

培养海马神经元网络学习模型的构建*

李艳玲 李向宁 周 炜 曾绍群 刘 曼 骆清铭**

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 华中科技大学生物医学工程系, 武汉 430074)

摘要 对于培养的神经网络而言, 学习是外界刺激与网络响应之间联系建立和调控的过程. 为构建合适的神经网络学习模型, 采用闭环低频(1 Hz)成对电极的电刺激模拟认知任务, 在多通道微电极阵列系统中对培养的海马神经网络进行训练, 使其发生网络层次上的学习行为. 经过训练后, 神经网络在刺激后 20~80 ms 内的早期突触后响应明显增加, 响应/刺激比(在闭环训练中, 电极上任一阶段连续 10 次刺激的早期突触后响应的个数/10)增大, 响应时延减小, 并且响应具有选择性, 即表明, 神经网络与外界刺激之间已建立可调控的联系, 该可调控联系是通过网络的响应来表现的, 建立神经网络与外界刺激之间的可调控联系即网络层次的学习.

关键词 海马, 神经网络, 学习模型, 低频电刺激, 微电极阵列

学科分类号 Q6

对于培养的神经网络而言, 学习是外界刺激与网络响应之间联系建立和调控的过程^[1~3]. 研究认为^[1~3], 重复施予一定频率的电刺激, 神经网络的突触后响应明显增加, 响应时延减小, 并且响应具有选择性, 即表明, 神经网络与外界刺激之间已经建立可调控的联系, 该可调控联系是通过神经网络的响应来表现的, 建立神经网络与外界刺激之间的可调控联系即网络层次的学习. 目前对学习的研究主要集中在行为水平、脑片水平和分子水平上, 基于网络层次的研究仍较少. 我们知道, 大脑是通过电信号携带和编码信息的, 同时, 神经元传递的信息必须经过整合才能最终实现学习、记忆等脑的高级功能, 而信息的整合是在网络层次完成的^[4]. 因而在网络层次建立神经元的学习模型对研究学习和记忆的机理非常必要.

多通道微电极阵列 (multi-electrode array, MEA) 具有对神经网络的电生理活动进行无损、实时、连续、长时程、多点记录和分析的优点. 本实验在 MEA 上通过闭环低频成对电极电刺激的方法, 对培养的大鼠海马神经网络进行训练, 使其发生网络层次的学习行为, 从而在网络层次上构建了海马神经元学习模型. 通过构建此学习模型, 能够从网络层次对神经元的电生理活动进行整体的观察与分析, 为揭示学习、记忆等脑的高级功能的机制提供了网络层次的研究平台, 为最终揭示神经元

携带、编码信息以及信息的整合机制提供了一个重要的方法.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

动物: Wistar 大鼠(由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供).

试剂: 胎牛血清(杭州四季青公司), 马血清(Hyclone 公司), DMEM 培养基(Gibco 公司), 谷氨酰胺(Gibco 公司), 胰蛋白酶(Gibco 公司), D-多聚赖氨酸(Sigma 公司).

仪器: 多通道微电极阵列系统(MCS GmbH 公司), 四通道刺激器(MCS GmbH 公司), 氟代乙烯丙烯聚合物膜(fluorinated ethylene-propylene film, FEP, Durafilm 公司), IX70 倒置显微镜(Olympus 公司), CCD(Princeton 公司).

1.2 神经元培养

取孕龄 18 天的 Wistar 大鼠, 用乙醚麻醉, 以

*国家自然科学基金资助项目(60478016), 教育部科学技术研究重大资助项目(重大 10420).

**通讯联系人. Tel: 027-87792033, Fax: 027-87792034

E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2006-07-08, 接受日期: 2006-09-28

75%的酒精消毒后剖腹取出胎鼠. 无菌条件下冰上操作, 快速断头取脑, 分离海马组织, 放入盛有 Hank's 缓冲液(Hank's buffer salt solution, HBSS)的培养皿中, 剔除血管和脑膜. 剪碎海马组织, 以 0.125%胰蛋白酶 37℃消化 10 min, 以接种液(其成分为 79% DMEM, 10%胎牛血清, 10%马血清, 1%谷氨酰胺)终止消化. 反复吹打消化后的组织使其成均匀的细胞悬液, 用接种液稀释至 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 细胞/ml, 接种于经 100 mg/L 的 D-多聚赖氨酸处理 30 min 的 MEA 培养皿中. 首先在电极区域及周边 2 mm² 的区域内接种 30 μ l 的细胞悬液, 30 min 后补加 1 ml 接种液, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养. 24 h 后完全弃去接种液, 换生长液(其成分为 89% DMEM, 10%马血清, 1%谷氨酰胺). 以后每 3 天更换一半生长液. 在 MEA 芯片上覆盖一层 FEP 膜, 能较好地维持培养液的渗透压和 pH 值, 以便长时间地观察与记录.

