

体外培养神经元网络功能结构的长时间发育变化

陈文娟^{①②*}, 李向宁^{①②*}, 冯显^②, 蒲江波^{①②}, 骆清铭^{①†}

① 华中科技大学武汉光电国家实验室(筹), Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 武汉 430074;

② 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

2010-03-03 收稿, 2010-07-26 接受

国家自然科学基金资助项目(30800314, 30727002)

摘要 神经功能结构的建立和维持是学习与记忆等高级功能的基础. 因神经网络的结构错综复杂, 节点行为多变且受多种因素的影响, 目前其拓扑结构的形成和维持机制尚不清楚. 基于多电极阵列系统, 本研究连续记录了体外长时间培养的海马神经元网络的自发放电活动; 利用不同电极放电序列之间的互相关系数映射功能连接强度, 构建网络拓扑结构图, 分析其发育特性. 对培养 1~18 周的 3 个样本的分析结果显示, 网络拓扑结构的形成和维持具有自组织和自解离特性: 网络连接建立期(1~3 周), 邻近节点之间建立连接, 形成局域微网络; 随着网络的发育, 逐步形成多节点的复杂功能结构; 发育成熟期(12 周后), 功能连接开始消退, 部分节点脱离网络, 网络聚集程度增加. 不同发育时期网络各节点连接强度的分布均符合幂率分布, 表明无外界输入的培养神经元网络是具有无尺度特征的复杂网络. 本研究有助于复杂神经网络结构的形成及维持机制分析, 为研究神经发育和神经系统信息处理机制提供新的视野.

关键词

神经发育
海马神经元网络
功能连接
无尺度
多电极阵列

为了快速、准确处理复杂多变的环境信息, 神经元通过突触连接相互作用形成神经节点, 进而组成错综复杂的功能结构来行使各种高级神经功能^[1,2]. 在发育早期突触连接数目急剧增加, 随后迅速减少; 发育成熟后耦合的神经元在受到时间相关刺激后可出现长时间突触连接增强; 这种活动依赖的结构改变被认为是学习与记忆等高级认知功能的细胞基础^[3]. 对神经系统功能结构形成和维持机制的研究, 包括神经元之间如何建立精确、复杂的突触连接节点以及如何形成并维持具有高级功能的复杂动态网络, 是神经科学家关注的热点问题^[4,5].

由于动物机体结构复杂多变, 在体研究网络连接结构的发育变化十分困难. 近几十年来, 人们利用膜片钳和光学标记等技术, 已研究了单个或几个神经元的电生理特性及其突触连接的发育变化^[1,3,6,7]. 然而, 真实中枢神经系统中神经元数目为 10^{12} , 突触

连接极为复杂, 根据单个或几个神经元的动力学特征分析神经系统的功能结构存在很大限制. 对研究者而言, 理解和量化神经网络的结构形成过程及其在储存和处理信息时的编码机制依然是一项巨大的挑战.

体外培养神经元网络的连接较为简单, 可以作为阐明神经系统的结构和功能联系的一种简单有效模型. 基于多电极阵列(multi-electrode array, MEA)系统, 人们可以实时、连续、无损、多通道进行神经信号的胞外记录, 并直接观察神经元的生长、发育以及网络中突触连接的变化^[8-10]. 已有研究表明, 培养神经网络在发育过程中复杂多变的放电模式对研究神经网络的可塑性和学习记忆等神经编码机制具有重要意义^[11,12], 而网络功能结构在长时间发育中的变化规律至今尚不清楚.

本文利用多电极阵列系统记录了体外培养海马

英文引用格式: Chen W J, Li X N, Feng X, et al. Long-term characterization of functional structure of cultured hippocampal neuronal networks (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 2531—2538, doi: 10.1360/972010-412

神经网络 1~18 周的自发放电活动, 并根据互相关系数构建功能连接, 分析神经网络功能结构在自发育过程中的演化规律.

