

大鼠在体海马 CA1 区场电位引导新技术* ——刺激/记录/给药一体化装置的开发和应用

王晓晖 杨 威 原 丽 李少凤 杨 东 潘艳芳 祁金顺**

(山西医科大学生理系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001)

摘要 大鼠海马场电位记录是研究学习记忆的一个重要手段, 尤以在体记录更具生理学意义。为克服目前在体海马场电位记录的弊端和诸多不便, 提高实验效率, 设计并完善了一套简便易行, 融刺激、记录、给药于一体的大鼠海马在体 CA1 区场电位实验技术。将雄性 SD 大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪上, 利用自制的刺激/记录/给药联合装置, 引导海马 CA1 区场兴奋性突触后电位(fEPSP)。结果表明, 使用刺激/记录/给药联合装置能长时间稳定记录由测试刺激诱发的海马 CA1 区 fEPSP 。高频刺激条件下, 能成功诱导早期时相长时程增强(E-LTP)和晚期时相型长时程增强(L-LTP)。海马内注射 AMPA 受体阻断剂 CNQX($100\text{ }\mu\text{mol/L}$, $1\text{ }\mu\text{l}$)可迅速抑制 fEPSP , 注射 NMDA 受体拮抗剂 AP-5($100\text{ }\mu\text{mol/L}$, $1\text{ }\mu\text{l}$)可明显压抑 LTP, 药物发挥作用的时间较侧脑室给药明显缩短, 剂量减少。采用此联合装置还成功实现了 PPF 的稳定记录。总之, 采用刺激/记录/给药一体化技术进行在体海马 CA1 区场电位记录的特点是简单、可靠、高效, 可以为开展脑认知功能活动的电生理学研究奠定良好的基础。

关键词 场电位, 刺激/记录/给药一体化装置, 海马, 在体
学科分类号 R338.3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00575

用电生理手段记录大鼠海马 CA1 区场电位是经典的神经电生理研究方法。这种研究手段自从 Bliss 和 Collingridge 首次报道海马长时程增强(long-term potentiation, LTP)记录技术以来, 已经成为揭示学习记忆的生理学机制、探讨神经退行性疾病的发病机制以及开发新的神经保护作用药物的重要方法^[1-2]。大鼠海马 CA1 区场电位记录包括离体脑片和在体整体动物记录。离体脑片保留了部分海马的神经联系通路, 能够比较真实地反映生理状态下局部脑区的突触传递活动以及各种干预引起的突触传递变化。这些优点使得海马脑片场电位记录成为研究突触可塑性的重要手段之一。在体海马场电位记录与离体脑片实验相比, 最大优点是完整保留了海马内部以及海马与周围组织的所有神经联系, 因而能够更全面地反映海马的突触活动以及药物的真实效能。因此, 在体海马场电位以及在体 LTP 记录更加受到重视。然而, 在体大鼠海马场电位实验当前普遍采用的仍是传统的刺激、记录、给药分离式方法, 刺激电极和记录电极分别从不同角

度进入相应部位进行电刺激和场电位或 LTP 记录, 给药则多采用侧脑室途径。这些操作(刺激、记录、给药)的分别实施不仅需要的设施多, 占用的操作空间大, 而且由于刺激和记录部位十分接近, 使刺激和记录电极尖端的准确定位十分困难。特别是, 侧脑室导管给药不仅插管本身对脑组织伤害较大、给药后药物扩散到记录部位的潜伏期较长, 而且由于是全脑扩散, 脑室给药的剂量往往也较大、记录部位的药物浓度更不易掌握。近年来, 我们在记录离体和在体大鼠海马 CA1 区场电位的基础上, 设计并逐步完善了一套简便易行的实验技术, 能够在

* 国家自然科学基金资助项目(30840085), 山西省自然科学基金资助项目(2010011049-3), 山西省归国留学人员基金资助项目(2010-51), 山西医科大学细胞生理学省部共建教育部重点实验室主任基金(2010-07)和太原市科技项目(100115168)。

** 通讯联系人。

Tel: 0351-4135091, E-mail: jinshunqi@sohu.com

收稿日期: 2010-11-09, 接受日期: 2010-12-16

只有一套三维推进器的情况下, 顺利完成在体大鼠海马 CA1 区场电位刺激、记录以及给药。

1 材料与方法

1.1 动物与手术准备

实验选用 250~300 g 健康雄性 SD 大鼠, 由山西医科大学实验动物中心提供, 使用过程符合国家及山西医科大学的有关实验动物使用的规则和制度。在 25%乌拉坦(1.5 g/kg)腹腔麻醉下固定于三维脑立体定位仪(Narishige, Japan)上, 暴露颅骨, 以前囟点(Bregma)为基准, 在海马 CA1 区对应的颅骨部位钻孔, 侧脑室给药组另在颅骨相应部位加钻孔。记录期间用电热毯维持动物体温于 37~38℃。

1.2 刺激/记录/给药联合装置的设计、制备和安装定位

刺激/记录/给药联合装置由刺激电极和中空的记录电极绑定而成(图 1a)。刺激电极采用金属钨材料的同心圆电极(Sequim, WA, USA); 中空的记录电极兼作局部给药管, 用长度 100 mm、外径和内径分别为 0.75 mm、0.15 mm 的不锈钢材料经绝缘处理后自制而成。如图 1a 所示, 刺激电极和记录电极被平行固定于聚乙烯管的电极固定鞘内, 两电极尖端的中心距离为 1.0 mm, 尖端高度差为

