neurons of the rat substantia nigra zona compacta[J]. *J Physiol*, 1987,392:397-416
- [5] Wu HQ, Schwarcz R, Shepard PD. Excitatory amino acid-induced excitation of dopamine-containing neurons in the rat substantia nigra: modulation by kynurenic acid[J]. *Synapse*, 1994,16(3):219-230

- [6] Murphy KP, Greenfield SA. Neuronal selectivity of ATP-sensitive potassium channels in guinea-pig substantia nigra revealed by responses to anoxia[J]. *J Physiol*, 1992,453:167-183
- [7] Galarraga E, Bargas J. Firing patterns in substantia nigra compacta identified neurons in vitro[J]. *Arch Med Res*, 1995,26(2):191-199.
- [8] Rohrbacher J, Ichinohe N, Kitai ST. Electrophysiological characteristics of substantia nigra neurons in organotypic cultures: spontaneous and evoked activities[J]. *Neuroscience*, 2000,97(4):703-714.
- [9] Mascio MD, Giovanni GD, Matteo VD, et al. Decreased chaos of midbrain dopaminergic neurons after serotonin denervation[J]. *Neuroscience*, 1999,92(1):237-243.
- [10] Ott E. Chaos in dynamical systems[M]. New York:Cambridge University Press, 1993.108-138.
- [11] Wagner CD, Persson PB. Chaos in the cardiovascular system: an update[J]. *Cardiovas Res*, 1998,40(2):257-264.

RELATIONSHIP BETWEEN FIRING PATTERN AND RESPONSIVENESS OF SUBSTANTIA NIGRA COMPACTA NEURONS

LIU Guo peng¹, HU San jue¹, FAN Ai-lin¹, HAN Sheng¹, WANG Xiao-bin¹
(1. Institute of Neurosciences; 2. Tang Du Hospital,
The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Studying of relationship between the firing pattern and sensitivity of substantia nigra compacta (SNc) neurons to glutamate, dopamine and anoxia, to certify universality of "non-period sensitivity" in nervous system. Spontaneous activities of SNc neurons in brain slice of young rats were recorded extracellularly, which were divided into periodic and non-periodic firing patterns. The sensitivity of neurons with two firing patterns to glutamate, dopamine and anoxia were compared. Further, the non-linear dynamic of interspike interval (ISI) time series of non-period firing was analyzed. The results indicate that the non-periodic firing neurons are more sensitive to glutamate, dopamine and anoxia than periodic firing neurons in SNc, and that a family of unstable period orbits was identified from time series of ISI of non-periodic firing, suggesting deterministic dynamical mechanism contained within in ISI time series of non-periodic firing.

Key Words: Substantia nigra compacta; Spontaneous activity; Glutamate;
Dopamine; Anoxia; Unstable period orbits