

实验技术

多通道在体记录技术——动作电位与场电位信号处理

徐佳敏, 王策群, 林龙年*

华东师范大学脑功能基因组学教育部、上海市重点实验室, 上海 200062

摘要: 多通道在体记录可以同时记录到多个神经元的胞外放电信号以及对应的局部场电位的活动信号。如何对记录到的这两种电信号进行合适的处理, 以确保实验结果的准确性, 是运用好多通道在体记录技术的关键之一。本文旨在针对多通道在体记录的原始数据, 介绍动作电位及场电位信号的常用数据处理方法。动作电位信号属于高频信号, 一般用40 kHz的高速采样频率进行采集和记录。根据记录到的神经元胞外动作电位波形, 运用主成分分析技术, 再结合四电极记录技术的优势, 可对来自记录电极周围不同空间位置的神经元放电信号进行良好的甄别, 从而获得较精确的单神经元放电时间序列。而局部场电位信号属低频信号(< 300 Hz), 一般用1 kHz的采样频率进行采集和记录。记录到的场电位原始信号需要进行数字滤波, 从而分离出场电位信号中不同频率段的节律性振荡。啮齿类动物海马结构中常见的节律性振荡有动物清醒活动及快速眼动睡眠时的theta节律(4~12 Hz); 清醒认知活动过程中, 伴随着theta节律一起出现的gamma节律(30~80 Hz); 以及清醒静止及慢波睡眠时的ripple高频振荡(100~250 Hz)。针对以上处理获得的数据, 常用的后续数据分析方法有: 神经元放电间隔分析、神经元放电自相关与互相关分析、以及信号的频谱分析等。

关键词: 多通道在体记录; 动作电位; 场电位; 主成分分析

中图分类号: Q424

Multi-channel *in vivo* recording techniques: Signal processing of action potentials and local field potentials

XU Jia-Min, WANG Ce-Qun, LIN Long-Nian*

Key Laboratory of Brain Functional Genomics (Ministry of Education and Shanghai Municipality), East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract: Multi-channel *in vivo* recording techniques are used to record ensemble neuronal activity and local field potentials (LFP) simultaneously. One of the key points for the technique is how to process these two sets of recorded neural signals properly so that data accuracy can be assured. We intend to introduce data processing approaches for action potentials and LFP based on the original data collected through multi-channel recording system. Action potential signals are high-frequency signals, hence high sampling rate of 40 kHz is normally chosen for recording. Based on waveforms of extracellularly recorded action potentials, tetrode technology combining principal component analysis can be used to discriminate neuronal spiking signals from differently spatially distributed neurons, in order to obtain accurate single neuron spiking activity. LFPs are low-frequency signals (lower than 300 Hz), hence the sampling rate of 1 kHz is used for LFPs. Digital filtering is required for LFP analysis to isolate different frequency oscillations including theta oscillation (4–12 Hz), which is dominant in active exploration and rapid-eye-movement (REM) sleep, gamma oscillation (30–80 Hz), which is accompanied by theta oscillation during cognitive processing, and high frequency ripple oscillation (100–250 Hz) in awake immobility and slow wave sleep (SWS) state in rodent hippocampus. For the obtained signals, common data post-processing methods include inter-spike interval analysis, spike auto-correlation analysis, spike cross-correlation analysis, power spectral density analysis, and spectrogram analysis.

Key words: multi-channel *in vivo* recording; action potential; local field potential; principal component analysis

Received 2013-11-08 Accepted 2013-12-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30990262, 81271490), and the National Basic Research Development Program of China (No. 2013CB835101).

*Corresponding author. Tel: +86-21-62233533; Fax: +86-21-62601953; E-mail: lnlin@brain.ecnu.edu.cn

多通道在体记录技术因其记录的实时性和在记录神经元数量上的优势,近年来被广泛应用于神经科学研究^[1-4]。多通道在体记录所采集的原始数据为神经元的胞外动作电位信号,以及记录电极所在脑区的局部场电位信号。由于这两种信号的特性、来源和形成机制不同,因此,针对这两类信号的数据处理方法也有所不同^[2,5,6]。

对于动作电位信号,关键是如何从原始记录数据中获得准确的单个神经元放电活动的时间序列。由于在某些脑区,神经元胞体的排列较为密集,以致在一根记录电极上,可同时记录到几个甚至十几个神经元的放电活动,这给准确区分不同神经元的放电活动带来了困难。而四电极的使用则可在很大程度上解决这一问题^[2,3,7]。由于四电极技术可对四根绑在一起的记录电极进行联动采样,因此对记录电极周围任一神经元的任一动作电位信号都可以记录到四个放电波形,再经过后续的数据处理,可增加对记录电极周围不同神经元放电活动的区分度^[1,3,8,9]。

对于局部场电位信号,它反映的是局部脑区群体神经元突触后电位的线性总和。在脑内存在着各种模式的场电位节律振荡 (rhythmic oscillations)^[4,10]。这些具有不同频率范围的周期性振荡信号,为脑中群体神经元编码、存储和提取神经信息提供了一种时间上的同步,也反映了大脑神经网络信息处理的不同活动模式^[4,11]。啮齿类动物处于不同行为状态时,其海马神经网络的活动也具有不同活动模式,反映在场电位节律振荡上,主要是动物在清醒、探索状态 (active exploration) 或快速眼动睡眠 (rapid-eye-movement sleep, REM sleep) 时的 theta 节律 (4~12 Hz); 与认知行为活动相关的 gamma 节律 (30~80 Hz); 以及在慢波睡眠 (slow wave sleep, SWS) 时出现的 ripple 节律 (100~250 Hz)^[12-14]。要研究这些节律性场电位活动,首先需要对原始场电位信号进行一系列的滤波处理,提取出不同频段的节律性振荡信号。