0.8 mm, 以保证在脑立体定位仪的一个垂直推进器上可同步到达大鼠海马 CA1 区的刺激/记录部位。另外, 为了防止中空电极(即给药通道)在插入脑组织过程中被组织堵塞, 预先将一根不锈钢材料制备的与记录电极内径匹配的记录电极内芯(图 1b)插入到记录电极的中空腔内, 长度与记录电极相同。以上结构组成了刺激/记录/给药联合装置的主体, 为了顺利实施实验中给药, 装置还包括由中空的给药导管(外径同电极内芯, 材料为不锈钢)、与导管相连的聚乙烯软管和微量注射器构成的给药系统。实施给药时, 拔出防堵记录电极内芯, 将连接有微量注射器(或注射泵)的中空给药导管插入记录电极的管腔中即可。

在脑立体定位仪上, 利用同一三维微推进装置将上述电极联合装置同步插入到预定的海马 CA1 区刺激/记录部位。刺激和记录电极尖端的相对位置由大鼠解剖图谱^[3]决定。电极插入后, 刺激电极的尖端定位在海马 Schaffer 侧枝处, 坐标为 Bregma 后 4.2 mm、中线右侧旁开 3.8 mm, 记录电极尖端定位在 CA1 区放射层, 坐标为 Bregma 后 3.8 mm、中线右侧旁开 2.9 mm(图 1c)。参考电极单独插入, 定位在 Bregma 后 8.0 mm、中线旁开 1.0 mm。

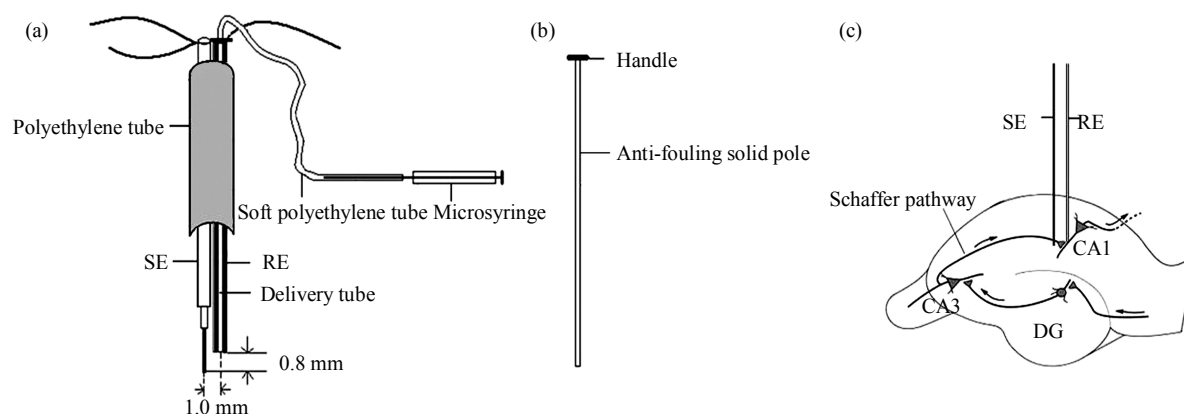


Fig. 1 Schematic diagram of stimulation/recording/drug delivery system and its position in the hippocampus

(a) Stimulation/recording/drug delivery system in the polyethylene tube. (b) An anti-fouling solid pole. (c) Position of the tips of stimulation/recording electrodes in hippocampus. The tip of bipolar SE is implanted at the Schaffer collateral/commissural pathway, the tip of the RE is positioned at the stratum radiatum in the CA1 region. SE: Stimulating electrode; RE: Recording electrode.

1.3 在体海马场电位记录和 LTP 的诱导

当刺激/记录/给药联合装置的尖端接近海马 CA1 区预定部位时, 由计算机控制的电子刺激器 (SEN-3301, Japan) 和光电刺激隔离器 (ss-102J, Japan) 每 30 s 给予组织一个测试刺激。减慢电极推

进速度, 直至刺激引导出最大场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)。fEPSP 由生物信号放大系统(成都仪器厂)采集、低通滤波 1 kHz, 放大后的信号由计算机储存并进行离线分析。测试刺激以引起最大 fEPSP 幅度 50%

的刺激强度作为记录基础 fEPSP 的刺激强度. 记录基础 fEPSP 的时间为 30~60 min, 以测试联合装置引导和记录基础性突触传递活动的稳定性. 在测试刺激诱发 fEPSP 的基础上, 利用不同刺激参数诱导早期时相的 LTP(early-phase LTP, E-LTP)和晚期时相的 LTP(late-phase LTP, L-LTP). E-LTP 通常由一组高频刺激(high frequency stimulation, HFS)诱导, 包含 3 串频率为 200 Hz 的 HFS, 每串 20 个刺激, 串间隔 30 s, HFS 后记录时间不少于 1 h; L-LTP 则由同样的 3 组 HFS 组成, 组间隔 5 min, 记录时间与 HFS 后不少于 3 h. HFS 后 fEPSP 幅度大于 150% 为成功诱导. 谷氨酸 AMPA 受体阻断剂 CNQX(Sigma-Aldrich, USA)和 NMDA 受体阻断剂 AP-5(Sigma-Aldrich, USA)经联合装置的给药系统实施. 另外, 给药前后采用双脉冲刺激诱发配对的 fEPSP, 以监测突触前机制参与的双脉冲易化(paired pulse facilitation, PPF)现象.

