

新技术讲座

神经芯片技术的研究进展

吴浩扬 吴裕远*

(西安交通大学能源与动力工程学院, 西安 710049)

摘要 神经芯片是一种用硅微加工技术制造的微机电器件。活体的哺乳动物神经元细胞在神经芯片上培养存活, 通过外加电路的控制, 人们可以方便地对活体神经元进行检测, 研究其在外加激励模式下的响应, 整个研究过程是选择性的、实时的、连续的。简要评述了神经芯片技术的研究进展, 并对其前景作了展望。

关键词 神经芯片, 微机电器件, 多电极阵列

学科分类号 Q6

为深入研究神经元突触的发育过程、外加激励对神经元突触可塑性的影响等许多神经生物学的基本问题, 也为了对损伤或退化的生物神经功能进行修复, 人们需要明确生物神经网络在外加激励模式下的响应规律。在目前的技术水平下, 直接对动物中枢神经系统作详尽电生理测量还不现实, 可行的途径是先对小型的、人工培养的生物神经网络中的神经细胞电特性作同时、实时测量。由于对突触可塑性的研究需要几天到几个星期的时间, 所以测量过程应该是非损伤的, 以便长期观测。传统的基于玻璃电极的电生理测量技术存在以下不足: a. 需要对神经元细胞进行穿刺, 这是一种损伤性的操作, 不可避免地会改变细胞的电特性以及缩短细胞的寿命; b. 由于要一次性地对许多神经元同时作成功穿刺非常困难, 所以也不能对整个神经网络中的全部神经细胞同时作测量。因此传统的方法不能满足要求。

为克服传统方法的弊端, 人们研究出了微电极阵列技术。微电极阵列是一个由金属微电极所构成的平面阵列, 神经元细胞在电极上培养。它是神经元细胞和外围电路之间的桥梁, 通过它可将神经元的静息电位、动作电位等信号传递给外围电路。与传统的基于玻璃电极的电生理测量技术相比, 微电极阵列技术具有非损伤的特性, 非常适于研究神经元细胞的自发活动, 因此已经在神经生物学领域中得到了广泛的应用。尽管如此, 在研究神经网络动力行为、神经元突触可塑性等方面, 微电极阵列技术仍然存在着一些缺点: a. 因为神经元的胞体和突触没有固定在微电极阵列上, 所以随着实验过

程的进行, 活体神经元细胞会离开原先接触的微电极, 移动到其他地方, 故而无法建立微电极和神经元之间的一一对应; b. 由于神经元没有约束在微电极上, 因此也无法确定外加电路施加的激励和测量到底针对了多少神经细胞。

神经芯片技术作为一个新兴的研究领域, 是在微电极阵列技术的基础上发展起来的。简单地说, 神经芯片技术是利用硅微加工技术, 在硅片上加工出一组微井, 每个微井中放入一个人工培养的活体神经元细胞, 微井底部与金属微电极相连。这样一来, 神经元细胞和金属微电极之间就实现了一一对应, 人们可以在神经细胞的寿命期限内方便地对其作选择性地激励和测量。

1 神经芯片的结构

Maher 等^[1]采用一个 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小的硅片, 厚度为 $500\text{ }\mu\text{m}$, 在其上刻蚀出一个 $4\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ 的薄膜, 厚度为 $16\text{ }\mu\text{m}$, 在芯片上制备出一个 4×4 微井阵列。微井上部面积为 $30\text{ }\mu\text{m}^2$, 微井深度为 $16\text{ }\mu\text{m}$ (即微井把硅片刻穿), 微井的容积大于成熟神经元细胞的大小。微井之间的间隔为 $100\text{ }\mu\text{m}$, 微井底部是 500 nm 厚的金电极, 金电极通过引线 with 芯片边缘的接触电极相连, 金电极和硅片之间是 $1\text{ }\mu\text{m}$ 厚的氮化硅绝缘材料^[1]。微井上方是一个中空的盖板, 发育早期的神经元细胞尺寸较小, 可以通过盖板中央的通孔, 而发育成熟的神经元细胞尺

* 通讯联系人。

Tel: 029-2668725, E-mail: yywu@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2003-05-13, 接受日期: 2003-06-28

寸较大,就被盖板限制在微井内. 盖板除了中央通孔外,四周还开有孔隙通道,神经元的轴突、树突可以透过盖板的孔隙自由伸出,与其他神经元细胞形成突触连接. 实验选取小鼠的海马体神经细胞作为研究对象,原因是: a. 海马体神经元和大多数中枢神经系统的神经元相似,都能在体外自发地形成高密度的网络互连; b. 目前已有许多关于这种细胞的培养和生理性质的研究成果; c. 培养 18 天后,几乎所有的海马体神经元都成为兴奋锥体神经元,能够在分离培养的环境下很好地存活.

