

鸽子慢性电刺激用电极转接装置及其固定方法

蔡雷^{①②} 王浩^{①*} 王文波^① 石爱菊^③ 戴振东^①

① 南京航空航天大学仿生结构与材料防护研究所 南京 210016; ② 南京航空航天大学机电学院 南京 210016;

③ 南京邮电大学理学院 南京 210046

摘要: 慢性电极植入以及无线刺激技术被广泛应用于动物自由活动状态下的脑区功能研究。实现刺激器与脑内植入电极过渡连接的转接装置需固定在颅骨之上。鸟类特殊的骨质构造不利于转接装置的长期固定。以鸽子(*Columba livia*)为例设计制作了一种用于慢性运动诱导实验的9通道电极转接装置,长12.8 mm、宽9.5 mm、高5.5 mm,重0.42 g;根据鸽子颅骨特点在固定过程中对颅骨表面进行粗糙化处理增加固定时与牙科水泥的接触面积,并选取特定位点拧入螺钉进行固定,有效延长了转接装置的固定时间。经实验验证能够在鸽子头部稳定固定6个月以上,满足鸽子长期运动诱导研究的需求,未对动物正常活动产生影响。该装置及其固定方法亦可为其他小型动物的脑区功能研究提供借鉴。

关键词: 鸽子;电刺激;电极转接装置;无线刺激器;运动诱导

中图分类号: Q95-337, Q189 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)02-280-06

Design and Application of An Electrode Adapter for Chronic Experiments in Pigeon

CAI Lei^{①②} WANG Hao^{①*} WANG Wen-Bo^① SHI Ai-Ju^③ DAI Zhen-Dong^①

① *Institute of Bio-inspired Structure and Surface Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016;*

② *College of Mechanical and Electrical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016;*

③ *College of Science, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210046, China*

Abstract: Electrode implantation and wireless stimulation are widely used in investigating brain functions in conscious, freely moving animals. Electrode adapter connecting the wireless stimulator and the implanted electrode needs to be fixed upon the skull. The specialization in bird bone makes it difficult for long-term fixation of the adapter. Here describes a 9-channel electrode adapter for chronic movement induction in the pigeon (*Columba livia*). It is 12.8 mm long, 9.5 mm wide, 5.5 mm high, and weights 0.42 g. According to the characteristics of pigeon's skull, we roughen the skull surface, upon which the electrode adapter is mounted, by means of drilling a series of pits. This process forms a few "contact cones" to increase the contact area between the skull and the electrode adapter when binding by the dental cement. Additionally, three micro-screws are used to reinforce the binding at the specific point of the skull. These processes effectively extend the duration of the adapter on pigeon's head. The preliminary experiments have shown that all the tested adapters ($n=6$) are fixed on the skull stably for at least 6 months without influence on pigeon's normal activities. The

基金项目 国家自然科学基金面上项目(No. 61375096, 61175105), 高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20133218120038), 中国博士后科学基金特别资助项目(No. 2012T50497);

* 通讯作者, E-mail: haowang@nuaa.edu.cn;

第一作者介绍 蔡雷, 男, 博士研究生; 研究方向: 神经电生理、动物机器人; E-mail: caileitcl@163.com。

收稿日期: 2013-08-08, **修回日期:** 2013-11-09

adapter and its fixation method are suitable for long-term investigation of brain functions in freely moving birds and would provide inspiration for other animal studies.

Key words: Pigeon (*Columba livia*); Electrical stimulation; Electrode adapter; Wireless stimulator; Movement induction

