

神经元的固有特性代表了 斑马雀声音学习中的鸣叫和失误

Intrinsic neuronal properties represent song and error in zebra
finch vocal learning

Arij Daou^{1,2} and Daniel Margoliash¹

¹*Department of Organismal Biology & Anatomy, University of Chicago, 1027 E. 57th
St., Chicago, IL 60637, USA.*

²*Program, American University of Beirut, P.O. Box 11-0236, Riad El Solh, Beirut
1107 2020, Lebanon*

Accepted: 14 January 2020 by Nature Communications

(translated by zang jie)

摘要：神经元调节其固有的生理特性，这可能会影响网络特性并有助于行为可塑性。在成年斑马雀科大脑切片记录中，我们发现在每个鸟类基底神经节区域内的X投影（HVC_x）神经元共享相似的尖峰波形形态和尖峰序列，此外建模表明五个主离子流的大小相似。这些属性在遗传上各不相同，成年嫡系鸟类（在相同的鸣叫上）共享相似的波形和尖峰特征。而这些属性是动态保持的：学习鸣叫的幼鸟中的HVC_x显示出可变的属性，而成鸟在鸣叫时数小时内的均匀性会迅速下降，同时会受到异常（延迟）的听觉反馈的影响。因此，在单个鸟类中，成鸟能够迅速地对反馈的变化做出反应。这可以识别具有固有属性的网络交互，而这些固有属性会影响信息存储和信息处理。

1、引言

尽管人们普遍认为记忆是通过活动依赖的变化介导的突触强度中的可塑性来实现的，但非突触形式的可塑性也已被考虑²⁻⁴。神经元表达的离子电流的类型和大小有助于响应给定输入而生成的动作电位的数量，时间和模式，因此神经元对网络动力学具有一定的贡献⁵⁻⁷。这些内在特性（IP）的可塑性包括体内平衡和其他形式的调节作用^{5,8,9}，这表明可能对脑可塑性产生广泛的影响。神经元的内在特性已通过多种实验方法在体外和体内进行了实验调控，同时也包括行为调节^{10,11}，可能涉及一个或多个离子流^{8,12}，并且可能仅限于树枝状细胞的片段^{13,14}，体细胞²以及轴突^{15,16}。后面部分的变化应调节由神经元树突的时空求和的所有过程产生的电流。然而，目前相对较少的研究探索了，在成年神经元群体中的这种潜在广泛而强大的可塑性机制是如何学习超出操作条件的复杂学习行为的^{17,18}。

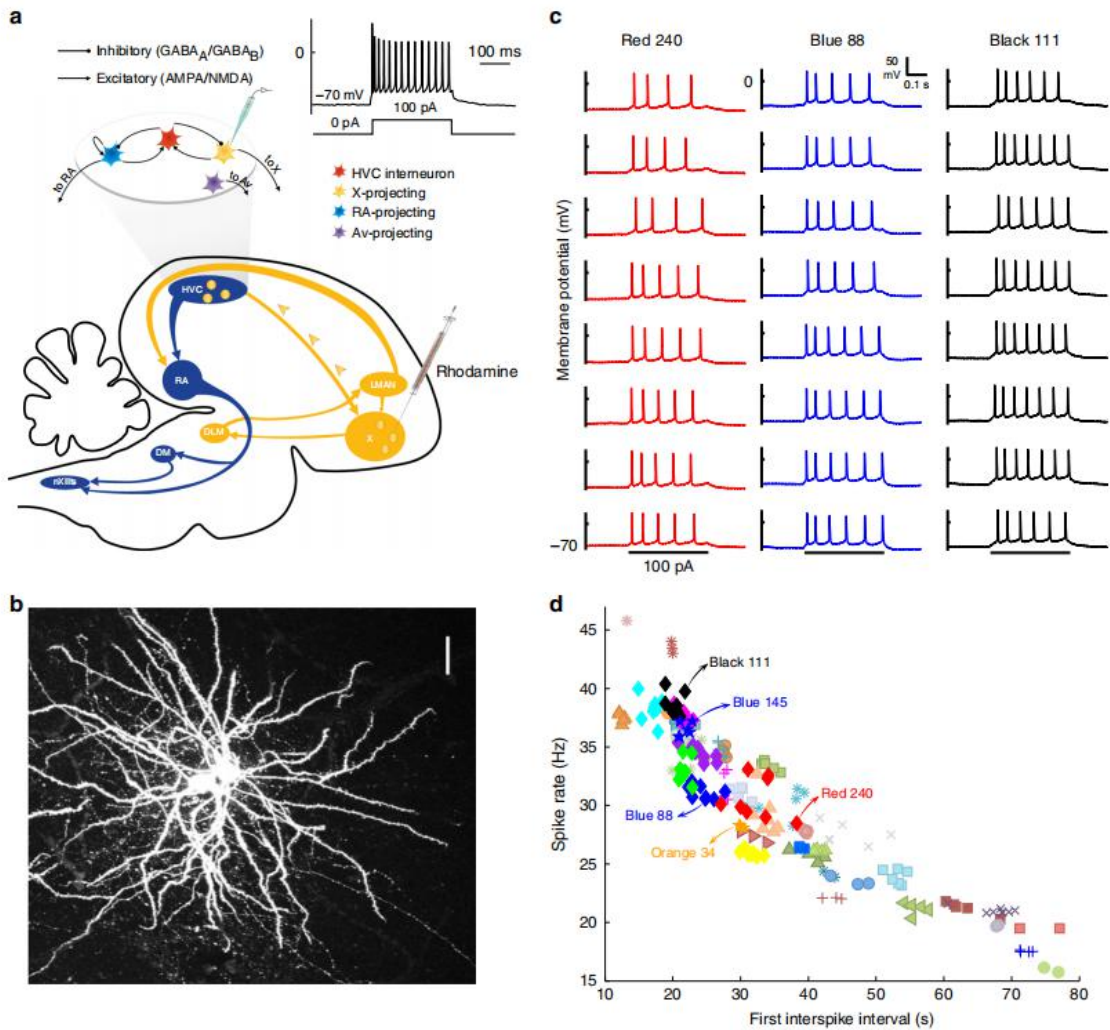


图1 个体鸣禽类具有统一且独特的HVCx固有特性：发放序列。a. 鸟鸣系统，实验装置和全细胞记录。鸟鸣系统的示意图（矢状视图），上面有一个切片中的HVC单元类型示意图。HVC包括中间神经元（HVC_I），投射到运动通路RA的HVC_{RA}神经元和投射到X区域的HVC_X神经

元。(很少有神经元具有分叉的轴突, 即投射到 RA, 又投射到区域 X⁶³)。HVC_x 神经元已通过示踪剂注入 X 区域进行了预标记。插图显示了对电流注入的典型 HVC_x 电压响应。请注意, 在平稳电压上, 峰值速率会随时间推移而变化。这是 HVC_x 响应的许多特征中的两个, 它们在每只鸟类中都是一致的, 但因鸟类而异。b. 标记 HVC_x 神经元的示例。在右下角可以看到每个单元的轴突, 该轴突向 X 区域投影。比例尺: 30 μm。c. 三只鸟 (红色 240, 蓝色 88, 黑色 111) 每只中有八个不同的神经元, 在 100 pA, 200 ms 去极化电流脉冲响应下, 来自每只禽类的所有八个 HVC_x 的尖峰模式, 显示出禽类同质性和跨鸟异质性。迹线以尖峰数目从高到低的顺序排列, 然后是第一个 ISI 的持续时间。鸟类以增加兴奋性的顺序从左到右排序。d 第一个 ISI 与峰值速率的散点图在群体数据中显示了相同的同质性/异质性效应 (N = 253 个神经元)。N = 51 种独特的颜色/符号中的每一种都代表一只鸟的数据。菱形符号表示具有 8 个或更多记录的神经元的鸟。带有文本点的箭头标识图 1 和 2 所示的鸟。文本中提到的 1-3, 包括同一天记录的成对鸟类 (黑色 111 / 红色 240 和蓝色 145 / 橙色 34)。每个颜色/符号在图 1d, 图 2c, 图 3c 和补充图 3, 7 中指同一只鸟。

鸟鸣学习是一种完善的语音学习模型。鸟鸣的学习受到听觉反馈的调节, 这对于幼鸟¹⁹的鸟鸣发展和成鸟的鸟鸣维护²⁰是必不可少的。操纵听觉反馈的频谱或时间特征会引起鸟鸣行为的变化, 而鸟类可以根据参数和接收修饰反馈的特定鸟鸣音节做出自适应响应。理解这种快速而精确的反馈调节机制对于告知行为内部模型的计算理论很重要。

成年斑马纹雀有一个有趣的模型, 因为它们会唱出极其精确而不变的鸟鸣, 尤其是在将它们引向雌性时, 它们被认为在短时间内对反馈扰动相对不敏感²¹, 这与其他种类的孟加拉雀纹不同。但是, 斑马雀斑需要听觉反馈来维持其鸟鸣²⁰。哪些机理差异导致不同物种的反馈调节方式不同?

