

# 激光与光电子学进展

## 光遗传学用多功能光纤

齐岩坤, 张智浩, 吕时超, 周时凤\*

华南理工大学发光材料与器件国家重点实验室, 广东 广州 510640

**摘要** 光遗传学融合了光学、遗传学与基因工程,以其高时空分辨率和细胞类型特异性两大独特优势克服了传统手段控制神经元活动的许多缺点,为神经领域提供了革命性的研究手段。光遗传技术的发展取决于功能化神经探针的开发。集成了光电多功能模块的多功能光纤探针具有体积小、生物相容性高等优势,可广泛应用于光遗传学中,成为该领域当下研究热点。首先,介绍了光遗传学用神经探针需具备的基本功能,神经探针的分类及集成式神经探针的制备工艺,其次,对应用于光遗传学的多功能光纤探针的国内外研究现状进行了综述,最后,讨论了光遗传学用多功能光纤目前存在的问题及可能的解决方案。

**关键词** 光遗传学; 神经探针; 多功能光纤

中图分类号 TN253 文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP230987

### Multifunctional Optical Fibers for Optogenetics

Qi Yankun, Zhang Zhihao, Lü Shichao, Zhou Shifeng\*

State Key Laboratory of Luminescent Materials and Devices, South China University of Technology,  
Guangzhou 510640, Guangdong, China

**Abstract** Optogenetics is a technology that integrates optics, genetics, and genetic engineering to accurately control the activity of neurons. With the unique advantages of high spatial, temporal resolution and cell type specificity, optogenetics overcomes many shortcomings of traditional methods to control the activity of cells, and provides a revolutionary research method for the field of neurology. The applications of optogenetics technology are governed by the functional neural probes. In recent years, multifunctional optical fiber probe has attracted much attention due to its photoelectric functional, small size and high biocompatibility. First, the basic functions of optogenetic neural probes, the classification of neural probes and the preparation methods of integrated neural probes are introduced. Second, typical applications of multifunctional optical fiber probes in optogenetics are reviewed. Finally, existing problems and possible solutions of multifunctional optical fiber used in optogenetics are discussed.

**Key words** optogenetics; neural probe; multifunctional fiber

## 1 引言

光遗传学技术是一种新兴的神经调节技术,该技术结合遗传工程与光来操控神经元细胞,又被称为光刺激基因工程(Optical stimulation plus genetic engineering)。1971年,Fork<sup>[1]</sup>利用蓝光完成定向神经刺激,成功触发了海兔神经节的动作电位,第一次通过光信号实现对神经元的定向操控。1979年,Crick<sup>[2]</sup>提出了光遗传学的初步概念,即一种可以用光来触发或抑制特定神经元而不影响其他神经元群体的新型光学

方法。2002年,Nagel等<sup>[3]</sup>提出了视紫质通道蛋白ChR1和ChR2。这些视紫红质蛋白来源于单细胞生物(绿藻和细菌等)的微生物视紫红质基因,它们可以作为光敏离子通道或泵,在光照下调节细胞膜上的离子流动,从而激活或抑制细胞的电流产生。2003年,研究人员将ChR2引进神经元内并成功表达出来<sup>[4]</sup>,随后Karl实验室<sup>[5]</sup>在2005年成功实现蓝光对注入光敏蛋白特异神经元的刺激,通过光信号调控患有帕金森小鼠的运动,该实验成果的公布标志着光遗传学的正式诞生。作为一种快速发展的基因和神经工程技

收稿日期: 2023-03-20; 修回日期: 2023-05-07; 录用日期: 2023-05-08; 网络首发日期: 2023-05-18

基金项目: 国家杰出青年科学基金(62125502)

通信作者: \*zhoushifeng@scut.edu.cn

术,光遗传学技术通过光敏感膜蛋白的异源表达,在毫秒时间尺度上光学诱导神经元特异性去极化,实现在较高空间分辨率下对特定神经元群体的光学控制,而不影响大脑中的其他神经元。由于具备更高的选择性和特异性、操作简便、时间和空间精度高的特点,光遗传学在神经再生、脑疾病诊断、基因编辑、肿瘤免疫学和人工智能等领域表现出广阔的应用前景<sup>[6-11]</sup>。作为神经元与外接设备连接的桥梁,光遗传学的广泛应用很大程度上得益于神经探针的开发,如致密三维硅探针、结合微型LED和聚合物电极阵列的硅探针、碳纤维神经探针和光纤探针等<sup>[12-15]</sup>,它将复杂的神经系统与外部世界联系起来,使研究人员操控神经元细胞成为现实。本文将从神经探针具备的基本功能、分类以及集成式光纤探针的制备工艺三方面进行介绍,对光遗传学用多功能光纤探针在国内外的研究进展进行综述。

## 2 光遗传学用神经探针

### 2.1 光遗传学用神经探针的基本功能

光遗传学技术利用基因操作手段,将光敏蛋白(如ChR2、NpHR等)基因导入活细胞,并在细胞膜结构上进行特殊离子通道的表达。经过蓝光、黄光等特定波长光照射,细胞膜结构上特殊离子通道被打开或关闭,离子通道对阴离子或阳离子的通过具有选择性,导致细胞膜两边的电位发生改变,使细胞膜产生去极化或超极化<sup>[16]</sup>。当膜两侧的极化现象减弱到一定程度时会激活神经元,诱导神经元产生电信号,当极化现象加剧则会抑制神经元产生电信号,神经元的激活与抑制会对动物行为产生影响<sup>[17]</sup>。作为光遗传学技术中常用

