

听觉电生理实时分析系统及其在大鼠下丘 信息编码研究中的应用

冯 蕾, 武小静, 乔志梅, 高上凯, 洪 波

(清华大学医学院生物医学工程系, 北京 100084)

摘要: 基于 TDT 神经电生理软硬件平台和 Matlab 软件环境, 开发了专用于听觉电生理研究的实时分析软件。通过对神经元胞外记录信号的在线处理和分析, 可以在实验过程中得到刺激后放电活动时间直方图、平均发放率、首次发放潜伏期等定量分析结果, 以及刺激参数变化时神经元发放率的变化曲线, 如发放率 - 刺激强度曲线等。此分析软件被用于大鼠下丘神经元听觉信息编码的研究中, 观察到下丘神经元对于纯音和噪声刺激不同的时间响应模式, 以及神经元发放率和首次发放潜伏期对声音刺激强度的编码。

关键词: 听觉电生理; 实时分析; 下丘; 大鼠

中图分类号: Q424; Q959.837

0 引 言

听觉是感觉的重要组成部分。研究声音在听觉通路各级的编码与整合, 及最终转换成有意义的听觉感知的神经机理, 是系统神经科学的重要内容之一。这一层次的研究目前主要是用微电极记录听觉通路上单个神经元或者神经元群体的胞外电活动^[1-5], 通过分析特定刺激条件下神经元的放电行为, 来解析神经系统如何进行听觉信息的编码和感知表达。

听觉电生理实验具有一定的特殊性: 针对研究目的寻找到对设定刺激有响应的神经元是整个实验的基础。因此, 对神经元基本生理特性的实时分析和判断十分重要, 包括最佳频率 (best frequency, BF)、首次发放潜伏期 (first spike latency, FSL)、刺激后放电活动时间直方图 (post-stimulus time histogram, PSTH) 等。TDT (Tucker-Davis Technologies, FL, USA) 听觉工作站的应用越来越广泛, 与其它系统相比, 具有较大的灵活性和可扩展性, 但是其提供的实时分析软件在功能上有局限。用户根据自身实验设计需要扩展新功能时, 就要了解其特殊的系统设计和编程平台, 自行设计程序, 这给实验系统的建立带来了难度。本研究在 TDT System 3 听觉工作站基础上, 利用 ActiveX 控件, 结合 Matlab 的数据处理功能和图形用户界面 GUI, 建立了一个用于听觉电生理研究的实时分析软件系统。该系统可以在实验中实时读取 TDT 记录到的

神经元放电信号和刺激参数信息, 并给出基本的分析结果, 为听觉电生理实验提供了一种方便和量化的工程评测手段, 可以帮助实验者更有效率地寻找对特定刺激有响应的神经元。由于该软件是基于 Matlab 环境开发的, 与专用数据分析软件相比, 具有更强的通用性和可扩展性。通过大鼠下丘听觉电生理实验的多次检验, 该系统工作稳定, 操作简单, 可以实时给出听觉神经元基本生理特性的定量分析结果, 为实验数据的进一步分析和实验方案的改进提供了便利的参考信息。

下丘是听觉通路中的重要整合中枢^[6], 它接受所有低级核团 (上橄榄核, 下橄榄核, 耳蜗核) 的上行输入, 并且接受来自听觉初级皮层的下行调控。以往的研究结果表明, 下丘神经元参与了很多复杂的听觉功能, 比如声音的定位^[7]、噪声环境中声音的检测^[8]、声音其它基本特征的编码^[9]、感觉信息的整合^[10], 甚至防御反应等^[11,12]。本研究的目标就是在已经建立的大鼠听觉研究模型基础上, 利用实时分析软件系统, 对下丘神经元的反应特性进行实时定量分析。

收稿日期: 2007-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (60675029)

