

用于光遗传技术的体外细胞光刺激系统

蔚鹏飞 周 意 张志华 何 伟 鲁 艺 屠 洁

(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘 要 光遗传技术具有在毫秒水平上精细调控某种特定细胞亚群活性的优势, 对神经回路和某些神经系统疾病的发病机制和干预治疗等基础研究提供了一个崭新的生物工程学工具。文章基于光遗传技术的特点, 研发了一套针对光感基因改造过体外培养细胞与离体脑片 LED 光刺激系统, 实现远程无线控制 LED 阵列的刺激时间、频率、占空比等参数, 并同步检测培养细胞的理化特性。

关键词 LED; 光刺激; 光遗传技术
中图分类号 TP 391 **文献标志码** A

In Vitro Cell Culture Light Stimulation System for Optogenetics

WEI Pengfei ZHOU Yi ZHANG Zhihua HE Wei LU Yi TU Jie

(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract Optogenetics technology has the advantage of regulating the activity of specific cell population in milliseconds level, which provides a novel bioengineering tools for understanding the mechanism of the neural circuits and the pathogenesis of some neurological diseases and interventions treatment. Based on the characteristics of optogenetics, we developed a set of LED light stimulation system for optogenetics modified in vitro cell culture or brain slice. This device can remotely control stimulation parameters of LED arrays such as time, frequency, duty cycle, and simultaneously detect physicochemical properties of cultured cells.

Keywords LED; light stimulation; optogenetics

1 引 言

随着经济的高速发展和社会竞争压力的增加, 各种神经精神疾病的发病率也快速增加。精神疾病已经成为一类严重影响中国民众身心健康的疾病, 给患者的家属以及整个国家和社会带来沉重的负担。而且目前这些疾病的发病机制尚不

明确, 干预和治疗手段有限。传统的药物治疗是神经精神疾病治疗的重要方法。虽然通过药物治疗, 部分病人的症状可以得到缓解, 但是 10% 左右的精神病人通过 2 年甚至 5 年的药物治疗后并不能有效地控制疾病的发生^[1]。

神经调节技术是一种可逆的治疗方式, 主要利用电、磁或光刺激等改变大脑特定神经回路的活性来达到治疗疾病的目的。目前, 有三

收稿日期: 2014-06-03 修回日期: 2015-03-19

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAI01B08)

作者简介: 蔚鹏飞(通讯作者), 博士, 助理研究员, 研究方向为神经信息编码技术, E-mail: pf.wei@siat.ac.cn; 周意, 硕士, 研究方向为生物医学信号处理; 张志华, 本科生, 研究方向为医疗器械硬件研发; 何伟, 硕士, 研究方向为神经信息编码技术; 鲁艺, 副研究员, 研究方向为光遗传技术开发及其在神经精神疾病研究中的应用; 屠洁, 副研究员, 研究方向为异常神经回路的调控研究。

种主要的神经调节技术可对机体细胞进行神经干预与调节,包括深部脑刺激(Deep Brain Stimulation, DBS)、经颅磁刺激(Transcranial Magnetic Stimulation, TMS)和光遗传技术(Optogenetics)。

DBS 本质上是一种电刺激过程,临床上应用电极刺激神经中枢相应部位,对某些癫痫^[2]和帕金森氏病^[3,4]等疾病有一定的治疗作用。但 DBS 本身由于缺乏细胞特异性而会有副作用;另外,由于神经胶质细胞瘢痕形成导致电极绝缘,治疗作用只能持续几个月到几年;再者, DBS 对某些疾病治疗作用的机制尚不清楚。

TMS 通过电场去极化兴奋神经细胞而起到治疗作用,可用于治疗精神分裂症^[5]、帕金森氏病^[6]、重度抑郁症^[7]、中风^[8]、慢性疼痛^[9]等神经精神疾病。但是 TMS 只能刺激大脑表面几厘米范围,无法刺激深部神经元。同 DBS 一样, TMS 也不能实现抑制神经元和对特定细胞亚型进行特异性刺激。