端脑鸟鸣系统包括最终与 syrinx 和呼吸肌接合以产生鸟鸣的运动路径, 以及与反馈介导的鸟鸣学习和维护相关的基底神经节路径。在前脑核 HVC (专有名称) 中, 投射到鸟鸣系统的基底神经节成分的基底神经节区域 X 投射 (HVC_x) 神经元 (图 1a) 显示了鸟鸣过程中的精确定时活动²³, 也许携带了有关鸟鸣的信息, 但并非必需鸟鸣²⁴。在静止的鸟类中, 已经在几种鸟类中观察到了 HVC 神经元中高度的鸟鸣选择性听觉响应^{25,26}, 但是在清醒的斑马雀科中它们被极大地抑制²⁷⁻²⁹。此外, 响应于鸟鸣过程中的听觉反馈扰动, 包括在 HVC_x 突触处在内的斑马鳍³⁰中的 HVC 发放活动没有改变, 而类似的操作可靠地改变了孟加拉雀科中的 HVC 活动³³。斑马雀斑中这种对反馈不敏感的模式可能有助于产生弹道 (反馈不变) 鸟鸣, 但是如果这样的话, 鸟类如何评估反馈呢? 在这里, 我们报告了一种令人惊讶的机制, 可以快速存储有关鸟鸣结构的信息。通过分析响应体细胞电流注入的原始数据轨迹, 我们显示出成年成年鸟类内 HVC_x 内在特性的均

匀性以及和鸟类鸟鸣相关的鸟类之间的变异的一致模式。均质性是通过可塑性机制保持的，并且对听觉扰动敏感。

2、HH 模型拟合

我们使用基于单室电导的 HVC_X 神经元³⁴的 Hodgkin - Huxley-like 生物物理模型来估计离子电流的大小。该模型包括产生尖峰的电流 (I_K 和 I_{Na})，高阈值 L 型 Ca^{2+} 电流 (I_{Ca-L})，低阈值 T 型 Ca^{2+} 电流 (I_{Ca-T})，小电导 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流 (I_{SK})，A 型 K^+ 电流 (I_A)，超极化激活阳离子电流 (I_h) 和泄漏电流 (I_L)。每个 HVC_X 神经元的膜电位因此遵循以下电流平衡方程：

$$C_m \frac{dV}{dt} = -I_L - I_K - I_{Na} - I_{Ca-L} - I_{Ca-T} - I_A - I_{SK} - I_h + I_{app}$$

其中 I_{app} 代表注入的恒定 DC 电流， C_m 是膜电容。手动调整了五个参数 (g_{Na} ， g_K ， g_{SK} ， g_H 和 g_{Ca-T})，以响应施加的阶跃电流定性地再现膜电位轨迹³⁴。我们固定了 g_{Ca-L} 的值，因为通过改变 g_{SK} 可以达到相同的拟合精度，因此无法区分两者。我们固定了 g_A 的值，因为在 HVC_X 中它的电导很小，并且对发射模式的影响很小。手动拟合对任何给定动物的其他细胞的拟合都是盲目的。HVC_X 模型神经元的所有参数均与 Daou 等人³⁴ 保持不变，电容 (C_m) 除外，成年 HVC_X 设置为 50pA，幼年 HVC_X 设置为 75pA (后者增加了 50%，由于幼年 HVC 神经元的大小较大)。

对于每个建模的神经元，通过迭代手动调整为 100pA 的去极化步骤和 -140pA 的超极化步骤设置参数。如果模型电压迹线与尖峰频率，单个尖峰的时序，尖峰幅度和生物电压迹线的静息膜电位相匹配，则认为该拟合为“良好”。至关重要的是，只有当模型使用数据集以外的数据进行预测时，才能验证模型的有效性(例如，图 3a)。

3、结果

3.1 个别鸟类具有统一的 HVC_X 固有属性。

我们在分布于 76 个动物的多个实验设计中的总共 370 个 HVC_X 神经元中，通过脑切片制备在细胞内全细胞膜片的视觉引导下进行了电流记录。如前所述³⁴⁻³⁸，我们明确地通过 HVC_X 的独特生理特性对其进行了鉴定，并确认了这些离线。生理特性在 70% 充满生物胞素的神经元中得到确认 (参见图 1b 和方法：组织学)，其中 96% 的轴突可以我们观察到，所有的轴突都清楚地向 X 区域 (图 1a, b)。进一步证实了 HVC_X 神经元的生理学特征，无一例外地在 14 位成鸟和 1 位幼鸟中得到了证实，该记录来自 114 个细胞的记录，这些记录通过向 X 区域

注射示踪剂进行了逆行标记（请参见方法：逆行示踪剂）。我们对获得稳定记录的每个单元进行了表征。一旦结果的结构开始出现，我们便专注于为每只动物尽可能多地记录 HVC_x 神经元，在进行切片记录之前开始记录每只鸟的歌声，并在通过刺激之前将所有细胞系统地带至 -70mV 电流，以最大程度地减少因膜电导的电压依赖性变化（插入时的静止膜电势为 $-70.49 \pm 2.3\text{mV}$ ，此处和整篇论文中为平均值 \pm SD）引起的变化，将电池保持在 -70mV 的电流为 $9.73 \pm 16.35\text{pA}$ ，最小 -30pA；最大 35pA；N=370HVC_x）。所有细胞均接受规范性去极化（100pA, 200ms）和超极化（-140pA, 200ms）电流脉冲，以及许多其他刺激。

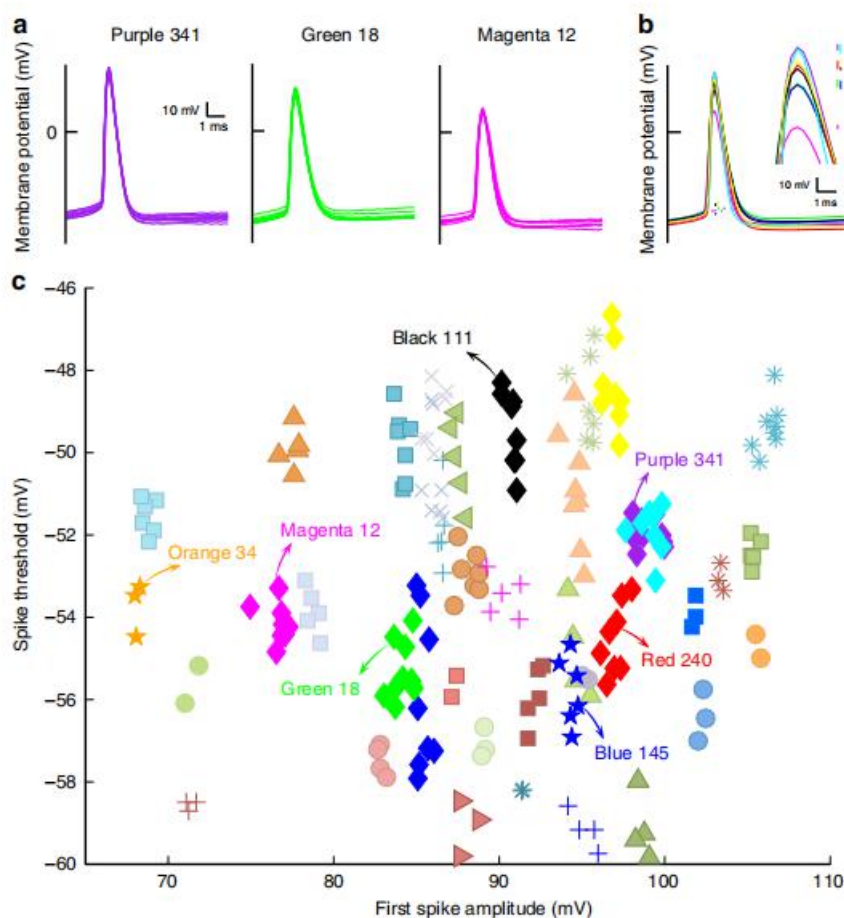


图 2 鸟类个体具有规范且独特的 HVC_x 固有属性：发放波形。相同的颜色用于表示出现在多个面板中的鸟。a 每只鸟的第一个尖峰波形具有相似的形状（紫色 341，10 HVC_x；绿色 18，9 HVC_x；品红色 12，8 HVC_x），并且各个鸟的尖峰形状不同。b 记录的 HVC_x 数量最多的八只鸟中的每只鸟的平均第一尖峰波形（图 1c 中的三只鸟，图 2a 中的三只鸟，其他两个 HVC_x 的鸟）。每只鸟用不同的颜色表示。竖线以尖峰阈值为中心，竖线的高度表示尖峰阈值变化（ $\pm 1\text{SD}$ ）。条形图彼此稍微偏移以提高可见性。插图显示了峰值附近平均尖峰波形的细节。垂直条以平均峰值幅度的峰值为中心，条的高度代表幅度变化（ $\pm 1\text{SD}$ ）。c 神经元倾向于聚集在尖峰幅度和尖峰阈值空间内的不同鸟类特定区域。

HVC_x 在鸟鸣过程中会发出短暂的强烈的尖峰脉冲³⁰，并在体电流注入的刺激下在切片中发出自适应的尖峰串^{34,36}。响应于典型的去极化电流的注入，我们观察到给定禽类的 HVC_x 的峰值模式都倾向于具有相似的发作，峰值次数和峰值时间，而这些特征因禽而异（图.1c）。第一个发放间期（ISI）与发放率的关系图显示了 HVC_x 种群的鸟内同质性和跨鸟异质性模式（N=253 个神经元，来自所有 51 只成年禽类，每只都有两个或多个 HVC_x，但是除了同胞对中的第二个或药理学和其他实验性处理（见下文）外，每只鸟 4.96 ± 2.31 个神经元），个别鸟与种群平均值有显著差异（图 1d）。否定了所有禽类中 HVC_x 具有相同的第一个 ISI 平均值。在更严格的零假设假设中，每对鸟共享相同的均值，成对 MANOVA 比较中有 69%（628）在 5% 的水平上被拒绝（使用保守的 Bonferroni 校正后）。在尖峰频率和前三个 ISI 的主成分分析中，PC1 占鸟类差异的 90%（补充图 1）。HVC_x 神经元发出的尖峰数量和速率的调节将影响其对基底神经节通路的贡献。因此，在这些切片记录中，HVC_x 神经元传输到其网络的活动在每只鸟类中相对均匀，并且在鸟类之间变化更大。个体动物之间的这种均匀性是未知的，并且由于在鸟鸣过程中观察到的不同 HVC_x 的尖峰模式中个体鸟类的变化而无法预料 30。