通讯作者: 洪波, 电话: (010)62795985, 传真: (010)62792995

E-mail: hongbo@tsinghua.edu.cn

1 实验方法

1.1 基于 TDT 和 Matlab 的系统设计与实现

本系统的硬件主要基于 TDT System 3 平台。该平台通过 DSP 硬件模块实现了数字信号的在线处理,包括放大、模数转换、滤波,以及神经元的分类 (spike sorting)。纯音 (pure tone) 序列,噪声 (noise) 序列,正弦幅值调制信号 (sinusoidally amplitude modulated stimuli, SAM) 等各种声音刺激信号由 TDT RP2.1 硬件模块产生;刺激参数由我们开发的 Matlab 程序控制。刺激信号由扬声器驱动模块 (TDT-ED1) 驱动的静电扬声器 (TDT-ES1) 发出。采集到的神经元放电信号经前置放大器 (TDT-RP16RA) 放大,并进行模数转换后,通过光纤输入高速数字处理器 (TDT-RX5)。经过硬件滤波 (300 Hz~4 kHz) 后的原始波形和硬件分类后的动作电位的时间点 (time stamps) 通过高速数据接口输入电脑,贮存在专门的数据栈

TTank 中。

OpenEx 是 TDT 提供的软件环境,其优势在于为用户提供了一个把专用系统 (Turn-Key) 和定制系统 (Customer) 结合起来的软件平台。另外,我们注意到 Matlab 是大多数实验室后期离线处理数据时选用的工具。因此我们在 OpenEx 的基础上,结合 Matlab,实现了一个面向用户的实时数据分析软件系统。这一系统避免了数据格式转换和系统兼容性的问题。最重要的是,该系统可以在实验的过程中即时完成数据的初步分析。

我们的软件系统以 OpenEx 软件组件的客户端/服务器 (Client/Server) 通路及其提供的 ActiveX 控件为基础开发。TDT 系统记录的数据储存在 PC 机上的数据栈 TTank 里。数据栈 TTank 是一个数据库服务器,用户可以通过不同的客户端访问数据,包括 TDT 提供的配套软件如 OpenScope、OpenBrowser、OpenExplorer,或其他编程语言的客户端如 VC++、VB、Matlab (图 1)。这些编程语言与 TDT 数据栈的通讯是通过 ActiveX 控件实现的。

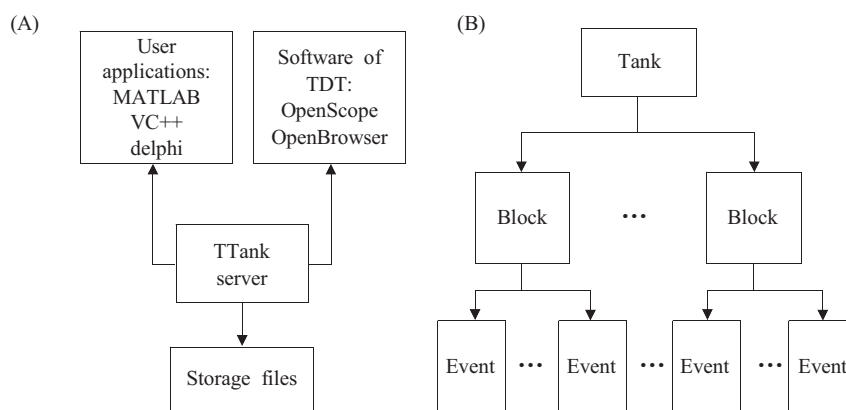


Fig.1 Diagram of data access. (A) The Client/Server approach of OpenEx. TTank is a database server which can store and provide data to many applications in real-time during an experiment or offline for post-hoc analysis of data. (B) Format of data stored in TTank server. Tanks are used to determine where data will be stored during an experiment; data of each session are stored in blocks; in which different types of data can be classified as different events

我们的软件正是通过 TDT 提供的一系列 ActiveX 控件的接口,实现了输出输入双向的通讯功能:一是由 Matlab 控制 TDT RP2.1 硬件模块产生声音刺激的参数,包括刺激持续时间 (duration)、刺激频率 (frequency),以及刺激幅度 (intensity);二是在 Matlab 中直接从数据栈 TTank 中读取数据,包括原始波形、动作电位时间点、刺激