1.3 学习训练实验

首先, 对在 MEA 芯片上培养 2~6 周的海马神经网络进行自发锋电位(spikes)的检测, 通过 NEX 软件(Neuroexplorer)的互相关运算, 将相关程度最好的 2 个相邻电极定义为活性电极对. 对于选择的活性电极对同时给予 500 mV, 200 μ s, 1 Hz 的方波电压刺激, 以此作为学习训练方案, 随机选择 10 个其响应/刺激比(在闭环训练中, 电极上任一阶段连续 10 次刺激的早期突触后响应^[9]的个数/10)在学习训练之初 $\leq 1/10$ 的电极作为观测电极, 记录刺激后神经网络的响应, 当网络的响应达到要求(响应/刺激比 $\geq 2/10$), 即停止刺激. 这是一个刺激与神经网络之间形成可调控联系的闭环过程. 静息 10 min 后进行下一轮学习训练. 若给予刺激 10 min 神经网络的响应仍然达不到要求, 停止刺激, 静息 10 min 后进行下一轮学习训练. 每组训练循环由 8 次训练组成. 在训练循环中, 如果响应/刺激比增加、响应时延减小, 则表明经过训练后网络成功地进行了学习.

将训练成功的电极两两组合, 以其中一个电极作为参考电极, 另外一个作为观测电极, 同时记录刺激后神经网络的响应. 当参考电极上神经网络的响应没有达到要求(响应/刺激比 $< 2/10$), 而观测电极上的响应达到要求(响应/刺激比 $> 2/10$), 即表示神经网络的响应具有选择性, 发生了选择性学习. 当神经网络能够发生学习并且学习具有选择性时, 就成功建立了网络层次的神经元选择性

学习模型.

1.3.1 活性电极对选择.

方法 1: 对神经网络的自发锋电位进行检测, 通过 NEX 软件提供的互相关分析, 随机选择两个相邻电极进行观测, 将神经网络自发电生理活动相关程度最好的两个相邻电极定义为活性电极对, 即刺激电极对.

方法 2^[1]: 对神经网络的自发锋电位进行检测, 导入 NEX 软件作光栅图, 对各组相邻电极上成对锋电位进行计数, 将成对锋电位数最多的一对相邻电极定义为活性电极对.

1.3.2 刺激参数选择. MEA 系统具有两种不同的刺激模式: 电流刺激模式和电压刺激模式. 通过预实验选择合适的刺激参数: 给予海马神经网络不同刺激模式、不同强度、不同频率的低频电压或电流方波刺激, 最后选择方波电压刺激模式, 刺激参数为 500 mV, 200 μ s, 1 Hz.

1.3.3 刺激时延的选择. 选择好活性电极对之后, 对于选择的活性电极对分别以间隔 0 ms、1 ms、5 ms、10 ms、100 ms 的时延, 给予海马神经网络 500 mV, 200 μ s, 1 Hz 的方波电压刺激, 观察神经网络的响应发生几率, 以响应/刺激比和响应时延(从刺激开始时刻至达到要求的响应发生的时间)这 2 个指标评估刺激与神经网络之间形成可调控联接的强度.

1.3.4 响应观测时段的选择. 刺激后时间直方图的构建: 通过活性电极对给予网络 100 次 500 mV, 200 μ s, 1 Hz 的方波电压刺激, 记录观测电极上神经元的响应, 计算其在刺激后不同时段的发生概率. 选择海马神经网络的早期突触后响应发生概率最大的时段作为观测时段.

1.4 数据处理

所有信号首先进行滤波处理, 设定 3~5 倍标准偏差(σ)为阈值, 小于阈值的信号作为噪声. 信号处理和锋电位序列分析利用 MC-Rack 和 NEX 软件完成. 对于从 6 个 cultures 中每个 culture 各 10 个通道进行统计分析, 应用 Origin 统计软件和 Matlab 程序对实验结果进行统计分析和归一化处理. 文中实验数据均表示为 $(\bar{x} \pm s)$.

