

实验技术

海马脑片癫痫样放电时空特性的多电极记录研究

刘建盛¹, 宫新伟², 龚海庆², 张溥明², 梁培基², 陆钦池^{1,*}

上海交通大学¹医学院附属仁济医院神经内科, 上海 200127; ²生命科学技术学院生物医学工程系, 上海 200240

摘要: 为了探索离体条件下癫痫样放电的时空特性, 本研究采用多电极记录系统记录高钾人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)诱导的幼年大鼠海马脑片的自发放电活动。在成功诱导出癫痫样的簇样放电后, 加入苯巴比妥钠以观察其对脑片各区域放电的压抑作用。结果显示: (1)高钾 ACSF 持续灌流脑片 15 min 左右, 多电极阵列上可记录到海马 CA3(a~c)和 CA1 区反复出现同步节律的癫痫样簇样放电, 与脑电信号中的发作间期痫性放电相似; 定量分析结果提示, CA 区各个亚区锥体细胞的活动特性无明显差异($P>0.05$), 而齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒细胞层没有出现簇样放电, 仅有少量动作电位发放, 发放频率远低于 CA 区($P<0.05$); (2)在持续高钾灌流下, 稳定的簇样放电一旦建立即可至少持续 40 min; (3)簇样放电发放稳定后给予 60 $\mu\text{mol/L}$ 苯巴比妥钠, 发现同步化放电的区域逐渐缩小, CA1 和 CA3c 区的放电活动首先被压抑, 而 CA3a 和 b 区的部分锥体细胞在加药 10 min 后仍有较强的簇样放电。以上结果提示, 多电极阵列能够有效地用于研究离体条件下癫痫样放电的时空特性, 并可探索抗癫痫药对脑片不同区域癫痫样活动的作用。

关键词: 癫痫; 多电极阵列; 海马; 簇样放电

中图分类号: R742.1

Exploring spatiotemporal patterns of epileptiform discharge in hippocampal slice using multi-electrode arrays

LIU Jian-Sheng¹, GONG Xin-Wei², GONG Hai-Qing², ZHANG Pu-Ming², LIANG Pei-Ji², LU Qin-Chi^{1,*}

¹Department of Neurology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; ²Department of Biomedical Engineering, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: To investigate the spatiotemporal properties of epileptiform activity *in vitro*, 400 μm -thick transverse hippocampal slices were prepared from juvenile rat and planar multi-electrode array (MEA) containing 60 electrodes was used to record the electrical activity induced by bath application of high potassium artificial cerebrospinal fluid (ACSF) on slices. Following successful induction of epileptiform bursts, phenobarbital sodium was applied to test for its inhibitory effects on bursting activity in different regions of slice. Region-specific characteristics of epileptiform activity and anticonvulsant actions of phenobarbital sodium in the hippocampal network were determined by comparing the population activity obtained from MEA. The results showed that: (1) 15 min after high- K^+ ACSF application, rhythmic and synchronous epileptiform bursts could be detected from all CA sub-regions. Quantitative analysis indicates that the firing patterns of different CA sub-regions were not statistically different ($P>0.05$). However, no bursting activity was recorded from granular cells in dentate gyrus, only sparse spikes were observed, with frequency significantly lower than that in CA regions ($P<0.05$). (2) The high- K^+ -induced bursting activity could last for more than 40 min with stable bursting activities. (3) Bath application of 60 $\mu\text{mol/L}$ phenobarbital sodium inhibited the bursting activities on hippocampal slice. Bursting activities in CA3c and CA1 were firstly suppressed. 10 min after the phenobarbital sodium application, strong bursting activities persisted only in some of pyramidal cells in CA3a and CA3b. These results show that MEA could be applied for studying the spatial and temporal properties of epileptiform activity *in vitro*, as well as the region-specific effects of anti-epileptic drugs.

Key words: epilepsy; multi-electrode array; hippocampus; burst

Received 2009-12-30 Accepted 2010-02-25

This work was supported by the Shanghai Jiao Tong University Fund for Interdisciplinary Research for Medical Applications (No. G08PETZD05, YG2007MS07).

*Corresponding author. Tel: +86-21-58752345; Fax: +86-21-58709953; E-mail: qinchilu2005@yahoo.com.cn