时间点等,并在 Matlab 中给出神经元响应的初步分析结果。

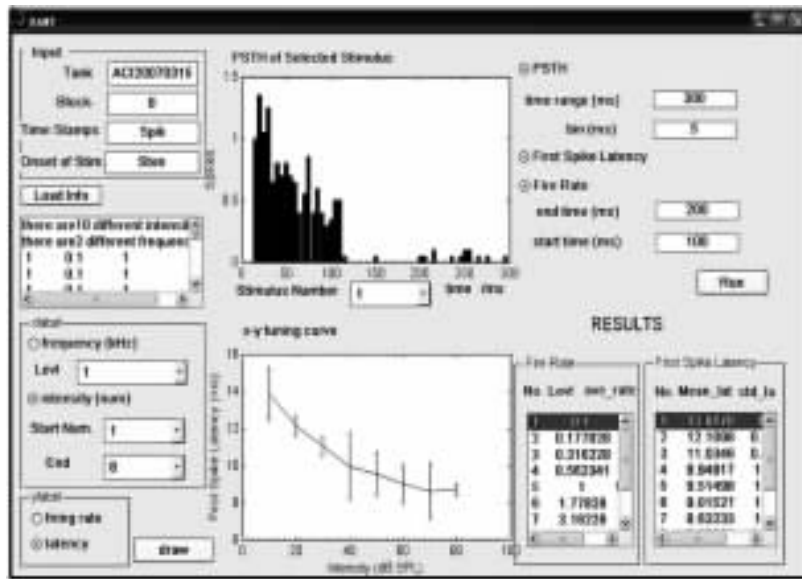
Matlab 除了具备强大而灵活的数据运算能力,还提供图形用户界面 (GUI) 工具,用于数据处理结果的交互显示。本系统软件的用户界面就是在 Matlab GUI 开发环境中实现的 (图 2A)。用户只需输入分析的对象,包括本次实验数据栈的文件

名、特定数据段的编号, 以及所存储数据的标注名称, 选择需要的分析手段, 提供详细的参数信息, 如时间窗的大小、计算发放率的时间范围等, 就直接可以得到相应的分析结果。分析结果有数字和曲线两种表示方式, 直观且便于进一步分析。

在结构设计上, 我们充分考虑了软件的可扩展性, 主要体现在两个方面: 一是利用了 Matlab 提供的 GUI 工具, 能够生成高效和易维护的用户界面, 用户可以根据实际的实验要求, 在此软件的结

构基础上, 自由地修改各种控件的属性, 或是增加新的功能; 二是通过编写 Matlab 的脚本文件, 用标准化的函数来实现对数据的所有操作和处理, 包括从数据栈服务器里读取数据, 以及计算 PSTH、平均发放率和首次发放潜伏期等 (图 2B)。通过使用模块化的函数, 使得软件易于修改和编辑, 并且所有的标准函数都可以在 Matlab 里独立于 GUI 使用。

(A)



(B)

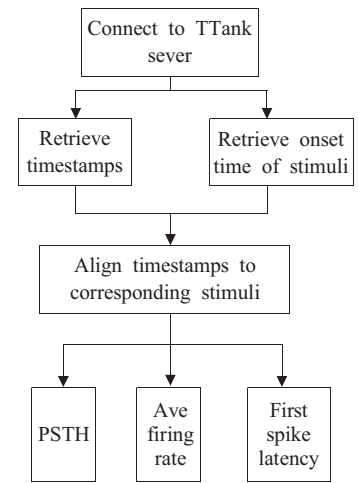


Fig.2 Real-time auditory neurophysiology toolbox. (A) The GUI of the toolbox based on ActiveX and Matlab. As shown in the figure, the user only need to input the name of the tank, the block number and the event names of recorded data. The PSTH and tuning curves of the average first spike latency or average firing rate versus variable parameters can be calculated. Time range and bin width can be set freely. (B) Functions used in the toolbox and the flowchart of data analysis. All these functions are standard script M-files, which can be modified in Matlab and be used separately by other applications in Matlab

