

鸟鸣控制的组合编码

在斑马雀的鸟鸣过程中，运动控制核中心 HVC 表现出一系列稀疏的尖峰发放[1]，然而，肌肉控制信号通过平滑变化来驱动发声器官。为了研究稀疏的 HVC 信号如何转换为连续的声音模式，我们在斑马雀鸟鸣期间记录了 RA（HVC 和运动神经元之间的运动前区域）的神经元群体的活动。我们发现，高度相似的鸟鸣声音通常是由不同的 RA 组合构成的。此外，尽管鸟鸣变化是在较宽的时间范围内（10–100ms）发生的，但是 RA 中神经活动的模式变化仅维持很短的时间

（5–10ms）。我们认为鸟鸣是由一个在单个基础时段上运行的动态电路驱动的，并且 RA 神经元组合控制肌肉会导致 RA 活动与鸟鸣结构多对一映射。这允许快速变化的 RA 集群驱动快速和缓慢的声音调制，从而将稀疏的 HVC 信号转换为连续的发声模式。

1、介绍

鸟鸣是一种复杂的学习行为，包括从几毫秒到几秒的时间范围内的连续语音表示[2]。幼鸟使用听觉反馈系统在成年后准确地复制记忆中的鸟鸣[3]。成年斑马雀的鸟鸣由 0.5–1.0s 的声音模式（这里称为主题）组成。主题在鸟鸣期间重复且不定次数播放，其本身由音节组成，每个音节的时间长度为 100 毫秒，并以确定的顺序发生。音节又由通常定型且复杂的频谱结构（称为子音节）组成，可以快速（10ms 以内）或缓慢（高达 100ms）地变化。

鸟鸣是由一组称之为“鸟鸣控制系统”的脑神经核生成的（见图 1A）[4]。前运动神经核声音中枢（HVC）[1]，位于该控制系统顶部附近，编码声音产生的时间顺序[5]。投射到 RA 的 HVC 神经元[1]会在鸟鸣主题中的产生尖峰活动（持续时间为 6ms）[6]。接着，RA 投射到肌层组织的舌下运动核[7]和脑干呼吸区[8]。同时，RA 投射神经元也在 RA 内部建立起局部连接[9]。与 HVC 中极为稀疏的神经元放电模式相反，syrinx 肌肉和呼吸肌由连续的控制信号驱动，这些信号具有包含反映主题，音节和亚音节声学结构的广泛信息[10]。然而，在 HVC 中观察到的稀疏发放又是如何转换为声带肌肉的连续活动？

作为 HVC 和脑干运动核之间的中介，RA 可能在这种转化中起重要作用。鸟类鸣叫时刺激 RA 会引起鸟类的发声被短暂扰动[11]，此后很快会恢复到不受干扰的状态，这意味着 RA 会在很短的时间内对鸟鸣进行快速编码（10–20 毫秒）。鸟鸣中的神经元先前记录表明，单个 RA 神经元的每个基序会产生多个高频脉冲[5]。发放开始时间和这些发放中的尖峰模式被高度定型，并且相对于鸟鸣中的声学结构能以毫秒级的精度进行再现。尽管 RA 中还包含可能抑制 RA 放电模式的远程抑制网络，但我们认为 RA 中的发放模式是由投射到 RA 的 HVC 神经元

(HVC_{RA}) 驱动的[6]。鸟鸣的学习除了从 HVC 接收输入外[12]，也在基底神经节回路中受到 RA 的影响，这意味着 RA 是前运动通路中学习的重要场所[13]。

我们通过量化鸟鸣过程中 RA 神经元的活动结构以及其与鸟鸣的频谱和时间结构之间的关系，研究了 RA 在鸟鸣运动控制中所起的作用。我们提出了一个模型，用于将 HVC 中的稀疏模式转换为连续的肌肉控制信号。最后，我们将认为 RA 活动模式的许多特征可能是学习的结果，并且与前运动回路的结构有关。

2、材料和方法

鸟类被安置在定制设计的有机玻璃笼子中，可以随意获得食物和水。实验中使用的所有四只鸟都是成年雄性斑马雀，并植入睾丸激素以提高鸟鸣次数。将雌性斑马雀放在单独的玻璃笼子中，并在分离出 RA 神经元以引发定向鸣叫后将其呈现给雄性。

