



体外培养的神经网络可塑性*

邵琪 孟维伟 李晓红 邵文威**

(天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300072)

摘要 神经网络是大脑执行高级认知行为的结构基础, 研究证明学习记忆及神经退行性疾病与神经网络可塑性密切相关。因此, 揭示调控和改变神经网络可塑性的机制对理解神经系统信息交互以及疾病治疗具有重大意义。目前, 基于微电极阵列 (microelectrode array, MEA) 培养的神经网络是体外探究学习和记忆机制的理想模型, 同时针对该模型的研究为预防和治疗神经退行性疾病提供了独特的视角。本文综述了基于MEA采集体外培养神经网络的放电信号来构建功能网络的相关研究, 分别从二维神经网络和三维脑类器官发育, 以及开环和闭环电刺激对神经网络可塑性影响的角度, 总结了体外培养神经网络可塑性的相关研究, 最后对该方向的应用前景进行了展望。

关键词 微电极阵列, 可塑性, 功能网络, 发育, 电刺激调控

中图分类号 Q819

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0216

神经网络可塑性是指神经网络在神经元活动的影响下, 增强或减弱神经元之间的突触连接关系, 从而重构神经网络的现象, 被证明是大脑学习、记忆存储及适应环境等高级认知功能的基础^[1-3]。因此, 研究神经网络可塑性可增进对大脑信息处理及工作机制的理解, 对治疗神经系统疾病具有重要的指导意义。目前评估神经网络可塑性手段有两种: a. 使用显微镜、免疫荧光标记直接观测体外神经网络结构连接形态, 或者采用结构和扩散核磁共振成像技术构建大脑结构网络连接模式; b. 计算来自不同神经元的放电活动之间的相关性来反映功能连接的变化^[4-5]。由于体外直接观测方法存在显微镜分辨率以及荧光标记特异性等限制因素, 并且核磁共振成像技术因其技术局限不能准确构建大脑结构网络, 所以从功能连接角度评估神经网络可塑性的发生是在体和体外广泛使用的方法^[6-7]。

研究者目前主要从在体和体外两种方式开展对神经网络可塑性的研究。对于在体研究, 研究者借助侵入式和非侵入式技术采集和记录人类和动物大脑的活动数据, 分析学习和记忆过程中不同脑区的活动和连接模式的变化, 揭示神经网络可塑性在行为学习及记忆中的作用^[8-10]。但由于在体神经系统结构的复杂性, 侵入式电极采集到的神经元电

生理活动数据受外界环境干扰及人或动物呼吸、动作等的影响较大, 数据质量难以保证, 同时面临实验操作难度大、对脑区产生损伤和伦理等问题^[6, 11]。使用非侵入式的头皮脑电分析大脑活动变化属于对神经信号的间接测量, 难以反映真实的神经信号, 且脑电活动的个体间差异较大, 难以得到具备普适性的结论^[7, 12]。而体外主要采用脑片和离体神经网络探究神经网络的可塑性。脑片与在体大脑有相似的结构特性, 具备在体神经网络结构且易于对神经活动信号直接测量, 但脑片的神经元结构致密, 实验数据受到切片质量的影响, 缺乏稳定性, 限制了对神经网络可塑性的进一步研究^[13]。为解决上述方案存在的难以测量和实验数据不稳定的问题, 大量研究者采用体外培养神经网络作为神经网络可塑性的研究对象。体外培养神经网络包括二维 (2D) 神经网络和三维 (3D) 脑类器官, 2D神经网络结构简单, 培养周期短, 且被证明具有学习、记忆和初步智能行为^[1]。而3D脑类器官被证明具备与人脑相似的复

* 国家重点研发计划 (2021YFF1200800), 国家自然科学基金 (82171861, 81971782, 82101853) 和天津市科技计划 (20JCZDJC00780) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18322260753, E-mail: wenwei.shao@tju.edu.cn

收稿日期: 2023-06-02, 接受日期: 2023-09-28

杂结构组织,是探究人脑信息交互及工作机制的理想模型^[14-15]。体外培养神经网络具有可大批量培养、易于精确控制实验条件、采集信号干扰小的优势,虽然结构简单,但具有自组织特性,成为当下研究神经网络可塑性的重要实验对象^[11, 13]。

对于体外神经网络的信息输入与信号采集问题,研究者主要采用微电极阵列(microelectrode array, MEA)系统作为体外神经网络信号实时采集和记录以及与外界信息输入的媒介,该系统可实现多位点、高时空分辨率、非侵入无损长时间记录神经元电生理活动,具备易于操作和使用等优点^[16],是目前研究离体条件下神经网络可塑性以及表征网络动力学的前沿技术^[17]。该类技术的发展使得探究复杂高维神经网络可塑性(例如,皮层和海马^[18-19])受发育状态、电刺激^[20-21]、药理调控^[22]的影响成为可能。

本文以采集体外培养神经网络的放电信号来构建功能网络角度,综述了体外培养神经网络可塑性的相关研究。首先介绍了网络可塑性的定义、类型及机理;第二部分综述了探究神经元发育对可塑性影响的相关研究;第三部分综述了电刺激调控对可塑性影响的相关研究;最后结合当前研究现状,对该领域未来可能的方向及应用前景进行总结和展望。

1 神经网络可塑性

神经元是神经网络最基本的结构和功能单位,而突触是支撑神经元间信息传递的关键结构(图1a)。神经元间通过放电活动调整突触连接关系,即突触可塑性^[23]。突触可塑性是神经网络可塑性的基础,而神经网络可塑性依赖于突触可塑性形成适应输入信息的动态结构,将时间信息转换和存储在突触修饰的空间分布模式中^[24],被认为与学习和记忆密切相关,是神经科学领域研究的热点之一。

研究表明,突触连接关系的增强或减弱导致结构和功能变化与激活谷氨酸型突触受体以及突触后 Ca^{2+} 浓度升高等神经生物学变化相关^[25-26]。依据突触可塑性发生后产生的不同现象,可以将突触可塑性分为赫布定律可塑性以及稳态可塑性^[27]。赫布定律表明,被重复激活的两个神经元将强化彼此之间的连接关系^[25, 28]。赫布定律可塑性根据突触功能可塑性变化性能不同分为锋电位时间依赖可塑性(spike timing-dependent plasticity, STDP)^[29]、长时程增强(long term potentiation, LTP)和长时程抑制(long term depression, LTD)现象^[27, 30](图1c)3种。严格依赖于突触前和突触后神经元先后放电顺序以及因果传输关系的突触强度变化过程被称为STDP,图1b展示了参与诱导依赖于STDP的

