

光控制神经活动研究进展*

刘秀丽 周 炜 曾绍群**

(武汉光电国家实验室(筹) Britton Chance 生物医学光子学研究中心, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要 神经活动即神经兴奋的产生与传递, 阐明神经活动的基本过程是现代脑科学的目标之一. 神经活动的光控制用光作为激活和抑制神经活动的手段, 主要通过笼锁化合物、光敏感蛋白、光开关蛋白等物质的光活化或直接光刺激来实现. 光控制神经活动的方法具有操作简单、非接触、高时空分辨、可定量重复等优势, 因此在基础和临床神经生物学研究中具有广阔的应用前景. 综述了各种光控制神经活动方法的原理、特点及最新进展, 分析了其技术发展的趋势.

关键词 笼锁化合物, 光敏蛋白, 光开关蛋白, 光刺激

学科分类号 Q63

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00263

大脑是一个复杂的多级系统, 大致可分为分子、突触、神经元、神经回路、投射区和系统等不同层次, 大脑功能是由各神经细胞功能逐级整合而成. 在研究神经细胞如何完成各种功能时, 往往需要激活或抑制特定细胞以确认其在神经回路中的作用^[1], 因此, 神经活动的活化和抑制是神经科学研究中不可或缺的技术手段.

目前神经活动的控制主要通过电刺激和神经药理学方法等实现. 电刺激方法通过向细胞内注入电流或在细胞外给予场电势来激活神经活动. 虽然该方法时间精度非常高, 但是细胞内注入电流会对被刺激细胞产生不可逆的损伤, 并且难以实现多个细胞或多个部位的同时刺激, 而细胞外场电势刺激方法的细胞特异性和空间精度很低. 神经药理学方法通过兴奋性或抑制性神经递质等来激活或抑制神经活动. 由于受加药方式和药物扩散等影响, 该方法的时间和空间精度、细胞特异性不高. 尤其是在厚组织或活体实验中, 药物难以精确作用于特定部位调控特定细胞的活动.

用光作为调控手段是一种研究神经活动的新方法. 1971年, Fork^[2]用 488 nm 激光照射海兔神经节细胞时记录到细胞的动作电位, 于是提出了这一开创性的方法. 近年来, 随着各种光活性物质的合成和光学技术的发展, 很多研究小组对光控制方法进行了改进并初步应用于神经生物学领域. 通过光活性物质控制神经活动只需要特定光束扫描预选的

活化位点, 实验操作非常简单. 结合荧光标记及成像技术, 可以同时记录所调控神经细胞的形态、位置信息以及功能信号, 易于同时确定该细胞在神经网络中的结构定位和功能, 因此具有广阔的应用前景. 斯坦福大学的 Zhang 和 Wang 等^[3]2007年发表在《自然》(Nature)上关于光控制神经回路的文章, 被该杂志评为该年度最受欢迎的论文之一, 并被麻省理工学院技术综述评为该年度十大最有影响的技术之一. 本文对光控制神经活动方法的原理、特点与最新应用进行综述, 并提出神经活动研究对光控制技术的新要求, 分析光控制技术的发展趋势.

1 光控制神经活动原理及比较

神经活动的光控制即通过光活性物质的光活化实现激活和抑制神经活动的目的. 根据所使用光活性物质的特性, 将光控制方法分为 4 类, 分别为: a. 笼锁化合物的光解笼锁. 对笼锁化合物光活化解笼锁, 将其从封闭状态转变为活性状态调控神经活动^[4]. b. 光活化光敏感蛋白. 激活表达于神经细胞膜上的光敏感蛋白质, 如视紫质通道, 诱导细

* 国家自然科学基金资助项目(30727002, 30700215)和高等学校创新引智计划资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-87792033, E-mail: sqzeng@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2009-04-24, 接受日期: 2009-08-03

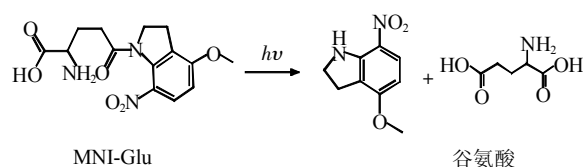
胞膜电位的去极化或超极化^[5]. c. 光活化光开关蛋白. 光照连有光致异构的化学基团的通道, 打开或关闭该通道, 调控神经活动^[6]. d. 激光直接刺激. 激光直接刺激诱导神经元产生神经活动^[7].