1.2 动物手术与胞外电生理记录

实验选用大鼠作为下丘听觉研究的动物模型, 主要因为大鼠已经在视觉、本体感觉、学习记忆等系统神经科学研究中广泛应用, 相应的神经元胞外记录技术较为成熟, 听觉通路的解剖与生理也较为清晰^[6]。

实验共用 15 只健康、听力正常的 SD 雄性大鼠 (北京大学医学部实验动物中心提供), 体重 250~300 g。手术前用 20% 乌拉坦 (Urethane) 腹腔注射麻醉 (6 ml/kg), 记录过程中通过大鼠的呼吸和眨眼反射来监测麻醉状态。腹腔注射阿托品 (0.8 mg/kg), 气管切开插管防止呼吸道堵塞。将大鼠固定在立体定位仪上, 暴露颅骨, 除去表面肌

肉和结缔组织, 用 502 强力胶将一根 10 cm 长的平头铁钉固定在头顶颅骨上, 用牙科水泥 (磷酸锌水门汀) 加固。根据大鼠脑图谱, 用颅钻在一侧人字缝上、距离矢状缝 2 mm 处打一个直径 2 mm 的孔, 暴露硬脑膜。

胞外电生理记录在消音室 (Anechoic Chamber) 中进行。大鼠固定在自制的头部固定仪上, 使双耳处于自然畅通状态。静电扬声器固定于大鼠口眼平面, 在电极记录位置的对侧, 距两耳连线中点 30 cm 处。钨丝电极 (A-M Systems, 阻抗 3~5 M Ω) 由微推进器驱动垂直穿过硬脑膜进入下丘, 搜寻深度为 2.00~5.50 mm, 根据神经元对刺激响应特性判断深度定位是否合适。

实验中使用的声音刺激包括短纯音和短噪声两种。声音刺激持续时间为 100~500 ms, 刺激速率为每秒 1 次, 上升与下降时间为 5 ms。纯音刺激的频率范围为 2~24 kHz, 间隔 1 kHz。声音强度范围为 10~80 dB SPL, 间隔 10 dB。

2 结果与分析

我们在实验中共记录到 47 个下丘神经元, 并通过前述的 Matlab 实时分析软件对记录到的神经元的响应 (图 3) 进行了有关刺激后放电活动时间直方图、平均发放率、首次发放潜伏期等初步分析。

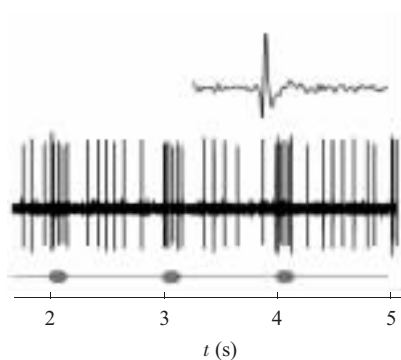


Fig.3 An example of the raw waveform we recorded. The marks below the waveform represented the durations of sound stimuli. Our recorded data usually had a signal to noise ratio up to 7:1 or larger

2.1 刺激后放电活动时间直方图 (PSTH)

神经元对刺激的响应, 可以通过施加刺激后其电发放活动的改变来评价, 其中放电频率的改变是一个重要特征。在实验过程中, 可以通过点阵图 (Raster Plot) 直观观察到刺激对神经元活动的变化情况, 包括神经元的响应与刺激的时间锁定、刺激诱发的神经元发放的增加或者减少等。但是点阵图的不足之处是缺少定量的标准; 而刺激后放电活动时间直方图除了可以直观地反映出神经元在声音刺激作用下放电活动的改变, 还可以定量地衡量各种变化, 包括发放率被增加的程度, 或被抑制的时间长短等。

在我们的软件中可以生成由相同刺激重复多次组成的序列, 记录整个刺激序列中神经元的发放, 并在 Matlab 中统计每次刺激后顺序时间片段 (5 ms) 内的发放个数, 得到相应的刺激后放电活动时间直方图 (图 4)。图 4 显示了记录到的 4 个