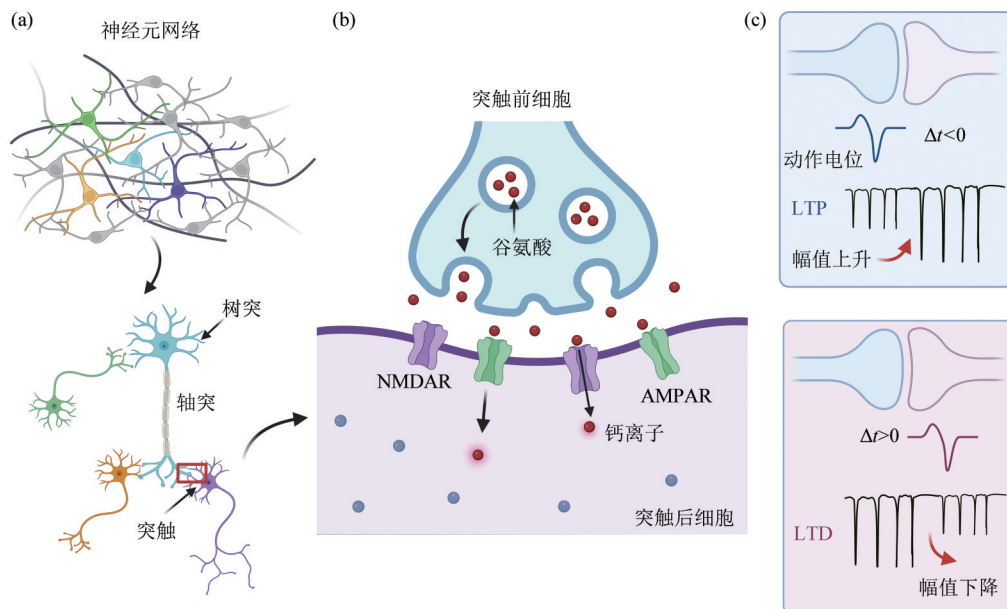


Fig. 1 Neuronal networks and synaptic plasticity

图1 神经网络及突触可塑性

(a) 神经网络以及神经元结构; (b) STDP神经通路, N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体, α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)受体; (c) 长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)示意图(使用BioRender.com绘制)。

信号通路。LTP指的是对突触前神经元施加高频刺激或施加低频并诱导突触后神经元产生较大的去极化幅值变化 (>30 mV), 且突触前神经元较突触后神经元早大约 20 ms 响应的现象^[26]。LTD指的是单独施加低频刺激或诱导突触后产生较小的去极化幅值变化, 且突触后早于突触前出现动作电位的现象^[23, 31]。LTP 以及 LTD 现象是目前公认的网络学习与记忆的基础^[13, 27]。由于赫布定律对神经网络的调控是一种正反馈调节过程, 会导致突触前后的过度增强和抑制, 进而引起神经网络功能的紊乱, 因此神经网络存在一种保障功能稳定的突触可塑性调节机制, 即稳态可塑性。稳态可塑性包含神经元兴奋性的调控以及突触强度的稳定, 可以调整神经网络的总体活动水平, 是维持神经网络功能稳定的基础^[27]。

为了表征神经网络可塑性的发生情况, 探究神经网络连接形式的变化是关键, 目前神经网络有两种连接形式: 结构连接和功能连接, 即结构网络和功能网络。若神经元间存在因果连接关系, 则被定义为有效连接, 属于功能连接形式之一^[32]。本文综述了表征体外神经网络功能连接的相关研究, 这类研究借助 MEA 系统采集体外培养神经元放电活动构建功能网络, 利用图论 (分析网络结构变化的数据工具) 从网络层面量化和表征神经网络连接动态变化过程^[33], 及神经网络可塑性的发生。

2 神经元发育对网络可塑性影响的研究进展

神经网络发育是指神经元在生长过程中由独立个体逐渐建立起相互连接的网络结构, 在发育的过程中, 通过神经元放电信号模式表征神经网络的信息传递和处理功能逐渐成熟 (图 2)。因此, 探究神经元发育对网络可塑性的影响具有重要意义, 可以帮助研究者理解人类大脑发育过程网络结构的变化, 对探究神经系统疾病发生机制起到了重要的指导作用。

2.1 2D 神经网络发育过程中网络拓扑结构变化规律

2D 神经网络是指在 2D 平面上与 MEA 耦合培养的神经网络, 是体外研究神经网络发育过程中网络结构变化规律的重要工具。自组织能力是神经网络固有的属性, 体外种植 24 h 后突触可生长约 100 μm ^[34], 且在发育过程中观察到由初始孤

