

·综述·

光遗传学技术在缺血性脑卒中研究中的应用

李依娜¹, 张旭², 叶樱泽¹, 古丽娟¹

1. 武汉大学人民医院中心实验室, 湖北 武汉 430060

2. 武汉大学人民医院神经外科, 湖北 武汉 430060

摘要:光遗传学技术整合了光学和遗传学,能够利用光特异地在时间及空间两方面精确控制细胞的活性。越来越多的研究证明光遗传学在理解脑未知的组织功能,以及中枢神经系统疾病的治疗方面有巨大的潜力。缺血性脑卒中是常见的脑血管疾病,死亡率、致残率高。光遗传学对于部分特定的脑区、神经回路及神经元的调控能够有效地促进缺血性脑卒中后神经功能的恢复。该综述简单地介绍了光遗传学技术的原理,总结了近年光遗传学技术在缺血性脑卒中研究中的应用情况。

[国际神经病学神经外科学杂志,2021,48(4): 396-401]

关键词:缺血性脑卒中;光遗传学技术;神经回路

中图分类号:R743.33

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.04.016

Application of optogenetic technology in the study of ischemic stroke

LI Yi-Na¹, ZHANG Xu², YE Ying-Ze¹, GU Li-Juan¹

1. Central Laboratory of Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

2. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

Corresponding author: GU Li-Juan, Email: gulijuan@whu.edu.cn

Abstract: Optogenetic technology, integrating optics and genetics, can utilize light to precisely control cell viability in time and space. More and more studies have demonstrated the great potential of optogenetics in understanding the unknown tissue functions of the brain and in the treatment of central nervous system diseases. Ischemic stroke is a common cerebrovascular disease, with characteristics of high mortality rate and high disability rate. The regulation of optogenetics on some specific brain regions, neural circuits, and neurons can effectively promote the recovery of neurological function after ischemic stroke. This article reviews the principle of optogenetic technology and the application of optogenetic technology in the study of ischemic stroke in recent years.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery,2021,48(04):396-401.]

Keywords: ischemic stroke; optogenetic technology; neural circuit

光遗传学是一项整合光学、软件控制、遗传学、电生理等多学科交叉的生物工程技术,它主要是通过采用基因操作技术将编码光敏蛋白的基因导入特定类型的神经细胞中表达,光敏蛋白在特定光照的刺激下对细胞产生兴奋或抑制的作用,从而实现对神经细胞的控制^[1]。

缺血性脑卒中由脑部血液供应突然中断引起,以神经元功能障碍和神经细胞受损为特征。脑的不同核团、

不同脑区功能各异,并能相互促进或抑制,形成环路。缺血性脑卒中局部核团及脑区的破坏,不仅会影响其本身功能的执行,也会破坏其所在环路的功能,进而影响缺血灶周围甚至远处的核团及脑区功能,造成极差的预后。而光遗传学在脑卒中领域的应用,可以使探索脑卒中发生后核团及脑区受到的影响及其相互之间的联动具有较高的时间与空间精准性。故越来越多的学者开始挖掘光

