

引文格式:

张曦昊, 詹阳. 用于长期神经元放电记录的一体化可步进植入式神经电极 [J]. 集成技术, 2022, 11(6): 67-74.

Zhang XH, Zhan Y. An implantable movable electrode with the integrated structure for chronic recordings of spiking neural signals [J]. Journal of Integration Technology, 2022, 11(6): 67-74.

用于长期神经元放电记录的一体化可步进植入式神经电极

张曦昊^{1,2} 詹 阳^{1*}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学技术大学纳米科学技术学院 苏州 215127)

摘 要 步进式电极是神经科学电生理记录的重要工具。传统电极支架的主要功能是电极丝支撑以及机械驱动电极丝的微推进。在慢性记录过程中, 电极的位置可以推进到更深的脑组织中, 从而记录更多的神经元放电活动。但传统电极支架制作和组装需要多个步骤和部件, 组装过程烦琐困难、结构集成度低, 且无法保证支撑板结构之间相互平行, 增加了实验误差。该文提出一种可实现集成度高、结构稳定、组装容易的新型电极构架。与传统电极支架相比, 新设计的电极支架具有更少的组件, 且一体化的支架设计减少了不同支架之间的误差, 有助于实验条件的统一。受力分析表明, 该文提出的新电极具有优良的抗形变特性, 且新电极比传统电极重量更小, 可减轻实验小鼠头部负载压力。通过手术在小鼠大脑中植入电极, 实验结果表明一体化记录电极可获得高质量的神经信号。因此, 该文提出了一种新的电极设计思路, 该思路有助于提高实验效率, 并可应用于多种小动物在体电生理实验。

关键词 神经电极; 3D 打印; 电生理; 神经元放电

中图分类号 Q 424 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20220527001

An Implantable Movable Electrode with the Integrated Structure for Chronic Recordings of Spiking Neural Signals

ZHANG Xihao^{1,2} ZHAN Yang^{1*}

¹(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(School of Nano Science and Technology Institute, University of Science and Technology of China, Suzhou 215127, China)

*Corresponding Author: yang.zhan@siat.ac.cn

Abstract Movable electrodes are important recording tools for *in vivo* electrophysiology in neuroscience. The traditional electrode holder supports the structure of the electrodes which can be mechanically moved.

收稿日期: 2022-05-27 修回日期: 2022-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070985); 国家重点研发计划项目(2018YFA0701405)

作者简介: 张曦昊, 硕士研究生, 研究方向为神经信息记录材料优化; 詹阳(通讯作者), 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为神经信息处理和神经环路与行为, E-mail: yang.zhan@siat.ac.cn。

The entire electrode structure is manually assembled. During the chronic recordings, the electrode can be lowered towards deeper brain tissues so that more neurons can be recorded. However, the traditional electrode holder assembly requires multiple time-consuming steps with low-level component integration and multiple panel components are difficult to be aligned in parallel. Here, a novel electrode holder which consists of an integrated design with fewer components and a stronger structure was designed. The new design reduces the differences between different electrodes and contributes to the standard experimental conditions. Simulation results show that the new electrode is resistant to deformation when the external force is applied. Compared with the traditional electrodes, the new electrode is lighter and helps reducing head loading pressure for experimental mice. Implantation of the electrode in the mouse brain demonstrates that it can obtain high-quality neural signals. Current research opens new opportunities for improved experimental efficiency and the applications in various *in vivo* electrophysiology in small animals.

Keywords neural electrode; 3D printing; electrophysiology; neuron discharge

Funding This work is supported by National Natural Science Foundation of China (32070985), National Key R&D Program of China (2018YFA0701405)

Ethical Statement The study was approved by the Institutional Review Board of the Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (ID number: SIAT-IRB-170811-NS-ZY-A0367)

1 引 言

人类大脑约有 1 000 亿个神经元，它们之间通过复杂的动作电位传递信息^[1]。大脑作为人体复杂的器官之一，人们对其功能和作用机制的了解依然不足，大脑的功能机制研究仍是当今热门的科研领域之一^[2-4]。近年来，自由活动的清醒动物的大脑中，各个相关脑区群体神经元的活动规律成为神经科学研究的热点。在体多通道电生理技术是记录神经活动的一种重要手段，该技术凭借其诸多优势已广泛应用于神经科学研究中^[5-7]。在动物清醒、自由活动的状态下，利用在体多通道电生理技术不仅可以观察目的脑区神经元的活动状态，使记录的神经元信号和正常生理状态下一致，还可以记录具体脑区的数百个神经元活动^[8-10]。一般来说，研究人员使用在体多通道电生理技术，同时记录实验动物的电生理数据和行为学数据，以探究动物特定行为下的脑区活动

