动物学杂志 *Chinese Journal of Zoology* 2015, 50(1): 9 ~ 15

普氏蹄蝠下丘 CF-CF 联合敏感神经元的声反应

邹丽芳 李 琳 危晨雪 唐 佳*

华中师范大学生命科学学院 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室 武汉 430079

摘要：为了研究普氏蹄蝠（*Hipposideros pratti*）下丘（IC）中恒频-恒频（CF-CF）联合敏感神经元声反应特性，以及易化型和抑制型 CF-CF 联合敏感神经元在 IC 高频表征区神经元中所占的比例，实验记录了普氏蹄蝠 IC 神经元在不同频率和声强下的单声反应以及在不同延迟下的双声反应。本实验采用在体细胞内电生理技术从 7 只听力正常的蝙蝠上共获得 77 个 IC 声敏感神经元。所获得的数据经过处理并应用 SigmaPlot 10.0 软件作图。研究结果显示，77 个神经元中 37（48.1%）个为 CF-CF 联合敏感神经元，且多数为抑制型（24/37），少数为（13/37）易化型。实验结果说明普氏蹄蝠 IC 中既存在易化型也存在抑制型 CF-CF 联合敏感神经元，其中抑制型 CF-CF 联合敏感神经元比易化型所占比例更高。这些 CF-CF 联合敏感神经元有助于蝙蝠在巡航过程中处理回声信息时进行频谱和时相的整合。

关键词：CF-CF 联合敏感神经元；易化；抑制；下丘；普氏蹄蝠

中图分类号：Q955 **文献标识码：**A **文章编号：**0250-3263（2015）01-09-07

Response Properties of CF-CF Combination Sensitive Neurons in Inferior Colliculus of Pratt's Roundleaf Bat

ZOU Li-Fang LI Lin WEI Chen-Xue TANG Jia*

School of Life Sciences and Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation of Integrative Biology，

Central China Normal University，Wuhan 430079，*China*

Abstract: To study the response properties of constant frequency-constant frequency (CF-CF) combination sensitive neurons in inferior colliculus (IC) of pratt's roundleaf bat (*Hipposideros pratti*), and the proportions of facilitatory and inhibitory CF-CF combination sensitive neurons in high frequency representation region of IC, single CF tones with different frequencies and intensities and double CF tones with different interpulse intervals were used to study the responses of combination sensitive neurons in IC. The responses of 77 IC neurons of 7 bats with normal hearing were recorded by intracellular recording

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 31000959)；

*通讯作者，E-mail: bobaytang2013@126.com；

第一作者介绍 邹丽芳，女，硕士研究生；研究方向：神经生物学；E-mail：865162711@qq.com。

收稿日期：2014-04-05，修回日期：2014-09-17 DOI: 10.13859/j.cjz.201501002

method. All data obtained under different stimulation conditions were processed and plotted using Sigmaplot 10.0. Among 77 recorded neurons, 37 (48.1%) were the CF-CF combination sensitive neurons. Most neurons (24/37) were the inhibitory CF-CF combination sensitive neurons (Fig. 2B) and the remaining 13 were the facilitatory ones (Fig. 2A). These results indicate that there are both facilitatory and inhibitory CF-CF combination sensitive neurons in IC of pratt's roundleaf bat. And the proportion of inhibitory CF-CF combination sensitive neurons was higher than that of facilitatory ones. The CF-CF combination sensitive neurons may play an important role in temporal and spectral integration of information in the echoes from the targets during the navigation of bats.

Key words: CF-CF combination sensitive neuron; Facilitation; Inhibition; Inferior colliculus; Pratt's roundleaf bat (*Hipposideros pratti*)