1 材料与方法

(i) 体外培养与信号采集. 神经元培养采用孕龄 18 d 的 Wistar 大鼠, 乙醚麻醉, 取出胎鼠. 无菌条件下分离海马, 在 0.125% 胰蛋白酶中 37°C 消化 10 min, 用吸管吹打成细胞悬液, 稀释至 5×10^6 细胞/mL, 在电极区附近 2 mm^2 区域内接种 $15 \mu\text{L}$ 细胞悬液; 15 min 后补加 1 mL DMEM 培养液, 在 37°C, 5% CO_2 培养箱中培养. 24 h 后全换液, 以后每 2 天换半液. 未注明的药品中除马血清来自 Hyclone 公司外, 均来自 Gibco 公司.

实验采用多通道记录系统(MEA60 System, MCS GmbH, Germany), 该系统由多电极阵列、放大器 MEA1060、温度控制器、数据采集卡 MC-Card 以及数据记录系统组成. 多电极阵列底板是 $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$

的透明石英玻璃; 中间为细胞培养皿, 其底部植入 60 个微电极, 电极直径 $30 \mu\text{m}$, 相邻电极间距 $200 \mu\text{m}$, 呈 8×8 矩阵排列. 数据采集卡以 25 kHz/通道的采样频率同时记录 60 通道的电活动(图 1(a)). 锋电位(spike)由 MC_RACK 软件离线检测.

(ii) 信息熵. 熵是衡量系统信息量的一个重要指标^[13]. 一般来说, 系统的有序程度越高, 熵值越低. 信息论中, 熵的定义如下:

$$H = -\sum_i p_i \ln(p_i), \quad (1)$$

其中 p_i 为系统中某一事件出现的概率. 本文根据锋电位间隔序列(interspike interval, ISI)的分布概率研究神经元自发放电活动的熵编码.

(iii) 网络功能连接. 功能连接, 也就是空间上不同区域的活动在时间上的相关性^[6]. 本文选取互相关函数分析不同活跃电极(平均放电频率大于 1 Hz)记录到的锋电位序列之间的时间相关程度^[14]. 将某一电极的锋电位序列 $\{y\}$ 从参考电极的锋电位序列

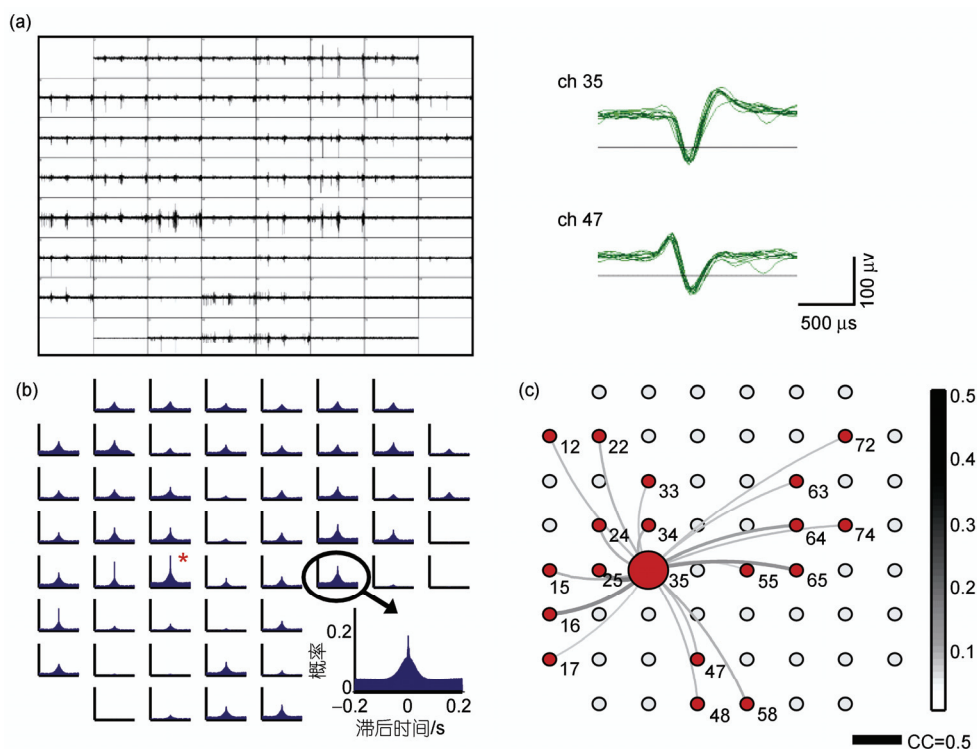


图 1 根据神经网络的自发放电活动构建功能连接网络

(a) 多电极阵列系统采集到的原始信号, 60 个电极按 8×8 矩阵排列; (b) 以 ch 35 为参考电极, 计算其他电极与之的互相关, bin = 1 ms; (c) 根据互相关系数构建功能连接, 线条的颜色和粗细取决于功能连接强度, 节点的大小依赖于功能连接的数目