的工具,神经探针应具备光源及光信号通道以传输特定波长的光来刺激特定区域内含有光敏蛋白的细胞,此外,为验证光刺激的有效性,还需使用电极记录神经元产生的动作电位。因此,神经探针需要具有如下基本功能模块:光源、光信号通道、电信号通道,如图1<sup>[18]</sup>所示。目前,已有研究人员开展了关于神经探针功能模块的开发研究。光源方面,通常使用微型LED或外接激光器作为神经探针的光源<sup>[19-20]</sup>。若使用微型LED作为光源,则需将其耦合到神经探针上,这加大了神经探针的加工难度,因此,以激光器作为光源的神经探针在光遗传学的应用更为普遍。在光信号通道方面,研究人员通常将光波导入神经探针作为神经探针的光信号通道,其中光纤作为一种典型的光波导元件以其能够将光输送到指定区域实现精准刺激的优势而被广泛应用到神经探针中。此外,也有研究人员以微型LED为光源,不使用光波导,直接将LED连接在植入物上插入脑组织进行光遗传学研究<sup>[21]</sup>,这类探针由于未使用光波导,其空间分辨率十分有限。近期,清华大学盛兴课题组<sup>[22]</sup>通过使用微型LED产生双色光实现了在自由行为的小鼠中的双向光遗传调制,该报道为无线光刺激神经元提供了新思路。电信号通道方面,电信号的收集可使用金属电极丝或微电极阵列来完成,尽管使用微电极阵列可实现多通道电信号传输,但被植入后较大的探针体积会导致较大的创口产生,不利于探针的长期使用。为了使探针更加微型化,提高探针的长期稳定性,也可使用电极丝作为电信号通道,通过将金属电极丝与光波导集成到一个截面上,可显著减小探针的体积,避免了使用微电极阵列所引起的大创口。

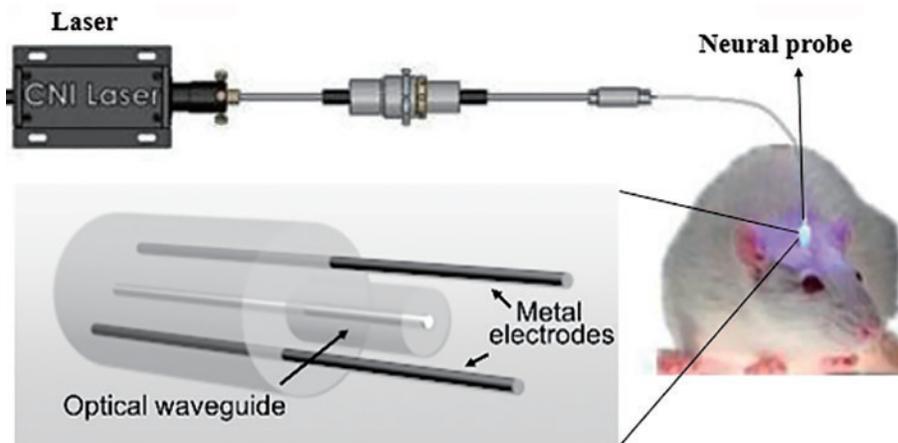


图1 以激光器为光源、光纤为光信号通道、金属电极丝为电信号通道的神经探针示意图<sup>[18]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of neural probe using laser as light source, optical fiber as optical signal transmission channel, and metal electrode wire as electrical signal channel<sup>[18]</sup>

### 2.2 光遗传学用神经探针的分类

根据上述基本功能模块的集成方式不同,可将光遗传学用神经探针分为非集成式与集成式两大类。非集成式探针多使用微电极阵列作为电信号通道。2012

年,Zorzos等<sup>[23]</sup>设计了一种三维波导阵列,以激光为光源,外接光耦合仪实现光耦合。尽管该探针能实现多层多位点刺激,但所使用的耦合仪体积大。2017年,Schwaerzle等<sup>[24]</sup>提出了一种带有激光二极管芯片的硅

基探针。该探针由两个相同的光二极管组成,这两个二极管连接在探针底座上,每个光二极管上设有两个刺激点和 4 个电信号记录点,实现了光刺激和电记录同步。该探针的特点是无需外接耦合仪器。2020 年,He 等<sup>[25]</sup>开发了面向长期稳定神经记录的超柔神经电极。2021 年,Steinmetz 等<sup>[26]</sup>制备了能够长期进行大脑记录的微型化高密度探针。总体而言,非集成式探针存在体积较大的问题,分辨率有待提升,植入后也可能导致组织产生较大创口,且在移动的生物体中难以保证大脑-设备接口的稳定性。

集成式探针是指将光波导和电信号通道集成到一个截面上的一类神经探针,由于功能模块的集中,该类探针体积小,在一定程度上避免了非集成式探针引起的大创口。多功能光纤可作为一种功能优异的集成式神经探针,其概念于 2015 年由麻省理工学院 Fink 教授课题组<sup>[27]</sup>首次提出,并将其应用于光遗传学。作为一种集成式探针,多功能光纤通过传统的热拉伸工艺将多种功能模块一同集成进光纤内,后续经过镀层、水凝胶吸附及激光微加工等工艺还可进一步提升探针性能和拓展其功能<sup>[28-30]</sup>。此外,它还具有体积小、功能模块丰富、生物相容性高等优点。基于上述特性,这类集成式多功能探针近几年引起了广泛的关注。

### 2.3 集成式光纤探针的制备工艺

集成式光纤探针通过预制棒设计、热拉伸工艺及光纤后续加工三个步骤来实现功能模块的集成整合。近几十年来,人们提出了很多制备预制棒的方法,如管棒法、纤芯熔融法、薄膜卷积法及堆叠拉丝法<sup>[31-33]</sup>等,通过设计预制棒的结构及复合各种材料,为光纤探针功能模块的集成提供了基础,如图 2(a)<sup>[34]</sup>所示。热拉伸工艺的原理如图 2(b)<sup>[35]</sup>所示,即由预制棒在高温下熔融,然后借助自身重力或施加外力拉伸成微米级的具有芯包结构的光纤。获得预制棒后,将其置于加热炉中进行热拉伸,热拉伸技术的优势在于它能够同时拉伸玻璃、金属电极丝等多种材料。通过在热拉伸过程中将电极丝输送到预制棒内共同被拉伸,即可获得带有电信号通道的光纤。以此复合光纤为基础制备的神经探针同时实现了光信号通道与电信号通道的集成。复合光纤制备后,还可对光纤进行后续加工处理,以改善探针的性能或拓展其功能。如图 2(c)<sup>[34]</sup>所示,使用水凝胶吸附可使探针植入后引起的组织损伤明显减少,极大地提高了探针的生物相容性。利用飞秒激光烧蚀微型窗口,如图 2(d)<sup>[36]</sup>所示,可使探针实现多位点刺激的同时避免类似非集成式探针所引起的大创口,改善了探针的安全性与耐用性。