收稿日期:2020-12-21;修回日期:2021-04-01

作者简介:李依娜(1998—),女,医学本科生,主要从事脑缺血再灌注损伤发病机制的研究。

通讯作者:古丽娟(1973—),女,医学博士,副教授,主要从事脑缺血再灌注损伤发病机制的研究。Email: gulijuan@whu.edu.cn。

遗传学技术在治疗缺血性脑卒中或是研究其病理方面的可能性,现就目前相关的研究成果予以综述,以期对缺血性脑卒中的研究及治疗提供新的思路。

1 光遗传学技术原理

光敏蛋白是一种在特定光的刺激下能够改变自身构象,使特定离子能够跨膜运动的蛋白。常用的光敏蛋白包括:在莱茵衣藻中发现的钠离子通道视紫红质-2(channelrhodopsin-2, ChR2),它响应蓝光使钠离子进入细胞使细胞膜去极化从而兴奋细胞^[2];在细菌中发现的氯离子通道嗜盐菌紫质(halorhodopsin, NpHR),它响应绿光或者黄光让氯离子进入细胞使细胞膜超级化抑制细胞的兴奋性^[3]。除此之外,另一种细菌视紫红质(archaerhodopsin, ArchT),响应黄色光,抑制细胞兴奋性^[4]。光遗传学通过光敏蛋白运载体将光敏蛋白基因转运进细胞并使光敏蛋白能够在细胞膜平稳的表达。注射运载体的位置及运载体上的特异性启动因子可以控制光敏蛋白的细胞特异性表达。运载体主要有病毒和转基因动物,常用的病毒有腺病毒和慢病毒。表达光敏蛋白和Cre重组酶的转基因小鼠也已成功构建^[5]。光遗传学技术里常用光源有激光、发光二极管以及白炽灯,通常通过显微镜照射路径传递。而对于一些深部的结构,则需要光纤靶向特定的区域^[5]。最后,光遗传学通过脑电记录、共聚焦或双光子显微、功能磁共振成像、免疫荧光成像等来记录分析结果^[5]。

2 光遗传学在缺血性脑卒中的研究进展

现有的对于脑卒中的治疗主要限于治疗时间窗的溶栓治疗、康复治疗、药物治疗、细胞移植和脑刺激^[6-8]。其中脑刺激是一种有前景的神经修复手段,因为神经元的活性是影响神经可塑性的主要因素^[9],并且脑刺激可以控制特定脑区的活动。脑刺激的方法有微电极刺激、脑深部刺激术(deep brain stimulation, DBS)和包括经颅磁刺激和经颅直流电刺激在内的非侵入性刺激方法^[10],但 these 方法激活的是多种神经细胞与神经回路,我们无法得知具体的恢复机制,且可能存在副反应,故光遗传学技术成为了近年来脑卒中恢复研究中的热门。表1为近年来用光遗传学刺激靶神经回路改善或抑制脑卒中动物功能研究的主要情况。

2.1 病灶同侧初级运动皮质

健康大脑半球间存在竞争模型,两个半球的同源区域会通过胼胝体相互抑制。当一侧发生卒中时,病灶同侧皮质无法维持对对侧皮质的抑制,导致对侧皮质过度激活,反过来又使同侧皮质被强烈抑制从而减少同侧皮质的运动输出,影响卒中后的恢复^[11]。利用光遗传学反复刺激脑卒中小鼠病灶同侧初级运动皮质(ipsilesional primary motor cortex, iM1)内V层神经元可以激活梗死周围区域和对侧M1,在激光打开时便能观察到患肢的运

动^[12];卒中小鼠体重增加,在感觉运动行为测试中表现良好,但刺激iM1卒中小鼠整体运动表现仅恢复到卒中前基线的50%左右;光遗传学刺激后3 min内,激光多普勒血流仪测地脑血流量(cerebral blood flow, CBF)明显增加,说明光遗传学能够增强脑卒中小鼠的CBF及神经血管耦合;蛋白印迹分析表明卒中小鼠的神经营养因子(BDNF、NGF、NTF3)以及突触可塑性标记物——生长相关蛋白43(GAP43)的表达也明显增加。而对照组正常的小鼠接受光遗传学刺激之后,并没有出现上述表现,说明卒中小鼠中的神经元刺激作用可能与卒中导致的微环境改变有关。