2 结果与分析

2.1 在 MEA 芯片上培养的海马神经网络

图 1a 是 MEA 中培养神经网络的芯片, 在 MEA 芯片上培养 2 周的海马神经元初步形成了网

络连接(图 1b). 在体外培养 2 周后, 芯片的大多数电极上可观察到海马神经网络的自发电信号. 图 2 给出了其中一个芯片上培养的海马神经网络的电活动记录, 每条迹线代表在一个电极上记录到的海马神经元发放的电信号. 由图 2 可见, 各电极上神经元的电信号有大致相同的发放模式, 并且各电极上神经元发放的锋电位序列在时间结构上保持基本同步, 表明神经元之间已经建立了广泛的突触连接, 并形成了相互通讯的功能性网络.

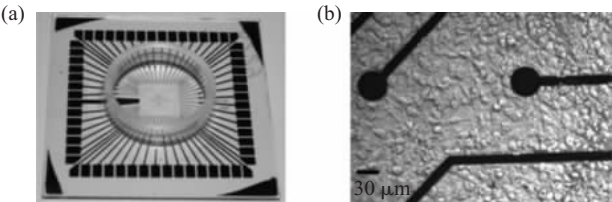


Fig. 1 Cultured hippocampal neuronal networks on MEA system
(a) Dish in MEA system. (b) Representative hippocampal neuronal networks (15 days *in vitro*, div) cultured on MEA system, scale bar=30 μm .

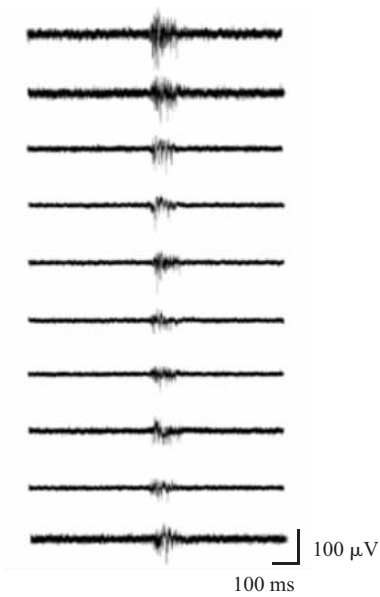


Fig. 2 Spontaneous signals of hippocampal neuronal networks (28 div) cultured on MEA system