癫痫是以反复痫性发作为特征的慢性脑功能障碍综合征。痫性发作是由于大脑神经元的过度同步化放电所致,在脑电图(electroencephalogram, EEG)上比较常见地表现为背景节律下出现的高幅负相棘波后紧跟一个慢波^[1]。在离体条件下对痫性放电的细胞机制已经进行了大量的研究,但关于癫痫发生的网络机制目前还不是很清楚^[1]。有研究尝试运用传统的钨丝电极或光学成像技术研究海马切片上不同区域的放电特征^[2,3],但由于存在操作复杂及信号不稳定等原因未能推广应用。多电极阵列(multi-electrode array, MEA)记录技术能够同时记录组织切片上多个部位的电活动^[4]。该技术应用于海马切片记录已有20多年历史^[5],但少有应用于癫痫研究的报道。Wheeler等^[5,6]曾在32道的多电极上记录到急性海马切片上CA1区的癫痫样放电,但并没有对该放电模式做具体的定量分析。近年来随着MEA技术的不断进步,使得在更大的区域范围内研究癫痫样放电的时空特性成为可能,比如目前应用60道MEA已经可以在海马脑片上同时记录到CA3、CA1和齿状回(dentate gyrus, DG)区的生物电活动,为研究癫痫发生的网络机制提供了一种新的技术手段^[7]。为了探索离体条件下应用MEA技术研究癫痫的可行性及优势,我们使用MEA记录高钾人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)灌流下海马神经元的自发放电活动,并对其进行定量分析。高钾脑片模型是常用的一种离体癫痫模型,在体外可以较为可靠地模拟癫痫样放电^[2,8]。本研究通过对从MEA上记录到的海马脑片各区域的电活动进行分析,以揭示海马脑片癫痫样放电的定量特征及时空特性,并初步探

索了应用MEA技术进行药理实验的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 选取2~3周清洁级雄性健康Sprague-Dawley大鼠,由中国科学院斯莱克实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪):2007-0005,使用许可证号:SYXK(沪):2003-0026。动物管理严格按照中国卫生部实验动物管理条例执行。苯巴比妥钠购自上海新亚药业有限公司,其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 海马切片的制备 大鼠断头处死,快速取全脑放入用95% O₂+5% CO₂混合气饱和的温度为0~4 °C的ACSF, ACSF的组成 (mmol/L): NaCl 124, KCl 3.5, NaH₂PO₄·2H₂O 1.2, MgCl₂·6H₂O 1.3, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 25, D-Glucose 10 (pH=7.4, 渗透压~300 mOsm/L)。待脑组织冷却后(~3 min)快速剥离海马,放置于振动组织切片机(Vibratome, USA)上,沿海马槽纤维平行方向将海马切成400 μm厚的切片,将切片移至预先通以95% O₂+5% CO₂的ACSF中,27 °C的孵育箱孵育2 h。

1.3 MEA与灌流系统 本实验所采用的MEA,其底板是一块5 cm×5 cm见方的透明石英玻璃,电极阵列区域大约为1.4 mm×1.4 mm,内嵌有60条彼此绝缘的导线(Ti)(图1A)。这些导线与透明电极尖端(TiN)相连,电阻值为400 kΩ,电极直径大约30 μm,并排成8×8的平面矩阵(四个角上空缺)(图1B)。实验中将孵育后的切片移至多电极内的电极阵列区域,用滤纸吸干切片与玻璃之间的ACSF,并用尼龙网固定使切片与多电极紧密贴附(图1C)。

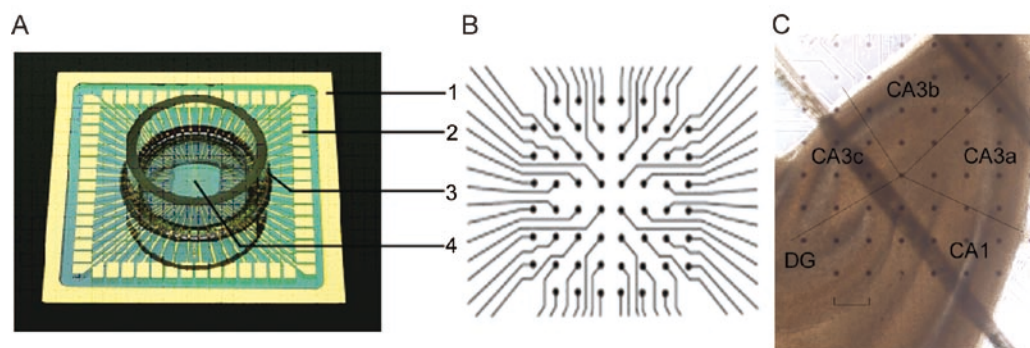


图 1. 多电极阵列及大鼠海马切片在显微镜下的照片

Fig. 1. Multi-electrode array (MEA) and micrograph of rat hippocampal slice. A: Overview of a 60-electrode MEA. External dimensions are 5 cm×5 cm. 1: The quartz glass; 2: The connecting pads; 3: The glass ring; 4: The patterned area containing the electrodes. B: Electrode field of the MEA with 60 electrodes (30 μm diameter, 200 μm spacing). C: Optical picture of an acute hippocampal slice on MEA. CA regions (CA1, CA3a, CA3b, CA3c) and dentate gyrus (DG) locations are indicated by solid lines. Scale bar, 200 μm.

