

脑内源信号光学成像术: 猫视皮质方位功能柱的活体显示

俞洪波^{1,2}, 邢大军¹, 寿天德^{1,2,3}

(1. 复旦大学生命科学学院脑科学研究中心、立人实验室, 上海 200433; 2. 中国科技大学生命科学院视觉研究实验室, 安徽 合肥 230027; 3. 中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放实验室, 北京 100101)

[摘要] 脑内源信号光学成像术是目前为止空间分辨率最高的一种活体脑成像技术, 它为大范围皮质的功能构筑研究提供了有力工具。本文介绍了应用这一技术显示活体猫视皮质的方位功能柱的方法, 此方法基本上也适用于其他皮质的功能构筑研究。

[关键词] 光学成像; 内源信号; 方位功能柱; 视皮质; 猫

Visualization of the functional orientation columns in the cat visual cortex by in vivo optical imaging based on intrinsic signals

YU Hong-bo^{1,2}, XING Da-jun¹, SHOU Tian-de^{1,2,3}

(1. Center for Brain Science Research and Liren Lab, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Vision Research Lab, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026; Lab of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

[Abstract] The optical imaging based on intrinsic signals is the one with the best spatial resolution among *in vivo* brain imaging techniques. It becomes a powerful tool for studying functional architecture of the cortex in a large scale. We describe the method using this technique to show the orientation columns in the cat visual cortex. Basically, it is also suitable for studying functional organization of other cortex.

[Key words] optical imaging; intrinsic signal; orientation column; visual cortex; cat

20世纪70年代以来,许多脑成像技术如X-射线断层成像术(X-CT)、磁共振成像术(MRI)、功能磁共振成像术(fMRI)、正电子发射断层成像术(PET)的出现,使得神经科学家和医生们不仅能在活体动物和人观察到脑形态的变化,而且能观察到某些脑功能的变化,为揭示脑的奥秘提供了强有力的新方法^[1]。

1982年Grinvald使用电压敏感染料于海马脑片研究中,以光学记录成像技术显示出明显可见的神经元电活动扩散现象^[2]。这种方法依赖于电压敏

感染料将神经元的电活动转换为光学信号,用光敏器件进行检测,从而把神经元的电活动转变为可视图像。但是,电压敏感染料存在光毒性药理学副作用,使用受限制。1986年Grinvald等终于找到与神经元活动相关的脑内源性光学信号,并用光学成像方法显示了大脑皮质的功能构筑^[3]。这种基于内源信号的光学成像(optical imaging based on intrinsic signals)是目前为止空间分辨率最高(达0.1mm)的一种整体动物脑成像技术,经过十多年的改进,已经逐步完善。我们于1998年11月在复旦大学研制成

[文章编号] 1008-0872(2000)04-0355-05 [中图分类号] Q 436 [文献标识码] A [收稿日期] 2000-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金重大项目课题(39893340-3),上海-联合利华研究和发展基金(9805)项目和中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放实验室项目 [通讯作者] 寿天德 [联系电话] 021-65642355

[作者简介] 俞洪波(1973-),男,中国科技大学生命科学院视觉研究实验室博士研究生,从事视觉信息加工中枢机制的研究。



功国内首套用于脑研究的内源信号光学成像系统^[4],并开展了视觉领域的科学研究,正在取得一些新的成果^[6-8]。

1 材料和方法

1.1 原理 在一定刺激条件下,脑内神经元的兴奋,将可能引起神经元快速的神经活动(如递质释放、细胞间隙的扩张与收缩、毛细血管的扩张、水分子的转运等),并由此导致散射光的变化;引起神经元代谢活动的骤增,继而使附近毛细血管中去氧血红蛋白的量升高;接着又会引起局部血流的增加,局部毛细血管中氧合血红蛋白升高。这三种生理过程,将会使局部脑对特定波长光的吸收率发生变化。利用上述与脑内神经元活动关联的光学变化,用电荷耦合器件(CCD)摄像机便可将整片脑区中的兴奋区域和相对不兴奋区域记录下来,并用计算机图像处理技术区分出来,显示于二维平面上。Fig 1表示内源性信号的几种不同成分在刺激4 s前后的变化时程。各成分的相对贡献均以最大值归一化后的百分率表示,且与光源光照的波长有关。显然,散射成分紧跟神经元活动,出现最快,而与脑微循环相关的其他成分则慢得多。