由于联合敏感神经元可对特定声音进行频谱和时相的整合（Portfors et al. 2001a），因此在动物声通讯中扮演非常重要的角色。前人已在两栖类如豹蛙（*Rana pipiens*）（Fuzessery et al. 1983）、鸟类如斑胸草雀（*Taeniopygia guttata*）（Margoliash et al. 1992）、猕猴（*Macaca mulatta*）（Rauschecker et al. 1997）和蝙蝠如帕氏髯蝠（*Pteronotus parnellii parnellii*）（Suga et al. 1979）的听觉系统中发现这类神经元，认为这些神经元有助于动物对复杂声音的分析和处理，其中，在一种恒频-调频（constant frequency-frequency modulation，CF-FM）蝙蝠——帕氏髯蝠中的研究报道最多（Suga et al. 1978）。早期研究表明，帕氏髯蝠听皮层中的调频-调频（frequency modulation-frequency modulation，FM-FM）或恒频-恒频（constant frequency-constant frequency，CF-CF）联合敏感神经元对处在不同谐波的脉冲-回声组合声反应比对单独的脉冲和回声的反应之和更好（Suga et al. 1978，Schuller et al. 1991），脉冲为第一谐波 FM 或 CF（FM_1 或 CF_1）声，回声为更高谐波的 FM 或 CF（FM_n 或 CF_n，$n = 2$，3，4）声。然而，在 FM 蝙蝠中，FM-FM 联合敏感神经元对相同谐波的脉冲-回声组合声反应更好（Dear et al. 1993）。研究还发现，CF-CF 神经元主要分析蝙蝠与靶物的相对速度（Suga et al. 1983），FM-FM 神经元可以判断蝙蝠与靶物之间的距离（Simmons et al. 1980），说明这些联合敏感神经元对于蝙蝠捕食昆虫时获取有效的猎物信息具有重要的生物学意义。

本实验所研究的普氏蹄蝠（*Hipposideros pratti*）属蹄蝠科蹄蝠属，主要分布在中国大陆西南地区，是一种 CF-FM 蝙蝠（陈敏等 2002）。有关帕氏髯蝠 FM-FM 联合敏感神经元的研究较多，在细胞外、细胞内记录方面均有报道，并且主要集中在对这种神经元的延迟调谐、整合机制等方面的研究（Mittmann et al. 1995，Peterson et al. 2008，2009）。然而针对 CF-FM 蝙蝠所特有的这种 CF-CF 联合敏感神经元的报道较少，并且目前只查阅到细胞外记录对于此类蝙蝠处理其与靶物相对速度的研究（Olsen et al. 1991a），还没有发现细胞内记录对于 CF-CF 联合敏感神经元产生机制的报道。

因此，本实验以普氏蹄蝠为研究对象，采用细胞内记录方法寻找普氏蹄蝠下丘（inferior colliculus，IC）中的 CF-CF 联合敏感神经元，并比较此类神经元的声反应特性与蝙蝠中 FM-FM 联合敏感神经元的差异，以及与其他动物中联合敏感神经元反应特性的异同，可为后续深入研究蝙蝠处理回声定位信号的神经机制提供一定的参考依据。

1　材料与方法

1.1　动物手术与电极制备

本实验所用动物为 7 只普氏蹄蝠，采自湖北省崇阳县。3 雌 4 雄，体重 42.5 ~ 64.0 g，平均（49.9 ± 7.3）g。外科手术前用超声波录制仪（D980，Petterson Elektronik AB，Sweden）录制普氏蹄蝠的发声信号，并绘制频谱图和能量谱图（图 1）。腹腔注射 0.48%戊巴比妥纳（45 ~ 50 mg/kg）麻醉动物，剪去动物头顶毛发，划开头皮，钝性分离肌肉，暴露出头顶的颅骨，利用 95%酒精棉球脱脂，用 Lotite 496 胶水将一根长约 2.0 cm 的平头钉固定在动物颅骨表面，用牙科水泥加固。然后在动物下丘上方的中央部分用解剖针钻一个直径为 200 ~ 500 μm 的圆形小孔，将动物放入屏蔽室中固定在实验台上。实验过程中，注意使动物保持在静息和浅麻醉状态。每次实验开始前，用 P97 微电极拉制器（P-97，Sutter，USA）将外径为 1.5 mm、内径为 0.86 mm 的玻璃微管（Sutter，USA）拉制成尖端直径小于 1 μm 的微电极，电极内灌注液为 1 mol/L 的柠檬酸钾溶液，在进行实验记录时，电极阻抗为 40 ~ 130 MΩ。