{x}的起点开始逐点向后移动, 计算离散数值积分, 即可获得不同时间延迟 t 对应的互相关值:

$$\text{Corr}(t) = \left(\sum_i x(i)y(i+t) \right) / N, \quad (2)$$

其中 N 为参考电极锋电位序列的长度.

网络功能连接强度定义: 指定某一电极为参考电极时, 互相关系数定义为该电极的输入强度; 指定该电极为比较电极时, 定义互相关系数为其输出强度. 若互相关曲线存在显著峰值, 且峰值大于设定阈值, 则认为在两个记录电极之间存在功能连接(图 1). 本文中阈值的选取标准为, 功能连接的数目不超过网络最多可能存在的边数 $M \times (M-1)$ 的 10% (M 为活跃电极数目)^[6,15]. 同一个样本在不同发育阶段选取相同的阈值进行分析. 对所有活跃电极记录到的锋电位序列进行互相关分析, 根据功能连接数目和输入输出强度构建网络拓扑结构图^[15]. 本文利用节点的度数、连接强度和输入输出的差异性常用参数对网络拓扑结构进行定量分析. 其中, 节点的度数定义为网络中与该节点关联的边数之和; 输入输出的差异性则定义为:

$$\text{Difference} = \frac{|\ln - \text{Out}|}{\ln}. \quad (3)$$

2 结果

2.1 神经网络不同时期的自发放电活动

多电极阵列培养皿上高密度培养海马神经元, 种植 24 h 以后神经元有 100 μm 左右的突起. 体外培养 2 周(*week in vitro*, WIV)后, 神经元突起交错复杂, 构建成网络. 通过连续记录, 发现培养 1 WIV 后在多数电极上记录到自发放电活动, 放电模式以随机散发为主. 2~3 WIV 后网络发育成熟, 自发放电模式主要呈现为簇发活动, 每个簇发活动由多个锋电位组成. 簇发活动是一种较为稳定的放电模式, 可以在网络发育过程中持续较长时间(6~7 周以上). 本文所分析的 3 套发育数据, 12 WIV 后簇发活动逐渐减少, 部分电极的放电活动消失.

信息熵是分析复杂神经元放电活动有序程度的重要指标, 本研究分析了 3 个长时间记录样本在发育过程中的信息熵(bin = 10 ms, 根据活跃电极的 ISI 序列在 0~1 s 内的概率分布计算). 结果显示(图 2), 网络信息熵在发育过程中的变化规律呈‘U’型分布. 1~7

WIV 信息熵持续下降, 8~11 WIV 无明显变化趋势, 12 WIV 后开始逐渐上升. 根据熵在自发发育过程中的变化规律, 我们认为神经元在发育初期通过建立突触连接协同活动, 不断提高网络活动的有序程度; 发育成熟后, 网络结构较为稳定, 网络有序程度不再发生明显变化; 随着神经网络的衰亡, 突触连接逐渐变弱, 网络有序程度降低. 信息熵的分析结果表明, 培养海马神经网络在自发发育中经历了自组织和自解离 2 个过程.

为了研究网络结构随发育的演化规律, 我们选用互相关系数研究不同电极之间的功能连接. 3 WIV 内不同电极无明显同步现象(图 3(a)). 3 WIV 后各电极出现同步簇发活动, 如 ch35 与 ch55 两个电极的互相关曲线在 35 和 58 DIV(*days in vitro*)均存在显著峰值(互相关系数分别为 0.12 和 0.14), 网络放电活动的同步程度明显提高. 12 WIV 后网络同步活动逐渐消失, 但部分邻近电极的放电活动之间仍然存在同步(如 111 DIV 时 ch35 与 ch55 的互相关曲线在 $t=0$ ms 存在显著峰值 0.18).