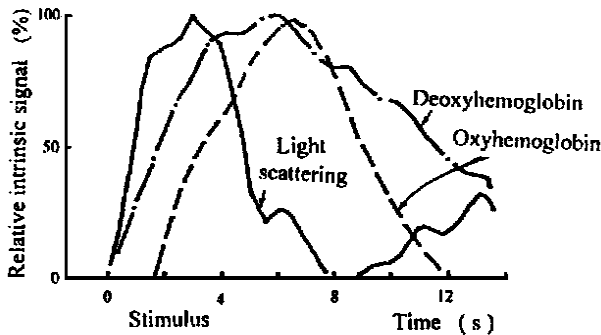


Fig 1 Time course of different components for cortical intrinsic signals before, during and after grating pattern stimuli. The relative contributions are normalized (from Bonhoeffer and Grinvald, 1996^[11])

1.2 实验系统 Fig 2表示这套光学成像系统的示意图。该系统由光学成像系统和视觉刺激系统两个子系统组成。前者由可见光光源、CCD摄像机(A rea Scan, Canada)和计算机图像处理及显示器等组成,后者由计算机图像发生器和高分辨率显示器等组成。CCD摄像机安置在可在垂直方向上微调(精度2 μm/分度)的架子上,其帧扫描速度为16帧/秒,空间分辨率为24 μm,景深为0.1 mm左右。视觉刺激为方波光栅图形,其平均亮度为15.1 cd/m²,对比度为0.9,时间频率为2 Hz,光栅方位(orientation)

和空间频率等参数均可按需选择。光源经滤色片发出波长为640 nm的红光经光纤照射皮质表面,记录动物双眼受不同方位的条形运动光栅刺激时的皮质方位功能图。用波长为550 nm的滤色片产生绿光照射皮质,记录动物脑表面血管分布图。

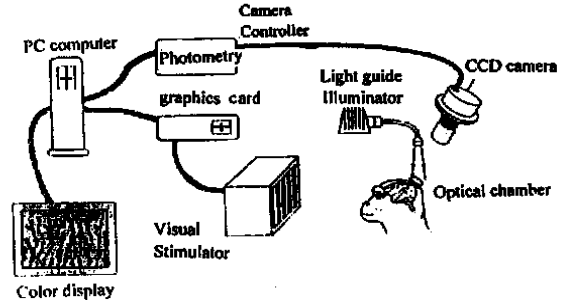


Fig 2 Diagram of the optical imaging system based on intrinsic signals and visual stimulating system

1.3 动物准备 将体重为2~3 kg的猫在盐酸氯胺酮(25 mg/kg)麻醉下,施气管插管和静脉插管术。以戊巴比妥钠(3 mg/kg·h)和三碘季胺酚(10 mg/kg·h)连续静注,保持动物轻度麻醉和麻痹状态。用人工呼吸机维持动物呼吸,使呼出的CO₂含量为4%左右。体温控制在38℃,连续监视动物心电图和脑电。用阿托品(1%)和新福林(5%)扩瞳以防止瞬膜收缩。为动物配戴接触镜并矫正视力。经在实验动物P1, L3处开颅,暴露初级视皮质(17区)后,用牙科水泥在皮质处颅骨上,粘连一个不锈钢制顶部为玻璃窗口的透明小室,内注入有一定液压的甲基硅油以保持皮质表面波动最小,并防止气泡入内。

1.4 数据处理 由于光学成像信号微弱,其变化量仅为1/1000,故功能图需经叠加平均处理,方能显示。本实验中图形刺激时间为2 s,刺激间隔为10 s,重复刺激8~64次。先将摄像机每秒采样的16帧图像平均为一幅图,然后将同一刺激条件重复刺激的、同一相应时刻的平均图再行叠加平均为一幅图。我们使用“第一帧分析”技术,即把采样单位的每帧图像都减去第一帧未加刺激时采集的图像,可以有效地消除0.1 Hz以下的慢波干扰。