情况。该技术主要包括电极的设计与组装、电极埋植、电生理数据记录以及电生理数据分析等步骤^[11]。

近年来，为提升实验精度，提高实验效率，3D 打印的驱动及辅助装置已应用于神经电极的植入实验中^[12-13]。用于神经记录的微丝探针也出现了集成度更高的绞合方法^[14]，本文将新的集成度较高的电极支架制作方法应用于多通道在体记录中。虽然新型神经电极已经在精度^[15]、器件化^[16]、柔性化及功能化^[17-21]等方面取得了很大的进展，但本文所使用的方法仍具有价格低廉、制作方便等优势，新型电极如 *neuropixels* 售价在万元左右，本文的电极则采用四电极技术^[22]，单个制作成本仅 500 元左右。在多通道在体记录的相关实验中，电极的制作是关键步骤，而电极支架作为电极的主体部分尤为重要，其具有支撑、黏附连接器、组装电极丝和步进的作用。在传统方法中^[23]，电极支架的制作需要 PCB

板、铜柱、环氧树脂等材料, 部件较为零散。针对其制作过程存在步骤烦琐、一体化程度低、精度不高等问题, 本文提出了一种新的电极支架制作方法, 使得电极支架一体化程度和精度更高, 重量更轻, 节省了制作时间。此外, 本文还进行了动物实验, 并对实验结果进行了验证。

2 材料和方法

2.1 实验动物

本研究的动物饲养条件和实验方案经中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审查通过(受理号: SIAT-IRB-170811-NS-ZY-A0367)。实验选用年龄为 8~13 周的 C57BL/6J 雄鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)。动物饲养在小鼠中央排风通气笼盒系统中, 人为控制小鼠生活的灯光环境为 12 h 光照/12 h 黑暗。小鼠饲养房间内的光照强度为 15~20 lux (光照时间为 8:00~20:00, 自动控制), 设施内设定温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度为 40%~70%。

2.2 电极支架制作方法

为简化电极支架的制作流程, 本文尝试了新的电极支架制作方法。新的支架结构采用光敏树脂-国产 9400, 用以替换传统结构中的印制电路板(Printed Circuit Boards, PCB 板)与铜柱。在传统结构中, 需要手动将 PCB 板与铜柱进行组装, 然后用氧树脂胶热封, 具体操作可参考马晓宇等的方法^[23]。由于手工制作过程较为烦琐, 且可能导致误差, 因此本文利用 3D 打印技术重新设计制作了电极支架。

2.3 有限元分析

有限元分析是利用数学近似的方法对真实的物理系统(几何和载荷工况)进行模拟。利用相互作用的元素(即单元), 就可用有限数量的未知量去逼近无限未知量的真实系统^[24]。将电极支架的结构信息导入有限元分析软件 ANSYS 中, 依托

