



上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的研究进展*

刘颖勋 李林源 何宇蒙 任 维**

(陕西师范大学现代教学技术教育部重点实验室, 西安 710062)

摘要 光遗传学技术是结合基因工程和光学技术对生物体特定细胞进行精确调控的新兴生物技术, 该技术可以特异性地兴奋或抑制靶神经元, 成为解析介导特定行为神经环路的强有力的工具. 传统技术依赖光纤, 对脑组织有损伤且限制了动物的自由活动. 新一代上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术, 借助近红外光组织穿透相对深的特性, 能够对啮齿类动物脑组织深层核团进行无线调控, 克服了传统技术中埋置光纤存在的缺陷. 本文总结了上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的发展历程及现状, 比较分析了这类无线光遗传学技术的优缺点, 最后对该技术面临的挑战及未来前景进行了分析和展望.

关键词 光遗传学, 上转换纳米颗粒, 近红外光, 无线调控
中图分类号 Q189

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0232

1979年, 美国著名科学家、DNA双螺旋结构发现者之一Francis Crick对神经科学未来发展进行展望, 认为科学家急需开发出一种只针对特定神经元活性进行调控而不影响其他细胞的实验技术. 具有分子生物学背景知识的Crick进一步指出可以对特定神经元进行基因改造, 从而使它们可对外界信号(如光刺激)产生精准应答. 这一理念建立了光遗传学的思想雏形, 并经20多年几代科学家的努力得以实现^[1]. 2005年, 美国斯坦福大学的Karl Deisseroth首次在体外培养的神经元细胞表达一种微生物的光敏感蛋白(Channelrhodopsin-2, ChR2), 通过使用脉冲蓝光照射实现了时空精确可控地激活神经元, 真正意义上建立了光遗传学技术^[2]. 此后的十多年里, 光遗传学技术快速发展, 为人类探究和解析大脑神经功能提供了新的革命性技术手段, 并被*Nature Methods*评选为2010年度方法^[3].

尽管光遗传学技术在神经生物学研究中有广泛的应用, 但是现有方法依赖光纤向大脑深部核团进行光波传导, 外科手术埋置光纤的方法存在诸多不容忽视的缺陷. 近红外(near infrared, NIR)光具有组织穿透相对深的特性, 由于缺乏对NIR光响

应的光敏蛋白, 无法直接应用于光遗传学. 借助上转换纳米颗粒(upconversion nanoparticles, UCNP)将NIR光转换为特定波长的可见光激活光敏蛋白, 能够实现对动物脑组织深层核团的无线调控, 从而引起研究者广泛关注^[4-6]. 本文总结了UCNP介导的无线光遗传学技术的发展及现状, 比较分析了这类无线光遗传学技术的优缺点, 最后对该技术面临的挑战及未来前景进行了分析和展望.

1 光遗传学技术介绍

1.1 光遗传学技术的原理与发展

光遗传学(optogenetics)技术是一种整合基因工程和光学技术的新型神经元活性调控手段. 该技术利用基因工程手段改造靶细胞遗传信息, 通过表达载体的组织特异性启动子及定位注射技术, 将光敏蛋白的表达限定在特定脑区的单一类型细胞膜上. 再经特定波长的激光照射激活光敏蛋白, 引起

* 陕西省自然科学基金(2020JM-305)和中央高校基本科研业务费(GK201903102)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 029-85308178, E-mail: renwei@snnu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-30, 接受日期: 2020-11-09

细胞内离子浓度及膜电位变化, 进而引起特定神经环路活动及动物行为发生改变. 同时由于光敏蛋白对光照刺激响应非常灵敏, 光照刺激停止后神经元活性即可得到恢复^[2-3]. 因此, 与以往的电刺激或化学药物刺激相比, 光遗传学技术具有高时空分辨率和细胞类型特异性两大特点, 克服了传统技术不能特异性地对某一类神经元进行精确操控以及药物起效时间长的缺陷. 光遗传学技术和行为学实验相结合, 可以从本质上阐明特定的细胞类型、神经纤维投射与机体生理活动间的因果关系, 广泛地应用于解析神经环路和大脑功能之间的因果关系以及神经系统疾病的发病机制研究^[3].

1.2 传统光遗传学技术的缺陷

光遗传学技术的关键环节在于光敏蛋白的特异性表达和光-组织界面的建立. 常用的光敏蛋白有 Channelrhodopsin-2 (ChR2) 和 Halorhodopsin (NpHR) (图 1a). 前者对波长为 472 nm 的蓝光敏感, 激活后引起神经元去极化; 而后者则对 593 nm 的黄光敏感, 使得神经元活性受到抑制^[3, 7]

(图 1b). 由于激发光敏蛋白的光波长限定在可见光, 而短波长的可见光穿过生物组织后光强显著衰减 (图 1c). 据估计, 穿透 0.5 mm 的动物脑组织后, 可见光的初始功率密度仅能保留 10%. 现有方法通常通过外科手术向大脑植入光纤进行光波传导, 埋置光纤带来一系列问题 (图 1d): 首先, 侵入式操作容易引发组织损伤、出血与炎症; 其次, 实验期间动物的运动和抓挠会造成光纤尖端发射移位, 导致光纤传输脱靶, 并对脑组织造成额外损害; 第三, 光纤限制了动物的运动范围, 无法完成穿梭箱或水迷宫等行为学实验; 第四, 在社交行为实验时无法同时对多只动物进行调控, 因为多根光纤会缠绕或打结.

综上, 尽管光遗传学技术已广泛应用于神经科学研究领域, 传统技术对深部组织的光刺激依赖颅内埋置光纤, 必然对周围组织产生非预期的损伤, 严重影响光遗传的调控效应. 因此, 急需开发非侵入式光源系统, 以满足体外无线调控的需求.