立的神经元重组为复杂神经网络的现象, 类似于体内的拓扑特征复杂化演变的过程。为了揭示发育过程中功能网络复杂化的本质, Kamioka 等^[35]最早基于 MEA 探究了体外皮层神经网络发育时间与放电模式的关系, 发现网络在发育阶段由零散的锋电位逐渐演变为网络同步爆发, 表征神经网络发育成熟。Downes 等^[36]采集了体外神经元发育前 5 周的自发电数据构建功能连通图并借助图论进行分析, 结果表明, 早期的皮层培养物 (体外培养 14 d, DIV14) 网络中节点和连边均较少, 呈现随机连接的稀疏网络形态, 随着发育时间增长 (DIV35), 网络中节点增多, 节点间连接密集, 网络的拓扑特征由随机网络向小世界网络 (具有较高的聚类系数和较短的平均路径长度的网络) 发展。Van Pelt 等^[37]发现, 体外培养神经网络发育和成熟的过程中, 突触连接强度和网络拓扑结构发生改变, 这些变化与网络动力学的变化密切相关。骆清铭团队^[34]在体外培养海马神经网络中也发现了相同的发育规律, 发育不同阶段呈现的活动模式与神经网络的成熟度和连接关系密切相关。Wagenaar 等^[38]发现, 体外培养皮层神经元在发育初始阶段, 发放零散的锋电位 (spike), 随着神经元发育成熟, 放电模式由零散 spike 转变为爆发 (burst) 模式, 以及在网络层面出现多个神经元同时放电活动的同步网络爆发现象^[39], 且该放电模式呈周期稳定性^[34]。由此可见, 神经网络物理形态连接结构与时空放电动力学变化存在紧密的相互促进作用^[40]。Teller 等^[41]在研究体外培养神经网络发育过程中网络爆发对拓扑结构的影响时, 使用神经元自发 burst 构建功能网络拓扑结构, 发现神经网络进行信息交互的固有连接模式呈现出分离和聚集相协调的特点, 即局部呈现高度模块化的特征, 全局表现为多个局部模块通过较稀疏的网络形成整体协调连接。Schroeter 等^[42]证明, 前 4 周体外培养神经网络的功能网络连接强度、密度均显著增加, 成熟的网络具有模块化和小世界属性 (小世界网络具有的网络结构特征) 等特征。同时, Antonello 等^[43]证明, 体外培养神经网络发育过程中节点倾向于与高度节点连接, 形成模块化, 提高信息传输速率。

2D 神经网络是研究神经网络发育过程中网络拓扑结构变化规律的重要工具, 以体外培养的 2D 神经网络为研究对象的相关研究表明, 随着 2D 神经网络逐渐发育成熟, 其功能连接模式从

稀疏无序逐渐发展为多模块协调的高度组织的连接模式, 这些研究能更好地理解体外神经网络发育过程中的动态变化过程。

2.2 3D脑类器官发育过程中网络拓扑结构变化规律

基于体外培养2D神经网络研究网络拓扑结构的变化存在两个弱点, 即缺乏空间分离(模块化)和3D拓扑结构^[44]。而3D脑类器官是指体外培养具有体内脑组织特性的3D神经网络结构的类器官, 这些脑类器官在3D空间内的发育过程中也会产生网络拓扑结构变化, 展示了脑类器官不同发育时间节点对应的形态^[14, 45]。为了在体外构建模拟大脑的3D模块化组织, 科学工作者起初借助3D打印支架和聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)模型构建3D神经网络^[46-48], 但对于培养类似人脑多样性细胞的类器官研究甚少。随着干细胞技术的发展, 体外培养3D脑类器官慢慢诞生, 并基于MEA采集脑类器官在体外不同发育时期电生理信号, 研究表明, 随着脑类器官发育成熟, 网络结构复杂化, 神经元放电强度、同步性和网络爆发增加^[49], 表明神经元放电活动与网络结构密切相关。Giandomenico等^[50]使用气液界面的方法培养大脑类器官, 通过分析自

发活动构建的功能网络拓扑结构, 发现在远和近距离都有相关性较强的神经元活动, 表明神经元分布和形态是影响3D脑类器官网络拓扑结构的重要因素, 小部分远程连接表明, 遥远区域之间的联系可能是神经元集群之间的联系^[51]。此外, 突触可塑性是引起网络拓扑结构变化的重要因素之一。Sharf等^[52]根据神经元平均放电率构建了不同发育阶段的脑类器官功能网络, 研究表明, 早期5、6个月脑类器官中放电神经元个数较少, 且各神经元之间放电活动不存在相关性, 随着脑类器官发育成熟, 7、8个月时功能网络中连边增多, 连接强度增大, 网络连接更紧密。表明体外培养3D脑类器官发育成熟过程中放电模式多样化, 改变了突触可塑性, 从而影响了神经网络可塑性。使用2D MEA记录3D脑类器官发育过程中网络拓扑结构变化的相关研究表明, 3D脑类器官在发育过程中的神经元放电模式、网络节点及网络密度变化规律与2D体外神经网络具有相似性。而针对3D空间的3D脑类器官网络可塑性仅对神经元放电模式进行了初步探究, 采用植入式针状电极、网状电极从3D空间记录了体外脑类器官电生理信号^[45, 52], 对于更复杂的脑类器官3D功能网络在发育过程中的变化规律目前没有研究。

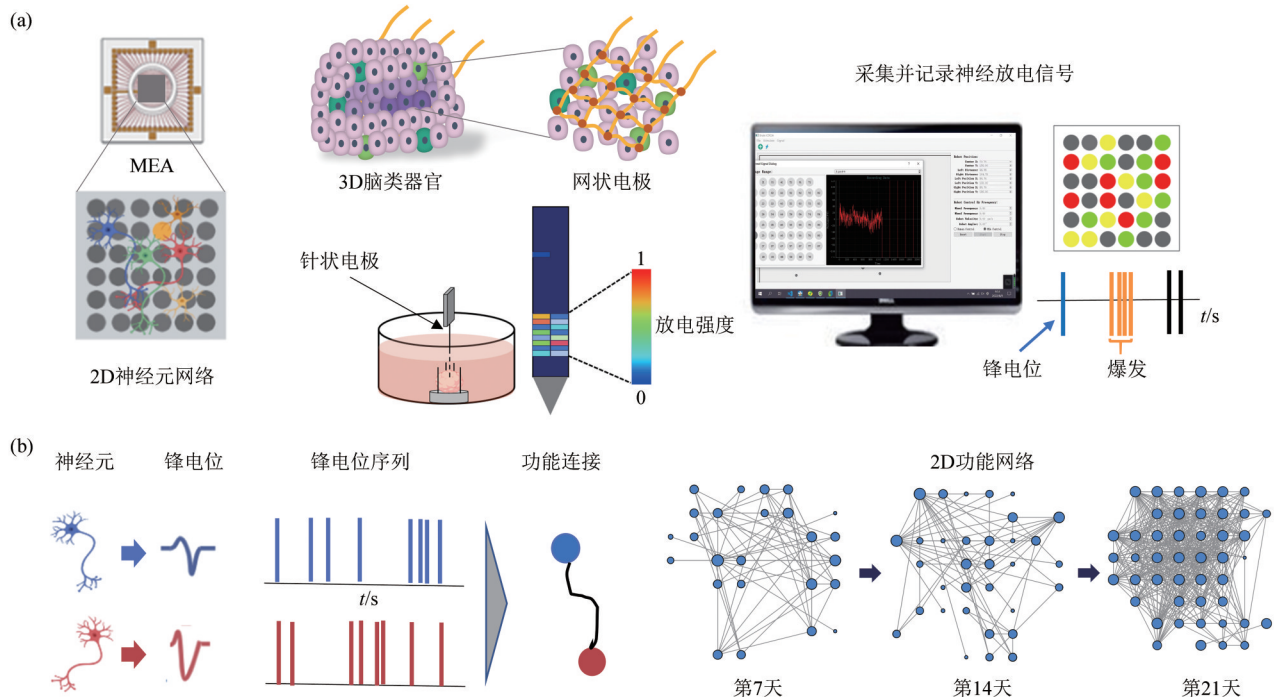


Fig. 2 Changes in the topology of functional networks during the development of neuronal networks