实验材料设置参数(表 1), 即可根据具体的实验对其结构进行模拟仿真。

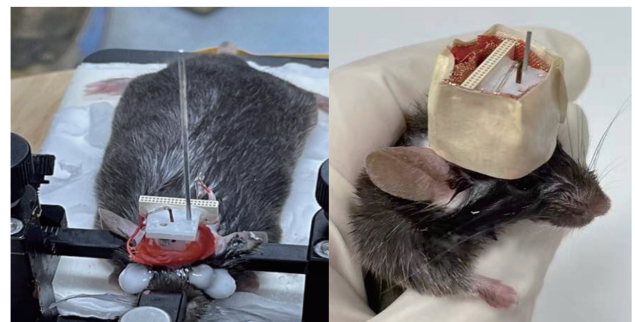
表 1 9400 树脂材料参数

Table 1 9400 resin material parameters

泊松比	硬度	密度	杨氏模量	抗拉强度
0.41	79 MPa	1.1 g/cm ³	750 MPa	47 MPa

2.4 埋置电极手术

为验证电极的实用性, 本文进行了相应的动物实验。如图 1(a)所示, 向小鼠腹腔注射 60 mg/kg 体重剂量的 1% 戊巴比妥钠, 用以麻醉实验小鼠。待动物进入深度麻醉状态后, 去除头部皮毛, 剪开头皮, 将实验小鼠固定在立体定位仪上, 涂上眼膏, 调平小鼠脑袋, 确定海马 3 区(CA3)的坐标(A/P: -2.06 mm; M/L: 2.30 mm)并用黑色油性笔标记后, 用颅钻钻开电极洞。在前凶前和后凶后面分别钻一个孔, 将连有地线和参考线的颅钉拧入颅骨。在颅骨中缝两侧合适的位置分别钻一个洞, 以制作电极支架的基层, 并将颅钉旋入颅骨。先用 502 胶水固定颅钉, 待 502 胶水凝固后, 用牙科水泥将 4 颗颅钉包裹起来形成环形基座。用尖镊挑破电极洞内的硬脑膜, 本次记录脑区为 CA3, 调整电极位置, 电极置入深度为 2.35 mm。用液体石蜡和固体石蜡混合物将电极洞封住, 然后利用比例适当且均匀混合的牙科水泥, 将环形基座和电极支架的下层板粘合在一起, 待牙科水泥变硬后, 将颅



(a) 电极埋置手术示意图 (b) 使用新的电极支架埋置完成的实验鼠

图 1 电极埋植手术展示图

Fig. 1 Electrode implantation operation display

骨和连接器的地线、颅骨和连接器的参考线分别焊接在一起。在整个电极支架的四周紧密包围上铜网，并在铜网上涂上稀释的牙科水泥，待牙科水泥完全凝固后，用胶带将整个电极支架缠绕起来，露出连接器，防止苏醒后的小鼠破坏电极丝，且可避免灰尘进入，电极埋植完成后的老鼠如图 1(b) 所示。将小鼠放在加热垫上等待苏醒，待小鼠恢复一周后，对小鼠进行电生理信号记录。

2.5 神经元在体记录

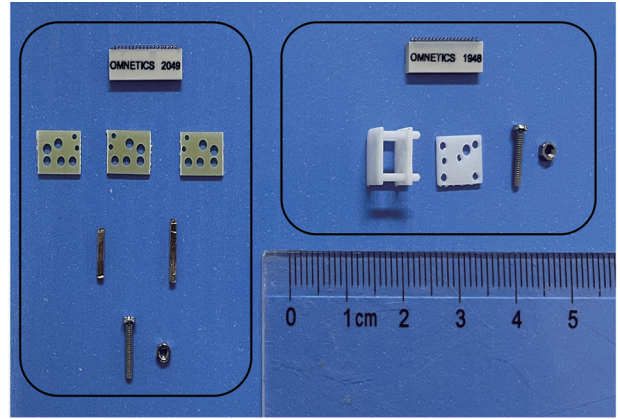
本实验使用的记录设备为美国 Plexon 公司的 128 通道在体电生理记录系统。每根电极记录的神经放电信号经微电极放大器放大后分为两路，一路负责记录神经元的胞外动作电位(采样频率为 40 kHz)，另一路负责记录局部脑区的场电位(采样频率为 1 kHz)。上机观察时，应根据所观察脑区的场电位特征和神经元放电特征，决定是否推进记录电极。在步进电极的操作中，控制每次步进的距离为 50 μm 左右，每次电极推进后，等候数小时再进行下次推进，以防止脑组织形变回弹而错过记录脑区。通常电极经过的地方神经元会失活，因此记录电极只进不退。

3 结果与讨论

3.1 新型电极支架的设计与组装

本文提出的新型电极支架是在马晓宇等^[23]的电极结构基础上，根据现有的实验需求，重新进行了设计。对结构优化后整体建模，使得新电极支架的一体化程度更高，并利用光固化打印机批量制作电极支架。本文对电极支架的制作步骤亦进行了优化，使其组成部件更少，如图 2 所示。其中，图 2(a) 为改进前使用 PCB 板、铜柱的电极支架结构，图 2(b) 为本文采用新技术的支架结构。改进前的结构，需要手动将铜柱镶嵌入 PCB 板中，并用环氧树脂胶热封连接处，过程烦琐复