图 1 给出了神经芯片的结构示意图.

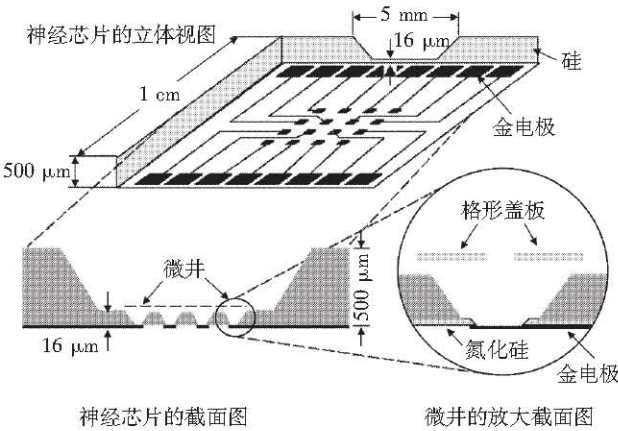


Fig. 1 A schematic view of the neurochip structure^[2]
图 1 神经芯片的结构示意图^[2]

2 神经芯片的制备

图 2 所示为神经芯片加工各步骤截面示意图^[1,2], 其中步骤 (1) ~ (3) 针对整个硅片进行, 步骤 (4) ~ (9) 针对硅片中部的薄膜进行. 初始时, 硅片是一个由直径为 101 mm 的单晶硅构成的 3 层结构, 结构的主体是 500 μm 厚的 N 型掺杂硅, 下方是 4 μm 厚的 P 型重掺杂硅, 之下是一层 16 μm 厚的 N 型掺杂硅. (1) 用低压化学气相沉积法 (low pressure chemical vapor deposition, LPCVD) 在硅片两面生长出 1 μm 厚的氮化硅, 并加工出一个 4 mm × 8 mm 大小的窗口; (2) 用乙烯二胺邻苯二酚 (ethylene diamine pyrocatechol, EDP) 溶液对硅片进行各向异性刻蚀, 刻蚀反应在 P 型硅的表面处停止, 这一步用于在硅片中部生成一个 16 μm 厚的硅薄膜; (3) 作再一次刻蚀, 去掉硅薄膜上的 P 型层.

以下步骤针对硅片中部的薄膜进行. (4) 在硅薄膜的两面, 用热氧化法生长 0.5 μm 厚的二氧化硅层, 在硅薄膜上方的二氧化硅层中加工出与微井盖板的孔隙通道相对应的图案, 并通过刻蚀得到孔隙通道的突起结构, 再去除硅薄膜下方的二氧化硅层, 之后用 LPCVD 法在硅薄膜上方沉积一层 1 μm 厚的氮化硅; (5) 加工出微井盖板的图案, 通过刻蚀反应在硅薄膜上方生成微井盖板和盖板中