自制的灌流槽与电极底板形成灌流小室(~ 0.52 mL), 待电极阵列接入多电极记录系统后, 灌流液由蠕动泵(Ismatec SA, USA)平稳地以 0.8 mL/min 的速度从灌流槽的一侧小孔泵至灌流小室, 并流过灌流小室内的切片表面。灌流液为 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ 混合气饱和的 ACSF 或高钾 ACSF ($[\text{KCl}]_o$ 为 8.5 mmol/L, 其余与 ACSF 同)。离体切片用控温仪(Thermostat HC-X, Multi Channel Systems MCS GmbH, Germany)维持在 35°C , 同时将 Ag/AgCl 细丝浸入灌流液作为参考电极。

1.4 电生理记录及离线处理 海马神经元的电活动通过电极阵列同步记录, 经过一个 60 通道的放大器(单端放大, 带宽 $10\sim 3400$ Hz, 放大倍数 1 200, 输入阻抗大于 $10^{10} \Omega$, 输出阻抗 330Ω), 然后由计算机软件 MC_Rack (Multi Channel Systems MCS GmbH, Germany)对神经元的电活动信号进行同步采样, 采样率为 $20 \text{ kHz}^{[9]}$ 。采样信息显示于屏幕, 并同步存储于计算机硬盘以备离线分析。分析时对原始记录信号先进行 200 Hz 高通滤波, 以噪音信号标准差的 4 倍作为阈值获得各个电极上记录的动作电位发放信号, 再进行后续分析。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 统计方法采用方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高钾诱导的簇样放电

持续灌流含有高钾的 ACSF 后在 MEA 上可以记录到在海马 CA 区域各部分锥体细胞层的同步化簇样放电。簇样放电在不同的实验标本及记录条件下有不同的标准, 离体癫痫模型上的研究显示^[2], 癫痫样的簇样放电在胞外记录时表现为叠加于场电位上成串发放的动作电位, 在海马切片多个区域同步出现, 具有发作间期癫痫样放电的特征。图 2A 为从图 1C 所示切片上记录到的多区域同步出现的簇样放电。图 2B 是图 2A 中第 74 道电极上记录到的一个经过 200 Hz 高通滤波后的典型的癫痫样簇样放电。统计该道电极上 15 min 内连续记录到的 150 个簇样放电, 显示簇样放电内的动作电位之间的时间间隔(inter-spike interval, ISI)呈指数分布(图 2C), 这与在培养的海马神经元及在体的海马 CA1 区锥体细胞上的研究结果类似^[10,11]。由图 2C 可见, 该电极记录的簇样放电内 95% 的 ISI 值小于 12.80 ms ($I_{95} = 12.80$

ms, 虚线所示)。分析了 6 个脑片上的 CA3a 区簇样放电 I_{95} 值, 为 $11.06 \pm 1.45 \text{ ms}$ (分布区间为 $8.22 \sim 13.90 \text{ ms}$)。图 2D 分析了同一道电极(#74)上的 150 个典型簇样放电内的动作电位的放电时间序列, 图中每个点代表了一个动作电位, 可以发现在簇样放电起始段动作电位发放比较密集, 而在临近结束时发放较稀疏, 提示 ISI 在每个簇样放电后期增大。

2.2 簇样放电的时间特性

在正常 ACSF 灌流时, 海马切片上很少观察到自发放电。而在高钾 ACSF 灌流后, 会先观察到神经元明显的兴奋性表现, 出现少量的自发放电; 经过 $5\sim 10 \text{ min}$ 的持续灌流, 则出现大规模的同步化放电(图 2A)。为了定量描述多电极记录到的海马神经元的放电情况, 我们引入了 4 个参数对其进行分析: 动作电位频率(spike frequency)、每分钟簇样放电的个数(burst count per minute)、簇样放电持续时间(burst duration)及每次簇样放电内含的动作电位个数(number of spikes per burst)。灌流初期, 上述 4 个参数会呈现不断变化。

经过 $10\sim 20 \text{ min}$ 的持续高钾灌流后, 电极所记录到的簇样放电状态逐渐进入稳态, 表现为上述各参数指标虽然存在随机起伏, 但没有明显的变化趋势。取一段稳态发放的 10 min 的数据段, 求得在该时间段内各个参数的平均值, 并以其为基准, 计算随后 40 min 持续高钾灌流时各参数关于基准值的相对值(每 30 s 为一个时间窗)。图 3 分析了在 6 张切片上记录到的 9 个位于 CA3a 区锥体细胞层的数据。以图 3A 为例, 第一个空心圆代表稳定发放开始 10 min 内的平均动作电位频率, 后面每个实心圆代表相应时间窗(bin= 30 s)内的动作电位频率相对值($n=9$ electrodes)。可以看出一旦稳定的放电出现, 这种状态至少可以保持 40 min 。以同样的方法分析了每分钟簇样放电的个数(图 3B)、簇样放电持续时间(图 3C)和每次簇样放电内含的动作电位的个数(图 3D), 均显示类似的稳定放电模式。在对 CA3b、CA3c、CA1 区锥体细胞层的放电活动进行分析时也显示了类似的稳定放电模式。