杂。本文新设计的电极支架结构如图 3 所示，其包括上层盖板结构 C 和下层主体部分。该支架通过 4 根圆柱连接电极支架下层的两层板，使结构



(a) 改进前电极部件图

(b) 改进后电极部件图

图 2 电极支架组件新旧对比图

Fig. 2 Comparison of old and new electrode holder assembly

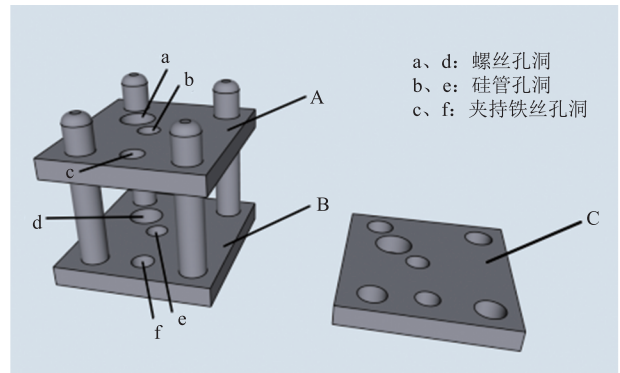


图 3 电极支架结构示意图

Fig. 3 Schematic diagram of electrode structure

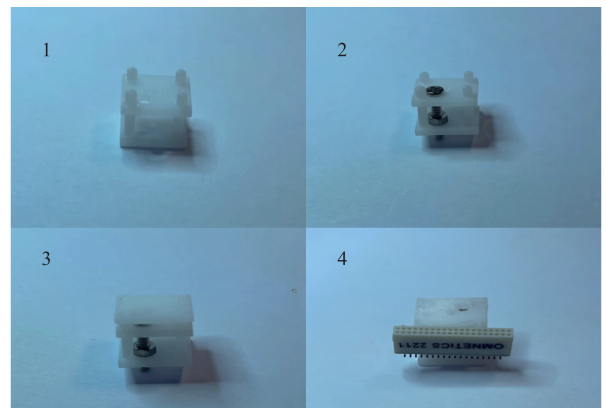


图 4 部件组装示意图

Fig. 4 Component assembly diagram

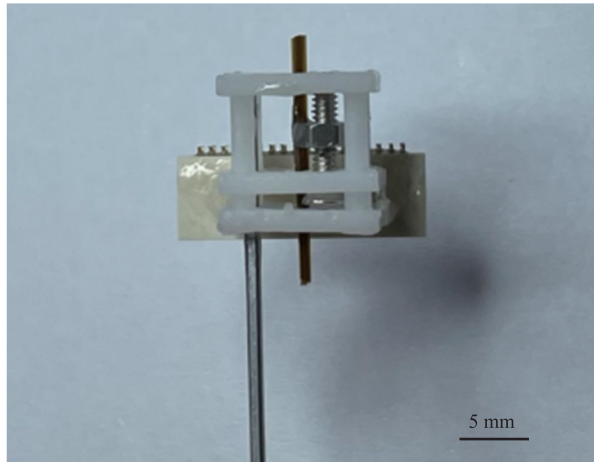


图 5 电极支架实物图

Fig. 5 A finished electrode array

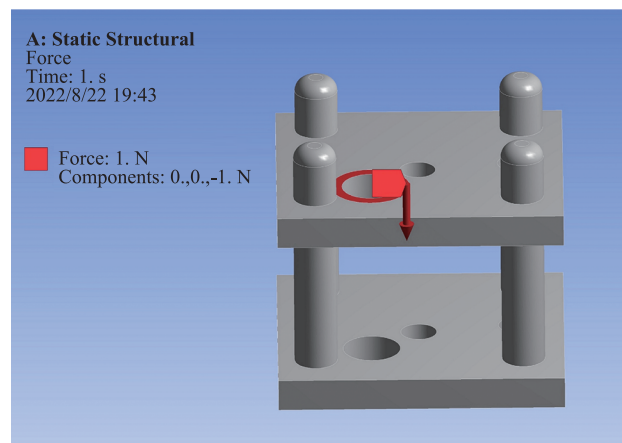
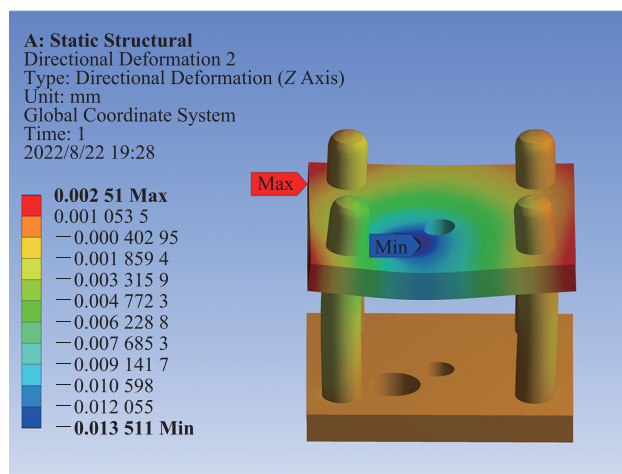
更加牢固, 当受力时, 在竖直方向上产生的应变更小。图 4 为部件组装过程示意图, 图 5 为初步完成组装的电极支架实物图, 其中, 孔洞的大小和位置可根据不同的实验要求进行调整, 该支架还可用于光电极的相关实验中。

