

文章编号 1006-8147(2018)04-0277-04

论 著

## 焦虑环境增加大鼠内侧前额叶皮层 LFPs 功能连接

陆军,董浩然,郑旭媛

(天津医科大学生物医学工程学院,天津 300070)

**摘要** 目的:研究焦虑环境对大鼠内侧前额叶皮层局部场电位(LFPs)功能连接的影响。方法:应用清醒动物在体植入微电极阵列记录技术,分别记录8只成年SD大鼠在熟悉环境和高架十字迷宫10 min内前额叶皮层16通道LFPs,利用短时傅里叶变换(STFT)计算LFPs时频能量密度,应用定向传递函数(DTF)计算功能连接强度。结果:LFPs时频能量集中在theta(4~12 Hz)频段,在熟悉环境和焦虑环境时theta频段能量密度分别为 $10.653\pm 0.173$ 和 $12.581\pm 0.345$  ( $P<0.05$ );theta频段LFPs的DTF值分别为 $0.022\pm 0.001$ 和 $0.031\pm 0.002$  ( $P<0.05$ )。在焦虑环境时的theta频段能量密度和功能连接强度较熟悉环境时显著增加。结论:焦虑环境会增加大鼠内侧前额叶皮层LFPs的功能连接。

**关键词** 高架十字迷宫;内侧前额叶皮层;局部场电位;功能连接;焦虑;大鼠

中图分类号 R3

文献标志码 A

### Anxiogenic environment enhances rat's LFPs functional connection in the mPFC

LU Jun, DONG Hao-ran, ZHENG Xu-yuan

(School of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To explore the effect of anxiogenic environment on local field potentials (LFPs) functional connection in the medial prefrontal cortex (mPFC) in rats. **Methods:** By using extracellular multi-electrode array in vivo animal, 16-channel LFPs were recorded from mPFC when eight rats were exposed to familiar environment and an elevated plus maze (EPM) for 10 minutes, and then the frequency power spectrum was calculated by short time fourier transform (STFT) and functional connectivity by directed transform function (DTF) among LFPs. **Results:** The LFPs time frequency power spectrum were concentrated in theta band (4–12 Hz). The powers of theta band were  $10.653\pm 0.173$  and  $12.581\pm 0.345$  ( $P<0.05$ ) in the familiar environment and EPM, respectively. Theta band LFPs functional connectivity was  $0.022\pm 0.001$  and  $0.031\pm 0.002$  ( $P<0.05$ ) in the familiar environment and EPM, respectively. Theta band energy density and functional connectivity were significantly increased in anxiogenic environment. **Conclusion:** LFPs functional connectivity in rats could be enhanced in the mPFC during exposure to anxiogenic environment.

**Key words** elevated plus maze; medial prefrontal cortex; local field potentials; functional connectivity; anxiety; rats

焦虑症是一种以持续性紧张、担心、恐惧或发作性惊恐为特征的情绪障碍,伴有植物神经系统症状和运动不安等行为特征<sup>[1]</sup>。高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)是国际上公认的测量啮齿动物焦虑反应的方法<sup>[2]</sup>。焦虑状态与内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)活动相关<sup>[3-4]</sup>,但其产生机制尚未清楚。在本次研究中,利用16通道微电极阵列记录成年SD大鼠在熟悉环境(Familiar)和高架十字迷宫的内侧前额叶皮层局部场电位(local field potentials, LFPs),对LFPs进行时频分析和脑网络分析,评估焦虑环境对大鼠内侧前额叶皮层LFPs功能连接的影响。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(61471266)

作者简介 陆军(1992-),男,硕士在读,研究方向:神经工程;通信作者:郑旭媛,E-mail:zhengxuyuan@tmu.edu.cn。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级成年雄性SD大鼠8只,10~12周龄,体质量250~300 g,由中国军事医学科学院实验动物中心提供。饲养地点为天津医科大学动物实验中心。动物室内每天12 h光照,12 h黑暗。对大鼠进行分笼饲养(每笼3~4只)。饲养期间保持安静舒适的环境(室温 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\%\pm 10\%$ )。

