

- ceptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 1992; **58**(1):335-341
- 13 Beohme G A, Bon C, Stutzmann J M *et al*. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, 1991;**199**(3):379-382
- 14 O'Dell T J, Robert D, Hawkins E *et al*. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation, Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**88**(12):11285-11289
- 15 East S J, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine nitric oxide pathway. *Neurosci lett*, 1991; **123**:17-19
- 16 Zalatsky R A, Nicoll R A. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, 1990;**248**:1619-1624
- 17 Williams J H, Errington M L, Lynch M A *et al*. Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature*, 1989;**341**:739-742
- 18 Piomelli D, Volterra A, Dale N *et al*. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as a second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. *Nature*, 1987;**328**:38-43

体外构筑生物神经网络方法述评

朱扬明 韦 钰

(东南大学分子与生物分子电子学国家实验室, 南京 210018)

提 要

受人工神经网络研究的推动,也由于神经器件研究的需要,探索大脑思维机制的启发,人工控制生物神经网络形成的方法近年受到了人们的重视。下面综述体外控制生物神经网络形成的几种方法,并对它们的特点作适当评述。

关键词 生物神经网络,神经器件,细胞生长

电场对生物组织生长发育的影响早已被人们所认识^[1-3]。有证据表明电场对细胞迁移有导向作用。一般情形下,细胞向负极的生长增强,向正极的生长减弱。非对称的钙离子流在这种趋电运动中起关键作用。用电刺激骨细胞的分裂增殖已用于临床骨折的治疗等等。神经系统在发育和适应过程中有一个普遍的现象,就是神经元电活动的变化先于其形态变化。这意味着在细胞培养时可以用电场或别的方法来影响神经元的电活动,从而使它的形态变化向着人们期望的方向发展。由此就可得到一种在体外引导神经细胞生长的方法,也是体外构筑生物神经网络(BNN)的可能途径。事实上,Aizawa等人就是用这样的方法在体外构筑

BNN的^[4-6]。然而,神经细胞的生长发育是一个极其复杂的过程,它的机制还不很清楚,有一些因素还不为人们所知^[7],或者知其然而不知其所以然,这就不排除用其它途径来控制神经细胞生长的可能性。我们下面提到的方法有些就属于此类。

就我们目前掌握的资料来看,体外控制BNN形成的方法有以下几种:

1 用电极控制细胞的增殖及其生长方向

Aizawa等人用电极控制细胞增殖的工作

最早发表在 1988 年^[4]. 他们不仅研究电场对细胞增殖的影响, 还观察了电场作用下 HeLa 细胞形态、细胞膜流动性、通透性等的变化. 这些工作是针对哺乳动物的细胞进行的. 后来, 他们又转入在体外构筑 BNN 的研究^[5,6]. 他们以鼠成纤维细胞 (pheochromocytoma, PC12) 为对象. 把这些细胞放到包有胶原的 In_2O_3 制作的光学透明电极 (OTE) 上. OTE (可以组成特殊的模式, 如梳状, OTE 的间距 $20\mu\text{m}$) 放在培养皿的底部. 培养皿中有一个和 OTE 对应的电极和一个 Ag/AgCl 参考电极. OTE 的电位由稳压器和函数发生器控制. 细胞培养时, 在基质中加入神经生长因子 (NGF) 以促进细胞的分化. 实验结果发现, 在 OTE 对 Ag/AgCl 的电位低于 0.3V 时, PC12 细胞分化成神经元, 且具有长的轴突; 而 OTE 的电位在 0.4V 左右时, 细胞分化受到显著抑制. 培养 14d 后发现轴突沿着培养皿底部露出的玻璃条纹生长而不沿 OTE 生长.

Aizawa 等人的结果是容易理解的. 正电位可以抑制细胞 (神经细胞) 的生长. OTE 的电位高, 当然可以抑制细胞的分化, 并阻止它们沿 OTE 的方向生长. 类似的结果在肿瘤细胞中也可观察到. 当肿瘤细胞增殖时, 细胞膜的电位较低, 若对它们加上适当的正电位, 则可显著地抑制它们的生长.

2 用基片表面和细胞的相互作用来控制细胞的生长

Jimbo, Torimitsu 等人的工作比较典型^[7,8]. 他们发现, 在细胞培养时, 感觉神经纤维倾向于在某些金属氧化物表面生长. 这种倾向性依赖于该金属的电负性. 他们的具体做法如下^[7]:

选用生长 6 周的小鼠 (ICR) 和 15d 的鸡胚的背部根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 作为材料. 37°C 时用 $5\text{mg}/\text{ml}$ 的胶原酶分解 DRG 1h, 再离心 ($1200\text{ r}/\text{min}$) 5min, 研碎后用吸量管把细胞移到有金属氧化物 (SnO_x , InO_x , AlO_x , TiO_x) 图样的基片上培

养. 金属氧化物图样由光刻方法产生. 培养基质成分为 MEM, HEPE, NaHCO_3 , HGF, 人转铁蛋白, 猪血清, 孕激素, 青霉素, 链霉素等 (各成分的比例请详见文献 [7]). 基质的 pH 用 $1\text{mol}/\text{L}$ 的 NaOH 调至 7.4. 结果表明, 氧化铝和氧化铟具有很强的引导神经细胞轴突生长的能力. 当无金属氧化物的图样时, 轴突只是随机地在玻璃基片上生长. 但有金属氧化物图样时, 轴突则沿着这些图样的轴向生长; 只是偶尔长到玻璃基底上. 即便如此, 生长一段很短的距离后, 它们还会回到金属氧化物表面来. 尽管 $1\mu\text{m}$ 金属氧化物图样的宽度已小于轴突的大小, 但它足以引导轴突的生长了. 这似乎表明细胞能在微米尺度的范围内区别金属氧化物和玻璃基片的不同.