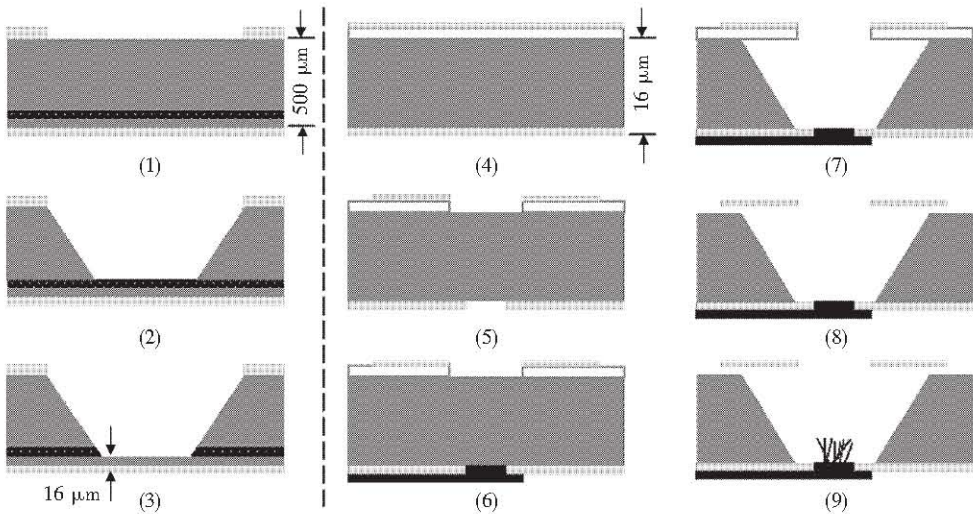


Fig.2 Cross sectional views of a silicon wafer at different stages during the neurochip fabrication processing^[1,2]
图 2 神经芯片加工各步骤截面示意图^[1,2]
■: N 型硅; ▨: 氮化硅; □: 二氧化硅; ■: P 型硅; ■: 金电极; ▨: 铂黑.

间的通孔,在硅薄膜下方开一小孔用于放置金属微电极;(6)在硅薄膜下方蒸发出 10 nm 厚的铬和 500 nm 厚的金电极;(7)用 EDP 刻蚀法生成微井;(8)用 49% 的氢氟酸去掉氮化硅下的二氧化硅,即生成微井盖板的孔隙通道;(9)将铂黑电镀在微电极上,铂黑的作用是增大电极的电容量,即减小电极的交流阻抗。

以上所说的微井盖板中包含了突触生长的孔隙通道,但是当神经元细胞的突触生长延长到微井之外时, Maher 等^[1,2]没有对这些突触的生长行为作限制。这样在实际中,各个神经元之间建立的突触连接就带有随机性,不利于后续研究的使用。Service 等^[3]提到了一种改进的方法,即用微加工的方法在硅片表面设计一个图案,将利于神经细胞生长的化学物质按照这个图案加工在硅片上,而在图案之外涂上不利于神经细胞生长的另一种化学物质。然后在硅片上培养神经细胞,如此培养出来的神经元细胞的突触就按照预先指定的图案生长,各个神经元细胞之间建立的突触连接就是确定性的。

3 信号检测

一个神经芯片在构建好之后,就可以用来检测神经元细胞的膜电位。当研究神经元的自发放电行为时,可以直接利用神经芯片上的微电极进行检测。当研究神经元在外加激励下的放电行为时,由于激励信号的幅值一般为 1 V 量级,持续时间为 10 ms,而神经元动作电位信号的幅值为 0.1 mV 量级,持续时间为 1 ms,激励信号的幅值比响应信号的幅值大 1 万倍,因此无法用神经芯片微电极对神经元细胞同时作激励和检测。为此, Maher 等^[1]利用一个电压敏感的荧光染料 RH237 来检测激励作用下的细胞膜电位,该荧光染料的性质是其激发光谱随着膜电位的变化而变化。将该荧光染料结合在神经细胞的膜表面,则在一束固定波长的激发光照射下,荧光染料的发射光强度也就会随着膜电位的变化而变化。用低噪声光敏二极管和放大器可检测发射荧光的强度变化,从而检测神经元细胞在外加激励作用下的响应。

4 神经元细胞与硅材料之间的生物相容性

与其他种类细胞不同,神经细胞在发育成熟后不能分裂和复制,在受损伤之后也几乎不能作自身修复。因此当神经系统的功能退化或受到损伤后,很难完全恢复正常。神经芯片技术尝试将神经科学

和集成电路技术结合在一起,以实现修复某些缺失的神经功能。对神经元细胞与硅材料的生物相容研究是神经芯片技术研究中的一项关键内容。构建神经元细胞与硅材料之间长期稳定的生物相容性界面不仅是测量神经细胞膜电位的需要,更是为了以后能将神经芯片植入人脑,对大脑组织中受损伤或功能退化的部分进行修复。