神经元在刺激期间 (A、C: 0~500 ms; B、D: 0~100 ms) 及刺激结束后的神经元发放模式。直方图的不同形状体现出神经元不同的时间响应模式, 而时间响应模式是兴奋性传入和抑制性传入综合作用的结果, 反映的是该神经元邻近的整个神经网络响应刺激的综合效果。例如, 有些神经元 (图 4B) 在刺激下先接受兴奋传入, 并表现为发放率显著增加, 随后立刻接受到抑制性传入, 表现为发放的减少。

2.2 发放率函数 (rate function)

根据传统的发放率编码 (rate coding) 理论, 神经元在刺激条件下, 在单位时间窗内放电数的改变可以反映刺激参数的变化。

我们的实验中使用各种变化参数的标准化刺激序列, 例如刺激强度逐渐增加的短噪声序列, 固定频率、刺激强度逐渐增加的短纯音刺激序列, 或者固定某一刺激强度、频率逐渐递增的短纯音刺激序列。分析软件可自动读取刺激参数和时间点, 以及神经发放时间点, 并计算在每次刺激下, 神经元在刺激后某一特定的时间窗内的发放个数 (此时间窗可由用户设定)。同时, 软件可以根据刺激参数自动叠加相同刺激参数下的发放个数, 给出特定刺激参数下的平均发放率 (每秒内发放个数), 最后得到平均发放率随刺激参数变化的曲线。以噪声刺激为例, 我们设定噪声刺激序列的强度从 10 dB SPL 增加到 80 dB SPL, 以 10 dB 为间隔, 且每种强度的刺激重复 15 次, 则此刺激序列总共包括 120 个刺激。刺激速率为每秒 1 次, 刺激持续时间为 100 ms。分析软件自动检测刺激强度的变化, 并且叠加在同一刺激强度的 15 次刺激下、每次刺激起始后 150 ms 内的神经元的发放个数, 计算对应于每一个刺激强度的神经元平均发放率, 进而可以画出平均发放率随刺激强度变化曲线 (rate-intensity function, RIF)。通过发放率 - 刺激强度曲线 (图 5) 可以看出此神经元通过发放率编码噪声刺激强度, 随着刺激强度的增加, 发放率相应增加。

神经元发放率还与声音频率^[2]以及声源距双耳的位置^[3]等参数相关。在相同的刺激强度下, 对应于下丘神经元最大发放率的刺激频率为该神经元的最佳频率 (best frequency, BF); 类似的, 对应于最大发放率的声源位置为其最佳方位角 (best azimuth, BA)。因此, 实时给出与刺激参数相关的神经元发放率曲线, 能够为分析神经元对刺激的编码提供定量的参考。