对于给定的禽类，HVC_x 的尖峰波形也倾向于符合共同的形状，而尖峰形状随禽类的不同而变化（有关我们表征的所有尖峰波形特征的定义，请参见补充图 1）。我们通过检查突发中第一个尖峰的形状（每个细胞一个尖峰）的形状来表征其特征，以响应规范的去极化刺激。在记录的 HVC_x 数量最多的三只鸟中（N=10、9、8），来自给定鸟的细胞具有惊人相似的波形，而每只鸟具有不同的尖峰波形形状（图 2a）。对于记录的 HVC_x 数量最多（ $n \geq 8$ ）的八只鸟，比较第一个尖峰波形的平均值有助于说明整个鸟类的变化，包括平均尖峰幅度和尖峰阈值的变化（图 2b）。尖峰幅度和尖峰阈值将不同鸟类的神经元分离为视觉上高度不同的簇（图 2c），并且该簇在统计学上具有显著意义（请参见方法：附加统计分析，图 2c）。峰值阈值被认为可以反射体中和峰值起始区域附近的兴奋性³⁹。因此，在每只鸟类中，HVC_x 的种群在发放时和发放形态上均表现出同质性，并且这些特征随鸟类的不同而不同。IP 的许多其他特征也聚集了来自不同鸟类的神经元（补充图 3）。尖峰幅度，平稳幅度，尖峰阈值和尖峰间隔等功能应随输入电阻而变化。我们在数据中发现了这样的关系，无论我们是否考虑所有神经元（ $R^2=0.29$ ， $P=4 \times 10^{-6}$ ，输入电阻 $181 \pm 35 M\Omega$ ，N=253 个神经元）与第一个尖峰幅度显著相关），或 51 只鸡中每只鸡的输入电阻和第一个尖峰幅度的整个单元的平均值相关（ $R^2=0.35$ ， $P=0.012$ ，t 检验）。

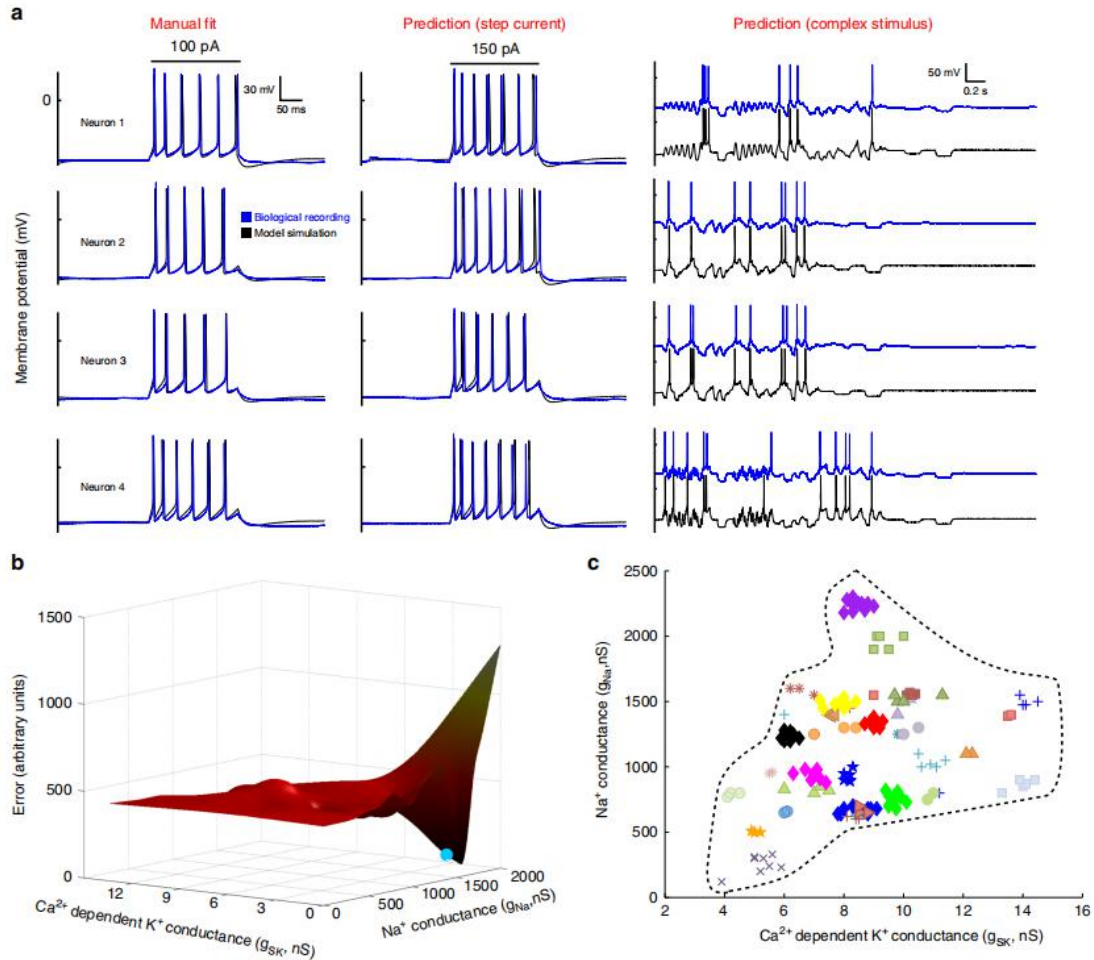


图 3 为均匀固有特性的离子基础建模。a 四个神经元的示例数据，其中五个最大电导的手动调节在相应的生物学记录（蓝色迹线）和模型仿真（黑色迹线）之间达到了良好的拟合。根据对 100 pA 的电流脉冲的响应来判断模型拟合（左图）。良好的拟合对拟合过程中未使用的电流注入产生了良好的预测，例如，考虑对 150 pA 幅值的阶跃电流（中间面板）和混沌电流刺激（右侧面板；未显示混沌刺激以保持清晰度）的预测）。b 示例误差流形（见文本）显示了在详尽的参数搜索中检查的五个的两个参数 (g_{SK} , g_{Na})。手动确定的拟合（蓝点）位于相同的凹面中，并且靠近全局最小值。c 所有 151 个人工建模神经元的散点图，显示了在整个群体中变化最大的两种电导 g_{Na} 和 g_{SK} 。用不同的颜色符号表示的不同动物 ($N = 38$) 在 2D 空间中占据不同的区域。虚线围住了建模数据集的二维电导空间，代表了正常成年斑马雀种群所占据的整个参数空间的估计值。图 5c, 5f 和 7c 中出现了相同比例尺的相同虚线。

对照实验和分析拒绝了一些假设，即鸟类之间的变异是由实验条件的不受控制的变异引起的。在每两天，我们使用两对相同的 ACSF 和细胞内溶液从两对鸟类（红色 240/黑色 111；蓝色 145/橙色 34）中记录。单个神经元的 HVC_x 尖峰序列值（ISI 与尖峰率）显示在四只鸟中聚集，但在整个鸟中变化很大（图 1d），每只鸟的神经元的尖峰波形相似，但变化太大在给定对的鸟之间有很大的差异

(图 2b; 补充图 3)。这表明在实验当天制备的 ACSF 除了渗透压, 内部(移液器)溶液或相对离子浓度以外的其他因素导致了 HVC_xIP 中禽类之间的差异。此外, 比较实验期间记录的不同细胞的峰值幅度或比较实验之间较长时间间隔(天)内每只鸡的平均峰值幅度, IP 值也没有随时间变化。串联电阻和第一个尖峰幅度之间也没有关系 (N=253 个神经元, 51 只鸟, R²=0.029, P=0.65, t 检验)。因此, 我们没有发现证据表明非特异性作用可以解释结果, 从而促使人们寻找 HVC_xIP 变异的生物学机制和行为解释。

3.2 对均匀固有特性的离子基础进行建模

神经元动力学和尖峰形状之间的关系应受给定细胞离子电流的大小影响。我们通过对神经元的较大子集 (63 只禽类中的 290HVC_x, 为任何给定禽类建模的所有细胞) 中的离子电流大小进行建模, 探索了 HVC_x 动力学与峰形之间的关系, 包括实验禽类 (见下文) 和大型未操纵的对照鸟的子集 (151 个神经元, 38 个鸟, 随机选择的鸟)。使用结合了最近通过 HVC³⁴ 药理学证实的离子电流的 HH 模型, 使用 Hodgkin - Huxley 型电荷平衡方程对细胞进行建模。我们使用单室模型, 因此没有树枝状或体细胞离子电流对我们进行和建模的体细胞测量的潜在贡献有所不同。HH 模型的大多数参数在生物学现实值上保持恒定, 而我们改变了五种主要离子电流的最大电导的幅度, 包括快速钠通道 (I_{Na}), 钾通道 (I_K), 钙依赖性钾通道 (I_{SK}), 超极化激活的环状核苷酸门控通道 (I_h) 和 T 型钙通道 (I_{Ca-T})。建模包括手动调整五个电流幅度的值, 以在 HH 方程 (模型神经元) 的输出和实际神经元的行为之间取得良好的匹配, 而只考虑对典型的去极化和超极化电流注入的响应。(离子电流对 HVC_x 尖峰波形特征的影响已在其他地方进行了广泛描述³⁴。) 根据启发式检查尖峰形状和尖峰列, 判断出良好的拟合, 并且在许多情况下, 获得了出色的拟合 (图 3a, 左面板)。

