

小鸡视网膜神经节细胞的反应特性: 多电极记录研究*

陈爱华 周 艺

(中国科学院上海生命科学研究院上海生理研究所, 上海 200031)

龚海庆 梁培基**

(上海交通大学生物医学工程系, 上海 200030)

摘要 视网膜主要进行视觉信息的初级加工和处理. 应用多电极记录技术, 对一小块保持功能活性的小鸡视网膜上的多个神经节细胞的电活动进行同步记录, 然后通过相关非线性分析方法检测提取动作电位. 对视网膜神经节细胞群体活动特性的分析, 说明了视觉信息不仅为神经元的放电频率所编码, 也为相邻神经元的协同放电活动所携带.

关键词 视网膜 神经节细胞 多电极记录

神经科学的一个基本问题是, 神经元活动怎样对行为信息进行编码^[1]. 视觉系统, 尤其是视网膜, 因其所含的神经元种类较少, 并具有清晰的分层结构, 为研究神经元的编码机制提供了方便^[2].

然而, 多年来对于视网膜的信号处理加工机制的了解主要来自单细胞记录^[2,3]. 这项技术的内在前提是单个神经元作为一个功能单位, 其活动可以独立地反映一个特定的过程, 群体中每个神经元的放电活动特性主要取决于刺激. 因此, 对单个神经元的编码机制的探究有助于对整个神经系统的信息处理机制的了解. 尽管这些传统方法对理解相关生物学过程中的细胞分子机制有很大的帮助, 然而近来发现, 大脑的信息处理在很大程度上依赖于相关神经元的相互合作与整合^[4]. Meister 等人^[5~9]的一系列研究表明, 视觉刺激的编码依赖于视网膜神经节细胞的群体放电活动, 而另外一些实验则发现了神经节细胞的相关性放电, 对神经元在发育过程中找到正确的靶细胞, 形成高度有序的结构起着重要的作用^[10]. 而且, 神经元间活动的相关性在信息处理过程中具有快速变化的特性. 在视网膜和外膝体中均发现, 神经元在不同的刺激条件下能迅速形成不同的功能群体^[11]. 因而, 为了理解大脑中的编码、解码及信息处理等机制, 一些相关技术, 例如多电极细胞外记录^[7~9]已得到应用. 本研究主要是运用多电

2002-08-15 收稿, 2002-09-25 收修改稿

* 上海市科学技术委员会发展基金(批准号: 0121A14073, 02JC14008)和国家重点基础研究规划基金(批准号: G1999054000)资助项目

** 联系人, E-mail: pjliang@server.shncn.ac.cn

极记录系统对视网膜上多个神经节细胞上的电活动进行同时记录, 此外, 还通过相关性分析比较了相邻神经元在无光刺激或全域白色闪光刺激下的反应活动模式。

1 实验方法

1.1 实验过程

运用多电极阵列(Multi Channel Systems MCS GmbH, German)(图 1(a))对新生小鸡(大约 2~4 d)的离体视网膜神经节细胞进行胞外记录, 该电极阵列的底板是一块 5 cm × 5 cm 的透明石英玻璃, 上面镶有 60 条绝缘金属导线(其从放大器连接处一直延伸到电极矩阵中心)。电极由这些导线的尖端形成(直径大约为 10 μm), 并按 8 × 8 的矩阵方式进行排列, 电极间距为 100 μm^[12,13](图 1(b)), 而微电极形成的该阵列用一个玻璃环塑封住, 形成灌流小室。

眼睛取出后, 用剪刀或刀片将其切成两半, 并将角膜和晶状体与后半部分分开。接着用镊子移去与视网膜表层相连的玻璃体, 然后将视网膜剪成 4 mm × 4 mm 的小块。最后, 将其移至电极上, 使神经节细胞与电极紧密接触。为了提高两者之间的黏附性, 平面微电极上先滴有 3 μL 溶解在甲醇中的硝酸纤维素(浓度为每 10

mL 甲醇溶有 1 cm² sartorius 硝酸纤维素), 并置于空气中晾干。标本由标准灌流液进行灌流, 灌流液的组成如下(单位: mmol/L): 100 NaCl, 5 KCl, 3 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 25 葡萄糖, 并通有含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 同时维持 pH 值为 7.5 ± 0.2。实验过程中, 灌流速度为 4.5 mL/min, 离体组织用控温仪(Thermostat HC-X, Multi Channel Systems MCS GmbH, German)维持在 37℃, 同时将 Ag/AgCl 小块置于灌流液作为参考电极。