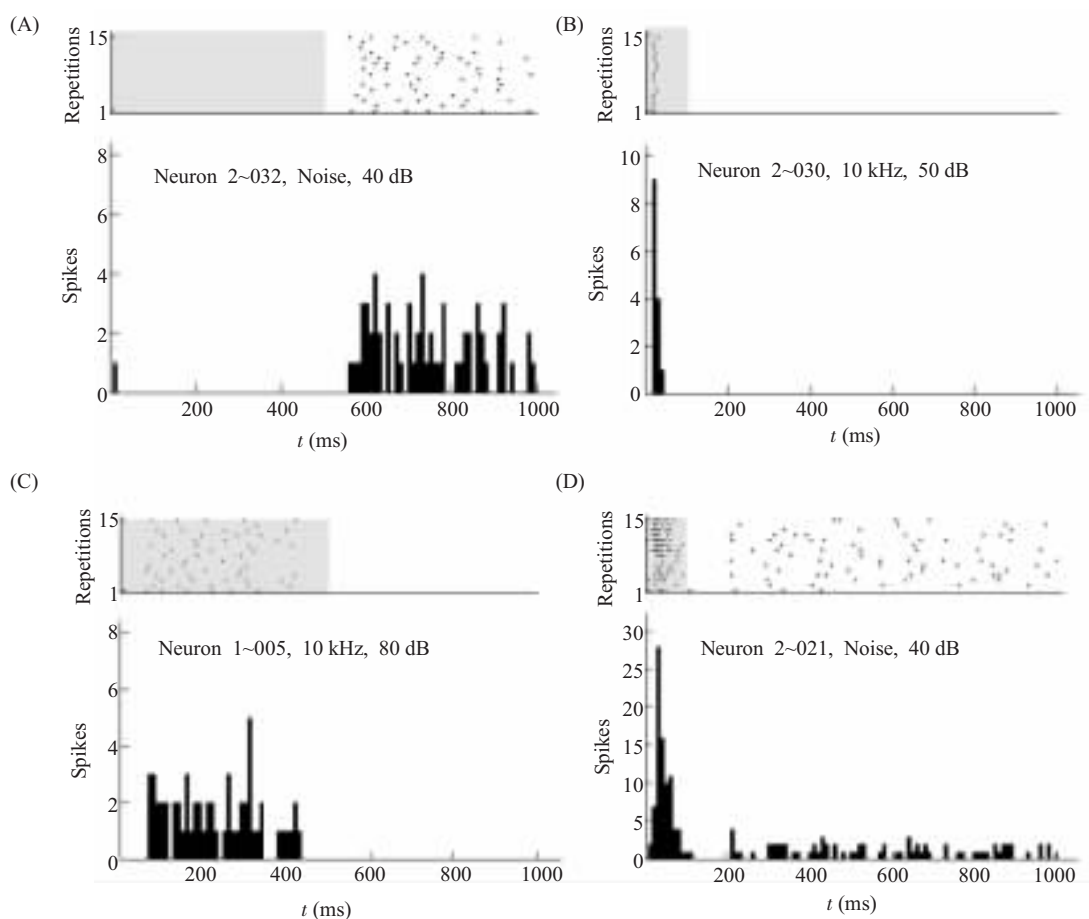


Fig.4 Examples of temporal response patterns. Stimuli were presented once a second with a duration of 500 ms (A, C) or 100 ms (B, D). Each raster plot above the PSTH revealed a neuron's responses to 15 repetitive stimuli (Each line was a trial while each dot represented a spike). The shadow area represent the duration of the stimulus. (A) Spontaneous activities of this neuron were inhibited during stimulus representation. (B) This unit fired once after each stimulus. (C) The discharge of this neuron was evident throughout the duration of the stimulus. (D) The activity of this unit was increased in the stimulus duration, and then inhibited after stimulus

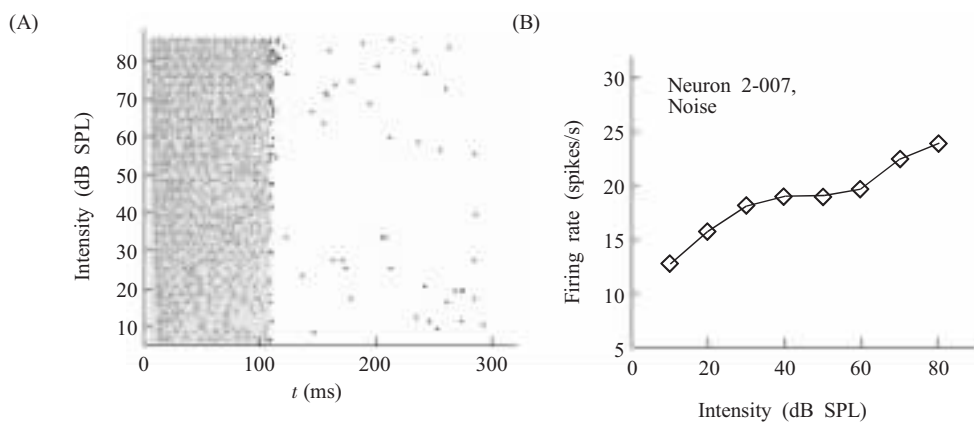


Fig.5 Rate-intensity function. (A) The raster plot of the neuron's responses to noise with intensity increment. As shown in the raster plot, firing rate was increased and first spike latency was decreased in response to higher intensity stimuli. (B) Rate-intensity function of neuron 007 responding to noise. The firing rate increased monotonically with intensity increment

2.3 首次发放潜伏期 (FSL)