通过针对拟合过程中未使用的当前注射评估模型预测来测试模型拟合。好的拟合往往会产生好的预测。对于其他幅度的阶跃电流 (图 3a, 中间图), 以及比阶跃电流具有更复杂的动力学特性的混沌电流 (图 3a, 右图), 观察到了很好的预测。良好预测的案例表明, 神经元的尖峰波形形状与其动力学特性所描述的爆发特性有关。为了扩展此分析, 我们采用了拟合优度的定量度量, 使用从当前脉冲注入测得的八个响应参数将模型拟合与模型预测进行了比较 (请参见方法: 模型预测和交叉验证)。这证实了该模型做出了很好的预测, 例如, 对于 45.7%

(69/151) 的细胞进行 150pA 注射的预测与图 3a 中的神经元 4 的预测一样好或更好。在 75pA 和 150pA 时的预测质量是可比的, 而在较高电流 (175pA) 时的预测质量较差。然后, 我们测试了手动拟合过程是否发现了局部最小值或整体误差最小值, 这还评估了手动拟合过程是否可能无法识别代表不同神经元离子电流

大小的不同组合的不同局部最小值。为此，我们对五个离子电流幅度的空间进行了详尽的参数搜索，并使用相同的拟合优度来评估模型输出相对于实际神经元的输出（请参见方法：详尽的参数搜索和补充图 4）。这表明，人工拟合产生了无偏见的结果，并且倾向于发现全局最小值（图 3b）。最后，我们还进行了交叉验证分析，表明给定神经元的模型在预测该神经元的反应方面比其他鸟类的神经元模型要好得多（请参见方法：模型预测和交叉验证及补充图 5）。尽管在这些建模研究中保持不变的 HH 方程的其他参数原则上也可以解释鸟类内部和鸟类之间的相似变化，但是模型的出色性能使我们将注意力集中在估计的离子电流强度的潜在生物学意义上。

检查五个离子通道的预测电流强度（手动拟合）的分布发现，每只动物的神经元在离子电导强度的五维空间中占据的体积很小，并且动物之间存在很大差异。可以从上述尖峰波形和尖峰序列的变化中预见到这一点，但是这里用在药理上可行的 HVC_X 离子电流的大小表示。散点图以图形方式显示了成年动物 (g_{Na} 和 g_{SK} ; 图 3c) 中变化最大的两个电流以及其他电流（补充图 6）。手动比较数据和通过参数搜索拟合数据的散点图产生了相似的结果（补充图 7）。在我们的样本中，物种内 g_{Na} 的模型估计值变化超过 19.2 倍， g_{SK} 的变化超过 4.1 倍，而具有 5 个或更多神经元的每只动物内的平均变化为 $1.23x \pm 0.48(g_{Na})$ 和 $1.14x \pm 0.12(g_{SK})$ 。对于其他三种电流，获得了相似的结果（每只鸟的所有神经元的最大变异/平均变异： $1.24x \pm 0.15(g_K)$ ， $1.17x \pm 0.34(g_h)$ ， $1.19x \pm 0.69(g_{Ca-T})$ ），分别进行了展示鸟类在电导量值的五维空间中占据了很小的空间。为了量化每只鸟的所有五种离子电导率的联合变化，对于 $HVC_X \geq 8$ 的 8 只鸟，我们定义了最小超椭球体的体积，跨越了每只鸟中所有神经元的五种电导率大小的分布。平均而言，鸟类的超椭球体仅占“物种”体积的 $0.00037 \pm 6.1 \times 10^{-5}$ ，即 38 只未受操纵的鸟类的全部 151 个神经元所占的超椭球体体积。（如果每个参数占据总范围的 0.1，并且该空间是各向同性的，则将产生 10^{-5} 的体积。）这证实了这样的趋势，即每只鸟中所有神经元的五个电导具有相似的大小，并且鸟类之间的大小差异很大。考虑所有鸟类的五个电导幅度值，得出的结果显然是非高斯分布。在五个离子电导幅度的主成分分析中，PC1 占有所有鸟类所有建模神经元方差的 41.4%，其他 PC 约为 20%。这表明这些电流并没有简单的线性组合来捕获动物之间的大部分变化。

3.3 评估孤立网络 HVC_X 中的固有电流

我们使用的建模框架没有考虑片中网络活动可能引起的任何当前来源。为了控制这一点，我们在四只动物中进行了实验，这些动物在洗澡后使用一系列旨在阻止突触快速传递的药物混合物来表征神经元（请参见方法：药理学操作）。（由

于冲洗可能不完全，因此在药物治疗后放弃了一片切片，因此我们每片切片仅记录一个细胞。)在所有情况下，该模型均显示出估算的 SK 电流减少，而其他电流的估算则保持不变(图 4a)。重要的是，即使观察到神经元的静息膜电位有小幅增加，药理学处理后单个神经元的尖峰形态也没有改变(图 4b)。因此，从网络中分离细胞不会破坏鸟类内相似性和鸟类间电流强度估计值的模式(图 4a)。我们将这些结果解释为表明，药理学治疗使抑制性中间神经元(HVC_I)沉默，这为 HVC^{40,41} 提供了实质性的投入(图 1a)。在 HH 电流平衡方程中，SK 电流的减少会增加细胞的总体兴奋性，模仿抑制性输入的减少。

3.4 内在的细胞特性与学习的联系

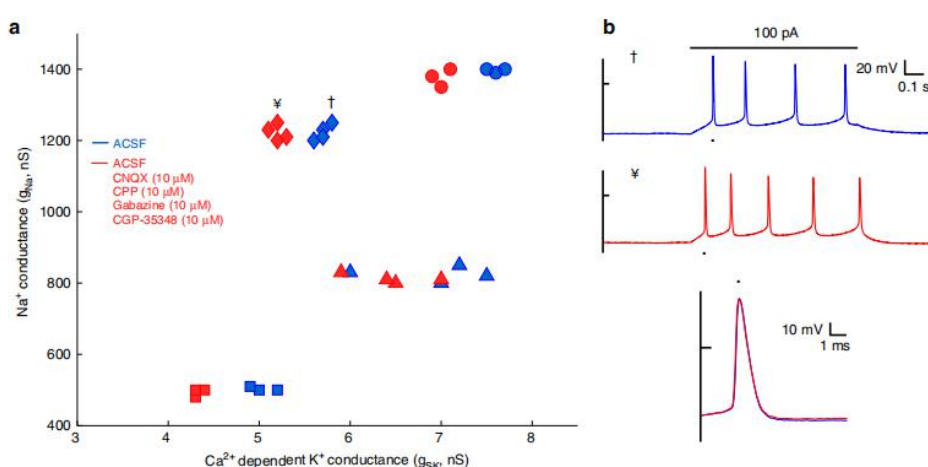


图 4 直接测量网络隔离的 HVC_x 中的内在电流。a 在使用快速突触拮抗剂之前(蓝色)和之后(红色)的四只鸟(不同符号)的神经元电导。b 示例神经元，在应用拮抗剂之前(†)和之后(‡)，突触阻断后兴奋性增加(上图)，但刺突形态无变化(下图)。

然后，我们转向了强大的鸟鸣学习机制，以洞悉哪些因素可能导致 HVC_x 神经元种群内在特性的这种意料之外的变化模式。大多数鸟类似乎随机分布在电导幅度参数空间中(图 3c)。为了检查分布是否与鸟类的鸟鸣有关，我们考虑了已为其建模神经元并录制鸟鸣的 18 只鸟类(请参见方法：鸟鸣录音)。我们计算了一只鸟的电导值的质心与其他 17 只鸟的质心之间的欧几里得距离，并使用广泛采用的标准斑马线将这些距离与相应两只鸟的歌的相似度进行了比较。鸟鸣的相似度(比较规范主题的对称测度-音节的序列 42)。令人惊讶的是，当一起考虑所有鸟类的数据时，这两个度量之间存在很强的相关性(不完全相同的下三角矩阵值的线性回归， $R = -0.70$, $P < 10^{-4}$ ，这里和以下的 t 检验)，以及当 11/18 鸟的数据被单独考虑($P < 10^{-3}$ 或更小)时(图 5a)。此外，一只离群的鸟引起了所有不重要的结果。当我们删除白色 20 号时，即记录的 HVC_x 数量最少($N=3$)的两只鸟之一，除单独考虑的其余一只鸟以外，所有鸟的 P 值均 < 0.001 (16 只鸟)，

其余一只的边际显著性 ($P < 0.06$), 并且在组数据中得出 $R = -0.75$ 且 $P < 10^{-4}$ 。我们还检查了方差归一化的欧几里得距离 (马哈拉诺比斯距离, 请参见方法: 马哈拉诺比斯距离) 之间的相关性, 证明了相似的结果 (所有鸟类的数据一起考虑, $R = -0.75$, $P < 10^{-4}$)。我们还通过重新计算移动 g_{SK} 之后的电导距离 (所有鸟类, 包括离群值, 鸟鸣相似度与修正的欧几里得距离的相关性), 重新计算了电导距离, 从而排除了网络效应通过 g_{SK} 估计的贡献 (图 4) 主导该计算的可能性。 $R = -0.69$, $P < 10^{-4}$; 与修正的马氏距离, $R = -0.54$, $P < 10^{-3}$)。因此, 值得注意的是, 不同斑马雀斑中 HVC_x 固有离子电流的差异与鸟类鸟鸣的声学特征差异有关。这些结果激发了未来的工作, 以确定哪种鸟鸣功能最能描述 HVC_x 固有属性中从鸟到鸟的变化, 无论这些特性是声学的, 与运动相关的⁴³, 还是与鸟鸣演奏的其他特征相关的。此类研究可能会深入了解将 IP 与感觉运动行为联系起来的机制。