给光刺激由计算机屏幕产生, 通过光学聚焦系统, 投射于离体视网膜上形成 0.7 mm × 0.7 mm 的光斑。采用间隔 500 ms 的闪光刺激, 持续时间也为 500 ms, 光强 0.139 μW/m²。神经元对光反应通过 60 道电极进行同时记录, 经过一个 60 道通路的放大器(单端放大, 带宽 10~3400 Hz, 放大倍数 1200, 输入阻抗大于 10¹⁰ Ω, 输出阻抗 330 Ω)^[14], 然后由商业软件(MCRack)对神经元反应其与刺激信息一起采样, 采样信息显示于屏幕, 同时存储于计算机, 以备离线分析。采样率为 10 kHz。

1.2 信号分析

通常平面微电极上记录得到的信号幅度比较小(0.01~0.1 mV), 信噪比也较低^[15]。仔细观察这些记录数据, 还可以发现有些信号与噪声具有相似的频谱特性, 因而采用传统的带通滤波器并不能将信号与噪声分离。

本研究中, 单道电极上记录到的神经元活动, 通过非线性方法进行信号分离^[16], 这种时频分析方法利用即时频率和幅度信息来分离动作电位, 提高了信噪比, 从而突出动作电位的

峰值。非线性算子 j 的定义如下: $j(x(t)) = \left(\frac{dx(t)}{dt} \right)^2 - x(t) \left(\frac{d^2x(t)}{dt^2} \right)$ 。 $x(t)$ 是在时刻 t 从电极上

记录到的原始信号, $j(x(t))$ 为非线性算子输出。通过检测 $j(x(t))$ 中的峰值所在, 来决定 $x(t)$ 中的动作电位的发放时刻。在研究不考虑动作电位的幅度, 对锋电位按其发放的先后顺序进行

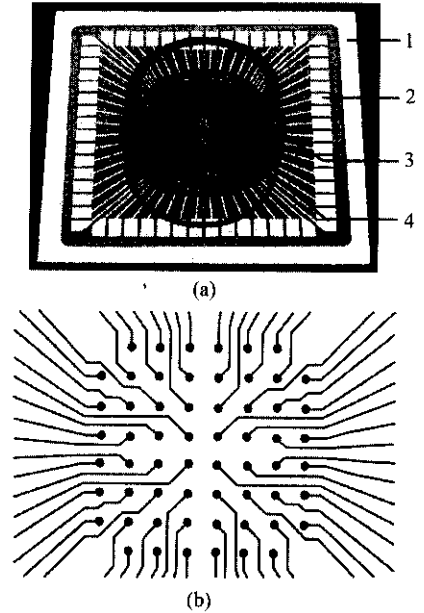


图 1 多电极阵列示意图

(a) 平面微电极: 1 示石英玻璃底板; 2 示放大器连接处; 3 示玻璃环; 4 示电极矩阵区域。(b) 矩阵区域内电极的详细排列方式

排列, 获得每个电极上的动作电位串。

一般情况下, 电极上的动作电位串给出相关神经节细胞的时间编码信息, 同时记录得到的神经节细胞之间的相互关系则可以通过相关性分析来推知^[7,10,17]。相关性通常反映地是一个细胞在另一个细胞活动作用下的平均放电频率, 因而, 运用相关性分析可以了解视网膜神经节细胞间的相互作用。通常相关性定义如下:

$$c_{xy}(m) = \begin{cases} \sum_{n=0}^{N-|m|-1} x_n y_{n+m} & m \geq 0 \\ c_{yx}(-m) & m < 0. \end{cases}$$

式中 x_n 为信号序列 x 在 n 时刻的值, 而 y_{n+m} 表示信号序列 y 在 $n + m$ 时刻的值; $c_{xy}(m)$ 则定义为序列 x 与序列 y 以 m 为时延的相关性, 这反映了信号 x 对 m 时刻后信号 y 的总体影响。