2.2 丘脑皮质

受损半球皮质活动的诱发在局灶性脑卒中后数周内处于抑制状态,此时感觉运动障碍最为明显^[13],而感觉诱发的皮质活动依赖于丘脑传入输入的完整性。局灶性脑缺血导致梗死周围皮质与丘脑轴突突触的联系减少,存活丘脑皮质电路兴奋降低^[14]。光遗传学刺激丘脑皮质能够激活皮质感觉回路,增强感觉皮质回路的恢复^[15],但表1所示刺激范式对血流影响很小,需连续60 s、10 Hz的刺激才能增加脑血流量。光遗传学刺激也促进了丘脑皮质的重新布线,促进新的、稳定的丘脑皮质突触终扣的形成,而不会影响轴突分支动力学。此外,受刺激的小鼠表现出感觉皮质和前爪功能更完全的恢复,并且在刺激停止后仍然存在。

2.3 第二听觉皮质腹侧

声音经过第二听觉皮质腹侧(ventral second auditory cortex, AuV)加工后投射至恐惧记忆相关的外侧杏仁核(lateral amygdala, LA),为声音相关的工具记忆的神经回路^[16]。这样的上下游投射关系的两个脑区,对于下游的缺血梗死,促进上游脑区的神经活动或许可以帮助其功能恢复。针对此有研究建立了LA缺血模型,利用光遗传学技术刺激AuV^[17]。在连续2 d的刺激后,在大鼠训练恐惧记忆获取的阶段和声音相关恐惧试验中,实验组与对照组比较,行为表现的差异有统计学意义,而与没有进行脑缺血处理的正常组的表现比较,差异无统计学意义。所以,可以认为上游AuV的光遗传学刺激兴奋神经元的活动达到一定程度可以促进LA缺血后行为的恢复,但由于实验动物未进行组织学上的检测,LA病灶的情况并不能确定。

2.4 皮质脊髓束

病灶对侧完整的皮质脊髓束(corticospinal tract, CST)具有一定的神经可塑性,会萌芽至去神经支配的脊髓灰质^[18]。而且新长出的CST纤维数量与运动恢复水平之间存在正相关关系,这表明皮质脊髓束布线对卒中后恢复有益^[19]。光遗传学刺激皮质脊髓回路能促进卒中大鼠运动功能的恢复,如果随之进行强化康复训练,在脑卒