图2 神经网络发育过程中功能网络拓扑结构的变化

(a) 基于2D MEA以及3D网状和针状电极采集神经元电生理信号; (b) 功能网络的构建方法以及发育中功能网络结构变化示意图(使用BioRender.com绘制)。

3 电刺激调控体外培养神经网络

神经网络可塑性不仅受神经元自身发育的内在影响,研究表明,外界电刺激是影响神经网络可塑性的重要因素,对神经网络的形成和功能调节具有重要作用。揭示刺激调控对体外神经网络可塑性的影响规律,对研究神经系统疾病治疗具有积极意义。

3.1 电刺激参数

为了更好地揭示刺激调控对神经系统信息处理和传递的影响机制,对体外培养神经网络模型施加电刺激模拟外界输入的感觉信息,基于MEA系统采集神经元对输入刺激的反馈电信号,从而解码电刺激诱发神经元的活动并分析电刺激对神经网络可塑性的影响。

在探究电刺激诱发网络可塑性的研究中,电刺激参数的选择是实验关键环节,一般包含电压或电流刺激的幅值和频率,电压刺激是体外培养神经网络广泛使用的刺激形式。电压幅值在0.2~1 V之间^[53],对于低频常采用0.02、0.2和1 Hz^[7, 21],高频常采用20 Hz^[40, 54]。电刺激对神经网络可塑性的影响具有复杂性和多样性,不同的刺激参数将诱发不同的网络可塑性。

3.2 开环和闭环电刺激对神经网络拓扑结构的影响

电刺激是诱导网络可塑性的常用方法,分为开环刺激和闭环刺激两种方式。开环刺激是指实验过程中采用固定的刺激参数,不因神经元对刺激响应而调整刺激参数;而闭环刺激是指在刺激过程中实时根据神经元对刺激的响应效果改变刺激参数。图3展示了开闭环电刺激范式对神经网络的影响。

3.2.1 开环电刺激范式

开环电刺激是探究刺激调控对体外神经网络可塑性影响的简单有效的范式。Maeda等^[55]最早发现通过对一个或多个电极加强直(高频)刺激会改变体外培养皮层神经网络可塑性,后续研究证明,强直刺激可诱导神经网络出现LTP和LTD类似大脑皮层的可塑性现象,这两者是表征学习记忆的关键指标^[30]。Gladkov等^[56]基于体外培养海马神经元验证了低频和高频刺激均可诱导功能连接发生显著重构。此外,Chiappalone等^[54]使用强直脉冲刺激(20 Hz)与低频刺激(1 Hz)联合的电刺激实验方案,对MEA上两个独立电极通道分别

施加强直和低频刺激,结果表明,强直和低频联合性刺激范式诱导神经网络可塑性效果最佳,引起的增强作用可持续数小时。Poli等^[40]沿用该刺激范式,发现强直刺激引起功能连接强烈重塑的现象,该现象可能与全局范围的神经网络可塑性有关。电刺激除对网络连接产生影响外,也会改变神经网络的放电模式。Madhavan等^[57]通过分析强直刺激前后网络爆发模式的变化,证明强直刺激可改变神经网络的可塑性并形成动态的信息流,重构的神经网络是支撑信息传递和存储的稳定结构。

除高频刺激可以诱导神经网络可塑性外,低频刺激也被证明是激活体外皮层海马神经网络学习记忆功能的最佳频率^[21]。Jimbo等^[58]证明,多位点电刺激可以改变神经元动力学与空间网络信息传递方向,从而重塑神经网络功能连接关系。Le Feber等^[59]揭示了使用低频电刺激可改变神经网络功能连接的数量和突触效能,从而验证体外培养神经网络具有学习能力,同时揭示了体外培养神经网络具有记忆并行的存储能力^[60]。此外,韩尧^[7]探究了慢性(低频)电刺激对神经网络功能连接模式的影响规律,发现0.02 Hz刺激组和未施加电刺激的对照组中网络密度随发育时间增加而增加,而0.2 Hz刺激组中的网络密度却保持稳定,小世界属性不受刺激频率的影响,这种现象可能和刺激位点顺序有关。

此外,Gao等^[61]采用A β 寡聚体诱导海马神经网络建立了阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的体外病理模型,采用不同幅值结合4 Hz和40 Hz两种刺激频率,探究了电刺激对海马神经网络放电活动的影响,初步探讨了电刺激对AD神经网络的调控作用,为体外调控神经性退行性疾病的神经网络提供了一种新方法。

开环电刺激对神经网络的影响具有复杂性和多样性,需要结合具体的实验和模拟研究来深入探讨。同时,由于开环电刺激并未考虑反馈回路的影响,其效果可能与闭环电刺激存在差异。

3.2.2 闭环电刺激范式

开环电刺激已经被证明可以调控体外神经网络的可塑性,使其具有学习和记忆能力,但对于神经网络的输出反馈信号的含义无法解析。为了使体外神经网络具备一定功能,研究者采用闭环刺激范式训练神经网络,闭环电刺激可根据神经网络状态或任务反馈实时修改刺激参数,从而缩短