1.1 光解笼锁

笼锁化合物是一类功能被屏蔽的生物活性分子, 其全称为光致不稳定笼锁化合物. 该物质一旦吸收特定波长的光子, 分子结构就发生改变, 释放出活性分子, 这一光活化过程称为光解笼锁. 笼锁化合物的种类很多, 主要包括第二信使、核苷酸、神经递质、钙离子等. 一种理想的笼锁神经递质具备以下特性: a. 具有热稳定性, 尤其不能水解; b. 光解释放快速高效, 能满足突触事件对递质释放的时间 (ms) 和浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 需求; c. 笼锁物质、反应中间产物以及光分解的副产物均应完全惰性, 且对递质的受体、转运体和释放的递质代谢等没有影响.

常用的笼锁神经递质有笼锁谷氨酸和笼锁 γ -氨基丁酸. 早期合成的笼锁谷氨酸(如 N-1-(2-nitrophenyl) ethoxycarbonyl-L-glutamate)因无法满足上述条件, 未能得到广泛应用. 目前神经科学研究中常用的笼锁谷氨酸 MNI-Glu (4-methoxy-7-nitroindoliny-l-glutamate)是 2001 年 Canepari 等^[8]合成的. 笼锁 γ -氨基丁酸(如 NI-caged GABA)的工作原理与笼锁谷氨酸类似, 吸收特定波长光子释放出活性 γ -氨基丁酸发挥作用. 本文以 MNI-Glu 为例对笼锁化合物进行简介.

MNI-Glu 的活化光谱范围为 300~380 nm, 最大活化波长约为 355 nm. 实验通常采用紫外激光或氙灯配合适当的滤光片进行光解笼锁^[9]. 光活化释放活性谷氨酸的量取决于激发光的强度、激发体积以及笼锁谷氨酸的浓度等. 该方法空间精度取决于光源类型、激发光的波长、物镜倍数及数值孔径等, 时间精度依赖于激发光的波长、强度以及系统的光束控制能力等. MNI-Glu 的光活化过程如下式所示:



光解笼锁释放的活性谷氨酸可与各种谷氨酸受体结合引起细胞响应, 如图 1 所示, MNI-Glu 光解笼锁释放的谷氨酸激活神经元树突上的谷氨酸受体

引起神经活动. MNI-Glu 满足上述理想笼锁神经递质的所有必要条件^[4]. 首先, MNI-Glu 的热稳定性好, 在生理 pH 下几乎不发生水解, 即使在 pH 值为 12 和温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 环境下其半衰期仍大于 6 h. 其次, MNI-Glu 光分解速度大于 3 000 s^{-1} , 在氙灯闪烁光分解中, AMPA 受体(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, 谷氨酸受体的一种)介导电流的上升时间小于 1 ms. 此外, MNI-Glu、光分解副产物对谷氨酸受体没有拮抗和激动作用, 而且光解笼锁释放的谷氨酸介导的电流与内源性谷氨酸介导的电流形状完全一致.

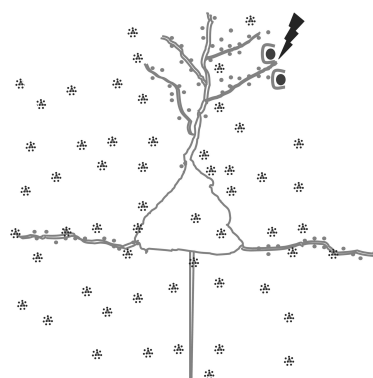


Fig. 1 Optical activation of neural activities via uncaging of MNI-Glu

图 1 光解笼锁 MNI-Glu 诱导神经活动

⚡ : 神经元; * : MNI-Glu; ○ : 谷氨酸; ⚡ : 解笼锁激光.