本文主要介绍多通道在体记录技术的单神经元放电信号甄别,以及局部场电位信号的初步处理方法,并在此基础上,介绍几种常用的后续数据分析方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,10 周龄,购自上海

斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪2007-0005),使用许可证号:SYXK(沪)2003-0026。自制 96 通道电极帽。

1.2 主要仪器

戴尔 PRECISION 690 工作站电脑 (Dell Inc., Austin, TX, 美国),96 通道在体记录系统 (Plexon Inc., TX, 美国)。

1.3 数据分析软件

Offline Sorter (Plexon Inc., TX, 美国), Neuro-Explorer (Nex Technologies, AL, 美国), Matlab6.5 (The MathWorks Inc., Massachusetts, 美国)。

1.4 电极植入手术与数据采集

将制作好的 96 通道电极植入小鼠双侧海马 CA1 区域,手术后恢复 2~3 天,使用多通道在体记录系统,观察和采集海马 CA1 区神经元的放电活动及场电位活动信号。美国 Plexon 公司的多通道在体记录系统,可通过同一根记录电极,同时采集动作电位信号和场电位信号^[15]。

多通道在体记录对神经元动作电位信号的采集一般使用 40 kHz 的高速采样频率。为了减少无关数据,一般使用阈值触发采样技术。即实验者预先设定一电位阈值,超过这一阈值电位的信号会自动触发系统的数据采集。采集时程由触发点前与触发点后两部分时段构成,具体值可由实验者预先设定,总采样时程一般控制在 1.4 ms 以内 (略长于 1 个动作电位的时程)。

多通道在体记录对局部场电位信号的采集则主要使用 1 kHz 的采样频率,且是连续采样方式。

1.5 动作电位信号处理

多通道在体记录技术在记录原理上属神经元胞外记录技术,当记录电极尖端距离神经元的胞体较近时 (< 140 μm),就可探测到该神经元胞体的动作电位信号^[16]。就胞外记录技术而言,如何在同一记录电极上区分出记录电极周围不同神经元的放电活动,一直是一个关键问题。理论上,同一神经元在同一记录电极上的动作电位波形具有一致性;而不同的神经元由于胞体形态、与记录电极距离等因素的影响,记录到的动作电位波形在幅度、时程和形状上会有差异 (图 1)。因此,对多通道在体记录技术而言,区分不同神经元的放电活动,主要依赖记录到的动作电位波形的不同。最初,基于动作电位波形的神经元分类技术,主要采用动作电位波形的幅度、波宽等参数指标。近年来,随着主成分分析

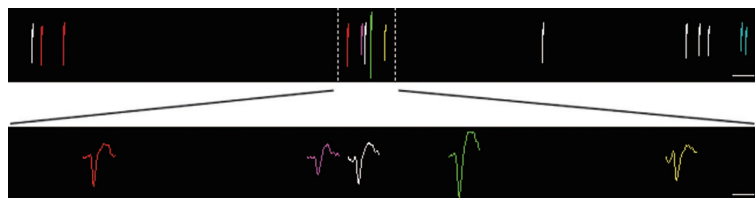


图 1. 胞外动作电位原始放电波形

Fig. 1. The original action potential waveforms recorded from different neurons. Colors indicate different waveforms from multiple single neurons. The enlargement of the selected area from the upper panel is demonstrated in the bottom panel. Note the different waveform amplitudes of different neurons. Scales: upper panel: 16 ms, 0.2 mV; lower panel: 1 ms, 0.2 mV.

(principal component analysis) 技术的运用, 使得神经元分类技术在精度上有了较大的提高^[6]。

1.5.1 主成分分析

胞外动作电位的幅度、波宽等参数虽然能反映动作电位波形的主要特征, 但相对于整个放电波形特征信息而言, 仅依赖这些参数, 显然会丢掉原始放电波形中的其它有用信息。神经元放电波形的特征空间是一个多维度空间, 主成分分析是一种通过降维技术, 把多个变量特征进行线性组合, 从而转化为少数几个主成分的多元统计分析方法。这些主成分能够反映原始变量中的绝大部分信息, 因此, 运用主成分分析法来进行动作电位波形的特征甄别, 比一般的特征分类方法的精度要高。

在具体处理过程中, 一般将某一电极在某段时间内记录到的所有放电波形原始数据作为一高维数据集, 通过线性变换, 为这原始的高维数据建立一种新的转换坐标系。在此坐标系中, 使得任何数据投影的第一大方差落在第一个坐标轴上(称为第一主成分), 第二大方差则落在第二个坐标轴上(第二主成分), 依次类推。这样既减少了数据集的维数, 又同时保持了数据集对方差贡献最大的特征。在 Matlab 软件平台中, 提供了一主成分分析函数“princomp”, 用户可根据该函数的具体说明, 调用执行主成分分析功能。

经过主成分分析后, 可以选取前两个或三个主成分作为图形空间坐标维度, 根据每个波形的主成分得分, 画出所有波形在这二维或三维坐标空间的分布状况, 由此, 可对这些动作电位的波形数据样本进行直观的聚类处理。