2 结果

2.1 动作电位的检测和提取

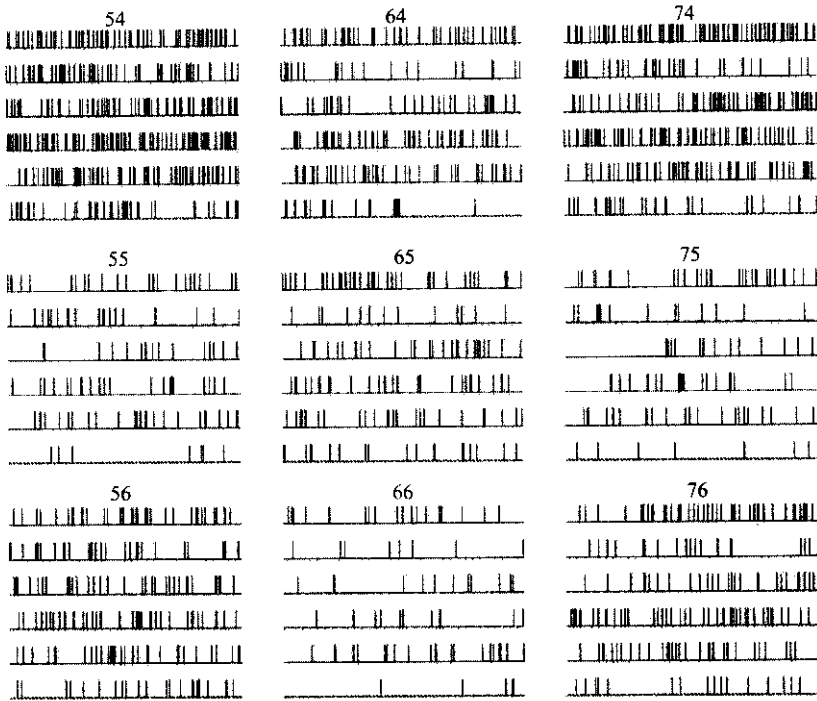
从视网膜标本上得到的原始电极信号, 经过非线性算法实施对动作电位的检测, 得到每个电极上动作电位的时间序列。图 2(a) 和 3(a) 给出的是在无光和白色全视野闪光刺激下从 9 个电极上得到的动作电位串, 在重复的 20 多次实验观察中得到了相似结果, 在此给出的只是其中的 1 例。虽然实验的标本中神经元和电极阵列之间的相互位置是随机而不确定的, 电极信号之间的互相关函数不能完全重复, 但是对每次实验数据进行处理的结果发现, 各个标本上不同电极信号间的互相关函数呈相似模式。

2.2 神经节细胞的自发放电活动

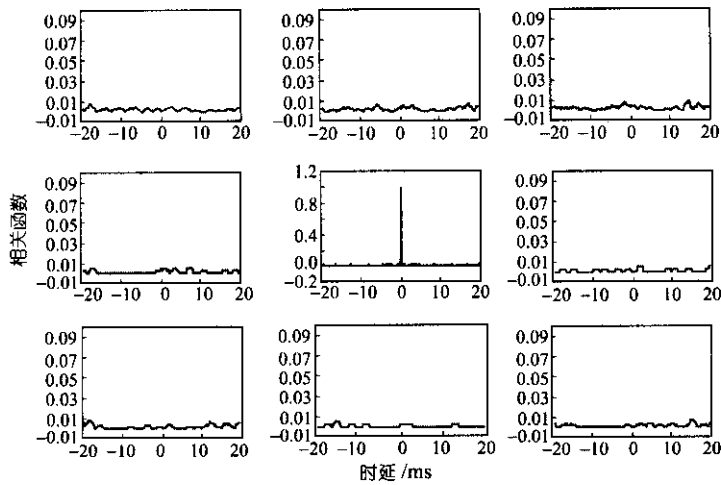
视网膜神经节细胞在没有光刺激情况下往往也有动作电位的发放, 即自发放电活动。图 2(a) 显示在暗中, 从 9 道电极上同时记录得到的视网膜神经节细胞的放电反应, 可见, 这些动作电位的发放随机且稀疏。对这些数据序列进行自相关和互相关分析的结果如图 2(b) 所示。正中间为第 65 道电极上的自相关函数, 其余给出的则是第 65 道与其他相邻电极上信号的互相关函数(排列顺序与图 2(a) 中一致)。第 65 道电极信号的自相关函数接近于 0, 说明了神经元呈随机发放(其他电极上的信号也是一样)。同时, 互相关函数图也呈平坦特性, 说明了自发放电时神经元之间的放电活动是相互独立的。