1.2 光敏感蛋白

光敏感蛋白(light-sensitive proteins)是光活化膜蛋白的统称, 广泛分布于原核生物、植物以及动物的视觉系统中. 目前用于神经科学研究的光敏感蛋白主要为 Channelrhodopsin-2(ChR2)和 Natronomonas pharaonis halorhodopsins(NpHR)两种.

ChR2 是从单细胞绿色藻类 *Chlamydomonas reinhardtii* 上分离出来的一种感光性蛋白质. 其 N 端的 315 个氨基酸残基高度保守, 组成 7 个跨膜螺旋构成了一个光门控的阳离子通道. ChR2 的光活化光谱在 350~550 nm 范围内(中心波长为 470 nm). 表达 ChR2 的细胞在此波段的光照下, ChR2 通道打开, Na^+ , Ca^{2+} 等进入胞内, 产生一内向电流, 引起细胞去极化产生动作电位. ChR2 的响应速度非常快, 光刺激后 50 μs 内即记录到光介导的电流^[9]. 2005 年, Boyden 等^[10]将 ChR2 表达于哺乳动物神经元的细胞膜上, 用于神经活动的光活化.

NpHR 是从一种嗜盐古细菌 *Natronomonas pharaonis* 上分离出来的光驱动氯泵, 其分子结构与 ChR2 类似, 包含一个 7 次跨膜螺旋结构. NpHR 的光活化光谱为 525~650 nm(中心波长为 578 nm). 表达 NpHR 的哺乳动物细胞在该波段光照射下启动氯泵, 胞内氯离子浓度增高产生超极化反应. 光照射表达 NpHR 的细胞引起的光电流出现和消失的时间分别为 68 ms 和 73 ms. 2007 年, 斯坦福大学的 Zhang 等^[9]和麻省理工大学 Han 等^[10]同时将 NpHR 表达于神经元上, 用于神经活动的光抑制. 由于 ChR2 和 NpHR 的光活化谱较少重叠, 如图 2 所示, 这两种蛋白质被联合用于双向控制神经活动^[10]. ChR2/NpHR 体系的时间精度依赖于系统对光束的控制能力以及激发波长和强度等, 而空间精度则与刺激光的波长、光激发体积以及该体系在细胞上的表达量等有关.

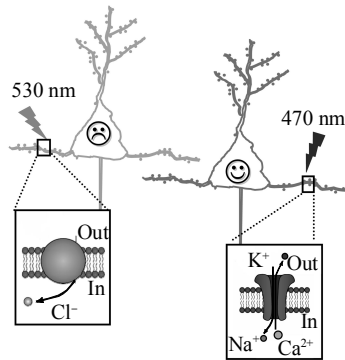


Fig. 2 Optical modulation of neural activities via ChR2 and NpHR

图 2 光活化光敏感蛋白调控神经活动

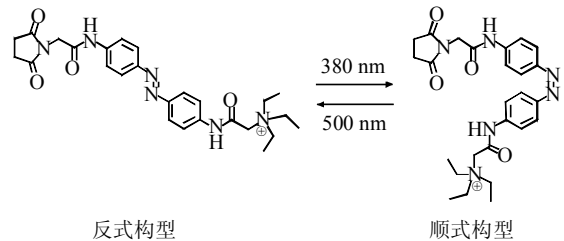
☉: 表达 ChR2 的神经元; ☹: 表达 NpHR 的神经元; ☐: ChR2; ☐: NpHR; ⚡: 530/470 nm 光照.

此外, Rhodopsin 4(RO4)是另外一种被用于抑制神经活动的光敏感蛋白. 将该蛋白质与 G- 蛋白偶联, 当波长 355 nm 的光照表达 RO4 蛋白的细胞时, 产生 G- 蛋白偶联的抑制效应^[11]. 由于光电流出现和消失的时间延迟较长, 即电流出现时刻较光照开始时刻延长约 300 ms, 电流消失时刻较光照停止时刻延迟约 6 s^[11], 因此 RO4 应用较少.