光遗传技术基于基因治疗的方法,利用病毒载体将光敏感通道或泵蛋白基因导入某一特定的细胞亚群中表达。其中一种光敏感型通道蛋白(Channelrhodopsin-2, ChR2)对蓝光敏感,蓝光可激活该通道,而使 Na^+ 、 K^+ 等阳离子进入细胞内而兴奋细胞;另一种氯离子蛋白(Halorhodopsin, NphR)对黄光敏感,黄光将使 Cl^- 进入细胞而抑制细胞^[10,11]。该技术克服了传统药理学工具或电刺激等模式缺乏细胞选择性的缺点,相比其他形式的刺激具有更高时空分辨率。

体外人工神经网络的建立及其传递规律的解析是认识脑网络和脑功能常用的研究方式,但传统上给予体外培养的人工神经网络实施干预的方法,往往缺乏高时空的精准。因此基于光遗传技术具有细胞类型选择特异性、高时空精准的优势,我们希望将该技术应用于对体外培养的神经

网络调控的研究中。但是由于目前在脑片膜片钳系统或在体植入式光刺激系统中,一般是应用基于光纤的点光源刺激方式,而缺乏为体外神经培养装置使用的光刺激设备。因此本文设计了一套基于 LED 光刺激系统用于经过光敏感基因改造过的体外培养细胞。本刺激系统能够实现 473 nm 蓝光和 588 nm 黄光两种特定波长的光刺激,结合化学传感器,可以同步检测刺激中培养细胞理化性质的变化。该装置能够根据实验需求灵活地调节光强、刺激频率、占空比、时间等技术参数,并能实时监测培养皿的温度、光强、pH 值、光照时间等信息。通过无线模块和上位机连接,可以远程无线地设计不同的刺激模式,并实时将当前刺激参数和检测到的培养装置内的理化信息显示出来。此外,本装置还配备良好的散热装置,保证培养皿内温度不会过高,使研究实验顺利进行。

2 系统的设计与实现

我们希望设计一套可以应用在体外细胞培养设备上的光刺激系统,该刺激系统主要需要达到的几点重要技术指标包括:

(1) 使用时间: 保证连续光刺激工作时系统的稳定,即连续工作 2 小时以内光强不会显著衰减。这一点主要是由于细胞培养环境一般是封闭的,而对于一些慢性、定时给予刺激的实验,需要光刺激设备可以长时间独立工作,因此要保证其光强的稳定性。

(2) 温度: 光刺激有可能造成培养器局部温度的升高而影响培养细胞的生存,因此需要设计局部实时散热的方法。

(3) 光照强度: 根据前人实验,光遗传学刺激神经细胞时到达细胞表面的平均激发光强不低于 $1 \text{ mW}/\text{mm}^2$ 。因此我们需要对光源进行设计,保证到达培养皿底部的平均光强是均匀分布,并且足够激发神经细胞活动。

(4) 刺激模式: 为了利用高时空精准的光刺激对体外神经网络的编码规律进行调控, 我们需要实现对刺激脉冲频率、脉宽、个数任意连续控制和可调; 同时为了避免培养的细胞受到污染, 对刺激参数的控制应该可以无线完成。

刺激系统主要分为上位机和下位机两部分(见图 1)。其中, 上位机部分是 LED 光刺激系统的软件和操作部分, 可以根据实验需要设定不同的刺激模式参数; 下位机部分是 LED 光刺激系统硬件部分, 主要功能是接受上位机发送过来的刺激模式参数并通过下位机实现该参数模式下 LED 阵列的控制。上位机与下位机之间通过无线传输模块实现实时全双工通信。