2.3 簇样放电的空间特性

为了比较海马不同区域的特性, 将海马分为 CA3a、CA3b、CA3c、CA1 及 DG 区(图 1C)^[12], 取不同区域锥体细胞层及 DG 区颗粒细胞层的数据进行分析。结果显示, 在成功诱导出癫痫样活动的 60 个脑片中, 同步化的簇样放电可见于海马 CA

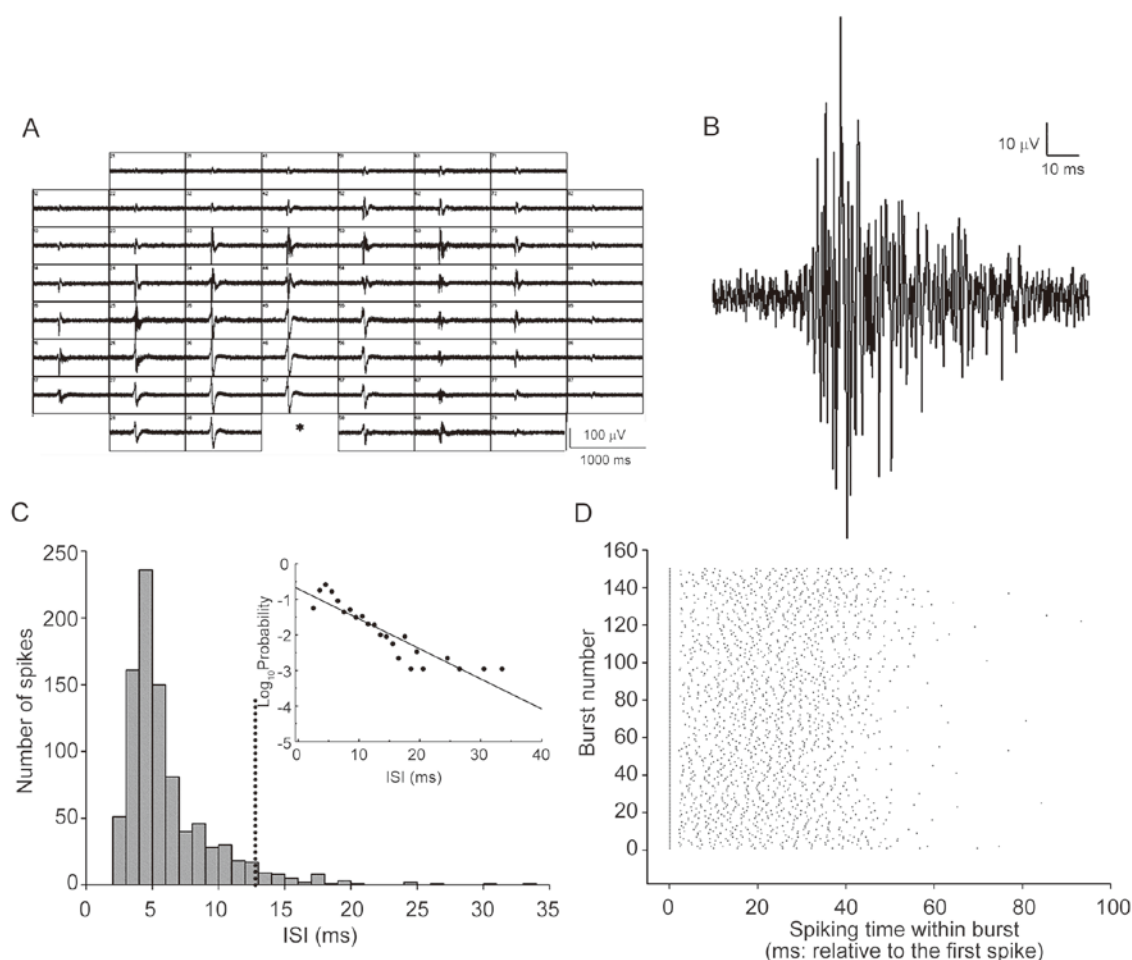


图 2. 高钾诱导的海马脑片癫痫样簇样放电

Fig. 2. Epileptiform bursting activity induced by high K^+ perfusion in hippocampal slice using multi-electrode arrays. A: Screenshot of multi-electrode recording for hippocampal slice presented in Fig. 1C. Each window represents the recording from one electrode (*: the electrode switched off due to noise). B: Representative example of a burst after field potential was filtered by a 200 Hz high-pass filter. C: Inter-spike interval (ISI) histogram during bursting. The vertical dotted line marks 95 percent of ISIs within burst. Inset: linear regression of the logarithmic ISI probability distribution indicates an exponential distribution. D: Raster plot of spike timing for 150 typical epileptiform bursts. B, C and D are analyses performed on data recorded from electrode #74.