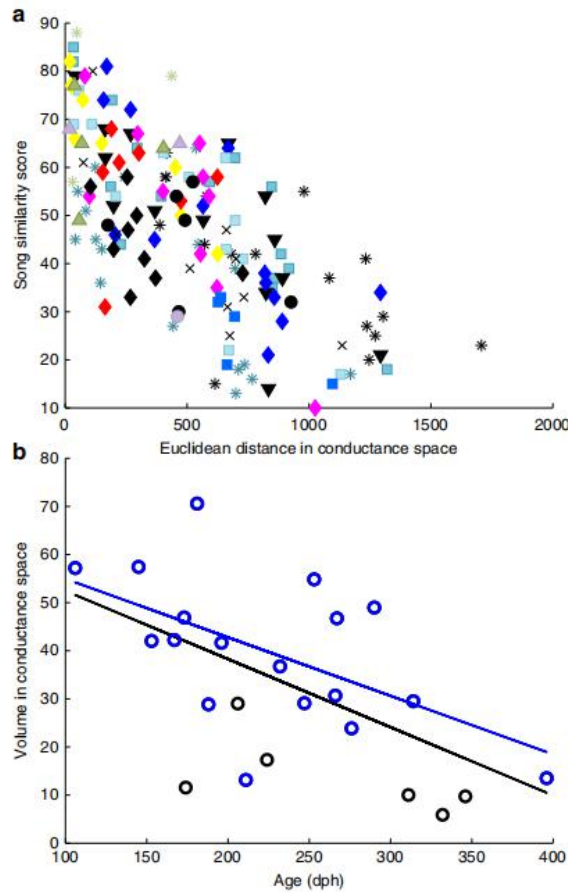


图 5 将固有的细胞特性与学习联系起来。一个二维散点图, 其中包含 18 只已建模并记录其鸣叫的鸟。每只鸟都有一个独特的颜色符号。对于每对鸟, 比较两只鸟的歌曲时的相似度得分⁴²相对于两只鸟的电导值质心 (手动拟合) 之间的距离作图。给定颜色符号绘制的点数范围为 1 到 17 ($N \times N$ 矩阵的下三角部分中的非同一性值)。b 二维散点图, 显示了每只鸟相对于其年龄 (孵化后天数, dph) 的五维电导空间量。蓝色圆圈表示具有 5 个以上神经元的鸟, 黑色圆圈表示具有 4 个以下神经元的鸟。(体积测量对少量记录的神经元敏感, 例如,

请注意，所有黑圈均位于回归线以下。) 两种拟合均适用于所有鸟类 (黑线, $R = -0.57$ 和 $P = 0.0038$, t 检验) 对于 ≥ 5 个神经元的禽类 (蓝线, $R = -0.55$, $P = 0.016$, t 检验) 很重要 (见文本), 表明 IP 差异与年龄有关。

许多鸣禽物种中的鸟鸣个体发育一直持续到成年, 远远超出了性成熟和鸟鸣的结晶。例如, 在成年斑马雀科中, 对听觉反馈的敏感性 (通过震耳欲聋后鸟鸣的变化来衡量) 随年龄的增长而降低⁴⁴。我们观察到 IP 的变化伴随着年龄相关的变化, 每只鸟的所有神经元占据的空间的总电导量随着年龄的增长而减小 (图 5b)。失去对听觉反馈的敏感性可能会导致整个 IP 失去 IP 的变化, 但是还需要进一步的实验来解决这两者是否在机械上相关, 以及这些关系是否反映了鸟鸣学习或学习衰老的独立影响。

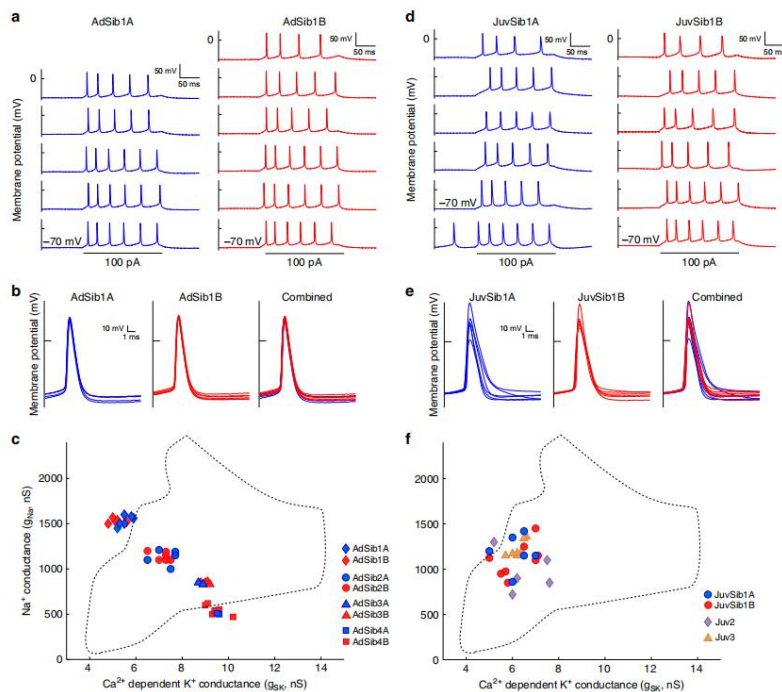


图 6 均质内性质的发展基础。尖峰响应一对成年同胞 (> 90 dph) 记录的神经元的标准去极化电流而训练。注意鸟类内部和鸟类之间响应的相似性。b 每个成年同级兄弟 (左图和中面板) 的第一个尖峰波形, 然后再组合 (右图), 显示了两个同级兄弟之间的惊人相似性。c 每对兄弟姐妹在由 g_{Na} 和 g_{SK} 跨越的参数空间中占据相似的区域, 而四对兄弟姐妹中的每对兄弟姐妹都具有不重叠的分布。红色和蓝色区分兄弟。来自这些同级的数据表明, 物种所占据的参数空间比图 3c 中所示的要大一些。d 尖峰序列响应一对少年同胞 (JuvSib1A, 57 dph; JuvSib1B, 58 dph) 记录的神经元的标准去极化电流。请注意, 与成年兄弟姐妹不同, 幼鸟内部和之间的差异很大 (参见图 5a)。e 幼年兄弟姐妹的第一个尖峰波形, 显示出鸟类内部和鸟类之间的巨大差异。f 四只幼鸟在参数空间中占据了一个重叠的有限区域, 每只鸟的电导值显示出相当大的分散性。与 (c) 比较; 两个面板共享相同的 X 轴和 Y 轴范围。对于 (c) 和 (f), 虚线表示未操纵的不相关成年鸟所占据的区域 (图 3c)。

3.5 均匀固有特性的发展基础

这些结果的直接含义是，鸟鸣相似的鸟应该拥有 IP 相似的 HVC_x。我们通过检查四对同胞成年鸟中 HVC_x 的 IP 对其进行了测试。每对的兄弟姐妹都在一个繁殖群体中长大，并具有相同的父母，但是四对兄弟姐妹在生理上来自四对不同的父母。如 IP 和鸟鸣声学之间的关系所预测（图 5a），每对同胞鸟的神经元具有惊人相似的尖峰序列（例如，图 6a）和尖峰波形（图 6b），在四对之间变化的鸟。从尖峰波形和尖峰序列获得的测量分布（尖峰率，第一尖峰间隔，平稳幅度，尖峰阈值，第一尖峰幅度）支持了这种视觉印象，每对同胞的神经元倾向于聚集在一起，但是每个同胞对的不同区域（补充图 8）。我们可以访问其中两对鸟鸣中的两个兄弟的鸟鸣，并确认相应的预测，即每对兄弟姐妹的鸟鸣具有非常相似的时间和频谱特征（例如，补充图 9），它们之间存在差异。三对鸟鸣。对于每对同胞，HVC_x 在电导空间中占据非常相似的区域（图 6c）。这与尖峰波形，尖峰活动模式以及对成对的随机选择的禽类进行比较的模型化的离子电流幅度的巨大变化形成鲜明对比（图 2、3、4）。

	Orange 168 4 h	Pink 89 1 day	Orange 116 1 day	Orange 148 2 days
Number of introductory notes preceding each song	*	**	**	**
	Baseline: 1.76 ± 0.84 DAF: 2.43 ± 1.07	Baseline: 2.11 ± 1.05 DAF: 2.63 ± 1.07	Baseline: 2.16 ± 1.28 DAF: 2.70 ± 1.11	Baseline: 1.68 ± 0.91 DAF: 2.06 ± 0.95
Number of songs sung over the interval of analysis	Baseline: 70 DAF: 28	Baseline: 175 DAF: 102	Baseline: 132 DAF: 96	Baseline: 172 DAF: 109

Numbers of notes analyzed over 1 s preceding each song. Numbers of songs analyzed over first 4 h of the day preceding and the day of DAF exposure for Orange 168, or over the full days for the other birds. Two-tailed unpaired t test. *P < 0.01; **P ≤ 0.001.