表1 光遗传学技术重建动物脑卒中后神经回路恢复动物脑功能研究汇总

刺激靶回路	脑卒中模型	光遗传学模型	刺激方案	刺激光源	刺激时间	参考文献
iM1	10~12周雄性小鼠; 短暂性中脑动脉阻塞	Thy1-ChR2-YFP line-18 转基因小鼠	每天接受3次连续1 min的 刺激,每次刺激间隔3 min	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 20 ms 光脉冲; 功率0.4~0.8 mW	脑卒中后 5~10 d	[12]
丘脑皮质	2~5月龄的雄性C57BL/6 小鼠;光致血栓法	注射AAV2. CaMKII. hCh R2 (E123A)	每次接受1 h的刺激,其中 刺激1 s休息4 s,每周5次	475 nm 蓝光;5 Hz, 5 ms 光脉冲, 10 mW/mm ²	脑卒中后 第3天,持续 6周	[15]
AuV	2~3月龄Sprague Dawley 大鼠;光致血栓法	注射AAV2/8-Camk II α -ChR2 (h134)-mCherry	每天接受3次连续的1 min 刺激,每次间歇3 min	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 20 ms 脉冲, 10 mW/mm ²	卒中后 8~10 d	[17]
CST	3~4月龄雌性Long-Evans 大鼠;光致血栓法	逆行注射AAV9-CamKII0.4. Cre. SV 40载体到大鼠惯用爪子的对侧 颈半脊髓,再在同侧前驱运动和感 觉运动皮质注射Cre重组酶依赖性 ChR2载体,从而实现皮质脊髓投 射神经元中ChR的特异性表达	每天接受3次刺激,每次刺 激包括3次连续的1 min 刺 激,每个1 min 刺激间隔 3 min	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 20 ms 脉冲 16.6 mW/mm ²	脑卒中后 3~14 d	[20]
DCN	8~12周龄雄性C57BL/6J 小鼠;光致血栓法	注射rAAV-hsyn-hChR2-mcherry- WPRE-PA 病毒	每天接受3次连续1 min的 刺激,每次刺激间隔3 min	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 20 ms 光脉冲	脑卒中后 7~21 d	[21]
cLCN	10~12周龄雄性小鼠; 短暂性中脑动脉阻塞	Thy-1-ChR2-YFP line-18 转基因小鼠	每天接受3次连续1 min的 刺激,每次间隔3 min	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 20 ms 光脉冲, 功率0.2~0.4 mW	脑卒中后 5~14 d	[23]
神经移植 干细胞	成年雄性大鼠;短暂 性大脑中动脉阻塞	转导在EF1a启动子下与ChR2-eyfp 融合的ChR2基因的慢病毒	每天连续刺激3次,每次持 续30 s,间隔1 min	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 20 ms 光脉冲, 12 mW	脑卒中 后4周	[25]
纹状体谷 氨酸能 神经元	3月龄雄性小鼠;结扎 右大脑中动脉远端 与双侧颈总动脉	ChR2转基因小鼠[B6. Cg-Tg(Thy1- COP4/EYFP)18Gfng/J]	每天接受刺激15 min,其中 刺激12 s休息48 s	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 5 ms 脉冲, 功率0.35~1.02 mW	卒中后 5~13 d	[26]
纹状体 GABA能 神经元	16周龄,体重25~28 g 小鼠;短暂性大脑中 动脉阻塞	Gad2-Arch-GFP转基因小鼠	每天接受刺激2次,每次 15 min	530 nm 绿色激光; 10 Hz, 5 ms 脉冲, 功率1 mW	卒中后 7~13 d	[27]
急性期同 侧感觉运 动神经元	8周龄的雄性Sprague Dawley大鼠; 光致血栓法	AAV9-syn-ChR2(H134R)-mcherry 病毒转导	持续接受刺激2 h,每次刺 激1 s,间隔4 s	473 nm 蓝色激光; 10 Hz, 5 ms 脉冲	卒中后 第10 min	[28]

中之后5周,大鼠整体运动表现便能恢复到健康基线水平^[20]。该实验在大鼠脑卒中后5~6周,用生物素化葡聚糖胺(biotinylated dextran amine, BDA)顺行标记来自病灶对侧运动皮质的皮质纤维,然后在颈髓中线处计数得知,接受光遗传学刺激的大鼠BDA阳性CST纤维密度是未接受任何干预的脑卒中大鼠的9~13倍,而接受光遗传学刺激联合康复训练的脑卒中大鼠BDA阳性CST纤维密度则是对照组大鼠的16~18倍,所以反复光遗传学刺激可激活皮质脊髓神经元,促进轴突从完整的颈髓向去神经支配半脊髓萌发;并且通过计算机视觉算法自动评估恢复后大鼠的抓握轨迹证明光遗传刺激联合康复训练会恢复原有的运动模式,而不是诱导的补偿行为。反过来,CST的光遗传学沉默也会使恢复中的大鼠运动功能减退。

2.5 小脑深部核团

利用光遗传学研究整个小脑深部核团(deep cerebellar nuclei, DCN)在脑卒中后环境富集(environmental enrichment, EE)诱导的功能恢复中的作用,也在一定程度上

可证明光遗传学刺激小脑深部核团可以促进卒中后的运动功能的恢复^[21]。EE是啮齿动物卒中有有效的康复措施,与标准环境相比,EE提供了全面的感官、运动、认知和社交刺激。该实验结果显示,脑卒中后,与假刺激组相比,光遗传学激活DCN组小鼠运动有所恢复,激活组达到的效果与环境富集组加假刺激组相当,并且当环境富集组用黄色激光给与光遗传学抑制时,小鼠表现出较差的恢复率,恢复水平与假刺激组相当,说明反复光遗传学DCN刺激调节环境富集诱导的运动恢复。