2.1 电生理学数据

麻醉鸟类后，通过 3 小时的外科手术将微型驱动器植入颅骨（Fee 和 Leonardo, 2001 年）。该微型驱动器重 1.5g，包含三个电动定位器。三个独立控制的电极（Microprobe WE3003H3）以 200mm 的间距捆绑在一起，在 RA 的背部到腹部范围内缓慢前进。一个小的侧向定位器使我们可以将电极束移位几十微米，从而获得新的穿透力。因此，我们在 RA 中记录的神经元群体进行了采样。我们无法确定在 RA 肌内的记录位点的精确位置。单个信号通过尖峰间隔直方图进行观察。神经和声学数据是通过用 Labview（美国国家仪器，奥斯汀，德克萨斯州）编写的定制设计软件收集的。在实验结束时通过组织学验证电极在 RA 中的位置。

2.2 数据分析

2.2.1 瞬时发放率

在整个分析过程中，我们将神经活动表示为瞬时发放速率 $R(t)$ ，在每个时间点将其定义为峰值间隔的倒数，如下所示：

$$R(t) = \frac{1}{t_{i+1} - t_i} \quad t_i < t \leq t_{i+1} \quad [2.1]$$

其中 t_i 是第 i 个峰值的时间。

2.2.2 鸟鸣对齐

斑马雀科鸟鸣音节长度会在 2% 到 5% 之间变化。如果 RA 峰值序列与每个鸟鸣主题的首端对齐，则会给 RA 峰值序列的结构增加足够大的噪声。为了解决

这种音节间的时间长度不一致，我们以基序中的每个音节起点作为对齐点。线性拉伸或压缩每个对齐点之间的尖峰时间，以匹配代表性模板图案中的相应间隔。这种时间长度调整仅基于鸣叫序列，与尖峰序列完全无关。

2.2.3 神经集成相关矩阵。

对于记录中的每类神经元群体，我们记录了其基序的平均瞬时放电速率。我们将代表性的瞬时点火速率曲线定义为相对于均值具有最小平方误差的曲线。神经元 i 的代表性瞬时放电速率是时间相关活动向量 $A_i(t)$ 的第 i 个元素。基于此向量，在时间 t 和 t' 发生的两种神经活动模式之间的相关性计算如下：

$$C_N(t, t') = \frac{\langle \tilde{A}_i(t) \tilde{A}_i(t') \rangle_i}{\sqrt{\langle \tilde{A}_i^2(t) \rangle_i \langle \tilde{A}_i^2(t') \rangle_i}} \quad (2.2)$$

其中 $\tilde{A}_i(t) = A_i(t) - \langle A_i(t) \rangle_i$ 。

2.2.4 鸟鸣相关矩阵

鸟鸣的对数功率谱 $S_i(t)$ 的多锥度估计值[14]使用 8ms 的滑动窗口，0.5ms 的步长和 $NW=2$ 的时间带宽来计算，其中 i 为频率和 t 是鸟鸣中的时间。鸟鸣声谱图通过将平均鸟鸣频谱和平均声功率进行归一化，以强调音节内的精细声学结构，而不是简单地将与音节相关的频谱变化与内部进行比较。时间 t 和 t' 处的鸟鸣相关性矩阵计算为如下：

$$C_S(t, t') = \frac{\langle \tilde{S}(t, \omega) \tilde{S}(t', \omega) \rangle_\omega}{\sqrt{\langle \tilde{S}^2(t, \omega) \rangle_\omega \langle \tilde{S}^2(t', \omega) \rangle_\omega}} \quad (2.3)$$

3、结果

3.1 单个 RA 神经元的放电统计

我们用微型驱动器[15]来记录四只自由活动的成年雄性斑马雀（总共 78 个神经元）中来自 RA 核神经元的单细胞外信号。如先前所观察到的，在鸟鸣期间，我们记录的大多数 RA 神经元都产生了明确的动作电位发放（图 1 B, 图 2 A）[5]。部分神经元具有高度周期性的自发放电模式（约 20—30 Hz）和较大的尖峰宽度（ $202 \pm 63 \mu s$ ），它们被确定为投射神经元（ $n=76$ ）[12]。

