

讲 座

记录神经活动的光学技术进展

江丕栋

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

提 要

根据神经活动时神经细胞或其标记物光学性质的变化, 利用显微镜、二维光检测器、信号处理和显示系统, 可以同时监测很多位置上的神经元活动. 时间和空间分辨率高. 可对多位置的动作电位给出波形图阵列, 或由多位置动作电位的瞬时分布图形成动画. 可将脑的结构与功能结合起来, 形成功能神经解剖学.

关键词 神经活动, 光学记录, 多点记录, 膜电位, 伪彩色活动图, 功能神经解剖学

1 目的意义

研究中枢神经系统(CNS)的结构、功能及其信息加工, 一般应用电生理、组织化学、生物化学、心理物理和行为等方法. 组织学研究表明, 神经元连接成复杂的回路和网络. 任何一个感觉信息加工, 都涉及上百万个互相联系的神经元的活动. 于是, 单个神经元的活动都将受网络活动所调制, 其响应性质也受其它神经元活动所影响. 特定网络的活动, 也受其它神经元网络中神经元活动所影响. 因此, 要研究神经系统的功能, 了解神经活动, 就要了解神经网络各神经元的活动, 以及它们之间的连系, 就需用各种多导记录仪器. 记录神经活动的方法很多. 用微电极实时记录, 有损伤且仅限于少数神经元记录, 通常不能同时记录五点以上. 采用 ^{14}C 标记的2-去氧葡萄糖得到的脑活动代谢图, 可以在一次试验中, 对整个活动区域仔细地定位, 但测量时间需几十分钟, 且只能进行一种实验. 其它方法如脑电图、脑磁图、正电子发射断层照相术、核磁共振成像、血流放射性成像等, 有一定的时间分辨(实时)或空间分辨(三维), 但还不能满足要求.

观察较快的神经活动, 需提高记录的时间

分辨能力. 观察神经活动的传递, 要求有相当的空间分辨能力, 以便了解突触传递情况, 了解神经元之间的联系. 有一定的空间分辨能力, 还可了解钙离子进入一个细胞的部位, 以及移动过程. 为观察网络活动, 了解各个神经元之间的相互作用, 还要求能记录一定的空间范围, 对多位置神经活动时成像.

根据神经活动时神经细胞或其标记物光学性质的变化来记录神经元活动, 可以满足上述要求. 这种光学方法可分为四类: 光散射和双折射的变化; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)荧光的变化; 钙敏感染料和膜电位敏感染料的荧光或光吸收的变化.

所用染料-标记物有以下几类: a. 钙离子浓度的染料指示剂, 如: 水母发光蛋白(aequorin), 偶氮胍(arsenazo) III, 四羧酸盐指示剂等. b. 膜电位光吸收指示剂, 如: WW375, NK2367, RH155等. c. 膜电位变化荧光指示剂, 如: 苯乙烯染料(RH414, RH241), Oxonals(NK3041, RH155, WW781), 部花青(merocyanine, WW375)等.

2 发展过程

1949年, Hill 和 Keynes 对甲壳类神经干进行了一系列刺激, 观察到光散射变化. 1968年, Cohen 观察到神经元和单轴突的光散射和巨大纤维的双折射变化. 首次提出了光学方法.

1964年, Aubert 等对起电盘 (electrophorus) 电感官片层观察到 NADH 荧光变化. 1974年 Schuette 等第一次对脑的活动作多导测量, 采用象增强器和摄象机, 观察癫痫发作时脑皮层的 NADH 荧光变化. 1977年, Salzberg 和 Cohen 等用几只光电二极管, 同时记录了无脊椎动物 CNS 中的几个神经元. 1981年, Grinvald 和 Cohen 等用 124 个光电二极管阵列记录了无脊椎动物的神经节.

1966年, Jabosic 用染料骨螺紫 (murexide) 来指示荧光随钙离子浓度的变化, 研究蟾蜍缝线肌中钙的释放和再吸收.

Ross 和 Cohen 等人 1974 年用染料光吸收变化, 1977 年用双折射变化, 记录了巨大轴突的活动.

1968年起, Cohen 等人用膜电位敏感染料记录了轴突的膜电位变化, 此后进行了很多工作.

