

# 基于微电极阵列的离体嗅球振荡信号识别

陈庆梅<sup>①②</sup>, 董琪<sup>①</sup>, 胡靓<sup>①</sup>, 凌树才<sup>③</sup>, 尹一飞<sup>③</sup>, 刘清君<sup>①</sup>, 王平<sup>①\*</sup>

① 生物传感器国家专业实验室, 生物医学工程教育部重点实验室, 浙江大学生物医学工程系, 杭州 310027;

② 江西中医药学院医疗电子学科组, 南昌 330006;

③ 浙江大学医学院人体解剖与细胞生物学系, 杭州 310058

\* 联系人, E-mail: cnpwang@zju.edu.cn

2012-07-01 收稿, 2012-10-07 接受, 2013-06-06 网络版发表

国家自然科学基金(81027003)和教育部博士点基金(20120101130011)资助

**摘要** 为了研究嗅球各层的电生理特征, 利用离体的嗅球切片与微电极阵列的耦合实现嗅球不同位置神经元自发响应的同步检测。结果显示, 在嗅球切片的不同层具有不同频率的振荡, 而 $\gamma$ 频率的振荡主要出现在突触小球层。此外, 信号包含负相、正相和双相的锋电位, 并且分布在嗅球不同层。这些结果表明, 利用嗅球切片与微电极阵列的结合实现多点同步测量, 对信号振荡的识别是非常有用的, 这对进一步研究嗅觉信息的编码和处理功能具有重要的意义。

## 关键词

嗅球切片

体外信号振荡

识别

微电极阵列

神经元网络活动的快速振荡被认为是感觉<sup>[1]</sup>、运动<sup>[2]</sup>和感知<sup>[3]</sup>等大脑区域信息处理过程中的重要特征。在嗅球的电生理研究中也观察到不同频率的振荡信号, 主要包括 $\theta$ <sup>[4,5]</sup>,  $\alpha$ <sup>[6]</sup>,  $\beta$ <sup>[6]</sup>和 $\gamma$ <sup>[7~10]</sup>4 种节律波。研究者通过功率谱密度计算分析了嗅球神经元响应的频率分布以及它们在嗅觉信息处理中的作用<sup>[7,9,10]</sup>。其中, 快速的 $\gamma$ 频率振荡被广泛地认为在气味识别中起着关键作用<sup>[9]</sup>; 而 $\theta$ 节律则被看作是呼吸的节律<sup>[5]</sup>, 或被认为是嗅觉系统突触输入在时间上重构的一种表现<sup>[4]</sup>。然而, 关于“嗅球中到底存在多少种频率的振荡信号”、“这些振荡信号是否有规律地出现在嗅球的不同层”的问题目前还没有统一的定论。

本研究利用微电极阵列(microelectrode array, MEA)对嗅球切片的自发信号进行记录, 实现了多点信号的同步采集, 进而分析嗅球不同层的信号振荡特征。

## 1 实验与方法

(i) 切片准备。本实验采用 Wistar 大鼠, 约 3 周龄, 雌雄不限, 由浙江省医学科学院提供。取大鼠称重后用 20% 的乌拉糖(7 mL/kg)进行腹腔注射麻醉,

斩首取脑并置于冰水混合态的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中, 迅速剥离出连接大脑的完整嗅球, 将其置于通氧的 ACSF(冰水混合态)中。5 min 后快速分离嗅球, 取出其中半个嗅球经过简单处理后放入振动切片机(Vibratome 1000 Plus, Vibratome Company, USA)中切片。切片过程中必须保证嗅球组织淹没在不断通氧的 ACSF(冰水混合态)中。切片沿水平方向, 厚度约 300  $\mu\text{m}$ , 整个过程大约在 10 min 内完成。每完成一次切片, 迅速用吸管将切片转移至恒温孵育系统内孵育, 约 60 min 后进行嗅球切片自发电位的检测。

实验用氧为 95%  $\text{O}_2$  与 5%  $\text{CO}_2$  的混合气体; ACSF 的成分详见文献[11]。为了获得清晰的嗅球切片层次, 实验结束后对嗅球切片进行尼氏(Nissl)染色处理。