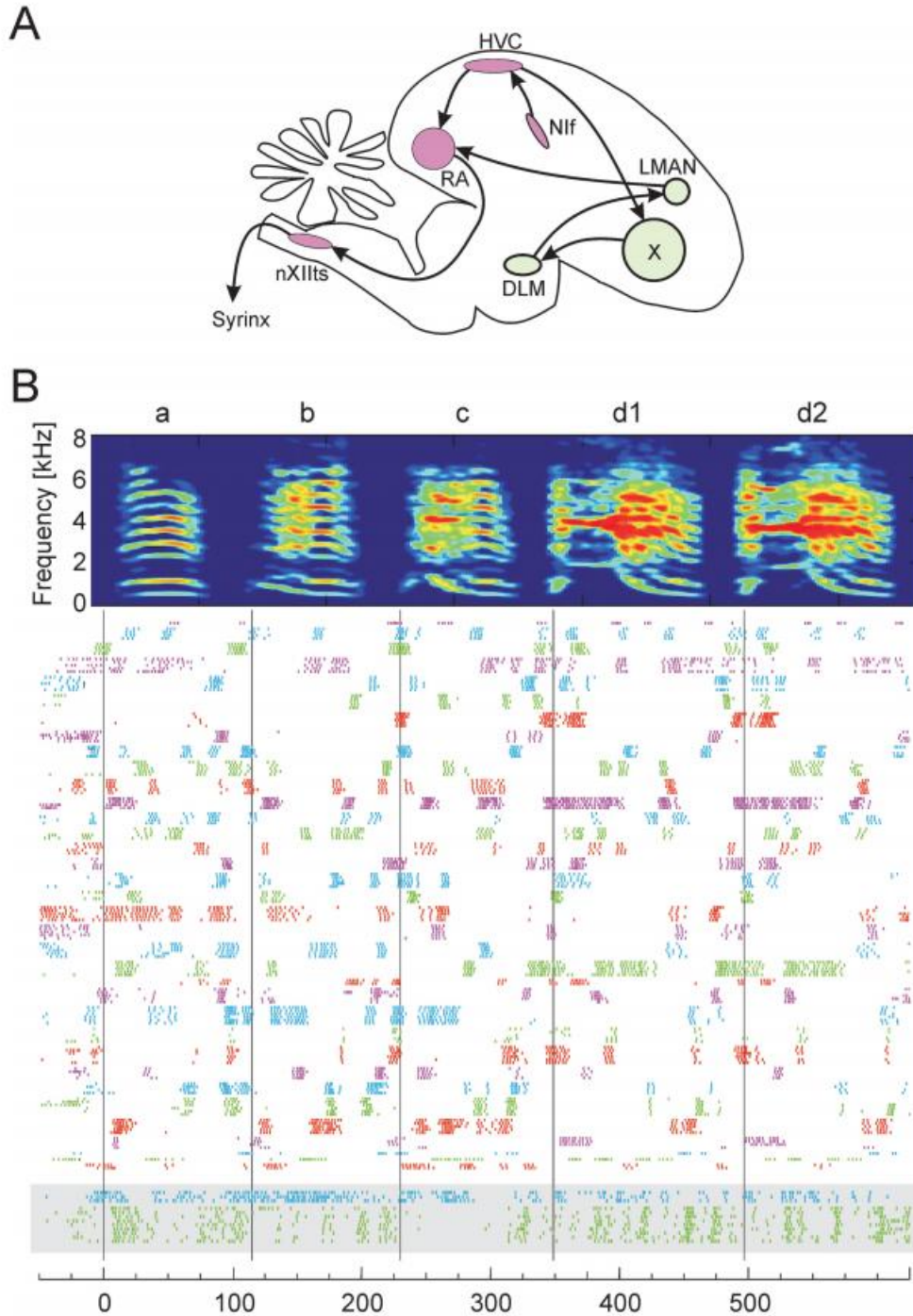


图 1.记录斑马雀科雀中 RA 神经元的活动 A: 鸟鸣控制系统的简化示意图。从 HVC 到 RA 到 nXIIts(垂舌舌下核)再到声带器官(syrinx)的前运动通路用红色突出显示。DLM, 丘脑外侧侧核; LMAN, 前鼻外侧神经核[1]; Nif, 是鼻中枢神经核。B: 在鸟鸣期间记录的所有 34 个 RA 投射神经元的鸣叫对齐的峰值活动的栅格图。每行显示一个鸟鸣主题期间产生的峰值。不同颜色的尖峰序列表示不同的 RA 神经元的活动。每个 RA 神经元产生的发放模式通常不同于所有其他 RA 神经元。底部(灰色框)显示了同一只鸟中记录的两个推测出的 RA 中间神经元。图顶部的频谱图显示了这只鸟的代表性鸟鸣主题。