1.2　声刺激与信号记录

实验为自由声场刺激，由 TDT（Tucker-Davis Technology system 3，Alachua，USA）设备发射出声音信号，并且可以通过计算机调整声信号的频率、时程和声强。实验开始前，利用声级计（B&K，2610，Denmark）与 1/4 英寸麦克风（B&K，4936，Denmark）校正声刺激系统。扬声器中心与蝙蝠眼鼻线位于同一水平，并位于所要记录下丘部位的对侧 30°，正对蝙蝠外耳道口。实验过程中所用声时程均为 15 ms（起/落为 0.5 ms），每 500 ms 发出声信号一次。（1）找下丘声敏感神经元，记录神经元的最佳频率（best frequency，BF），BF ≥ 52.0 kHz（第二谐波附近）（O'Neill et al. 1989，Peterson et al. 2008），并记录神经元的静息电位和记录深度。（2）记录神经元在最佳频率、声强为 65 dB SPL（声压级，sound pressure level）的单声反应。（3）记录神经元在声强为 75 dB SPL，频率在第一谐波（CF_1）附近的单声反应（$a = b/2 \pm n$，$n = 0$、0.5、1，此式子中，a 表示 CF_1，b 表示 BF）。（4）记录神经元的双声反应。其中，第一个谐波为 CF_1 信号，第二个谐波为 BF 信号，双声延迟（delay）分别为 －4、－2、0、2、4、6、15、20、30、50 ms。实验时，将准备好的普氏蹄蝠放入屏蔽室并固定好，利用电动推进器（SM-21，Narishige，Japan）将电极步进推入蝙蝠下丘（0 ~ 4 800 μm），记录到的神经元信号经细胞内放大器（Axoclamp 900 A，USA）和采集器（Digidata 1440 A，USA）处理后，再由 p-Clamp 10.3 软件记录并保存在计算机内，以做后续分析。

1.3　数据处理与分析

叠加神经元对连续 8 次声刺激的动作电位发放数，假设神经元对 CF_1 单声刺激的动作电位发放数为 x，神经元对 BF 单声刺激的动作电位发放数为 y，神经元对 CF_1 与 BF 在不同双声延迟时的组合声的动作电位发放总数为 z，若 $z \geqslant 1.2(x + y)$，则该神经元定义为易化型联合敏感神经元；若 $z \leqslant 0.8(x + y)$，则该神经元定义为抑制型联合敏感神经元；剩余的则为非联合敏感神经元。作图软件为 SigmaPlot 10.0。

2　结果

2.1　普氏蹄蝠的声信号

在静息状态时，普氏蹄蝠发出的回声定位信号为 CF-FM 声，CF 部分时程较长，FM 部分则较短。图 1 表示在静息状态下，普氏蹄蝠回声定位信号的频谱图和能量谱图。普氏蹄蝠第一、第二、第三谐波的 CF 部分频率分别为 29.5 kHz、59.0 kHz、88.5 kHz。