实验选取 fEPSP 幅度为记录指标, 以基础 fEPSP 幅度为 100%, HFS 以及给药前后 fEPSP 幅度以此进行标准化. PPF 反应以 fEPSP2 和 fEPSP1 幅度的比值作为指标进行分析.

1.4 数据处理

标准化的 fEPSP 幅度用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, PPF 以 $(\text{EPSP2}/\text{EPSP1}) \times 100\%$ 为指标, PPF 结果分析采用配对 t 检验的统计方法, 其余结果统计采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 刺激/记录/给药联合装置能可靠诱导在体海马 CA1 区 fEPSP

当刺激/记录/给药联合装置推进到海马 CA1 区预定位置时, 刺激、记录同步进行以诱导 fEPSP, 并通过观察诱发电位的相位和电位大小, 确定电极尖端在脑内的最佳深度. 结果发现: 将联合装置推进到预定位置并作适当的深度调整后, 每只动物的每次测试刺激都能够可靠地诱发出信噪比较高的 fEPSP(图 2), 诱发成功率高达 100%. 进一步观察可见, fEPSP 的波幅在一定范围内随刺激电流的增大而增大. 以电流为 50 μA 时诱发的 fEPSP 幅度值为 100% ($n=6$), 100 μA 诱发的 fEPSP 为 $(171.0 \pm 1.5)\%$ ($n=6$), 150 μA 诱发的 fEPSP 为 $(244.0 \pm 2.7)\%$ ($n=6$), 200 μA 诱发的 fEPSP 为 $(283.0 \pm 3.8)\%$ ($n=6$). 在此基础上, 我们选用可以

成功诱发 fEPSP 的刺激电流强度 50 μA 做为后续实验的参数.

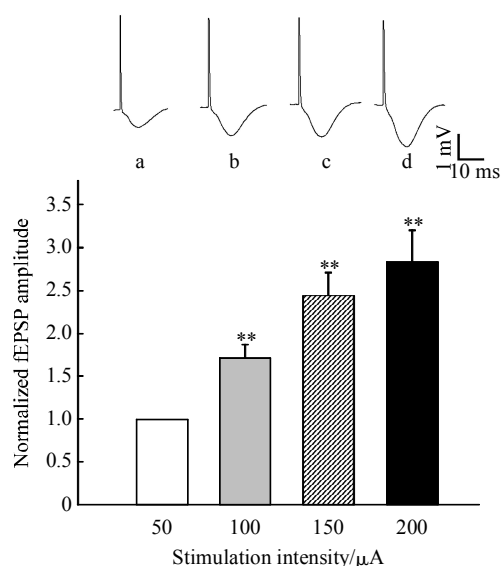


Fig. 2 The fEPSPs in the rat hippocampal CA1 area were reliably evoked by using the stimulation/recording/drug delivery system

The average amplitude of fEPSPs increased with the increase of the stimulation intensity. The four current curves (a, b, c, d) at the top of the figure are typical original fEPSP traces induced by four different stimulus intensities (50, 100, 150, 200 μA). ** $P < 0.01$ as compared with the values in 50 μA group.

2.2 刺激/记录/给药联合装置能长时间稳定记录基础水平的 fEPSP 和成功诱导早期及晚期时相的 LTP

为了确定刺激/记录/给药联合装置是否可以稳定记录基础水平的 fEPSP 以及实现 LTP 的诱导和维持, 我们进行了测试刺激和 HFS 条件下的一系列相关实验. 如图 3a、c 所示, 在连续 30 min 的基础性 fEPSP 记录中, fEPSP 幅度或斜率相当稳定, 基本呈现一水平直线. 在不给予 HFS 的对照组中, 稳定的 fEPSP 波幅可持续到记录结束的 1.5 h (图 3a)或 3.5 h 之后(图 3c). 随后, 采用 E-LTP 或 L-LTP 的实验参数给予 HFS 诱导 LTP 的产生. 结果显示, 在 E-LTP 实验中, 与 HFS 前 $(100.0 \pm 4.0)\%$ 相比, HFS 后 fEPSP 相对幅度增加至 $(187.0 \pm 4.5)\%$ ($n=6$), 连续记录 60 min 时仍高达 $(137.0 \pm 5.9)\%$ (图 3a, b), 明显高于没有给予 HFS 的对照组($n=6$, $P < 0.01$). 在应用多组 HFS 后, L-LTP 被成功诱导, HFS 后 fEPSP 相对幅度即刻增加到 $(211.0 \pm 7.5)\%$ ($n=6$), 180 min 后, fEPSP 幅度仍然维持在 $(115.0 \pm 5.0)\%$

(图 3c, d), 与对照组相比具有统计学差异($n = 6$, $P < 0.01$). 可见, 刺激 / 记录 / 给药联合装置能可

靠地用于基础水平的 fEPSP 记录以及高频刺激引起的 E-LTP 和 L-LTP 实验.