此外，我们还发现另一类神经元具有比投影神经元更窄的波峰宽度（ 75 ± 12 us），并且在非鸣叫期没有自发活动。同时在脑切片记录中观察到的 RA 中间神经元的特征是狭窄的峰宽度和缺乏自发活动，这与 RA 投射神经元具有自发性并表现出较大的峰宽度不同[12]。两个推测出的中间神经元（图 1 B，底部）在鸟鸣期间处于活动状态，并且在鸟鸣持续时间内的发射速率分别为 107 ± 13 Hz（ \pm SD）和 183 ± 8 Hz（ \pm SD）。这些神经元表现出的尖峰模式与其他大多数类型相比，在定性上较少发放且不固定。通过计算鸟鸣过程中记录神经元的所有尖峰序列之间的平均相关性，可以量化每个神经元的发射模式的可变性。每个中间神经元的尖峰序列之间的平均相关性为 0.62 ± 0.1 。而投影神经元尖峰序列的平均相关性是 0.90 ± 0.1 （在 34 个神经元中平均）。中间神经元尖峰模式中的相关性显著低于投射神经元（t 检验； $p = 0.002$ ）。

鸟鸣过程中推测的投射神经元的峰间隔直方图在 2 ms 处急剧达到峰值，并在 8 ms 的间隔内具有长的指数衰减尾巴（图 2B）。瞬时点火速率的分布（尖峰间隔的倒数）是强烈的双峰分布（图 2C），一种模式反映了 RA 脉冲内的点火速率，另一种模式反映了脉冲之间的较低点火速率。发放点火速率在 455 Hz 处达到峰值，宽度为 ± 188 Hz。使用瞬时点火速率 125 Hz 的阈值定义爆发和偏移量。RA 发放的平均宽度为 8.7 ms，持续时间为 3 到 20 ms（分布的 10—90%；中位数为 6.0 ± 0.4 ms）（图 2D）。RA 发放之间间隔的平均持续时间为 53.90 ± 50.1 ms。

平均而言，每个 RA 神经元在每个鸟鸣主题产生 12 个发放（平均猝发率，为 16 ± 3.7 个/s），并在 $12 \pm 2\%$ 的主题中处于“打开”状态（相对独立于 ± 25 Hz 的阈值范围内独立（图 2E）。我们对 13 对 RA 神经元（鸟 9 中 $n=6$ ；鸟 12 中 $n=7$ ）同时进行了记录（图 3A）。纪录显示神经元对的发放时刻具有 0.28 ± 0.3 ms 的误差（图 3B）。在突发间隔大于 20 ms 时，误差以每 100 ms 间隔 0.7 ms 的速率增加。