1.1.2 高架十字迷宫 有两个开放臂(长×宽为50 cm×10 cm)、两个相对的封闭臂(长×宽×高为50 cm×10 cm×40 cm)、一个连接4个臂的中央平台(10 cm×10 cm),开放臂、封闭臂和平台区底部均为灰色,且前两者互相垂直成十字状;每个臂附在50 cm高的塑料底架上。

## 1.2 实验方法

1.2.1 植入多通道微电极阵列 应用 40 mg/kg 的剂量腹腔注射戊巴比妥钠(Sigma, America)麻醉后, 头部固定在立体定位仪上 (Lab Standard™, America), 头顶部去毛并常规消毒皮肤, 沿颅顶中线剪开皮肤, 暴露头骨及前囟, 依据 George Paxinos & Charles Watson 大鼠脑立体定位图谱, 于前囟(AP)前 2.5~4.5 mm, 中线右侧(MR)旁开 0.2~1.0 mm, 用牙科钻在颅骨上开一个矩形的窗口, 露出硬脑膜并将其挑破。再钻 3~4 个孔用以安置不锈钢螺钉作为固定。16 通道微电极阵列(Plexon, America)垂直植入脑组织表面向下 2.5~3.0 mm<sup>[5]</sup>, 利用牙科水泥固定用不锈钢螺钉和电极阵列, 形成一个整体, 以保证固定强度。手术后大鼠应当单笼饲养, 并经常抚摸和抓握大鼠, 使其熟悉实验者, 待动物恢复 5~7 d 后, 进行信号记录。

1.2.2 LFPs 记录 记录熟悉环境 LFPs 时, 将大鼠放入一个 60 cm×60 cm×35 cm 的鼠笼中, 任其自由探究 10 min 并记录 LFPs; 记录焦虑环境 LFPs 时, 将大鼠头朝开放臂置于 EPM 的中央区, 释放后任其自由探究 10 min 并记录 LFPs。微电极阵列所记录到的 LFPs, 经微型 Headstage(Plexon, America)由信号传输导线传送到前置放大器处理, 进行 5 000 倍放大, 然后经过 A/D 转换变成数字信号, 通过光纤快速传输进入 OmniPlex 神经信号处理系统(Plexon, America)处理后, 作为原始数据存储在计算机中。应用的 LFPs 信号采样率为 2 kHz。

## 1.3 LFPs 处理

1.3.1 多通道 LFPs 的时频分析 原始记录数据经过截止频率为 500 Hz 低通滤波, 利用加权最小二乘的局部线性回归与拟合方法消除 16 通道 LFPs 信号中夹杂的基线漂移与工频干扰, 剔除原始数据差分记录中的参考通道和漂移过大的通道, 获取零均值 16 通道 LFPs。高架十字迷宫中大鼠自由探究 10 s 的 LFPs 作为研究对象, 8 只大鼠共 140 段 LFPs (rat1=15 trials, rat2=18 trials, rat3=19 trials, rat4=18 trials, rat5=18 trials, rat6=20 trials, rat7=15 trials, rat8=17 trials)。应用短时傅里叶变换(short-time fourier transform, STFT) 计算大鼠在熟悉环境和高架十字迷宫中前额叶皮层 LFPs 的能量密度分布。STFT 的基本思想是假定信号在一个短时间间隔内是平稳的, 滑动窗函数  $g(t)$ , 计算出各个不同时刻的功率谱。信号  $x(t)$  的 STFT 定义为:

$$\text{STFT}(f, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} [x(t)g(t-\tau)]e^{-j2\pi ft} dt \quad (1.1)$$

式中  $g(t)$  是窗函数,  $f$  为频率。

选取汉明窗, 窗口长度为 1 000 ms, 窗口移动步长为 250 ms, 经过 STFT 变换, 可以获得每个通道 LFPs 信号的时频能量分布, 再计算 16 通道 LFPs 的平均时频能量分布, 便可获得大鼠在高架十字迷宫焦虑状态过程中 LFPs 能量密度的时间-频率分布特征模式。根据时频分布特性, 选取能量密度大的频段作为与焦虑状态相关的特征频段, 并应用带通滤波方法提取特征频段分量。