训练时间, 使体外神经网络达到训练的目标功能, 具备类似在体神经网络的智能。

Shahaf等^[62]首次通过闭环调控结合奖赏方式在真实的皮层神经元证明, 通过重复刺激训练可以使神经网络的输出信号达到预期响应频率, 表明神经网络的功能连接可以通过电刺激诱导放电活动的方式进行调节, 这种调节使得空间网络连接形态趋于稳定, 可以在特定的时间内达到预期的响应。闭环实验不仅用于研究学习反馈, 还可以控制神经元活动。Wagenaar等^[63]将刺激分布在多个电极上, 通过闭环反馈不断微调刺激强度, 抑制了神经元同步爆发放电模式, 为治疗癫痫疾病提供了新范式。由于神经网络具有高度动态变化特征, 使用简单数学模型难于控制网络活动趋于稳定状态, Wülfing等^[64]使用强化学习模型训练神经网络实现长时间稳定放电活动。

闭环刺激不仅可以实现对神经元放电模式的调控, 研究人员基于编解码技术探讨了任务模式下体外神经网络与外部环境(真实与虚拟环境)之间

的信息交互, 实现体外生物神经网络控制机器人避障^[1, 65]以及打乒乓球游戏^[66]。该功能的实现是基于对不同电极位点输入刺激信息以及解码响应驱动位点信号实现生物神经网络控制任务, 建立生物神经网络感知与运动映射关系, 表明体外神经网络具备感知和处理多样信息的能力, 通过控制刺激输入来调整神经元之间连接权重, 可以使体外培养神经网络短时间内学会控制任务, 有希望以低能耗获得超越人工智能的计算学习能力^[67]。此外, Buccelli等^[68]构建了神经假体模型, 通过闭环调控实现了生物与人工神经网络互相通讯, 将为治疗和恢复脑部损伤提供新颖范式。

基于任务模式下生物神经网络与外部环境之间的信息交互研究表明, 通过闭环电刺激对体外神经网络的影响具有更高的精度和可控性, 可以通过回路反馈对电刺激的响应效果进行调节和控制, 使体外神经网络逐渐适应外界输入的刺激信息, 从而实现对神经网络拓扑结构和功能的精细调节和控制。

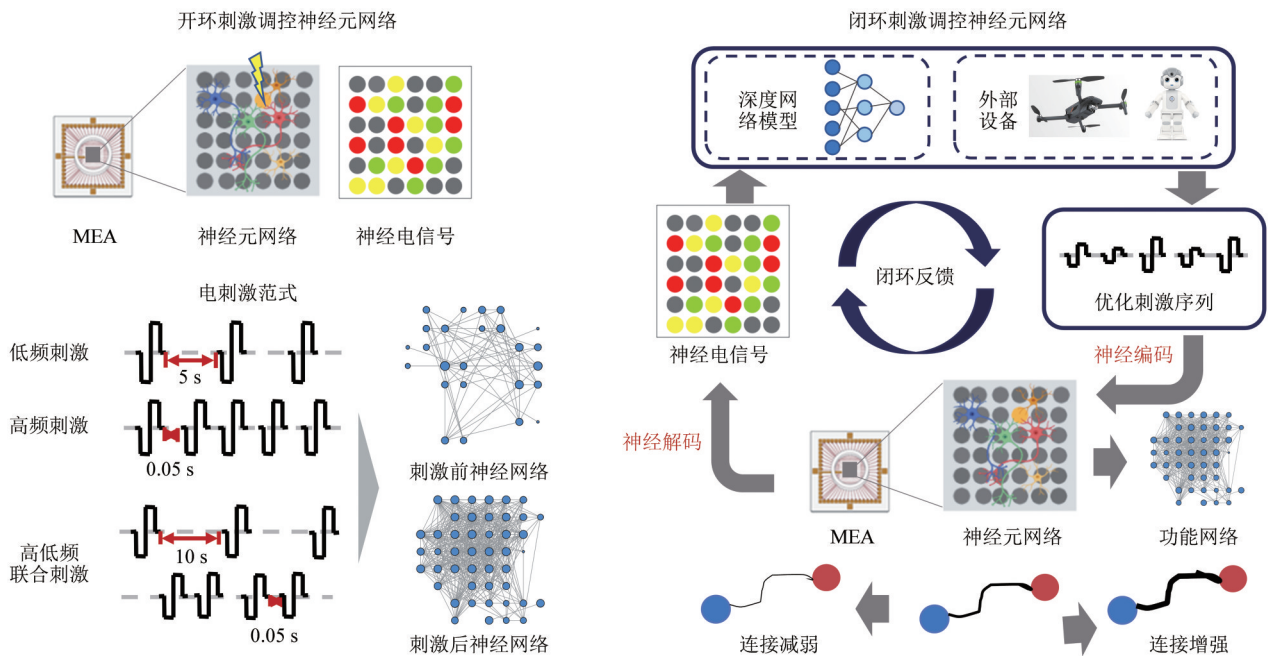


Fig. 3 Open-loop and closed-loop stimulation paradigms modulate neuronal networks

图3 开环与闭环刺激范式调控神经网络

4 总结与展望

基于MEA体外培养的大尺度高度连接的生物神经网络是研究功能神经网络的理想模型, 研

究人员发现了发育过程中会发生神经网络结构演变以及不同电刺激范式会改变神经网络可塑性。本综述系统回顾了本领域的主要研究, 并总结了基于MEA体外培养的神经网络在发育过程中以及

外界电刺激调控神经元功能拓扑结构发生变化的研究进展。在阐述了功能网络可塑性的理论背景下,首先分别从2D体外培养神经网络和新兴3D脑类器官的角度全方面总结了不同发育时间点网络连接变化的特征,其次,总结了不同刺激范式下闭环和开环电刺激对功能神经网络可塑性的影响。结合神经元放电模式和神经网络拓扑结构多角度揭示诱导神经网络功能结构发生改变的背后因素,将会推动以下研究内容的深入挖掘和探索。

a. 模型的复杂和精细化:随着柔性电极的发展,未来研究可以研发更加复杂和精细化的体外神经网络模型,包括3D神经网络和不同类型的神经网络模型。这些模型可以更好地模拟真实神经网络的形态和功能,并提高对神经网络可塑性的研究水平。