同胞鸟具有相似的遗传学，相似的年龄，并且可能遵循相似的声音发展轨迹 45，从而达到相似的成年鸟鸣。为了检查声乐发展学习是否有助于调节神经元离子电导 17,18，我们初步研究了鸟鸣学习的整形阶段（孵化后（dph）：55（Juv2），57（JuvSib1A），58（JuvSib1B），62（Juv3））（n ≥ 5HVC_x 鸟），其中两个是兄弟姐妹。与在每只未操纵的成年鸟类中观察到的 HVC_x 特性的相似性不同，来自每只幼鸟的 HVC_x 表现出更大的可变性。比较来自幼年兄弟姐妹对和成年兄弟姐妹的数据，这尤其令人信服。两个少年同胞中每个同胞的不同细胞发出的尖峰序列存在显著变化（图 6d），远大于成年同胞（图 6a）所观察到的变化，并且这些差异在统计学上具有显著意义（见图 6d）。方法，其他统计分析，图 6d）。来自两个少年同胞的神经元在尖峰波形中表现出相当大的变化（图 6e，左图和中图）。与成年兄弟姐妹相比，少年兄弟姐妹中尖峰波形的变化要大得多（参见图 6e，b，右图），并且这种差异在统计学上具有重要意义（参见方法，其他统计分析，图 6e）。在所有四只幼鸟（包括同胞对）中，细胞的峰值运动特征分布（补

充图 10) 比在四个成年同胞对中的每一对对应鸟的分布更分散 (比较图 10) 分别是补充图 8a-c 和补充图 10a-c)。

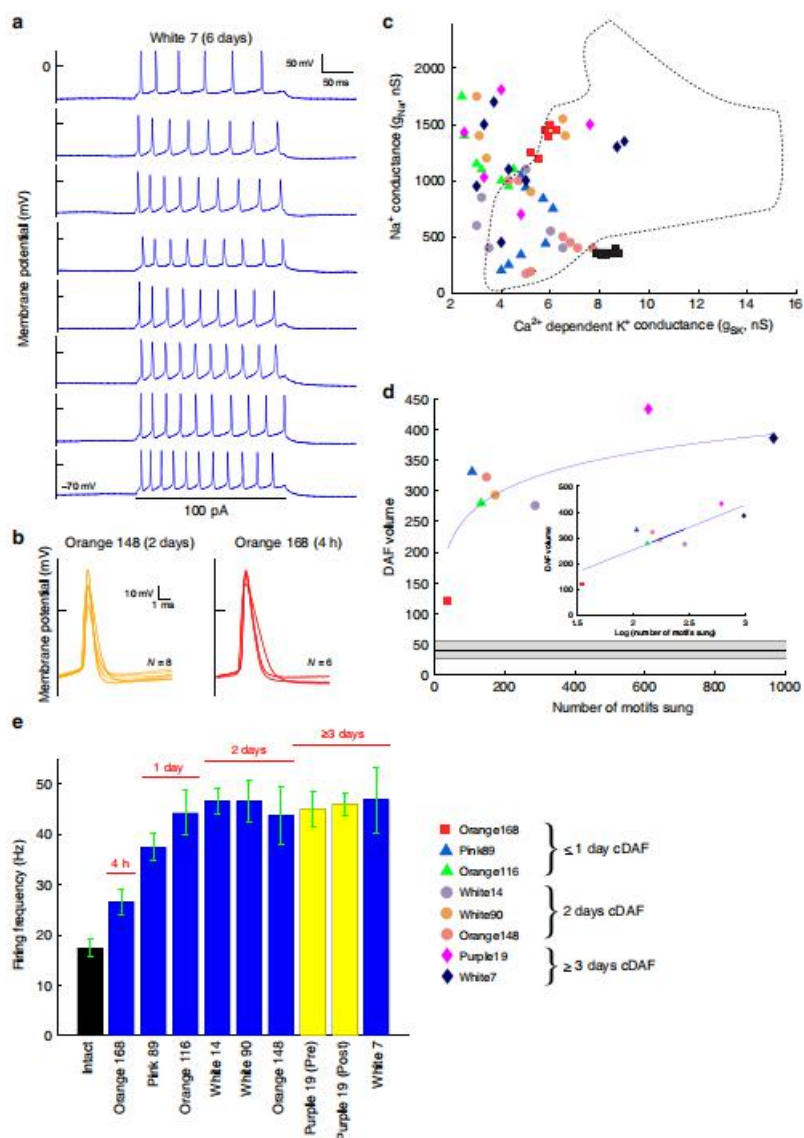


图 7 学习迅速调节内在特性。训练鸟类白色 7 的神经元 (cDAF 暴露 6 天), 与完整的鸟类相比显示出巨大的差异 (例如, 图 1c)。b 暴露于 cDAF 2 天后, 鸟类的第一个发放形态发生重大变化; cDAF 暴露仅 4 h 的鸟类也观察到一些变化。c 对所有 cDAF 鸟类的神经元进行建模显示, 离子电流大小的紧密簇丢失, 并且移至未操纵的成虫占据的区域之外 (虚线)。d cDAF 禽的痕量 (参见方法: 痕量) 随基序数量对数变化。插图显示了线性对数图, 表明包括 4 h 点在内的所有点都接近拟合线。黑线 (均值) 和灰色阴影区 (SD) 显示了所有 HVCX ≥ 5 的未操纵鸟 (N = 17) 的相应迹线量。图例在面板中显示鸟类的符号颜色 (b - d)。e 平均射击率。黑条 (完整) 是 51 只未操纵鸟, 273 个神经元的平均值 (17.38 ± 9.02) 的平均值。每个蓝色条是一只 cDAF 鸟 (平均值 \pm SD)。在暴露于 cDAF 的第一天, cDAF 禽类的兴奋性增加, 随后的几天没有增加。在 cDAF 暴露量为 3 天的家禽中 (紫色 19, 黄色条形), 在用快速突触阻断剂沐浴切片后, 可以保持增加的发放率。

为了评估电导体积，由于在两只幼鸟（HVC_x分别为5和6）中几何体积的定义不明确，因此我们使用了“痕量”体积测量。与成年鸟类相比，四只幼鸟的电导空间中每个点的分布都具有较大的痕量（平均 0.355 ± 0.12 ）。幼体和成年体之间的这种差异非常显著（ $P < 10^{-5}$ ，未配对 t 检验， $t = 7.9$ ， $df = 14$ ，比较了痕量的幼体和痕量的 $n \geq 6$ HVC_x/未操纵的成年禽体鸟）。有迹象表明可能是与年龄有关的影响，最老的鸟（62dph; Juv3）显示出的变异小于三只年轻的鸟（图 6f）。

幼年 HVC_x 神经元种群的特征是，一些但不是全部神经元对超极化电流脉冲表现出很少或没有下垂，并且在这些细胞中，电流脉冲终止后没有反弹（或在某些细胞中被追踪）（简单的反弹去极化），类似于以前报道的少年 HVC_x 神经元 17。在幼年 HVC_x 神经元的 HH 模型中， g_{CaT} 电导几乎没有变化，但 g_H 电导却有很大变化。一般而言，与成鸟相比，未成年人的 g_H 和 g_K 值变化幅度大于 g_{Na} 或 g_{SK} 。此外，所有少年神经元都被限制在成年人占据的 g_{Na}/g_{SK} 空间的一小部分（图 6f）。尽管样本量很小，但这表明对内在特性的发展变异存在初步的遗传约束，这些内在特性随电导而变化，并且学习有助于扩大其中一些约束（例如，特征空间中的位置），同时限制其他约束（例如，特征空间的变化）。包括交叉培养兄弟姐妹在内的发展研究可以帮助阐明这些限制。然而，目前的结果表明，HVC_x 的内在特性在开发过程中发生变化[17,18]，不是通过纯细胞自主现象而是以对网络和行为约束敏感的方式发生的。

3.6 学习可以迅速调节内在属性。

结果表明听觉反馈在调节 HVC_xIP 中的作用，这是在幼鸟鸟鸣学习过程中首先表现出来的，并一直持续到成年。为了直接评估这种可能性，我们转向一种技术 46 来操纵鸟鸣过程中鸟类的连续延迟听觉反馈（cDAF）经历（请参阅方法：延迟听觉反馈）。隔离的成年鸟类（因此会唱“无方向性”鸟鸣）被暴露于 4 小时至 6 天的 cDAF 中（cDAF 的发作是在打开房灯的早晨），然后我们从这些鸟类中进行体外 HVC_x 录音。我们分析了 cDAF 暴露时间最短的四只鸟的鸟鸣情况，并在第一次使用 cDAF 的当天和第二天的基准日检查了所有鸟鸣。我们观察到 cDAF 对鸟鸣行为的明显影响，初步观察与正在进行的行为实验中对其他鸟类的更详细观察一致。与之前的基准日相比，鸟类在 cDAF 暴露的第一天倾向于鸟鸣的鸟鸣较少，并且每首 cDAF 鸟鸣倾向于带有更多介绍性的注释（表 1）。这些影响迅速发生，例如仅在 cDAF 暴露 4h 的鸟类中观察到了这些影响。对于其他形式的修饰听觉反馈，尚未报告斑马雀跃鸟鸣行为的这种快速变化，这可能解释了为什么我们发现了 HVC_x 生理学同时伴随快速变化而其他人没有这种变化