(ii) 信号采集与处理。如图 1(a)所示, 将嗅球切片与 MEA 耦合, 构建一种生物-电子传感系统, 可以实现控制电路与生物系统之间的双向通讯。这种生物传感器以嗅球切片为敏感元, 以 MEA 为二级元件, 因而可以对嗅球内多点的电生理活动进行同步监测。图 1(b)为信号测试系统框图。

**引用格式:** 陈庆梅, 董琪, 胡靓, 等. 基于微电极阵列的离体嗅球振荡信号识别. 科学通报, 2013, 58: 1851–1854

**英文版见:** Chen Q M, Dong Q, Hu L, et al. Discrimination of signal oscillations for the *in vitro* olfactory bulb with microelectrode array. Chin Sci Bull, 2013, 58, doi: 10.1007/s11434-013-5934-8

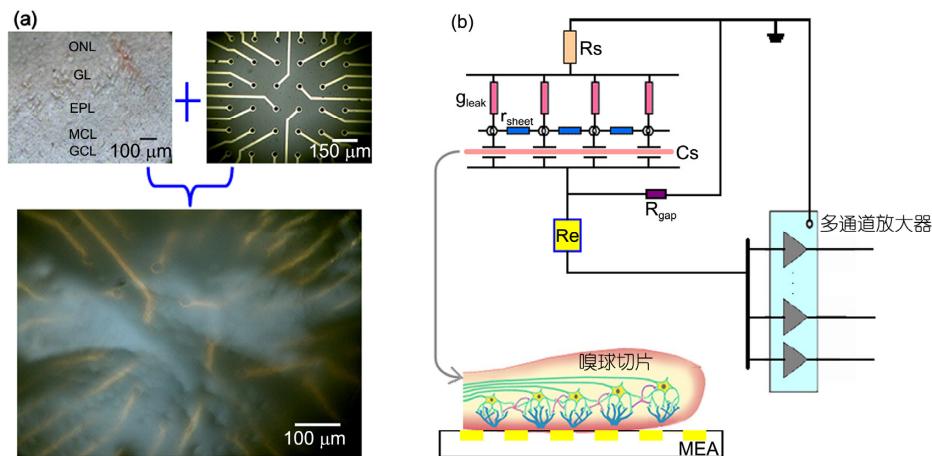


图1 基于嗅球切片传感器的构建(a)和信号测试系统框图(b)

为了减小因工频干扰带来的噪声，整个测试过程在屏蔽箱内进行。数据采集系统包含一个多通道放大器(MEDI6, Multichannel Systems, GmbH, 德国)，可以实现 16 通道的同步监测；同时还自带一个分析软件(MCRack)，可用于数据采集中的相关设置并可对数据进行简单地处理与分析。本实验的采样频率为 10 kHz。

为了考察嗅球不同层信号的振荡特点，本研究对实验记录的原始信号分 5 个频段进行滤波处理，分别为  $\delta$  波段：1~3 Hz； $\theta$  波段：4~7 Hz； $\alpha$  波段：8~13 Hz； $\beta$  波段：14~29 Hz 和  $\gamma$  波段：30~115 Hz。

## 2 结果

### 2.1 嗅球切片形态

在哺乳动物嗅球中，神经元按照一定的规律排列，使得嗅球呈现一种层状结构。一般认为嗅球包含以下 5 层：嗅觉神经层(the olfactory nerve layer, ONL)、突触小球层(glomerular layer, GL)、外丛层(external plexiform layer, EPL)、僧帽细胞层(mitral cell layer, MCL)和颗粒细胞层(granule cell layer, GCL)。图 2 是经过 Nissl 染色后得到的嗅球切片的显微照片，由此可以清晰地分辨嗅球的不同层次以及各层嗅球神经元的大致形态。