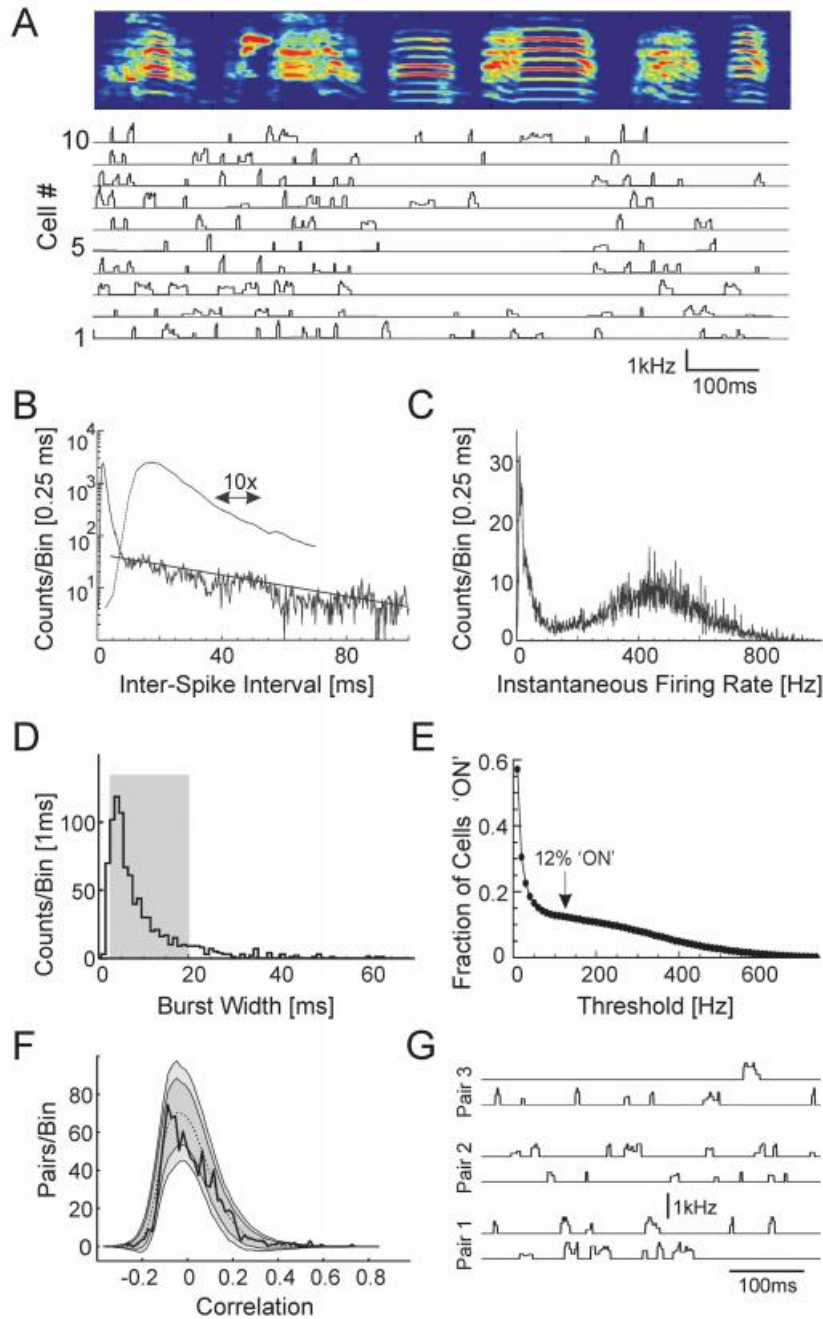


图 2 RA 发放模式的统计数据。 A: 在鸟鸣主题过程中，鸟类 10 个 RA 神经元的瞬时放电速率。RA 神经元表现出明显的发放现象。顶部是对应鸟儿的鸣叫的频谱图。注意到，相对于复杂的非谐和音节，在产生简单的谐波音节时，RA 发放密度降低。 B: 所有与鸟鸣相关的 RA 神经元的尖峰间隔直方图（虚线是实线的 10 倍扩大）。 C: 瞬时发放率的分布。 D: 发放持续时间直方图（阈值 125 Hz）。平均发放长度为 8.67 ms；灰色框标记 10–90% 的间隔。 E: 射击率高于阈值的 RA 发放的概率与为阈值的关系。注意在 125 Hz 处的平稳段，其概率为 12%。 F: 在每只鸟中记录的成对的 RA 神经元对之间的相关性分布，所有鸟的平均用黑色实线表示， $n=946$ 对。还显示了随机的脉冲串的模拟数据的分布（平均值用黑色

虚线表示； ± 2 SD 用深灰色区域表示， ± 3 SD 用浅灰色区域表示）。G：鸟 9 中三对相邻 RA 神经元的瞬时放电速率曲线。每对在同一微电极上同时记录。