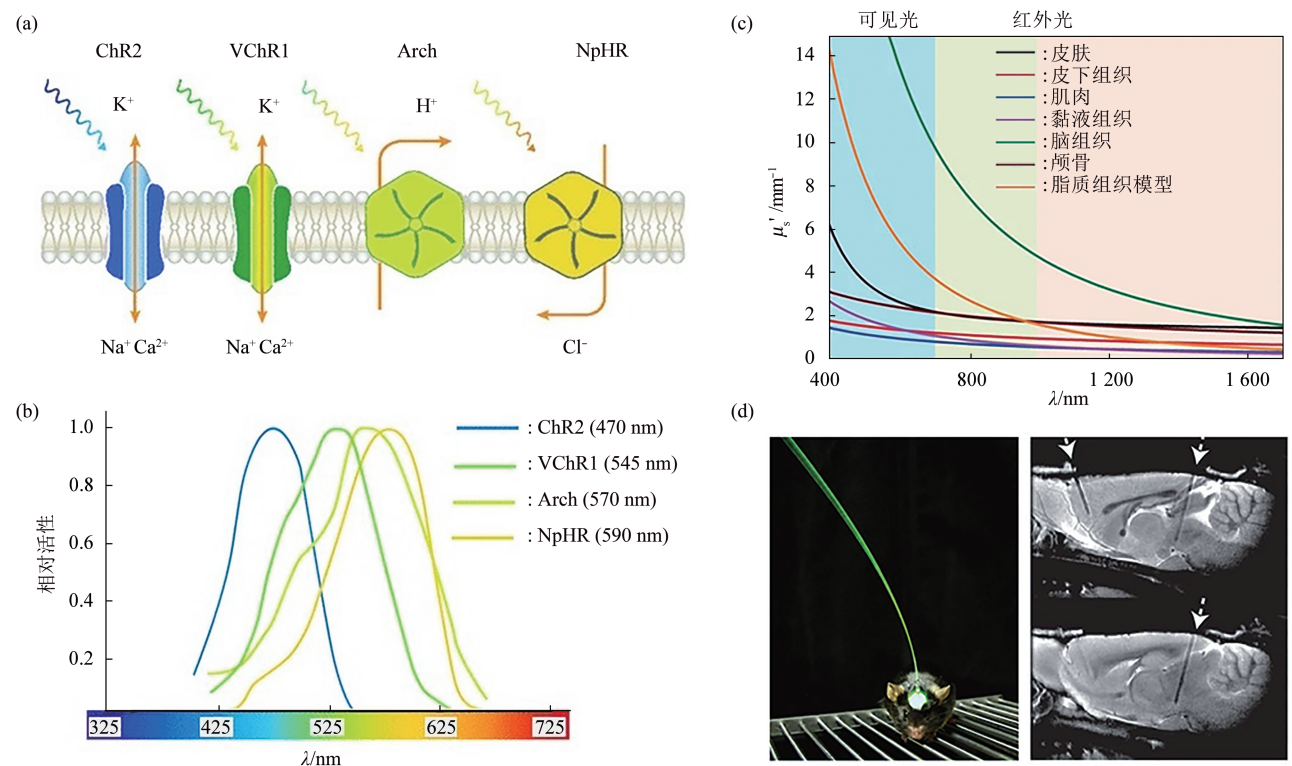


Fig. 1 Genetic working principles and the side effects of current tools using invasive fiber-optic probes
图1 光遗传学技术原理图及传统技术使用光纤存在的缺陷
(a, b) 常见光敏蛋白的工作原理及其最大激发波长^[5]. (c) 生物组织对不同波长光波的散射系数^[5]. (d) 传统技术使用光纤进行光波传导, 光纤限制了动物的自由活动并对脑组织产生不可避免的损伤 (图中白色箭头所示)^[3, 7].

1.3 无线光遗传学技术的探索

为了克服传统技术对光纤的依赖,研究人员通过使用微型可植入光源或改造光敏蛋白,建立无线光遗传学技术.随着微电子技术的发展,微型发光二极管(μ -LED)体积缩小,可植入到目标脑区.同时借助蓝牙技术进行体外无线调控,在光遗传学实验中备受关注^[8].需要指出的是,可植入的电子设备的能量供给问题始终是其广泛应用的限制因素.携带固态电池会阻碍设备的微型化,加重小鼠头部负荷,且无法进行脊髓和外周神经系统调控.无线接收电磁场能量进行能量转换效率低,且动物的活动只能限定在特殊的设备内,无法进行复杂行为学实验^[8-9].

另一种思路是改造现有光敏蛋白,摆脱对短波长、高功率光源的依赖.研究者通过基因工程技术改造光敏蛋白,使其激发波长红移,构建红移光敏蛋白(red-shifted opsin)^[10].已有研究表明,两种红移光敏蛋白,ReaChR和Chrimson,直接在体外接受655 nm和735 nm的红光激发下可引起小鼠的触须运动^[11].但是红移光敏蛋白的“通道关闭速率”较慢,未能达到ChR2的调控水平.并且激发波红移范围有限,并不能实现组织穿透相对深的NIR光激发.另有学者联合使用人工智能计算和生物实验,从ChR2理论上存在的120 000种突变体中筛选出了3种光电流强度、波长特异性和动力学特性均符合光遗传应用的新型ChR2(ChRger2)候选分子^[12].由于ChRger2蛋白具有超强光灵敏度,微弱的光照即可激活蛋白.作者通过小鼠尾静脉注射病毒载体,待ChRger2在脑组织表达后,在第二运动皮层上方的颅骨表面放置光纤,发现470 nm蓝光体外照射即可诱发小鼠产生偏转运动.尽管这些超灵敏光敏蛋白在非人灵长类动物体内取得较好的调控效果^[13],但这种体外无线调控仅限于浅层脑组织,深层核团调控仍依赖于埋置光纤.

与基因工程技术改造和筛选光敏蛋白相比,通过上转换发光纳米材料将近红外光转换为可见光,为光敏蛋白和NIR光建立联系,不仅能够实现基于NIR光的无线遗传学技术,同时操作简便,因此已

得到更多研究者的关注^[5-6].

2 上转换纳米颗粒的特性及生物医学应用

近年来,随着纳米生物技术的发展,纳米材料在生物分子检测、生物成像以及疾病诊疗等方面的应用日益广泛^[14].在诸多纳米材料中,由镧系稀土元素(如,Er、Yb、Tm和Nd等)掺杂形成的纳米颗粒具有上转换发光特性而格外引人注目.上转换发光是指,在低能光子的激发下经由两个及两个以上光子的吸收过程产生高能发射,也称为反斯托克斯发光(图2a).镧系元素核外电子壳层排布为 $4d^{10}5s^25p^64f^N(4f^{N-1}5d^1)6s^2$,形成原子时其内部的4f层没有填满电子.这样不同的4f壳层电子排布方式使其具有了丰富的能级结构.4f壳层内电子可能通过能级间跃迁实现对光的吸收和光的发射,其发射光谱范围可从近紫外延伸至近红外.稀土离子具有独特的准“阶梯状”能级结构和长的激发态寿命,使其可以连续吸收低能激发光的能量,更容易产生上转换发光现象.即稀土离子吸收低能量、长波长的近红外光,“上转换”为紫外光至近红外光,能够介导NIR光的生物医学应用^[15-16].

由于生物体组织对700 nm~1 500 nm的NIR光吸收率低,以NIR光为激发光源具有组织穿透相对深的性质,被誉为“生物组织光学窗口”(图2b).与量子点、有机染料和荧光蛋白等传统荧光探针相比,上转换发光纳米材料具有很好的荧光效率、光稳定性以及抗漂白性.更为重要的是,稀土上转换纳米材料通常以近红外光为激发光源,这使得基于上转换发光纳米材料成像具有很强的穿透性^[15].同时,上转换纳米材料的光学特性也极大地促进了NIR光在深层组织的多模态造影、药物可控释放以及肿瘤的光热治疗和光动力治疗等生物医学研究中的应用^[17].因此,在UCNP介导下,将具有组织穿透相对深特性的NIR光应用于光遗传学技术,能够满足后者向深层组织传导光学信号的需要,必然对其产生极大的促进作用.

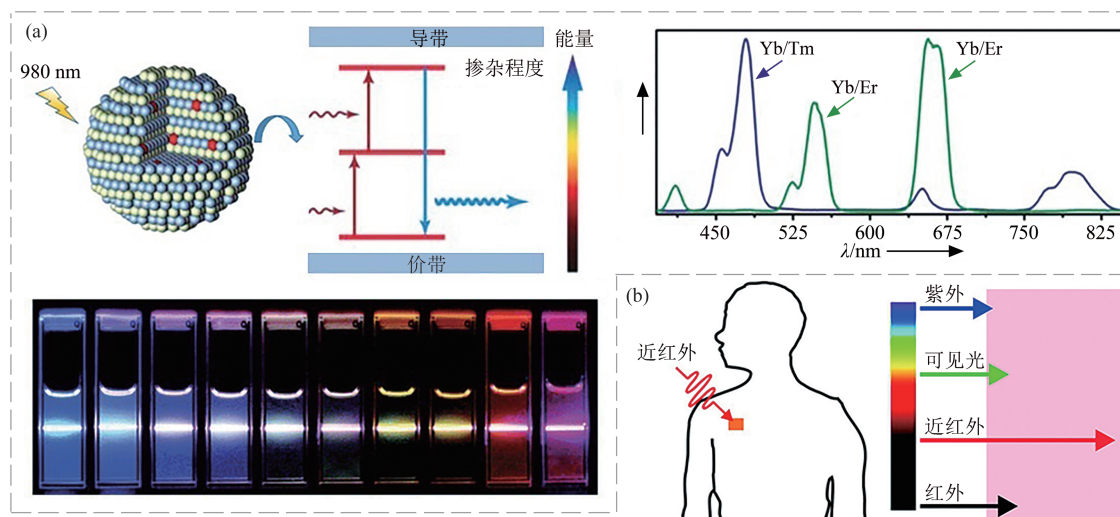


Fig. 2 Optical properties of upconversion nanoparticles and near infrared light^[5]

图2 UCNP的光子上转换机制及近红外光的组织穿透能力^[5]

3 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的特点

3.1 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的建立与发展

UCNP介导的无线光遗传学技术最早由光遗传学创始人之一Deisseroth于2011年首次提出并申请专利. 随后不同研究小组将该技术成功用于培养神经元^[18-20]、秀丽隐杆线虫^[21-23]、斑马鱼幼虫^[24]以及啮齿类哺乳动物^[4, 25-28]的神经元活性调节及行为调控(图3a, b).