2 结果

2.1 方位功能图 Fig 3为猫初级视皮质区对六个不同方位(0°~180°)的光栅图形刺激所引起的光学成像图。图中呈黑色的条纹或斑纹(平均宽度为0.5 mm)表示动物在不同方位的光栅刺激时所记录到的皮质细胞反应兴奋区的分布。很显然,尽管不同方位的光栅刺激所得的光学成像方位图图案是不同

的,但左右两图(刺激光栅方位相差 90°)在空间上均呈镶嵌互补的分布关系(为清楚起见,在底部两图中用黑线勾划出对应的脑区)。这说明无论刺激光栅方位如何,只要一对刺激光栅方位相互垂直,则其相应的皮质方位图在空间上总是镶嵌互补的。这就提示,相邻的方位柱之间可能存在正交侧抑制作用(lateral cross-orientation inhibition)。

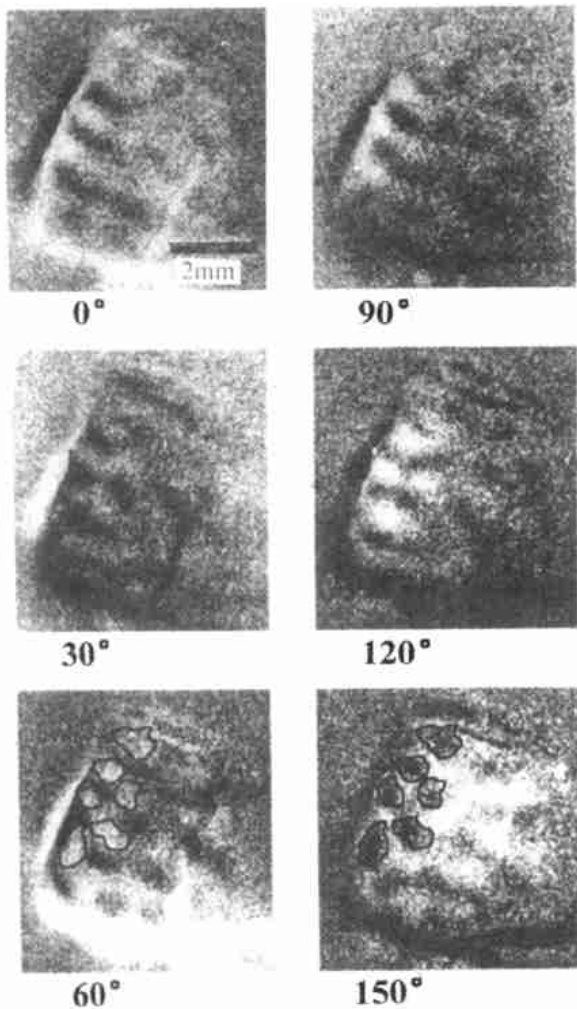


Fig 3 The cortical areas (dark stripes or areas) visually activated by six grating stimuli of different orientations in the primary visual cortex of the cat, showing roughly complementary mosaic relationship between the optical pattern pairs elicited by two gratings orthogonal each other. The numbers under each figure represent the orientations of stimulus grating used. The dark scale bars indicate 2 mm

2.2 方位功能柱(三维方位功能图) 由于我们在所用 CCD 摄像机前安装了特殊的放大镜,使得系统的成像景深很浅($< 100 \mu\text{m}$),安装在垂直微调的机械装置上的摄像机因此便可在视皮质的不同深度层次上,记录方位功能图。如 Fig 4 所示,本系统在深达 1.1 mm 范围内的不同层次上(也即视皮质 I, II + III 和 IV 层)均记录到形状一致的方位功能图,证明

视皮质方位柱的三维分布在活体动物确实存在。更深皮质的方位图则因脑组织自身的光吸收和散射而变得模糊不清了。然而,比国际上已发表的光学记录深度 0.9 mm,我们的系统显得更为优越。