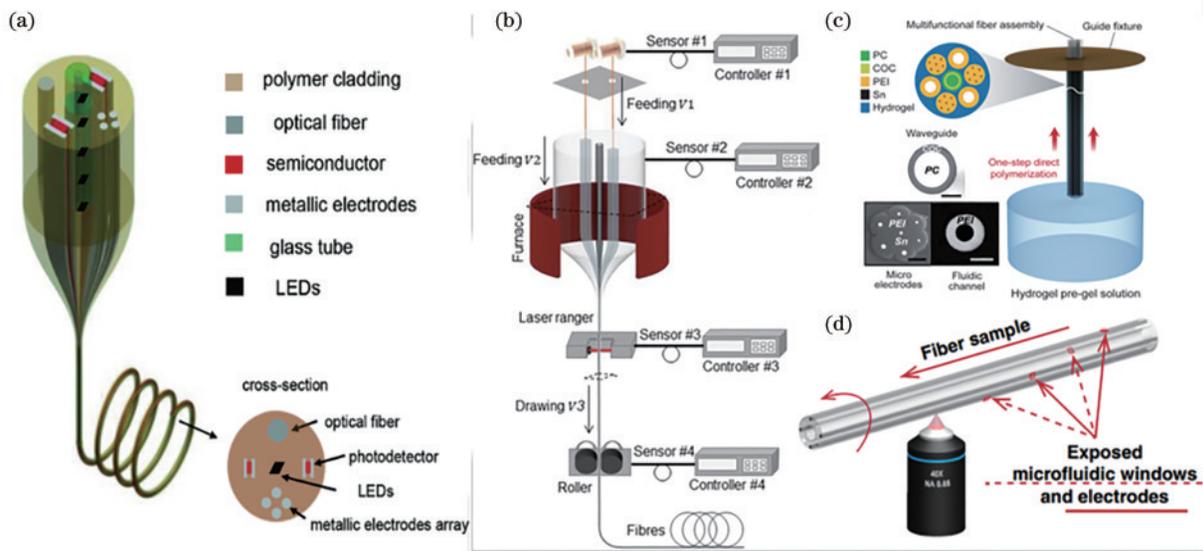


图 2 集成式探针制备工艺图。(a)复合材料的预制棒设计<sup>[34]</sup>;(b)热拉伸工艺原理示意图<sup>[35]</sup>;(c)水凝胶探针的制作<sup>[34]</sup>;(d)飞秒激光微加工工艺示意图<sup>[36]</sup>

Fig. 2 Schematic illustration of the fabrication of integrated probe. (a) Design of prefabricated bars for composite materials<sup>[34]</sup>; (b) schematic diagram of hot stretching process principle<sup>[35]</sup>; (c) preparation of a typical hydrogel probes<sup>[34]</sup>; (d) schematic diagram of femtosecond laser micromachining process<sup>[36]</sup>

## 3 光遗传学用多功能光纤

### 3.1 光电功能一体化神经探针

光电功能一体化是集成式光纤探针在光遗传学领域应用的基本要求。2015 年,Canales 等<sup>[27]</sup>首次提出了多功能神经探针,并将其应用于光遗传学。他们提出

了一种由聚合物、金属和复合材料共同组成的神经探针,该探针通过热拉伸工艺制得。由于构成预制件的材料要一起加热,它们必须在拉伸温度下具有足够低的黏度,因此材料应具有相似的玻璃化转变温度(对于非晶材料而言)和熔化温度(对于晶体材料而言)。鉴于此,该课题组使用热拉伸工艺制造了基于聚碳酸酯-

环烯共聚物-碳载聚乙烯(PC-COC-CPE)和聚苯砜-聚醚酰亚胺-锡(PPSU-PEI-Sn)材料组合的具有不同几何形状的多功能神经探针,如图3(a)<sup>[27]</sup>所示。利用PC与COC核之间的折射率差异实现了良好的导光,CPE作为记录电极,实现了光传输与电信号记录的同步。将该探针植入转基因小鼠的内侧前额叶皮层

(mPFC),长时间体内记录、光刺激、药物扰动和组织反应的结果证明,该探针可以形成稳定的脑机接口,实验结果如图3(b)<sup>[27]</sup>所示。此外,由于探针由聚合物组成,因此生物相容性较好。但与金属电极相比,CPE导电性能较差,导致电位记录能力较低,进而影响探针的空间分辨率。

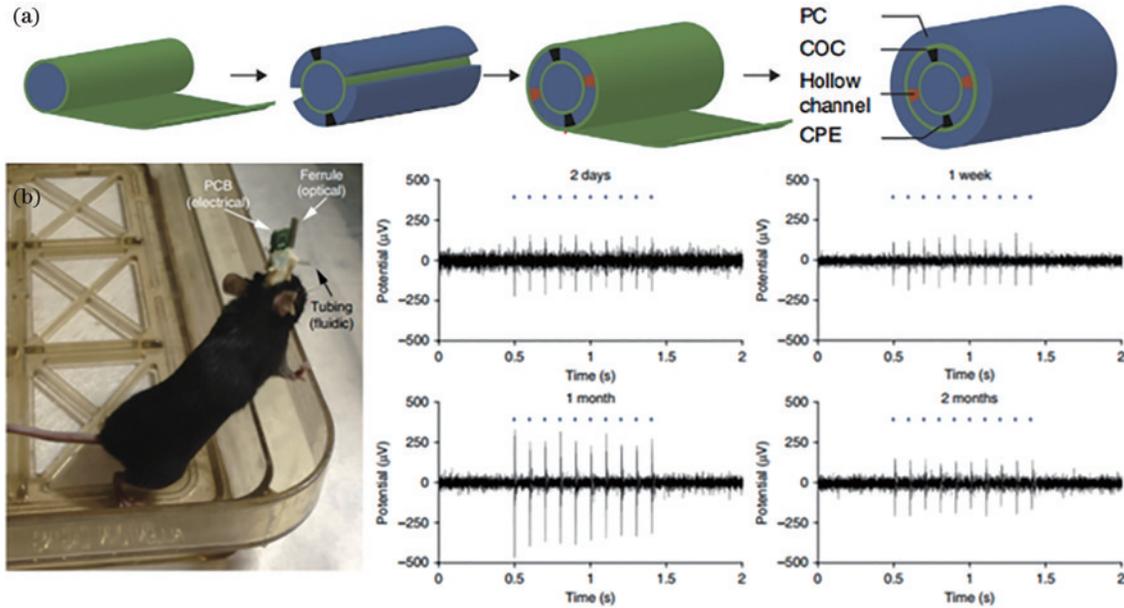


图3 多功能探针预制体制备及应用于活体小鼠的示意图。(a)光纤探头预制体的制作示意图;(b)探针植入小鼠的mPFC进行同步光遗传刺激后2天、1周、1个月和2个月的电生理信号<sup>[27]</sup>