3.1.1 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的体外应用

最早有研究者在包被UCNP的爬片上培养大鼠背根神经节神经母细胞瘤(ND7/23)细胞并转染表达光敏蛋白, 通过全细胞膜片钳实验首次证实NIR光诱导神经元活性的可行性. Hososhima等^[20]通过水热合成方法制备了两种上转换纳米晶体, NaYF₄: Sc/Yb/Er (E_x/E_m : 975 nm/543 nm)和NaYF₄: Sc/Yb/Tm@NaYF₄ (E_x/E_m : 975 nm/450, 480 nm), 与胶原蛋白混合后涂布于细胞爬片表面. 当NIR光照射这种特殊处理的爬片时, 上转换发射的可见光会从爬片底部照射神经元, 诱导光敏蛋白活化. 膜片钳实验证实, 用980 nm激光照射含发绿光UCNP的爬片, 会导致表达C1V1或mVChR1的ND7/23细胞产生内向光电流, 光电流幅值与NIR光强度正相关, 且能达到直接使用绿光

照射幅值的(70±8.0)%. 如果使用发蓝光的UCNP, 则在表达PsChR的细胞中也能诱导形成光电流, 并且使用20 Hz (50 ms)脉冲激光照射还可诱发细胞产生动作电位. 这些结果首次证实了在UCNP介导下, 使用NIR光能够有效调控神经元活性. 需要指出的是, 在该研究中使用的材料上转换效率小于0.024%, 激活光敏蛋白的NIR光功率高达58 W/mm². 而直接使用14 mW/mm²的绿色照射即可产生更高的光电流. 在这种高功率NIR光激发下, 即使没有UCNP, 神经元也会在对温度敏感的瞬时感受通道介导下产生小幅值的光电流. 提示该研究在上转换发光效率等方面仍有极大的改进空间.

Shah等^[18]用含UCNP的聚乳酸-羟基乙酸聚合物制备了相似的神元生长界面, 通过膜片钳实验证实, 在10 Hz的脉冲NIR光刺激下, 海马神经元形成重复动作电位. 该研究结果还证实高上转换效率的UCNP更适于介导NIR光对神经元活性的调控. 研究人员制备了具有核壳结构的UCNP, 有效地将发光效率提高至1%~3%. 相应的, 使用1 W NIR光照即可使表达ChR2的神经元去极化并诱发动作电位. 而裸颗粒则需要更高的激光功率和更长的脉冲时间才能触发神经元动作电位. Wu等^[19]进一步使用有机染料敏化核壳结构的UCNP, 将UCNP的上转换效率提高了7倍. 在这种UCNP介导下, 使用功率密度为0.117 W/mm²的808 nm NIR光即可诱导神经元去极化, 1.5 W/mm²的功率密度即可产生动作电位, 该功率是所有膜片钳研究中最底的.

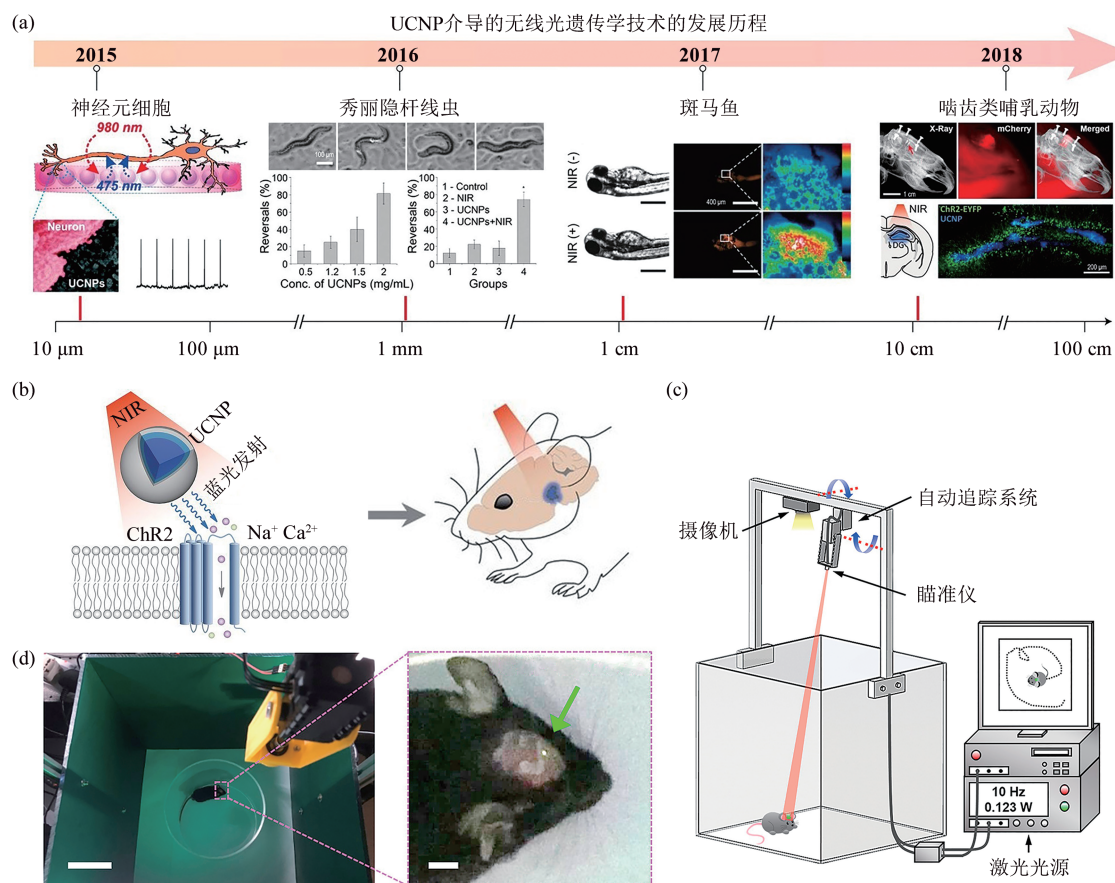


Fig. 3 UCNP-mediated wireless optogenetics for deep brain stimulation

图3 UCNP介导的无线光遗传学技术的建立与发展

(a) UCNP介导的无线光遗传学技术的发展历程^[29]. (b) UCNP介导的无线光遗传学技术的实验原理^[4]. (c, d) UCNP介导的光遗传学技术对自由活动小鼠运动皮层进行无线调控^[26].

3.1.2 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的在体应用

降低NIR光使用功率、减小NIR光照热辐射效应的另一种策略是使用脉冲光照模式. Bansal等^[21]在诱导HEK293细胞去极化实验中,报道了使用脉冲(准连续)光照模式能够显著降低NIR光功率(平均功率160 mW, 68 J/cm² vs 2W, 850 J/cm²)及UCNP剂量(0.65 g/L vs 1 g/L).基于此,通过优化上转换材料剂量及脉冲激光功率,该研究小组首次实现了利用近红外光进行在体行为调控.研究者以秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)为对象,选用机械感觉神经元表达ChR2的转基因品系并饲喂UCNP材料.经脉冲激光照射后上转换产生的蓝光会激活机械感觉神经元,并引起线虫产生类似于被触摸的逆转反应,执行欧米茄转弯以逃避光照刺激.最近,有研究分别以线虫的抑制性GABA

能运动神经元和兴奋性谷氨酸能中间神经元为研究对象,借助808 nm近红外光及540 nm发射光的UCNP对表达绿光敏感离子通道(Chrimson)的两种类型不同神经元活性进行调控,实现了对线虫多种运动行为的调控并对其运动机制做出探究,而不会导致动物的热损伤及纳米颗粒潜在的细胞毒性^[22].