实际的比较研究表明, 使用主成分作为分类指标, 比其他分类指标可以对动作电位波形数据进行更精确的分类^[2,5,9,17]。目前, 大多数神经元分类软件(如 Offline Sorter, MClust 等)都内置有主成分分

析功能。

1.5.2 四电极技术

随着主成分分析等技术的应用, 基于动作电位波形的神经元分类技术在精度上有了较大的提高, 但是由于记录电极周围是一个立体空间, 与同一记录电极空间距离相等的同类神经元往往会在记录电极上产生形状相似的动作电位波形, 此时, 两个或更多个神经元的放电可能被混淆在一起(如图 1 中红色和白色的放电波形)。同时, 脑内某些神经元具有簇状放电模式, 在一个簇状放电中, 一般包含有几个快速发放的动作电位, 且单个动作电位的胞外波形及幅度会有明显的变化(图 4A)^[3]。这种簇状放电动作电位波形的变异也常导致单个神经元的活动被神经元分类技术拆分成两个, 甚至三个神经元。

为了避免上述神经元分类过程中的潜在错误, 四电极技术应运而生。四电极技术的关键在于联动采样。四根记录电极被绞合在一起, 当其中任一记录电极上有超过阈值的信号时, 会触发其余三根记录电极的同步采样。这样对应记录电极周围空间中任意一个神经元的任意一次动作电位, 通过四根记录电极的联动采样便会记录到四个动作电位波形(图 2)。因此, 与四电极空间距离一致, 但空间位置不同的神经元, 会在四电极的每根单电极上留下大小不同的动作电位波形, 从而被加以区分。同时, 如果某个特定神经元在簇状放电时放电波形或幅度发生变化, 那么在四根记录电极上的改变也是成比例变化的, 这样也可以较准确地区分这些神经元。

由此可见, 四电极技术可降低区分在体单神经元放电时的错误, 从而提高多通道在体记录技术区分不同神经元放电活动的精度。图 2 显示了在海马 CA1 脑区, 单根四电极上同时记录到的一个中间神经元和四个锥体细胞。目前, 常规的多通道在体记录系统均会提供基于四电极的记录技术。

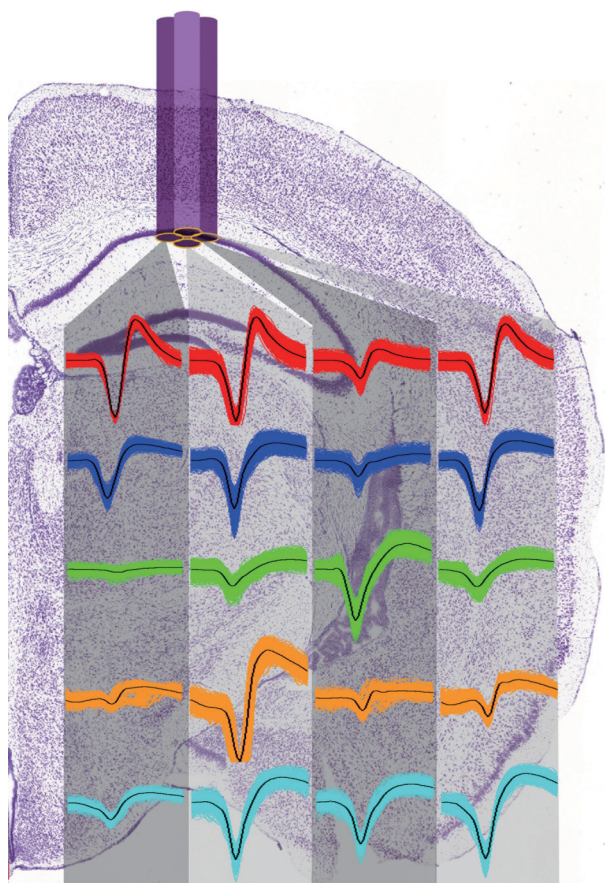


图 2. 四电极记录的不同神经元放电波形

Fig. 2. Five different neurons recorded simultaneously by a single tetrode placed in stratum pyramidale of hippocampal CA1 area. Waveforms recorded from each of the four electrodes are shown in each column. One putative interneuron is shown in red while the other four putative pyramidal neurons are shown in blue, green, yellow and cyan.

1.5.3 Offline Sorter软件使用

Offline Sorter 软件是美国 Plexon 公司开发的一款神经元分类软件，一般用于处理 Plexon 记录系统采集得到的原始数据（数据文件后缀名为“.plx”）。该软件有交互式的可视化界面，既可查看每个记录通道上的每个动作电位波形，也可对它们的归类属性进行即时操作。同时，软件还提供了多种基于动作电位波形特征的神经元聚类方法，且聚类结果可实时显示在二维或三维的视图窗口中。该软件的具体操作可参考软件使用说明书，在这里我们主要介绍一般的操作流程和注意要点。

首先，Offline Sorter 软件的主界面包含三个功能子窗口，一个是“文件信息窗口 (File Info View)”，显示被打开文件的基本信息。另一个是“当前通道

窗口 (Current Channel Window)”，用于显示被选中通道的所有放电波形，每个放电波形以波形与阈值交叉点对齐，重叠显示。界面下方还有一“连续数据窗口 (Continuous Data Window)”，把被选中通道的所有动作电位波形，按放电时间先后排序显示。此外还有一些特征分析窗口，如“二维聚类窗口 (2D Cluster View)”、“三维聚类窗口 (3D Cluster View)”等，它们一般重叠显示在“文件信息窗口”上，可通过点击窗口下方的切换标签，实现多个重叠窗口间的切换。