在本实验条件下,同一侧脑区的光学成像方位图十分稳定,一般保持 3~4 昼夜不变,最长时可达 6 天 5 夜,说明猫的视皮质方位功能柱是由十分稳定的神经解剖学结构基础(如通路和网络)所决定的。

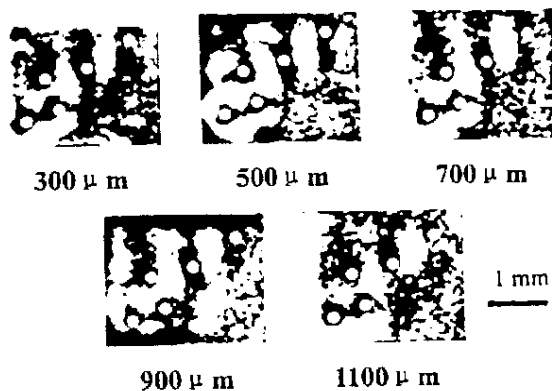


Fig 4 Orientation column patterns revealed by optical imaging at different depths under the surface of the primary visual cortex, as showed by numbers in μm . These patterns are quite similar. Black scale bar: 1 mm

2.3 方位功能柱的时间特性 本系统的摄像机以每秒 16 幅的速度连续记录皮质光学成像图像,我们观察到在光栅刺激(第 1.0~3.0 s)前和开始时,脑区中除了血管虚影外呈一片空白,第 1.5 s 时黑白条纹功能图形始隐约出现,随时间推移第 3~4 s 时的方位图变得最为清晰。随后功能图逐渐消退,至第 6 s 时已变得难以区分。值得注意的是整个过程中方位图清晰度随时间而变,但方位功能图的形状和空间分布没有变化(Fig 5)。方位图清晰度最高出现于刺激后 3~4 s 时与 Fig 1 原理图中去氧血红蛋白含量最大值出现时间一致,说明本方位图主要由神经元兴奋引起代谢增强,造成血液去氧血红蛋白含量上升,局部皮质变暗所致。

2.4 视网膜拓扑投射关系 我们用小面积的光栅刺激图形,分别刺激动物的上、下视野,获得了两个皮质位置不同的局部方位功能图,如 Fig 6 所示。上视野刺激产生的方位图黑白条纹显现于后侧皮质区(A);下视野刺激产生的方位图显现于前侧皮质区(B);当上下视野同时受刺激时所得的方位图则出现于皮质前后区(C)。说明光学成像的视觉功能图分布与视网膜对视皮质拓扑投射的解剖学关系完全一致。

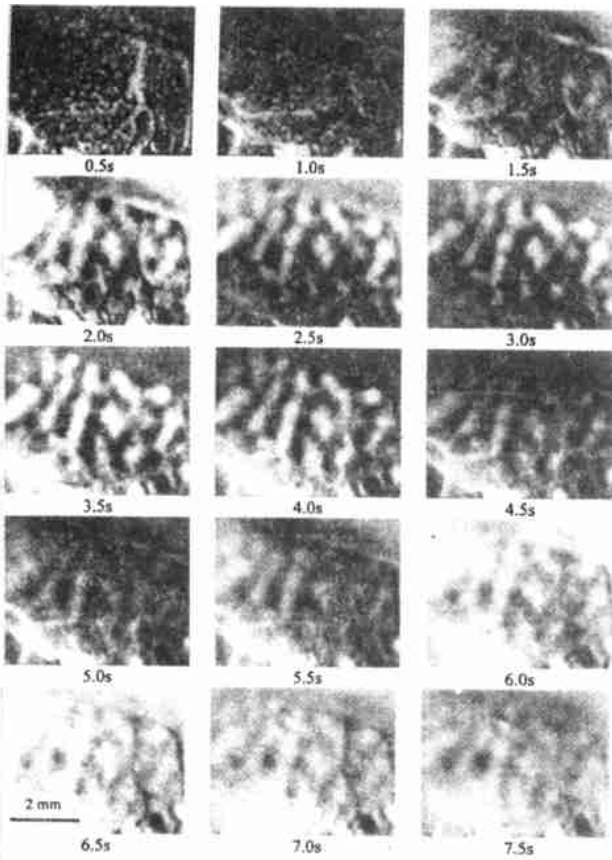


Fig 5 The cortical optical images obtained at different times showing the appearance and dimishment of orientation column pattern on the cortex. The stimulus duration was from 1.0 s to 3.0 s. Black scale bar: 2 mm