2.3 全域白色闪光刺激下的神经节细胞反应

本实验也观察了相同神经元在白色闪光刺激下的反应。与自发放电相比, 神经元活动出现了明显的改变。如图 3(a) 所示, 大多数神经元在给光和撤光后的一段时间内均有明显的放电反应。而自相关计算说明了从同一根电极上记录得到的动作电位的相继发放之间呈一定程度的正相关(如图 3(b) 中的 65 道), 尽管相关性较弱。而第 65 道电极与附近其他大多数电极上的信号间的互相关分析则在 0 点处或 0 附近有一个明显的峰值, 意味着这些神经元之间有同步化放电的趋势, 揭示对于重复性白光刺激神经元之间的活动并非独立。然而, 与其余的相邻电极相比, 第 65 和 55 道之间的相关性水平较低(图 3(b)), 这提示第 65 与 55 道电极上记录到的信号基本上是相互独立的。事实上, 电极信号之间的相关性也具多种模式: 负延迟(图中峰值



(a)



(b)

图 2 在暗中从 9 道电极上记录到小鸡视网膜神经节细胞的反应

(a) 从 9 道电极上同步记录到的神经节细胞的自发放电活动，持续时间为 6 s，每行代表 1 s。(b) 动作电位串之间的相关性分析：中间为第 65 道电极上的自相关分析，其余为第 65 道电极与其他周围相关电极上的动作电位串的互相关分析，排列顺序如(a)所示，横坐标是时延，纵坐标是相关函数