研究表明,不加修饰的单晶硅材料(或二氧化硅)生物相容性很差,神经细胞在其上生长很困难^[4]。因此需要对硅片表面进行修饰,以建立一个硅片和神经细胞之间的良好界面。目前已报道有以下几种方法:第一种方法是在硅片表面涂一层与神经细胞有吸附作用的分子,如多聚赖氨酸、有生物活性的肽链等,这些分子可被神经细胞膜上的受体所识别^[5,6];第二种方法是用化学固定化的方法将蛋白质固定在硅表面上,这些蛋白质可用于吸附神经细胞^[7,8],如果用微加工方法在硅片表面以一定的图案固定蛋白质,则可以将神经细胞以指定的图案固定在硅片上;第三种方法是对硅表面作修饰,产生一个单分子层,令其中的带正电的功能团(如氨基)指向外部^[9]。以上 3 种方法都是在硅片表面形成一个用于共价结合的分子层,以提高神经细胞在硅表面的附着能力。它们共同的弊端是附加分子层将不可避免地引入附加阻抗,阻碍了神经细胞与硅芯片之间的电流传递,减小了检测结果的信噪比。

Fan 等^[10]采用与前三方法不同的思路来修饰硅表面,即不是用化学的方法在硅表面上涂覆分子层,而是用离子注入的方法将氢氧根离子直接注入硅表面。这种方法增强了硅表面的亲水性,因此减小了神经细胞附着在硅表面所需要的功,有利于神经细胞的附着和繁殖,也有利于轴突和树突的生长。对于神经细胞和硅材料之间的界面来说,评价其质量的指标主要是这个界面的导电能力, Fan 等^[10]的方法可使神经细胞紧密地附着在硅材料表面上,减小了界面处的阻抗,提高了最终检测结果的信噪比。简言之,与前三方法相比,氢氧根离子注入法更有效地提高了神经细胞与硅表面之间的生物相容性。

Selvakumaran^[11]提出评价微电极材料生物相容性的两种指标:细胞毒性和蛋白质吸附能力。材料的细胞毒性是指材料抑制细胞生长的能力,蛋白质吸附能力是指材料表面吸附蛋白质的容易程度,这两个指标都是越低越好。文中对金、铂、铱、钨锡

氧化物、钛等材料进行了分析, 其中钛是一种已得到应用的可植入人体的材料. 研究发现, 在接触纤维原细胞 72 h 后, 金、铱、钨锡氧化物对细胞的生长没有抑制作用, 而铂、钛则明显抑制细胞生长, 即有较强的细胞毒性, 在接触血浆 24 h 后, 钛表面吸附的蛋白质层最厚, 钨锡氧化物表面吸附的蛋白质层最薄. 因此钨锡氧化物具有适合细胞生长和吸附蛋白质最少的优点, 不过如果考虑到电阻率低、加工容易等要求, 金便成为最具生物相容能力的微电极材料.

5 神经芯片技术的前景

现在神经芯片技术还处于起步阶段, 大部分研究尚都在生物体的体外 (*in vitro*) 进行, 即是将哺乳动物的神经元细胞从生物组织中分离出来, 在硅片上进行培养. 需要注意的是, 目前有关微电极阵列技术的研究已有不少突破^[12~14], 如美国杜克大学的研究人员通过设计两块专用 CMOS 模拟集成电路, 对取自大脑皮层的神经信号进行检测, 集成电路具备数据缓冲、放大、滤波、采样等功能, 初步实现了集成化的“硅-神经”接口^[15].

在微电极阵列技术的基础上, 预期将来能将神经芯片引入体内, 在生物体内构建一个与生物组织相容的硅芯片集成电路, 成为活体生物神经网络与硅集成电路技术结合的桥梁^[16,17]. 并可与神经修复技术结合在一起, 用于修复生物神经系统缺失或退化的功能, 如视觉、听觉、肌肉控制等功能. 更进一步, 还可利用无线通信技术^[18,19], 实现生物体内神经芯片与体外控制电路之间控制流、数据流的双向无线传输, 这不仅对神经损伤、神经功能退化等病症的治疗有着积极的意义, 而且对以后研究计算机和大脑之间的通信控制也有着重要的启示.