在电极组装过程中, 如图 3 所示, 首先将螺母放在 B 板的 d 孔上, 将螺丝从 A 板上层穿过 a 孔螺母后, 从 B 板的 d 孔穿出, 将硅管粘滞在一起后穿过 AB 板的 b、e 孔洞, 与螺母用卡夫特强力 AB 胶粘滞在一起, 此时, 从 A 板的 a 孔上使用螺丝刀转动螺丝, 可观察到随着螺丝刀的顺时针转动, 螺母带着硅管上下移动; 其次, 将 C 板直接通过对应的孔洞盖在 A 板上端, 与圆柱连接的孔洞处用 502 胶水粘封后, 将连接器用 AB 胶粘在 AC 板的侧边; 再次, 使用铂铱电极丝制作四电极, 穿入预先粘滞在一起的硅管中, 将电极丝尖端过火去除绝缘部分后, 绕在连接器的引脚上, 用银漆点涂每个引脚, 使电极丝与连接器之间的连接更加紧密, 再将地线分别焊接在连接器的最末端对角线处; 最后, 使用 1:1 混合均匀的 AB 胶封装连接器、电极丝、地线即可。

3.2 模型受力分析

本小节将模拟步进过程中支架结构可能发生的变化, 并对其进行分析。在步进时, 实验人员

对电极支架施加一个力转动螺丝, 以达到步进的效果。若模拟支架的结构发生形变, 那么可能影响实验中脑区定位的准确性, 因此, 本文对该情况下支架可能发生的形变进行了模拟。在步进过程中, 螺丝刀向下转动步进螺丝时可能会对结构施加一个力, 施力过程可以模拟为: 在 a 孔边缘的螺帽处施加一个圆环法向的压力的过程。电极支架的结构材料为 9400 树脂, 具体参数如表 1 所示。当步进压力 $F=1\text{ N}$ 时, 模拟支架结构可能发生的形变如图 6 所示。结果表明, 结构上层板在压力作用下, 沿负 Z 轴方向的最大形变为 0.013 mm (图 7)。在体多通道电生理记录实验中,

图 6 $F=1\text{ N}$ 时支架结构受力示意图Fig. 6 Simulation diagram for the applied force when $F=1\text{ N}$ 图 7 $F=1\text{ N}$ 时结构形变效果图Fig. 7 Simulation of the structural deformation when $F=1\text{ N}$

对带有电极的小鼠施加的步进压力通常较小，以防止对动物造成不可逆的损伤。当压力为 1 N 时，支架结构形变很小，几乎不会对实验结果产生影响。在以往使用的电极中，下层结构是用环氧树脂将铜柱和 PCB 板粘合而成，结构连接处使用热封的环氧树脂胶水，胶水的用量、热封温度、胶水的配比等都会影响整体结构参数。此外，将零散部件结合在一起的一体化程度较低，且连接处力学参数不能确定，不便进行力学分析，而改进后的结构一体化优势可避免上述问题。

3.3 结构质量对比

将本文电极支架与传统电极支架的质量进行对比，经多组称量后比较可知(图 8 为其中一次称量比较的结果)，与传统电极支架质量^[23]相比，本文电极支架的质量降低了 60% 左右。支架重量的降低在一定程度上可减轻实验动物的负重，从而减少电极质量对实验动物活动灵活性的影响。