3 膜电位变化测量法

用光学方法记录神经元活动, 其中应用最广泛的是利用电压敏感染料的光学信号来记录神经活动. 其原理是: 电压敏感染料分子与细胞膜结合, 成为分子换能器, 因膜电位变化而产生光学信号 (吸收或荧光变化). 与被染细胞电活动 (在微秒内) 同时发生, 并呈线性关系的光信号, 经显微镜达到二维光检测器, 转为电信号. 电信号经过加工 (放大, 滤波, 模/数转换), 可显示出神经活动过程, 取样率可达 7kHz. 其观察范围可达到几个平方毫米的区域.

此法有许多优点: a. 可同时监测很多 (> 100) 位置上的神经活动, 如很多神经元或一个神经元的不同部位; b. 基本是无损测量, 可测

膜过程, 如 T-tubulus 和突触前末梢. 微电极测不了这么小的范围; c. 时间分辨在亚毫秒级; d. 空间分辨率高, 可以分辨出皮层功能柱; e. 可对活动物实时记录; f. 同一动物既是实验对象又可同时做为自己的对照, 可同时接受几个连续刺激; g. 光信号直接反映了就在 (每个光电二极管) 所观察位置发生的电事件 (如细胞内膜电位变化).

需要注意的问题是: a. 光信号小, 应设法减弱噪声的影响; b. 应排除染料对生物体的药理效应和光动力损伤; c. 应减少深层光信号的影响.

4 测量技术

包括显微镜、光检测器、信号处理器和显示四个方面.

4.1 显微镜

并行方式. 被观察的脑区域或大量神经细胞经显微镜物镜成象. 样品上各点标记物所发出的光同时被收集.

串行方式. 经典的扫描显微镜, 点光源扫描到客体上, 客体每点所散射的光依次经过显微镜成象在 (非空间分辨的) 光检测器上. 象点相应地在焦平面上扫描, 形成客体的象. 空间分辨与并行方式同, 由显微镜决定.

另一种串行方式是用共焦扫描显微镜, 点光源和点检测器共焦. 检测器前的小孔光阑可阻止客体上焦点周围的散射光使之不被接收, 使侧向分辨改进 1/3; 还可以阻止在焦平面以外的光使之散焦, 以减小焦点深度, 提高纵向分辨率.

4.2 光检测器

光学记录方法的最大特点是实现多位置记录, 故将光信号转变为电信号时采用二维光检测器. 常用的有:

a. 电视摄象机. 电荷耦合器件或光导摄象管 (vidicon) 与显微镜结合, 组成电视显微镜.

空间分辨能力尚可. 但动态范围小 (少于 10^3), 帧频低, 故应用范围有限.

b. 光电二极管阵列. 光电二极管可以覆盖

所需要的动态范围. 用光电二极管形成二维阵列, 可将样品上各点发出的光并行读出. 空间相元决定于阵列的数目, 通常是几百个二极管.

4.3 电信号处理

检测器给出的模拟电信号要经过预处理(放大、滤波); 然后数字化; 送至计算机进行加工, 最后以所需要的方式显示出来.

4.3.1 电视系统的信号处理

对于用普通显微镜并行收集的光信号, 如用电视系统进行光电转换, 输出的模拟信号是串行的. 预处理只需单通道, 包括一套电流/电压转换器、滤波器(低通, 交流耦合)、放大器.

由于电视系统的帧频低和动态范围小, 其应用只限于对时间分辨要求不高的少数实验. 第一个报导的是1986年 Blasdel 和 Solama 在灵长目(猴)完整的皮层上, 看到神经活动的静态空间图形是决定于视刺激的空间模式. 1988年 Kauer 用蝶螈的嗅觉系统进行实验, 对蝶螈嗅球局部回路中的诱发活动做了实时成象.

4.3.2 光电二极管阵列系统(PDM)

用普通显微镜将物体成象在光电二极管阵列上, 各个二极管元的光电流并行送至各个模拟信号的预处理器. 众多光电二极管之并行系统, 需要多个低速信号处理器. 每个预处理器包括V/A转换, 滤波及放大. 为将并行信号变为串行信号, 要用一个多通道电路进行编码. 然后就可送至一个A/D转换器, 将信号数字化后, 送至计算机进行加工, (例如信号平均, 漂白校正等). 然后由显示单元显示, 并行观察. 最初是在1981年由 Grinveld 和 Cohen 等人用以监测分离的无脊椎动物神经节中许多神经元的活动, 使用含124个元素的光电二极管阵列. 此后, PDM 广泛应用于研究神经网络. 应用范围由简单的离体无脊椎动物样品到哺乳类脑的在位监测, 包括: 爪蟾(*Xenopus*) 垂体后叶中激发-分泌偶联; 完整无脊椎动物样品的行为相关活动; 哺乳类脑片中兴奋的扩展; 海马中突触传递的长时程增强; 脊椎动物和哺乳类完整脑中诱发的局部活动. PDM 系统也应用于蝶螈

嗅觉系统(蝶螈嗅球124个区域).