2.2 功能连接网络的拓扑结构

如方法所示, 我们通过计算所有活跃电极的两两互相关系数, 构建了神经网络在不同发育时期的功能结构(图 4). 结果显示, 网络发育初期(1~3 WIV)只有邻近的电极建立起简单、离散的功能连接, 如图 4(a)中的 ch14 和 ch24 电极, ch37 和 ch38 电极. 随着神经网络的发育, 相邻较远的电极之间也建立起连接, 功能连接的数目明显增加. 如图 4(c)所示, 各节点间的分布较为离散, 大量微弱的连接(图中的灰色线条)几乎分布在整个网络中; 少数较强的连接(图中的黑色线条)趋向于形成子集网络, 网络拓扑结

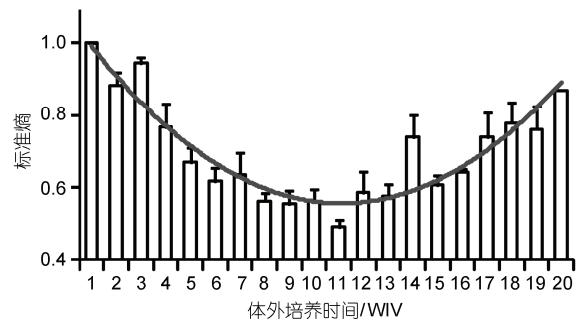


图 2 体外培养过程中神经网络信息熵的变化趋势
平均值±平均标准方差, 样本数目为 3

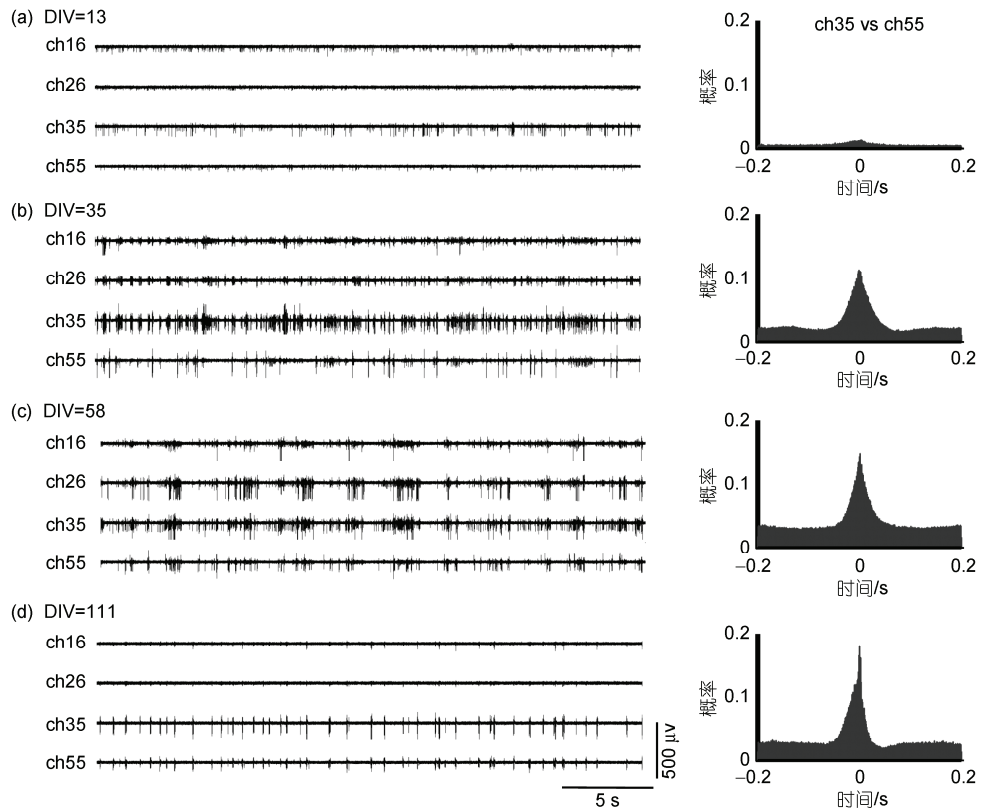


图3 神经网络自发放电活动和不同电极间互相关系数随发育的变化

以 ch35 为比较电极, ch55 为参考电极, bin=1 ms. (a) 体外培养 13 d (days *in vitro*, DIV); (b) 35 DIV; (c) 58 DIV; (d) 111 DIV