2.2 互相关算法挑选活性电极对的优点

图 3a 所示是体外培养海马神经网络 25 天时自发锋电位的光栅图. 下方方框中是图 3a 上方方框

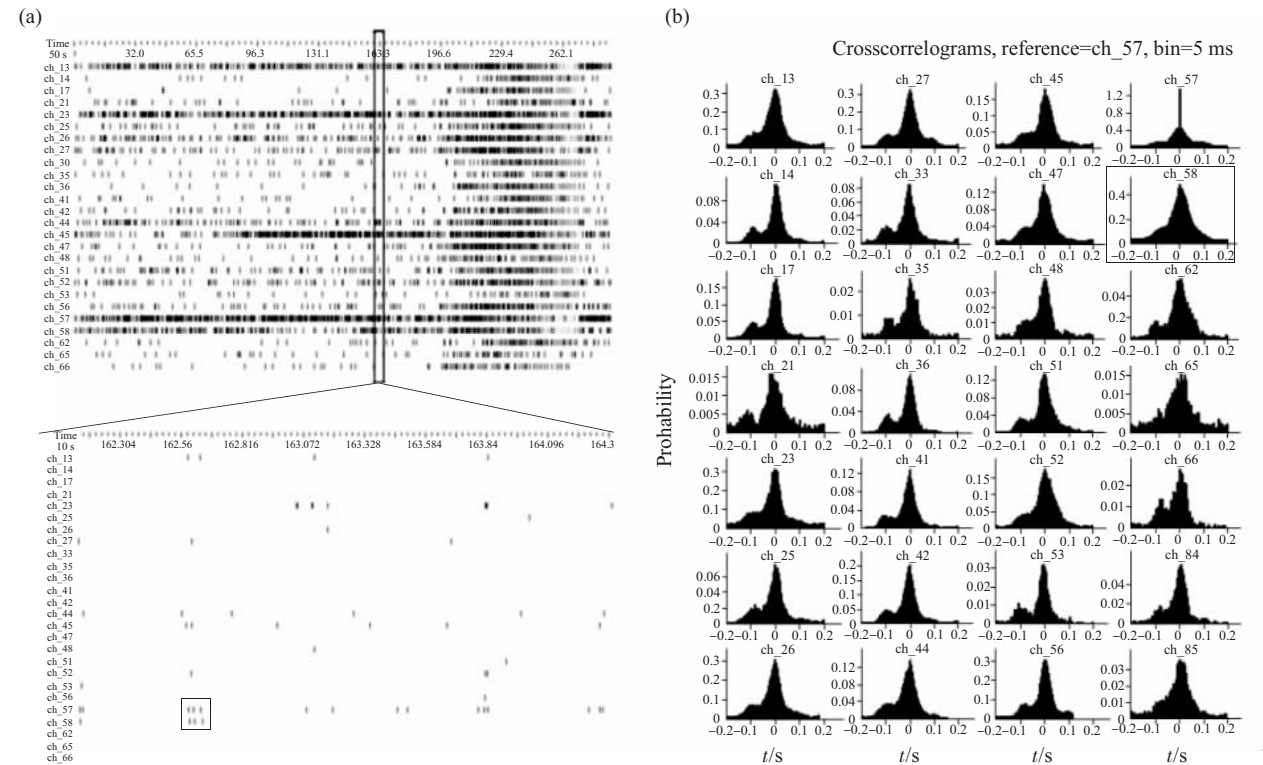


Fig. 3 Raster and crosscorrelograms of spontaneous spikes in hippocampal neuronal networks
(a) Raster of spontaneous spikes in hippocampal neuronal networks (25 div). In box below: three pairs of spikes well couple to each other between channel 57 and channel 58. (b) Crosscorrelograms of spontaneous spikes in hippocampal neuronal networks (25 div; reference=channel 57; bin=5 ms). In box: Crosscorrelograms of spontaneous spikes between channel 57 and channel 58.

中 57 通道和 58 通道自发锋电位光栅图的放大, 由下方方框图中观察到, 57 通道和 58 通道有 3 对耦合得非常好的锋电位. 通过自发锋电位的光栅图, 可以计算各对相邻电极中成对的锋电位数目, 取成对锋电位数目最多的 2 个相邻电极作为刺激电极对^[4]. 图 3b 所示为体外培养海马神经元网络 25 天时自发锋电位的互相关直方图. 标示方框中是 57 通道和 58 通道自发锋电位的互相关直方图. 可以看到, 57 通道和 58 通道自发锋电位的相关程度最高. 将相关程度最高的 2 个通道作为刺激电极对. 本实验设计的互相关法是将提取后的自发锋电位导入 NEX 软件, 直接通过互相关算法输出互相关直方

图, 通过互相关法挑选刺激电极对. 本实验设计的互相关法比人工光栅计数法^[4]要更为简捷.

2.3 不同刺激时延和不同观测时段网络响应发放的变化

图 4a 所示是不同刺激时延对海马神经元网络响应发放数目的影响. 如图 4a, 在 0 ms、1 ms、5 ms、10 ms、100 ms 的刺激时延范围内, 随着刺激时延增加, 海马神经元网络的响应 / 刺激比下降. 因此在后续的学习训练实验中选择 0 ms 的刺激时延, 即同时刺激活性电极对. 图 4b 是刺激后时间直方图, 表示刺激后不同时段网络响应发放几率的变化情况. 由图 4b 观察到, 当使用低频(1 Hz)电刺激

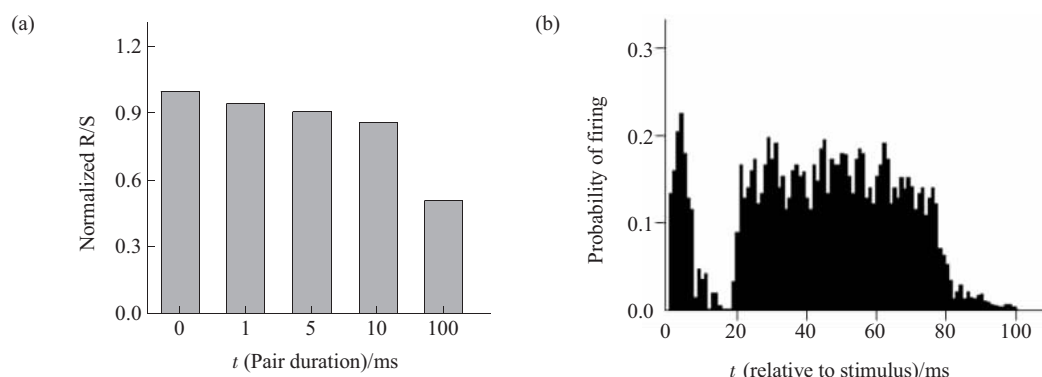


Fig. 4 Effects of different pair duration on responses and firing probability of responses within different time frames after stimulus