2.6 病灶对侧小脑外侧核

对侧小脑外侧核(contralesional lateral cerebellar nucleus, cLCN)通过齿状-丘脑-皮质通路将主要的兴奋性输出发送到包括运动、前运动、躯体感觉和非运动皮质区域,这些区域涉及平衡、协调、运动规划和视觉空间等功能^[22]。小鼠脑卒中后使用光遗传学选择性刺激病灶对侧小脑外侧核增加了神经活动,能够促进卒中后的功能恢复^[23]。与对照组相比,在卒中后第14天,与卒中前相比,

cLCN刺激的小鼠在行进距离上恢复近100%,而速度方面恢复到80%左右;蛋白印迹分析得知,cLCN刺激的小鼠在同侧躯体感觉皮质中的GAP43表达增加,并且该GAP43的增加与小鼠恢复呈正相关,提示cLCN刺激可增强结构可塑性;通过停止刺激2周后小鼠在旋转束测试中仍保持停止刺激时的恢复状态,说明这个恢复作用是持久的,并且短刺激组(卒中后5~14 d刺激)显示出与长刺激组(卒中后5~28 d刺激)相当的结果,表明延长刺激不能加强恢复的效果。光遗传学刺激cLCN比刺激iM1的区域小,激活的脑区更广泛,恢复效果更好。

2.7 神经移植干细胞

再生疗法,如神经干细胞移植(neural stem cell, NSC)可改善脑卒中后的组织修复和功能恢复^[24],但之前并不清楚移植的NSC调节局部回路的能力。有学者用光敏蛋白修饰NSC来探测移植的NSC在脑卒中中驱动受损神经回路和感觉运动功能的作用^[25]。通过分析动物的行为发现,对移植动物NSC-ChR2的光刺激增强了感觉运动性能,并增加了对侧损伤的前肢使用。差异基因表达分析表明,NSC移植物的光遗传学刺激上调涉及膜相关离子通道功能、神经元分化、轴突发芽和突触可塑性的转录物,下调了一些参与炎症反应的转录物,表明光遗传学刺激NSC可能通过抑制炎症反应来为组织修复提供有利的微环境,但光遗传学刺激移植细胞是否能促进神经网络的恢复或增加宿主与移植细胞间的联系还有待研究。

2.8 神经发生

在成年大脑中,侧脑室的脑室下区(subventricular zone, SVZ)和海马中的颗粒下区(subgranular zone, SGZ)是产生神经干细胞和成神经细胞的主要神经源性小区,在脑卒中后,SVZ成神经细胞能迁移到病变部位,用于组织修复,但SVZ产生细胞不足,且只有少量细胞能够到达病变部位并存活^[26]。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和谷氨酸为影响SVZ中细胞增殖的旁分泌因子,GABA抑制SVZ细胞增殖,而谷氨酸增强SVZ细胞的存活和增殖。纹状体区域在解剖学上与SVZ相邻,可能会影响SVZ中的细胞活动。

有研究^[26]往纹状体中注射荧光染料DiI,在SVZ和纹状体区域内都看到了明显的DiI分布,结合谷氨酸能标记,证实了谷氨酸能轴突从纹状体投射或者穿过纹状体到达SVZ。在小鼠脑卒中后,该实验用光遗传学刺激纹状体谷氨酸能神经元,用BrdU标记新生细胞,DCX标记迁移的成神经细胞,结果显示在卒中后,小鼠大脑DCX⁺细胞形成从SVZ到缺血皮质梗死区域的迁移流,并且在梗死周围区域发现了DCX⁺/BrdU⁺细胞。所以,卒中后纹状体中谷氨酸能神经元的光遗传学激活可能通过增加SVZ中谷氨酸的水平,刺激SVZ成神经细胞增殖和迁移至梗死周围皮质,到达梗死部位的成神经细胞能够存活