使用 Offline Sorter 软件处理数据的一般流程是：打开文件 → 选择通道 → 去除噪音 → 对齐波形 → 计算主成分 → 选择参数 → 手动或自动聚类 → 结果检验 → 保存处理结果。

在数据处理过程中应注意以下要点：

(1) 对齐波形：多通道在体记录技术采用的是阈值触发采样技术，采集的每个动作电位波形在阈值点对齐，这会给主成分的计算带来一定的影响。因此，为了获得最佳的主成分计算效果，需对动作电位波形进行对齐处理 (align waveforms)。操作时一般选择在动作电位波形的最大或最小值处对齐波形。

(2) 选择参数：Offline Sorter 软件的二维或三维聚类窗口提供了神经元聚类的可视化操作界面。对二维或三维空间的任一维度，软件均提供了几十种的波形特征参数选择，如 PC1、PC2、Peak、Valley 等。用户可通过选择不同的维度参数组合，以达到最佳的聚类分析效果。

(3) Offline Sorter 软件提供手动和自动两种神经元聚类方法。手动方法有波形划分和边界划分两种，自动聚类则有 K 平均法、波谷搜索法等。自动聚类方法虽方便，但在自动聚类完成后，仍需实验者检查分析的结果，并加以手动修订。

(4) 结果检验：理论上，一个单神经元的放电时间序列，其所有放电时间间隔 (interspike interval, ISI) 不应短于该神经元的不应期 (1~2 ms)。但在实际操作中，一般允许有 0.5%~1% 的污染率，也即时程小于不应期的 ISI 在所有 ISI 中的占比不得超过 1%^[6, 18, 19]。

1.6 场电位信号处理

局部场电位信号反映的是记录电极附近群体神经元突触后电位活动的总和。在动物不同行为状态下，场电位信号会呈现出不同频率的节律性振荡。因此，对场电位信号处理的关键，就是如何提取出

这些不同频率段的节律性振荡。在方法上, 一般采用数字滤波的方式, 将原始场电位信号分别处理成 θ 频段、 γ 频段和 ripple 频段等频率范围的场电位信号数据^[11]。

针对场电位信号的滤波处理, 可使用 Matlab 软件进行。Matlab 软件的工具箱提供了多个数字滤波函数, 比如 filter 函数和 filtfilt 函数等。其中 filter 滤波函数在滤波时因为相位响应而导致待处理信号经过滤波器后会产生相位偏移, 而 filtfilt 滤波函数则可以实现零相移滤波。图 3 比较了 filter 函数与 filtfilt 函数对同一场电位数据的 θ 频段滤波结果。可以观察到原始的局部场电位信号经过 filtfilt 函数滤波之后并没有产生相位偏移, 而使用 filter 函数则产生了相位偏移。因此, 在 Matlab 软件环境下, 对多通道在体记录的场电位数据, 一般使用 filtfilt 函数进行数字滤波操作。

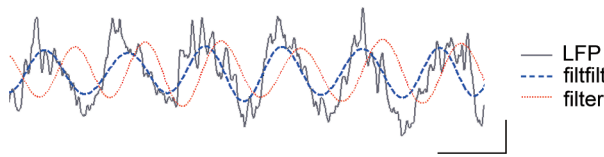


图 3. 不同滤波函数滤波结果

Fig. 3. Local field potential (LFP) filtered by different Matlab filter functions. The original LFP signal (in gray) is filtered either using function 'filtfilt' (in blue) or using function 'filter' (in red). Note the significant phase shift between the red and gray lines. Scales: 100 ms, 0.4 mV.

1.7 多通道在体记录技术常用数据分析方法

多通道在体记录的原始放电数据经初步处理后, 得到多个单神经元的放电时间序列和不同频段的场电位信号, 需使用 NeuroExplorer 或 Matlab 等软件进行进一步的数据分析, 常用的分析方法包括放电频率分析、放电间隔分析、自相关和互相关分析、事件相关分析、频谱分析和位置细胞分析等。以下主要介绍放电间隔分析、自相关和互相关分析, 以及频谱分析等常用数据分析方法。

1.7.1 放电间隔分析

放电间隔分析考察单神经元放电序列中, 所有相邻动作电位放电间隔的分布情况, 并以间隔时间为 X 轴, 以频数为 Y 轴, 用直方图的形式表现出来。因神经元放电序列的所有放电间隔均大于零, 因此放电间隔直方图的 X 轴只有正值。具体计算时, 首

先设一时间窗 (bin), 并将第一个时间窗口记为 [IntMin, IntMin+bin], 第二个时间窗口则记为 [IntMin+bin, IntMin+bin*2], 以此类推。大于时间窗左侧时标的放电间隔被计在该时间窗中, 而大于右侧时标的则不计入该时间窗内。最后, 对每一个时间窗, 计算整个单神经元放电序列中放电间隔落在该时间窗内的总放电个数。放电间隔分析可以反映不同的放电间隔在该神经元所有放电间隔中出现的频度和整体分布情况。不同神经元的在体放电模式一般会有不同的放电间隔分布特征 (图 4)。