(a) The relation of pair duration and response/stimulus ratio ($n=50$ experiments in 6 networks). Pair duration is the stimulation delay between the pair of stimulated electrodes. (b) Peristimulus time histogram (bin=1 ms; $n=30$ experiments in 6 networks). The first peak represents direct activation of neurons by the stimulus; the high firing stage following represents reverberating responses.

同时刺激活性电极对, 在刺激后 10 ms 内有一个峰, 这是由电刺激引起的神经元直接响应的发放高峰; 同时, 在刺激后 20~80 ms 内是神经元早期突触后响应的高发放期. 学习是外界信息经过突触传递后神经元网络作出响应的过程, 因而在后续的学习训练实验中, 选择刺激后 20~80 ms 作为网络学习响应的观测时段.

2.4 海马神经元网络在学习训练中的响应

图 5 所示是海马神经元网络在学习训练前后的响应情况. 图 5 中每行迹线表示该电极记录的在刺激前 10 ms 到刺激后 140 ms 网络的响应情况. 图 5a 为训练前网络在刺激后未发生早期突触后响应的情况; 图 5b 为训练后网络在刺激后发生早期突触后响应的情况. 由图 5 可见, 学习训练使刺激后 20~80 ms 内的神经元网络的早期突触后响应明显增加.

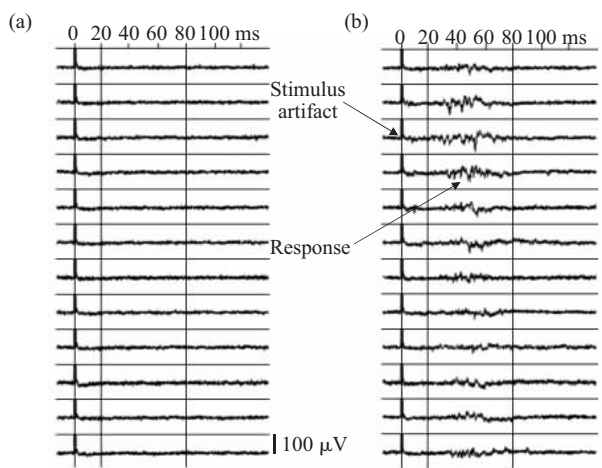


Fig. 5 Examples of response during learning in a cultured hippocampal neuronal network (21div)

Each trace within a panel shows recordings obtained 10 ms before the stimulus to 140 ms after the stimulus, before (a) and after (b) the training procedure. Note that the responsiveness of the electrode within the designated time window increased appreciably.

图 6 给出了训练循环中学习的动力学变化曲线. 学习的动力学变化主要是由响应 / 刺激比和响应发生的时延变化进行评估的. 图 6a 所示是在训练循环中海马神经网络的响应 / 刺激比逐渐增大的例子. 图 6b 所示是在训练循环中海马神经网络发生响应的时延逐渐减小的例子. 这两个例子中, 海马神经网络经过训练后其响应 / 刺激比逐渐增大并且响应时延逐渐减小, 这是一个神经网络与外界刺激建立起适当联系的过程, 进一步推测, 在这个过程中, 网络中刺激单元与响应单元之间几十甚至上百条可能通路中的最优通路被选择并稳定, 这是神经网络经过训练后突触可塑性发生改变的表现.