并分化为神经元,促进组织的修复,从而改善卒中后的恢复情况。

光遗传学抑制纹状体GABA能神经元活动,可改善神经行为的恢复,减轻缺血性脑萎缩;并且可以通过升高梗死周围内皮细胞bFGF的水平,增加微血管的密度。这种调节取决于星形胶质细胞的存在,可能是由于星形胶质细胞是纹状体GABA能神经元与微血管内皮细胞信号传递的中继站。纹状体GABA能神经元的抑制也能减少细胞凋亡,促进脑卒中后的功能恢复。相反,激活GABA能神经元则会加重脑损伤,减少微血管中的bFGF。值得注意的是在脑卒中亚急性期仅抑制纹状体GABA能神经元活性对神经的发生并没有很大的改善^[27]。

2.9 急性期同侧感觉运动神经元

大部分实验研究了光遗传学在脑卒中后期中的影响,也有实验^[28]研究了脑卒中急性期感觉运动神经元的光遗传学激活对神经血管功能的保护作用。通过激光散斑对比成像检测CBF变化,显示在卒中后2 h,光刺激组和对侧缺血区都有所增加,而到24 h以后,光刺激组缺血区扩张速度明显小于对照组,说明卒中急性期的光遗传学刺激减少了缺血区域的扩张;同时区域CBF供应也增加了,表明神经元激活后可能通过改善脑侧支循环,保护卒中后神经血管的功能,而用神经严重程度评分(Neurological Severity Score, NSS)评价行为和TTC染色组织学评价结果进一步证实了急性脑卒中中光遗传学激活神经元的保护作用。

3 展望

虽然已经有如此多的实验成果,但将光遗传学从实验室应用到临床上来还有很大的挑战。首先,啮齿类动物大脑与人类大脑结构功能有一定的差异,且人类大脑组织远大于啮齿类动物,在大范围光照的时候,有可能对神经组织造成伤害,也有可能使神经与回路出现非生理性的活动模式,所以在具体的时间窗和光参数方面需要更多更详尽的动物及人体研究;并且即便是相同的细胞类型,皮质中的神经元在生理情况下也会在不同的情况下出现兴奋或抑制,所以光遗传学通过光照同时激活或抑制表达了光敏蛋白的神经元的活动无法完全模拟,利用双光子全息光^[29]以及光敏蛋白soCoChR^[30]可以达到更为精确的时空控制。其次,将光敏蛋白基因转入患者体内可能会存在伦理问题,并且用外源的光敏蛋白可能会存在免疫反应的问题,这两个问题可能会通过用人类自身的光敏蛋白(如视蛋白)来解决;但光敏蛋白的表达在神经元群体中可能存在不均匀的问题,导致光遗传学操控的量级和范围会出现异质性,以及如何评估光敏蛋白表达的位置与水平也有待解决。

在对大脑更深的皮质下区域进行光刺激时,存在病毒的注射以及侵入性植入光导纤维对周围脑组织可能造

成损伤以及感染等问题。近年来各研究也在努力寻找不需要光导纤维植入即可诱导光遗传学的方法。如用具有较强组织穿透能力的近红外光代替穿透力较差的可见光^[31],可实现低侵入性的远程控制光遗传学。从光敏蛋白着手则可利用光化学遗传学技术解决,利用生物发光蛋白代替物理光源。已有研究^[32]将光敏蛋白与荧光素酶的融合蛋白转导进神经干细胞,并移植入缺血性脑卒中的小鼠大脑梗死区域,再通过鼻腔内给与荧光素酶底物腔肠素激活发光蛋白,实现光刺激。或寻找更敏感的光敏蛋白,最新的一项研究^[33]发现了一种对光线极为敏感的新蛋白SOUL,并对神经元细胞进行基因编辑,使之产生这种蛋白;随后成功地让光线穿过小鼠的头骨并改变了小鼠全脑各区域的神经元反应。恒河猴头骨比小鼠厚得多,也只需要将光纤植入硬脑膜外照射大脑,即可借助SOUL蛋白改变恒河猴大脑皮质的神经活动。除了SOUL,ChR变体里也出现了高光电流特性的ChRger2^[34],刺激光导纤维只需植入小鼠浅表脑区域,并且该光敏蛋白与微创基因传递系统^[35]可以结合,以解决病毒的侵入性注射带来的问题。也有实验将光遗传学成功应用到了灵长类动物上^[36-37],参与复杂行为和神经疾病病理的研究,一定程度上也证明了其安全性;使用腺病毒注射的I期和II期临床试验证明了其在帕金森病患者身上使用的安全性^[38]。这些实验进展增加了光遗传学技术应用于临床的可能性,但真正实现光遗传学的临床应用还需要更多的研究与努力。