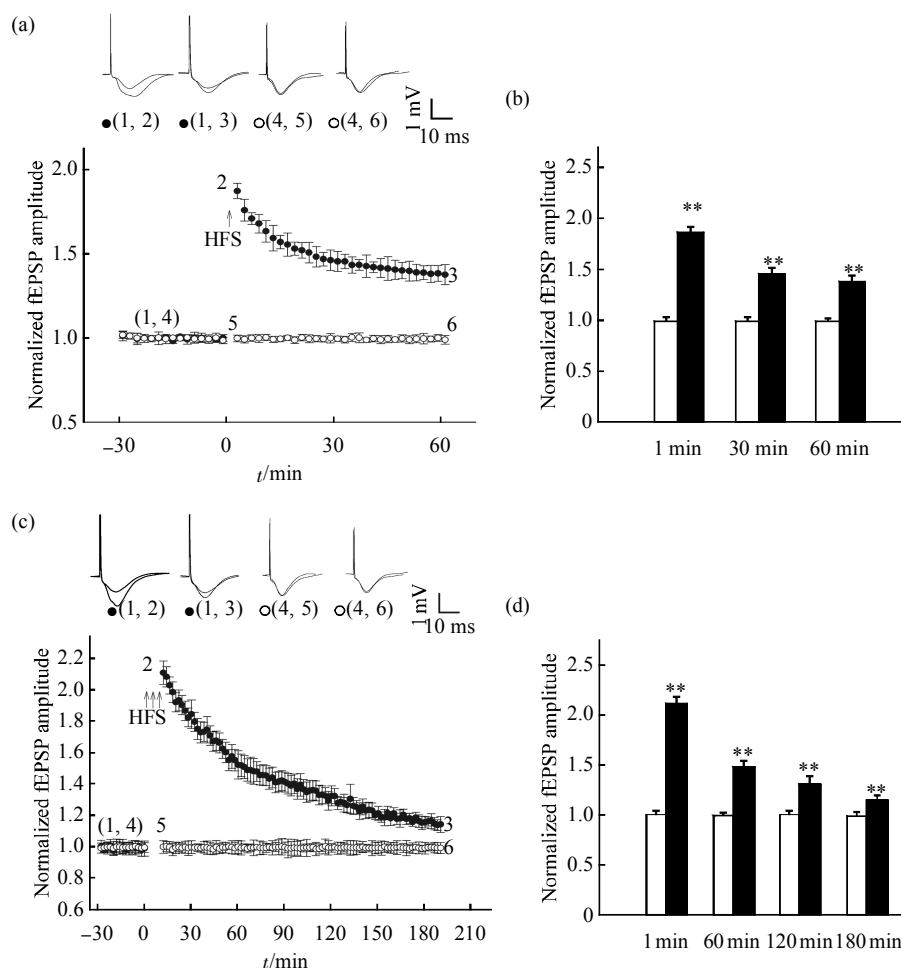


Fig. 3 Baseline synaptic transmission and synaptic plasticity was stably and effectively recorded using the stimulation/recording/drug delivery system

(a) 90 min of baseline synaptic transmission was stably recorded and E-LTP was successfully induced by a high frequency stimulation (HFS) protocol. ●—●: HFS; ○—○: Non-HFS. (b) Histogram showing the average fEPSP amplitudes at different time points in one set of HFS and non-HFS groups. □: Non-HFS; ■: HFS. (c) A more stable (210 min) baseline synaptic transmission and stronger L-LTP induction. ●—●: HFS; ○—○: Non-HFS. (d) Histogram showing the average fEPSP amplitudes at different time points in three sets of HFS and non-HFS groups. □: Non-HFS; ■: HFS. Insets, representative fEPSP traces recorded 15 min pre-HFS and 1 min, 1 h (or 3 h) after HFS.

2.3 经刺激/记录/给药联合装置实施给药对 fEPSP 和 LTP 的影响

据报道, fEPSP 的形成主要依赖于 AMPA 受体^[4], 而 LTP 的形成与 NMDA 受体激活有关^[5]. 据此, 为了观察经刺激 / 记录 / 给药联合装置实施脑内局部(即记录部位)给药的效果, 本实验通过记录 / 给药合一系统实施了海马内(intrahippocampal, IH)注射, 将 1 μ l 不同浓度的 AMPA 受体阻断剂 CNQX 和 NMDA 受体阻断剂 AP-5(100 μ mol/L, 1 μ l)直接微量注射于记录电极的尖端, 以观察 CNQX 对测试刺激诱发的 fEPSP 和 AP-5 对 HFS 诱发的

LTP 的影响. 同时, 与采用常规侧脑室注射(intracerebraventricular injection, ICV)AP-5(1 mmol/L, 5 μ l)对海马 LTP 的影响进行了对照.