各亚区；而动作电位仅在6个脑片的DG区被记录到，且并不形成簇样放电。表1总结了在6个脑片上所有区域的分析结果。

双因素方差分析的结果提示，尽管不同切片之间的差异较大，但各个切片上DG区颗粒细胞层动作电位的发放频率都明显低于CA各亚区($P < 0.05$, $n=6$)，此外在DG区未见到簇样放电，这些都进一步证实了DG区癫痫发生的阈值较高^[3]。取稳态放电数据，应用双因素方差分析方法，对海马不同CA亚区之间的4个参数进行统计分析。结果提示，在相同脑片上，各CA亚区活动性之间无统计学差异($P > 0.05$, $n=6$)；但不同脑片之间，每分钟簇样

放电的个数差异较大($P < 0.01$, $n=6$)。这提示在高钾ACSF灌流诱导的大鼠海马癫痫样簇样放电时，海马脑片不同CA亚区主细胞层的放电模式相似。

2.4 抗癫痫药物的效应

在各区出现稳定的同步化癫痫样簇样放电后(约15 min)，灌流液换成加有60 $\mu\text{mol/L}$ 苯巴比妥钠的高钾ACSF。图4显示了一例切片中海马各区在加药前后簇样放电频率的变化，图中虚线显示了对应的锥体细胞层和颗粒细胞层的位置，不同颜色的等高线区域代表了不同的簇样放电频率。可以发现CA1区和CA3c区的放电在给药3 min时已经开始被抑制(图4B)；给药7 min后除CA1和CA3c的放电