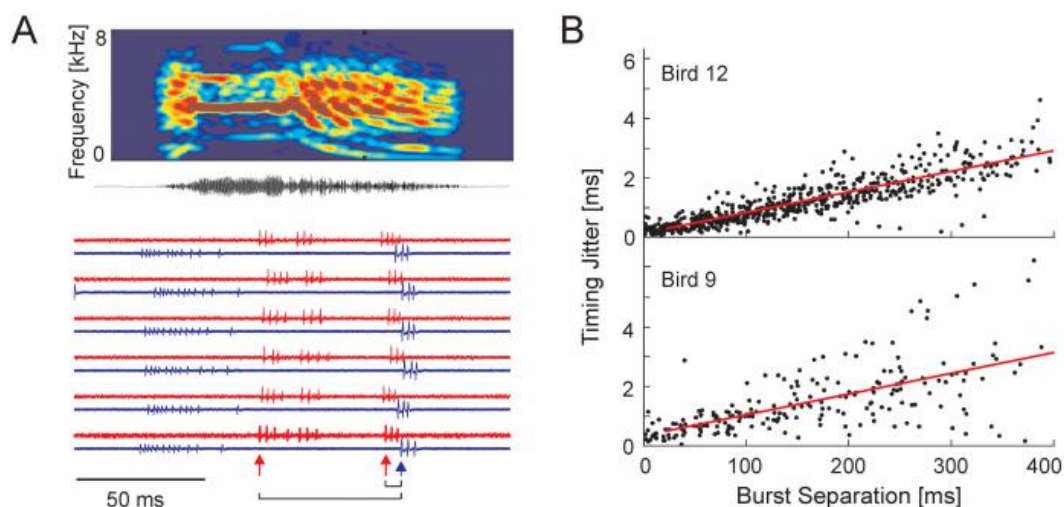


图 3 RA 中的峰值时间纪录。A：同时记录三个 RA 神经元，显示在一个鸟鸣音节（音节 d，鸟 9；见图 1 B）的六种演绎形式。在一个电极上记录了一个神经元（上部迹线；红色）；在另一个电极上记录了另外两个神经元（底部迹线；蓝色）。在将神经信号与音节的初端对齐后，识别单个尖峰，并测量每对尖峰之间的时间。B：显示了在成对的神经元对中的发放开始之间的时间抖动，与发放时间差之间的关系，针对同时记录的神经元对（ $n=13$ ）中的所有发放对（ $n=1299$ ）。

4、讨论

通过大量记录鸟鸣期间 RA 神经元的活动，我们观察到了 RA 神经回路活动的几个特性，有助于深入了解鸟鸣控制的机制：（1）在鸟鸣的每个时刻都有一个独特的 RA 组合编码；（2）无论鸟鸣的时间结构如何，RA 集群能够在 5-10ms 的时间尺度上迅速变化；（3）子音节的相似与 RA 组合编码有关；（4）音节之间的 RA 的活动与无声期间一样。两者似乎都是在明确的神经控制下的主动发放。这些发现构成了我们的解释的基础，即斑马雀科的鸟鸣是由动态电路产生的，该动态电路在单个基础时段上运行，该基础时段以 5-10ms 的时间步长连续变化。

RA 组合被认为是由 HVC 中的 RA 投射神经元在短时间内驱动的[6]。由于鸟鸣期间一直有 RA 合，我们推断鸟鸣期间有一个对应的 HVC_{RA} 组合。此外，由于 HVC_{RA} 神经元极少地发放，因此每个 RA 集群必须由唯一的 HVC_{RA} 集群驱动。图 8 将这些想法综合成一个简单的模型，用于在鸟鸣产生过程中生成 RA 发放序列。中间神经元和投射神经元侧支可能最终被证明在塑造 RA 活动中起着重要作用。但是，在这里，我们采用了一个不包含这些连接的简单模型。