事实上,秀丽隐杆线虫是光学透明的生物,因此蓝光照即可实现光遗传调控.为了突出NIR光组织穿透相对深的优点, Ai及其同事选择斑马鱼作为光遗传学操作的体内模型^[24].研究者首先构建了 $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Tm/Nd}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}@\text{PAA}$ UCNP,再与表达ChR2的HEK293细胞共孵育,通过 Ca^{2+} 成像、全细胞膜片钳及细胞凋亡检测证实808 nm NIR光能够有效激活ChR2蛋白活性并上调 Ca^{2+} 介导的生物学功能.为了表征808 nm NIR光是

否能够穿透斑马鱼组织调节光敏蛋白活性, 作者将上述表达 ChR2 的 HEK293 细胞在受精 48 h 显微注射植入斑马鱼幼虫卵黄囊中, 再与 UCNP 孵育 12 h. Ca^{2+} 成像和 Caspase-3 分子检测结果提示, 808 nm NIR 光能够穿透斑马鱼组织, 远程激活 ChR2 通道并上调 Ca^{2+} 介导的细胞凋亡作用. 近红外光远程调控离子通道活性能引起细胞凋亡, 提示该技术在肿瘤治疗方面具有一定的应用前景. 该研究的另一创新点是通过细胞自身新陈代谢在细胞膜蛋白多糖中掺入叠氮基团, 提高二苯基环辛炔 (DBCO) 修饰的 UCNP 与细胞的靶向结合能力, 增强调控效果. 这些工作不仅证实了 UCNP 介导的无线光遗传学技术在体应用的可能性, 还展现出这种非侵入式调控策略在不同活体动物模型应用上的优势和灵活性.

3.1.3 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术在高等哺乳动物中的应用

香港城市大学史鹏教授课题组的研究结果将 UCNP 介导的光遗传学技术成功用于啮齿类动物中枢神经系统的无线调控^[25-27]. 研究者首先将制备的纳米颗粒干燥并封装到毛细玻璃管中, 并和光纤装配到一起组装成微光极, 在 NIR 照射下上转换发射蓝光或绿光. 离体膜片钳实验中, 通过微操系统将微光极贴近靶细胞 ($<100\ \mu\text{m}$) 而不与细胞直接接触, 提高 UCNP 的使用安全性. NIR 光照刺激 ($1.4\sim12.7\ \text{mW}/\text{mm}^2$, 10 ms 脉宽, 1~10 Hz) 能在体外培养的单个神经元或神经网络中触发内向光电流和动作电位. 同时这种微型光源设备体积小 (直径约 $100\ \mu\text{m}$)、重量轻 (小于 1 mg), 可植入脑组织而不会对脑组织造成大损害. 因此, 该研究进一步在成年大鼠的视觉皮层 (DV: $-1.0\ \text{mm}$) 神经元表达光敏蛋白, 再将光源装置和膜片钳记录电极一起植入病毒载体注射部位. 体内电生理实验证实, 经 NIR 光 (脉宽: 30 ms, 功率: ChR2, $7\ \text{mW}/\text{mm}^2$; C1V1, $4.4\ \text{mW}/\text{mm}^2$) 照射能有效激活视觉皮质神经元^[25]. 这是 UCNP 介导的无线光遗传学技术首次在啮齿类哺乳动物体内得到应用.

然而上述实验仅从细胞水平支持 UCNP 介导的无线光遗传学技术能够在体调控神经元活性, 该技术是否能够直接调控高等动物行为变化尚不清楚, 因为如何通过 NIR 光无线照射对自由活动动物的靶组织给予充分的刺激仍是一个技术难题. 该团队设计了一种自动投射系统, 该系统能够自动识别旷场中小鼠头部位置并实时追踪并给予光照, 从而确保

动物在自由活动过程中接受到有效的光照刺激 (图 3c, d). 运用这套全光学无线投射系统, 研究者成功通过调控皮质纹状体区 (DV: $-3.0\ \text{mm}$) 神经元活性改变动物在旷场中的运动行为. 为了进一步检测 NIR 光的组织穿透能力, 作者选择位置更深的腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) (DV: $-4.5\ \text{mm}$) 作为靶区域. 在 Y 型迷宫实验中, 动物对 NIR 光源所在臂具有位置偏爱性, 提示该区域的 NIR 光照 (10 pulses, 20 Hz, 10 ms 脉宽, $5\ \text{mW}/\text{mm}^2$) 有效地激活了 VTA 区的多巴胺能神经元释放多巴胺递质, 增强了动物的愉悦感^[26]. 在此基础上, 该课题组进一步实现了神经元活性的抑制性调控^[27]. 抑制性光敏蛋白的调控不仅需要 UCNP 的发射光波长调整至 540~570 nm 附近, 与抑制性光敏蛋白的激发光相匹配, 同时需要较强功率的光照刺激, 这就对无线光照和 UCNP 的上转换效率要求严格. 研究者合成了具有六方相的核-壳结构 UCNP, 增强了上转换效率, 并结合自动投射系统证实了 UCNP 介导的无线光遗传学技术对小鼠运动行为的抑制作用.

有研究报道了一种通过光学漫射体 (ED1-C20, Thorlabs) 在动物活动范围内形成 NIR 光场, 实现了对小鼠旷场运动、转棒行为和胡须活动的无线调控. 与复杂的自动投射系统相比, 漫射体无线调控模式简单易行, 但使用的上转换材料在微米级, 转换效率低, 导致 NIR 光的初始功率高达 37 W, 成为限制其在体应用的重要因素^[28].

最近, McHugh 等^[4]使用 UCNP 介导的无线光遗传技术在小鼠体内诱发多种生理现象, 包括激活多巴胺能神经元、抑制癫痫、诱导 theta 振荡以及召回恐惧记忆等, 这是目前对 UCNP 介导的无线光遗传学技术在体内应用最深入的研究. 研究人员首先在 TH-Cre 转基因鼠的 VTA 注射编码 ChR2 蛋白的腺相关病毒, 3 周后, 待光敏蛋白表达后将 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}@\text{SiO}_2$ 纳米颗粒注射到双侧 VTA 区, 使用 960 nm NIR 激光照射后通过检测标志蛋白 c-fos 的表达、神经元电生理活动以及多巴胺水平检测, 发现在 UCNP 介导下 NIR 光能够激活多巴胺能神经元. 研究者进一步在 CamKII-Cre 小鼠的海马表达 Arch 抑制性光敏蛋白并注射 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}@\text{SiO}_2$ UCNP (E_m : $\sim 540\ \text{nm}$), 药物制备癫痫模型后, 颅外长时间低强度 NIR 刺激显著降低了海马区兴奋性神经元 c-fos 蛋白的表达, 即抑制海马神经元的癫痫状态, 提示该技术在神经疾病治疗方面

具有巨大的潜力。

3.1.4 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的其他应用方向

除了中枢神经系统外,UCNP介导的NIR光照体系还能用于体内其他多种生理活动调控.为了克服传统技术中庞大的光源设备难以植入脊髓的缺陷,有研究者将含UCNP的聚丙烯管拉制成细纤维并植入小鼠L4腰椎的背侧角.作者根据脊髓下游肌细胞的活性和动物运动行为变化检测这种装置对脊髓活性的调控作用.结果显示,NIR光刺激可靠地引起后肢肌肉活动,且活动强度与光照强度正相关.在旷场测试中发现,这种功能性UCNP细纤维能够有效干预自由移动的小鼠的运动^[30]. Rao等^[31]将光遗传学技术运用于心脏电生理功能研究,在心肌细胞中表达光敏蛋白,在UCNP介导下实施NIR光刺激,构建心脏节律与功能的光控制系统. He等^[32]基于基因工程技术在内质网Ca²⁺释放激活的Ca²⁺通道(Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel, CRAC)上加入光敏结构域,形成Opto-CRAC系统.在UCNP介导下,利用体外NIR光照引起表达Opto-CRAC的树突细胞中Ca²⁺内流以促进树突细胞的成熟并增强抗肿瘤免疫应答.山东大学研究团队发现,小鼠神经干细胞自身表达多种光敏蛋白,无需转染外源基因,通过微弱蓝光(300 μw/cm²)照射即可激活细胞内Melanopsin-TRPC6-Jab1信号转导通路,显著提升神经干细胞的增殖分化.该团队进一步在小鼠脑外侧进行NIR光照射,借助海马齿状回颗粒下区注射的UCNP产生蓝光,诱导静息态神经干细胞进行分化,实现了无线调控内源性神经干细胞的体内原位动员^[33].