如图 4 所示, 经中空记录电极海马内注射不同浓度的 CNQX 浓度依赖性压低了测试刺激诱发的 fEPSP, 注射 AP-5 则有效压低了 LTP. 在 CNQX 注射实验中($n=6$)(图 4a), 给药前基础 fEPSP 的平均幅度为(99.6 ± 3.3)%, 30 min 后给予低浓度(1 μ mol/L, 1 μ l)CNQX 海马内注射, 注射后 3 min fEPSP 平均幅度降低为(87.6 ± 4.4)%, 稳定 30 min 后给予中浓度(10 μ mol/L, 1 μ l) CNQX 海马内注射, 3 min 后

fEPSP 下降到 $(62.8 \pm 3.9)\%$ ，再稳定 30 min 后给予高浓度($100 \mu\text{mol/L}$, $1 \mu\text{l}$)CNQX, fEPSP 抑制程度更加明显, 降低到 $(49.6 \pm 3.7)\%$ 。具有明显的剂量依赖性抑制效应。在注射生理盐水组($n=6$), 注射前和对应 CNQX 注射时间的 3 次生理盐水注射后的 fEPSP 平均幅度分别为 100%, $(99.6 \pm 2.0)\%$, $(99.8 \pm 2.5)\%$ 和 $(100.3 \pm 2.2)\%$, 没有明显改变。可见, 采用联合装置给予 AMPA 受体阻断剂 CNQX, 可以较快地阻断 fEPSP, 而且随着 CNQX 浓度的

增大, 抑制效应相应增强。在 LTP 实验中(图 4b), 对照组局部注射生理盐水后($n=6$), HFS 诱发的 fEPSP 即刻可达到 $(175.0 \pm 4.9)\%$, 1 h 后仍可保持在 $(132.0 \pm 3.9)\%$, 通过中空记录电极海马 CA1 区局部注射 AP-5 后($n=6$), HFS 诱导的 LTP 受到明显压抑, HFS 后即刻 fEPSP 平均幅度只有 $(136.0 \pm 4.6)\%$, 1 h 后下降到 $(105.0 \pm 4.1)\%$, 接近了 HFS 前的基础水平。

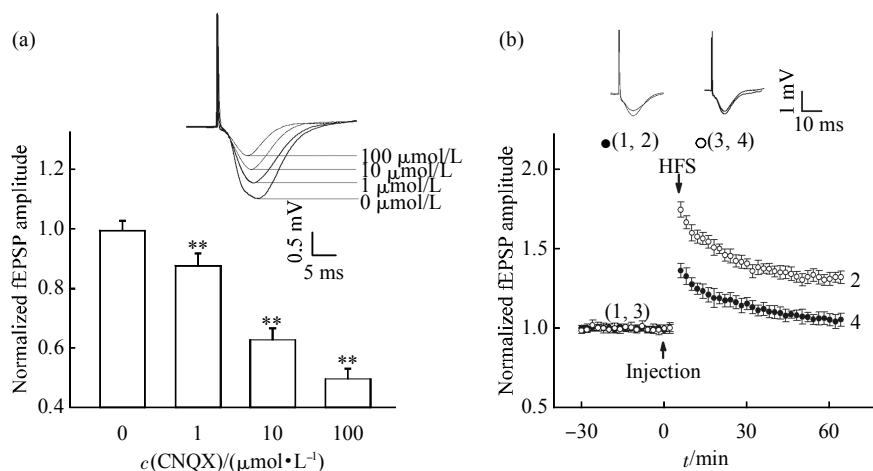


Fig. 4 The effects of CNQX and AP-5 administration via the stimulation/recording/drug delivery system on the hippocampal fEPSP and LTP

(a) Histograms showing the effects of IH injection of different concentrations of CNQX (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) on baseline fEPSP. The average amplitude of fEPSPs was gradually decreased with the increase of CNQX concentration. Insets, representative fEPSP traces recorded different concentrations of CNQX (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$). Calibration bars are 5 ms and 0.5 mV. $**P < 0.01$ as compared with the values in 0 $\mu\text{mol/L}$ CNQX group. (b) IH injection of AP-5 effectively inhibited hippocampal LTP. Insets, representative fEPSP traces recorded 15 min before IH injection of AP-5 and 60 min after HFS. Calibration bars are 10 ms and 1 mV. $\circ-\circ$: Control; $\bullet-\bullet$: AP-5.

接着, 我们又比较了经两种不同的给药途径 (IH 和 ICV) 注射 AP-5 对 LTP 的影响, 发现 IH 注射 AP-5 对 LTP 的压抑效应较 ICV 注射 AP-5 的抑

制效应要出现得更快, 可明显缩短药物发挥作用的潜伏期。如图 5 所示, 海马内给予 AP-5 ($n=6$) 后 3 min 随即进行 HFS 诱导 LTP, 结果发现, LTP