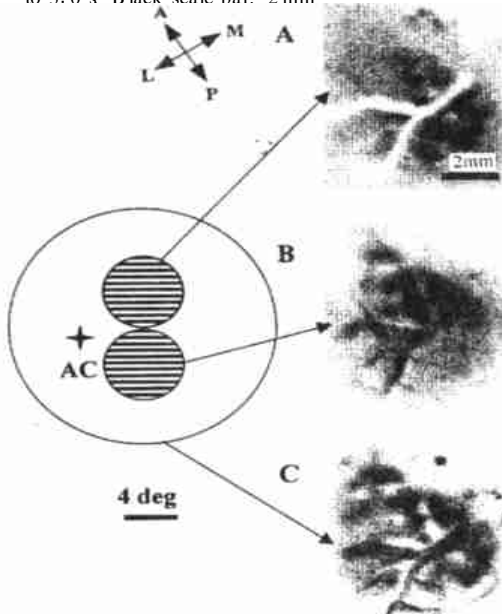
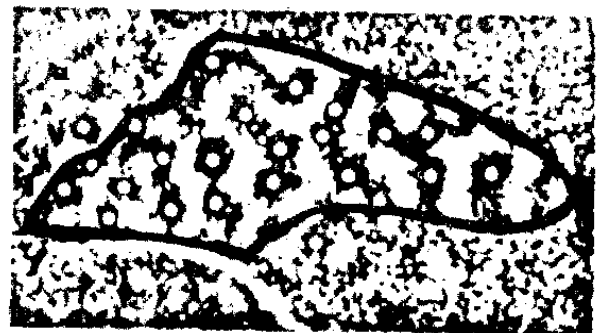


Fig 6 Cortical orientation column pattern distributions elicited by two respectively local grating stimuli on the upper (A), lower (B) visual fields and the two visual fields (C). AC, the projecting position of the area centralis in the cat retina. A, anterior; L, lateral; M, medial; P, posterior. Black scale bars: 2 mm on the cortical map; 4 degree in the visual field

2.5 空间频率依赖性 当我们使用不同空间频率的、相同方位的光栅刺激时,发现所得皮质17区方位功能图黑白条纹清晰区随空间频率不同而发生位移(Fig 7)。空间频率高的(即较密的)光栅刺激引起的方位柱图形所在位置靠近后侧皮质,即接近于对应于视网膜中央区域的视皮质部位;较低空间频率(即较疏的)光栅刺激引起的方位柱图形则靠近皮质前侧,即对应于视网膜周边区域的视皮质部位。这种方位功能图对空间频率的依赖性,为视皮质空间频率功能柱的存在提供了证据。



SF= 0.8 cycles/degree



SF= 0.5 cycles/degree



SF= 0.2 cycles/degree

Fig 7 Orientation column patterns elicited by visual grating stimuli of different spatial frequencies (SF). The clearest pattern which was elicited by the lower SF (0.2 c/deg) grating, indicated by thick dark lines, is located at the right lower side of the figure (anterior cortex), while the one by higher SF (0.8 c/deg) at the left upper side (posterior cortex); and the one by medial SF (0.5 c/deg) in between. Black scale

bar: 2 mm

此外,使用内源信号脑光学成像术,我们观察到更多的神经元的最优方位取向于垂直和水平方位,从而为心理学“倾斜效应”(The oblique effect)提供了神经生物学基础^[7,8]。