3.2 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的优点

综上所述,UCNP介导的NIR光遗传学技术能够实现对于脑组织深层核团的无线调控,克服了传统技术中光纤对动物活动的限制和脑组织的损伤^[4-6].摆脱了光纤的束缚,动物在接受光刺激时处于自由活动状态,能够完成多种复杂行为学检测,包括旷场运动、转棒实验、Y型迷宫及斯金纳箱等多个实验场景^[4, 26, 28].此外,借助纳米材料的独有特性,UCNP介导的无线光遗传学技术还具有以下几方面优点:

3.2.1 借助UCNP材料的可塑性,制备特定形态的照射光源,提高光遗传操作的多样性

例如在细胞水平上,将UCNP包覆在细胞爬片

表面,与被调控的细胞建立稳定的接触界面,能提高光遗传调控的效率(图4a)^[18-19].将纳米颗粒干燥并封装到毛细玻璃管中制备微光极,能够方便地植入脑组织实现啮齿类动物中枢神经的无线调控^[25-27].基于相同思路,该课题组以热塑性聚丙烯(polypropylene, PP)作骨架,通过高温拉伸将含UCNP的PP管拉制成直径约为500 μm细纤维,制备一种柔性光源装置.这种PP纤维管足够纤细,能植入形状不规则的脊髓而不妨碍脊髓运动(图4b).除了具有良好的生物相容性外,这种微光极在NIR光照射时能可靠地诱发后肢肌肉活动,且能够有效干预自由活动小鼠的运动行为.使用这种柔性UCNP-PP纤维管,克服传统技术中庞大的光源设备难以植入脊髓的缺陷,实现光遗传学技术对外周神经系统的调控^[30].

3.2.2 利用纳米颗粒表面的特殊修饰,提高UCNP与光敏蛋白靶向结合,增强局部刺激

在体外实验中,叶酸分子修饰能够提高纳米颗粒与肿瘤细胞的结合,但缺乏与光敏蛋白的靶向性^[34].为了特异性提高UCNP与光敏蛋白的结合,Yadav等^[35]将V5抗原表位插入ChR2蛋白的N末端(V5-ChR2m),并用NeutrAvidin修饰UCNP(NAv-UCNP),再借助生物素化的V5抗体与细胞膜上的V5-ChR2m特异性结合(图4c).结果显示,在抗体协助下,NAv-UCNP与V5-ChR2m的靶向结合显著增强,并降低了NIR光照功率及UCNP的剂量. He等^[32]简化了靶向结合体系,直接通过基因工程技术为Opto-CRAC系统修饰上链霉亲和素结合表位,在小鼠体内肿瘤部位特异性地提高了光敏蛋白与链霉亲和素修饰的UCNP靶向结合能力.此外, Ai等^[24]应用叠氮基团标记单糖(Ac4 ManNAz),通过细胞自身代谢在细胞膜蛋白多糖中掺入叠氮基团,增强DBCO修饰的UCNP在斑马鱼细胞表面的靶向定位.该策略不需要对光敏蛋白进行基因工程改造,操作简便,所以这种结合是非特异性的.

3.2.3 借助上转换发光形成不同波长的发射光,实现对神经元活性的多重调控

UCNP的上转换发光通常形成多个波长的发射光,Zhang等^[23]则创新地利用不同波长的发射光,实现对神经元活性的多重调控.研究者在线虫尾部的DVC神经元中共表达单线态氧发生器(miniSOG)和Chrimson光敏蛋白,在808 nm NIR光照(5 mW/mm², 5 Hz, 150 ms脉宽)下,借助

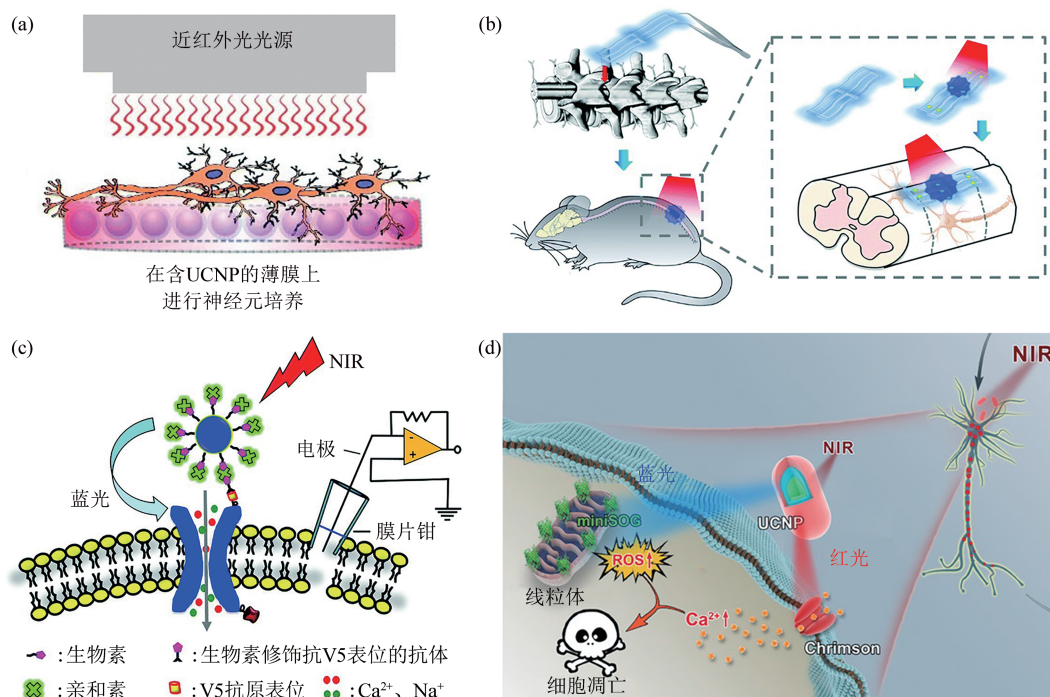


Fig. 4 The advantages of UCNP-mediated wireless optogenetics

图4 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的优点

(a) 以UCNP材料制备神经元生长支架, 与被调控的细胞建立稳定的接触界面^[18]. (b) 将含有UCNP的热塑性聚丙烯管植入小鼠脊髓, 实现对外周神经系统的无线光遗传学调控^[30]. (c) 借助生物素与链霉亲和素的高亲和力, 生物素修饰提高UCNP与光敏蛋白的靶向结合, 增强后者对近红外光的响应^[35]. (d) 借助上转换发光形成不同波长的发射波, 分别诱导不同的光敏元件, 实现对神经元活性的多重调控^[23].

UCNP产生450~470 nm及590~610 nm两种波长发射光, 分别诱导miniSOG生成单线态氧和Ca²⁺离子浓度升高, 两者协同作用显著诱导了神经元的凋亡及线虫运动的抑制作用(图4d).

3.3 上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术存在的问题与改进策略

尽管UCNP介导的光遗传学技术已成功用于啮齿类动物神经元活性的无线调控, 展示出广阔的应用前景. 但该技术仍存在几个关键问题需要深入研究, 包括UCNP的生物相容性、NIR光持续照射产生的热损伤以及UCNP的上转换效率低等问题^[5-6].

3.3.1 提高UCNP的生物相容性

纳米材料的生物相容性是在其于生物医学及临床应用的先决条件. 对于镧系元素掺杂的上转换纳米材料, 已有众多学者对其组织分布、体内代谢及生物相容性进行了深入的研究^[15, 17]. 荧光成像技术显示, UCNP通过内吞作用进入胞内, 在核周区域积聚, 最后被动力转运蛋白释放出细胞. 啮齿类动物尾静脉注射的UCNP主要被网状内皮系统吞噬,

经肝脏和脾脏代谢, 排出体外. 不论细胞活性检测, 还是在体的体重测量、组织学分析与血清生化分析均表明UCNP具有良好的生物相容性, 其潜在的细胞毒性与使用剂量及表面修饰等因素密切相关. 这些结果为降低UCNP的潜在毒性提供了一些常规的策略, 并在UCNP介导的无线光遗传学实验中得到广泛应用. 第一, 通过提高上转换效率、优化NIR光照参数等方式减少纳米颗粒的使用量, 因为其细胞毒性常具剂量依赖性^[21, 34-35]. 第二, 选择合适的表面修饰提高纳米颗粒的生物相容性, 例如二氧化硅(SiO₂)^[4, 21]或PEG^[35]、PAA^[24]及PLGA^[18]等高分子有机聚合物. 第三, 直接将纳米颗粒封装到玻璃管中, 可以避免稀土离子与神经元的直接接触, 降低纳米颗粒对细胞的不利影响^[25-27, 30].