1.3 光开关蛋白

光开关蛋白(light-switchable protein)是一类连接有偶氮苯基团(azobenzene)的离子通道或者受体. 偶氮苯基团具有光致异构效应, 500 nm/380 nm 波长的光照射下, 会发生顺式(臂长约 1 nm)和反式(臂长约 1.7 nm)之间异构转化, 即基团臂长发生改变^[6]. 将偶氮苯基团与受体或离子通道的功能域

共价结合, 即可通过光照射改变基团的臂长来控制光开关蛋白中配体与受体的结合与解离或者通道的开放与关闭. 偶氮苯基团光致异构效应如下式所示:



目前用于神经科学研究的光开关蛋白有钾通道(synthetic photoisomerizable azobenzene-regulated K⁺, SPARK)、离子型谷氨酸受体 LiGluR 等. 2004 年, Banghart 等^[12]将偶氮苯基团连接在 Shaker 钾通道上构建出一种光开关的钾通道(synthetic photoisomerizable azobenzene-regulated K⁺, SPARK). SPARK 通道光控神经活动的原理如图 3 所示, 在波长为 500 nm 的光照下, 偶氮苯基团呈反式, 其臂长约为 1.7 nm, Shaker 钾通道的孔道封闭. 在 380 nm 光照下, 偶氮苯基团转为顺式, 偶氮苯基团的臂长只有 1 nm, Shaker 孔道打开, 钾离子顺着浓度梯度流到细胞外, 引起细胞超极化. 2005 年, Volgraf 等^[13]将偶氮苯基团连接谷氨酸受体上构建出一种光控离子型谷氨酸受体(LiGluR). LiGluR 的工作原理与 SPARK 类似. 500 nm 光照下, 与偶氮苯基团臂连接的受体激动剂因与受体活性部位距离太远而不能结合, 通道无法打开. 380 nm 光照下, 激动剂与受体活性部位结合, 通道开放, 细胞产生去极化效应. 此外, 2005 年美国耶鲁大学 Lima 等^[13]还构建了一种光开关的 P2X 受体(ATP 受体).

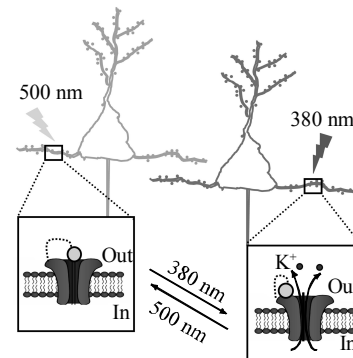


Fig. 3 Modulation of neural activities via photoisomerization of SPARK

图 3 光活化 SPARK 调控神经活动

☉: 神经元; ☐: 孔道封闭; ☐: 孔道开放; ⚡: 500/380 nm 光照.

1.4 激光直接刺激

激光直接照射神经细胞能够诱导神经活动。Fork 用 488 nm 的激光聚焦到海兔的神经节细胞时，记录到细胞产生电活动。2002 年，Yuste 等用高强度的锁模飞秒激光直接刺激锥体神经元，诱导细胞去极化产生动作电位^[7]。光刺激诱导神经细胞产生的响应依赖于激光聚焦的部位以及激光波长和平均功率、锁模状态等。激光直接刺激诱导神经活动，如图 4 所示，其机制可能与激光诱导内源性细

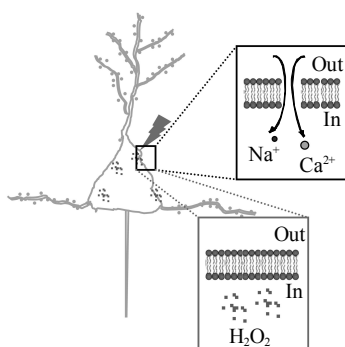


Fig. 4 Activation of neural activity via photonstimulation

图 4 激光直接刺激诱导神经活动

⚡: 光照; Na^+ , Ca^{2+} : 细胞膜光穿孔; H_2O_2 : 氧合作用。

胞色素产生氧自由基以及光诱导内质网的钙库释放、细胞膜光穿孔引起阳离子内流等效应有关^[4]。当刺激激光能量较低时引起细胞产生生化反应：作用于细胞内产生活性氧自由基，引起生理和病理改变；作用于细胞膜引起化学键断裂和分子重排等。当激光能量较高时，光刺激主要引起的是物理化学变化：当聚焦在细胞膜结构上的飞秒激光功率密度达到 10^{11} W/cm^2 时产生光致穿孔现象，引起胞外的钙离子内流或者内质网中游离钙的释放。