自 1791 年意大利生物学家 Galvani 发现生物电现象至今已有两百多年历史。1848 年神经传导过程中的电位变化首次被测量。Hess 通过脑内埋藏电极的方法实现了对清醒动物不同脑区功能的研究 (Bear et al. 2004)。此后脑内埋藏电极的方法被广泛应用于动物清醒状态下的脑区功能研究, 例如: 清醒状态牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 小脑功能研究 (Goodman 1958), 电刺激猫 (*Felis silvestris catus*) 的中脑、下丘脑后诱发防卫行为 (Adams 1968), 绿鬣蜥 (*Iguana iguana*) 不同脑区功能的研究 (Distel 1976, 1978) 等。早期对于自由清醒状态动物脑区功能的研究多采用有线刺激的方式, 一定程度上限制了动物运动行为的研究。随着微电子、精细加工、通信等技术的迅速发展, 符合不同需求的无线刺激装置相继问世 (Xu et al. 2004, Feng et al. 2007, 杨俊卿等 2007, 张春帅等 2011), 这为更深入地研究动物自由状态下的脑区功能 (尤其是运动功能) 提供了技术支持。目前报道的电极转接装置主要应用于哺乳动物等的生物电采集 (Lin et al. 2006, Steven et al. 2008, 王一男等 2010), 而且电极植入点位置相对固定。已有的用于电刺激研究动物脑区功能的在体电极进给装置 (Adams 1968, 1976), 机构复杂、外形尺寸大, 适于体型较大动物脑区功能的初期探索性研究。鸟类为了适应飞行活动, 在进化过程中出现的骨骼特化 (疏松多孔), 增加了电极转接装置与颅骨固定时的困难, 不利于转接装置的长期固定, 已有报道固定时间为 2 个月左右 (苏学成等 2012)。无线刺激系统与植入动物脑内的金属微电极的连接方法有待进一步改善, 转接装置的小型化、轻量化成为研究的一个关注点。本文以家鸽 (*Columba livia*) 为例介绍了一种多通道、体积小、重量轻的固定式电极转接装置, 可

为自由状态下研究小型动物不同脑区功能提供有益借鉴。

1 材料方法

1.1 实验动物 成年家鸽 6 只, 雌雄不限, 体重 (459 ± 27) g (Mean $\pm$ SD)。实验前动物禁食 24 h, 期间自由饮水。

1.2 实验材料及仪器 盐酸利多卡因注射液、肾上腺素注射液、2% 戊巴比妥钠溶液、生理盐水、1 ml 注射器、义齿基托树脂、牙托水、医用酒精、医用脱脂棉、安尔碘术前皮肤消毒液、EC 耳脑胶 (广州白云医用胶总公司); 组织解剖常用手术器械、脑立体定位仪 (68001 型, 瑞沃德生命科技有限公司, 深圳)、柔性颅骨钻 (Serial SR Foredom, Blackstone industries Inc. 美国)、LZJ-4D 手术显微镜 (镇江中天光学仪器有限责任公司, 江苏)、无线刺激系统 (张春帅等 2011) 等。

1.3 电极转接装置的设计及装配 鸟类在进化过程中出现的内部疏松多孔的骨骼结构增加了外部装置与颅骨固定时的困难, 不利于装置的长期固定。加之鸟类频繁的理毛过程中头部反复伸入翅下, 安装的转接装置经常受到触碰, 设计过程中减小转接装置尺寸以及增加其与颅骨接触牢固度等有利于延长固定时间。

转接装置主要包括: 设计定制单层印刷线路板 (printed circuit board, PCB) (厚度 1.0 mm, 图 1a)、固定螺钉 M 0.8 $\times$ 5.0 (螺钉直径 0.8 mm, 长度 5.0 mm)、1.27 mm 间距排母 1 $\times$ 9P-4.5 (单排排母, 9 孔, 排母高度 4.5 mm)、1.27 mm 间距排针 S1 $\times$ 9P-6/3 (单排直式排针, 9 针, 排针高度 6 mm, 配合端高度 3 mm)。定制线路板既适于与无线刺激系统输出端口相配合又便于脑内引出电极的固定, 线路板预留供固定螺钉嵌入的凹槽, 既增强了颅骨与转接

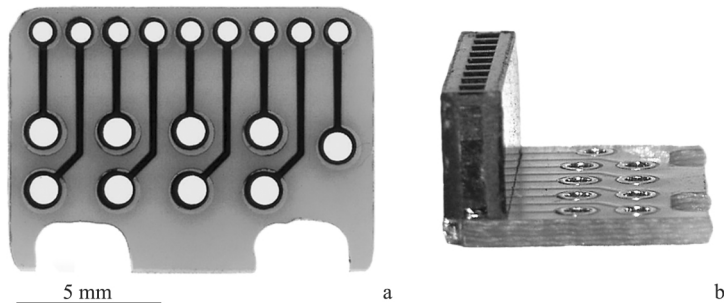


图 1 电极转接装置及底板

Fig. 1 The electrode adapter

a. 设计定制的印刷线路板; b. 电极转接装置侧视图。

a. Custom-designed printed circuit board; b. Lateral view of the electrode adapter.