参 考 文 献

- [1] DEISSEROTH K. Optogenetics[J]. Nat Methods, 2011, 8(1): 26-29.
- [2] BOYDEN ES, ZHANG F, BAMBERG E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(9): 1263-1268.
- [3] NAGEL G, SZELLAS T, HUHN W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(24): 13940-13945.
- [4] CHOW BY, HAN X, DOBRY AS, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps[J]. Nature, 2010, 463(7277): 98-102.
- [5] YIZHAR O, FENNO LE, DAVIDSON TJ, et al. Optogenetics in neural systems[J]. Neuron, 2011, 71(1): 9-34.
- [6] BACIGALUPPI M, RUSSO GL, PERUZZOTTI-JAMETTI L, et al. Neural stem cell transplantation induces stroke recovery by upregulating glutamate transporter GLT-1 in astrocytes[J]. J Neurosci, 2016, 36(41): 10529-10544.
- [7] HIU T, FARZAMPOUR Z, PAZ JT, et al. Enhanced phasic GABA inhibition during the repair phase of stroke: a novel therapeutic target[J]. Brain, 2016, 139(Pt 2): 468-480.
- [8] ZHAI ZY, FENG J. Constraint-induced movement therapy enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia/reperfusion[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(10): 1743-1754.
- [9] MURPHY TH, CORBETT D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(12): 861-872.
- [10] TSCHERPEL C, Grefkes C. Brain stimulation for treating stroke-related motor deficits[J]. Nervenarzt, 2019, 90(10): 1005-1012.
- [11] NOWAK D, GREFKES C, AMELI M, et al. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009, 23(7): 641-656.
- [12] CHENG MY, WANG EH, WOODSON WJ, et al. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(35): 12913-12918.
- [13] CLARKSON AN, HUANG BS, MACISAAC SE, et al. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke[J]. Nature, 2010, 468(7321): 305-309.
- [14] CAO ZJ, HARVEY SS, BLISS TM, et al. Inflammatory responses in the secondary thalamic injury after cortical ischemic stroke[J]. Front Neurol, 2020, 11: 236.
- [15] TENNANT KA, TAYLOR SL, WHITE ER, et al. Optogenetic rewiring of thalamocortical circuits to restore function in the stroke injured brain[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15879.
- [16] LIPSMAN N, LOZANO AM. Targeting emotion circuits with deep brain stimulation in refractory anorexia nervosa[J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(1): 250-251.
- [17] 张雪婷. 运用光遗传学技术在神经环路水平促进外侧杏仁核缺血性中风后的功能恢复[D]. 南京:东南大学, 2016.
- [18] HUANG XQ, WANG XT, YANG MQ, et al. Spontaneous neuronal plasticity in the contralateral motor cortex and corticospinal tract after focal cortical infarction in hypertensive rats[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(12): 105235.
- [19] WAHL AS, OMLOR W, RUBIO JC, et al. Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke[J]. Science, 2014, 344(6189): 1250-1255.
- [20] WAHL AS, BÜCHLER U, BRÄNDI A, et al. Optogenetically stimulating intact rat corticospinal tract post-stroke restores motor control through regionalized functional circuit formation[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1187.
- [21] ZHANG Q, WU JF, SHI QL, et al. The neuronal activation of deep cerebellar nuclei is essential for environmental enrichment-induced post-stroke motor recovery[J]. Aging Dis, 2019, 10(3): 530-543.
- [22] KÜPER M, DIMITROVA A, THÜRLING M, et al. Evidence for a motor and a non-motor domain in the human dentate nucleus--an fMRI study[J]. Neuroimage, 2011, 54(4): 2612-2622.
- [23] SHAH AM, ISHIZAKA S, CHENG MY, et al. Optogenetic neuronal stimulation of the lateral cerebellar nucleus promotes persistent functional recovery after stroke[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46612.
- [24] HSUAN YC, LIN CH, CHANG CP, et al. Mesenchymal stem