1.5 光控制神经活动方法比较

光控制神经活动只需要对光束进行时间和空间上的精确控制就可以实现神经活动的调控，4 类光控制方法的技术参数对比如表 1 所示^[9]。从表 1 中可知光敏感蛋白和光开关蛋白方法均是通过基因靶向标定细胞，可以构建转基因动物进行在体研究。光敏感蛋白和直接刺激方法则不需要添加任何外源底物，直接用光照进行神经活动控制。

Table 1 Parameters of optical control methods

表 1 光控制方法主要参数

光控制方法	膜电位变化	活化波长 /nm	时间精度 /ms	空间分辨率 / μm	外源化合物	参考文献
光解笼锁 (MNI-Glu)	去极化	355	< 1	~ 1	MNI-Glu	[4, 9]
光敏感蛋白 (ChR2)	去极化	480	1~ 3	~ 1	-	[3, 5, 9]
光开关蛋白 (LiGluR)	去极化	380/500	100	~ 1	受体激动剂	[6, 9]
激光直接刺激	去极化	800	30	~ 1	-	[7]

4 种光控制方法各有其特点和适用范围。光解笼锁方法容易控制加药浓度，适用于培养神经细胞和脑片的实验，但需要添加笼锁化合物而难于活体动物的研究。光敏感蛋白具有基因靶向性，可以选择性表达于特定类型细胞上，适于进行活体动物神经活动的研究，但该方法的应用需要进行细胞的转染或构建转基因动物。光开关蛋白同样可以通过基因手段表达于特定的神经细胞，用于活体动物神经活动的研究，但应用该方法不仅需要表达光开关蛋白，还需要添加偶氮苯基团。激光直接刺激方法不需要添加外源底物，但该方法诱导神经活动的机制尚不完全清楚。

2 光控制神经活动的主要应用

光控制方法具有操作简单、非接触、高时空分辨、可定量重复等优势，已被初步用于神经可塑性、神经信息整合、神经网络结构、神经病理学及动物行为学等神经科学研究中。下面以几个代表性研究为例对光控制方法在神经科学中的应用进行简单介绍。

2.1 神经可塑性研究

光控制神经活动的重要应用之一是突触可塑性研究^[15]。大脑皮层锥体神经元的突触可塑性一直被

认为是大脑学习和记忆的基础, 在单个树突棘水平是否存在可塑性仍不清楚. 2004年, Matsuzaki 等^[15]应用笼锁谷氨酸在脑片上研究单个树突棘突触可塑性. 在对单个树突棘周围的笼锁谷氨酸进行反复光活化后, 同样光照引起的电流增大, 并且伴随着树突棘的体积持续性增大, 这是首次证实单个树突棘水平存在突触可塑性. 海马体 CA3 区到 CA1 区的 Schaffer 侧枝是突触可塑性研究中最常用的神经回路之一. Zhang 等将光敏感蛋白用于 CA3 区到 CA1 区投射神经突触可塑性的研究. 他们将光敏感蛋白 ChR2 特异性表达于突触前 CA3 区的锥体神经元上, 用波长 470 nm 的激光照射 CA3 区神经元的轴突末端, 同时记录 CA1 区锥体神经元的响应电流. 反复光照后, 同样的光脉冲诱导的 CA1 区神经元的电流幅度增大, 该实验同样证实光活化诱导出长时程增强现象.