首次发放潜伏期通常定义为神经元第一次发放的时间与刺激起始时间的间隔。神经元被声音刺激诱发的第一次发放的时间由很多因素决定。近年来的听觉研究中,神经元的响应时间引起了研究者的很大关注^[3]。单个神经发放的响应时间通常能够精确到毫秒量级,比平均发放率包含更多的信息。听觉通路中大多数神经元的首次发放在时间上与声音的起始精确锁定,这种起始响应能够很敏锐地反映声音的动态变化,包括幅值(amplitude)、上升时间(rise time)等。此外,神经元对于特定刺激的首次发放潜伏期还与刺激的背景和历史有关,如,同时发生的其他刺激、该刺激前神经元的活动状态等。首次响应时间中包含了丰富的信息,是听觉神经放电数据分析中一个很重要的部分。

从图5中的点阵图可以看到,当刺激强度增大时,神经元首次发放的潜伏期显著缩短。利用我们的软件,可以根据神经元发放时间点和刺激起始时间点,将神经元的发放与其响应的刺激对应,并且计算在特定强度短噪声的重复刺激下,该神经元的首次发放潜伏期的均值和方差,实时给出首次发放潜伏期随刺激特征变化的曲线(图6),给实验者一个更为直观和定量的分析结果。从图6可以看到,该神经元的首次发放潜伏期随刺激强度的增加而单调下降。已经有其它文献证明此现象的存在^[4]。除此之外,还可以设定频率变化的纯音刺激序列,观察首次发放时间与频率的相关性;用户也可以根据自身的需要,设定针对其他参数变化的刺激序列。

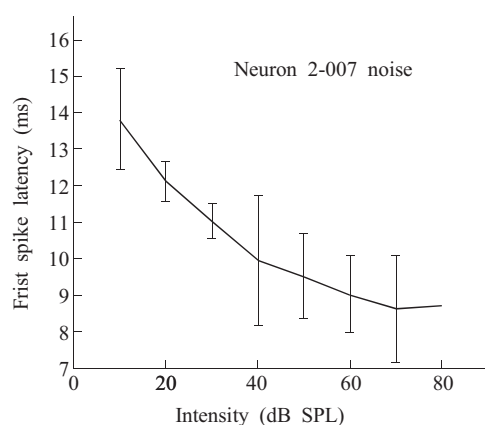


Fig.6 Tuning curve of first spike latency. First spike latency decreased with the increment of stimulus intensity

3 结论与讨论

日新月异的信息技术为听觉电生理研究提供了丰富的工具和方法。TDT 听觉电生理 workstation 在国内外的研究中应用越来越广泛。我们的听觉电生理实时分析软件实现了 TDT 系统与数学工具 Matlab 软件的结合,提供了一种快速有效的数据分析手段。此软件被用于研究大鼠下丘神经元对声音刺激响应的生理特性的实验中,实验表明该软件能够帮助实验者更有效地发现和甄别听觉神经元的信息编码特性。特别是针对实验中刺激参数变化的序列,我们利用 Matlab 强大的计算和逻辑功能,实现了对刺激参数影响神经元电活动的实时和定量的评价。

我们利用钨丝电极对大鼠下丘神经元对纯音和噪声刺激的响应进行胞外记录,并通过对记录信号的处理和分析,获得了下丘神经元的刺激后放电活动时间直方图、平均发放率、首次发放潜伏期等信息的定量分析结果。我们的初步实验结果表明,下丘神经元具有不同的时间响应模式,反映了不同神经元在信息整合中不同的功能;对于记录到的一类神经元,刺激强度增加会使得神经元的发放率提高,首次发放潜伏期缩短。

总之,本文完成的基于 Matlab 和 TDT 平台的听觉电生理实时分析软件,能够在实验过程中及时提供定量的神经元放电特征信息,提高神经电生理实验的效率,并为后期的深入数据分析提供参考。此外,该软件系统模块化的设计和标准的数据通讯接口,使得所有 TDT 的用户都可以根据自身的实验要求,添加其他更为复杂的分析功能。我们实验室已经在此基础上,开发了基于主成分分析方法的实时神经元分类工具箱。(本文开发的软件程序可以从 <http://neuro.med.tsinghua.edu.cn> 的 download 栏目下载)。