(a) 9400 树脂材料的电极支架质量称重 (b) PCB 板铜柱等组装的电极支架质量称重

图 8 新旧电极支架质量对比图

Fig. 8 Weight comparison for the traditional electrode and the novel electrode

3.4 信号记录

待实验动物术后恢复大约一周，再进行后期行为训练或电生理信号记录实验。实验开始前，

将小鼠用毛巾或棉花轻轻握在手心，待小鼠安静并适应实验人员的实验操作后，将小鼠脑袋上缠绕在电极上的胶布解开，并检查是否有木屑掉入电极连接器中，做好电极连接器的清理工作。将 Plexon 系统的连接器与小鼠头上的电极连接器相连接，检查是否连接稳定。在正式电生理信号记录实验前 2~3 d，对小鼠重复上述操作，保证小鼠在实验时能够自由活动。打开 omniplex (电生理信号记录软件) 和 cineplex studio (行为学视频记录) 软件，分别在两个软件中设置好记录参数，点击开始记录。图 9 为截取的一段小鼠电生理活动信号，获取电生理信号数据后，在 offline sorter 软件中，对全波段 wideband 原始数据做高通滤波，使用阈值检测法，神经元放电长度为 1 400 μ s，脉冲间隔为 1 ms，信号检测阈值为 5 SD (standard deviation)。首先，提取满足检测标准的信号，得到神经元放电在时间轴上的集合；然后选择主成分分析方法提取神经元放电的不同特征；最后使用 offline sorter 软件中的聚类算法 k -means，进行神经元的聚类分析，神经元分类的标准参考主成分分析的分类情况和类内距离 L -ration 以及类间距离 Isolation Distance 两个值的大小。后续具体分析参考徐佳敏等和 Schmitzer-Torbert 等的方法^[25-26]。

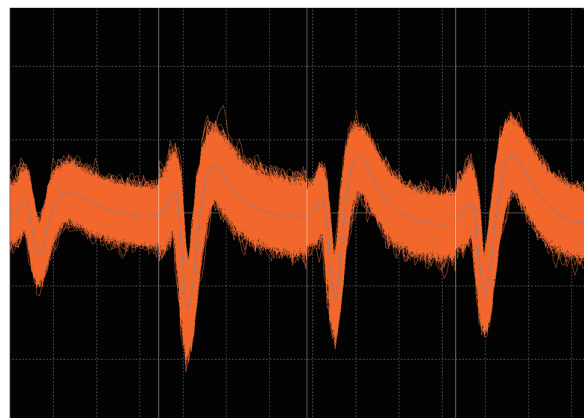


图 9 使用新型记录电极得到的神经元活动信号

Fig. 9 Spiking activities from the tetrode recordings using the novel electrode

4 结 语

结合具体实验, 本文制作出一种用于长期神经元放电记录的一体化可步进植入式神经电极支架。该支架简化了电极的制作流程, 提高了支架结构的精度和一体化程度, 提升了实验效率。此外, 还减轻了电极的质量, 可一定程度上减轻实验鼠的负重, 减少电极对实验鼠自由活动的影响。通过动物实验验证, 该支架可正常记录小鼠的电生理活动。若确定了具体的实验脑区, 就可批量制作该电极支架, 还可根据不同的实验目的进行定制。通过改变孔洞的半径和位置, 可同时记录不同脑区的电生理信号; 通过适当的结构改变, 还可将该电极支架应用于光遗传实验中。