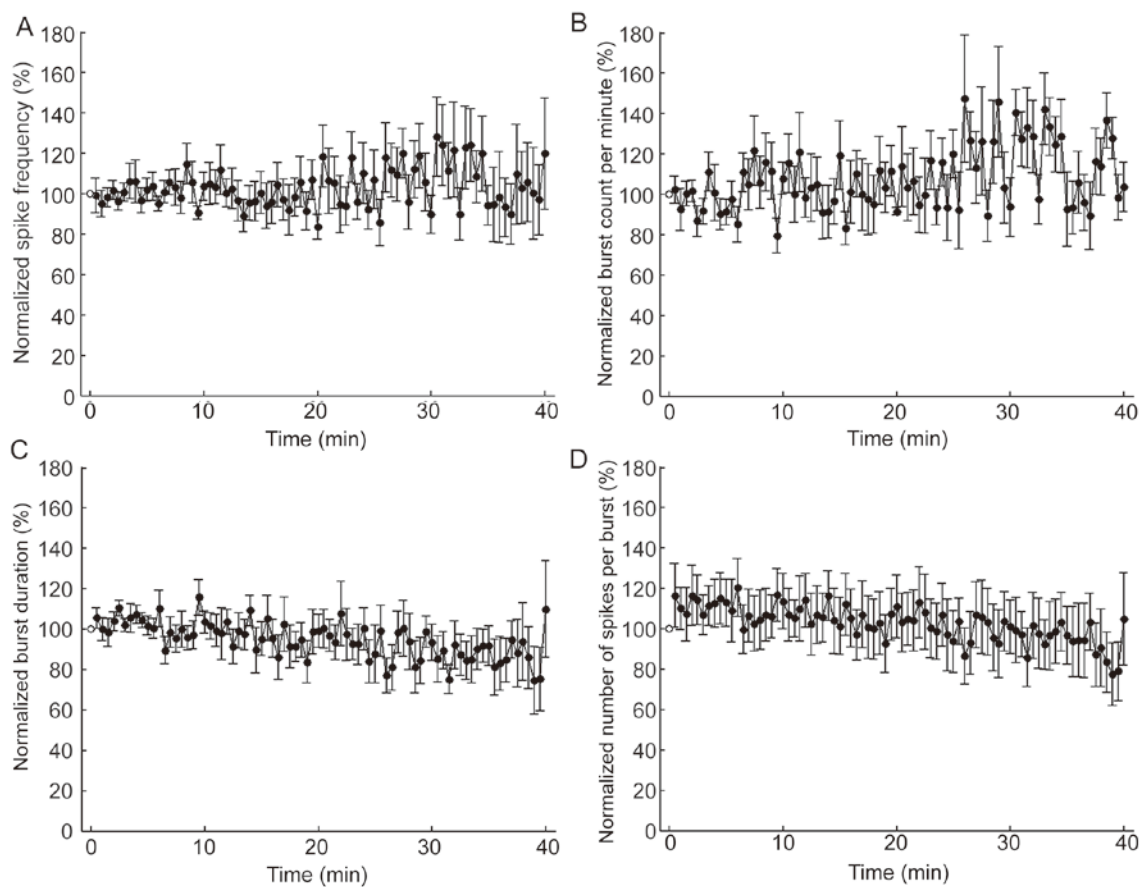


图 3. 高钾诱导海马脑片癫痫样簇样放电的稳定发放
Fig. 3. Steady state of high K^+ -induced epileptiform bursting activity in hippocampal slice using multi-electrode arrays. A: Spike frequency. B: Burst count per minute. C: Burst duration. D: Number of spikes per burst. The first blank circle in each plot represents baseline for each parameter. Filled circles indicate data points per 30 s. Data were recorded from CA3a region ($n=9$).

表1. 海马不同区域放电参数的比较

Table 1. Comparisons of discharge parameters among different hippocampal regions

Areas	Spike frequency (Hz)	Burst count per minute	Burst duration (ms)	Number of spikes per burst
CA1	5.24±1.34	14.43±1.98	29.01±5.45	7.60±1.48
CA3a	7.37±2.02	15.32±2.73	36.63±4.13	9.58±1.20
CA3b	7.42±1.25	15.65±1.96	42.29±4.00	11.52±1.59
CA3c	6.36±1.08	14.90±2.70	39.03±3.81	9.95±1.02
DG	1.76±0.46*	N.A.	N.A.	N.A.

Mean±SEM. * $P<0.05$ vs all CA sub-regions, two-way ANOVA, 6 electrodes for each subfield from 6 slices. N.A.: Not available as no burst was detected from this area.

进一步被抑制，部分邻近 CA3a 与 CA3b 区的放电也开始被压抑(图 4C)；在给药 10 min 后，只有 CA3a 和 b 区的部分区域仍可出现较强的簇样放电(图 4D)。

3 讨论

大脑群体神经元的异常超同步化放电是癫痫发

生的重要电生理基础。长期以来，基于单细胞记录的电生理技术对了解单个神经元在癫痫发生中的作用有着重要的贡献。然而，癫痫的发生不仅取决于单个神经元的兴奋性，更重要的是在神经网络内通过突触联系及局部电位的被动传播，使更多的神经元参与动作电位的发放行为，从而引起群体神经元