2.2 神经信息整合研究

神经元树突信号计算和整合的研究是光控制神经活动的另一种突出应用^[16]. 神经元的树突具有强大的运算能力, 空间分布不规则的树突分支、受体和电压门控的通道均与树突信息整合和突触可塑性中的各种法则有关. Andresen 等对笼锁谷氨酸进行不同时空模式光解笼锁来研究树突的信号整合机制, 结果发现同一个树突具有两种信息整合模式. 树突对时间间隔在 10~100 ms 之内非同步输入信号进行线性整合, 而对同步输入信号进行超线性整合. 空间信息对非同步信号的整合影响较小, 但对同步信号的整合影响显著, 当输入的同步信号集中在 20 μm 范围内时, 在树突上可记录到一个大幅度的超线性整合局部电流, 而当这些同步信号在空间分布较分散时, 超线性程度降低甚至消失^[16]. 光控制方法具有非接触、可定量重复等优势, 便于模拟各种模式生理信息, 因此将会在树突的信息运算与整合研究中发挥重要作用.

2.3 神经回路图谱研究

Arenkiel 等^[17]用 ChR2-YFP 融合蛋白进行在体神经回路的活化及图谱绘制. 他们以中枢神经系统表达 ChR2-YFP 的转基因小鼠的嗅球和梨状皮层为研究对象, 根据被照射神经细胞的分布和响应细胞的分布来绘制神经连接的结构图谱. 结果发现, 单个僧帽状细胞对光照发放动作电位, 增加光照射嗅球的面积时, 激活的嗅小球数目增加, 皮层细胞的活动也随之增加. 这些实验结果支持嗅觉处理的一个模型, 即嗅觉处理依赖于僧帽状细胞向皮层细胞

信息的集中与整合. 这一结果不仅展示了一种可以利用光对无损哺乳动物的大脑进行神经回路精确操作的新体系, 并且证实了 ChR2 转基因小鼠在探索复杂神经回路功能连接中的作用. Farber 等则采用光直接刺激的方式绘制神经元输入图谱. 他们采用电压敏感的荧光染料标记水蛭的神经元, 记录一个神经元电响应信号时, 依次采用激光刺激激活其他多个神经元, 成功绘制出记录细胞的输入图谱.

2.4 神经病理学研究

光控制神经活动还被用于神经病理学研究和疾病的治疗^[18]. 正常动物的视神经节细胞自身没有光敏感特性, 其功能是接受光敏感细胞(视锥细胞和视杆细胞)的光信号输入, 将其转变成电信号并上传至视皮层. 视网膜退行性疾病会引起正常光敏感细胞的死亡, 导致视网膜对光反应消失. Bi 等将 ChR2 表达于遗传性的失明模型动物(光敏感细胞缺失)视网膜的视神经节细胞上, 使其转变成光敏感细胞. 表达 ChR2 的视神经节细胞可以被 470 nm 光照激活, 并将光信号编码转变成电信号传入视皮层, 引起视觉高级中枢的响应. 在视皮层记录到光照引起视皮层的神经活动, 表明失明小鼠对光反应的建立. ChR2 表达于视网膜的视神经节细胞是视锥细胞和视杆细胞发生退行性病变动物复明的一种可能策略.

2.5 动物行为学研究

由于光敏感蛋白和光开关蛋白具有基因靶标的优势, 因此被用于动物行为学研究^[19]. 体感皮层表达光敏感蛋白 ChR2 的转基因小鼠被用于学习行为的研究. Huer 等^[19]采用胚胎电转染技术, 将 ChR2 特异地表达于小鼠桶状皮层 II/III 层锥体神经元细胞膜上. 采用发光二极管(470 nm, 11.6 mW)对小鼠桶状皮层的神经元进行照射, 同时结合奖励进行学习行为训练: 当有光照时, 小鼠向左运动, 可以得到一滴水喝, 作为正确识别的奖励; 而当没有光照时, 小鼠向右运动, 也得到一滴水喝, 是对正确否定的奖励, 其余情况没有水喝. 训练后的小鼠行为正确比例与照射光强的相关性很强, 证实光控制神经活动可用于动物学习行为的建立与研究. 2005年, 美国耶鲁大学的 Lima 等^[19]构建一种光开关的 P2X 受体用于遥控果蝇爬行、跳跃或飞行等行为. 在 ATP 存在时, 紫外线激光照射果蝇, 激活连接光开关的 P2X 受体. 实验显示, 将该受体表达在控制果蝇爬行的多巴胺能神经元上, 本来懒散的果蝇在光照下变得非常活跃, 而将该受体表达在控制