1.7.2 自相关与互相关分析

从统计学角度分析, 神经元放电活动的时间序列可以被认为是一种随机点过程 (stochastic point processes), 神经元放电序列的自相关分析 (auto-correlation analysis) 反映神经元在时刻 t 与时刻 $t+k$ 时放电的关联程度。具体计算时, 也是先设一时间窗, 然后计算神经元放电序列中每个放电与序列中其他放电的时间差 D , 再统计各时间窗口内 D 的总数, 画成频数直方图, 即为神经元放电的自相关图 (auto-correlograms)。由于要计算每个放电与其前后所有放电的时间间隔差, 所以自相关图 X 轴的时间有正负值^[4, 11] (图 4)。

神经元放电序列的互相关分析 (cross-correlation analysis) 则用于判断两个神经元序列间放电活动的关联度, 主要计算目标神经元与参考神经元之间放电率的关系。分析原理与自相关分析基本一致, 只是换成计算参考神经元的每个放电与目标神经元放电序列中所有放电的时间差, 然后再画成互相关图 (cross-correlograms)。在互相关图中, 如在参考神经元放电后几毫秒时间内出现目标神经元的放电频率尖峰, 表明两神经元之间存在兴奋性联接; 而放电频率的降低, 则预示着两神经元之间有着抑制性联接^[20-22] (图 5)。

1.7.3 频谱分析

经多通道在体记录得到的单神经元放电时间序列和局部场电位信号均属时域信号, 其中场电位是连续时域信号, 而神经元放电时间序列则是离散时域信号。这两类时域信号可通过频谱分析将其转换成频域信号, 从而来考察其频率的变化规律。对于神经元放电时间序列, 一般先将其转换为连续的放电频率直方图, 然后再对其进行相应的频谱分析。针对神经元电活动信号的频谱分析主要包括功率谱分析 (power spectral density analysis) 和实时频谱分

析 (spectrogram analysis)。功率谱分析能反映信号中的频谱特征, 而实时频谱分析能观察信号中的频谱特性随时间变化的规律 (图 6)。在 NeuroExplorer 等专业分析软件中有频谱分析功能, 用户可直接使用^[23]。

2 结果

2.1 小鼠海马CA1区神经元放电间隔分析与自相关分析

运用多通道在体记录技术, 我们记录了小鼠海马 CA1 区神经元的在体放电模式, 并经过 Offline Sorter 软件的处理得到单神经元的放电时间序列, 再运用 NeuroExplorer 软件对其进行放电间隔分析和自相关分析。根据放电频率和放电波形等参数, 可以在海马 CA1 区大致区分出锥体细胞 (图 4A) 和中间神经元 (图 4B, C, D) 的放电活动。锥体细胞放电间隔直方图 (图 4A) 中短而尖的单个波峰, 以

及自相关图中的递减峰表示其具有明显的簇状放电特性。某些中间神经元 (图 4B) 也具有簇状放电特性。而图 4C 显示的中间神经元, 其自相关图中有多个等间隔波峰, 提示其放电具明显的周期性发放特征, 峰峰间期即为周期时间。

2.2 小鼠海马CA1区神经元的互相关分析

考察了海马 CA1 区神经元的基本放电特性之后, 我们想进一步探讨这些记录到的神经元之间是否存在相互作用关系。应用互相关分析, 可以对这一问题进行初步探讨。图 5A 为一根四电极上同时记录到的一个中间神经元与一个锥体细胞间的互相关分析, 结果显示锥体细胞的某些放电在中间神经元之前, 且在几毫秒时间窗内会有中间神经元的后续放电出现, 这种稳定的放电诱发关系, 提示两者之间可能存在着由锥体细胞到中间神经元的兴奋性单突触联接。图 5B 为一根四电极上同时记录到的两个不同锥体细胞之间的互相关分析, 结果表明前