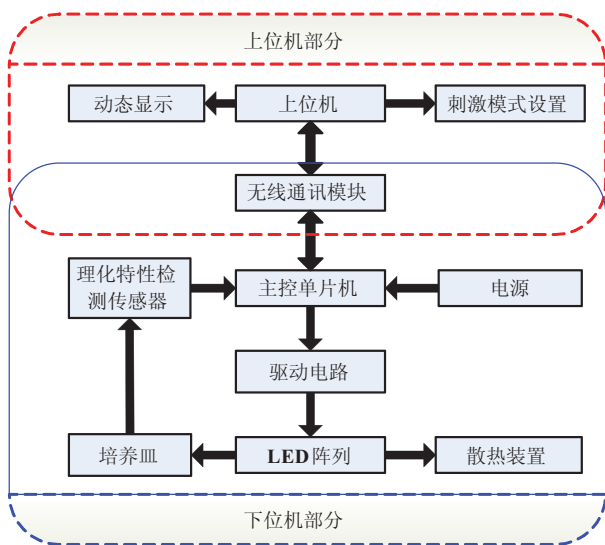


图 1 系统的整体结构

Fig. 1 The schematic representation of the structure of light stimulation system

2.1 上位机的设计与实现

上位机部分主要包括 PC 机、无线通讯模块、参数设置界面软件 3 部分(见图 2)。其中, 参数设置界面软件是基于 LabView 设计的, 可以按照实验需求设置不同的刺激模式, 并将运行状态显示出来。

参数设置界面软件主要有刺激模式设置模块、运行状态显示模块和运行参数保存模块。这



图 2 上位机软件界面和无线通讯模块

Fig. 2 Software interface and the module of wireless communication

些可供选择的刺激参数包括孔板选择面板、运行参数设置面板。其中, 孔板可以选择六孔板培养皿中的一个或者多个孔板。运行参数设置面板可供实验人员设计各种不同的刺激模式, 可以设定单一的刺激模式, 也可以设定多种刺激模式的叠加。这些刺激模式参数包括刺激频率(Hz)、占空比(%), 刺激时间(s)、是否散热(Y/N)、暂停时间(s)。其中, 散热是通过 LED 电路板上散热片结合风扇的启动来实现的。这些刺激参数可以在光刺激系统开始工作之前预先设定好, 也可以在实验过程中进行设计和更改, 通过无线通讯模块传到下位机上。运行参数保存模块主要是保存实验过程中的刺激模式参数。运行状态显示模块除了可以显示当前运行状态光刺激的频率、占空比、已运行时间和剩余运行时间外, 还可以结合其他物理和化学传感器显示其他培养细胞的理化特性。

2.2 下位机的设计与实现

下位机部分是 LED 光刺激系统的硬件部分, 主要包括主控模块、光源驱动模块、LED 光源阵列、无线通讯模块、传感器检测模块、供电模块、散热模块等部分组成(见图 3)。下位机主要实现按照上位机预先设定好的刺激模式, 控制 LED 阵列的闪烁。



图3 下位机部分的主要模块

Fig. 3 The major components of the light stimulation

主控模块是通过 51 单片机来实现的，将上位机发送过来的刺激模式参数，转换成电脉冲序列信号。光源驱动模块是通过三极管的放大作用来驱动 NUD4001 恒流芯片实现 LED 按照设定的频率和占空比闪烁。LED 光源阵列上有 6 组，每组 9 个，一共 54 个 LED 灯来实现对六孔板中不同培养皿中细胞的独立光刺激。无线通讯模块通过 2.4 G 高速无线串口透传模块实现，无线传输距离在 10 m 左右。由于刺激实验需要在隔离的恒温箱中进行，这样的无线操作方式可以有效避免细胞受到污染的可能。下位机部分中的无线模块主要功能是接受上位机部分无线模块发送过来的刺激模式参数，并且将下位机中检测到培养细胞的温度、pH 值、光强等理化性质传给上位机显示出来。传感器模块主要是用来检测光刺激过程中培养皿中培养细胞的理化特征参数，保证细胞处在正常适宜的环境中生长。供电模块是通过大容量的可充电锂电池来实现供电的，可以保证实现对培养细胞的长时间光刺激。散热模块主要包括散热片和散热风扇两部分，将大功率 LED 照射产生的热量排走，避免因散热不良导致培养细胞的温度过高而影响其正常生长。