装置固定的牢固度又可有效降低转接装置最终高度。剪掉配合端针体的 1.27 mm 排针, 在保护排母接口的同时基本未增加转接装置高度。

该装置结构简单, 装配方便。用焊锡将裁剪好的排母焊接于 PCB 线路板, 细砂纸打磨排母引脚在线路板底面的突出部分, 将去掉配合端针体的排针插入 PCB 板上的排母。电极转接装置整体结构侧视图见图 1b。

1.4 动物麻醉及手术 采用胸肌肌肉注射戊巴比妥钠全身麻醉, 联合手术区皮下注射盐酸利多卡因局部麻醉法对鸽子进行麻醉。采用 2% 戊巴比妥钠溶液 1.5 ml/kg (Karten et al. 1967) 胸肌肌肉注射进行全身麻醉, 待鸽子身体趴卧、头部下垂后, 在手术区皮下注射 2% 盐酸利多卡因注射液 (含 1/200 000 浓度肾上腺素注射液) 0.5 ml 进行局麻, 以提高镇痛效果。鸽子基本失去痛觉反射和角膜反射后, 将其固定于脑立体定位仪上。剪除手术区上方羽毛, 医用碘伏对手术区皮肤进行消毒, 确定手术区范围后, 用止血钳夹紧皮肤, 夹闭其中的小血管, 然后剪除手术区皮肤, 消毒棉球擦除表面结缔组织, 暴露定位参考点。

1.5 电极转接装置固定方法 用固定于脑立体定位仪上的柔性颅骨钻在中脑上方颅骨较厚位置 (囟点后 5.0 mm, 矢状缝旁开 4.0 mm) 及囟点前钻螺钉固定孔 (钻头直径 0.5 mm), 对电极植入点周围颅骨进行粗糙化处理 (图 2a)。

拧入钝化处理后的固定螺钉, 用银丝缠绕左右侧固定螺钉, 作为电刺激参考极 (图 2b)。EC 耳脑胶填充螺钉和颅骨间隙, 然后牙科水泥封固。

利用脑立体定位仪三维移动臂上的电极适配器携带植入电极 (直径 100 μm 镍铬不锈钢丝, Teflon 绝缘) 到达目的脑区, 通过微分头 (精度 10 μm) 进给电极, 当电极尖端达到合适深度时用 EC 耳脑胶对电极进行预固定, 然后用牙科水泥固定电极。电极依次植入完毕, 将牙科水泥涂敷在鸽子颅顶骨骼上, 使其与颅骨充分贴合, 作为电极整体固定的“初级底板” (图 2c)。然后将电极转接装置安放在“初级底板”上方, 使鸽子左右侧中脑上方的固定螺钉位于转接板后方的凹槽内, 用牙科水泥将转接装置、固定螺钉和“初级底板”整体固定 (图 2d), 连接植入电极的引出端与转接装置上对应的电极固定孔 (图 2e), 最后实现植入电极、固定螺钉、电极转接装置和“初级底板”的整体封固 (图 2f), 并将剪掉配合端针体的 1.27 mm 排针插入排母, 对接口进行保护。实验结束对手术创口消毒处理, 做好术后动物恢复过程保温。

1.6 使用注意事项 鸽子术后恢复 3 ~ 5 d 后, 进行无线运动诱导实验。刺激采用双向方波刺激, 波宽 1 ms, 频率 80 Hz, 强度 1.0 ~ 3.0 V。将无线刺激器安装于转接装置的过程中