- cell-based treatments for stroke, neural trauma, and heat stroke [J]. *Brain Behav*, 2016, 6(10): e00526.
- [25] DAADI MM, KLAUSNER JQ, BAJAR B, et al. Optogenetic stimulation of neural grafts enhances neurotransmission and downregulates the inflammatory response in experimental stroke model[J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(7): 1371-1380.
- [26] SONG MK, YU SP, MOHAMAD O, et al. Optogenetic stimulation of glutamatergic neuronal activity in the striatum enhances neurogenesis in the subventricular zone of normal and stroke mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 98: 9-24.
- [27] JIANG L, LI WL, MAMTILAHUN M, et al. Optogenetic inhibition of striatal GABAergic neuronal activity improves outcomes after ischemic brain injury[J]. *Stroke*, 2017, 48(12): 3375-3383.
- [28] BO B, LI Y, LI WL, et al. Optogenetic excitation of ipsilesional sensorimotor neurons is protective in acute ischemic stroke: a laser speckle imaging study[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2019, 66(5): 1372-1379.
- [29] RONZITTI E, CONTI R, ZAMPINI V, et al. Submillisecond optogenetic control of neuronal firing with two-photon holographic photoactivation of chronos[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(44): 10679-10689.
- [30] SHEMESH OA, TANESE D, ZAMPINI V, et al. Temporally precise single-cell-resolution optogenetics[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(12): 1796-1806.
- [31] YU N, HUANG L, ZHOU YB, et al. Near-infrared-light activatable nanoparticles for deep-tissue-penetrating wireless optogenetics[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(6): e1801132.
- [32] YU SP, TUNG JK, WEI ZZ, et al. Optochemogenetic stimulation of transplanted iPS-NPCs enhances neuronal repair and functional recovery after ischemic stroke[J]. *J Neurosci*, 2019, 39(33): 6571-6594.
- [33] GONG X, MENDOZA-HALLIDAY D, TING JT, et al. An ultra-sensitive step-function opsin for minimally invasive optogenetic stimulation in mice and macaques[J]. *Neuron*, 2020, 107(1): 197.
- [34] BEDBROOK CN, YANG KK, ROBINSON JE, et al. Machine learning-guided channelrhodopsin engineering enables minimally invasive optogenetics[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(11): 1176-1184.
- [35] CHALLIS RC, RAVINDRA KUMAR S, CHAN KY, et al. Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(2): 379-414.
- [36] GALVAN A, STAUFFER WR, ACKER L, et al. Nonhuman primate optogenetics: recent advances and future directions[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(45): 10894-10903.
- [37] SHEWCRAFT RA, DEAN HL, FABISZAK MM, et al. Excitatory/inhibitory responses shape coherent neuronal dynamics driven by optogenetic stimulation in the primate brain[J]. *J Neurosci*, 2020, 40(10): 2056-2068.
- [38] BARTUS RT, BAUMANN TL, SIFFERT J, et al. Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients[J]. *Neurology*, 2013, 80(18): 1698-1701.

责任编辑:龚学民