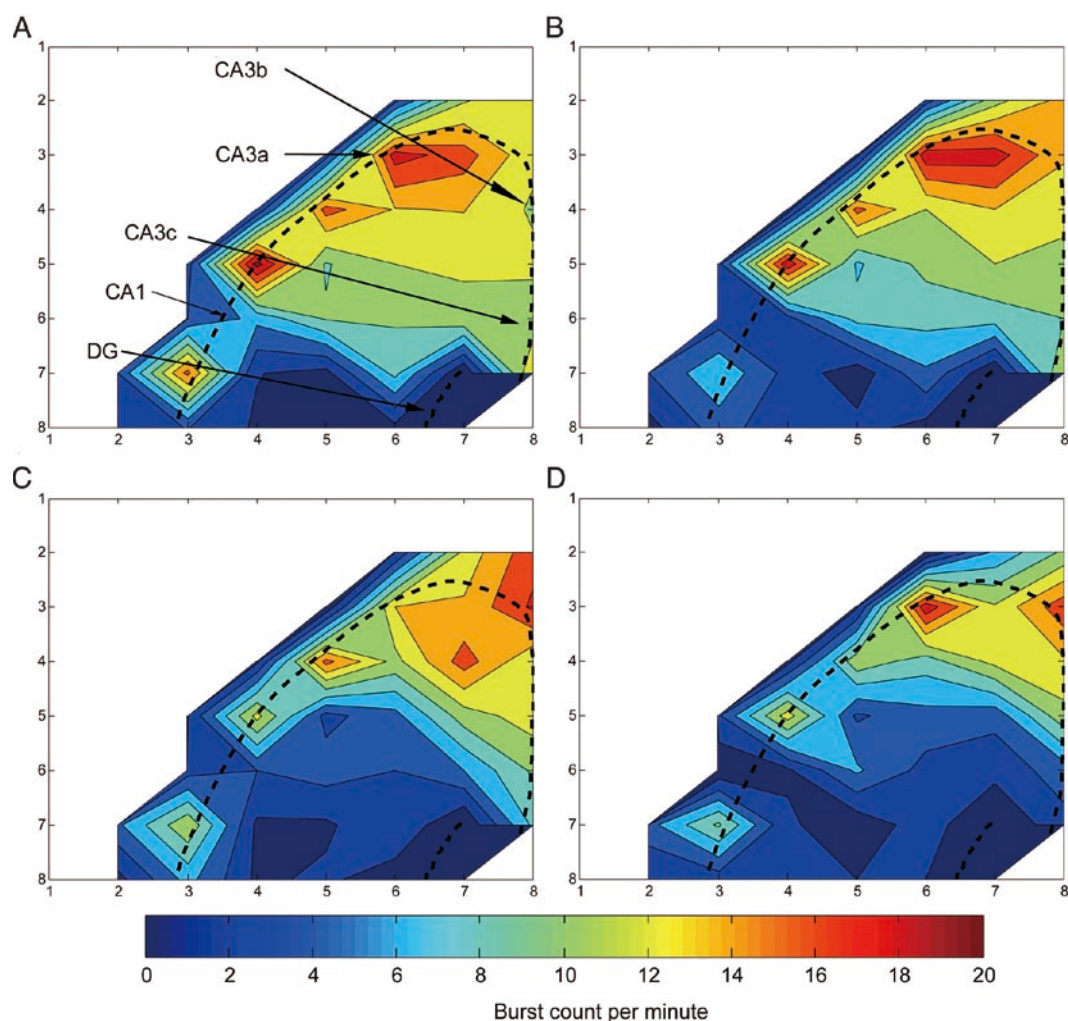


图 4. 苯巴比妥钠对高钾诱导的海马脑片不同区域的癫痫样放电的抑制效应

Fig. 4. Inhibitory effects of phenobarbital sodium (60 $\mu\text{mol/L}$) on high K^+ -induced epileptiform activity in different regions of hippocampal slice. A: Contour plot of bursting activity during sustained high K^+ perfusion. B: 3 min after drug application. C: 7 min after drug application. D: 10 min after drug application. Dashed line in each plot indicates positions of CA pyramidal cell layer and DG granular cell layer. Different hippocampal regions are indicated. Burst count per minute is color-coded.

的同步放电^[1,13]。尽管在活体上可以应用 EEG 等技术记录到大脑多个部位神经元的群体活动，但由于在 EEG 等记录时掺杂了许多复杂的神经网络之间相互联系的信息，影响了它们在研究特定神经网络中的作用。海马被认为是颞叶癫痫的重要致病部位^[14]，由于其癫痫发作的阈值较低，且目前对其内部网络结构的研究相对比较清楚^[12]，因而成为体外研究癫痫发生机制的重要标本。在研究中，我们成功地应用 MEA 记录到无镁、匹鲁卡品及高钾诱导的海马脑片上的癫痫样同步化簇样放电。本论文主要以高钾模型为例探索应用 MEA 研究海马脑片癫痫样放电的方法。高钾海马切片模型是一个传统的癫痫模型，其致病作用主要是通过增加神经元的放电频率，并激活部分阈值高的神经元也参与同步化的放电^[15]，从而

引起类似发作间期痫性放电的簇样放电。

MEA 记录技术的出现，为在离体条件下研究神经元的群体活动提供了一种新的手段。簇样放电时多个神经元同步放电，可有效增加兴奋性突触的开放数量和传递效率^[16]，并通过侧枝联系引起整个神经网络的高兴奋性^[17]。分析 MEA 上记录到的簇样放电内的动作电位序列，发现在簇样放电时动作电位在初期发放比较密集，而在后期发放稀疏，这提示在簇样放电初期，兴奋性的因素占主导，而在簇样放电后期，抑制性的因素占主导^[18]。每次簇样放电初期的兴奋性作用可能与谷氨酸能突触联系形成的正反馈回路有关，而在放电后期抑制性 GABA 能通路的激活则有助于一次簇样放电的终结^[19]。既往的研究中有将 ISI 小于 6 ms 定为簇样放电的标准^[10,11]，

而在本研究中发现簇样放电内 ISI 的 I_{95} 值分布于 8.22~13.90 ms, 考虑可能与所用的记录手段、动物品系、实验标本不同有关。

引入参数对海马各区的放电模式进行定量研究, 可以发现海马各 CA 亚区之间的放电模式相同, 而 DG 区无明显的动作电位发放, 这可能与 DG 区细胞兴奋阈值较高且存在较多抑制性突触有关^[20]。与从其它电生理记录手段记录到的结果类似^[21,22], 典型的癫痫样簇样放电一旦被诱导出来后即可稳定存在。苯巴比妥钠是临床常用的一种抗癫痫药物, 其抗癫痫作用是通过增强 GABA_A 的作用而抑制兴奋性的突触传递^[23]。在放电稳定后加入苯巴比妥钠发现该药对不同区域的效应并不相同(图 4), CA3a 和 b 区域的放电较晚被抑制。实验中切片与灌流管出入口的相对位置是随机的, 在图 4 所示实验中, CA3c 位于 CA3a 和 b 区右侧, 但 CA3c 区的放电活动先于 CA3a 和 b 区被抑制; 另外的几次实验也得到了一致的结果。故认为苯巴比妥钠抑制效应的差异并不仅仅是因为灌流的方向性, 而更可能是由于海马切片 CA 不同亚区兴奋性与抑制性突触联系的数量不同。CA3a 和 b 区存在更广泛的回返性突触联系, 这可能也是这两个区域经常成为“癫痫起搏点”的重要原因^[13,19]。