b. 神经疾病康复的发展:目前侵入式电刺激是调控神经系统疾病的常用方法,将采集的脑电信号构建功能网络^[69-70]分析发作网络状态。但构建的功能网络是静态数据,无法进行实时更改刺激方案调控。此外,个体差异性较大,无法使用相同的刺激范式进行治疗。而通过体外模拟构建神经退行性疾病模型^[61, 71],测试和验证对治疗退行性疾病网络有效的刺激范式,可以为在体疾病治疗提供参考方案。

c. 人工智能的开发:通过探索体外神经网络可塑性在发育以及刺激调控下的变化,掌握神经元信息交互以及网络架构原理,将推动芯片或类脑计算机设计等前沿科技进展,启发人工智能新理论、新算法和新框架。同时使用人工智能技术来辅助分析和预测神经网络的结构和功能,可以更好地理解神经网络可塑性的机制和规律,提升生物智能可解释性。

d. 多学科融合发展:已有的针对神经网络功能拓扑结构变化的研究,仅从网络指标数学层次分析功能网络拓扑结构的动态变化过程,并没有深入挖掘导致网络可塑性发生改变的本质原因,所以神经网络可塑性研究需要多学科的合作,包括神经科学、生物学、物理学和工程学等领域,有望进一步推动不同学科之间的交叉融合,促进神经网络可塑性研究的发展和应用。

参 考 文 献

- [1] Chen Z, Liang Q, Wei Z, *et al.* An overview of *in vitro* biological neural networks for robot intelligence. *Cyborg Bionic Syst*, 2023, 4: 0001
- [2] McFarlan AR, Chou C Y C, Watanabe A, *et al.* The plasticity of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 2023, 24(2): 80-97
- [3] Appelbaum L G, Shenasa M A, Stolz L, *et al.* Synaptic plasticity and mental health: methods, challenges and opportunities. *Neuropsychopharmacology*, 2023, 48(1): 113-120
- [4] Ulló S, Nieuwenhuis T R, Sona D, *et al.* Functional connectivity estimation over large networks at cellular resolution based on electrophysiological recordings and structural prior. *Front Neuroanat*, 2014, 8: 137
- [5] 梁夏,王金辉,贺永.人脑连接组研究:脑结构网络和脑功能网络. *科学通报*, 2010, 55(16): 1565-1583
Liang X, Wang JH, He Y. *Chin Sci Bull*, 2010, 55(16): 1565-1583
- [6] 李亚鹏.大脑功能网络及其动力学研究[D].武汉:华中科技大学, 2014
Li Y P. Study on Brain Functional Network and Its Dynamics [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014
- [7] 韩尧.基于图论分析的生物活性功能脑网络研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2018
Han Y. Study on Bioactive Functional Brain Network Based on Graph Theory Analysis [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, PLA, 2018
- [8] Rubin D B, Hosman T, Kelemen J N, *et al.* Learned motor patterns are replayed in human motor cortex during sleep. *J Neurosci*, 2022, 42(25): 5007-5020
- [9] Abel T, Havekes R, Saletin J M, *et al.* Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks. *Curr Biol*, 2013, 23(17): R774-R788
- [10] Rohan J G, Carhuatanta K A, McInturf S M, *et al.* Modulating hippocampal plasticity with *in vivo* brain stimulation. *J Neurosci*, 2015, 35(37): 12824-12832
- [11] 楼力政.微电极阵列上培养神经网络的特性分析[D].杭州:浙江大学, 2019
Lou L Z. Characteristics Analysis of Cultured Neural Networks on Microelectrode Arrays [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [12] Mohr P N, Nagel I E. Variability in brain activity as an individual difference measure in neuroscience?. *J Neurosci*, 2010, 30(23): 7755-7757
- [13] 薛艳华.培养神经网络可塑性模型初探[D].武汉:华中科技大学, 2012
Xue Y H. Preliminary Study on The Cultivation of Neural Network Plasticity Model [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012
- [14] Passaro A P, Stice S L. Electrophysiological analysis of brain organoids: current approaches and advancements. *Front Neurosci*, 2021, 14: 622137
- [15] Trujillo C A, Gao R, Negraes P D, *et al.* Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell stem cell*, 2019, 25: 558-569.e7
- [16] Smirnova L, Caffo B S, Gracias D H, *et al.* "Organoid intelligence (OI): the new frontier in biocomputing and intelligence-in-a-dish.". *Front Sci*, 2023, 1: 1017235