Fig. 3 Schematic diagram of the multifunctional probe prefabrication and the application of a living mouse. (a) Schematic diagram of fabrication of optical fiber probe precast; (b) electrophysiological signals at 2 days, 1 week, 1 month, and 2 months after the probe was implanted in the mPFC of mice and subjected to synchronous photogenetic stimulation<sup>[27]</sup>

为了进一步提高探针的性能,2017年, Park等<sup>[37]</sup>制备了一种微型全聚合物神经探针。该探针同样是使

用热拉伸工艺制得,包含记录电极、光波导和微流体通道,如图4(a)<sup>[37]</sup>所示。为提高电极的导电性,研究制

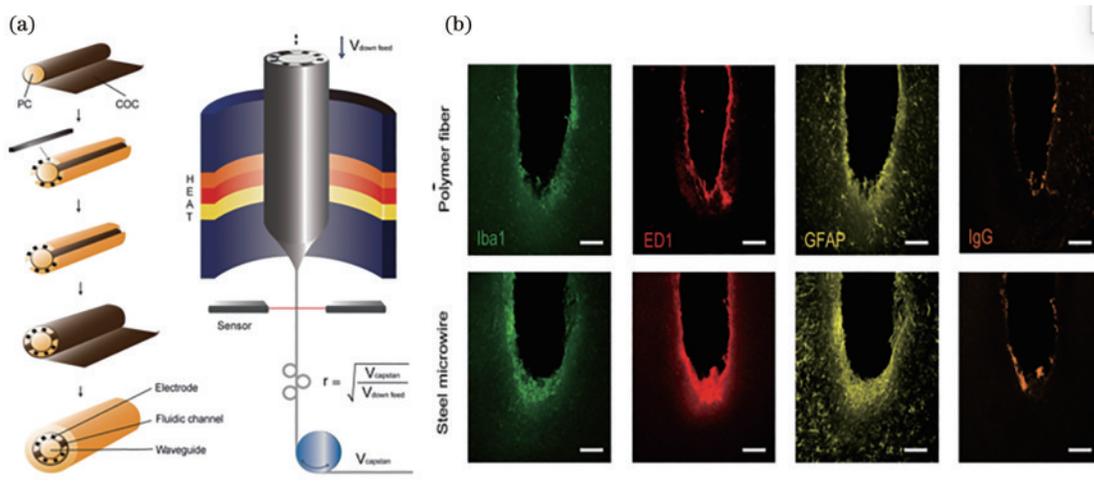


图4 全聚合物神经探针制备及其具备良好生物相容性的示意图。(a)包含记录电极、光波导和微流体通道的预制棒制作及热拉伸过程;(b)植入探针与不锈钢微线1个月各自周围形成胶质瘢痕和血脑屏障突破的共聚焦显微镜图像(比例尺为100 μm)<sup>[37]</sup>

Fig. 4 Schematic diagram of the preparation of an all-polymer neural probe and its good biocompatibility. (a) Fabrication and thermal stretching of prefabricated rods including recording electrodes, optical waveguides, and microfluidic channels; (b) confocal microscope images of glial scar formation and blood-brain barrier breach around the implanted probe and stainless steel microwires at 1 month respectively (scale bar is 100 μm)<sup>[37]</sup>

备了一种由 CPE 和质量分数 5% 的石墨组成的导电聚合物复合材料(gCPE)。与 CPE 相比,片状 gCPE 的电阻降低了 41%。研究人员以 PC 为纤芯、以 COC 为包层、以 6 个 gCPE 为电极制得预制体,然后热拉伸制得 100 m 的光纤,通过调整拉伸参数,电极和微流体通道尺寸减小到 20~30  $\mu\text{m}$ ,而波导直径调节到 50~80  $\mu\text{m}$ ,最终使整个集成结构的直径仅为 180~220  $\mu\text{m}$ 。单神经元动作电位的记录实验和长期稳定性结果都表明了探针具有优异的光电特性。将该探针植入大脑 1 个月后,与植入不锈钢微线相比,胶质瘢痕和血脑屏障突破有所减少,也证实了探针具有良好的生物相容性,如图 4(b)<sup>[37]</sup>所示。研究人员还将探针应用于单个大脑区域和投影电路中 ChR2 表达的动态光电生理研究中,进一步展示了该微型光纤探针的实用性。

2020 年, Du 等<sup>[35]</sup>通过光纤拉丝工艺制备了一种柔性多模态光纤探针,该探针是由用于神经信号记录的金属电极和用于光刺激的双包层波导共同组成的。以 PC 为纤芯、聚偏氟酸乙烯(PVDF)为内包层、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)为外包层,制得 PC-PVDF-PMMA 复合预制件,通过热拉伸将金属电极嵌入到光纤内。这种双包层波导可将光限制在内芯,而用于电信号记录的金属电极则被嵌入在光纤探针外层。该特殊结构的设计不仅提高了探针的光传输性能,也使其具有优异的机械性能以及较低的比阻抗。同时,它具有尺寸小(质量仅有 0.3 g)、灵活性高、生物相容性好、

光传输性能强以及电阻抗低等优点。利用上述光纤探针,实现了活体小鼠高分辨率(单细胞水平)和长期高灵敏度(至少 10 周)的同步光学刺激和神经信号记录。信噪比是全聚合物探针的 6 倍,高达 30 dB。