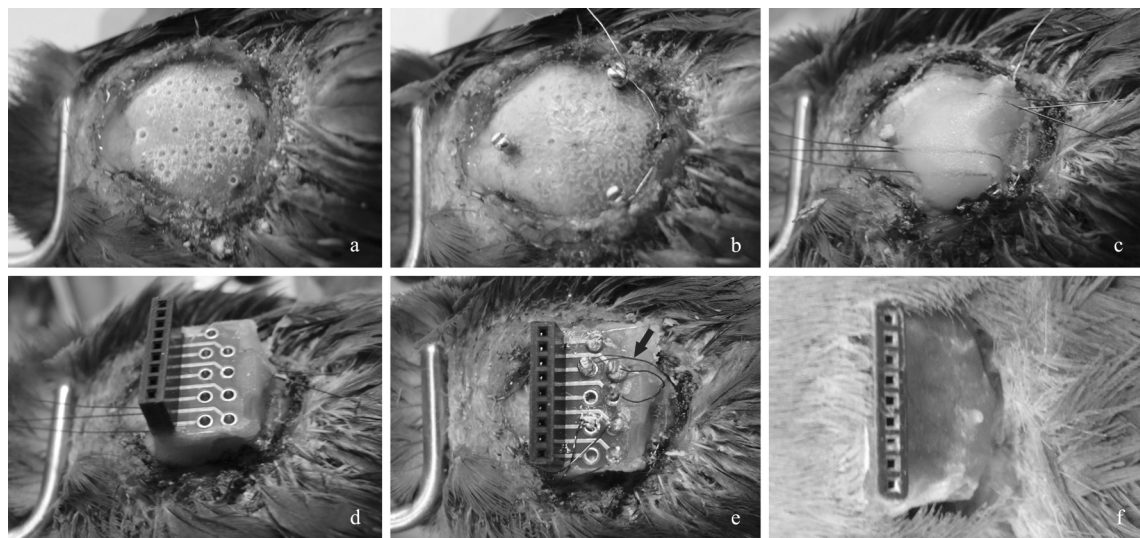


图 2 电极转接装置固定方法

Fig. 2 The fixation procedure of the electrode adapter

a. 颅骨粗糙化处理; b. 拧入固定螺钉并连接地线; c. 牙科水泥整体固定电极形成“初级底板”; d. 电极转接装置固定于颅骨上方; e. 电极丝引出端焊接于转接孔中(箭头所示为电极丝的引出端); f. 术后 2 个月时电极转接装置固定情况。

a. Roughening the skull surface; b. Tightening the micro-screws and grounding; c. Construct “primary base” for the adapter using dental cement; d. Fixation of the adapter upon the skull; e. Electrical connections between the adapter and the brain-implanted electrodes (the free end of one electrode is indicated by the arrow); f. The condition of the electrode adapter two months after operation.

避免鸽子头部挣扎(可遮挡鸽子眼睛后操作),用尖嘴钳夹持转接装置背侧的排母接口,用镊子小心取下排母上的保护排针,将无线刺激器的排针轻轻插入排母,实现刺激器与转接装置的配合(图 3a)。运动诱导实验中无线刺激器与转接装置相连,鸽子头部突出物体积增加,应减少鸽子在狭小空间的活动,避免头部撞击硬物。

2 结 果

2.1 转接装置物理参数 电极转接装置底板为根据实验需求设计定制的单层 PCB 电路板,转接装置采用 1.27 mm 间距排母与无线刺激系统相连。转接板外形尺寸及重量与通道数相关。以 9 通道转接板为例,长度为 12.8 mm,宽度为 9.5 mm,高度约为 5.5 mm,整体重量仅为 0.42 g。单通道对应重量不足 0.05 g。

2.2 使用寿命 实验中的 6 只鸽子电极转接

装置固定时间均超过 6 个月,最长达到 13 个月。基于日常行为观察发现,鸽子术后在鸽舍内及放飞过程中的行为,如摄食、飞行、繁殖、育雏等与其他未做手术的信鸽没有可辨别的差异。运动诱导实验中,通过电极转接装置的排母实现与无线刺激系统输出端排针的结合(图 3a),图 3b 显示术后 7 个月电极转接装置在鸽子头部的固定情况,图 3c 所示为电极转接装置从鸽子头部取下后的侧视图。实验中对颅骨表面进行了粗糙化处理,有效增加了牙科水泥接触面积,同时在接触面形成很多“接触锥”(图 3d),增强了接触牢固程度;在颅骨前方增加的固定螺钉,实现了电极转接装置与鸽子颅骨深层的三点固定(图 2b),对延长使用寿命起到有益帮助。

