

陈彦熹,徐志栋,刘婷婷,等. 脑卒中神经环路研究技术进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 114-122, 128.

Chen YX, Xu ZD, Liu TT, et al. Technological advances in the study of post-stroke neural loops [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 114-122, 128.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.014

## 脑卒中神经环路研究技术进展

陈彦熹<sup>1,2</sup>, 徐志栋<sup>2</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 马连素<sup>3</sup>, 孙芳玲<sup>1\*</sup>, 王文<sup>1\*</sup>

(1.首都医科大学宣武医院 北京市老年病医疗研究中心 实验动物室,北京 100053;

2.河北科技大学化学与制药工程学院,石家庄 050018;

3.北京医药健康科技发展中心,北京 100053)

**【摘要】** 神经环路由神经元之间通过突触结构相互连接而形成,是大脑信息传递和处理的基本单元,在神经功能调控中发挥重要作用。卒中后,脑梗死区域及梗死周围区域与远程区域的神经连接受损,导致患者出现神经功能障碍甚至残疾。然而,随着检测技术进步,越来越多研究已证实卒中患者在慢性期时能产生一定的功能恢复,可能与突触连接和神经环路的重新建立有关。因此,开发特定的技术来识别和操纵神经元活动模式,以及使用高时空分辨率成像策略解读这些神经变化过程,使我们能够了解卒中恢复的全脑网络动力学和神经环路重建的发生机制,从神经生物学角度理解卒中病理学发展到行为结果的闭环关系。目前研究神经环路的技术主要集中于光遗传学、化学遗传学、在体钙成像和功能磁共振成像技术。本文将介绍这4种主要技术的工作原理,重点总结各自在解析卒中后神经重塑研究中的应用成果,并简要分析了每种技术的应用场景、优劣性和未来发展趋势,帮助临床及基础研究人员利用这些技术发现新的治疗策略以及评估康复策略的有效性。

**【关键词】** 卒中;神经环路;光遗传学;化学遗传学;成像技术

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 04-0114-09

## Technological advances in the study of post-stroke neural loops

CHEN Yanxi<sup>1,2</sup>, XU Zhidong<sup>2</sup>, LIU Tingting<sup>1</sup>, MA Liansu<sup>3</sup>, SUN Fangling<sup>1\*</sup>, WANG Wen<sup>1\*</sup>

(1. Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing Municipal, Geriatric Medical Research Center, Experimental Animal Center, Beijing 100053, China. 2. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018. 3. Beijing Medical and Health Technology Development Center, Beijing 100053)

**【Abstract】** Neural loops are formed by interconnections between neurons through synaptic structures, which are the basic units of information transmission and processing in the brain and play an important role in the regulation of neural functions. After stroke, neural connections between the infarct and peri-infarct regions and the remote area are damaged, resulting in patients being at risk of neurological dysfunction or even disability. However, with advances in detection technology, an increasing number of studies are demonstrating that patients with stroke can undergo some functional recovery during the chronic phase, possibly via a mechanism related to the re-establishment of synaptic connections and neural circuits. Therefore, the development of specific technology to identify and manipulate neuronal activity patterns, as well as the use of high-resolution temporal and spatial imaging strategies to decipher these neurological processes, will allow

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(82173795);北京市自然科学基金(7242217)。

**【作者简介】** 陈彦熹(1997—),女,硕士研究生,研究方向:神经药理学。E-mail:chanbbc77@163.com

**【通信作者】** 王文(1968—),男,博士,教授,研究方向:心脑血管病病理机制及药物研究。E-mail:lwzwang@163.com

孙芳玲(1985—),女,博士,副研究员,研究方向:脑重大疾病再生修复靶点及药物发现。E-mail:sun\_fangling@163.com

\* 共同通信作者

us to understand the whole-brain network dynamics of stroke recovery and the mechanisms by which neural loop reestablishment occurs. Furthermore, we may be able to neurobiologically comprehend the closed-loop mechanisms that underlie the development of stroke pathology and their relationship to behavioral outcomes. Current technologies used for studying neural circuits include optogenetics, chemical genetics, *in vivo* calcium imaging, and functional magnetic resonance imaging. This article introduces the working principles of these four major technologies and focuses on summarizing the result of their respective application in resolving neural remodeling after stroke. We briefly analyze the application scenarios, advantages and disadvantages, and future development trends of each technique. This paper will help clinical and basic researchers to use these technologies to discover new therapeutic strategies and evaluate the effectiveness of rehabilitation strategies.