2021 年, Park 等<sup>[34]</sup>在模拟脑组织的软水凝胶基质中制备了一种由多材料纤维紧密集成的多功能探针,该探针具有自适应弯曲强度。自适应弯曲强度的概念解释如图 5(a)<sup>[34]</sup>所示,脱水后的探针在初次插入大脑皮层时表现出足够的弯曲刚度,植入后探针从周围组织中吸收水分并转化为顺应性肿胀状态。研究人员首先通过热拉伸制得由 PC 芯和 COC 包层组成的单个功能光纤,光纤内包含由 7 根封装在 PEI 包层中的 Sn 线组成的微电极阵列,以及用于微流体通道的 PEI 管。为了充分利用水凝胶的机械和化学特性同时不影响探针的性能,在水凝胶基质中集成了微型光纤组件,该组件包含 1 个波导、3 个微电极阵列及 3 个微流体通道。由于探针在水凝胶基质内集成,探针与神经组织之间机械性能的不匹配得到了改善。水凝胶基体还能有效地解耦探针弯曲过程中单根光纤的应力场,使探针的弯曲刚度明显低于相同尺寸的其他种类探针。因此,植入后探针诱导周围神经组织的应力和应变显著降低,如图 5(b)<sup>[34]</sup>所示。此外,干燥和完全水化的水凝胶之间弹性模量的差异使得探针在无需借助夹具的情况下可直接插入大脑深层,增强了探针的长期生物相容性。将探针植入自由运动的小鼠脑中,能跟踪分离单神经元动作电位长达 6 个月。

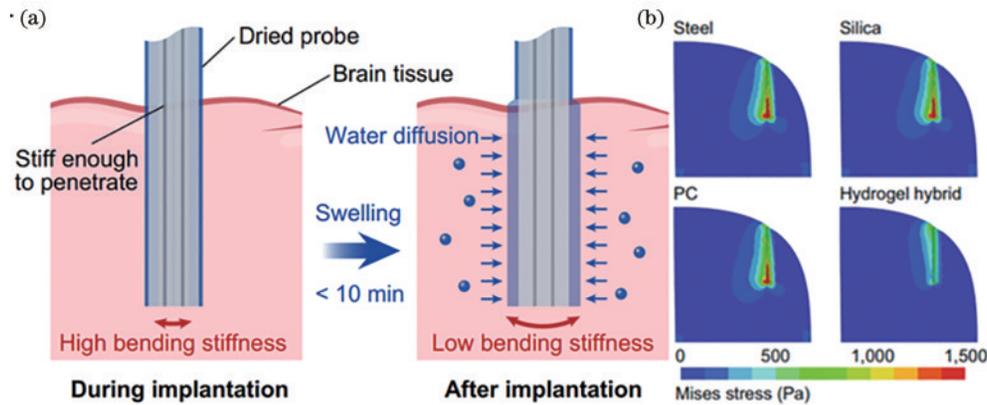


图 5 水凝胶探针自适应弯曲刚度及其与神经组织的机械性能高匹配性。(a)自适应弯曲刚度的概念说明;(b)不锈钢、二氧化硅和 PC 纤维以及水凝胶探针在脑组织横向微运动时的脑组织内 Mises 应力分布<sup>[34]</sup>

Fig. 5 The adaptive bending stiffness of hydrogel hybrid probes and its high matching with mechanical properties of nerve tissue. (a) Description of the concept of adaptive bending stiffness; (b) Mises stress distribution of stainless steel, silica, PC fibers, and hydrogel hybrid probes in brain tissue during lateral micromotion<sup>[34]</sup>

为了获得超低损耗、低阻抗,同时具有宽频响应的神经探针, Dai 等<sup>[38]</sup>研究人员于 2023 年制备了一种多材料玻璃光纤探针,该探针是以高折射率玻璃(HBG<sub>1</sub>)和低折射率玻璃(HBG<sub>2</sub>)两种硼硅酸盐玻璃作为纤芯,硼硅玻璃(LBG)作为包层材料,通过热拉伸制得的。探针以高熔点金属(如铂和钨)作为记录电极,相比于

此前报道的 CPE 电极,阻抗降低了一个数量级。由于神经信号的信噪比增大,探针的分辨率也得到显著改善。与此前报道的全聚合物纤维探针相比,该探针在 338~2753 nm 的超宽波段表现出优异的光传输性能,为近红外甚至中红外光遗传刺激和临床治疗提供了新的可能。此外,该探针具有优良的光学性能,与此前的

报道相比,其光纤损耗显著降低,损耗值可控制在 0.01306 dB/cm 以内。另外探针的力学性能,包括弯曲刚度、存储模量和应力,也比之前报道的探针更强,因此适用于深部脑组织的神经调节。研究进一步做了该探针在自由运动的小鼠深部脑组织中进行长期神经刺激和神经元弱电信号探测的演示。

### 3.2 多刺激位点神经探针

基于光纤的光电一体化神经探针使同步光刺激和电记录成为可能。然而,这些神经探针的连接位点被限制在单一位置,通常是在光纤末端,这极大地限制了这些多功能神经探针的广泛应用。将神经探针的单一连接位点拓展到空间多位点对光遗传学应用于基础神经科学和临床的发展具有重要意义。为了实现这一目标,2019年,Vasudevan等<sup>[30]</sup>制备了一种多功能多孔光电光纤(LOEF)。LOEF同时具备以下三个功能:激活神经元上的光敏离子通道;作为光波导传输蓝光以刺激神经元释放多巴胺;作为实时检测多巴胺释放的电化学传感器,如图6(a)<sup>[30]</sup>所示。通过将商用熔融硅基光纤在惰性氮气气氛中于900℃热解,在热解过程中,光纤上的聚酰亚胺缓冲层会发生分解,从而在包层

周围形成一层薄的碳层,由此产生的导电热解碳涂层已被证明是一种极好的电极材料,并可用于检测多巴胺。为了评估热解过程对光纤光学功能的影响,该课题组采用剪切法分析了热解前后光纤的光传输性能,证实了热解后其透射功率无明显变化。通过目视碳包层没有漏光,确认了碳层中没有任何的不连续,这就得到了具有光学和电学特性的光纤,即光电光纤(OEF)。为了将OEF转换为LOEF,使用高功率皮秒激光通过热解碳涂层、包层和光纤芯烧蚀微光学窗口,光纤的入射角和临界角局部减小,从而导致光从纤芯中漏出,如图6(b)<sup>[30]</sup>所示。在烧蚀过程中,通过改变激光脉冲的功率和频率来优化这些微光学窗口的深度,以允许足够的光泄漏,同时保持光纤的机械完整性。该课题组对LOEF漏光的强度和空间分布进行了表征和优化,以实现多位点光刺激,如图6(c)、(d)<sup>[30]</sup>所示。利用六氨基钌氧化还原偶联和多巴胺表征了LOEF的电化学性能,利用计时电流法,将光通过LOEF,同时检测多巴胺被释放的能力,证实了该LOEF被应用的可能性,也为多刺激位点神经探针的开发提供了思路。