本工作同时对电极转接装置的外形尺寸和重量对固定时间的影响进行了初步比较,结果见表 1。

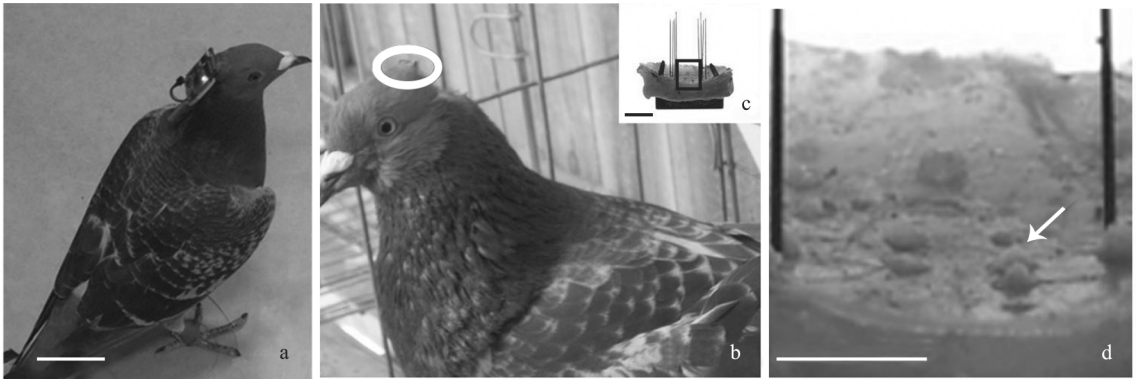


图 3 电极转接装置应用及从鸽子头部取下后情况

Fig. 3 Applications of the electrode adapter

a. 鸽子通过电极转接装置佩戴无线刺激系统; b. 术后 7 个月鸽子佩戴电极转接装置(椭圆形区域); c. 从鸽子头部取下的转接装置; d. 固定转接装置形成的“初级底板”腹侧(图 c 中方框部分放大), 箭头示“接触锥”。图 a、c、d 中标尺分别为: 5 cm、5 mm、2 mm。

a. A pigeon wearing the wireless stimulator via the electrode adapter; b. Seven months after the electrode adapter fixation on the skull (indicated by an oval circle); c. The adapter with the “primary base” removed from the tested animal; d. The close-up of Fig. c to show the detail of the contact surface between the skull and the “primary base”. The arrow indicates the “contact cone”. Bar = 5 cm, 5 mm, 2 mm in Fig. a, c, d, respectively.

表 1 电极转接装置参数及使用寿命对比

Table 1 Comparison of parameters and usage duration of the electrode adapter

型号 Type	重量 Weight (g)	尺寸(长×宽×高) Size (length×width×height) (mm)	使用时间(月) Usage duration (month)	动物数量 Number of animal
I	1.54	13.7×11.5×11.1	<1	5
II	0.80	10.5×9.6×11.6	≈2	4
III	1.05	11.1×9.6×10.5	≈2	3
IV	0.42	12.8×9.5×5.5	>6	6

3 讨 论

3.1 电极转接装置使用寿命差异 鸟类为了适应飞行生活, 全身多个系统发生了相应的变化。鸽子的骨骼较轻(约占体重的 5%), 颅顶部骨骼多数区域非常薄, 厚度在 0.5 mm 左右, 只有脑表面起伏较大处骨骼才会异化变厚, 以便填满空隙, 使鸽脑充满颅腔。实验发现鸽子颅顶骨最厚处位于端脑、小脑和中脑的交汇处, 此处颅骨厚度在 4 mm 左右, 但是骨骼中充满孔隙。实验中“打桩”点选取左右侧颅骨最厚处以及端脑前端颅骨较厚处 3 点, 实现电极转接装置的牢固固定。与其他动物致密坚固的骨骼不同, 鸽子特殊的骨骼结构对电极转接装置

的固定时间影响较大。已有研究报道, 鸽子头部电极转接装置多数在 2 个月即脱落, 影响长期实验研究(苏学成等 2012)。对急性麻醉状态下鸽子中脑核团参与运动调控进行的相关研究, 初步确定了中脑半环隆枕等核团与运动的关系(董满收等 2012), 但此研究过程中鸽子处于麻醉状态且头部固定, 不同脑区对运动的调控作用需要在清醒状态下进一步确定。为此, 我们在鸽子运动诱导研究的过程中采用了 4 种不同类型的电极转接装置。结果显示, 电极转接装置外形尺寸和重量的减少有利于延长固定时间(表 1)。多数情况下电极植入鸽子脑内后外部施加刺激的有效性随时间延长会逐渐减弱, 这点与鸽子机器人研究的结果相似(苏

学成等 2012)。但我们在实验中发现有些鸽子在 2 个月时仍能保持良好刺激应答, 这些鸽子在诱发反应时一般刺激参数较低。推测实验动物刺激应答灵敏程度的变化可能与植入电极位置的准确性以及手术过程和术后刺激实验时的具体操作有关, 研究动物脑区功能过程中植入电极的长期有效性有待进一步研究, 比如采用生物相容性较好的金属铂电极。