果蝇逃跑反应的大神经元上时,光照则会使果蝇展翅飞走。

3 光控制神经活动的发展趋势

对清醒动物神经活动进行研究是当前神经科学的发展趋势。几乎所有机体感觉和运动都是由神经回路对信息的动态编码完成,神经回路信息处理机制是研究热点。由于缺少合适的技术手段,活体动物的各种神经细胞在神经回路信息处理中的贡献还不清楚,与行为相关的神经回路活动机制研究更是停滞不前。光控制神经活动技术将在这一研究领域发挥重要作用。同时,为应对这一挑战,需要发展新的光活性物质,并研发快速有效的光束控制技术。

光活性物质的发展方向是提高光活化速率、效率与稳定性,并将激发光谱向长波段(红外波段)推进。2007年,Graham等合成的笼锁谷氨酸(4-carboxymethoxy-5,7-dinitroindolyl glutamate, CDNI-Glu)量子释放效率更高、光响应时间更短^[20],因此较MNI-Glu更为有效。同时,由于近红外激光能够对CDNI-Glu光解笼锁释放出活性谷氨酸,因此该光活性物质也将更适用于活体动物和厚组织的研究。

光束控制技术的改进包括扫描方式的改进和刺激仪器的光纤化。目前多点扫描多采用机械式顺序扫描模式,由于机械惯性限制了扫描点间的切换速度,在模拟再现生理信号时表现出很大的局限性。Bullen等利用声光偏转器实现了单波长激光的无惯性快速扫描,能够在扫描范围内对光束进行离散点间的随机控制。Shoham等^[21]采用声光偏转器控制紫外激光,1 ms内可对20个不连续位点进行准同步光活化。而飞秒激光声光扫描理论与技术的最新进展使得可用飞秒激光进行多点快速的光控制,其时间精度达到10 μs/点^[22],比机械扫描方式的1 ms/点提高了两个数量级。三维随机扫描可用于实现快速的三维刺激,多焦点激发技术^[23]等则可实现多点同步刺激,而飞秒激光声光可调谐滤波技术则可用于快速活化和观测。

仪器的微型化、光纤化便于在活体动物研究中进行光控制。光子晶体光纤、成像光纤束等光纤成像核心器件发生了质的飞跃,光纤的集成度、数值孔径等重要指标显著提高。光纤多光子内窥显微成像技术取得了重要进展。双光子荧光显微镜的发明人Denk等将光纤化系统用于自由运动小鼠神经

活动的成像研究。斯坦福大学的Aravanis等^[24]结合光敏感蛋白遗传技术和光纤显微技术建立了一种光-神经活动控制界面,并初步用于啮齿类动物运动行为的控制。这种光纤化仪器用于与行为相关的神经回路活动机制的研究,具有广泛的应用前景,给出了技术发展的方向。