3 讨论

根据一年多来的实验经验,我们认为应用基于内源信号的脑功能成像技术研究脑功能组织,特别需要注意的关键技术环节是:动物呼吸必须维持好,使呼出的CO₂含量为4%左右;硬脑膜剥离时须尽量防止出血;麻醉水平须合适,剂量不能太大;不锈钢顶部玻璃小室内甲基硅油液压必须适中,太大会压迫血管影响正常皮质功能,太小则皮质表面波动难以消除。此外,小室内甲基硅油的温度也须保持温和。

综上所述,基于内源信号的脑功能成像技术为整体动物的大脑皮质(特别是视皮质)大范围的功能组织研究提供了有力的工具,它使过去只能用2-脱氧葡萄糖同位素标记和放射性自显影技术才能显示的皮质功能柱得以长时间的实时显示。它不仅可以用来研究视觉皮质,而且可以用来研究听觉皮质、体感等皮质的功能。这种技术与微电极单细胞记录技术、脑内微量电泳技术、神经药理学技术、各种免疫组化荧光染色技术乃至分子生物学技术结合,将可以在功能意义明确的脑区展开深入的研究,把分子和细胞水平的事件与整体功能联系起来,实现分析方法和综合方法的有机结合,更加有利于阐明大脑皮质如何进行工作的基本原理。复旦大学脑研究中心视觉研究小组的师生们正沿着这一路线工作着,

已获得一些可喜的成果正在陆续发表中。另外,用脑内源信号光学成像技术于某些动物的行为研究时,可以在不开颅情况下进行记录^[1]。也已有人于脑外科手术时开始应用此技术尝试研究人的脑功能^[9],展示了内源信号光学成像技术的诱人前景。

[参考文献]

- [1] Bonhoeffer T, Grinvald A. Optical imaging based on intrinsic signals: the methodology. In: Brain Mapping: The Methods (Toga AW, Mazziotta, eds) [A] San Diego: Academic, 1996, pp55~ 97.
- [2] Grinvald A. Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage sensitive optical probes [J] J Physiol, 1982, 333: 269~ 291.
- [3] Grinvald A. Functional architecture of cortex revealed by optical image of intrinsic signals [J] Nature, 1986, 324: 361~ 364.
- [4] 张昆,俞洪波,寿天德.基于内源性信号的脑光学成像系统的研制[J]生物物理学报,1999,15: 596~ 604.
- [5] 俞洪波,张昆,寿天德.脑光学成像结合药理学研究:印防己苦毒素对脑初级视皮层方位功能柱图的作用[C]中国神经科学学会第三届全国学术会议(摘要),1999, P208.
- [6] 俞洪波,寿天德.用脑光学成像术研究不同空间拓扑位置猫初级视皮层的空间频率反应特性[J].生理学报,2000, 52: 411~ 415.
- [7] 俞洪波,寿天德.脑光学成像术揭示的猫初级视皮层方位倾斜效应[J].生理学报,2000, 52: 431~ 434.
- [8] Appelle S. Perception and discrimination as a function of stimulus orientation: The effect in man and animals [J] Psychol Bull, 1972, 78: 266~ 278.
- [9] Haglund MM, Ojemann GA, Hochman DW. Optical imaging of epileptiform and functional activity in human cerebral cortex [J] Nature, 1992, 385: 668~ 671.

(上接第 332 页)

- [7] Sidell N, Wada R, Han G, et al. Phenylacetate synergizes with retinoic acid in inducing the differentiation of human neuroblastoma cells [J] Int J Cancer, 1995, 60(4): 507~ 514.
- [8] Lipschutz JH, Samid D, Cunha GR. Phenylacetate is an inhibitor of prostatic growth and development in organ culture [J] J Urol, 1996, 155(5): 1762~ 1770.

- [9] Manabe S, Ohsawa K. Effect of excess phenylacetate diet during pregnancy on fetal brain growth in rats [J] Tokushima J Exp Med, 1993, 40(3~ 4): 137~ 145.
- [10] Swaiman KF, Wu SR. Phenylalanine and phenylacetate adversely affect developing mammalian brain neurons [J] Neurology, 1984, 34(9): 1246~ 1250.