4.3.3 激光扫描系统

经典的扫描显微镜与单个光电二极管(PD)或光电倍增管(PMT), 形成一个“串行”的记录系统. 光电流送至单个模拟信号预处理电路, 进行A/D转换, 数字处理和显示. 串行系统的信号处理器只需一个, 但要高速. 这样的激光扫描系统未见有成功应用于神经网络的报导, 但用此系统与电压敏感染料曾用于非神经网络, 监测可兴奋细胞(如心肌细胞)的兴奋扩展. Dillon 和 Morad 在1981年报导了测量心脏中动作电位的传播.

4.3.4 共焦系统

共焦显微镜在观察形态时很成功, 但光学记录神经活动则不大成功. 原因在于: 稳定性差(检测到的光, 非光子涨落 $D < 10^2$); 商品共焦显微镜的时间分辨极低(帧频 $> 1s$).

4.4 显示

多位置记录, 需要用二维的数据显示系统, 例如用高分辨图形显示器来监视很多位置的局部神经活动, 并叠加在电视图象上.

5 多位置神经活动同时显示

5.1 页显示 给出各部位膜电位波形图的阵列. 即将各个部位一段时间内动作电位波形变化过程, 按照各部位空间位置表现在同一屏幕上.

5.1.1 Cattarelli 和 Senseman 在1990年报导了用于研究蝶螈嗅觉系统. 用电压敏感染料 WW375 (0.8mg/ml), 注入半透明的蝶螈前脑, 染45min.

5.1.2 用光学显微镜的物镜, 将组织样品——脑半球的右侧表面成实象到 12×12 的硅光电二极管阵列表面. 对于 $7 \times$ 物镜, 每个二极管监测脑组织 $183\mu m \times 183\mu m$ 的小区域.

5.1.3 用塑料吸附电极对横断嗅神经加短的电刺激 (0.7ms, 50V). 12×12 硅光电二极管阵列的光电流并行送至124道放大器, 124道A/D转换器, 32位微计算机数据采集系统. 经数字化和图象处理, 将 12×12 个膜电位波形

图阵列在同一个屏幕上显示出来。

5.2 伪彩色活动图(PAM)显示 给出每一时刻的对应于各部位微小区域膜电位值的阵列。

5.2.1 将注入电压敏感染料 WW375 (0.8mg/ml) 的半透明蝶螈前脑右侧表面, 成实象到 12×12 的硅光电二极管阵列表面。

5.2.2 电视成象: 将 PDM 换为 TV 照相机, 所摄得蝶螈嗅球右侧表面的图象信号记录在光盘上, 然后对选出的图象用图象处理系统数字化, 最后送至图形工作站。

5.2.3 光信号与电视图象对准: 把二极管阵列的位置叠加在 TV 图象上, 使位置对准。

5.2.4 伪彩色: 将 124 个光学信号波形的幅度归一化, 然后将 124 个方形小区域按照每个波形幅度大小标以不同颜色, 由基线为暗绿色开始, 向正方向幅度越大, 波长越长; 直至最大值为暗红色, 负值由蓝变到紫色, 共 14 阶伪彩色, 每阶差 10%, 共 124 个彩色方块网点, 形成 PAM, 叠加在灰阶的 TV 图象所对应的位置上。

5.3 PAM 动画显示

用两个缓冲器分别存放相邻时间的两个 PAM, 交替显示, 即形成动画电影。加短暂的电刺激 (0.7ms) 后, 每隔 1ms 给出一帧。

由 PAM 的动画显示, 可以看到在刺激后神经回路及脑中不同部位的活动的强度及其扩展过程, 即显示出诱发响应的空间-时间过程。还可得到响应的传播速度, 沿植入锥为 0.1m/s。

应用: Senseman 用于观察蝶螈的嗅球。他用 0.7ms 的短暂刺激作用于嗅觉神经, 可将脑的结构 (表面形态) 和脑的功能 (神经活动) 结合起来, 并可形象地直接观察, 被称为一种新的神经解剖学——“功能神经解剖学”。其优点是: 时间分辨好 (1ms/帧); 光信号大, 不需多次平均。