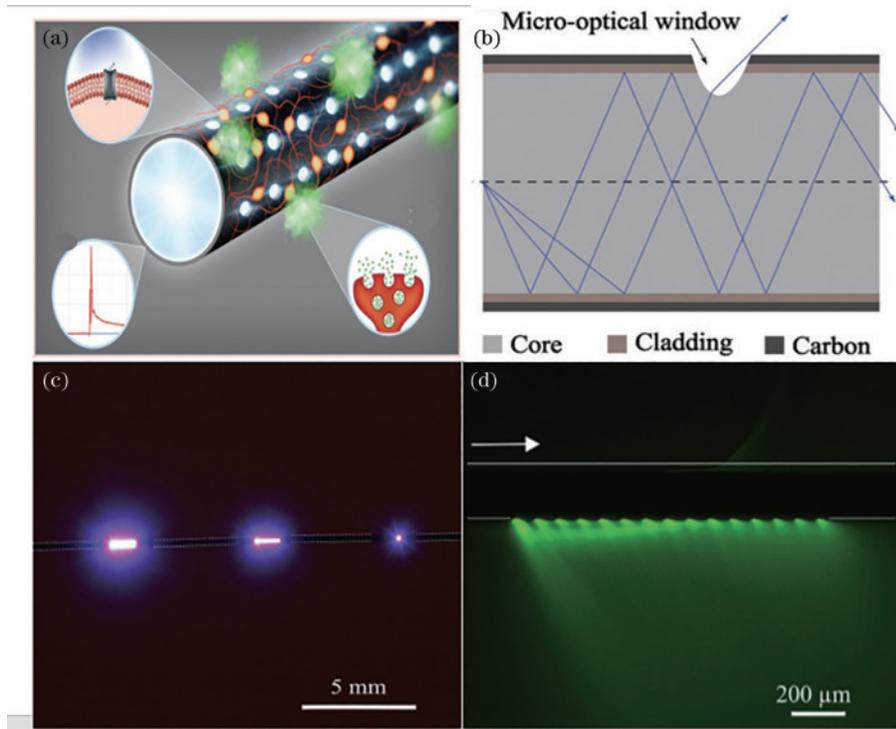


图6 多孔光电光纤的设计及其漏光演示示意图。(a)LOEF的三个功能;(b)激光烧蚀的微型窗口实现漏光的原理示意图;(c)从右至左表示单个、 $1 \times 10$ 和 $2 \times 10$ 微型窗口的不同漏光强度照片;(d)明胶中荧光纳米珠围绕LOEF的图像,显示窗口漏光的空间分布<sup>[30]</sup>

Fig. 6 Schematic diagram of the design of LOEF and the demonstration of its light leakage. (a) Three functions of LOEF; (b) schematic diagram of the principle of light leakage by laser ablation of the micro-window; (c) different light leak intensity from a pattern of a single,  $1 \times 10$ , and  $2 \times 10$  micro-windows (from right to left); (d) image of fluorescent nanobeads in gelatin surrounding the LOEF showing the spatial distribution of light leak<sup>[30]</sup>

为了进一步改进多材料光纤探针的功能,实现光刺激、电记录和药物输送同步进行,使探针由单位点

刺激拓展到空间多位点刺激,Jing等<sup>[36]</sup>于2020年开发了空间可扩展的多功能纤维探针。该探针以PC

为纤芯,聚偏二氟乙烯为包层,在波导旁加工了 6 个凹槽,其中 2 个插入 BiSn 合金作为电极,另外 4 个作为流体通道,制得预制体后,利用热拉伸工艺获得光纤。为了在探针上创建多位点接口,该课题组使用飞秒激光微加工技术在沿光纤长度的间隔位置上烧蚀电极记录位点、微流体通道开口和波导窗口,使用具有螺旋空心通道的支架将探针以指定的角度导入脑组织以实现植入后探针阵列的扩展。该探针可用于记录局部的峰电位活动和场电位,并在脑深部区域进行光刺激和化学调节活动,进而绘制和调节脑深部区域的大脑活动。长期的记录实验表明,该探针可以在多个位置得到电信号读数。此外,通过将探针植入慢性癫痫小鼠,检测到了发作期和间歇期不同大脑区域的不同峰电位活动,从而证实了该 3D 多功能神经探针的实用性。

### 3.3 诊疗一体化神经探针

光电功能一体化神经探针的开发实现了光植入与

电极记录的同步,将传统光遗传技术的三步手术化为两步手术,推动了光遗传学向前发展。为了进一步简化光遗传实验, Park 等<sup>[37]</sup>在光电功能一体化探针的基础上,在探针上预留微流体通道来输送携带光敏基因的病毒载体,通过将探针植入小鼠的内侧前额叶皮层,实现了仅需一步手术完成的光遗传实验,如图 7(a)、(b)<sup>[37]</sup>所示。这种集光电功能、给药通道于一体的诊疗一体化神经探针不仅简化了光遗传技术的繁琐步骤,也提升了实验结果的可靠性,更避免了多次外科手术对自由小鼠脑部带来的伤害。由于具备操作方便、结果可靠的优势, Park 等<sup>[34]</sup>在制备水凝胶探针时也预留了微流体通道用于病毒输送,如图 7(c)<sup>[34]</sup>所示。Jing 等<sup>[36]</sup>在制备空间可拓展的神经探针时,同样预留了 4 个凹槽作为微流体通道。研究人员用飞秒激光烧蚀探针获得多个微流体通道开口,将带有光敏基因的病毒输送到不同的位置,从而达到了多位点刺激不同区域的目的。