参考文献:

- [1] 吴飞健,刘双喜,陈其才, Bibikov NG. 刺激呈现率影响小鼠下丘神经元声反应特征. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2005,39(4):525~529
- [2] Palombi PS, Caspary DM. Physiology of the young adult Fischer 344 rat inferior colliculus: Responses to contralateral monaural stimuli. *Hearing Research*, 1996,100(1-2):41~58
- [3] 沈钧贤,陈其才. 大棕蝠听皮层神经元的双耳性及其方位角调谐特征. *科学通报*, 2002,27(4):285~288

- [4] Dean I, Harper NS, McAlpine D. Neural population coding of sound level adapts to stimulus statistics. *Nature Neuroscience*, 2005,8(12):1684~1689
- [5] Rees A, Sarbaz A, Malmierca MS, Le Beau Fiona EN. Regularity of firing of neurons in the inferior colliculus. *J Neurophysiol*, 1997,77(6):2945~2965
- [6] Malmierca MS. The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. *International Review of Neurobiology*, 2003,56:147~211
- [7] Aitkin LM, Martin RL. The representation of stimulus azimuth by high best-frequency azimuth-selective neurons in the central nucleus of the inferior colliculus of the cat. *J Neurophysiol*, 1987,57(4):1185~1200
- [8] Adrian R, Alan RP. Rate-intensity functions and their modification by broadband noise for neurons in the guinea pig inferior colliculus. *J Acoust Soc Am*, 1988, 1488~1498
- [9] Casseday JH, Ehrlich D, Covey E. Neural tuning for sound duration-role of inhibitory mechanisms in the inferior colliculus. *Science*, 1994,264(5160):847~850
- [10] Aitkin L, Tran L, Syka J. The responses of neurons in subdivisions of the inferior colliculus of cats to tonal, noise and vocal stimuli. *Experimental Brain Research*, 1994,98 (1): 53~64
- [11] Brandao ML, Melo LL, Cardoso SH. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, 1993, 58(1-2):49~55
- [12] Cardoso SH, Coimbra NC, Brandao ML. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, 1994, 63(1):17~24
- [13] Heil P. First-spike latency of auditory neurons revisited. *Current Opinion in Neurobiology*, 2004,14(4):461~467
- [14] Ryan A, Miller J. Single unit responses in the inferior colliculus of the awake and performing rhesus monkey. *Experimental Brain Research*, 1978,32(3):389~407

A REAL-TIME AUDITORY NEUROPHYSIOLOGY TOOLBOX AND ITS APPLICATION IN THE STUDY OF INFORMATION ENCODING IN RAT INFERIOR COLLICULUS

FENG Lei, WU Xiao-jing, QIAO Zhi-mei, GAO Shang-kai, HONG Bo
(Department of Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A real-time auditory neurophysiology toolbox was developed based on the TDT workstation and Matlab software. This toolbox was a user-customizable application designed for access of the TDT data tank and implementing fundamental analysis of neuronal data from extracellular recording, including post-stimulus time histogram, average firing rate, first spike latency, and tuning curve of auditory neuron's response to different stimuli with changing parameters during the experiment. The user interface of the toolbox was developed with GUI of Matlab, which was flexible to add new modules or to modify old ones. Besides, all functions used in the toolbox were standard script M-files which could be edited in Matlab and could be used separately by other applications in Matlab. SD rat was chosen as the animal model of inferior colliculus (IC) neurophysiology, in which the function of aforementioned real-time toolbox was tested. Preliminary experimental results revealed different temporal response patterns of IC neurons and indicated that the intensity of stimuli could be encoded by the firing rate and first spike latency.

Key Words: Auditory neurophysiology; Real-time analysis; Inferior colliculus; Rat

This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (60675029)

Received: Apr 25, 2007

Corresponding author: HONG Bo, Tel: +86(10)62795985, Fax: +86(10)62792995, E-mail: hongbo@tsinghua.edu.cn