有趣的是，最近有报道说正常鸟类中的 HVC_X 子集在鸟鸣开始之前就活跃了，因此包括鸟类产生介绍音符的时间间隔 47。在这里，令人信服的结果是，与未操纵的成年鸟相比，cDAF 成年鸟 ($N=9$) 的 HVC_X 表现出内在特性的巨大变化。例如，在经历了 6 天的 cDAF 之后，在白色 7 号鸟类中记录的 8 个 HVC_X 中，尖峰爆发模式有很大的变化，尖峰频率几乎变化了 2 倍，并且尖峰幅度变化很大(图 7a; 图 1c, 2b, 6a) 的特征在完整的成年鸟类中从未观察到。cDAF 鸟类的第一个峰值波形也显示出比未操纵的成年鸟类的预期要大得多的变化(图 7b; 参见图 2a, b, 6b)，并且这种影响非常显著(请参见方法，其他统计分析，cDAF)。(未经操作的动物的神经元与接触 cDAF 的动物的神经元之间的输入电阻没有显著变化：对照组， $181 \pm 35 M\Omega$ ， $N=253$; cDAF， $185 \pm 24 M\Omega$ ， $N=62$ ， $t=0.98$ ， $d.f.=313$ ， $P=0.15$ ，未配对 t 检验)对 cDAF 禽类 HVC_X 中相关离子电流的分析显示，在未操纵禽类中，离子电流幅度的紧密簇显著分解(例如，图 7c)，White⁷ 的电导几何体积为“物种”体积的 0.084，即非操纵鸟类的平均值的 228 倍。这些结果是否来自异常的感觉反馈还是运动对该反馈的响应尚待确定，但是在任何一种情况下，结果都表明成年动物的内在特性以与正在进行的行为紧密相关的方式动态地受到调节。未来的研究可以确定调节响应是混沌的还是合法的，在 cDAF 鸟类中看到的尖峰波形形状，电导值和爆发特性的分布可能反映了 DAF 暴露引起的许多不同的鸟鸣语法和其他特征的变异性⁴⁶。

cDAF 暴露时间较长的禽类，其内在特性的变化尤其明显，例如，将 cDAF 暴露 4h (橙色 168; 图 7b, 右图)，暴露 2 天 (橙色 148; 图 148) 的鸡的峰值波形进行比较。图 7b, 左图) 和 6 天的暴露时间 (白色 7; 图 7a)。这表明聚类的破坏与鸟类在听觉反馈错误条件下的鸟鸣次数有关，即使在 cDAF 暴露仅 4 小时后，该现象仍很明显(在此期间，Orange168 演唱了 35 个图案，这是鸟鸣的主要单位)。观察到每只鸟鸟鸣的基序数与该鸟的 HVC_X 的电导值的痕量之间有对数关系(图 7d)。线性对数图(插图 7d, 插图)显示，包括 4h 点在内的所有点都合理地拟合了对数关系。cDAF 鸟类的拟合在 5.9 个基序处与 $HVC_X \geq 5$ 的 17 只未操纵鸟类的体积最大。鉴于电导率变化和 cDAF 暴露之间的实际关系不太可能严格对数，因此该估计值是近似的，但是这些结果表明正在进行的行为可以在非常快的时间尺度上调节神经元群体的内在特性，可能与时间相当反馈改变鸟鸣的尺度。

我们观察到 cDAF 鸟类的数量较小 g_{SK} 值超出预期，许多 cDAF 鸟的神经元值低于任何未操纵鸟的观察值(图 7c)。较低的 g_{SK} 量将表现为增加的兴奋，实际上我们观察到 HVC_X 神经元的兴奋性增加(峰值频率)，这仅限于 DAF 暴露的第一天(图 7e)。这表明诸如调节体膜离子通道密度的快速机制可能是引起

内在兴奋性调节的近端机制。在稳态条件下（在 cDAF 发作后 3 天进行测试），在阻断快速的突触连接后，兴奋性得以维持，表明它是 HVC_x 固有的（图 7e，紫色 19，黄色条）。总体而言，我们的数据表明，HVC_xIP 值反映了一些与鸟类的鸟鸣行为有关的体验信号，将内在属性的调节与深入研究的鸟类学习模型联系在一起。

4、讨论

越来越多的证据将 IP 的修改与学习现象联系起来^{2,4, 17, 18, 48, 49}。在这里，我们利用能够产生高度精确且可重复的学习行为的动物，在个体动物的层面上描述 IP 组织的特征。对体细胞注射响应的原始数据痕迹的分析表明，成年成年禽体内 HVC_x 内在特性的均一性和禽类之间的变异具有一致的模式。均质性通过塑性机制保持。它在发育上不稳定^{17,18}，而在成年人中，有效形式的听觉反馈操纵⁴⁶会导致起病迅速，并不断破坏 IP 同质性。结合了五种已知的 HVC_x 离子流的霍奇金-赫克斯利形式模型³⁴很好地捕获了这些结果，既代表了观察结果的简洁描述，又代表了潜在的细胞机制的一种假设。不管采用哪种机制，都可以观察到 IP 的同质性，但是，值得注意的是，它们受到与单个鸟类学到的鸟鸣的特征相关的约束，如 HH 建模的结果所示。细胞特性和学习之间的关系在概念上很重要；它可以深入了解鸟类鸟鸣学习的具体情况，但对神经编码也具有更广泛的意义。

为了评估 HH 模型，从文献中估计了除主要离子流以外的许多生物物理参数，并使其保持恒定，并将可能的树突状贡献折叠到一个单室模型中。这种方法的局限性需要仔细评估。我们模型中固定的生物物理参数的变化，以及 HVC_x 可能表达的其他未知离子通道，以及动物内部和动物之间 HVC_x 解剖结构的相似性变化，都可能产生不同的结果并影响对 HVC_x 的估计。我们确定的当前幅度。统计物理学中应用于高维空间数据同化问题的技术为解决该问题提供了一种有原则的方法^{51,52}，并且可能有助于确定生物物理参数的子集是否是鸟类学习形成的参数。但是，令人惊讶的是，对所有可能的解决方案的大空间进行详尽的测试往往会产生一个全局全局最小值，该全局最小值在给定禽类的所有 HVC_x 之间共享。例如，我们报道了不同动物之间的 g_{Na} 差异很大（几乎 20 倍），这一结果保证了采用替代技术的后续实验。与此相比，龙虾气孔神经节（STG）的神经元可以表达不同动物中离子电流大小的 4 倍变化⁵³。对鸣禽物种进行的比较分析可能有助于将鸟鸣行为的差异（例如速率，复杂性，时机，精度，学习程度）与细胞特性的变化联系起来，也许可以洞悉整个分类单元的变化。

我们的结果提出了一个问题，即在给定的动物中，HVC_x 神经元的 IP 如何共享相似的值。如果具有相似形态的同源神经元接收到相似的突触输入（包括反馈），那么这可能倾向于通过 IP 可塑性机制来调节输出的相似性。除网络效应外，

膜电压本身可能有助于直接调节离子通道的共表达，从而提供了另一种机制，神经元的输出可通过该机制影响其自身的电导幅度⁵⁴。斑马纹鸟鸣系统功能组织的已知特征与这些 IP 可塑性机制的可靠表达相一致。给定的斑马雀斑通常会演唱一个精确复制的鸟鸣图案，HVC_X 和 HVC_{RA}（HVC 投射神经元的另一种主要类别）在鸟鸣过程中发出非常高频率的短暂尖峰时，往往表现出明显的规律性。。每个尖峰脉冲都是不变的，因此看起来似乎比鸟鸣^{23,30}中携带的信息少得多。因此，在给定的斑马线上，不同的 HVC_X 可能会收到惊人的相似输入，具有惊人相似的尖峰脉冲爆发活动，这可能会导致相似的 IP。然而，在鸟鸣过程中活跃的不同 HVC_X 会在每个鸟鸣主题中发出 1-4 个尖峰脉冲³⁰，但是我们在样本中检测到 HVC_XIP 的同质性。除非我们在切片中采样时不知不觉地将录音偏向于 HVC_X 的子集，否则这些考虑似乎表明 IP 调节发生在各个尖峰脉冲的水平。

综上所述，这些是在“冠军”脊椎动物模型中表达的神经元组织的极端特征，以提高运动行为的准确性。这表明，如果更难于在其他物种中检测到 IP，则 IP 也受到类似的监管。

相同的解释可以帮助解释 IP 与鸟类鸣叫行为之间的关系。尽管已经确定在 HVC²³ 中高度调节鸟鸣期间的尖峰定时，但仍存在关于在鸟鸣期间 HVC 中代表尖峰定时的哪些特征的争论^{43、55、56}。就像某些人^{43,57}所述，如果在鸟鸣过程中 HVC 神经元种群的活动反映了个体鸟类鸟鸣的特征，那么这可以用来雕刻与每只给定鸟类鸟鸣的声音相关联的 HVC 神经元的 IP。HVC_X 在鸟鸣过程中的定时功能是否会因鸟类而系统地变化，这一点尚待测试。在这里，我们使用了一种异常（连续延迟）听觉反馈的有效形式，该反馈对鸟鸣行为和 HVC_XIP 产生了快速影响。在这种情况下评估 HVC_X 超阈值活性将很有价值。

HVC_XIP 也在更长的时间范围内受到监管。最近的一项研究¹⁷表明，HVC_X 的流挂性和回弹性在发育过程中显示出发育变化和变异性。我们确认了这些结果，并将其扩展到包括 IP 的其他功能，尖峰波形和兴奋性（发出尖峰的次数）。在随后的研究中，据报道，未受训的幼鸟表现出与成年动物相似的特性，但受辅导的幼鸟与这两种幼鸟均不同，这似乎是自相矛盾的结果¹⁸。我们也观察到幼年家禽和成年家禽之间的差异（图 6f），我们的结果可能有助于解决所报道的悖论。鉴于先前的研究集中在从 HVC 神经元的多个类别进行记录，因此每个细胞类别仅记录了很少的细胞。如此处报道的那样，这排除了采样足够的 HVC_X 来检测单个成年鸟内在特性的同质性的问题，并且无法解决 HVC_XIP 在单个未成年幼鸟中的分布。如果在辅导之前，HVC_X 的内在特性在每个幼年期都广泛分布，那么鉴于样本大小为 1-3HVC_X/bird¹⁸，就不会检测到这种情况，而且未受训和成年鸟类中每只鸟类的神经元样本都将广泛出现。同样分散，解决了悖论。未来的研究探索