3 系统工作的参数实测

本文中的光刺激系统可以实现对 LED 阵列工作在 1~99 Hz 频率范围，占空在 1%~99% 范围内的远程无线的连续可调。本系统可以用于 6、24、96 孔板以及微电极阵列 (Microelectrode

Array, MEA) 等体外细胞培养装置。对几个主要参数的实测结果如下 (所有的实验测试均在 6 台样机中进行并取平均结果)：

(1) 使用时间：样机进行 20 Hz 连续脉充蓝光刺激，每间隔 15 min 对其输出光强进行检测。结果发现直到 120 min 左右输出光强仍能稳定维持在初始光强的 90% (见图 4)。而一般的普通固态激光光源连续启动 1 h 后的光强浮动可达 30% 以上。

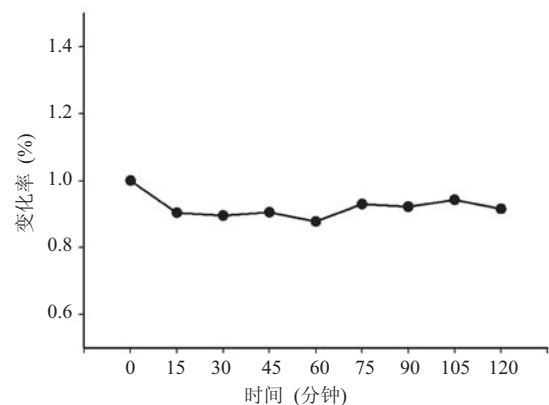


图4 光强随时间的变化率

Fig. 4 The changing rate of light intensity over time

(2) 使用温度：对温度的控制是使用该刺激器进行分子生物学实验一个至关重要的因素。由于连续的光照会使培养皿受照射局部短时间积累较高的温度，即使在恒温箱中使用该设备，在连续使用 60 min 后培养皿底部温度会上升至 40℃，破坏了细胞外环境的稳态。我们通过设计程控的风扇散热装置，使得温度快速从局部释放，结果显示在连续使用 120 min 后局部温度仍可维持在 38℃ (见图 5)。

(3) 光照强度：由于希望给予整个培养皿均匀强度的光刺激，我们设计了一种 LED 阵列排布的方式避免了单一光源导致的强度不均匀 (图 6(a))。在培养皿中心、侧面以及边缘三个位置分别测量光强 (图 6(b))，得到的结果显示三个点的光强强度都可达到 2 mW/mm² 以上并且没有显著差异 ($P > 0.5$, t 检验) (图 6(c))，完全满足光

遗传学实验对激发光强度的限制。

(4) 刺激模式: 对该光刺激系统的输出刺激频率, 与通过示波器测量得到的参数相比较, 得到在不同刺激频率和占空比等参数下的误差结果 (图 7): 在整个 1~99 Hz 范围内, 本光刺激系统