2.2　普氏蹄蝠下丘中的 CF-CF 联合敏感神经元与非联合敏感神经元

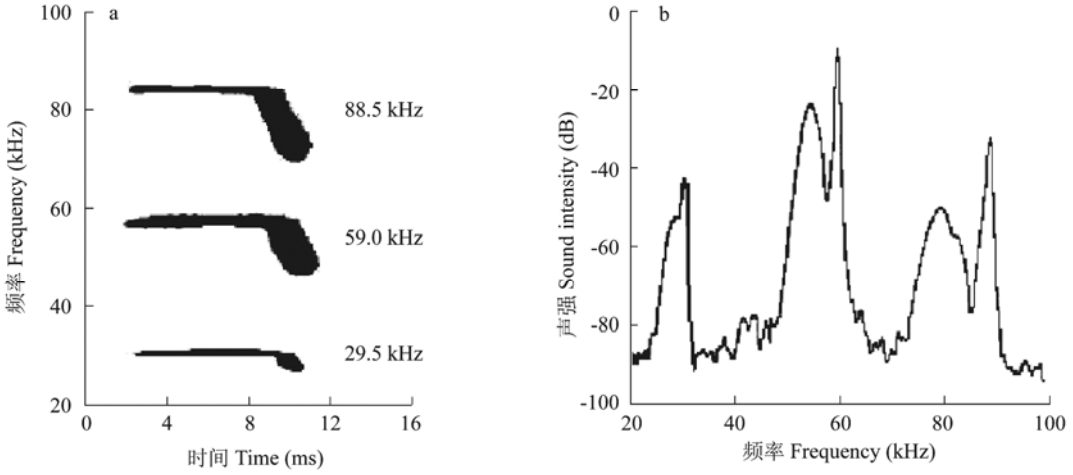

图 1　普氏蹄蝠在静息状态下回声定位信号的频谱图（a）和能量谱图（b）

Fig. 1　Sound spectrograms (a) and power spectra (b) of echolocation pulse of *Hipposideros pratti* at rest

本实验在普氏蹄蝠下丘高频表征区记录到 77 个神经元，神经元的 BF 范围 52.0 ~ 62.0 kHz，平均（56.7 ± 3.0）kHz，静息电位范围 - 70 ~ - 5 mV，平均（ - 19.3 ± 10.6）mV，记录深度范围 1 571 ~ 4 650 μm，平均（3 016.1 ± 630.5）μm。图 2 为下丘中记录到的 CF-CF 联合敏感神经元与非联合敏感神经元。图 2A 为一个代表性的易化型联合敏感神经元，该神经元无论是在 BF/2 与 BF 双声组合刺激下，还是在（BF/2 ± 0.5）kHz 与 BF 或（BF/2 ± 1）kHz 与 BF 的双声组合刺激下，神经元对联合声的反应均强于两个单声反应之和，且该神经元的最佳易化延迟为 2 ms（图 2A：d）。同理，图 2B 显示一个代表性的抑制型联合敏感神经元，该神经元无论是在 BF/2 与 BF 双声组合刺激下，还是在（BF/2 ± 0.5）kHz 与 BF 或（BF/2 ± 1）kHz 与 BF 的双声组合刺激下，神经元对联合声的反应均弱于两个单声反应之和，且该神经元的最佳抑制延迟为 4 ms（图 2B：d）。图 2C 为一个代表性的非联合敏感神经元，该神经元在不同双声组合下发放数变动较少，在实验所设定的整个双声延迟范围内，既不发生易化也不发生抑制（图 2C：c ~ e）。

2.3　普氏蹄蝠下丘中 CF-CF 联合敏感神经元和非联合敏感神经元所占比例

在本实验所记录到的 77 个神经元中，有 37（48.1%）个为 CF-CF 联合敏感神经元，均为 CF_1-CF_2，其中，13（16.9%）个为易化型，24（31.2%）个为抑制型；其余 40（51.9%）个为非联合敏感神经元。

3　讨论

本实验在普氏蹄蝠下丘高频表征区记录到的 CF-CF 联合敏感神经元显示，抑制型 CF-CF 联合敏感神经元的比例高于易化型 CF-CF 联合敏感神经元。有关帕氏髯蝠 FM-FM 神经元的研究报道已指出，其下丘中抑制型 FM-FM 联合敏感神经元占有很大比例（Mittmann et al. 1995，Peterson et al. 2008），而内侧膝状体中仅具有少量抑制型 FM-FM 联合敏感神经元，到了听皮层却没有发现抑制型 FM-FM 联合敏感神经元（Olsen et al. 1991b）。另外，在帕氏髯蝠听皮层（Suga et al. 1983）和内侧膝状体（Olsen et al. 1991a）中发现大比例的易化型 CF-CF 联合敏感神经元，且听皮层比内侧膝状体中的易化型 CF-CF 神经元更多（Olsen et al. 1991a）。由于抑制型联合敏感神经元在下丘以下核团就已形成（Portfors et al. 2001b），而易化型联合敏感神经元起源于下丘（ Wenstrup et al. 2001，Nataraj et al. 2005），因此推测从蝙蝠