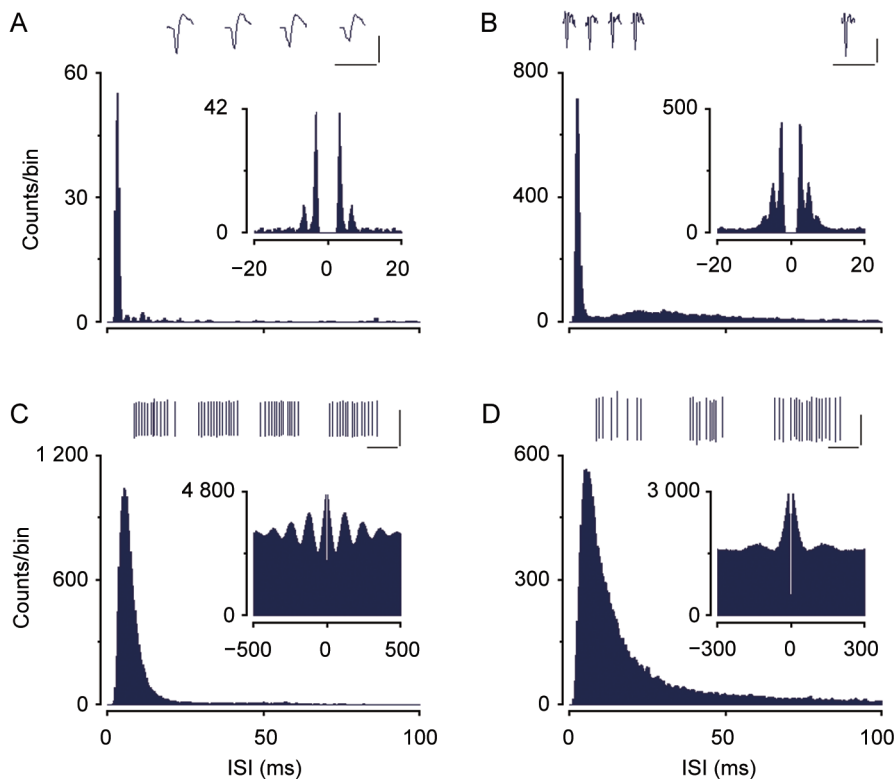


图 4. 4种不同海马CA1区神经元放电间隔直方图和自相关直方图分析

Fig. 4. Interspike interval (ISI) histograms and auto-correlograms of a putative pyramidal neuron (A) and three different types of putative interneurons (B, C, D) recorded from hippocampal CA1 area. The pyramidal neuron has typical burst firing with low firing rate as indicated by the sharp peak in the ISI histogram in A. The vertical lines in C and D are action potentials fired by the corresponding neurons. Neuron C has periodical burst firing, hence the cyclic activity in the auto-correlogram. Scales: A: 1 ms, 0.4 mV; B: 2 ms, 0.1 mV; C: 16 ms, 0.2 mV; D: 16 ms, 1.6 mV.

一个神经元发放动作电位之后，后一个神经元跟着发放，即这两个神经元总是顺序发放动作电位，推测它们之间也应该有着单向的兴奋性突触联接。

2.3 小鼠海马CA1区动作电位与场电位信号的频谱分析

场电位是连续采样得到的信号，可直接进行频谱分析；而神经元的放电时间序列一般需转换为放电频率直方图 (rate histogram) 后，再对其进行计算分析 (NeuroExplorer 软件在进行频谱分析时，会对神经元的放电时间序列自动进行转换计算)。图 6 显示的是在小鼠海马 CA1 区记录到的一个神经元在动物不同行为状态下的放电时间序列，以及在同一电极上记录到的对应原始场电位信号 (图 6A, D)。对场电位信号的功率谱分析显示，在动物活动状态下，场电位信号中有明显的 theta 和 gamma 节律峰

(图 6B)，在慢波睡眠状态下则有 ripple 节律峰 (图 6E)。而在神经元的功率谱分析图中，不论动物是在活动状态还是慢波睡眠状态，神经元信号均以 theta 节律峰为主 (图 6B, E)，提示该神经元的放电活动始终与 theta 节律有一定的关联性。而实时频谱则分析显示，场电位 theta 和 gamma 节律在时间上具持续性 (图 6C)，而 ripple 节律则呈明显的间断性 (图 6F)。

3 讨论

本文以小鼠海马 CA1 区群体神经元在体电活动为例，介绍了多通道在体记录技术的动作电位与场电位信号的一些基本处理与分析方法。对于动作电位信号，首先要尽可能准确地获得单个神经元的放电活动时间序列，然后再运用放电间隔分析、自相

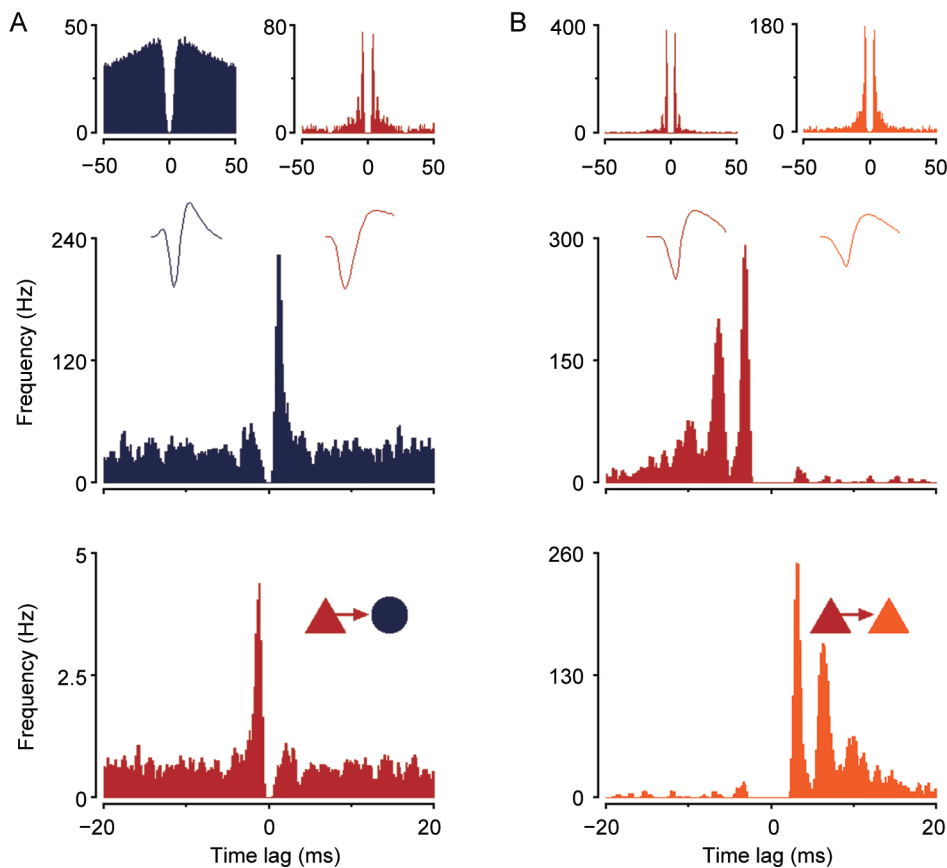


图 5. 海马CA1神经元之间的互相关分析

Fig. 5. Cross-correlograms of different neuron pairs in hippocampal CA1 area. The upper panel displays auto-correlograms of four neurons. A: Excitatory drive from putative pyramidal neuron (red) to interneuron (blue). Note large, sharp peak at ~ 2 ms in the cross-correlogram (middle panel) with the pyramidal neuron firing as the reference event indicating excitatory monosynaptic connection. The average waveform of each neuron type is displayed in the middle panel. B: Cross-correlogram of two putative pyramidal neurons shows that the neuron displayed in red is activated before the neuron shown in orange.