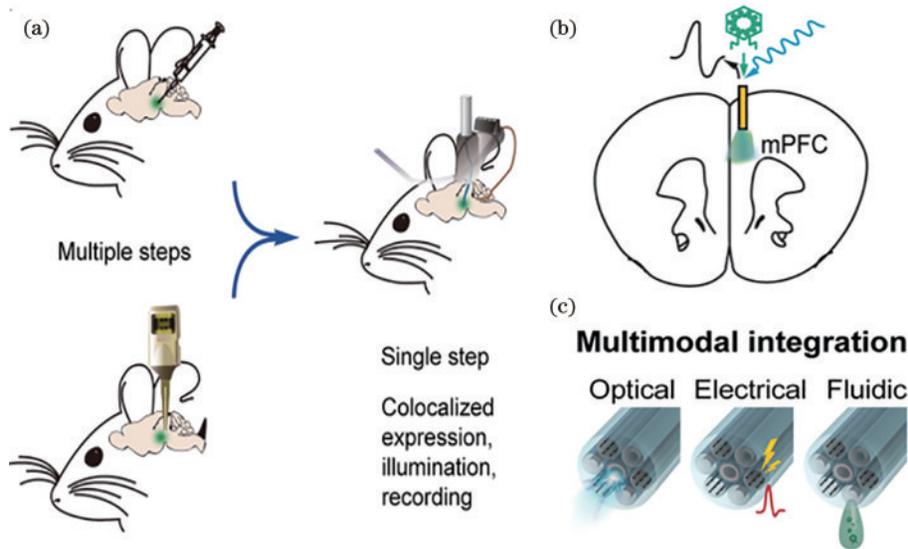


图 7 多功能神经探针实现简化光遗传实验的示意图。(a)光遗传实验的两步手术和由多功能光纤探针实现一步手术的对比示意图;(b)用光纤探针在小鼠的 mPFC 同步进行病毒递送、光刺激和电记录的示意图;(c)光纤探针的光电功能与微流体通道的集成<sup>[34,37]</sup>

Fig. 7 Schematic diagram of the multifunctional neural probe to simplify optogenetic experiments. (a) Schematic comparison of two-step operation performed by photogenetic experiment and one-step operation performed by multifunctional fiber probe; (b) schematic illustration of simultaneous viral delivery, optical stimulation and electrical recording in mPFC of mice with fiber probe; (c) integration of fiber probe photoelectric function with microfluidic channels<sup>[34,37]</sup>

## 4 结束语

集光功能、电功能、微流体通道等多种功能于一体的多功能光纤探针以其功能模块集中、体积小、在植入区域产生的创口小等优势而被广泛应用于光遗传学。本文介绍了光遗传学的工作原理、神经探针应用于光遗传学需要具备的功能模块、神经探针的分类和集成式光纤探针的制备工艺及应用。对多功能光纤探针应用于光遗传学的发展进行展望,包括两个方面:

1) 从功能开发方面来讲,多功能光纤探针目前受

结构的影响,多数只能实现单通道光刺激。动物的大脑皮层是标志性的层状结构,不同层在不同的刺激下会对动物行为产生不同的影响<sup>[39]</sup>,多功能光纤探针的单通道只能对单层进行光刺激,这限制了探针在光遗传中的应用,因此,未来需要开发具有多通道的多功能光纤探针以实现多层刺激的交替或同步。此外,对神经元进行光刺激会导致其周围微环境发生变化,比如温度和 pH 值,若将温度传感器和 pH 值传感器等集成到多功能光纤探针上并应用于光遗传学,或许会进一步促进光遗传学的发展。还可将多功能光纤探针锥形

化,锥化后部分刺激光会被引导到光纤外使其对外界环境折射率变化变得高度敏感<sup>[40]</sup>,锥化还能减小对神经组织的损伤。

2) 从具体应用方面来讲,多功能光纤探针目前仍需外接激光才能实现对细胞的光刺激,这种物理连接严重限制了自由活体的运动,也会引起不必要的反应,对探针的长期稳定性产生不利影响<sup>[41]</sup>,这是当前面临的一个主要问题。此外,多功能光纤探针的生物相容性仍需进一步改善。尽管目前已通过使用聚合物光纤探针、水凝胶探针减小了对植入区域的损伤,但聚合物光纤探针的低分辨率和水凝胶探针的高损耗使得它们都难以应用于深部脑刺激。因此,未来研制出能够实现长期无线光刺激及具有更高生物相容性的神经探针,对光遗传学的发展意义重大。例如目前,通过使用各种生物材料以其柔性、可降解性等优势制备植入式的光电器件已被研究<sup>[42-43]</sup>,未来,用这类生物可降解材料制备多功能光纤探针可使探针的生物相容性进一步得到改善。