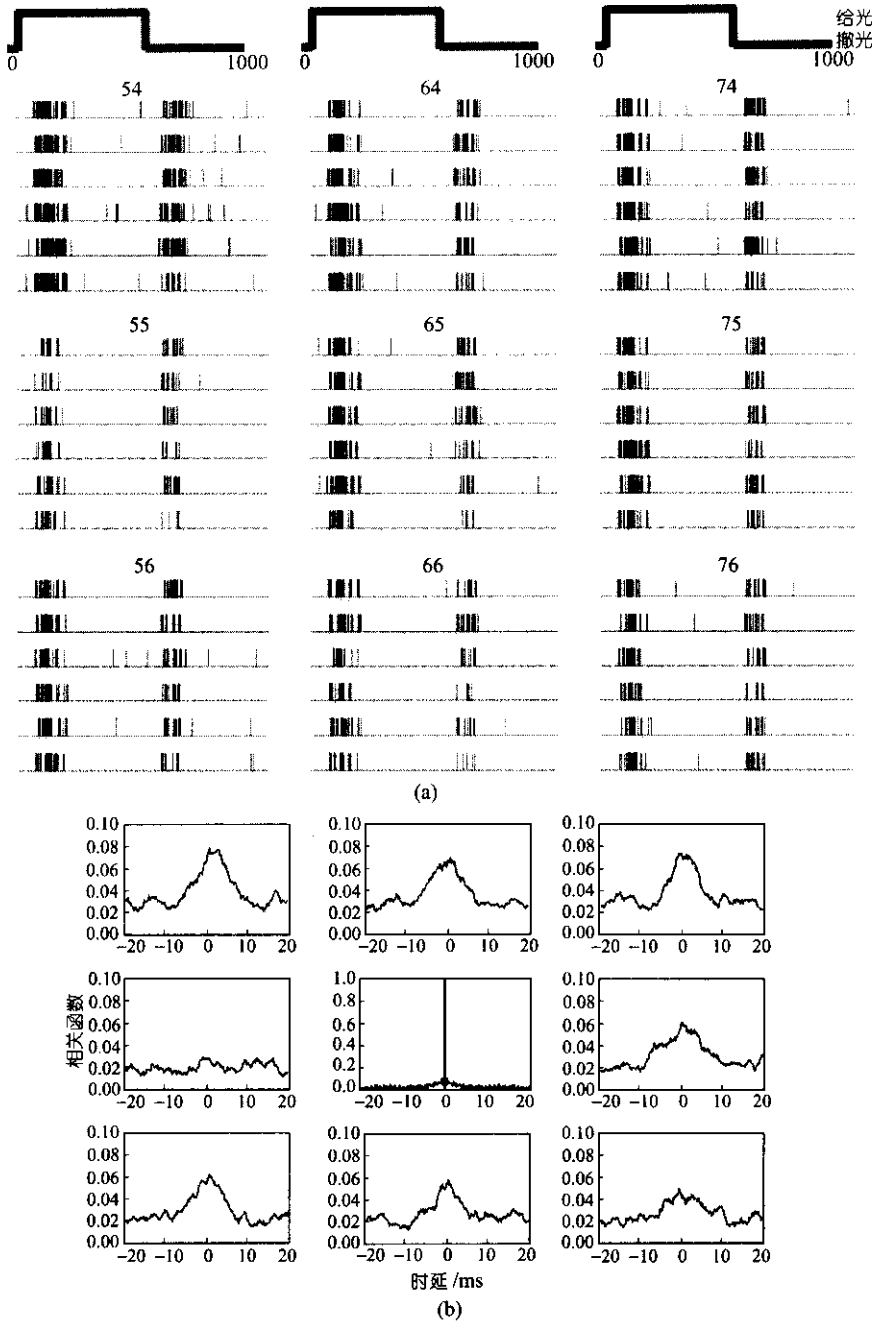


图 3 从 9 道电极上记录到的视网膜神经节细胞对周期性闪光刺激的反应(每个周期中给光和撤光时程均为 500 ms)

(a) 从相邻的 9 道电极上记录到的放电序列(图中最上面表示刺激的时间, 下面为连续 6 s 的记录); (b) 在全视野白色闪光刺激下的相关性分析: 中间为第 65 道电极上的自相关分析, 其余为第 65 道电极与其他周围相关电极上的动作电位串的互相关分析, 排列顺序如(a)所示

位于 0 值左边)反映了第 65 道电极上记录的信号先于第 74 和 76 道上的信号, 而正延迟(图中

峰值位于 0 值右边)则反映了第 65 道电极上的信号可能受到第 54, 56 和 64 道电极上的神经元的影响, 而零延迟则说明了第 65 道电极上的神经元的信号与第 66, 75 道上的神经元有同步放电^[17].

这些相关性说明了上述神经元回路间可能存在如下机制: 不同细胞可以同时对一个强的信号输入起反应, 而在另外一些情况下, 神经节细胞之间也可以相互影响. 因而, 相关性分析有助于了解视网膜信号处理中存在的可能机制.

3 讨论

3.1 单细胞记录

长期以来, 以单电极记录为基础的电生理技术对于了解单个神经元的特性有着相当重要的贡献. 在视觉研究中, 人们通常选择一些简单的刺激模式, 例如闪光刺激或移动光栅, 进行多次重复刺激, 从而确定某个神经节细胞放电反应, 并按照神经元对光刺激的时间、空间以及光谱敏感特性将神经元从功能上分为若干类. 但是, 仔细观察图 2(a) 和 3(a) 可以看出, 神经元对相同重复性刺激的反应模式有一定的可变性, 说明了对视觉刺激的特征性编码绝非单个神经元活动的结果, 而是多个神经元活动的结果^[5]. 另一方面, 对神经元细胞群体如何对视觉信息进行编码以及下一级视觉系统怎么从这些细胞群体的放电模式中获得编码信息却了解得很少. 部分原因当然是因为神经通路中存在许多复杂的前馈和反馈机制, 还存在其他困难, 例如对大规模神经元反应的采集和分析, 以及从这些反应中提取刺激编码信息.