未受辅导和受辅导的幼鸟内在特性的可变性可能是阐明发育鸟鸣学习的遗传和表观遗传学特征的引人注目的方法。

HVC_xIP 的群体同质性在功能上有什么意义？如果所有 HVC_x 都共享 IP 的公共值，则表示检测小扰动的公共基准。HVC 网络中的微小变化可能会导致 HVC_x 的一小部分 IP 发生变化，这可能表现为尖峰脉冲时序的变化。如果给定的下游 X 区神经元比较从不同 HVC_x 接收到的尖峰脉冲(可能具有适当的延迟)，则可能会对此类变化敏感。相同的逻辑扩展到其他不太相似的网络，其中具有相似 IP 的神经元将倾向于更可靠地反映相似输出的相似输入。这表明神经元网络的稳定性包括 IP 的规范化，给定功能网络或神经元整体的所有神经元可能倾向于共享 IP 的通用值。这种正规化将来自包括学习在内的动态过程。

我们在这里报告的神经元集合的固有特性的正则化也可能表现在突触组织中，由于技术原因，这很难评估。然而，我们推测单纯的突触机制不足以解释 HVC 神经网络中的信息存储。我们证明，(至少) HVC_x 神经元的内在兴奋性的可塑性有助于鸟鸣记忆图谱，大概是使用已知的将多种离子通道与内在可塑性联系起来的机制。在学习过程中调节不同离子电流大小的动态变化意味着对前一状态的持久记忆，这种记忆不同于在突触中表达的记忆，并具有不同的功能后果，这早就被假定⁵⁹。此外，我们的结果(尤其是尖峰阈值)表明了我们的内在特性可塑性的体细胞成分。通过计算，在人工神经网络中，这意味着模型神经元输出的激活功能本身受学习规则的约束。从生物学上讲，这可以用于整合突触输入和/或改变神经元的输出特性，从而增加学习和记忆现象的突触可塑性考虑中未曾想到的必要的计算元素⁶¹。

5、参考文献

[1] I. Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Long-term potentiation—a decade of progress. *Science* 285, 1870–1874 (1999).

[2] Mozzachiodi, R. & Byrne, J. H. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci.* 33, 17–26 (2010).

[3] Chen, S. et al. Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *eLife* 3, e03896 (2014).

[4] Johansson, F., Jirenhed, D. A., Rasmussen, A., Zucca, R. & Hesslow, G. Memory trace and timing mechanism localized to cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 14930–14934 (2014).

[5] Marder, E. & Prinz, A. A. Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *BioEssays* 24, 1145–1154 (2002).

- [6] Golowasch, J., Casey, M., Abbott, L. F. & Marder, E. Network stability from activity-dependent regulation of neuronal conductances. *Neural Comput.* 11,1079–1096 (1999).
- [7] Marder, E. From biophysics to models of network function. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 25–45 (1998).
- [8] MacLean, J. N. et al. Activity-independent coregulation of IA and Ih in rhythmically active neurons. *J. Neurophysiol.* 94, 3601–3617 (2005).
- [9] MacLean, J. N., Watson, B. O., Aaron, G. B. & Yuste, R. Internal dynamics determine the cortical response to thalamic stimulation. *Neuron* 48, 811–823(2005).
- [10] Moyer, J. R. Jr., Thompson, L. T. & Disterhoft, J. F. Trace eyeblink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J. Neurosci.* 16, 5536–5546 (1996).
- [11] Aizenman, C. D., Akerman, C. J., Jensen, K. R. & Cline, H. T. Visually driven regulation of intrinsic neuronal excitability improves stimulus detection in vivo. *Neuron* 39, 831–842 (2003).
- [12] Fan, Y. et al. Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I(h). *Nat. Neurosci.* 8, 1542–1551 (2005).
- [13] Losonczy, A., Makara, J. K. & Magee, J. C. Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452, 436–441 (2008).
- [14] Ohtsuki, G., Piochon, C., Adelman, J. P. & Hansel, C. SK2 channel modulation contributes to compartment-specific dendritic plasticity in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 75, 108–120 (2012).
- [15] Grubb, M. S. & Burrone, J. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 465, 1070–1074 (2010).
- [16] Kuba, H., Oichi, Y. & Ohmori, H. Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465, 1075–1078 (2010).
- [17] Ross, M. T., Flores, D., Bertram, R., Johnson, F. & Hyson, R. L. Neuronal intrinsic physiology changes during development of a learned behavior. *eNeuro* 4 (2017).
- [18] Ross, M. T. et al. Experience-dependent intrinsic plasticity during auditory learning. *J. Neurosci.* 39, 1206–1221 (2019).
- [19] Konishi, M. The role of auditory feedback in the control of vocalization in the white-crowned sparrow. *Z. fur Tierpsychologie* 22, 770–783 (1965).
- [20] Nordeen, K. W. & Nordeen, E. J. Auditory feedback is necessary for the maintenance of stereotyped song in adult zebra finches. *Behav. Neural Biol.* 57, 58–66 (1992).

- [21] Leonardo, A. & Konishi, M. Decrystallization of adult birdsong by perturbation of auditory feedback. *Nature* 399, 466–470 (1999).
- [22] Sakata, J. T. & Brainard, M. S. Real-time contributions of auditory feedback to avian vocal motor control. *J. Neurosci.* 26, 9619–9628 (2006).
- [23] Hahnloser, R. H., Kozhevnikov, A. A. & Fee, M. S. An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature* 419, 65–70 (2002).
- [24] Scharff, C., Kirn, J. R., Grossman, M., Macklis, J. D. & Nottebohm, F. Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. *Neuron* 25, 481–492 (2000).
- [25] Margoliash, D. Preference for autogenous song by auditory neurons in a song system nucleus of the white-crowned sparrow. *J. Neurosci.* 6, 1643–1661 (1986).
- [26] Prather, J. F., Peters, S., Nowicki, S. & Mooney, R. Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature* 451, 305–310 (2008).
- [27] Schmidt, M. F. & Konishi, M. Gating of auditory responses in the vocal control system of awake songbirds. *Nat. Neurosci.* 1, 513–518 (1998).
- [28] Rauske, P. L., Shea, S. D. & Margoliash, D. State and neuronal class-dependent reconfiguration in the avian song system. *J. Neurophysiol.* 89, 1688–1701 (2003).
- [29] Dave, A. S., Yu, A. C. & Margoliash, D. Behavioral state modulation of auditory activity in a vocal motor system. *Science* 282, 2250–2254 (1998).
- [30] Kozhevnikov, A. A. & Fee, M. S. Singing-related activity of identified HVC neurons in the zebra finch. *J. Neurophysiol.* 30.97, 4271–4283 (2007).
- [31] Hamaguchi, K., Tschida, K. A., Yoon, I., Donald, B. R. & Mooney, R. Auditory synapses to song premotor neurons are gated off during vocalization in zebra finches. *eLife* 3, e01833 (2014).
- [32] Vallentin, D. & Long, M. A. Motor origin of precise synaptic inputs onto forebrain neurons driving a skilled behavior. *J. Neurosci.* 35, 299–307 (2015).
- [33] Sakata, J. T. & Brainard, M. S. Online contributions of auditory feedback to neural activity in avian song control circuitry. *J. Neurosci.* 28, 11378–11390 (2008).
- [34] Daou, A., Ross, M. T., Johnson, F., Hyson, R. L. & Bertram, R. Electrophysiological characterization and computational models of HVC neurons in the zebra finch. *J. Neurophysiol.* 110, 1227–1245 (2013).
- [35] Dutar, P., Vu, H. M. & Perkel, D. J. Multiple cell types distinguished by physiological, pharmacological, and anatomic properties in nucleus HVc of the adult zebra finch. *J. Neurophysiol.* 80, 1828–1838 (1998).

[36] Mooney, R. Different subthreshold mechanisms underlie song selectivity in identified HVC neurons of the zebra finch. *J. Neurosci.* 20, 5420–5436 (2000).

[37] Shea, S. D., Koch, H., Baleckaitis, D., Ramirez, J. M. & Margoliash, D. Neuron-specific cholinergic modulation of a forebrain song control nucleus. *J. Neurophysiol.* 103, 733–745 (2010).

[38] Wild, J. M., Williams, M. N., Howie, G. J. & Mooney, R. Calcium-binding proteins define interneurons in HVC of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Neurol.* 483, 76–90 (2005).

[39] Bean, B. P. The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 451–465 (2007).

[40] Kosche, G., Vallentin, D. & Long, M. A. Interplay of inhibition and excitation shapes a premotor neural sequence. *J. Neurosci.* 35, 1217–1227 (2015).

[41] Mooney, R. & Prather, J. F. The HVC microcircuit: the synaptic basis for interactions between song motor and vocal plasticity pathways. *J. Neurosci.* 25, 1952–1964 (2005).

[42] Tchernichovski, O., Nottebohm, F., Ho, C. E., Pesaran, B. & Mitra, P. P. A procedure for an automated measurement of song similarity. *Anim. Behav.* 59, 1167–1176 (2000).