由于光刻方法可以在微米的线度上刻蚀出任意期望的图形 (如平行线条, 六角形), 而细胞又可沿着这些图样生长, 这意味着, 在体外可以设计出具有我们期望结构的 BNN, 并对它进行研究. Jimbo 和 Kawana 在这方面已作了一些努力^[8]. 他们用前述的方法成功地使神经细胞生长到一些预定的区域 (这些区域以及生长路径用光刻的方法产生), 然后在这些区域施以一定模式的电刺激 (输入), 记录膜电位、膜电流、刺激电流等波形 (输出), 并成功地观察到单个神经元的时间总和现象.

我们认为, Torimitsu 等人的工作和 Aizawa 等人的工作相比似乎更出色些. 他们不仅成功地使神经细胞生长到一些预定的区域, 而且还观察到单个神经元的时间总和现象. 这迈开了研究单个神经元信息处理方式的第一步. 另外, 由于光刻可以刻蚀任意期望的图样, Torimitsu 等人在构筑 BNN 时也更自由些. 但是, 金属氧化物为何能引导轴突的生长, 其机理还不太明了. 金属元素的电负性起什么作用也不清楚. Torimitsu 等人提出了一个可能的解释^[7], 认为和表面电荷有关. 这还有待进一步证实.

Jimbo 等人的工作还不很全面. 研究单个细胞的信息处理方式是不够的. 还应考虑如何

在细胞间形成突触联系,进而构成网络。体外构筑的 BNN 作为新一代神经器件肯定会有新的特性。当然,所有这些工作不可能一蹴而就,需要人们长期的不懈努力。

3 用自组装膜引导神经细胞的生长

Georger 等人用自组装 (SA) 方法在固体基片表面形成硅烷偶联的乙二胺 (silane-coupled ethylenediamine, EDA) 单分子膜,用深紫外 (deep UV) 光刻对该自组装层刻蚀。曝光区域用憎水的过氟化分子,如 13 氟硅烷 (tridecafluorosilane 13F) 进行修饰。测量接触角和 UV 谱可以发现,未曝光 EDA 的无机官能团和 13F 在同一个分子平面内^[9]。

把体外培养的人 SK-N-SH 神经分裂细胞 (neuroblastoma) 移植到上述方法修饰的基片上,可以发现 98% 以上的细胞有选择地吸附在基片上。移植幼鼠海马神经元,它们也有选择地吸附在 EDA 上,并且轴突、树突的生长仅限制在 EDA 表面 (宽度 1—20 μm)。

Georger 等人仅给出这样一个初步结果,神经细胞选择性地吸附、限制性地生长的原因还未解释。我们怀疑这些现象和 13F 的憎水性有关。

由于人工神经网络 (ANN) 研究的推动,新一代器件研究的需要,探索大脑思维之谜的启发,近年来在体外构筑 BNN 的工作受到了研究者的重视。

神经细胞的生长和许多因素有关。原则上讲,任何有效地控制这些因素的手段也可以有效地控制神经细胞的生长,包括它们的生长方向。本文就我们掌握的资料介绍了目前常用的体外控制 BNN 形成的几种方法,它们各有千秋,控制细胞生长的机理各不相同。其中,Jimbo, Tormitsu 等人的方法比较成熟,但还不全面,仍有许多工作要做。Georger 等人的工作借助于 SA 技术和光刻技术,有一定的吸引力。

Aizawa 小组的工作也有特点,控制细胞生长的机理比较清楚。现在还很难说那种方法以后会成为体外构筑 BNN 的主要方法。但有一点是可以肯定的,多种方法的并存,相互间取长补短,一定会促进方法本身的发展,推动体外构筑 BNN 研究的进步,从而把 ANN 的研究,神经器件的研究以及大脑思维机制的研究推向一个新高度。

参 考 文 献

- 1 商成,楼宇伟,万三.生物电化学振荡——一项可能对探索中医机制有意义的研究.科技导报,1991;1:37
- 2 Carter S B. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature*, 1967;213:256
- 3 Cooper M S, Keller R E. Perpendicular orientation and directional migration of amphibian neural crest cells in dc electrical fields. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984;81:160
- 4 矢尾板仁,碓山義人,筱原寛明 *et al.* 細胞増殖の電気制御.電気化学および工業物理化学,1988;56(12):1086
- 5 Aizawa M, Motohashi N, Shinohara H *et al.* Electrically controller formation of neuronetwork. IN: Pedersen P C *et al.* eds, *Proc of Annual Intl. Conf. of the IEEE Eng. in Medi. and Biol. Society*. New York: IEEE Publisher, 1990; 1740
- 6 Aizawa M. Design and fabrication of biomolecular electronic devices and neuro devices. In: Nagel J *et al.* eds., *Proc. of Annual Intl. conf. of the IEEE Eng. in Medi. and Biol. Society*. New York: IEEE Publishers 1991; 128—131
- 7 Torimitsu K, Kawana A. Selective growth of sensory nerve fibers on metal oxide pattern in culture. *Developmental Brain Research*, 1990;51(1):128
- 8 Jimbo Y, Kawana A. Electrical stimulation of cultured neural cells by planar electrode array. In: Pedersen P C *et al.* eds., *Proc. of Annual Intl. Conf. of the IEEE Eng. in Medi. and Biol. Society*. New York: IEEE Publisher, 1990;1741—1742
- 9 Georger J H Jr, Dulcey C S, Stenger D A *et al.* Co-planar patterns of selfassembled monolayers for selective cell adhesion and outgrowth. *Thin Solid Films*, 1992;210/211:716