- [17] Poli D, Pastore V P, Massobrio P. Functional connectivity in *in vitro* neuronal assemblies. *Front Neural Circuits*, 2015, **9**: 57
- [18] Brofiga M, Pisano M, Tedesco M, *et al.* Functional inhibitory connections modulate the electrophysiological activity patterns of cortical-hippocampal ensembles. *Cereb Cortex*, 2022, **32**(9): 1866-1881
- [19] Charlesworth P, Cotterill E, Morton A, *et al.* Quantitative differences in developmental profiles of spontaneous activity in cortical and hippocampal cultures. *Neural Dev*, 2015, **10**(1): 1
- [20] Callegari F, Brofiga M, Poggio F, *et al.* Stimulus-evoked activity modulation of *in vitro* engineered cortical and hippocampal networks. *Micromachines (Basel)*, 2022, **13**(8): 1212
- [21] Xu S, Deng Y, Luo J, *et al.* High-throughput PEDOT:PSS/PtNPs-modified microelectrode array for simultaneous recording and stimulation of hippocampal neuronal networks in gradual learning process. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(13): 15736-15746
- [22] Schröter M, Wang C, Terrigno M, *et al.* Functional imaging of brain organoids using high-density microelectrode arrays. *MRS Bull*, 2022, **47**(6): 530-544
- [23] Magee J C, Grienberger C. Synaptic plasticity forms and functions. *Annu Rev Neurosci*, 2020, **43**: 95-117
- [24] Bi G, Poo M. Distributed synaptic modification in neural networks induced by patterned stimulation. *Nature*, 1999, **401**(6755): 792-796
- [25] Caporale N, Dan Y. Spike timing-dependent plasticity: a hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci*, 2008, **31**: 25-46
- [26] Anisimova M, van Bommel B, Wang R, *et al.* Spike-timing-dependent plasticity rewards synchrony rather than causality. *Cereb Cortex*, 2022, **33**(1): 23-34
- [27] 刘曼. 河豚毒素诱导的培养神经网络的稳态可塑性[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007
Liu M. Steady-state Plasticity of Cultured Neural Networks Induced by Tetrodotoxin [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007
- [28] Jin I, Kassabov S, Kandel ER, *et al.* Possible novel features of synaptic regulation during long-term facilitation in Aplysia. *Learn Mem*, 2021, **28**(7): 218-227
- [29] Debanne D, Inglebert Y. Spike timing-dependent plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, 2023, **80**: 102707
- [30] Dringenberg H C. The history of long-term potentiation as a memory mechanism: controversies, confirmation, and some lessons to remember. *Hippocampus*, 2020, **30**(9): 987-1012
- [31] Dan Y, Poo MM. Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron*, 2004, **44**(1): 23-30
- [32] Rubinov M, Sporns O. Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage*, 2010, **52**(3): 1059-1069
- [33] Bonifazi P, Massobrio P. Reconstruction of functional connectivity from multielectrode recordings and calcium imaging. *Adv Neurobiol*, 2019, **22**: 207-231
- [34] 陈文娟, 李向宁, 骆清铭, 等. 体外培养神经网络功能结构的长时间发育变化. *科学通报*, 2010, **55**: 2531-2538
- Chen W J, Li X N, Luo Q M, *et al.* *Chin Sci Bull*, 2010, **55**: 2531-2538
- [35] 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**(2-3): 109-112
- [36] Downes J H, Hammond M W, Xydias D, *et al.* Emergence of a small-world functional network in cultured neurons. *PLoS Comput Biol*, 2012, **8**(5): e1002522
- [37] Van Pelt J, Vajda I, Wolters P S, *et al.* Dynamics and plasticity in developing neuronal networks *in vitro*. *Prog Brain Res*, 2005, **147**: 173-188
- [38] 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
- [39] Chiappalone M, Vato A, Berdondini L, *et al.* Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. *Int J Neural Syst*, 2007, **17**(2): 87-103
- [40] Poli D, Massobrio P. High-frequency electrical stimulation promotes reshaping of the functional connections and synaptic plasticity in *in vitro* cortical networks. *Phys Biol*, 2018, **15**(6): 06LT01
- [41] Teller S, Granell C, Domenico M D, *et al.* Emergence of assortative mixing between clusters of cultured neurons. *PLoS Comput Biol*, 2014, **10**(9): e1003796
- [42] Schroeter M S, Charlesworth P, Kitzbichler M G, *et al.* Emergence of rich-club topology and coordinated dynamics in development of hippocampal functional networks *in vitro*. *J Neurosci*, 2015, **35**(14): 5459-5470
- [43] Antonello P C, Varley T F, Beggs J, *et al.* Self-organization of *in vitro* neuronal assemblies drives to complex network topology. *Elife*, 2022, **11**: e74921
- [44] Muzzi L, Di Lisa D, Arnaldi P, *et al.* Rapid generation of functional engineered 3D human neuronal assemblies: network dynamics evaluated by micro-electrodes arrays. *J Neural Eng*, 2021, **18**(6): 066030
- [45] Le Floch P, Li Q, Lin Z, *et al.* Stretchable mesh nanoelectronics for 3D single-cell chronic electrophysiology from developing brain organoids. *Adv Mater*, 2022, **34**(11): e2106829
- [46] Frega M, Tedesco M, Massobrio P, *et al.* Network dynamics of 3D engineered neuronal cultures: a new experimental model for *in vitro* electrophysiology. *Sci Rep*, 2014, **4**: 5489
- [47] Tedesco M T, Di Lisa D, Massobrio P, *et al.* Soft chitosan microbeads scaffold for 3D functional neuronal networks. *Biomaterials*, 2018, **156**: 159-171
- [48] Brofiga M, Pisano M, Tedesco M, *et al.* Three-dimensionality shapes the dynamics of cortical interconnected to hippocampal networks. *J Neural Eng*, 2020, **17**(5): 056044
- [49] Fair S R, Julian D, Hartlaub A M, *et al.* Electrophysiological maturation of cerebral organoids correlates with dynamic morphological and cellular development. *Stem Cell Rep*, 2020, **15**(4): 855-868