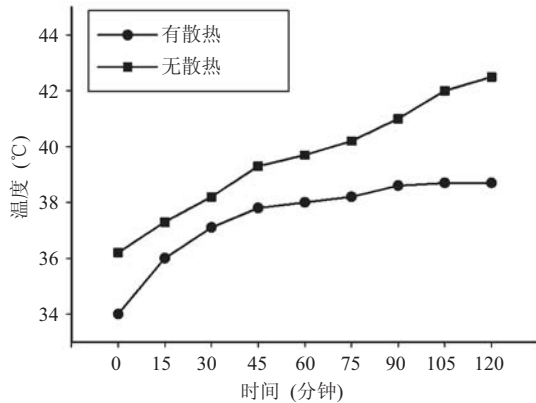


图 5 培养皿温度随时间的变化

Fig. 5 The changing rate of temperature in the dishes over time

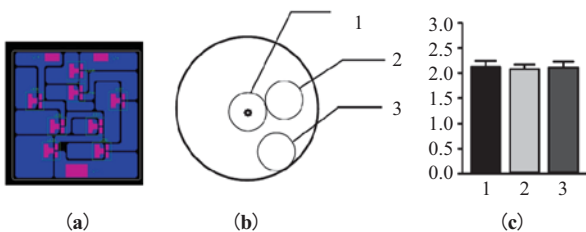


图 6 (a) 阵列式 LED 布局设计; (b) 光强测试点; (c) 测试结果

Fig. 6 (a) Layout of LED arrays; (b) Testing points of light density in the dish; (c) Testing result

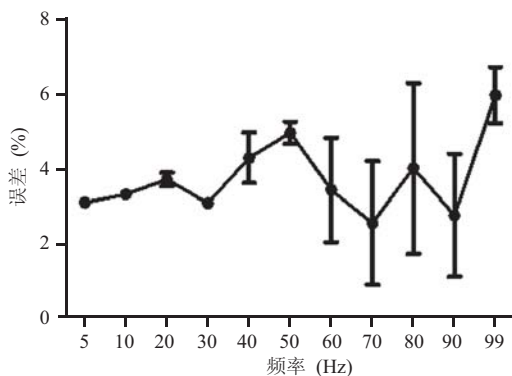


图 7 不同频率的输出误差

Fig. 7 Errors of different output frequencies

的输出频率误差都在 6% 以内; 在 50 Hz 以内光刺激系统的输出频率值都比较稳定, 误差百分比的方差较小; 随着刺激频率的增加, 本系统的输出频率误差增大, 输出频率值波动变大。

4 系统与活体脑片记录结合

将此光刺激设备与活体脑片微电极阵列 MEA 细胞外电活动记录技术相结合, 刺激携带光感基因的离体脑片细胞, 可以记录到由光照激活的神经元电活动。MEA 技术可以无创性地记录细胞的电活动, 该 8×8 的记录电极阵列由 60 个间隔 $200 \mu\text{m}$ 记录电极组成^[12]。其电极分布如图 8 所示。MEA 记录系统可记录携带光感基因的离体脑片细胞自发的电活动信号和由光刺激产生的诱发神经元电活动信号。由此, 我们开发研制的用于光遗传技术体外细胞光刺激系统可以有效地诱发出携带光感基因神经元的电活动, 证明了该设刺激设备的有效性。

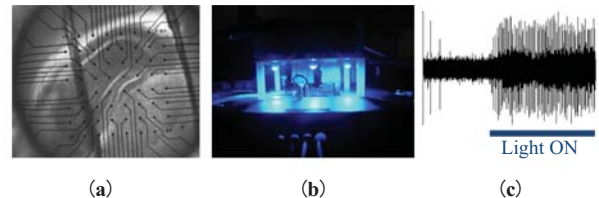


图 8 (a) MEA 电极记录示意图; (b) 光刺激系统刺激携带光感基因的离体脑片; (c) 由光刺激系统诱发的神经元电活动

Fig. 8 (a) The sample of MEA recording; (b) Stimulating the brain slice infected by Chr2 with light stimulation system; (c) Light activated neural activities

5 系统实际应用举例

以本研究组最近发表的两项工作为例 (见图 9): (1) 杨帆博士等^[13]应用该系统率先开展了应用光刺激调控皮下和原位颅腔神经胶质瘤生长的研究, 通过精确光控胶质瘤细胞膜电生理特性,