综上所述, MEA 可以有效地应用于离体癫痫模型的研究, 由于其操作方便并且可以多部位记录, 可有效地应用于离体条件下癫痫样放电时空特性及药物抗癫痫效应的研究。目前我们已经成功建立了定量分析 MEA 记录的海马脑片癫痫样放电的方法, 下一步我们将尝试在此基础上研究离体条件下癫痫样放电的起搏与扩布现象。当然, 本研究使用的平面多电极也还存在不足之处。由于目前的脑片制作方法可造成脑片表面细胞死亡^[24], 因而影响了对深层活细胞电活动的记录。三维 MEA 的应用也许可以很好地解决这个问题^[25], 从而使 MEA 在癫痫研究中发挥更大的作用。

* * *

致谢: 感谢上海交通大学生物医学工程系神经信息处理实验室各位同学提供的帮助, 感谢上海交通大学神经科学研究所张星漪老师提供的帮助。

参考文献

- McCormick DA, Contreras D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 815-846.
- Dzhala VI, Staley KJ. Transition from interictal to ictal activity in limbic networks *in vitro*. *J Neurosci* 2003; 23 (21): 7873-7880.
- Colom LV, Saggau P. Spontaneous interictal-like activity originates in multiple areas of the CA2-CA3 region of hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1994; 71 (4): 1574-1585.
- Steidl EM, Neveu E, Bertrand D, Buisson B. The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays. *Brain Res* 2006; 1096 (1): 70-84.
- Wheeler BC, Novak JL. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1986; 33 (12): 1204-1212.
- Novak JL, Wheeler BC. Two-dimensional current source density analysis of propagation delays for components of epileptiform bursts in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1989; 497 (2): 223-230.
- Hill AJ, Jones NA, Williams CM, Stephens GJ, Whalley BJ. Development of multi-electrode array screening for anticonvulsants in acute rat brain slices. *J Neurosci Methods* 2010; 185(2): 246-256.
- Traynelis SF, Dingledine R. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1988; 59 (1): 259-276.
- Liu X, Zhang YY, Gong HQ, Liang PJ. The GABA_A receptor-mediated inhibitory pathway increases the correlated activities in retinal ganglion cells. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2009; 61 (2): 99-107.
- Chen C, Chen L, Lin Y, Zeng S, Luo Q. The origin of spontaneous synchronized burst in cultured neuronal networks based on multi-electrode arrays. *Biosystems* 2006; 85 (2): 137-143.
- Harris KD, Hirase H, Leinekugel X, Henze DA, Buzsaki G. Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 2001; 32 (1): 141-149.
- Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6 (4): 347-470.
- Wittner L, Miles R. Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J Physiol* 2007; 584 (Pt 3): 867-883.
- Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav* 2009; 14 Suppl 1: 32-37.
- Cohen I, Miles R. Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in *in vitro* hippocampus. *J Physiol* 2000; 524 (Pt 2): 485-502.
- Bains JS, Longacher JM, Staley KJ. Reciprocal interactions between CA3 network activity and strength of recurrent collateral synapses. *Nat Neurosci* 1999; 2 (8): 720-726.
- Markram H. A network of tufted layer 5 pyramidal neurons.

- Cereb Cortex 1997; 7 (6): 523-533.
- 18 Awiszus F. Spike train analysis. *J Neurosci Methods* 1997; 74 (2): 155-166.
- 19 de la Prida LM, Huberfeld G, Cohen I, Miles R. Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* 2006; 49 (1): 131-142.
- 20 Coulter DA, Carlson GC. Functional regulation of the dentate gyrus by GABA-mediated inhibition. *Prog Brain Res* 2007; 163: 235-243.
- 21 Arias RL, Bowlby MR. Pharmacological characterization of antiepileptic drugs and experimental analgesics on low magnesium-induced hyperexcitability in rat hippocampal slices. *Brain Res* 2005; 1047 (2): 233-244.
- 22 Staley KJ, Bains JS, Yee A, Hellier J, Longacher JM. Statistical model relating CA3 burst probability to recovery from burst-induced depression at recurrent collateral synapses. *J Neurophysiol* 2001; 86 (6): 2736-2747.
- 23 Twyman RE, Rogers CJ, Macdonald RL. Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol* 1989; 25 (3): 213-220.
- 24 Teyler TJ. Brain slice preparation: hippocampus. *Brain Res Bull* 1980; 5 (4): 391-403.
- 25 Heuschkel MO, Fejtł M, Raggenbass M, Bertrand D, Renaud P. A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. *J Neurosci Methods* 2002; 114 (2): 135-148.