参 考 文 献

- 1 Maher M, Wright J, Pine J, *et al.* A Microstructure for interfacing with neurons: the neurochip. <http://ieeexplore.ieee.org>, 2003-05-13
- 2 Maher M, Pine J, Wright J, *et al.* The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *J Neuroscience Methods*, 1999, **87** (1): 45 ~ 56
- 3 Service F R. Neurons and silicon get intimate. *Science*, 1999, **284**: 578 ~ 579
- 4 Bayliss S C, Buckberry L D, Fletcher I, *et al.* The culture of

- neurons on silicon. *Sensors and Actuators*, 1999, **74** (1 ~ 3): 139 ~ 142
- 5 Gross G W, Ruoades B K, Azzazy H M E, *et al.* The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 1995, **10** (6 ~ 7): 553 ~ 567
- 6 Ignatius M J, Sawhney N, Gupta A, *et al.* Bioactive coatings for nanoscale instruments. *J Biomedical Material Research*, 1998, **40** (3): 264 ~ 274
- 7 Tiefenauer L X, Sorribas H, Padeste C, *et al.* Bio-functionalized Neurochips. *Proceedings of the 23rd Annual EMBS International Conference*, Istanbul, 2001
- 8 Clemence J F, Raieri J P, Aebischer P, *et al.* Photoimmobilization of a bioactive laminin fragment and patten-guided selective neuronal cell attachment. *Bioconjugate Chemistry*, 1995, **6** (4): 411 ~ 417
- 9 Stenger D A, Pike C, Hickman J J, *et al.* Surface determinants of neuronal survival and growth on self assembled monolayers in culture. *Brain Research*, 1993, **630**: 136 ~ 147
- 10 Fan Y W, Cui F Z, Chen L N, *et al.* Improvement of neural cell adherence to silicon surface by hydroxyl ion implantation. *Surface and Coatings Technology*, 2000, **131** (1 ~ 3): 355 ~ 359
- 11 Selvakumaran J, Hughes M P, Keddle J L, *et al.* Assessing biocompatibility of materials for implantable microelectrodes using cytotoxicity and protein adsorption studies. *The Second Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, Madison, 2002
- 12 Meyer J U, Schuttler M, Thielecke H, *et al.* Biomedical microdevices for neural interfaces. *The First Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, Lyon, 2000
- 13 Xu C, Lemon W, Liu C. Design and fabrication of a high-density metal microelectrode array for neural recording. *Sensors and Actuators A*, 2002, **96** (1): 78 ~ 85
- 14 Meyer J U, Stieglitz T, Ruf H H, *et al.* A biohybrid microprobe for implanting into the peripheral nervous system. *The Second Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, Madison, 2002
- 15 Obeid I, Morizio J C, Moxon K A, *et al.* Two multichannel integrated circuits for neural recording and signal processing. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2003, **50** (2): 255 ~ 258
- 16 Olsson R H, Glari M N, Wise K D. Silicon neural recording arrays with on-chip electronics for *in vivo* data acquisition. *The Second Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, Madison, 2002
- 17 Gasson M, Hutt B, Goodhew I, *et al.* Bi-directional human machine interface via direct neural connection. *Proceedings of the 2002 IEEE International Workshop on Robot and Human Interactive Communication*, Berlin, 2002
- 18 Takeuchi S, Shimoyama I. Wireless recording of insect neural activity with an SMA microelectrode. *Proceedings of 1st Joint BMES/EMBS Conference Serving Humanity, Advancing Technology*, Atlanta, 1999
- 19 Takeuchi S, Shimoyama I. An RF-telemetry system with shape memory alloy microelectrodes for neural recording of freely moving insects. *The First Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology*, Lyon, 2000, 491 ~ 496

Progress in Neurochip Technology

WU Hao-Yang, WU Yu-Yuan *

(School of Energy and Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract Neurochip is a microelectromechanical device made by silicon micromachine technology, on which the neuron cells of living mammalian can be cultured. These neurons can be detected readily under the control of applied circuits, and their responses to different stimulations can also be investigated. The overall process is selective, on-line, continually. The recent progress of neurochip technology is reviewed, and its future scene is anticipated.

Key words neurochip, microelectromechanical device, multielectrode array

* Corresponding author. Tel: 86-29-2668725, E-mail: yywu@mail.xjtu.edu.cn

Received: May 13, 2003 Accepted: June 28, 2003

知识与动态

Quorum Sensing 及其研究进展

陶金莉¹⁾ 沈亚领¹⁾ 迟莉丽²⁾ 魏东芝¹⁾

(¹⁾ 华东理工大学生物化学研究所, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

²⁾ 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

Quorum sensing (QS) 是近来受到广泛关注的一种细菌群体行为调控机制。由于不少人体或植物病原菌的发病机制受 QS 机制的调控, 很多细菌代谢产物也受到该机制的控制, QS 系统已成为医学、生物工程学等多领域的研究热点。在 QS 的调控过程中, 细菌分泌一种或多种自诱导剂 (autoinducer, 也称信息素 pheromone), 然后通过感应这些自诱导剂来判断菌群密度和周围环境变化, 当菌群数达到一定的阈值 (quorum, 菌落或集落数) 后, 启动一系列相应基因的表达, 从而调节菌体的群体行为。