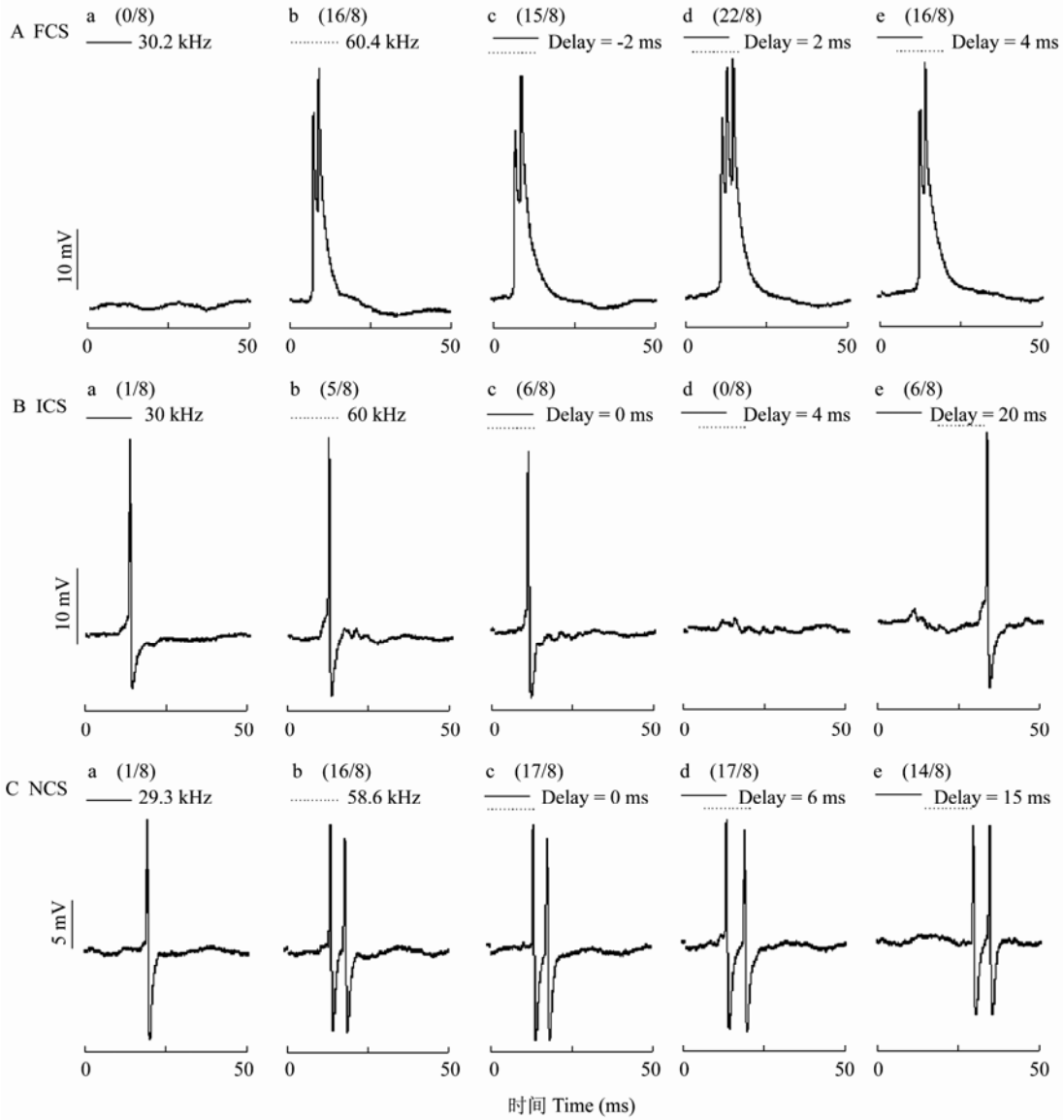

图 2　CF-CF 联合敏感神经元与非联合敏感神经元

Fig. 2　CF-CF and none combination sensitive neurons

A. 一个代表性的易化型联合敏感（FCS）神经元，在双声延迟为 2 ms，即 A(d)为最佳易化；B. 一个代表性的抑制型联合敏感（ICS）神经元，在双声延迟为 4 ms，即 B(d)为最佳抑制；C. 一个代表性的非联合敏感（NCS）神经元，在所测双声延迟范围时均不发生易化或抑制。A、B、C 中每个小图上方括号内的数据表示连续 8 次声刺激后共有几次动作电位的发放；每个小图上方实线和虚线分别表示不同的恒频声刺激；实线和虚线后的数据表示恒频声信号的频率。A(a)、B(a)、C(a)表示不同神经元在 BF/2 时的单声反应；A(b)、B(b)、C(b)表示不同神经元在 BF 时的单声反应；A(c ~ e)、B(c ~ e)、C(c ~ e)表示不同神经元在不同双声延迟时的反应。A 神经元的 BF、静息电位、记录深度分别为 60.4 kHz、－50 mV、2 665 μm；B 神经元的 BF、静息电位、记录深度分别为 60.0 kHz、－45 mV、2 957 μm；C 神经元的 BF、静息电位、记录深度分别为 58.6 kHz、－28 mV、2 875 μm。

A was a facilitatory combination sensitive neuron (FCS), A(d) was the best facilitatory response when delay was 2 ms; B was a inhibitory combination sensitive neuron (ICS), B(d) was the best inhibitory response when delay was 4 ms; C was a none combination sensitive neuron (NCS). The data in brackets in each panel of A, B and C represent a total of several action potentials after 8 consecutive acoustic stimulations; the solid and dashed lines above each panel represent different constant frequency stimulations; the data followed by solid and dashed lines represent the given frequencies. A(a), B(a), and C(a) represented a single acoustic response of different neurons in BF/2; A(b), B(b), and C(b) represented a single acoustic response of