1.3.2 LFPs 功能连接 基于多变量自回归模型(MVAR)的定向传递函数分析方法计算 LFPs 因果连接矩阵, 以多通道 LFPs 的每一个通道作为一个节点构建 LFP 因果网络<sup>[6-7]</sup>, 计算 LFP 因果网络的平均连接强度。

设 16 通道 LFPs 为  $X(t)=[X_1(t), X_2(t), \dots, X_N(t)]^T$ , 建立 MVAR 模型如下:

$$X(t) = \sum_{n=1}^p A(n)X(t-n) + E(t) \quad (1.2)$$

式中,  $A(n)$  为 16\*16 的系数矩阵,  $E(t)$  为白噪声,  $p$  为 MVAR 模型的阶数, 采用贝叶斯信息准则(bayesian information criterion, BIC)确定模型阶数。

MVAR 模型经傅里叶变换转换到频域:

$$X(f) = A^{-1}(f)E(f) = H(f)E(f) \quad (1.3)$$

式中,  $f$  表示频率。

$$A(f) = -\sum_{n=0}^p A(n)e^{-i2\pi fn\Delta t} \quad (1.4)$$

$$A(0) = -I$$

$H=A^{-1}$ , 是频域系数矩阵  $A$  的逆矩阵, 也称为系统的传递矩阵。

定向传递函数(directed transfer function, DTF) 定量描述 LFPs 之间的连接强度。基于传递矩阵  $H$ , 从通道  $j$  到通道  $i$  的因果连接值定义如下:

$$\gamma_{ij}(f) = \frac{|H(f)|^2}{\sum_{n=1}^p |H_{im}(f)|^2} \quad (1.5)$$

式中,  $\gamma_{ij}$  表示归一化后, 通道  $j$  对通道  $i$  的影响在所有通道对通道  $i$  的影响中所占的比例,  $\gamma_{ij}$  越大说明通道  $j$  对通道  $i$  的因果连接越强, 反之则越弱。 $k$  为通道数。

将 LFPs 的第  $i$  个电极记录通道定义为网络的节点  $i$ , 将每个通道 LFP 间的  $DTF_{ij}$  的倒数定义为网络节点  $j$  到  $i$  之间的边长, 构建 LFP 因果网络。计算 LFP 网络的 DTF 连接矩阵的平均 DTF:

$$DTF = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j \in G} DTF_{ij} \quad (1.6)$$

1.4 统计学方法 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用独立样本  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LFPs 时频分析结果 计算 8 只大鼠在 Familiar 和 EPM 中前额叶皮层 LFPs 的平均能量密度分布。由时频分析结果可观察到 LFPs 能量集中在 theta 频段(4~12 Hz),并且在 EPM 中 theta 频段的能量高于 Familiar, 能量分别为  $12.581 \pm 0.345$  和  $10.653 \pm 0.173$  ( $P < 0.05$ ) (图 1A、1B)。