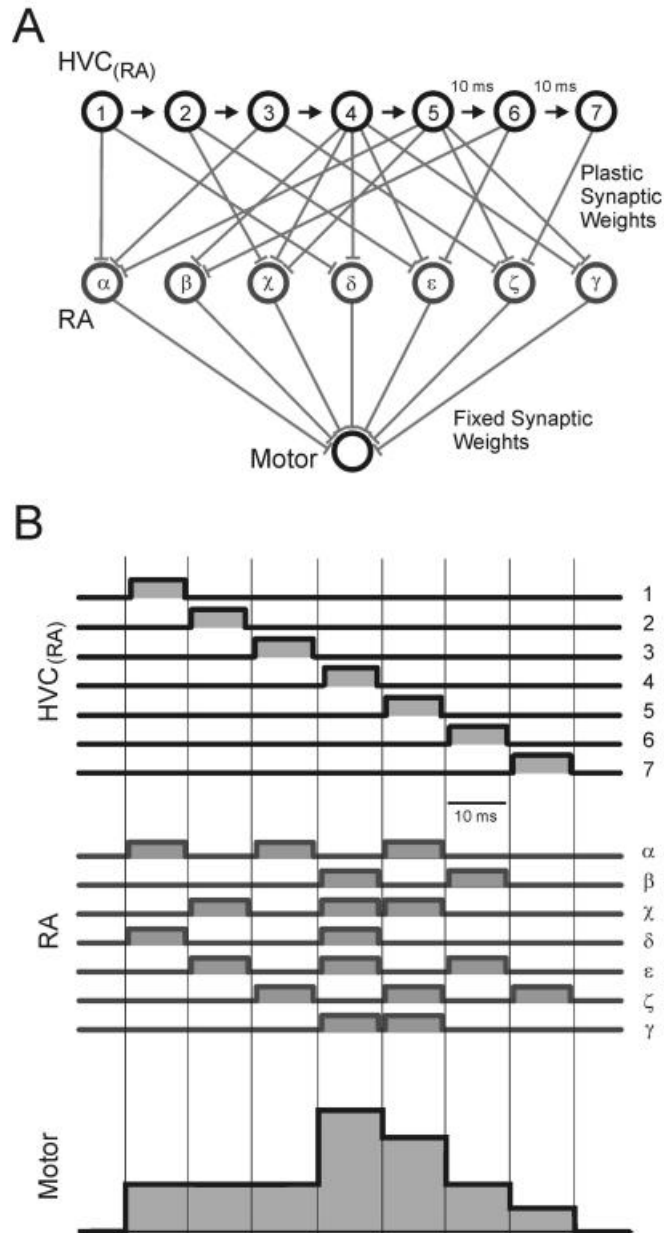


图 8 鸟鸣动力控制模型。A: 用于生成声音控制信号的假设。每个 HVC_{RA} 神经元 (1-7) 会在鸟鸣主题中发放一次。这些 HVC 神经元驱动 RA 神经元 (α - γ) 的不同亚群。然后通过运动单元将 RA 中的活动整合到连续的肌肉控制信号中。尽管仅显示一个动力输出, 但是该模型可以轻松扩展到任意数量的输出。B, 鸟鸣动力控制模型中的活动模式。HVC 中的离散和稀疏活动转换为 RA 中的离散和密集活动。在鸟鸣的每个 10 毫秒时间步长处, 不同的 RA 神经元群体处于活动状态。注意到, 由于从 RA 到肌肉的信息整合 (时间步长 1-3), 可以通过 RA 的活动模式来产生恒定的声音输出。

一般认为重复的鸟鸣基序是通过重新激活相同的 HVC 和 RA 组合序列而产生的[5][6]。但是, 单个音节也可以在单个主题内重复。Yu 和 Margoliash[5]表明, 音节的重复可能与重复的 RA 发放模式有关。这类似于我们在鸟 9 的口吃期间观

察到的 RA 活动的重复（图 1B, d1, d2, d3）。尽管我们认为 HVC_{RA} 神经元在鸟鸣主题期间仅发放一次，但是在重复音节的鸟鸣中这种现象并不成立[6]。对口吃期间 RA 集群的精确复制表明，当音节重复时， HVC_{RA} 序列也被重新激活，这一预测可以通过对重复音节时的 RA 和 HVC_{RA} 神经元进行记录来检验。

在这种情况下，我们回到先前提出的基本问题：尽管 HVC 和 RA 中的神经动力学在 5-10 毫秒的时间范围内迅速变化，但鸟鸣本身却大都变化缓慢，虽然有时能在 5-10 毫秒的时间范围内迅速调整，但此外一般在在 100 毫秒内保持近似恒定，在谐波叠加期间。快速变化的 RA 组合如何转变为连续的声音模式？我们根据 RA 神经元在下游运动回路上的收敛性来构造一个简单的假设。

大约有 8000 个 RA 神经元投射到脑干[16]，并促进了大概 7 个声带肌肉的活动[17]。尽管声带肌肉运动和声音输出之间的关系可能很复杂[19]，但最近的动力学模型[18]表明，在许多鸟类中，肌肉控制信号与声学参数具有一定地直接对应关系，因此产生这种信号的方式占主导地位。尽管尚未建立 RA 神经元与脑干运动单元之间的精确连通性，但一般认为单个 RA 神经元会投射到舌下运动神经核的子区域，而后者又投射到特定的声带肌肉。基于这些发现，我们考虑一个简化的视图，在该视图中，RA 神经元活动对声带肌肉的贡献可有效生成声音参数（例如音高）（图 8）。有人提出了类似的模型来控制灵长类动物的手臂运动[20]。

我们观察到的 RA 活动与鸟鸣声学结构之间的关系也源于此模型。RA 输出被线性求和以产生声音控制参数，从而使得任何 RA 活动模式的总和相同的值会产生相同的声音输出。RA 活动模式与声音输出之间存在简并的映射（我们同样适用“简并”一词来表示遗传密码，例如不同的 DNA 序列可以编码一个氨基酸。）。因此，将 RA 活动的高维度空间转换为肌肉活动的低维度空间的任何机制都会产生简并的映射。如果顺序产生 10 个产生相同声带配置的不相关 RA 组合，则鸟鸣在 100 毫秒内将具有恒定的声学结构（图 8B，时间步长 1-3）。