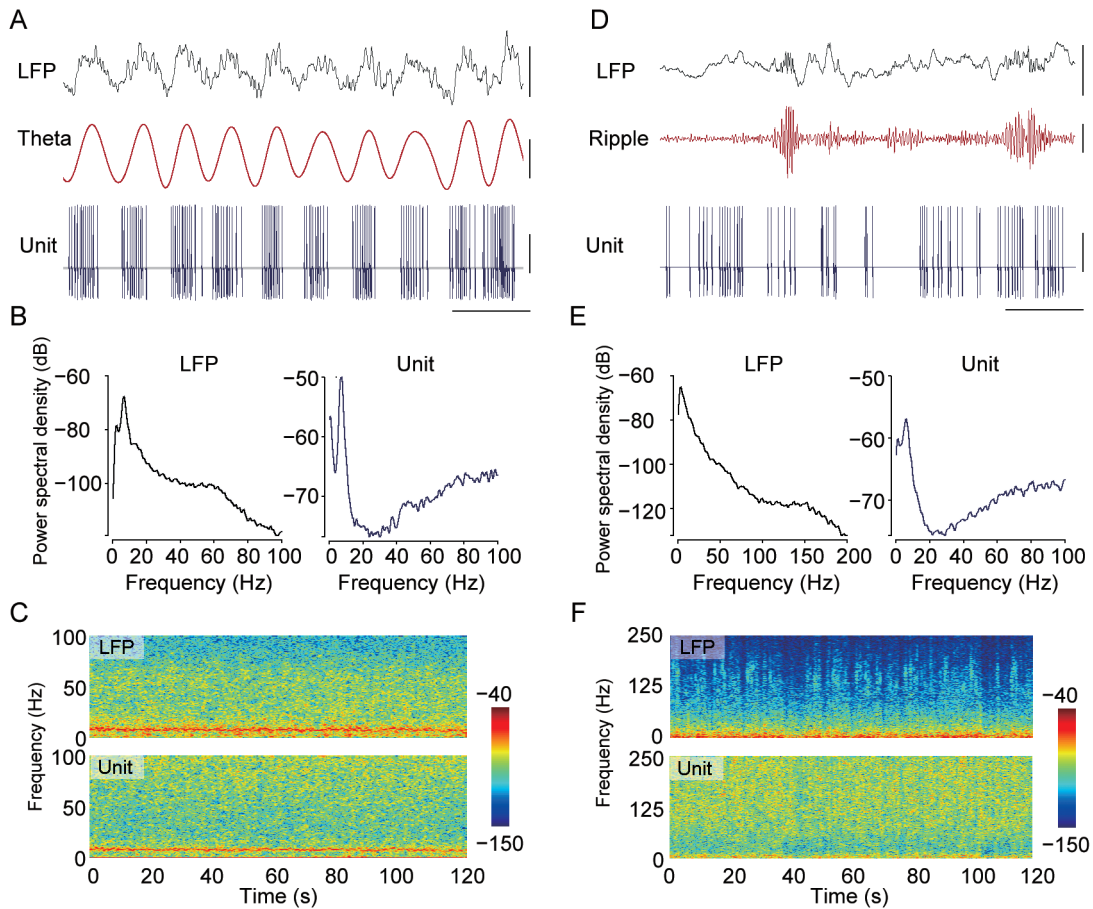


图 6. 动作电位与场电位的功率谱分析和实时频谱分析

Fig. 6. Power spectral density and spectrogram analysis of action potentials and local field potentials (LFPs). *A*: Originally recorded LFP (upper trace) and filtered theta oscillation (middle trace), as well as one single unit activity (lower trace) recorded from the same tetrode during active exploration. Scale bar: 200 ms, 0.5 mV for LFP and unit activity, 0.2 mV for filtered theta oscillation. *B*: Power spectral density (PSD) of LFP and unit spikes in *A*. Note the peaks at theta and gamma frequency range in the PSD of LFP and the theta frequency peak in unit PSD. *C*: Spectrogram analysis of LFP and unit activity in *A*. Note the continuity of theta activity in both spectrograms. *D*: Originally recorded LFP (upper trace) and filtered ripple oscillation (middle trace) along with corresponding single unit activity (lower trace) during slow wave sleep. Scale bar: 200 ms, 0.5 mV for LFP and unit activity, 0.1 mV for filtered ripple oscillation. *E*: PSD of LFP and unit spikes in *D*. Note the peak at ripple frequency range in the PSD of LFP. *F*: Spectrogram analysis of LFP and accompanying unit activity in *D*. Note the discontinuity of ripple activity around 150 Hz as well as the absence of theta activity in unit spectrogram.