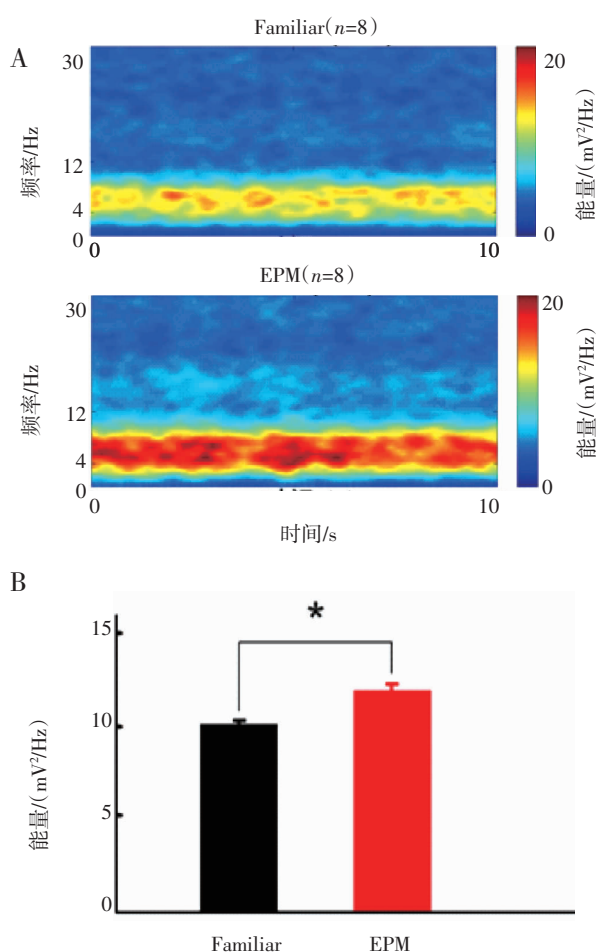


图1 在 Familiar 和 EPM 的 LFPs 时频分析结果

Fig 1 The LFPs time frequency power spectrum in Familiar and EPM

2.2 LFPs 功能连接结果 根据特征频段提取 theta 分量,计算大鼠在 Familiar 和 EPM 中 theta 分量的定向传递函数 DTF,得到可以直接描述功能连接的矩阵,计算矩阵中元素的平均值,得到 DTF 值,结果如图 2 所示。在 EPM 中 theta 频段的功能连接高于 Familiar,DTF 值分别为  $0.031 \pm 0.002$  和  $0.022 \pm 0.001$  ( $P < 0.05$ ) (图 2A、2B)。

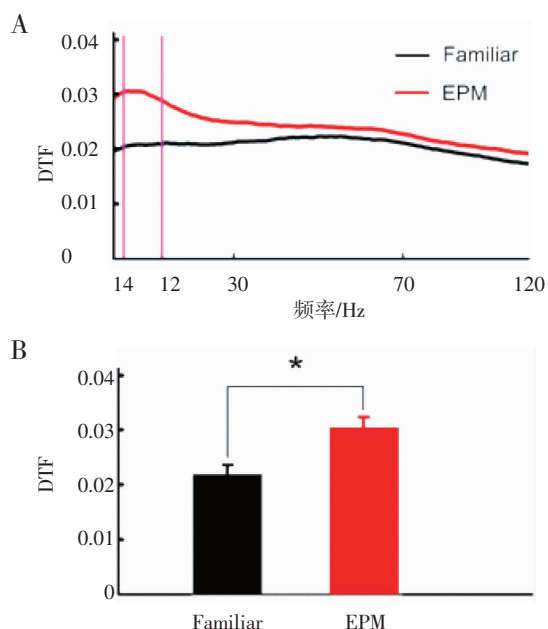


图2 在 Familiar 和 EPM 的 LFPs 的功能连接结果

Fig 2 The LFPs functional connectivity in Familiar and EPM

## 3 讨论

高架十字迷宫实验既是建立焦虑应激的模型也是测量焦虑反应的经典方法<sup>[8]</sup>。其原理是利用动物对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧心理,形成动物的矛盾冲突来考察大鼠的焦虑状态<sup>[9]</sup>。目前多通道同步记录技术可以长时间同步记录实验动物在清醒状态下自由活动的神经信号,成为焦虑相关脑区的研究中非常有效的工具。

内侧前额叶皮层是参与焦虑活动的重要脑区之一<sup>[10]</sup>。焦虑活动期间 mPFC 的 theta 频段的增加促进接收来自其他脑区输入的感觉、运动信息,比如 mPFC 与腹侧海马、内嗅皮层、杏仁核等脑区内 theta 活动同步性增加促进对外来反感信息的响应,抑制对焦虑环境的探索行为<sup>[11]</sup>。Adhikari 等<sup>[12]</sup>利用高架十字迷宫测试大鼠的焦虑活动时 mPFC 局部场电位,分析 mPFC 的焦虑相关的放电模式,结果发现焦虑状态时 mPFC 的 theta 频段能量在迷宫的反感区域增加,在安全区域减少,并认为大鼠 mPFC 的 theta 振荡影响大鼠在焦虑环境下的探索行为。