### 2.2 自发信号

利用图 1(b)所示的测试系统，通过多通道放大器可以同时获取多点的信息。图 3(a)为分别来自嗅球切

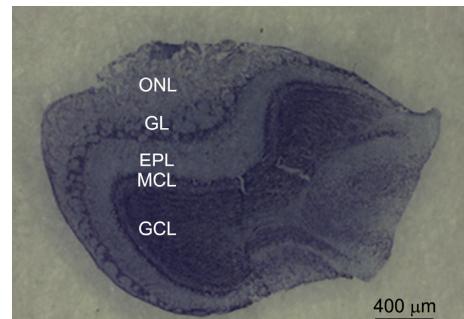


图2 Nissl 染色的嗅球切片

ONL, 嗅觉神经层; GL, 突触小球层; EPL, 外丛层; MCL, 僧帽细胞层; GCL, 颗粒细胞层

片 ONL, GL, EPL, MCL 和 GCL 各层神经元的自发响应。实验记录的嗅球神经元胞外电信号包括 3 种波形：正相锋电位、负相锋电位和双相锋电位。在 ONL 和 GL 层主要表现为负相锋电位；在 MCL 和 GCL 层主要是正相锋电位；而在 GL 与 EPL 的交汇处以及 EPL 层则主要表现为双相锋电位。这种锋电位极性分布的现象与膜片钳记录得到的结果相一致<sup>[12]</sup>。此外，在嗅球不同层记录的信号幅度和频率也不完全一致。信号的频率成分比较复杂，而信号幅度都比较小。在目前的实验中，记录的自发信号幅度最大在 200 μV 左右。

### 2.3 不同频段的滤波信号

为了区分嗅球切片不同层神经元信号的差异，实验记录的原始信号通过带通滤波获取信号的振荡特性。8 次的实验及滤波结果显示，同一层的神经元信号包含的频率成分比重虽然不完全相同，但是其

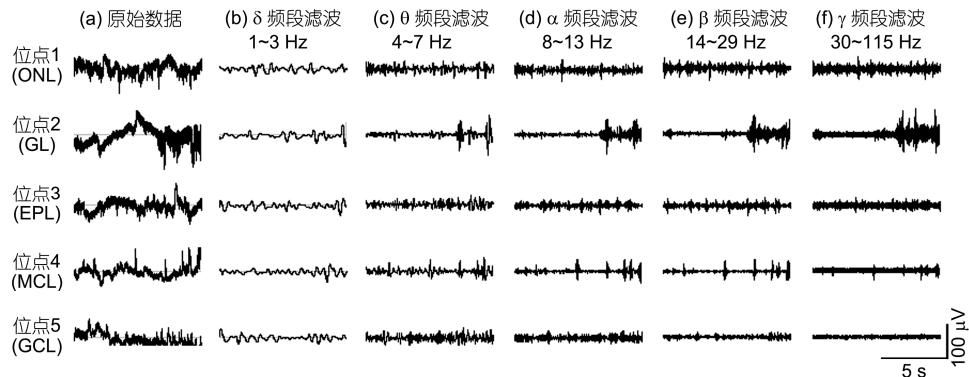


图 3 嗅球神经元的原始记录信号(a)及带通滤波信号(b)~(f)

信号分别来自嗅球切片的 ONL, GL, EPL, MCL 和 GCL 层; 带通滤波的频段分别是 1~3 Hz (b), 4~7 Hz (c), 8~13 Hz (d), 14~29 Hz (e) 和 30~115 Hz (f)

所包含的频率成分基本上是一致的。图 3(b)~(f) 分别是在  $\delta$  频段 (1~3 Hz),  $\theta$  频段 (4~7 Hz),  $\alpha$  频段 (8~13 Hz),  $\beta$  频段 (14~29 Hz) 和  $\gamma$  频段 (30~115 Hz) 对图 3(a) 中信号的带通滤波信号。由滤波的结果可知, 嗅球每一层的自发信号中  $\delta$  频率成分极少。在嗅球的 ONL 和 EPL 层, 信号频率成分比较复杂, 包含了几乎所有的频率成分, 但  $\delta$  频率和  $\gamma$  频率成分极少; 在 GL 层, 信号存在  $\alpha$ ,  $\beta$  和  $\gamma$  3 种节律的振荡, 其中  $\gamma$  节律的振荡占主导地位; MCL 层的信号频率成分与 ONL 和 EPL 层的相似, 但  $\alpha$  节律和  $\beta$  节律的振荡相对比较明显; 在 GCL 层, 主要是较低频的  $\theta$  波和  $\alpha$  波,  $\delta$  和  $\beta$  频率成分极少,  $\gamma$  频率的振荡几乎不存在。