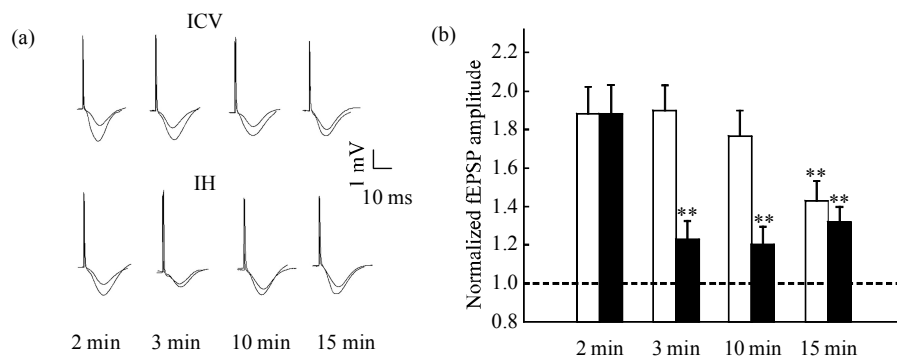


Fig. 5 Comparison of the inhibitory effects of AP-5 via IH and ICV

(a) Representative fEPSP traces of LTP which been induced at different time points after injection of AP-5. Calibration bars are 10 ms and 1 mV. (b) Histogram showing the different inhibitory latencies of AP-5 on LTP, 3 min and 15 min in IH group and ICV group, respectively. $**P < 0.01$ as compared with the values at 2 min. $\square$: ICV; $\blacksquare$: IH.

受到明显抑制, fEPSP 平均幅度由成功诱导时的 $(136.0 \pm 4.6)\%$ 下降到 $(105.0 \pm 4.1)\%$, 而经侧脑室给药 ($n=6$) 后 3 min 进行 HFS 诱导的 LTP, fEPSP 平均幅度没有明显改变, 直到给药后 15 min 再进行 HFS, 诱导的 LTP 才出现明显抑制, 平均幅度由成功诱导时的 $(148.0 \pm 4.6)\%$ 下降到 $(109.0 \pm 3.0)\%$.

2.4 刺激/记录/给药联合装置诱发 PPF 的实验观察

在突触可塑性研究中, PPF 可作为突触前神经递质释放改变的一个电生理指标. 为了了解刺激/记录/给药联合装置是否能有效记录 PPF, 我们使用间隔 50 ms、波宽 50 μ s 的双脉冲刺激进行了 PPF 实验. 配对脉冲每 30 s 一次, 持续观察 15 min.

然后, 再观察 AP-5 影响 LTP 的同时是否影响了 PPF, 给药前后各诱发 3 次 PPF. 图 6a 显示在连续 15 min 的 PPF 观察中 ($n=6$), fEPSP2/fEPSP1 保持了相当稳定的比值. 例如, 开始记录后 1 min 时 PPF 为 $(159.0 \pm 14.2)\%$, 至 15 min 时 PPF 仍为 $(159.0 \pm 13.9)\%$. 图 6b 显示, 海马内注射生理盐水(对照组, $n=6$)不影响 PPF, 海马内注射 AP-5 ($100 \mu\text{mol/L}$, $1 \mu\text{l}$, $n=6$) 后, PPF 仅由注射前的 $(160.0 \pm 13.0)\%$ 下降为 $(159.0 \pm 13.1)\%$, 与注射前相比没有任何显著性差异. 结合 AP-5 注射能够显著压抑高频刺激诱发的 LTP (图 4b) 的结果, 我们分析, AP-5 导致的 LTP 抑制可能不是通过改变突触前神经递质的释放引起的.

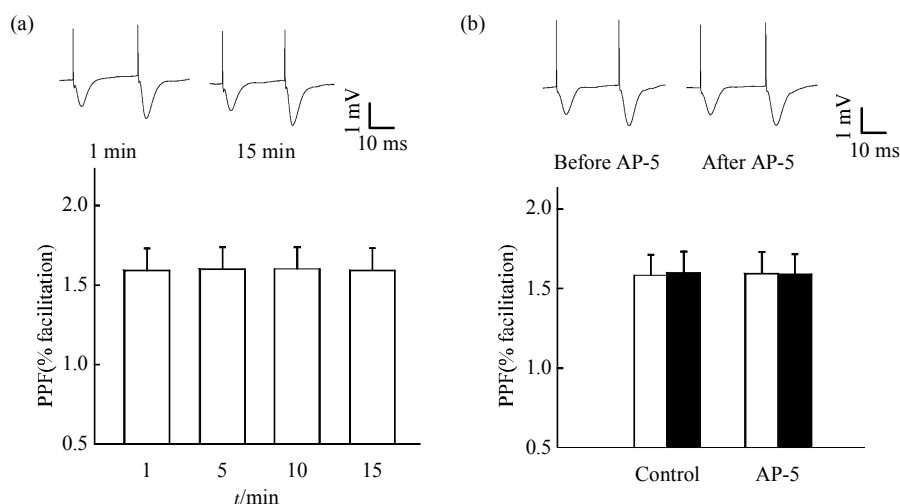


Fig. 6 The stable PPF recording with the stimulation/recording/drug delivery system and the effects of IH injection of AP-5 on PPF

(a) A continuous PPF recording in hippocampal CA1 area, with considerable stability during 15 min of recording. (b) IH injection of AP-5 did not affect PPF. Insets in (a) and (b), representative fEPSP traces recorded at different time points. Calibration bars are 10 ms and 1 mV. □: Before IH injection; ■: After IH injection.