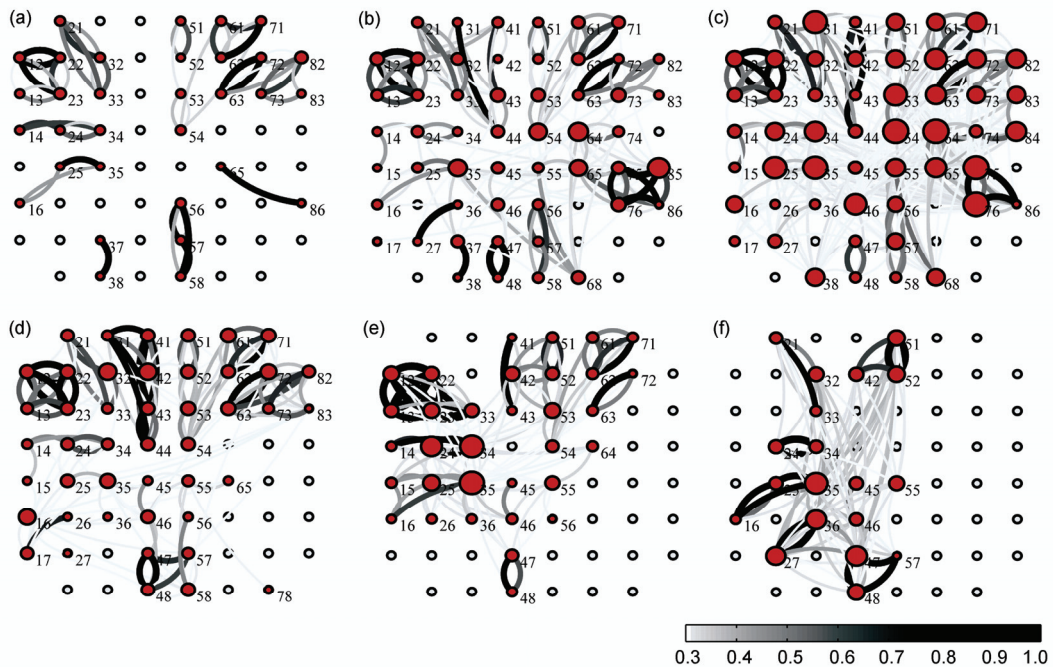


图4 不同发育时期神经网络的功能结构

体外培养天数依次为 21(a), 36(b), 62(c), 77(d), 97(e) 和 115 d(f)

构变得十分复杂. 神经元网络发育成熟后, 功能结构较为稳定, 没有发生显著变化. 12 WIV 后, 部分连接逐渐消失, 网络分布范围变小, 但节点之间的连接更加紧凑(图 4(e)和(f)). 培养神经网络在发育初期逐步建立功能连接, 网络结构自行由简单向复杂发展; 发育成熟后部分功能连接消失, 最终聚集为范围较小的网络. 功能结构随发育的变化趋势与信息熵的分析结果一致.

节点的度数分布是分析网络拓扑结构特征的重要指标. 我们对不同发育时期网络中各节点的度数进行统计分析, 结果显示, 在神经网络的不同发育时期, 各节点度数的概率分布均可以由幂函数 $f(x) = ax^{-b}$ 较好拟合(表 1). 网络中大多数节点与其他节点的连接较弱, 少数节点与其他节点的连接较强, 表明培养神经网络具有无尺度特征, 少数集散节点在网络中起着主导作用.