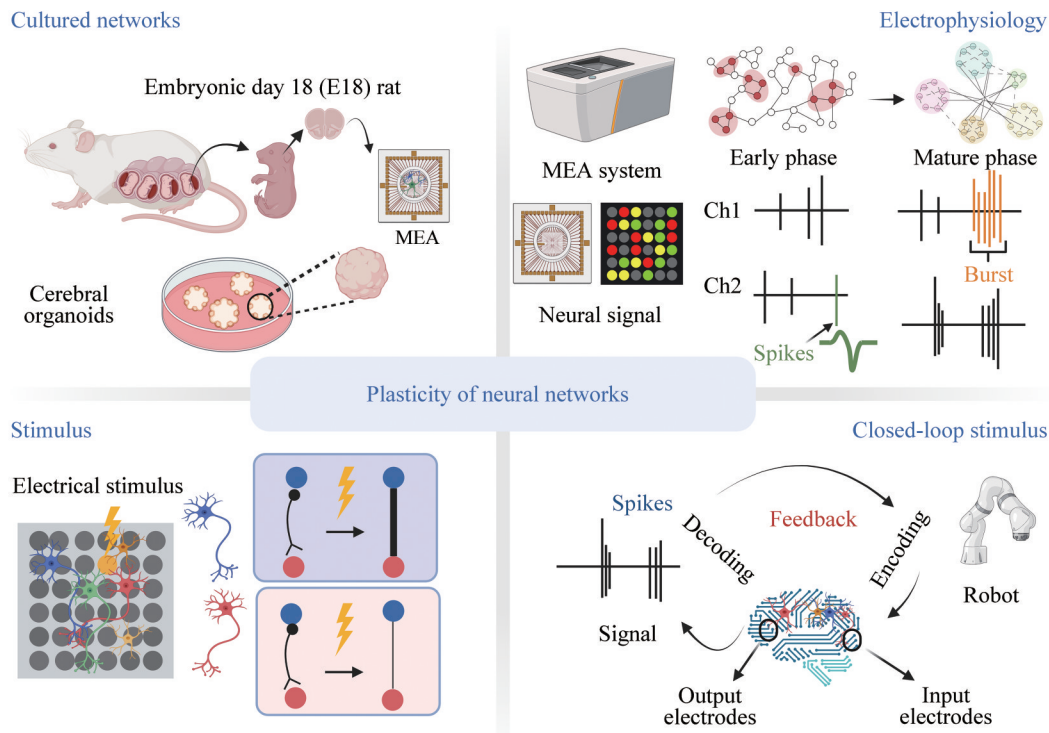
- [50] Giandomenico S L, Mierau S B, Gibbons G M, *et al.* Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat Neurosci*, 2019, **22**(4): 669-679
- [51] Rapisardi G, Kryven I, Arenas A. Percolation in networks with local homeostatic plasticity. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 122
- [52] Sharf T, van der Molen T, Glasauer S M K, *et al.* Functional neuronal circuitry and oscillatory dynamics in human brain organoids. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4403
- [53] Ruaro M E, Bonifazi P, Torre V. Toward the neurocomputer: image processing and pattern recognition with neuronal cultures. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2005, **52**(3): 371-383
- [54] Chiappalone M, Massobrio P, Martinoia S. Network plasticity in cortical assemblies. *Eur J Neurosci*, 2008, **28**(1): 221-237
- [55] Maeda E, Kuroda Y, Robinson H P C. Modification of parallel activity elicited by propagating bursts in developing networks of rat cortical neurones. *Eur J Neurosci*, 1998, **10**(2): 488-496
- [56] Gladkov A A, Kolpakov V N, Pigareva Y I, *et al.* Functional connectivity of neural network in dissociated hippocampal culture grown on microelectrode array. *Modern Technologies in Medicine*, 2017, **9**(2): 61-66
- [57] Madhavan R, Chao Z C, Potter S M. Plasticity of recurring spatiotemporal activity patterns in cortical networks. *Phys Biol*, 2007, **4**(3): 181-193
- [58] Jimbo Y, Kasai N, Torimitsu K, *et al.* A system for MEA-based multisite stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2003, **50**(2): 241-248
- [59] Le Feber J, Stegenga J, Rutten W L. The effect of slow electrical stimuli to achieve learning in cultured networks of rat cortical neurons. *PLoS One*, 2010, **5**(1): e8871
- [60] le Feber J, Witteveen T, van Veenendaal T M, *et al.* Repeated stimulation of cultured networks of rat cortical neurons induces parallel memory traces. *Learn Mem*, 2015, **22**(12): 594-603
- [61] Gao F, Gao K, He C, *et al.* Multi-site dynamic recording for A β oligomers-induced Alzheimer's disease *in vitro* based on neuronal network chip. *Biosens Bioelectron*, 2019, **133**: 183-191
- [62] Shahaf G, Marom S. Learning in networks of cortical neurons. *J Neurosci*, 2001, **21**(22): 8782-8788
- [63] Wagenaar D A, Madhavan R, Pine J, *et al.* Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci*, 2005, **25**(3): 680-688
- [64] Wülfing J M, Kumar S S, Boedecker J, *et al.* Adaptive long-term control of biological neural networks with deep reinforcement learning. *Neurocomputing*, 2019, **342**: 66-74
- [65] Kim E, Jeon S, An H K, *et al.* A magnetically actuated microrobot for targeted neural cell delivery and selective connection of neural networks. *Sci Adv*, 2020, **6**(39): eabb5696
- [66] Kagan B J, Kitchen A C, Tran N T, *et al.* *In vitro* neurons learn and exhibit sentience when embodied in a simulated game-world. *Neuron*, 2022, **110**(23): 3952-3969.e8
- [67] Chen Z, Liang Q, Wei Z, *et al.* An overview of *in vitro* biological neural networks for robot intelligence. *Cyborg Bionic Syst*, 2023, **4**: 0001
- [68] Buccelli S, Bornat Y, Colombi I, *et al.* A neuromorphic prosthesis to restore communication in neuronal networks. *IScience*, 2019, **19**: 402-414
- [69] Hu D K, Mower A, Shrey D W, *et al.* Effect of interictal epileptiform discharges on EEG-based functional connectivity networks. *Clin Neurophysiol*, 2020, **131**(5): 1087-1098
- [70] Bryson A, Mendis D, Morrisroe E, *et al.* Classification of antiseizure drugs in cultured neuronal networks using multielectrode arrays and unsupervised learning. *Epilepsia*, 2022, **63**(7): 1693-1703
- [71] Agboola O S, Hu X, Shan Z, *et al.* Brain organoid: a 3D technology for investigating cellular composition and interactions in human neurological development and disease models *in vitro*. *Stem Cell Res Ther*, 2021, **12**(1): 430

Plasticity of Cultured Neural Networks *In Vitro**

SHAO Qi, MENG Wei-Wei, LI Xiao-Hong, SHAO Wen-Wei**

(Institute of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Graphical abstract



Abstract Neuronal network is the structural basis for the execution of higher cognitive functions in the brain. Research has shown that learning, memory, and neurodegenerative diseases are closely related to neuronal network plasticity. Therefore, uncovering the mechanisms that regulate and modify neuronal network plasticity is of great significance for understanding information processing in the nervous system and for the treatment of diseases. Currently, neuronal networks cultured on microelectrode array (MEA) provide an ideal model for investigating learning and memory mechanisms *in vitro*. Additionally, studying such models offers a unique perspective for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. In this review, we summarize relevant research on functional network construction based on recording the electrical signals of neuronal networks cultivated on MEA. We focus on two aspects: 2D neuronal networks and 3D brain organoid development, as well as the effects of open-loop and closed-loop electrical stimulation on neuronal network plasticity. Lastly, we provide an outlook on the future applications of studying neuronal network plasticity using *in vitro* cultured networks.

Key words microelectrode array, plasticity, functional networks, development, electrical stimulus modulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0216

* This work was supported by grants from National Key Research and Development Program (2021YFF1200800), The National Natural Science Foundation of China (82171861, 81971782, 82101853) and Tianjin Science and Technology Plan Project (20JCZDJC00780).

** Corresponding author.

Tel: 86-18322260753, E-mail: wenwei.shao@tju.edu.cn

Received: June 2, 2023 Accepted: September 28, 2023