本文首先提出如何将 HVC 中的稀疏活动转换为声带肌肉中的连续活动这个问题。一般来说，研究者会期望 RA 发放模式的时间尺度直接对应于鸟鸣声学结构的时间尺度，即缓慢变化的 RA 组合会产生缓慢的声音调制。但是，我们的数据提出了不同的解决方案：简并性运动可以解释如何通过不相关的 RA 活动模式在主题中的不同时刻产生相同的声音。许多不同的神经集合映射到相同的输出状态，使 HVC 和 RA 的动力学可以在单个快速时段上运行，但仍然可以在很宽的时间范围内生成声音调制。这种简并性允许 HVC 与 RA 连接的许多不同模式来解决学习声音输出的问题，从而可能导致更快或更有效的学习[21]。

5、参考文献

- [1] Reiner A, Perkel DJ, Mello CV, Jarvis ED (2004) Songbirds and the revised avian brain nomenclature. *Ann NY Acad Sci* 1016:77–108.
- [2] Immelmann K (1969) Song development in the zebra finch and other estrilid finches. *Bird vocalizations* (Hinde RA, ed), pp 61–74. New York:Cambridge UP.
- [3] Konishi M (1965) The role of auditory feedback in the control of vocalizations in the white-crowned sparrow. *Z Tierpsychol* 22:770–783.
- [4] Nottebohm F, Stokes TM, Leonard CM (1976) Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *J Comp Neurol* 165:457–486.
- [5] Yu AC, Margoliash D (1996) Temporal hierarchical control of singing in birds. *Science* 273:1871–1875.
- [6] Hahnloser RHR, Kozhevnikov AA, Fee MS (2002) An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature* 419:65–70.
- [7] Vicario DS (1991) Organization of the zebra finch song control system. II. Functional organization of outputs from nucleus *Robustus archistriatalis*. *J Comp Neurol* 309:486–494.
- [8] Wild JM, Goller F, Suthers RA (1998) Inspiratory muscle activity during bird song. *J Neurobiol* 36:441–453.
- [9] Canady RA, Burd GD, DeVogd TJ, Nottebohm F (1988) Effect of testosterone on input received by an identified neuron type of the canary song system: a Golgi/electron microscopy/degeneration study. *J Neurosci* 8:3770–3784.
- [10] Goller F, Suthers R (1996) Role of syringeal muscles in controlling the phonology of bird song. *J Neurophysiol* 76:287–300.
- [11] Vu ET, Mazurek ME, Kuo Y (1994) Identification of a forebrain motor programming network for the learned song of zebra finches. *J Neurosci* 14:6924–6934.
- [12] Spiro JE, Dalva MB, Mooney R (1999) Long-range inhibition within the zebra finch song nucleus RA can coordinate the firing of multiple projection neurons. *J Neurophysiol* 81:3007–3020.
- [13] Bottjer SW, Miesner EA, Arnold AP (1984) Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. *Science* 224:901–903.
- [14] Thompson DJ (1982) Spectrum estimation and harmonic analysis. *Proc IEEE* 70:1055–1096.
- [15] Fee MS, Leonardo A (2001) Miniature motorized microdrive and commutator system for chronic neural recordings in small animals. *J Neurosci Methods* 112:83–94.

[16] Gurney ME (1981) Hormonal control of cell form and number in the zebra finch song system. *J Neurosci* 1:658–673.

[17] Greenewalt CH (1968) *Bird song: acoustics and physiology*. Washington, DC: Smithsonian Institution.

[18] Gardner T, Cecchi G, Magnasco M, Laje R, Mindlin GB (2001) Simple gestures for birdsongs. *Phys Rev Letts* 87:208101.

[19] Fee MS, Shraiman B, Pesaran B, Mitra PP (1998) The role of nonlinear dynamics of the syrinx in the vocalizations of a songbird. *Nature* 395:67–71.

[20] Fetz EE, Cheney PD (1980) Postspike facilitation of forelimb muscle activity by primate corticomotoneuronal cells. *J Neurophysiol* 44:751–772.

[21] Fiete I, Hahnloser R, Fee MS, Seung H (2004) Temporal sparseness of the premotor drive is important for rapid learning in a neural network model of birdsong. *J Neurophysiol* 92:2274–2282.