3.2 多电极记录及神经元群体编码

平面微电极能从 60 个位点上进行同步记录, 也即允许对多个神经元放电活动进行同步检测, 从而有助于了解视网膜神经元群体活动对视觉信息的综合处理与编码.

本研究中运用的非线性算法, 能在背景噪声较高的情况下, 提高信噪比, 从而检测出动作电位. 而相邻电极上的神经元活动的关系则通过对动作电位串的自相关和互相关进行分析获得. 通常从时程上可加以区分的相关性模式, 提示了这些神经元之间可能存在多种不同的回路^[10]. 根据同步化放电的定义^[18], 精确的同步化放电提示了两个神经元可能从同一个神经元接收兴奋性输入. 而正或负的延迟则说明了一个细胞可以兴奋另一个细胞, 如突触后细胞的放电往往略后于突触前细胞的放电. 尽管对视网膜同步化放电所代表的具体功能意义还不很清楚, 但是从上面的结果很易让人推测神经元之间的相互协调和相互综合在视觉信息处理过程中起着相当大的作用.

本研究也考察了神经元组间的多种相关性模式, 而同组神经元之间的相关性在不同的刺激条件下具有不同的特性, 例如第 65 与 54 道上的神经元活动在自发放电活动的情况下相互独立, 但在白色全域闪光刺激条件下却高度相关, 这些结果进一步说明了神经节细胞群体编码的即时调控性.

总的来说, 由多电极记录得到的反应特性和数据分析结果说明了有关刺激特性的编码很难从单个神经节细胞活动中获得, 同时, 对相邻神经元之间相关性的分析则能给出较多有关神经元在不同条件下的活动信息. 本文意在探究神经节细胞群体对刺激编码的动态性, 而我们则期待这项新的多电极技术能推动视网膜神经节细胞对其他简单刺激以及对自然刺激的编码机制的深入探究.

参 考 文 献

- 1 Warland D K, Reinagel P, Meister M. Decoding visual information from a population of retinal ganglion cells. *J Neurophysiol*, 1997, 78 (5): 2336~2350

- 2 Dacey D M. Circuitry for color coding in the primate retina. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 582~588
- 3 Kuffler S W. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol*, 1953, 16: 37~68
- 4 Nirenberg S, Latham P E. Population coding in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, 1998, 8: 488~493
- 5 Meister M. Multineuronal codes in retinal signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (2): 609~614
- 6 Meister M, Berry M J. The neural code of the retina. *Neuron*, 1999, 22 (3): 435~450
- 7 Meister M, Lagnado L, Baylor D A. Concerted signaling by retinal ganglion cells. *Science*, 1995, 270 (5239): 1207~1210
- 8 Meister M, Pine J, Baylor D A. Multi-neuronal signals from the retina: acquisition and analysis. *J Neurosci Methods*, 1994, 51 (1): 95~106
- 9 Meister M, Wong R O L, Baylor D A, et al. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science*, 1991, 252 (5008): 938~939
- 10 Mastrorarde D N. Correlated firing of retinal ganglion cells. *TINS*, 1989, 12 (2): 75~79
- 11 Neuenschwander S, Singer W. Long-range synchronization of oscillatory light responses in geniculate nucleus. *Nature*, 1996, 379: 728~733
- 12 Hämmerle H, Ebert U, Mohr A, et al. Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays. *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, 9: 691~696
- 13 Nisch W, Böck J, Ebert U, et al. A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity *in vitro*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, 9: 737~741
- 14 Ebert U, Schlosshauer B, Fennrich S, et al. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multi-electrode arrays. *Brain Res*, 1998, 2: 229~242
- 15 Thiébaud P, Beuret C, Koudelka-Hep M, et al. An array of Pt-tip microelectrodes for extracellular monitoring of activity of brain slices. *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, 14: 61~65
- 16 Kim K H, Kim S J. Neural spike sorting under nearly 0 dB signal-to-noise using nonlinear energy operator and artificial neural network classifier. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2000, 47: 1406~1411
- 17 Brivanlou I H, Warland D K, Meister M. Mechanisms of concerted firing among retinal ganglion cells. *Neuron*, 1998, 20 (3): 527~539
- 18 Usrey W M, Reid R C. Synchronous activity in the visual system. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61: 435~456