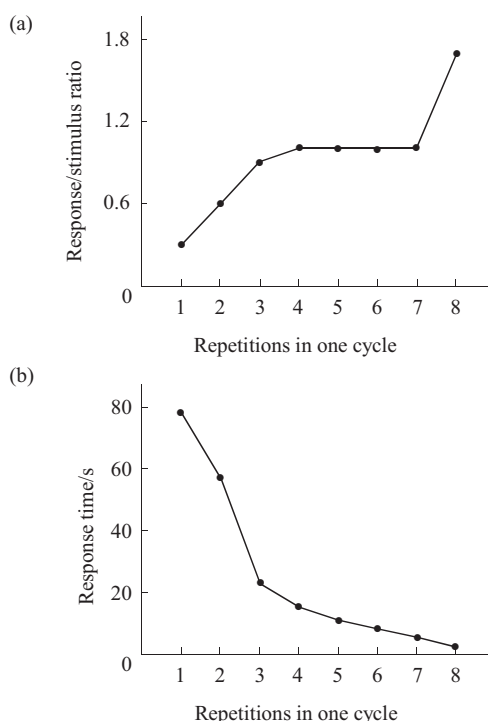


Fig. 6 Examples of learning curves in hippocampal neuronal networks

(a) Example of change of response/stimulus ratio in one training cycle.
(b) Example of change of response time in one training cycle. The response time (i.e., the duration of stimuli series until criterion is fulfilled) is plotted against the number of stimulation cycle. Each point depicts the time (in seconds) to accomplish the task in one cycle.

2.5 海马神经网络学习的选择性

将上述实验中成功发生学习的电极分为参考电极与观测电极两类, 进一步进行学习的选择性实验, 这样每一组里的参考电极与观测电极上的神经元都是已训练成功的具有同等学习能力的神经元

(对同一刺激能够作出达到要求的响应). 图 7 是在参考电极上的响应没有达到要求(响应 / 刺激比 < 0.2), 而观测电极上的响应达到要求(响应 / 刺激比 > 0.2)的前提下, 描绘的观测电极上的响应 / 刺激比(以 f 表示). 图 7 中黑色圆点代表观测电极, 星号表示对应的观测电极的 f 值. 从图 7 中可以看出, 神经网络中具有同等学习能力的神经元在刺激后分别作出了不同的响应, 说明神经网络发生了选择性学习.

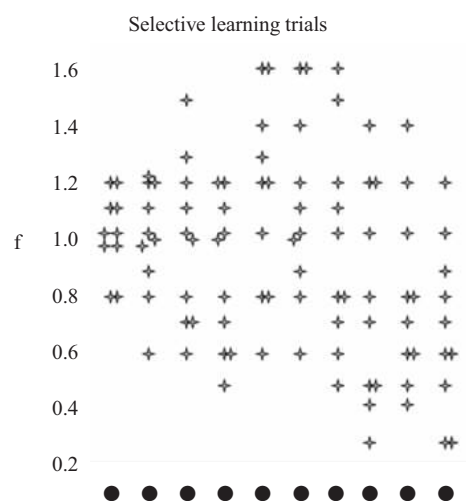


Fig. 7 Selectivity of learning

Changes in response/stimulus ratio (stars) of the selected electrode (filled circles) depicted by f , when the response/stimulus ratio of monitored electrodes was smaller than 0.2 ($n=60$ experiments in 6 networks).

3 讨 论

海马在学习与记忆中起着非常重要的作用^[6~8]. 体外培养的海马神经元能够保持在体海马神经元的生理特性, 包括形态学、药理学和电生理学的特性, 这对在分子水平、细胞水平和网络水平对海马的学习与记忆机制进行更深入细致的研究提供了非常有利的条件^[9]. 基于上述有利条件, 本实验在微电极阵列系统中构建了海马神经网络学习模型, 并通过该网络学习模型进行了一系列研究. 研究结果显示, 本实验设计的互相关法比人工光栅计数法^[10]更加简捷(图 3). 功能性海马神经网络(图 1 和图 2)能够对闭环低频成对电极电刺激作出响应(图 5). 在 0 ms、1 ms、5 ms、10 ms、100 ms 的刺激时延范围内, 随着刺激时延增加, 海马神经网络响应 / 刺激比下降(图 4a), 在刺激后 20~80 ms 的范围内是神经元早期突触后响应的高发放

期(图 4b). 随着训练的不断进行, 海马神经网络的早期突触后响应明显增加(图 5), 响应 / 刺激比逐渐增大并且响应时延逐渐减小(图 6), 同时, 体外培养的海马网络中的神经元能够对外界刺激有选择地作出响应(图 7), 此时神经网络与外界刺激之间已经建立可调控的联系, 即海马神经网络选择性学习模型成功建立.