正是基于这些提高纳米颗粒生物相容性的策略, 在UCNP介导的光遗传学的实验中, 所用的纳米材料均具有良好的生物相容性. 体外结果表明, 在实验剂量下的UCNP对细胞活力、热休克蛋白表达、活性氧生成及细胞凋亡无显著影响^[18, 24, 35].

秀丽隐杆线虫作为具有神经系统最简单的多细胞真核生物,常作为评估纳米材料毒性的模式生物.有研究表明,尽管10 g/L及更高浓度的UCNP具有一定的毒性,然而在光遗传学实验中所用剂量下UCNP对线虫的生长、产卵率及卵生存率无显著影响^[21-22].啮齿类动物在体实验表明UCNP注射位点处小胶质细胞并未增多,提示UCNP具有良好的生物相容性,并未在体内引发炎症反应^[4, 28].尽管已有研究均提示所用UCNP材料具有良好的生物相容性,但是这些材料的尺寸、组成与表面修饰各不相同(表1),而这些因素都会影响材料在生物体内的代谢与潜在毒性.特别是现有评价手段仍以组织形态观测和血清生化分析为主,缺乏针对中枢神经系统特定的检测方式.所以系统地研究UCNP的粒径、组分及表面修饰对生物相容性的影响仍是其在生物学应用研究中不可忽视的问题.

3.3.2 控制NIR光的热辐射

在UCNP介导的无线光遗传学技术应用中,除了考虑UCNP本身的生物相容性外,还需要评估NIR光照产生的热辐射损伤.已有研究表明光遗传学技术存在一定的热效应,即使用常用的激光功率(3~30 mW)对脑组织进行持续照射,也会导致脑组织温度升高0.2~2°C,影响突触传递和神经环路活性,乃至行为变化^[36].UCNP介导无线光遗传学技术常使用980 nm NIR光作照射光源,生物组织中的水分子对这种波长的NIR光有着强烈的吸收并转化为热能,从而导致局部组织的热损伤,同时也降低了近红外光的组织穿透深度.为了减少980 nm光源激发产生的热损伤,现有研究通过优化激光功率以及照射时间加以控制^[4, 26].更为有效的策略是将激发波长移至800 nm,因为水在该波段的吸收系数(0.02 cm⁻¹)远低于在980 nm的吸收系数(0.48 cm⁻¹),大大减轻了近红外光照引起的热损伤^[37-38].以808 nm NIR光作为激发光源需要将UCNP的敏化剂改为Nd³⁺离子,因为Yb³⁺离子的吸收峰集中在980 nm,而Nd³⁺离子则在808 nm的吸收峰最强.事实上,探索Nd³⁺离子敏化UCNP及其介导无线光遗传学技术的应用已展开,分别在培养的海马神经元、秀丽隐杆线虫和斑马鱼幼虫中得到应用^[18-19, 22-23].在这些研究中均采用了中等强度的NIR光进行光照刺激(表1),不会导致动物的热损伤.

3.3.3 提高UCNP的上转换效率

UCNP的上转换发光源于4f电子层内跃迁,光

谱中 $f-f$ 禁戒跃迁是窄带,导致了UCNP对激发光的吸收截面很小,故上转换发光效率通常仅有1%左右,严重阻碍了它们的实际应用.提高上转换发光效率的主要途径有:调整基质材料和掺杂离子配比、构建核壳结构以及有机染料表面修饰^[5, 39].这些策略在UCNP介导的无线光遗传学技术中得到良好的应用.首先,六方相的NaYF₄具有低的声子能量并与掺杂离子具有高的晶格匹配度,是目前公认性能最好的基质材料.自该技术建立以来,所用UCNP均以六方相的NaYF₄为基质^[18, 20, 34].特别是Wang等^[26]通过优化敏化剂离子(Yb³⁺)的掺杂含量来增强UCNP的发光,比传统裸颗粒的发光效率增强了近3倍.基于这种增强型上转换材料开发了可植入的微光极,用于在体内激活表达ChR2和C1V1两种光敏蛋白的神经元,对小鼠的运动行为进行调节.还可通过制备核壳结构提高上转换发光强度.外壳层作为保护层,可以阻止发光中心与表面猝灭中心之间的耦合作用,解决发射荧光的猝灭问题.Lin等^[27]制备发光强度比传统NaYF₄高出大约6倍的核-壳-壳型UCNP,实现了对抑制性光敏蛋白的调控.此外,为了解决UCNP消光系数小及稀土敏化剂激发峰窄的问题,研究人员尝试将有机染料(IR-806)偶联至纳米颗粒表面,以提高上转换发光效率^[19, 40].有机染料分子对光子吸收效率高和吸收峰宽,能够起到天线的作用,有效捕获外界激发光子,通过荧光共振能量传递将能量传递给激活离子,提高上转换发光效率.

3.3.4 增强UCNP与光敏蛋白互动

新技术需要将光敏蛋白表达载体与UCNP通过两次定位手术注入脑组织,两者的组织分布及相互结合直接影响着光遗传调控效果.基因组工程技术可以将光敏蛋白表达限定在特定细胞类型,但是UCNP的组织分布缺乏特异性.尽管已有研究通过表面修饰,提高UCNP与光敏蛋白的靶向结合^[34-35],但是这些研究还停留在细胞水平或低等实验动物中,哺乳动物中枢神经系统中的应用仍未见报道.此外,UCNP的发射波与抑制性光敏蛋白NpHR和Arch的激发光谱不完全匹配.因此,UCNP介导的光遗传学技术常用于神经元活动活化,而抑制作用成功率低^[4, 27].随着UCNP制备工艺的完善,上述问题将得以解决,UCNP介导的无线光遗传学技术将有着更广阔的应用前景.

Table 1 Summary of the applications of UCNP-mediated wireless optogenetics
表1 UCNP介导的无线光遗传学技术应用总结

光敏蛋白	UCNPs	E_x/E_m (nm)	上转换 效率/%	粒径/ nm	材料-神经元界面	功率/ (mW·mm ⁻²)	参考 文献
体内							
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Er@NaYF ₄	980/470	~4	25	含UCNP的pp管控制细纤维植入脊髓	20	[30]
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Tm@NaYF ₄ @SiO ₂	980/470	~2.4	40	900 nl 200 g/L UCNP定位注射VTA (DV: -4.2)	峰值功率: 0.7~2.0 W	[4]
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Tm@NaYF ₄	980/470	~4	25	含UCNP的微光极,植入小鼠STR (DV: -3.0)、VTA(DV: -4.4)或大鼠 皮层(DV: -1.0)	1.5~7	[25- 26]
C1V1	NaYF ₄ :Yb/Er@NaYF ₄	980/540					
C1V1	商业购买的上转换晶体	980/540	0.38	>1 000	600 nl 20 g/L UCNP定位注射mPFC (DV: -1.4)、dSTR(DV: -2.0)	100~400	[28]
ACR1						18.6	
eNpHR3.0	NaYF ₄ :Yb/Er@NaYF ₄ @SiO ₂	980/570			900 nl 200 g/L UCNP注射海马 (DV: -1.4)	峰值功率: 0.25~3.0 W	[4]
eNpHR	NaYF ₄ @NaYF ₄ :Yb/Er@NaYF ₄	980/540	~10	40	含UCNP的微光极,植入大鼠STN (DV: -7.8)或小鼠M2区(DV: -0.5)	6	[27]
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Tm/Nd@NaYF ₄ : Nd@PAA@DBCO	808/456, 480		40	100 g/L UCNP与斑马鱼孵育12 h	8	[24]
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Tm@SiO ₂	980/450, 475		~40	UCNP与细胞直接孵育或饲喂线虫6 h	峰值功率: 4 W	[21]
Chrimson	NaGdF ₄ :Yb, Er, Ca @NaYbF ₄ :Gd, Ca@NaNdF ₄ :Gd, Ca,	808/520, 540, 660		26	5 g/L UCNP饲喂线虫12 h达到饱和	640	[22]
Chrimson and miniSOG	NaNdF ₄ :Yb@NaGdF ₄ :Yb, Tm@NaGdF ₄ :Eu	808/470, 590		19×32	5 g/L UCNP饲喂线虫12 h	5	[23]
TRPC6 channel	NaYF ₄ :Yb/Tm@NaYF ₄	980/455, 475			2 μl 50 g/L UCNP注射SGZ (DV: -1.82 mm)	150	[33]
体外							
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Tm/NaYF ₄	980/450, 470	~3.5	50	UCNP与HeLa细胞孵育过夜	50~350	[34]
ChR2	NaYF ₄ :Yb/Tm@NaYF ₄ @ PLGA	980/470	1~3	46.7	UCNP涂布于爬片表面供细胞生长	1 W	[18]
V5-ChR2m	NaYF ₄ :Yb/Tm@SiO ₂ @PEG@NAv	980 /453, 474		99.5	50 mg/L UCNP与细胞直接孵育30 min	6.5	[35]
ReaChR	NaYF ₄ :Yb/Er@NaYF ₄ :Yb@IR-806	800/540	~5	27.5	UCNP涂布于爬片表面供细胞生长	117~1500	[19]
PsChR	NaYF ₄ :Sc/Yb/Tm@NaYF ₄	975/450, 480	~0.024	500	UCNP涂布于爬片表面供细胞生长	4100	[20]
C1V1, mVChR1	NaYF ₄ :Sc/Yb/Er	975/543		200		5800	
Opto-CRAC	NaYF ₄ :Yb/Tm@NaYF ₄ @PAA@Stv	980/480	2.7	40	20 g/L UCNP与细胞孵育2 h	15	[32]