3 讨 论

记录在体大鼠海马 CA1 区场电位是研究突触可塑性和脑高级功能的重要手段之一, 较离体脑片记录具有不可替代的生理学意义. 在记录海马 fEPSP 的基础上, PPF 和 LTP 是常用的两个电生理学指标. PPF 是由前后两个相距很近的刺激作用于突触传递通路时引起的突触传递效率短时间增强现象, 其形成机制与突触前神经末梢兴奋性递质释放的增加有关^[6]. LTP 则是一种由强直刺激作用于兴奋性突触传递通路诱发的突触传递效率长时间增强的现象, 其可能涉及到突触前或突触后机制. 鉴于

海马 LTP 与学习记忆行为的重要联系^[1], 采用电生理手段记录海马 LTP 已成为阐明学习记忆机制和神经退行性疾病发病机制的一个重要工具. 根据不同刺激参数引起 LTP 维持时间长短的不同, 可以将 LTP 分为 E-LTP 和 L-LTP. E-LTP 与膜上已有受体蛋白的磷酸化有关, L-LTP 则有新的蛋白质合成参与^[7]. 作为反映突触可塑性的重要指标, 在体 PPF 和 LTP 都被广泛用于电生理研究中, 特别是在体 LTP 的长期稳定记录更为人们所期望. 然而, 传统在体海马 CA1 区场电位的记录方法存在诸多不足和不方便之处, 导致在体海马 LTP 记录受到严重限制. 例如, 两套微推进装置(甚至采取不同

角度)在一个动物脑内进行的电极尖端定位准确性较差,致使 fEPSP 和 LTP 的诱导成功率低下.侧脑室给药不仅造成脑组织伤害、药物浓度和发挥作用的时间不易掌握,而且难以界定药物反应是对记录部位的直接作用还是通过影响其他脑区而间接引起.实验操作过程中,刺激和记录分别所需的推进装置和脑室导管等将占据有限的操作空间,使实验者难于下手.双推进装置和脑室给药(特别是贵重药品)又使实验成本大大增加.

本实验利用自制的刺激/记录/给药联合装置观察记录了在体海马 CA1 区的 PPF 和 LTP,并以记录/给药合一的方式进行了局部脑组织给药.使用该装置记录到的 fEPSP、PPF 的波形和参数以及 LTP 数值,类似于他人先前使用分离式电极记录到的结果^[6,8].本实验显示,使用刺激/记录/给药联合装置在海马 CA1 区能够长时间稳定记录由测试刺激诱发的海马 CA1 区 fEPSP(图 2,图 3)和 PPF(图 6).高频刺激能成功诱导 E-LTP(图 3a)和 L-LTP(图 3c).海马内注射 AMPA 受体阻断剂 CNQX 可迅速抑制 fEPSP(图 4a),注射 NMDA 受体拮抗剂 AP-5 可明显压抑 LTP(图 4b).与侧脑室注射相比,海马内注射明显缩短药物发挥作用的潜伏期(图 5).与常规在体或离体海马场电位记录方法比较,本实验技术改进在海马 CA1 区场电位实验中具有明显的特点和优势.首先,绑定刺激电极和记录电极后,电极尖端相对位置固定,不仅在一套微推进器的操作下即可完成双电极的同步推进,降低了研究成本,减少了操作占用空间和颅骨钻孔的数量,同时电极相对位置和刺激与记录部位组织相对位置的匹配大大提高了测试刺激诱发 fEPSP 的成功率,在保证动物状态和引导记录系统正常的条件下可达 100%.利用这种电极绑定技术,近年来我们已多次记录了在体大鼠海马 CA1 区的场电位,研究了精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)、胰高血糖素样肽 1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)、淀粉样 β 蛋白对海马 E-LTP 以及 L-LTP 的影响及其机制^[9-12].其次,记录电极和给药导管合一技术使得记录部位脑内局部注射给药成为可能.保证了药物可直接、快速微量注射于所记录的海马 CA1 区,这不仅减少了脑室插管带来的组织伤害,避免了脑室给药用量较大成本较高的弊端,也十分有利于观察药物对所记录部位电活动的直接反应,避免了药物全脑扩散可能出现的间接反应,使药物作用机制的解释局限化而更加清晰.

需要注意的是,本联合装置也存在一些缺陷和不足.首先,海马局部组织直接注射药物的容积不宜过大,每次 0.4~1 μ l 即可.如果给药容积过大、注射过快将导致海马局部体积增大,压力增加,影响脑组织功能以及所记录的场电位波形,为了防止这种不利影响,注射过程中务必保证速度均匀一致,在 3~5 min 内将药物缓慢注入,这与脑内注射的一般要求和有关文献报道也是一致的^[13-14].其次,更换防堵芯和注射内芯时需要谨慎操作,不能使记录电极位置发生位移.如果这些操作力度过大,会由于过度的机械振动影响电信号的稳定采集,因此,实施给药操作要尽可能轻柔,当然,这与实验者本身仔细、熟练的操作分不开.另外,在绑定电极推进入脑组织的过程中,如果直接将中空记录电极插入,会在电极推进过程中出现脑组织或血液将电极中央的管腔阻塞的现象,势必会影响场电位的记录,解决的办法是,实芯的记录电极内芯必须在电极插入脑组织前预先插入到记录电极中空的管腔内,并保持与中空记录电极长度相等、尖端平齐,还要保证内芯外径和管腔内径匹配(既能防止堵塞,又无较大阻尼).