PAM 动画显示与各二极管波形显示 (“页显示”) 两种方法可互相补充。从页显示可发现特大噪声或某二极管失效, 消去后可使伪彩色

化的归一化可靠。PAM 显示则可选取特定部位, 进一步分析该处的波形。

5.4 PAM 技术的改进

5.4.1 提高空间分辨。制造更多象素的二极管阵列。例如由 12×12 发展到 24×24 , 已有人使用 484 及 128 000 个相元的阵列。

5.4.2 三维定位。利用“光学切片”技术, 可得到三维的 PAM。

6 技术发展

6.1 寻求与膜电位有关的其他光学性质的变化, 用以反映神经活动。如能量转移, 旋光性或拉曼散射, 以及红外吸收的变化。

6.2 寻找或设计新的染料。

6.3 改进仪器:

6.3.1 提高信噪比

串行和并行的检测器商品已具有高的空间分辨能力、高帧频和足够的动态范围。

还需提高信噪比 (S/N)。为增加单个检测器元上所达到的光子数目, 要有更强的照明光, 可以用激光。但如果用激光扩束均匀照明, 会由相干引入斑点 (speckle) 噪声。最可取的解决办法是用荧光技术, 并用点照明, 即“激光扫描荧光显微术”。

6.3.2 散射问题的解决办法

通常多数样品的内在光散射都很强, 若不是共焦观察, 会导致空间分辨大大降低。哺乳类神经甚至在组织水平也表现出散射性质, 像完整的脑结构那样的厚样品, 也是如此。

共焦显微术最可取, 但不用标准的串行技术。而是使检测器针孔与点光源同步扫描, 可作为电子控制“飞针孔”。

6.3.3 三维光记录

可用上述光学切片方法来作神经活动的三维光记录。P. Saggau 用商品共焦显微镜, 高空间分辨 ($n=512 \times 512$), 低时间分辨 (帧频 $< 1\text{Hz}$), 发现在表面下 100—200 μm 之间能清楚地成象。所用样品是不同厚度的海马脑片, 用电压敏感荧光染料。结果与其它人的发现相符。

6.3.4 串行与并行

并行系统包括普通显微镜, PDM, 与每个检测器元相对应的局部的低速处理器 (包含一个模拟预处理电路和一个 A/D 转换器), 和一个微计算机。

串行系统包括扫描显微镜、单个光电二极管和单个高速处理器。

未来的系统将是并行与串行二者组合, 由特定的样品和实验来决定, 但多数将应用共焦原理。

参 考 文 献

- 1 Cohen L. Special topic: Optical approaches to neuron functions. *Annual Review of Physiology*, 1989; 51: 487-560
- 2 Schild D. *Chemosensory information processing* (NATO ASI Series, Vol. H39), Berlin: Springer-Verlag, 1990; 291-347
- 3 Hopp H P, Wu J Y, Falk C X *et al.* Multisite optical measurement of membrane potential. In: Boulton A A *et al.* eds, *Neuromethods*, Vol. 14: *Neurophysiological techniques: Basic methods and concepts*, Clifton: The Humana Press, 1990; 193-226

欢迎订阅《生物工程进展》

本刊于 1976 年创刊, 由中国科学院文献情报中心、北京生化免疫制剂中心主办, 是中国生物工程学会会刊, 是我国第一家报道生物工程研究进展的刊物。

本刊主要报道国内外生物工程高技术领域的重大研究进展、学术报告、动态、生物工程专利、国际学术交流信息、商业生物技术情报, 介绍国内外生物工程政策、规划及我国发展生物工程及产业化的对策, 报道经济建设主战场上的生物工程消息、人物, 宣传生物工程企事业单位和新技术新产品, 为促进我国生物工程高技术及产业发展提供全方位多层次多侧面的服务, 本刊曾两次获得中国科学院科技进步奖。

读者对象是: 生物工程领域科研院所、大专院校、科技企业、大中型企业和乡镇企业、各

级科委、各地高新技术产业开发区以及生物工程计划决策与服务部门的科技工作者和管理人员。

本刊为双月刊, 16 开 64 页, 每期定价 2.50 元, 邮发代号 18-132, 全国各地邮局均可订阅。

本刊欢迎刊登广告, 编辑部和广告部地址: 北京市中关村科学院南路 8 号 (100080), 联系人: 张宏翔, 电话: 2553167。

发行部地址: 北京市王府井大街 27 号 (100710), 联系人: 周鸿业, 电话: 556180。

编辑部现编辑有《生物工程信息快报》(月刊), 报道国内外生物工程科研与产业最新消息、最新成果、专利、动态, 每期工本费 8.00 元。订阅者请向《生物工程进展》编辑部索取订单。