### 参 考 文 献

- [1] Fork R L. Laser stimulation of nerve cells in *Aplysia*[J]. *Science*, 1971, 171(3974): 907-908.
- [2] Crick F H C. Thinking about the brain[J]. *Scientific American*, 1979, 241(3): 219-232.
- [3] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, et al. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae[J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2395-2398.
- [4] Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(24): 13940-13945.
- [5] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8(9): 1263-1268.
- [6] Xu X M, Ordaz J, Wu W. Optogenetics and its application in neural degeneration and regeneration[J]. *Neural Regeneration Research*, 2017, 12(8): 1197.
- [7] Yizhar O, Fenno L E, Davidson T J, et al. Optogenetics in neural systems[J]. *Neuron*, 2011, 71(1): 9-34.
- [8] Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, et al. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(7): 755-760.
- [9] Xu Y X, Hyun Y M, Lim K, et al. Optogenetic control of chemokine receptor signal and T-cell migration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(17): 6371-6376.
- [10] Hassabis D, Kumaran D, Summerfield C, et al. Neuroscience-inspired artificial intelligence[J]. *Neuron*, 2017, 95(2): 245-258.
- [11] Sinnen B L, Bowen A B, Forte J S, et al. Optogenetic control of synaptic composition and function[J]. *Neuron*, 2017, 93(3): 646-660.
- [12] Liu J, Fu T M, Cheng Z G, et al. Syringe-injectable electronics[J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(7): 629-636.
- [13] Rios G, Lubenov E V, Chi D, et al. Nanofabricated neural probes for dense 3-D recordings of brain activity[J]. *Nano Letters*, 2016, 16(11): 6857-6862.
- [14] Fu T M, Duan X J, Jiang Z, et al. Sub-10-nm intracellular bioelectronic probes from nanowire-nanotube heterostructures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(4): 1259-1264.
- [15] Tamaki S, Kuki T, Matsunaga T, et al. Flexible tube-shaped neural probe for recording and optical stimulation of neurons at arbitrary depths[J]. *Sensors and Material*, 2015, 27(7):507-523.
- [16] Liu Q, Gan L H, Ni J, et al. Dcf1 improves behavior deficit in drosophila and mice caused by optogenetic suppression[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(12): 4210-4215.
- [17] Miesenböck G. Optogenetic control of cells and circuits[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27: 731-758.
- [18] Method of the year 2010[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 1.
- [19] LeChasseur Y, Dufour S, Lavertu G, et al. A microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons *in vivo*[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 319-325.
- [20] Stark E, Koos T, Buzsáki G. Diode probes for spatiotemporal optical control of multiple neurons in freely moving animals[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2012, 108(1): 349-363.
- [21] Wu F, Stark E, Ku P C, et al. Monolithically integrated  $\mu$ LEDs on silicon neural probes for high-resolution optogenetic studies in behaving animals[J]. *Neuron*, 2015, 88(6): 1136-1148.
- [22] Li L Z, Lu L H, Ren Y Q, et al. Colocalized, bidirectional optogenetic modulations in freely behaving mice with a wireless dual-color optoelectronic probe[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 839.
- [23] Zozos A N, Scholvin J, Boyden E S, et al. Three-dimensional multiwaveguide probe array for light delivery to distributed brain circuits[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(23): 4841-4843.
- [24] Schwaerzle M, Paul O, Ruther P. Compact silicon-based optrode with integrated laser diode chips, SU-8 waveguides and platinum electrodes for optogenetic applications[J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2017, 27(6): 065004.
- [25] He F, Lycke R, Ganji M, et al. Ultraflexible neural electrodes for long-lasting intracortical recording[J]. *iScience*, 2020, 23(8): 101387.
- [26] Steinmetz N A, Aydin C, Lebedeva A, et al. Neuropixels 2.0: a miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings[J]. *Science*, 2021, 372(6539): abf4558.
- [27] Canales A, Jia X T, Froriep U P, et al. Multifunctional fibers for simultaneous optical, electrical and chemical

- interrogation of neural circuits *in vivo*[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 277-284.
- [28] Kang H, Hong W, An Y J, et al. Thermoplasmonic optical fiber for localized neural stimulation[J]. ACS Nano, 2020, 14(9): 11406-11419.
- [29] Tabet A, Antonini M J, Sahasrabudhe A, et al. Modular integration of hydrogel neural interfaces[J]. ACS Central Science, 2021, 7(9): 1516-1523.
- [30] Vasudevan S, Kajtez J, Bunea A I, et al. Leaky optoelectrical fiber for optogenetic stimulation and electrochemical detection of dopamine exocytosis from human dopaminergic neurons[J]. Advanced Science, 2019, 6(24): 1902011.
- [31] 楚玉石, 张建中, 彭纲定. 增材制造在特种石英光纤制备中应用的研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(15): 1516003.  
Chu Y S, Zhang J Z, Peng G D. Research progress of additive manufacturing in the preparation of special Shi Ying optical fiber[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(15): 1516003.
- [32] Temelkuran B, Hart S D, Benoit G, et al. Wavelength-scalable hollow optical fibres with large photonic bandgaps for CO<sub>2</sub> laser transmission[J]. Nature, 2002, 420(6916): 650-653.
- [33] Lin T C, Zhao J Z, Cao C Z, et al. Fabrication of metal-polymer nanocomposites by In-fiber instability[J]. Journal of Micro and Nano-Manufacturing, 2016, 4(4): 041008.
- [34] Park S, Yuk H, Zhao R K, et al. Adaptive and multifunctional hydrogel hybrid probes for long-term sensing and modulation of neural activity[J]. Nature Communications, 2021, 12: 3435.
- [35] Du M H, Huang L, Zheng J J, et al. Flexible fiber probe for efficient neural stimulation and detection[J]. Advanced Science, 2020, 7(15): 2001410.
- [36] Jing S, Patel D C, Kim J, et al. Spatially expandable fiber based probes as a multifunctional deep brain interface [J]. Nature Communications, 2020, 11: 6115.
- [37] Park S, Guo Y Y, Jia X T, et al. One-step optogenetics with multifunctional flexible polymer fibers[J]. Nature Neuroscience, 2017, 20(4): 612-619.
- [38] Dai Y, Du M H, Huang L, et al. Multimaterial glass fiber probe for deep neural stimulation and detection[J/OL]. Advanced Optical Materials: 2022: 1-11 [2023-03-30]. <https://doi.org/10.1002/adom.202202184>
- [39] Cai X, Li L Z, Liu W H, et al. A dual-channel optogenetic stimulator selectively modulates distinct defensive behaviors[J]. iScience, 2022, 25(1): 103681.
- [40] 刘壮, 杨玲珍, 王娟芬, 等. 基于氧化石墨烯功能化锥形光纤的血红蛋白传感研究[J]. 激光与光电子学进展, 2023, 60(5): 0517001.  
Liu Z, Yang L Z, Wang J F, et al. Study on hemoglobin sensing by graphene oxide functionalized tapered optical fiber[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2023, 60(5): 0517001.
- [41] Gutruf P, Krishnamurthi V, Vázquez-Guardado A, et al. Fully implantable optoelectronic systems for battery-free, multimodal operation in neuroscience research[J]. Nature Electronics, 2018, 1(12): 652-660.
- [42] 盛兴, 赵汶鑫, 李丽珠, 等. 脑机接口技术的基础研究: 神经元与二极管[J/OL]. 中国激光: 1-21 [2023-03-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1339.TN.20230309.1743.004.html>
- [43] Sheng X, Zhao W X, Li L Z, et al. Foundation of brain-machine interfaces: neurons and diodes[J/OL]. Chinese Journal of Lasers: 1-21 [2023-03-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1339.TN.20230309.1743.004.html>
- [43] Chiong J A, Tran H, Lin Y J, et al. Integrating emerging polymer chemistries for the advancement of recyclable, biodegradable, and biocompatible electronics [J]. Advanced Science, 2021, 8(14): 2101233.