关分析以及互相关分析等数据处理手段，研究其放电特性以及行为相关性。而对场电位信号，关键是要能不失真地提取出其中不同频段的节律性信号。

在单神经元放电信号的甄别与处理过程中，要尽可能地避免犯两类错误，一类是把两个或多个神经元的放电信号混淆成一个单神经元的放电活动；另一类则是把单个神经元的放电活动拆分成两个或多个神经元的活动。四电极技术的运用能明显地降低第一类错误的发生。而第二类错误的发生一般是由于在记录过程中，神经元放电波形的变异所致，

它需要实验者在实验过程中注意观察，并结合经验去判断。对于实验科学来说，误差是不可绝对避免的，为了判断单神经元放电序列的准确性，一般采用放电间隔的不应期污染指标。理论上来说，单神经元放电序列中的所有放电间隔，均不能小于神经元的不应期。但在具体操作上，若小于不应期（一般定为 1 ms）的放电间隔占该神经元放电序列所有放电间隔的比例小于 1%，则可考虑认为这是一个单神经元的放电序列。

按神经递质的性质划分，神经系统中主要有两

大类神经元, 即兴奋性的锥体细胞和抑制性的中间神经元。这两类神经元在形态、细胞膜表面分子标记、释放递质类型及功能上均有显著差异。多通道在体记录技术可以同时记录到局部脑区不同类型的神经元活动, 但是由于该技术不能对所记录的神经元进行标记, 因此无法对记录到的神经元进行准确的组织学上的分类和区分。不过对于多通道记录技术记录到的大量神经元, 可以借助动作电位的波形和放电模式上的一些特征, 来大致区分兴奋性的锥体细胞和抑制性的中间神经元。一般来说, 常用的区分锥体细胞和中间神经元的参数有胞外动作电位波形的半振幅时程和波峰-波谷时程, 中间神经元的这两个参数常较锥体细胞的小。此外, 在基础放电频率上这两类神经元也有较明显的区别, 锥体细胞的放电频率一般较低, 而中间神经元的放电频率则较高。依据这几方面的参数进行聚类分析, 可以对这两类神经元进行初步的区分^[16, 21]。

本文主要介绍了针对多通道在体记录技术的一些初步数据处理方法, 进一步的数据分析需要实验者结合具体的实验设计要求, 应用多种数学分析方法去实现。

参考文献

- McNaughton BL, Okeefe J, Barnes CA. The stereotrode - a new technique for simultaneous isolation of several single units in the central nervous-system from multiple unit records. *J Neurosci Methods* 1983; 8: 391-397.
- Jansen RF, Ter Maat A. Automatic wave form classification of extracellular multineuron recordings. *J Neurosci Methods* 1992; 41: 123-132.
- Gray CM, Maldonado PE, Wilson M, McNaughton B. Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *J Neurosci Methods* 1995; 63: 43-54.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Mamiya A, Buzsaki G. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving rat. *J Neurosci* 1999; 19: 274-287.
- Schmidt EM. Computer separation of multi-unit neuroelectric data: a review. *J Neurosci Methods* 1984; 12: 95-111.
- Lewicki MS. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network* 1998; 9: R53-R78.
- Schjetnan AG, Luczak A. Recording large-scale neuronal ensembles with silicon probes in the anesthetized rat. *J Vis Exp* 2011; 19: (56). pii: 3282.
- Pedreira C, Martinez J, Ison MJ, Quiroga RQ. How many neurons can we see with current spike sorting algorithms? *J Neurosci Methods* 2012; 211: 58-65.
- Wheeler BC, Heetderks WJ. A comparison of techniques for classification of multiple neural signals. *IEEE Trans Biomed Eng* 1982; 29: 752-759.
- Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Buzsaki G. Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 2009; 64: 267-280.
- Dragoi G, Carpi D, Recce M, Csicsvari J, Buzsaki G. Interactions between hippocampus and medial septum during sharp waves and theta oscillation in the behaving rat. *J Neurosci* 1999; 19: 6191-6199.
- Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 2002; 33: 325-340.
- Buzsaki G, Wang XJ. Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 2012; 35: 203-225.
- Dzhala VI, Staley KJ. Mechanisms of fast ripples in the hippocampus. *J Neurosci* 2004; 24: 8896-8906.
- Ma XY (马晓宇), Zhang YY, Wang LN, Lin LN. Multi-channel *in vivo* recording technique: Microdrive array fabrication and electrode implantation in mice. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2013; 65(6): 637-646 (Chinese, English abstract).
- Buzsaki G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2004; 7: 446-451.
- Schmidt EM. Instruments for sorting neuroelectric data: a review. *J Neurosci Methods* 1984; 12: 1-24.
- Harris KD, Henze DA, Csicsvari J, Hirase H, Buzsaki G. Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. *J Neurophysiol* 2000; 84: 401-414.
- Takekawa T, Isomura Y, Fukai T. Accurate spike sorting for multi-unit recordings. *Eur J Neurosci* 2010; 31: 263-272.
- Chorev E, Brecht M. *In vivo* dual intra- and extracellular recordings suggest bidirectional coupling between CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2012; 108: 1584-1593.
- Constantinidis C, Goldman-Rakic PS. Correlated discharges among putative pyramidal neurons and interneurons in the primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 2002; 88: 3487-3497.
- Bartho P, Hirase H, Monconduit L, Zugaro M, Harris KD, Buzsaki G. Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *J Neurophysiol* 2004; 92: 600-608.
- Zhang L, Chen G, Niu R, Wei W, Ma X, Xu J, Wang Z, Lin L. Hippocampal theta-driving cells revealed by Granger causality. *Hippocampus* 2012; 22: 1781-1793.