different neurons in BF; A(c－e), B(c－e) and C(c－e) represented double acoustic responses of different neurons when delay varied. For A neuron, BF, resting potential, recording depth respectively, 60.4 kHz, －50 mV, 2 665 μm; For B neuron, BF, resting potential, recording depth respectively, 60.0 kHz, －45 mV, 2 957 μm; For C neuron, BF, resting potential, recording depth respectively, 58.6 kHz, －28 mV, 2 875 μm.

听觉通路中下丘到内侧膝状体，再到听皮层的高位中枢，易化型联合敏感神经元可能越来越多，抑制型联合敏感神经元则越来越少，这与蝙蝠听皮层和内侧膝状体有效利用易化型 CF-CF 联合敏感神经元处理其与靶物的相对速度信息这一行为学特征是相适应的。

进一步比较蝙蝠与其他哺乳动物中易化型与抑制型联合敏感神经元所占比例的差异发现，无论是本实验普氏蹄蝠下丘中 CF-CF 联合敏感神经元，还是帕氏髯蝠（Peterson et al. 2008）下丘中 FM-FM 联合敏感神经元，均表现出抑制型比易化型联合敏感神经元所占比例更高。而在听力正常的小鼠（*Mus musculus*）下丘中却发现，大约 30%的小鼠下丘神经元有联合敏感反应，其中 16%为易化型，12%为抑制型（Portfors et al. 2005）。这与在 CF-FM 蝙蝠下丘中所发现的抑制型联合敏感神经元比例比易化型高有所不同，推测抑制型联合敏感神经元在蝙蝠中具有特殊的意义。研究表明，易化型 CF-CF 联合敏感神经元可以判断蝙蝠与靶物的相对速度（Olsen et al. 1991a）。而抑制型联合敏感神经元在单独给高谐波（即 BF）的 CF_2 声时有兴奋性发放，对单个的 CF_1 没有发放或者发放很少，但当 CF_1 信号与更高谐波的 CF 声在一定双声延迟给出时，发放被抑制了（图 2B），这是一种“echo-only”神经元（Mittmann et al. 1995），即在给双声且双声有一定重叠时，神经元反应减少，而在双声延迟加大或单独给 CF_2 时发放较多，这种神经元对于蝙蝠从回声中获取信息具有何种特殊的意义以及其神经机制是什么，还有待后续研究进行更深入的探讨。

参 考 文 献

Dear S P, Fritz J, Haresign T, et al. 1993. Tonotopic and functional organization in the auditory cortex of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. Journal of Neurophysiology, 70(5): 1988–2009.