大脑功能网络是对任务执行期间大脑结构网络上不同的神经元、神经元集群或脑区之间动态活动交互整合的直观描述。在脑网络层次上,基于磁共振成像、脑电图、脑皮层电图和脑磁图的研究能够深入理解大脑疾病的神经机制,比如焦虑症、抑郁症和癫痫等<sup>[13-14]</sup>。Paceschott 等<sup>[15]</sup>利用功能磁共振(fMRI)研究具有原发性失眠的焦虑症患者的脑功能网络时,发现与失眠症患者相比,原发性失眠的

焦虑症患者左侧杏仁核和双侧前喙扣带皮质大脑功能连接减弱,失眠症患者杏仁核对下行控制的减少会增加罹患焦虑症的风险。功能网络连接的参数在大脑疾病的临床诊断中有很好的潜在应用价值。

本次研究中,对获取的大鼠 mPFC LFPs 时频分析发现在 EPM 时 theta 频段的能量高于 Familiar,证实了 theta 频段的能量增加与焦虑状态相关。进一步对 theta 分量网络进行功能连接分析,发现在 EPM 时 theta 频段的功能连接强于 Familiar,提示 theta 分量网络连接强度的改变可能影响 theta 能量,从而对焦虑样行为作出调控。已有研究表明,焦虑症不仅与前额叶有关,还涉及海马和杏仁核等脑区<sup>[16-17]</sup>,而且除了 theta 振荡,其他的大脑节律也可能参与焦虑活动,比如在 EPM 时 theta-gamma 耦合减少<sup>[18]</sup>。下一步可以对这些脑区之间的神经振荡的交互作用进行研究。利用电生理技术记录神经信号和脑网络分析方法可以更加深入地了解与焦虑相关脑区问题,为研究焦虑症神经机制提供支持。

#### 参考文献:

- [1] Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2015,17(3):327
- [2] Goes T C, Antunes F D, Teixeira Silva F. Environmental enrichment for adult rats: effects on trait and state anxiety[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584:93
- [3] Adhikari A. Distributed circuits underlying anxiety[J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8(8):112
- [4] Leuner B, Shors T J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections[J]. *Neuroscience*, 2013, 251(15):108
- [5] Jacinto L R, Cerqueira J J, Nuno S. Patterns of Theta Activity in Limbic Anxiety Circuit Preceding Exploratory Behavior in Approach-Avoidance Conflict[J]. *Front Behav Neurosci*, 2016, 10:171
- [6] Park H J, Friston K. Structural and functional brain networks: from connections to cognition[J]. *Science*, 2013, 342(6158):1238411
- [7] Rubinov M, Sporns O. Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations[J]. *Neuroimage*, 2010, 52(3):1059
- [8] Saiyudthong S, Pongmayteegul S, Marsden C A, et al. Anxiety-like behaviour and c-fos expression in rats that inhaled vetiver essential oil[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(22):2141
- [9] Costa N S, Vicente M A, Cipriano A C, et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 108:82
- [10] Zarrindast M R, Khakpai F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior[J]. *Arch Iran Med*, 2015, 18(9):591
- [11] Chocyk A, Majcher-Maślanka I, Dudys D, et al. Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions—a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders[J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(6):1462
- [12] Adhikari A, Topiwala M A, Gordon J A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety[J]. *Neuron*, 2010, 65(2):257
- [13] Pagliaccio D, Luby J L, Bogdan R, et al. Amygdala functional connectivity, HPA axis genetic variation, and life stress in children and relations to anxiety and emotion regulation[J]. *J Abnorm Psychol*, 2015, 124(4):817
- [14] Hakamata Y, Komi S, Moriguchi Y, et al. Amygdala-centred functional connectivity affects daily cortisol concentrations: a putative link with anxiety[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):8313
- [15] Paceschott E F, Zimmerman J P, Bottary R M, et al. Resting state functional connectivity in primary insomnia, generalized anxiety disorder and controls[J]. *Psychiatry Res*, 2017, 265:26
- [16] Tovote P, Fadok J P, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(6):317
- [17] Adhikari A, Lerner T N, Finkelstein J, et al. Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear[J]. *Nature*, 2015, 527(7577):179
- [18] Stujenske J M, Likhtik E, Topiwala M A, et al. Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala[J]. *Neuron*, 2014, 83(4):919

(2018-01-07 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