至少 25 种以上的革兰氏阴性菌存在 QS 系统, 除了 *V. harveyi* 和 *M. xanthus*, 其余细菌中 QS 系统都与费氏弧菌中的典型系统——由 LuxI-LuxR 蛋白调控的 QS 系统相似。在该系统中, LuxI 类蛋白催化革兰氏阴性菌特有的一类小分子自诱导剂 (酰化高丝氨酸内酯——AHL, 能自由进出细胞) 的合成, 与之同源的 LuxR 类蛋白则负责识别高丝氨酸自诱导剂并进而激活下游靶基因的转录。与革兰氏阴性菌不同, 革兰氏阳性菌使用一些经过修饰的寡肽作为自诱导剂, 并拥有另外一种相对更复杂的信号传递系统。首先合成一些经过一次或多次转录后修饰与加工的自诱导肽, 并通过一种结合 ATP 的转运复合物 (ATP-binding cassette, ABC) 分泌到胞外。当自诱导肽随细胞生长, 在胞外积累到一定浓度后, 被受体识别并激活一系列连锁反应, 从而调节那些受 QS 控制的目标基因表达。

近年来研究较多的杂合型 QS 回路则兼具上述两种 QS 系统的部分特征, 这是在 *V. harveyi* 调节生物发光过程中被发现的, *V. harveyi* 的信号系统产生两种小分子的自诱导剂, 自诱导剂 1 (AI-1) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) 是一种高丝氨酸内酯的结构类似物, 而自诱导剂 2 (AI-2) 是一种新近鉴定的呋喃硼酸二酯, 与以前鉴定的自诱导剂没有任何类似之处。最近的研究发现, AI-2 作为 *V. harveyi* 的第二信息素也在其他多种格兰氏阴

性、阳性细菌中存在, 并极可能充当着细菌种间交流的通用语言。

杂合型回路中与革兰氏阴性菌相似的是其信号分子的产生系统。杂合型 QS 回路具有两条平行的感应途径, 两种接收信号分子的受体是同源的感应激酶, LuxN 蛋白识别 AI-1 提供的信号, LuxP 蛋白主要识别 AI-2 的信号。信号分子通过一系列传递方式到达 LuxO 感应调节子 (该感应调节子首先响应由 AI-1 提供的信号, 然后响应 AI-2 的信号), 通过控制 LuxO 蛋白磷酸化、去磷酸化实现对下游靶基因表达的调控。

不仅是 *V. harveyi*, Bonnie 等还发现很多革兰氏阴性菌及阳性菌都分泌自诱导剂 AI-2, 从而拥有在种间进行交流的语言能力。尽管许多细菌中 AI-2 的控制基因已被鉴别, 但迄今只在 3 种细菌 (*V. harveyi*、*V. cholerae* 和 *S. typhimurium*) 中明确了完整的 AI-2 识别和信号传递机制。

随着对 QS 认识的深入, 其在生物、医学等领域的应用逐渐成为研究人员所关注的热点。人们发现, 自诱导剂的生物合成酶及自诱导剂感应部位为新的抗菌药物开发提供了有潜力的靶点, *P. aeruginosa* 是肺囊性纤维化病人患慢性或致命性感染的最为常见的病原, *P. aeruginosa* 生物膜的形成受到 QS 的调控, 这种生物膜对包裹其中的绿脓杆菌起到一定的保护作用, 使得引起的感染持久而且难以治愈。在感染早期通过基因手段切除了绿脓杆菌中的信息素合成酶后发现感染症状明显减轻了。McNab 等证实 AI-2 介导的种间交流在混杂菌种生物膜的形成中是必不可少的一步, 齿菌斑牙齿表面的混杂菌膜中成百上千的各式菌种居住其中并受到掩护, 故控制 QS 中信息素的生成有望用于牙病的治疗。

QS 系统用于基因工程蛋白质药物产量提高已取得很大的成效。有研究者认为 QS 有可能用于受其控制的一些代谢产物如卡巴酚、灵菌红素产量的提高。