### 3 讨论

实验结果显示, 嗅球 5 个不同层的信号具有不同的电生理特点, 包括幅度、频率和锋电位极性, 这表明利用 MEA 获取嗅球切片不同点神经元的电生理特征是非常有用的。研究普遍认为, 负相放电现象是离子内流引起去极化产生的结果<sup>[13]</sup>; 在具有层状结构的组织中可以记录到负相和正相两种锋电位, 分别代表电流的接收端和发射端<sup>[13~15]</sup>。因此, 根据本研究得到的锋电位极性的结果(图 3(a))和汇-源理论, 认

为 ONL 和 GL 可能是嗅球内部电流的接收端, 而 MCL 和 GCL 可能是电流发射端。也就是说, 在嗅球切片的内部, 信号的传播很可能从 ONL 和 GL 层经 EPL 层到达 MCL 和 GCL 层。

图 3(b)~(f) 显示, 嗅球切片不同层的信号包含不同的频率成分。在离体嗅球切片的所有层几乎都含有极少的  $\delta$ ,  $\theta$  和  $\alpha$  波, 推测这些频率的信号可能与嗅球各层特定的生理功能无关。在 GL 层信号表现出比较高频的振荡, 其中  $\gamma$  频率的振荡占主导地位。有研究认为,  $\gamma$  频率的振荡与气味的识别有关<sup>[9]</sup>, 由此可以推测, GL 层可能参与了气味的识别与处理功能。

目前的研究结果表明, 利用嗅球切片与 MEA 的结合可以构建一种用于神经元胞外电位检测的生物传感系统, 并且有利于获取和识别离体嗅球神经元信号的振荡和电生理特征, 这对进一步研究气味识别和嗅觉信息的译码机制具有重要的意义。然而, 目前的研究还比较初步, 未来还需要更多的实验和更加深入的研究。由于离体实验的胞外环境与在体的环境不完全相同, 因此, 本课题组正在进行相应的在体实验研究, 以期探明离体实验与在体实验的差异, 并希望通过两种研究方式获取的实验结果综合解释嗅觉信息的处理机制。

### 参考文献

- 1 Singer W, Gray C M. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 1995, 18: 555~586
- 2 Sanes J N, Donoghue J P. Oscillations in local field potentials of the primate motor cortex during voluntary movement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4470~4474
- 3 Fell J, Klaver P, Lehnertz K, et al. Human memory formation is accompanied by rhinal-hippocampal coupling and decoupling. *Nat Neurosci*, 2001, 4: 1259~1264

- 4 Margrie T W, Schaefer A T. Theta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system. *J Physiol*, 2003, 546: 363–374
- 5 Kay L M. Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3863–3868
- 6 Lam Y W, Cohen L B, Wachowiak M, et al. Odors elicit three different oscillations in the turtle olfactory bulb. *J Neurosci*, 2000, 20: 749–762
- 7 Friedman D, Strowbridge B W. Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J Neurophysiol*, 2003, 89: 2601–2610
- 8 Lagier S, Carleton A, Lledo P M. Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J Neurosci*, 2004, 24: 4382–4392
- 9 Beshe J, Kopell N, Kay L M. Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *J Neurosci*, 2007, 27: 8358–8365
- 10 Gire D H, Schoppa N E. Long-term enhancement of synchronized oscillations by adrenergic receptor activation in the olfactory bulb. *J Neurophysiol*, 2008, 99: 2021–2025
- 11 Chen Q, Xiao L, Liu Q, et al. An olfactory bulb slice-based biosensor for multi-site extracellular recording of neural networks. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 3313–3319
- 12 Aroniadou-Anderjaska V, Ennis M, Shipley M T. Current-source density analysis in the rat olfactory bulb: Laminar distribution of Kainate/AMPA- and NMDA-receptor-mediated currents. *J Neurophysiol*, 1999, 81: 15–28
- 13 Taube J S, Schwartzkroin P A. Mechanisms of long-term potentiation: A current-source density analysis. *J Neurosci*, 1988, 8: 1645–1655
- 14 Kulics A T, Caulier L J. Cerebral cortical somatosensory evoked responses, multiple unit activity and current source-densities: Their interrelationships and significance to somatic sensation as revealed by stimulation of the awake monkey's hand. *Exp Brain Res*, 1986, 62: 46–60
- 15 Aizenman C D, Kirkwood A, Bear M F. A current source density analysis of evoked responses in slices of adult rat visual cortex: Implications for the regulation of long-term potentiation. *Cereb Cortex*, 1996, 6: 751–758