为了进一步研究网络拓扑结构的发育特性, 本研究根据各节点的功能连接数目随发育的变化规律, 通过 K -均值聚类方法将其分为明显不同的两类. 如图 5(a)所示, ●代表 Cluster I 中的节点, 在发育过程中与其他节点的连接较强; ▲代表 Cluster II 中的节点, 与其他节点的连接较弱. 在网络发育初期(1~6 WIV), 两类节点均开始与外界建立连接, 但 Cluster I 的初始平均连接强度(0.64±0.08)显著高于 Cluster II

(0.23±0.08). 随着网络的发育(4~15 WIV), 两类节点之间的差异逐渐增大(图 5(b)). Cluster I 中的节点较为稳定, 在 4~15 WIV 没有发生显著变化(4~6 WIV 的平均连接强度为 3.44±0.18, 13~15 WIV 为 4.27±0.29), 16~18 WIV 突然下降至 1.71±0.23. 而 Cluster II 与外界的连接强度在 7 WIV 开始下降(由 7~9 WIV 的 2.04±0.40 下降至 16~18 WIV 的 0.48±0.17), 该类节点逐渐在网络中消失. 节点的输入输出差异性分析则表明(图 5(c)): 在不同发育时期, Cluster I 中节点的输入输出均较为平衡, 差异程度远低于 Cluster II; 两类节点差异程度随着发育逐渐增加(1~15 WIV), 直至网络逐渐衰亡. 神经网络的发育过程中, 发育初期连接强度较强且输入输出较为平衡的节点更容易与其他节点建立连接, 成为集散节点.

3 讨论

神经网络的功能结构对研究神经可塑性和学习记忆具有重要意义^[16]. 基于多电极阵列系统, 我们分析了体外培养神经网络的功能结构随发育的演化规律. 结果表明, 离散培养的神经元在发育过程中逐渐建立功能连接, 形成复杂网络. 网络拓扑结构自行由简单向复杂发展, 且具有无尺度特征. 在神经网络的发育过程中, 节点之间存在竞争, 部分节点在网络中占据主导地位, 其余节点则逐渐脱离网络.

表 1 根据幂律分布拟合不同发育时期各节点的度数分布

	1~3 WIV	4~6 WIV	7~9 WIV	10~12 WIV	13~15 WIV	16~18 WIV
a	1.2410	15.0700	13.3300	11.3800	20.5200	10.6400
b	0.9228	0.5685	0.5004	0.5122	0.7346	0.8321
R^2	0.7581	0.8573	0.7566	0.7246	0.8646	0.9235

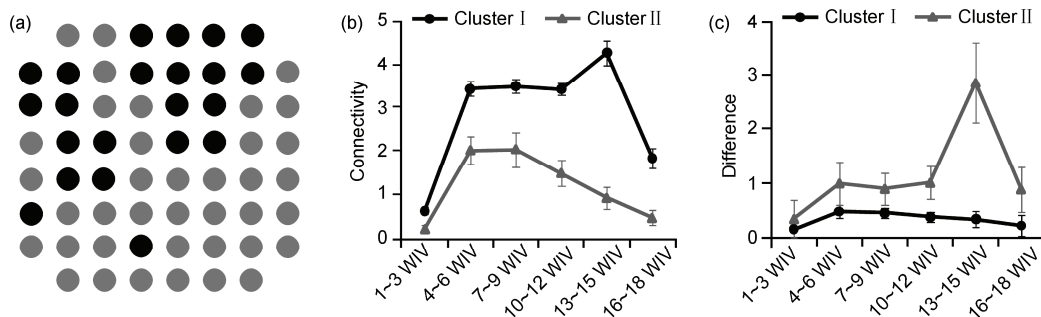


图 5 功能性神经网络的拓扑结构分析

(a) 根据功能连接数目随发育的变化可将 60 个节点划分为两类(K -均值聚类), ●代表 Cluster I 中的节点, ▲代表 Cluster II 中的节点; (b) Cluster I (●-●) 和 Cluster II (▲-▲) 的功能连接强度对比(均值±平均标准方差); (c) 两类节点的输入输出差异性对比(均值±平均标准方差)

神经元网络自发发育是机体维持正常功能的基础,对神经修复、神经可塑性和学习记忆等高级功能起着至关重要的作用^[9,11,17,18]。阐明神经发育的内在机制是现代神经科学研究的重要趋势。基于多电极阵列系统,我们能够连续、无损记录培养神经元网络的自发放电活动,长时间、稳定追踪网络发育过程中的动力学特征(18周以上)^[12,19,20]。