3.2 固定式电极转接装置与在体电极进给装置比较 在体电极进给装置主要应用于电刺激研究脑区功能 (Adams 1968, Distel 1976) 以及在体记录动物脑区神经电活动等 (Lin et al. 2006, Steven et al. 2008, 王一男等 2010)。进给装置采用丝杆结构, 限制螺母转动, 通过旋转螺杆实现螺母沿轴向的直线滑移, 并带动微电极进给, 为实现该功能, 所设计的微电极进给装置结构相对复杂、体积较大, 且研究脑区在额状面内的分布一般范围较小, 适于脑区功能相对“陌生”时的探索性研究过程。其最大优势体现在可以实现同一实验动物额状面内某一位点在背腹方向不同深度的研究。

本文提到的固定式电极转接装置采用颅骨钻孔的方式, 在不同脑区根据需求钻孔并植入电极、独立固定, 将较大范围 (根据需求基本可以涵盖全脑范围) 的分散电极采用牙科水泥整体固定, 然后固定电极转接装置, 将离散分布的电极对应连接于电极固定孔 (与无线刺激系统相匹配的连接器联通), 最后进行整体封固, 实现离散电极的牢固固定和规则引出。使用该装置时, 电极植入后位点确定, 一次实验只能研究相对固定的若干脑区的功能, 不利于对“陌生”脑区早期的探索性研究。其优点在于, 电极植入位点不受转接装置尺寸限制, 可以实现全脑不同位置的功能研究, 在初步确定不同脑区功能后, 可以从神经网络层面研究不同脑区之间的调控关系。固定方式采用牙科水泥涂层作为“初级底板”, 可实现与颅骨的充分贴合, 有利于长期固定。结合鸽子 (亦可延伸到其他实验动物) 颅骨的形态特征选取的固定点辅助螺钉固定方法增加了转接装置的固定牢固

度, 延长了使用寿命。此外, 固定式电极转接装置重量更轻、外形尺寸更小巧, 有利于对脑区功能长期电刺激及“异物”植入后的功能变化等慢性实验研究的开展。

参 考 文 献

- Adams D B. 1968. The activity of single cells in the midbrain and hypothalamus of the cat during affective defense behavior. *Archives Italiennes de Biologie*, 106(3): 243–269.
- Distel H. 1976. Behavior and electrical brain stimulation in the green iguana, *Iguana iguana* L.: I. Schematic brain atlas and stimulation device. *Brain Behavior and Evolution*, 13(6): 421–450.
- Distel H. 1978. Behavior and electrical brain stimulation in the green iguana, *Iguana iguana* L. II. Stimulation effects. *Experiment Brain Research*, 31(3): 353–367.
- Feng Z Y, Jiang J, Jin L, et al. 2007. A remote control training system for rat navigation in complicated environment. *Journal of Zhejiang University Science A*, 8(2): 323–330.
- Goodman D C. 1958. Cerebellar stimulation in the unanesthetized bullfrog. *Journal of Comparative Neurology*, 110(3): 321–335.
- Karten H J, Hodoss W. 1967. A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (*Columba livia*). Baltimore: John Hopkins Press, 6–8.
- Lin L, Chen G, Xie K, et al. 2006. Large-scale neural ensemble recording in the brains of freely behaving mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 155(1): 28–38.
- Steven J E, Wang X. 2008. Chronic multi-electrode neural recording in free-roaming monkeys. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2): 201–214.
- Xu S, Talwar S K, Hawley E S, et al. 2004. A multi-channel telemetry system for brain microstimulation in freely roaming animals. *Journal of Neuroscience Methods*, 133(1/2): 57–63.
- Bear M F, Connors B W, Paradiso M A; 王建军, 译. 2004. 神经科学: 探索脑. 北京: 高等教育出版社, 374–574.
- 董满收, 蔡雷, 王浩, 等. 2012. 电刺激家鸽中脑诱导运动的初步研究. *生物学杂志*, 29(4): 33–35.
- 苏学成, 槐瑞托, 杨俊卿, 等. 2012. 控制动物机器人运动行为的脑机制和控制方法. *中国科学: 信息科学*, 42(9): 1130–1146.
- 王一男, 唐永强, 潘璟玮, 等. 2010. 大鼠多通道在体记录. *生物物理学报*, 26(5): 397–405.
- 杨俊卿, 苏学成, 槐瑞托, 等. 2007. 基于新型多通道脑神经刺激遥控系统的动物机器人研究. *自然科学进展*, 17(3): 379–384.
- 张春帅, 郭策, 蔡雷. 2011. 微小型动物机器人遥控刺激系统的研制. *电子技术应用*, 37(5): 134–137.