4 展 望

光遗传学技术是神经科学领域一项革命性实验技术,其关键环节在于光敏蛋白的特异性表达和光-组织界面的建立.近红外光具有组织穿透相对深的优点,非常适用于向深层组织传导光学信号.事实上,在上转换发光纳米颗粒介导下,建立的NIR光遗传技术已经实现神经元活性的无线调控,诱发

多种生理现象.随着纳米生物技术的发展,上转换纳米颗粒介导的无线光遗传学技术的应用将具有以下几方面特征:

a. 应用场景更加多样.与基于微电子设备的无线光遗传相比,UCNP介导的无线光遗传学技术不需要任何头戴式或植入式电子设备,这样该技术可以在富水环境及其他复杂环境下进行实验^[41].摆脱了光纤的束缚及缠绕,可以在社交行为实验中同

时对多只动物进行光遗传调控.同时动物注射纳米材料后头部进行缝合,在外表上和其他同窝动物没有任何异样,这样也能避免在社交实验中因携带电子装置或光纤造成的外形差异而影响实验结果,进一步扩大光遗传学技术的应用范围并提高实验精确性.

b. 调控模式更加丰富.随着纳米材料合成工艺的日趋成熟,赋予了UCNP更丰富的光谱特征.例如研究者通过对吸收过滤壳层厚度的精确调控,成功实现了两组相对独立的正交激发:980 nm激发出 Tm^{3+} 离子的特征性紫外光/蓝光;796 nm激发 Er^{3+} 离子的绿色荧光^[42-43].两组上转换发光是完全相互独立,可以通过两种波长NIR光分别调控不同的光敏蛋白,为UCNP介导的无线光遗传学的多模态调控提供了可能性.此外,纳米颗粒还可作为药物载体,与光遗传学调控协同发挥作用.事实上,在肿瘤的光动力治疗中,已有研究报道了UCNP携带化疗药物与NIR光照产生的ROS协同进行肿瘤细胞的杀伤作用.在基于微电子设备的无线光遗传学,也有研究报道了将光遗传学和药理学联合,实现对负责编码奖赏行为的多巴胺能神经元活性进行复合调控^[44].这也将是UCNP介导的无线光遗传学技术的发展方向.

c. 技术应用更加安全.尽管表面修饰等策略能够提高稀土掺杂的上转换发光颗粒的生物相容性,但是和其他无机材料类似,它们同样存在着难以生物降解、不易代谢排出体外和潜在长期慢性毒性等问题,极大地限制了它们的临床应用.近年来,研究者开始将目光转向有机上转换发光材料.这类材料主要通过有机分子的双光子吸收而产生上转换发光.目前研究较多的有机上转换纳米材料包括纳米胶束包裹的近红外染料和共轭聚合物等.除了具有良好的光转换效率外,这些有机纳米材料不含任何重金属元素,具有较好的生物降解和代谢效率,在生物安全性方面表现出了明显的优势^[45].值得一提的是,有机上转换发光材料还摆脱稀土离子对特定波长NIR光的依赖,能够将吸收范围延伸至第二近红外窗口(NIR-II, 1 000~1 700 nm).与目前普遍使用的NIR-I区相比,II区NIR光与生物组织间相互作用较弱,能够有效降低生物组织对入射光的散射和吸收,提高成像深度的同时降低了热辐射^[46].尽管NIR-II的发射波与光遗传学技术中常用光敏蛋白的激发波长不相符,迄今尚未见使用可降解的上转换材料及NIR-II光进行光遗传调控的研究

报道.但因其生物安全性的优势,这也将成为基于近红外光的无线光遗传技术的一个重要研究方向,具有良好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] 郭晓强.光遗传学:一种行为光控新技术.自然杂志,2019,41(03):197-206
Guo X Q. Optogenetics: a new technology to control behavior using light. Chinese Journal of Nature, 2019, 41(03): 197-206
- [2] 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
- [3] Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. Nat Neurosci, 2015, 18(9): 1213-1225
- [4] Chen S, Weitemier A Z, Zeng X, *et al.* Near-infrared deep brain stimulation *via* upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. Science, 2018, 359(6376): 679-684
- [5] Wang Z, Hu M, Ai X, *et al.* Near-infrared manipulation of membrane ion channels *via* upconversion optogenetics. Advanced Biosystems, 2019, 3(1): e1800233
- [6] All A H, Zeng X, Teh D B L, *et al.* Expanding the toolbox of upconversion nanoparticles for *in vivo* optogenetics and neuromodulation. Adv Mater, 2019, 31(41): e1803474
- [7] Deisseroth K, Hegemann P. The form and function of channelrhodopsin. Science, 2017, 357(6356): eaan5544
- [8] Park S I, Shin G, McCall J G, *et al.* Stretchable multichannel antennas in soft wireless optoelectronic implants for optogenetics. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(50): E8169-E8177
- [9] Shin G, Gomez A M, Al-Hasani R, *et al.* Flexible near-field wireless optoelectronics as subdermal implants for broad applications in optogenetics. Neuron, 2017, 93(3): 509-521
- [10] Klapoetke N C, Murata Y, Kim S S, *et al.* Independent optical excitation of distinct neural populations. Nat Methods, 2014, 11(3): 338-346
- [11] Hooks B M, Lin J Y, Guo C, *et al.* Dual-channel circuit mapping reveals sensorimotor convergence in the primary motor cortex. J Neurosci, 2015, 35(10): 4418-4426
- [12] Bedbrook C N, Yang K K, Robinson J E, *et al.* Machine learning-guided channelrhodopsin engineering enables minimally invasive optogenetics. Nat Methods, 2019, 16(11): 1176-1184
- [13] Gong X, Mendoza-Halliday D, Ting J T, *et al.* An Ultra-sensitive step-function opsin for minimally invasive optogenetic stimulation in mice and macaques. Neuron, 2020, 107(1): 38-51
- [14] Young A T, Cornwell N, Daniele M A. Neuro-nano interfaces: Utilizing nano-coatings and nanoparticles to enable next-generation electrophysiological recording, neural stimulation, and biochemical modulation. Adv Funct Mater, 2018, 28(12): 1700239
- [15] Gu Z, Yan L, Tian G, *et al.* Recent advances in design and fabrication of upconversion nanoparticles and their safe theranostic applications. Adv Mater, 2013, 25(28): 3758-3779
- [16] 林贵娇, 万钢俊, 李慧丽, 等. 上转换纳米材料在生物应用中的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2018, 45(8): 821-832
Lin G, Wan A, Li H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2018, 45(8):