本研究表明,网络自发放电活动的信息熵随发育的变化规律呈“U”型分布(图 2),与在体发育过程相似^[21]。在神经元网络的发育初期,信息熵逐渐下降,放电活动的有序程度上升,表明网络具有自组织特性。这与 Potter 等人及 NBT 小组的研究结果一致^[22,23]。另一方面,我们还发现网络在 12 WIV 后存在自解离现象,已有研究中并未见相关报道。以往的研究主要针对体外培养 8 周的神经元网络^[8,17,18],但是长时间培养的网络更能反映神经发育的完整过程,对于网络内节点相互作用以及网络结构的维持机制研究更为有利。

复杂网络理论研究表明,神经系统的自组织特性依赖于网络的复杂拓扑结构(如无尺度网络、小世界网络)^[24,25]。在过去的十几年中,研究者已在细胞层次(由生化反应相连接的分子网络)和在体层次(通过突触连接的神经细胞网络)发现无尺度结构。本研究采用互相关系数,研究神经元网络功能结构在长时程发育过程中的变化规律(图 4)。结果表明,网络发育初期邻近的节点迅速建立功能连接;之后,较远的节点之间也逐渐出现连接;网络发育成熟后,部分连接开始消失。功能结构随发育的演化规律与信息熵一致,离散培养的神经元能够不依靠外界指令,仅在内在机制驱动下建立连接,通过相互协调提高自身活动的有序程度。而且,在发育过程中,功能网络中各节点的连接强度均较好地服从幂律分布(表 1),

表明网络具有无尺度特征,不同于随机网络。

在人工神经网络研究中已有无尺度特征的相关报道^[25],但在缺少外界输入和调控的培养神经网络中发现无尺度结构特征为人们研究复杂神经系统提供了新的视野。一方面,本研究记录了神经网络中 60 个节点的自发放电活动,其无尺度特性可以较好地解释简单神经网络的稳定性维持过程及复杂神经系统自我修复能力、稳态可塑性等特性^[26]。另一方面,无尺度网络正常功能的维持依赖于集散节点^[6],对于协同式攻击十分脆弱,这种缺陷可能与神经发育异常造成的一些疾病(如唐氏综合征、脑瘫等)有关。然而,在体研究中集散节点难以寻找和控制,集散节点与网络功能之间的具体关系尚不清楚。培养神经网络的结构相对较为简单、无外界输入,且易于观察和控制,对其动力学特征的分析并结合药理、电刺激实验研究将有助于阐明神经功能结构形成的内在机制。

本研究表明,初始连接较强的节点更易于与其他节点建立新的功能连接(图 5),验证了无尺度网络的“马太效应”^[13]。随着神经网络的发育,富者愈富,这类节点就拥有比其他节点更多的连接数目,更有可能成为集散节点。此外,网络拓扑结构的发育特性表明,培养神经网络的功能连接存在消退现象(图 4),这与在体的研究结果一致^[27]。消退现象被认为是神经系统通过神经元的相互作用消除错误结构,不断自我完善,从而提高对外界的适应能力。然而,消退现象的内在神经机制至今尚不清楚^[3]。我们发现初始连接度较低且输入与输出不平衡的节点在发育过程中逐渐消失(图 5)。本研究为无尺度网络的成长性和优先连接机制提供了实验证据,对研究神经发育过程中的网络节点连接和拓扑结构形成机制有所帮助,将进一步推进对高级神经功能的理解。

参考文献

- 1 Spudich J A, Gerhart J, McKnight S L, et al. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2008, 24: 183—209
- 2 Peng Y R, He S, Marie H, et al. Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. *Neuron*, 2009, 61: 71—84
- 3 Xu T, Yu X, Perlik A J, et al. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 2009, 462: 915—919
- 4 Yu S, Huang D, Singer W, et al. A small world of neuronal synchrony. *Cereb Cortex*, 2008, 18: 2891—2901
- 5 Pajevic S, Plenz D. Efficient network reconstruction from dynamical cascades identifies small-world topology of neuronal avalanches. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5: e1000271
- 6 Bullmore E, Sporns O. Complex brain networks: Graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci*,