对神经系统而言, 一类学习行为可以视作对刺激建立适当或最优反应的过程. 神经网络层次上, 接受外界刺激的单元与发生响应的单元间通常存在几十甚至上百条可能通路, 其间几十甚至上百个突触可能参与信息传递处理, 学习的结果是最优通路被选择并稳定下来. 利用体外培养神经元的优势就在于它们是这种学习行为很好的简化模型. 该模型可供研究者在真实神经元上探讨网络层次学习行为的神经机制, 是研究学习记忆机制的重要途径. 同时, 对深入比较海马与大脑皮层的学习机制有重要意义.

另外, 闭环的实验过程在神经网络和外界刺激之间构建了一个实时反馈体系, 这不仅对实现外界刺激与神经网络之间建立可调控的联系是必不可少的, 同时, 对提高突触传递的可塑性也是很有帮助的.

以上分析说明, 闭环低频成对电极电刺激能够成功训练海马神经网络进行学习, 通过该训练可以诱导神经元突触可塑性发生改变. 该神经网络学习模型可以作为在网络层次上对海马的学习机制进行研究的一个平台, 并为神经工程学中实现新型生物机器人提供了一种基础的实验方法^[10,11]. 另外, 本研究所使用的微电极阵列芯片以及改进的神经芯片^[12]上培养的海马神经网络, 还可作为一种高灵敏的生物电传感系统^[13], 进行高通量神经药物的筛选, 在神经药理学中有广泛的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Shahaf G, Marom S. Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 2001, **21** (22): 8782~8788
- 2 Marom S, Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: Lessons beyond anatomy. *Q Rev Biophys*, 2002, **35** (1): 63~87
- 3 Marom S, Eytan D. Learning in *ex-vivo* developing networks of cortical neurons. *Prog Brain Res*, 2005, **147**: 189~199
- 4 Nicholls J, Martin B, Wallace B, 等. 杨雄里等译. 神经生物学——从神经元到脑. 北京: 科学出版社, 2003. 第四版.
Nicholls J, Martin B, Wallace B, *et al.* Translated by Yang X L, *et al.* Neuroscience: From Neuron to Brain. Beijing: Science Press, 2003. 4th
- 5 Wagenaar D A, Pine J, Potter S M. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *J Neurosci Methods*, 2004, **138** (1~2): 27~37
- 6 Glanzman D L. Associative learning: Hebbian flies. *Curr Biol*, 2005, **15** (11): R416~R419
- 7 Bliss T V, Collingridge G L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, **361** (6407): 31~39
- 8 Bliss T V, Lemo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 1973, **232** (2): 331~356
- 9 Buzsaki G, Horvath Z, Urioste R, *et al.* High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science*, 1992, **256** (5059): 1025~1027
- 10 DeMarse T B, Wagenaar D A, Blau A W, *et al.* The neurally controlled animat: Biological action with simulated bodies. *Autonomous Robots*, 2001, **11** (3): 305~310
- 11 Reger B D, Fleming K M, Sanguineti V, *et al.* Connecting brain to robots: An artificial body for studying the computational properties of neural tissues. *Artif Life*, 2000, **6** (4): 307~324
- 12 吴浩扬, 吴裕远. 神经芯片技术的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (1): 89~93
Wu H Y, Wu Y Y. *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (1): 89~93
- 13 韦晓兰, 莫志宏. 细胞传感器与芯片的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (9): 855~859
Wei X L, Mo Z H. *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (9): 855~859

The Learning Model in Cultured Hippocampal Neuronal Networks*

LI Yan-Ling, LI Xiang-Ning, ZHOU Wei, ZENG Shao-Qun, LIU Man, LUO Qing-Ming**

*(The Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education, Department of Biomedical Engineering,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)*

Abstract Learning a new behavior is an exploration process that involves the formation and the modulation of association set between stimuli and neuronal networks' responses. To construct one appropriate learning model at networking level, on multi-electrode array, the closed-loop low frequency (1 Hz) pair stimulation was used to train the cultured hippocampal neuronal network and induce the learning behavior at networking level. Once the hippocampal neuronal network was trained successfully, the early postsynaptic responses were increased evidently, the response/stimulus ratio was increased and the response time decreased, furthermore, selective. These results indicate that the formation and the modulation of association between stimuli and neuronal networks' responses have been set, which means the learning behavior at networking level has occurred.

Key words hippocampus, neuronal networks, learning model, low frequency electrical stimulation, multi-electrode array

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (60478016), Major Program of Science and Technology Research of Ministry of Education (10420).

**Corresponding author . Tel: 86-27-87792033, Fax: 86-27-87792034, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

Received: July 8, 2006 Accepted: September 28, 2006