Fuzessery Z M, Feng A S. 1983. Mating call selectivity in the thalamus and midbrain of the leopard frog (*Rana p. pipiens*): single and multiunit analyses. Journal of Comparative Physiology A, 150(3): 333–344.

Margoliash D, Fortune E S. 1992. Temporal and harmonic combination-sensitive neurons in the zebra finch's HVc. The Journal of Neuroscience, 12(11): 4309–4326.

Mittmann D H, Wenstrup J J. 1995. Combination-sensitive neurons in the inferior colliculus. Hearing Research, 90(1/2): 185–191.

Nataraj K, Wenstrup J J. 2005. Roles of inhibition in creating complex auditory responses in the inferior colliculus: facilitated combination-sensitive neurons. Journal of Neurophysiology, 93(6): 3294–3312.

Olsen J F, Suga N. 1991a. Combination-sensitive neurons in the medial geniculate body of the mustached bat: encoding of relative velocity information. Journal of Neurophysiology, 65(6): 1254–1274.

Olsen J F, Suga N. 1991b. Combination-sensitive neurons in the medial geniculate body of the mustached bat: encoding of target range information. Journal of Neurophysiology, 65(6): 1275–1296.

O’Neill W E, Frisina R D, Gooler D M. 1989. Functional organization of mustached bat inferior colliculus: Ⅰ. Representation of FM frequency bands important for target ranging revealed by 14C-2-deoxyglucose autoradiography and single unit mapping. The Journal of Comparative Neurology, 284(1): 60–84.

Peterson D C, Nataraj K, Wenstrup J J. 2009. Glycinergic inhibition creates a form of auditory spectral integration in nuclei of the lateral lemniscus. Journal of Neurophysiology, 102(2): 1004–1016.

Peterson D C, Voytenko S, Gans D, et al. 2008. Intracellular recordings from combination-sensitive neurons in the inferior colliculus. Journal of Neurophysiology, 100(2): 629–645.

Portfors C V, Felix R A Ⅱ. 2005. Spectral integration in the inferior colliculus of the CBA/CaJ mouse. Neuroscience, 136(4): 1159–1170.

Portfors C V, Wenstrup J J. 2001a. Topographical distribution of delay-tuned responses in the mustached bat inferior colliculus. Hearing Research, 151(1/2): 95–105.

Portfors C V, Wenstrup J J. 2001b. Responses to combinations of tones in the nuclei of lateral lemniscus. Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 2(2): 104–117.

Rauschecker J P, Tian B, Pons T, et al. 1997. Serial and parallel processing in rhesus monkey auditory cortex. The Journal of Comparative Neurology A, 382(1): 89–103.

Schuller G, O'Neill W E, Radtke-Schuller S. 1991. Facilitation and delay sensitivity of auditory cortex neurons in CF-FM bats, *Rhinolophus rouxi* and *Pteronotus p. parnellii*. European Journal of Neuroscience, 3(11): 1165–1181.

Simmons J A, Stein R A. 1980. Acoustic imaging in bat sonar: echolocation signals and the evolution of echolocation. Journal of Comparative Physiology, 135(1): 61–84.

Suga N, O'Neill W E, Kujirai K, et al. 1983. Specificity of combination-sensitive neurons for processing of complex biosonar signals in auditory cortex of the mustached bat. Journal of Neurophysiology, 49(6): 1573–1626.

Suga N, O'Neill W E, Manabe T. 1978. Cortical neurons sensitive to combinations of information-bearing elements of biosonar signals in the mustache bat. Science, 200(4343): 778–781.

Suga N, O'Neill W E, Manabe T. 1979. Harmonic-sensitive neurons in the auditory cortex of the mustache bat. Science, 203(4377): 270–274.

Wenstrup J J, Leroy S A. 2001. Spectral integration in the inferior colliculus: role of glycinergic inhibition in response facilitation. The Journal of Neuroscience, 21(3): RC124.

陈敏, 冯江, 李振新, 等. 2002. 普氏蹄蝠（*Hipposideros pratti*）回声定位声波、形态及捕食策略. 应用生态学报, 13(12): 1629–1632.