总之,利用刺激/记录/给药联合装置能够简便、准确、节俭、高效地引导在体大鼠海马 CA1 区场电位,完成 PPF、E-LTP 和 L-LTP 等突触可塑性实验,该装置的设计与应用为开展神经科学脑高级功能的电生理学研究提供一项方便的新型实用技术.

参 考 文 献

- [1] Bliss T V, Collingridge G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, **361** (6407): 31-39
- [2] Bliss T V, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 1973, **232**(2): 331-356
- [3] George P, Charles W. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Australia: Academic Press Australia, 1982: 55-57
- [4] Li Q, Burrell B D. CNQX and AMPA inhibit electrical synaptic transmission: a potential interaction between electrical and glutamatergic synapses. *Brain Res*, 2008, **1228**: 43-57
- [5] Morris R G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation *in vivo* by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci*, 1989, **9**(9): 3040-3057
- [6] Schulz P E, Cook E P, Johnston D. Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J Neurosci*, 1994, **14**(9): 5325-5337

- [7] Pita-Almenar J D, Collado M S, Colbert C M, *et al.* Different mechanisms exist for the plasticity of glutamate reuptake during early long-term potentiation (LTP) and late LTP. *J Neurosci*, 2006, **26**(41): 10461–10471
- [8] Lauren J, Gimbel D A, Nygaard H B, *et al.* Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 2009, **457**(7233): 1128–1132
- [9] Zhang J F, Qi J S, Qiao J T. Protein kinase C mediates amyloid beta-protein fragment 31-35-induced suppression of hippocampal late-phase long-term potentiation *in vivo*. *Neurobiol Learn Mem*, 2009, **91**(3): 226–234
- [10] Jing W, Guo F, Cheng L, *et al.* Arginine vasopressin prevents amyloid beta protein-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampus *in vivo*. *Neurosci Lett*, 2009, **450**(3): 306–310
- [11] Guo F, Wu M N, Jing W, *et al.* Recordings of long term potentiation in rat hippocampal CA1 area with an electrodes binding technique *in vivo*. *Chin J Appl Phys*, 2007, **23**(3): 381– 384
- [12] Wang X H, Li L, Holscher C, *et al.* Val8-glucagon-like peptide-1 protects against Abeta1-40-induced impairment of hippocampal late-phase long-term potentiation and spatial learning in rats. *Neuroscience*, 2010, **170**(4): 1239–1248
- [13] Liang K C, Hon W, Tyan Y M, *et al.* Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze. *Chin J Physiol*, 1994, **37**(4): 201–212
- [14] Leung L S, Shen B. Glutamatergic synaptic transmission participates in generating the hippocampal EEG. *Hippocampus*, 2004, **14**(4): 510–525

A Novel Electrophysiological Technique for Rat Hippocampal CA1 Area Field Potential Recording *in vivo*: Development and Application of Stimulation/Recording/Drug Delivery System*

WANG Xiao-Hui, YANG Wei, YUAN Li, LI Shao-Feng, YANG Dong, PAN Yan-Fang, QI Jin-Shun**

(Department of Physiology, Key Laboratory for Cellular Physiology of Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract It is an important means to record rat hippocampal field potential, especially *in vivo* recording, in the study of learning and memory. To overcome the disadvantages and inconvenience in current hippocampal field potential recording and raise *in vivo* experimental efficiency, stimulation/recording/drug delivery system for *in vivo* hippocampal field potential recording was developed and applied. Anesthetized SD rats were fixed in a stereotaxic device and a homemade stimulation/recording/drug delivery system was used to record field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) in hippocampal CA1 area. The results showed that fEPSPs were easily evoked by nearly every test stimulus and maintained steadily for a long time by using the stimulation/recording/drug delivery system; high frequency stimulation (HFS) successfully induced early-phase LTP (E-LTP) and late-phase LTP (L-LTP); the baseline fEPSPs and LTP were promptly and effectively suppressed by intrahippocampal injection (IH) of AMPA receptor antagonist CNQX (100 μ mol/L, 1 μ l) and NMDA receptor antagonist AP-5 (100 μ mol/L, 1 μ l), respectively, with a shorter latency and a reduced dose compared with intracerebraventricular injection (ICV); the induction and recording of paired pulse facilitation (PPF) were also considerably easy and stable using the combination device. In short, the simplicity, reliability and high efficiency of stimulation/recording/drug delivery combination system in recording *in vivo* rat hippocampal CA1 area field potential make it more practical in the research of synaptic plasticity, and this technique established an important foundation for the study of higher cognitive brain function.

Key words field potential, stimulation/recording/drug delivery system, hippocampus, *in vivo*

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00575

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30840085), The Natural Science Foundation of Shanxi Province of China (2010011049-3), Shanxi Provincial Foundation for Returned Scholars (Main Program), China (2010-51), The Dean's Fund of the Co-constructing Key Laboratory of Cellular Physiology of Ministry of Education, Shanxi Medical University (2010-07), Science and Technology Fund of Taiyuan City (100115168).

**Corresponding author. Tel: 86-351-4135091, E-mail: jinshunqi@sohu.com

Received: November 9, 2010 Accepted: December 16, 2010