- 2009, 10: 186—198
- 7 Zhang F, Aravanis A M, Adamantidis A, et al. Circuit-breakers: Optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 577—581
 - 8 Wagenaar D A, Pine J, Potter S M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci*, 2006, 7: 11
 - 9 Li X, Zhou W, Zeng S, et al. Long-term recording on multi-electrode array reveals degraded inhibitory connection in neuronal network development. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 1538—1543
 - 10 Kamioka H, Maeda E, Jimbo Y, et al. Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci Lett*, 1996, 206: 109—112
 - 11 Marom S, Shahaf G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: Lessons beyond anatomy. *Q Rev Biophys*, 2002, 35: 63—87
 - 12 Li Y, Zhou W, Li X, et al. Characterization of synchronized bursts in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 2976—2982
 - 13 Borst A, Theunissen F E. Information theory and neural coding. *Nat Neurosci*, 1999, 2: 947—957
 - 14 Chiappalone M, Bove M, Vato A, et al. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. *Brain Res Dev Brain Res*, 2006, 1093: 41—53
 - 15 Bettencourt L M, Stephens G J, Ham M I, et al. Functional structure of cortical neuronal networks grown *in vitro*. *Phys Rev E*, 2007, 75: 021915
 - 16 Eytan D, Marom S. Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 2006, 26: 8465—8476
 - 17 Van Pelt J, Corner M A, Wolters P S, et al. Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays. *Neurosci Lett*, 2004, 361: 86—89
 - 18 Segev R, Benveniste M, Hulata E, et al. Long term behavior of lithographically prepared *in vitro* neuronal networks. *Phys Rev Lett*, 2002, 88: 118102
 - 19 陈文娟, 李向宁, 蒲江波, 等. 培养神经元网络自发放电序列的非线性特征. *科学能报*, 2010, 55: 7—14
 - 20 Li X, Zhou W, Liu M, et al. Firing patterns of long-term cultured neuronal networks on multi-electrode array. *Prog Nat Sci*, 2006, 16: 1337—1342
 - 21 Vaillancourt D E, Newell K M. Changing complexity in human behavior and physiology through aging and disease. *Neurobiol Aging*, 2002, 23: 1—11
 - 22 Wagenaar D A, Nadasdy Z, Potter S M. Persistent dynamic attractors in activity patterns of cultured neuronal networks. *Phys Rev E*, 2006, 73: 051907
 - 23 Pasquale V, Massobrio P, Bologna L L, et al. Self-organization and neuronal avalanches in networks of dissociated cortical neurons. *Neuroscience*, 2008, 153: 1354—1369
 - 24 Shin C W, Kim S. Self-organized criticality and scale-free properties in emergent functional neural networks. *Phys Rev E*, 2006, 74: 045101
 - 25 Luque B, Miramontes O, Lacasa L. Number theoretic example of scale-free topology inducing self-organized criticality. *Phys Rev Lett*, 2008, 101: 158702
 - 26 Zhou W, Li X, Liu M, et al. Homeostatically regulated synchronized oscillations induced by short-term tetrodotoxin treatment in cultured neuronal network. *Biosystems*, 2009, 95: 61—66
 - 27 Kano M, Hashimoto K. Synapse elimination in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 2009, 19: 154—161

Long-term characterization of functional structure of cultured hippocampal neuronal networks

CHEN WenJuan^{1,2}, LI XiangNing^{1,2}, FENG Xian², PU JiangBo^{1,2} & LUO QingMing¹

¹*Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Wuhan 430074, China;*

²*College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*

One way to understand brain function is to understand how functional structure of neurons organized during development. The underlying mechanism remains unclear because the network topology was too complex. With multi-electrode array system, the spontaneous activity of cultured hippocampal networks was recorded from 1–18 weeks *in vitro*. We mapped functional networks using cross correlation between pairs of electrodes. Analysis of three cultures indicated self organization and disorganization of cultured networks during long term development. Adjacent neurons in culture began establishing functional connections during 1–3 weeks *in vitro*. Then, more connections emerged and organized as complex networks. Finally, the network topology became more compact when some connections disappeared after 12 weeks. As the distribution of connections followed a power law during development, the cultured networks showed the characteristic of scale-free network. These works could shed new light on both neural coding and organization mechanisms of nervous system.

hippocampal neuronal network, functional connection, neural development, scale free, multielectrode array

doi: 10.1360/972010-412