- 821-832
- [17] Chen G, Qiu H, Prasad P N, *et al.* Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chem Rev*, 2014, **114**(10): 5161-5214
- [18] Shah S, Liu J-J, Pasquale N, *et al.* Hybrid upconversion nanomaterials for optogenetic neuronal control. *Nanoscale*, 2015, **7**(40): 16571-16577
- [19] Wu X, Zhang Y, Takle K, *et al.* Dye-sensitized core/active shell upconversion nanoparticles for optogenetics and bioimaging applications. *ACS Nano*, 2016, **10**(1): 1060-1066
- [20] Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, *et al.* Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics. *Sci Rep*, 2015, **5**: 16533
- [21] Bansal A, Liu H, Jayakumar M K G, *et al.* Quasi-continuous wave near-infrared excitation of upconversion nanoparticles for optogenetic manipulation of *C. elegans*. *Small*, 2016, **12**(13): 1732-1743
- [22] Ao Y, Zeng K, Yu B, *et al.* An upconversion nanoparticle enables near infrared-optogenetic manipulation of the *Caenorhabditis elegans* motor circuit. *ACS Nano*, 2019, **13**(3): 3373-3386
- [23] Zhang Y, Zhang W, Zeng K, *et al.* Upconversion nanoparticles-based multiplex protein activation to neuron ablation for locomotion regulation. *Small*, 2020, **16**(8): e1906797
- [24] Ai X, Lyu L, Zhang Y, *et al.* Remote regulation of membrane channel activity by site-specific localization of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Angew Chem Int Ed*, 2017, **56**(11): 3031-3035
- [25] Lin X, Wang Y, Chen X, *et al.* Multiplexed optogenetic stimulation of neurons with spectrum-selective upconversion nanoparticles. *Adv Health Mater*, 2017, **6**(17): 1700446
- [26] Wang Y, Lin X, Chen X, *et al.* Tetherless near-infrared control of brain activity in behaving animals using fully implantable upconversion microdevices. *Biomaterials*, 2017, **142**: 136-148
- [27] Lin X, Chen X, Zhang W, *et al.* Core-shell-shell upconversion nanoparticles with enhanced emission for wireless optogenetic inhibition. *Nano Lett*, 2018, **18**(2): 948-956
- [28] Miyazaki T, Chowdhury S, Yamashita T, *et al.* Large timescale interrogation of neuronal function by fiberless optogenetics using lanthanide micro-particles. *Cell Rep*, 2019, **26**(4): 1033-1043
- [29] Qin X, Xu J, Wu Y, *et al.* Energy-transfer editing in lanthanide-activated upconversion nanocrystals: a toolbox for emerging applications. *ACS Cent Sci*, 2019, **5**(1): 29-42
- [30] Wang Y, Xie K, Yue H, *et al.* Flexible and fully implantable upconversion device for wireless optogenetic stimulation of the spinal cord in behaving animals. *Nanoscale*, 2020, **12**(4): 2406-2414
- [31] Rao P, Wang L, Cheng Y, *et al.* Near-infrared light driven tissue-penetrating cardiac optogenetics *via* upconversion nanoparticles *in vivo*. *Biomed Opt Express*, 2020, **11**(3): 1401-1416
- [32] He L, Zhang Y, Ma G, *et al.* Near-infrared photoactivatable control of Ca^{2+} signaling and optogenetic immunomodulation. *Elife*, 2015, **4**: e10024
- [33] Wang M, Xu Z, Liu Q, *et al.* Nongenetic optical modulation of neural stem cell proliferation and neuronal/glial differentiation. *Biomaterials*, 2019, **225**: 119539
- [34] Pliss A, Ohulchanskyy T Y, Chen G, *et al.* Subcellular optogenetics enacted by targeted nanotransformers of near-infrared light. *ACS Photonics*, 2017, **4**(4): 806-814
- [35] Yadav K, Chou A C, Ulaganathan R K, *et al.* Targeted and efficient activation of channelrhodopsins expressed in living cells *via* specifically-bound upconversion nanoparticles. *Nanoscale*, 2017, **9**(27): 9457-9466
- [36] Owen S F, Liu M H, Kreitzer A C. Thermal constraints on *in vivo* optogenetic manipulations. *Nat Neurosci*, 2019, **22**(7): 1061-1065
- [37] Wang Y F, Liu G Y, Sun L D, *et al.* Nd^{3+} -sensitized upconversion nanophosphors: efficient *in vivo* bioimaging probes with minimized heating effect. *ACS Nano*, 2013, **7**(8): 7200-7206
- [38] Shen J, Chen G, Vu A-M, *et al.* Engineering the upconversion nanoparticle excitation wavelength: cascade sensitization of tri-doped upconversion colloidal nanoparticles at 800 nm. *Adv Opt Mater*, 2013, **1**(9): 644-650
- [39] Han S, Deng R, Xie X, *et al.* Enhancing luminescence in lanthanide-doped upconversion nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2014, **53**(44): 11702-11715
- [40] Zhang D, Wang L, Yuan X, *et al.* Naked-eye readout of analyte-induced NIR fluorescence responses by an initiation-input-transduction nanoplatfrom. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, **59**(2): 695-699
- [41] 刘雪. 808 nm 红外光响应氧化物上转换发光材料及其荧光增强研究[D]. 西安:西北大学, 2019
- Liu X. Research on 808 nm Infrared Light Triggered oxide Up-conversion Luminescence Materials and Their Fluorescence Enhancement[D]. Xi'an: Northwest University, 2019
- [42] Wu M, Yan L, Wang T, *et al.* Controlling red color-based multicolor upconversion through selective photon blocking. *Adv Funct Mater*, 2019, **29**(25): 1804160
- [43] Li X, Guo Z, Zhao T, *et al.* Filtration shell mediated power density independent orthogonal excitations-emissions upconversion luminescence. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(7): 2464-2469
- [44] Jeong J-W, McCall Jordan G, Shin G, *et al.* Wireless optofluidic systems for programmable *in vivo* pharmacology and optogenetics. *Cell*, 2015, **162**(3): 662-674
- [45] 彭锦雯, 杜肖龙, 陈妍, 等. 近红外二区荧光纳米探针的制备及其在生物成像中的应用. *高分子学报*, 2020, **51**(11): 1275-1284
- Peng J, Du X, Chen Y, *et al.* Synthesis and bioimaging application of near-infrared II fluorescence nanoprobe. *Acta Polym Sin*, 2020, **51**(11): 1275-1284
- [46] Hazra C, Ullah S, Serge Corrales Y E, *et al.* Enhanced NIR-I emission from water-dispersible NIR-II dye-sensitized core/active shell upconverting nanoparticles. *J Mater Chem*, 2018, **6**(17): 4777-4785

Research Progress of Upconversion Nanoparticles-mediated Wireless Optogenetics*

LIU Ying-Xun, LI Lin-Yuan, HE Yu-Meng, REN Wei**

(Key Laboratory of Modern Teaching Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Optogenetics has been developed to control the activities and functions of neural circuits with high cell-type specificity and spatiotemporal resolution. However, current optogenetic tools generally rely on visible light with poor tissue penetration ability that does require invasive optical fiber devices to deliver visible light into deep inside brain tissue. These often result in a series of side effects, such as tissue damage and restrict free movement of animals. Fortunately, upconversion nanoparticles (UCNPs)-mediated optogenetic systems facilitate the optogenetic regulation in complex living systems. In this review, the recent advances on design strategies of UCNP-mediated wireless optogenetics in biomedical research are summarized and the future perspectives for refining and advancing UCNP-mediated wireless optogenetics into *in vivo* for remote therapy are proposed.

Key words optogenetics, upconversion nanoparticles (UCNP), near-infrared (NIR) light, wireless manipulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0232

* This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2020JM-305) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (GK201903102).

** Corresponding author.

Tel: 86-29-85308178; E-mail: renwei@snnu.edu.cn

Received: September 30, 2020 Accepted: November 9, 2020