选择性地降低病变细胞的存活率。进一步通过模型小鼠活体水平的光调控研究,以及在人源胶质瘤细胞中的检测,证实了这种方法的有效性。(2)在另一项由屠洁博士等^[14]展开的研究中,将光感基因以胶质细胞特异性启动子 GFAP 的控制下制备光敏型星型胶质细胞,光特异性调控胶质细胞能促进间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)往神经元方向的分化。在体大鼠脑卒中模型证实光特异性调控光敏胶质细胞后,能促进其周围 MSCs 的神经元分化,提高脑卒中大鼠的神经功能修复。

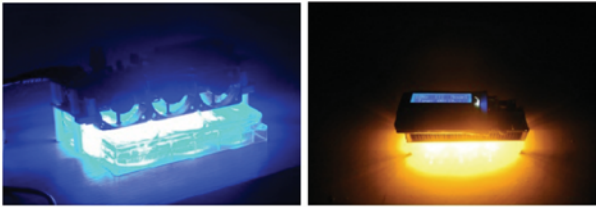


图 9 体外细胞光刺激系统工作图

Fig. 9 The samples of in vitro cell culture light stimulation device

6 总 结

本文设计和实现了一种基于光敏感基因改造过的体外培养细胞光刺激系统,能够实现远程、无线遥控来设置不同的光刺激模式,并能够实时动态地检测和显示体外培养细胞所处的理化状态。该系统可以广泛地用于光遗传技术领域的体外细胞培养中的光刺激,调控其功能,对于一些神经环路的研究和一些神经精神疾病的研究提供了一种有力的工具。

参 考 文 献

- [1] Winokur G, Coryell W, Keller M, et al. A prospective follow-up of patients with bipolar and primary unipolar affective disorder [J]. *Archives of General Psychiatry*, 1993, 50(6): 457-465.
- [2] Velasco F, Velasco M, Velasco AL, et al. Electrical stimulation of the centromedian thalamic nucleus in control of seizures: long-term studies [J]. *Epilepsia*, 1995, 36(1): 63-71.
- [3] Kleiner-Fisman G, Herzog J, Fisman DM, et al. Subthalamic nucleus deep brain stimulation: summary and meta-analysis of outcomes [J]. *Movement Disorders*, 2006, 21(Suppl 14): S290-S304.
- [4] Burn DJ, Tröster AI. Neuropsychiatric complications of medical and surgical therapies for Parkinson's disease [J]. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 2004, 17(3): 172-180.
- [5] Dlabac-de Lange JJ, Knegtering R, Aleman A. Repetitive transcranial magnetic stimulation for negative symptoms of schizophrenia: review and meta-analysis [J]. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2010, 71(4): 411-418.
- [6] Lefaucheur JP. Treatment of Parkinson's disease by cortical stimulation [J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2009, 9(12): 1755-1771.
- [7] Marangell LB, Martinez M, Jurdi RA, et al. Neurostimulation therapies in depression: a review of new modalities [J]. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2007, 116(3): 174-181.
- [8] Nowak DA, Bösl K, Podubeckà J, et al. Noninvasive brain stimulation and motor recovery after stroke [J]. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 2010, 28(4): 531-544.
- [9] Rosen AC, Ramkumar M, Nguyen T, et al. Noninvasive transcranial brain stimulation and pain [J]. *Current Pain and Headache Reports*, 2009, 13(1): 12-17.
- [10] Zhang F, Wang LP, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry [J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 633-639.
- [11] Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, et al. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology [J]. *Journal of Neural Engineering*, 2007, 4(3): S143-S156.
- [12] Li YL, Zhou W, Li X, et al. Characterization of synchronized bursts in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(12): 2976-2982.
- [13] Yang F, Tu J, Pan JQ, et al. Light-controlled inhibition of malignant glioma by opsin gene transfer [J]. *Cell Death and Disease*, 2013, 4: e893. doi:10.1038/cddis.2013.425.
- [14] Tu J, Yang F, Wan J, et al. Light-controlled astrocytes promote human mesenchymal stem cells toward neuronal differentiation and improve the neurological deficit in stroke rats [J]. *Glia*, 2014, 62(1): 106-121.