参 考 文 献

- [1] Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain [J]. *Frontiers in Human Neuroscience*, 2009, 3: 19915731.
- [2] Simons JS, Ritchey M, Fernyhough C. Brain mechanisms underlying the subjective experience of remembering [J]. *Annual Review of Psychology*, 2022, 73: 159-186.
- [3] Hu WX, Meng XH, Bai YT, et al. Interpretable multimodal fusion networks reveal mechanisms of brain cognition [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2021, 40(5): 1474-1483.
- [4] Deriche R. Computational brain connectivity mapping: a core health and scientific challenge [J]. *Medical Image Analysis*, 2016, 33: 122-126.
- [5] Hunt DL, Lai CX, Smith RD, et al. Multimodal *in vivo* brain electrophysiology with integrated glass microelectrodes [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2019, 3(9): 741-753.
- [6] Fan LZ, Kheifets S, Bhm UL, et al. All-optical electrophysiology reveals the role of lateral inhibition in sensory processing in cortical layer 1 [J]. *Cell*, 2020, 180(3): 521-535.
- [7] Pacheco AT, Bottorff J, Gao Y, et al. Sleep promotes downward firing rate homeostasis [J]. *Neuron*, 2021, 109(3): 530-544.
- [8] Wilson MA, McNaughton BL. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space [J]. *Science*, 1993, 261(5124): 1055-1058.
- [9] Harris KD, Csicsvari J, Hirase H, et al. Organization of cell assemblies in the hippocampus [J]. *Nature*, 2003, 424(6948): 552-556.
- [10] Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, et al. Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop [J]. *Neuron*, 2009, 64(2): 267-280.
- [11] Jog MS, Connolly CI, Kubota Y, et al. Tetrode technology: advances in implantable hardware, neuroimaging, and data analysis techniques [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2002, 117(2): 141-152.
- [12] Zhu KJ, Aiani LM, Pedersen NP. Reconfigurable 3D-printed headplates for reproducible and rapid implantation of EEG, EMG and depth electrodes in mice [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2020, 333: 108566.
- [13] Kloosterman F, Davidson TJ, Gomperts SN, et al. Micro-drive array for chronic *in vivo* recording: drive fabrication [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2009, 26: e1094.
- [14] Newman JP, Voigts J, Borius M, et al. A simple and fast microwire twister [J]. *Journal of Neural Engineering*, 2020, 17(2): 026040.
- [15] Hong GS, Lieber CM. Novel electrode technologies for neural recordings [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2019, 20(6): 330-345.
- [16] 都展宏, 鲁艺, 蔚鹏飞, 等. 植入式神经电极阵列器件与材料的研究进展 [J]. *物理化学学报*, 2020, 36(12): 2007004.
Du ZH, Lu Y, Wei PF, et al. Progress in devices and materials for implantable multielectrode arrays [J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2020, 36(12): 2007004.
- [17] Du MD, Guan SL, Gao L, et al. Flexible micropillar electrode arrays for *in vivo* neural activity recordings [J]. *Small*, 2019, 15(20): 1900582.
- [18] Heo DN, Kim HJ, Lee YJ, et al. Flexible and highly

- biocompatible nanofiber-based electrodes for neural surface interfacing [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 2961-2971.
- [19] Zhang MC, Guo R, Chen K, et al. Microribbons composed of directionally self-assembled nanoflakes as highly stretchable ionic neural electrodes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(26): 14667-14675.
- [20] Gao L, Wang JF, Zhao Y, et al. Free-standing nanofilm electrode arrays for long-term stable neural interfacings [J]. *Advanced Materials*, 2021, 34(5): 2107343.
- [21] Ghazavi A, González-González MA, Romero-Ortega MI, et al. Intra-neural ultramicroelectrode arrays for function-specific interfacing to the vagus nerve [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 170(4): 112608.
- [22] Buzsáki G. Large-scale recording of neuronal ensembles [J]. *Nature Neuroscience*, 2004, 7(5): 446-451.
- [23] 马晓宇, 张艺瑶, 王丽娜, 等. 多通道在体记录技术——小鼠可推进式微电极阵列帽制作与植入手术 [J]. *生理学报*, 2013, 65(6): 637-646.
- Ma XY, Zhang YY, Wang LN, et al. Multi-channel *in vivo* recording technique: microdrive array fabrication and electrode implantation in mice [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2013, 65(6): 637-646.
- [24] Szabo BA, Babuska IM. Finite element analysis [J]. *Mathematics of Computation*, 1991, 60(201): 733-739.
- [25] 徐佳敏, 王策群, 林龙年. 多通道在体记录技术——动作电位与场电位信号处理 [J]. *生理学报*, 2014, 66(3): 349-357.
- Xu JM, Wang CQ, Lin LN. Multi-channel *in vivo* recording techniques: signal processing of action potentials and local field potentials [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2014, 66(3): 349-357.
- [26] Schmitzer-Torbert N, Jackson J, Henze D, et al. Quantitative measures of cluster quality for use in extracellular recordings [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(1): 1-11.