**【Keywords】** stroke; neural loop; optogenetics; chemical genetics; imaging technology

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

卒中仍是全球范围内导致高致残率的主要原因<sup>[1-2]</sup>,这是由于卒中会导致局部脑回路直接结构的损伤和全脑网络的间接功能损伤。卒中后能发生一定程度的功能恢复,并在许多研究中被证明与梗死附近或远端区域的神经重新连接有关<sup>[3-4]</sup>,这一过程被称为“重映射”。同时也有研究表明这种“重映射”作用未必有利于卒中的功能恢复,异常的神经连接和神经元的过度兴奋可能会加重功能缺陷<sup>[5-6]</sup>。因此,更好地理解神经连接的重塑过程是未来发展脑卒中的治疗策略的关键。

脑内神经元相互连接形成传递特定信息的通路,即神经环路。中枢神经系统的神经环路不仅涉及多个脑区,更具有复杂的连接结构,进而支配高级神经功能。要分析神经环路的组分以及他们的功能,就需要把神经元的特性与神经系统的特定功能对应起来。因此,利用可视化脑回路神经解剖和功能特性的技术,能为明确卒中后神经环路的重塑过程提供关键支持。目前此技术主要有两类:①通过识别和操纵特定神经元,直接观察神经元与行为功能之间的因果联系(如分子生物学、遗传学技术);②使用高时空分辨率技术,记录下大脑中的神经元的活动(如电生理、钙成像、磁共振成像技术)。

本文将对 4 种主要的神经环路研究技术在卒中研究和临床应用中的进展进行介绍,其中光遗传学和化学遗传学可操纵神经元活动,在体钙成像和功能磁共振成像技术上主要用于识别神经元活动。采用上述 4 种脑回路研究的可视化技术能够观察单个神经元和突触、神经元群体和神经细胞种群以及不同的脑区内部和区域间连接,在多层面上解读神经环路组成和功能特性,帮助科学工作者们理解卒中后神经环路的重建过程,有助于发现新的治疗措施及关键靶点。

## 1 光遗传学

2005 年,光遗传学引入神经科学为解析哺乳动物的皮质功能图提供有力的工具。光遗传学是将光控技术和遗传学技术相结合,将基因工程编码的光敏感离子通道蛋白表达于可兴奋的靶细胞上,再利用相应波长激活光敏感通道,以实现神经系统生理功能的精细调控<sup>[7]</sup>。根据选择不同的光敏感蛋白(如 CHR2、CHETA、NPHR3.0、ARCH 或 JAWS 等)、激发光源和光源递送方式能够选择性地激活或抑制靶细胞,操纵远程轴突投射或其他神经细胞形成的环路连接,从而探索神经环路机制<sup>[7-9]</sup>。相比于传统的药物注射和电刺激手段,光遗传学技术具有高时空分辨率、高特异性、低毒性以及轴突投射选择性,其时间准确度可达到毫秒范围,在空间上可实现对单一神经细胞乃至亚细胞范围的精确控制,并且能低损伤地控制特异性神经元活动,尤其适用于在体、甚至清醒动物行为学实验<sup>[9-10]</sup>。因此,光遗传学技术在探索多种疾病背后神经环路变化和脑网络运作的研究中展示出巨大潜力。