参 考 文 献

- 1 Nagayama S, Zeng S, Xiong W, *et al.* *In vivo* simultaneous tracing and Ca²⁺ imaging of local neuronal circuits. *Neuron*, 2007, **53**(6): 1~15
- 2 Fork R L. Laser stimulation of nerve cells in *Aplysia*. *Science*, 1971, **171**(3974): 907~908
- 3 Zhang F, Wang L P, Braunder M, *et al.* Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 2007, **446**(7136): 633~639
- 4 Canepari M, Nelson L, Papageorgiou G, *et al.* Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolyl- and 4-methoxy-7-nitroindolyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters. *J Neurosci Methods*, 2001, **112**(1): 29~42
- 5 Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, *et al.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(9): 1263~1268
- 6 Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, *et al.* Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol*, 2006, **2**(1): 47~52
- 7 Hirase H, Nikolenko V, Goldberg J H, *et al.* Multiphoton stimulation of neurons. *J Neurobiol*, 2002, **51**(3): 237~247
- 8 Ghezzi D, Menegon A, Pedrocchi A, *et al.* A micro-electrode array device coupled to a laser-based system for the local stimulation of neurons by optical release of glutamate. *J Neurosci Methods*, 2008, **175**(1): 70~78
- 9 Zhang F, Wang L P, Boyden E S, *et al.* Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 785~792
- 10 Han X, Boyden E S. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS ONE*, 2007, **2**(3): e299
- 11 Li X, Gutierrez D V, Hanson M G, *et al.* Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green *algae channelrhodopsin*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(49): 17816~17821
- 12 Banghart M, Borges K, Isacoff E, *et al.* Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci*, 2004, **7**(12): 1381~1386
- 13 Lima S Q, Miesenböck G. Remote control of behavior resource through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell*, 2005, **121**(1): 141~152
- 14 Watanabe W, Matsunaga S, Fukui K, *et al.* Intracellular manipulation by femtosecond lasers: review. *J Innovative Optical Health Sciences*, 2009, **2**(1): 1~8
- 15 Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies G C R, *et al.* Structural basis

- of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 2004, **429**(6993): 761~766
- 16 Gasparini S, Magee J C. State-dependent dendritic computation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 2006, **26** (7): 2088~2100
- 17 Arenkiel B R, Peca J, Davison I G, *et al.* *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*, 2007, **54**(2): 205~218
- 18 Bi A, Cui J, Ma Y P, *et al.* Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 2006, **50**(1): 23~33
- 19 Huer D, Petreanu L, Ghitani N, *et al.* Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature*, 2008, **451**(7174): 61~66
- 20 Ellis-Davies G C R, Matsuzaki M, Paukert M, *et al.* 4-carboxymethoxy-5,7-dinitroindolyl-glu: an improved caged glutamate for expeditious ultraviolet and two-photon photolysis in brain slices. *J Neurosci*, 2007, **27**(25): 6601~6604
- 21 Shoham S, O'Connor D H, Sarkisov D V, *et al.* Rapid neurotransmitter uncaging in spatially defined patterns. *Nat Methods*, 2005, **2**(11): 837~843
- 22 Iyer V, Hoogland T, Saggau P. Fast functional imaging of single neurons using random-access multiphoton (RAMP) microscopy. *J Neurophysiol*, 2006, **95**(1): 535~545
- 23 Qu J, Liu L, Chen D, *et al.* Temporally and spectrally resolved sampling imaging with a specially designed streak camera. *Opt Lett*, 2006, **31**(3): 368~370
- 24 Aravanis A M, Wang L P, Zhang F, *et al.* An optical neural interface: *in vivo* control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng*, 2007, **4**(3): S143~156

Recent Progress in Controlling Neural Activity With Light*

LIU Xiu-Li, ZHOU Wei, ZENG Shao-Qun**

(Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Neural activity is a process of induction and propagation of neural excitability, clarifying whose mechanism is one of the basic goals of modern neuroscience. It is necessary to manipulate, stimulate or silence specific sets of neurons, when determine their role in brain function, and to achieve this goal with light is a new approach to control neural activities. Photostimulation techniques have been achieved through four approaches: light-mediated uncaging of chemically modified signaling molecules, excitation of light-sensitive proteins introduced into neurons, chemical modification of ion channels and receptors to render them light-responsive, and optical stimulation of neurons. Optical controlling of neural activity proves to be noninvasive, noncontact, and easy to repeat, which has been harnessed to rapidly activate or silence neurons. This optical control allows precise, millisecond control of neural circuits, which possesses a wide application prospect in fields of the foundation and clinical neuroscience. Here it the principles and applications of these optical controlling methods were reviewed, and their development trends in technical improvements and applications were discussed.

Key words caged compounds, light-sensitive proteins, light-switchable proteins, optical stimulation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00263

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30727002, 30700215) and The Programme of Introducing Talents of Discipline to Universities.

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87792033, E-mail: sqzeng@mail.hust.edu.cn

Received: April 24, 2009 Accepted: August 3, 2009