多项研究利用光遗传学技术结合行为学方法探究特异性神经环路投射在卒中康复中的作用。Cheng 等<sup>[11]</sup>采用将光纤植入 *Thy1-CHR2-YFP* 系 18 转基因卒中小鼠的患侧初级运动皮层(ipsilesional primary motor cortex, iM1)第 V 层兴奋性锥体神经元,记录电极植入对侧初级运动皮质(contralesional M1, cM1)、患侧初级感觉皮质(somatosensory cortex, iS1)和患侧纹状体(striatum, iStr)的双重记录方法,通过重复性 iM1 刺激可以观察到 iS1、iStr 和 cM1 产生神经元放电,并且 iM1 刺激组小鼠在转棒行为评价中运动距离更长和速度更快。这些行为功能的改善伴随着 cM1 和 iS1 中突触可塑性标记物 GAP43

的表达增加,以及脑血流量和神经血管耦合反应的改善。提示 iM1 刺激可能通过激活梗死周边和 cM1 的皮质兴奋性来促进突触重塑和改善脑网络环境,帮助卒中后的功能康复。由于 *Thy1* 是泛神经元启动子,*Thy1*-CHR2 小鼠能够特异性激活刺激的神经元,而不影响其他非神经元亚型,因此增加了该实验的可靠性。另一项研究也采用了相似的操作,改为将光纤植入转基因小鼠的小脑齿状核(lateral cerebellar nucleus, LCN)中,探索齿状核-丘脑-皮质回路投射对卒中后神经功能的影响<sup>[12]</sup>。他们在刺激 15 d 后比较 iM1 和 cM1 以及 iS1 和 cS1 中 GAP43 的表达量,发现仅有 iS1 的 GAP43 表达显著增加,iM1 和 cS1 呈增加趋势。与对照组相比,刺激组小鼠的运动功能改善更好。该研究表明激活齿状核-丘脑-皮质回路有利于促进脑内皮质尤其是 iS1 的结构可塑性(如轴突发芽)并伴随着神经功能恢复。值得关注的是,该研究显示 GAP43 的表达与 cM1 的恢复呈强烈的负相关趋势,与激活皮质-皮质回路的研究结果相反。上述研究结果表明,iS1 的重塑可能对卒中的恢复显示出更有利的结果,而对侧 M1 皮层的激活与抑制对神经可塑性有不同的影响,可能与不同通路的激活有关,值得在未来进一步研究。

除了控制特定细胞和大脑区域的神经元放电外,神经环路的研究还要有同步监测神经元群体活动的方法,如功能磁共振成像(functional magnetic resonance imaging, fMRI),电压敏感染料成像(voltage sensitive dye imaging, VSDI)<sup>[13]</sup>,在体双光子钙成像等。Vahdat 等<sup>[14]</sup>使用腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)搭载 CHR2 探针局部注射于 iM1,随后进行光刺激,通过 fMRI 技术评估了卒中前和卒中治疗后的全脑神经动力学,并确定丘脑-皮质和皮质-皮质回路的重映射有利于卒中康复。此外,为了进一步研究皮质-丘脑回路在卒中康复的具体贡献,他们将光纤植入患侧丘脑后核中选择性地刺激 iM1-丘脑投射神经元,行为学评价显示皮质-丘脑回路足以改善卒中后的功能障碍,提示卒中早期丘脑-皮质回路干预可能是卒中康复的关键。Lim 等<sup>[15]</sup>通过光刺激结合 VSDI 绘制了全脑皮质功能网络连接。他们首先比较了光刺激和感觉刺激的 VSDI 差异,发现感觉刺激诱导的患侧脑半球 VSDI 反应表现出延迟和抑制,而光刺激诱导的 VSDI 反应表现为抑制,并未表现出延迟,提示在探

索皮质内回路的功能时光遗传刺激可能比感觉刺激更高效。此外,该研究在卒中 1 周观察到患侧脑半球皮质网络连接整体被抑制,并影响到健康脑半球,卒中 8 周时,这种抑制已得到显著改善。他们通过光刺激揭示了卒中 8 周时梗死周围的不同区域呈现出不同的改善程度,如前-外侧区域仍处于抑制状态,而后-内侧区域显示出恢复状态,表明梗死周围区域的恢复不均匀。

光遗传学技术以高时空分辨率和高特异性的优势为探索疾病状态下神经环路变化提供不可估量的价值,在动物模型中成功证明光遗传学方法将为临床开发新的深部脑刺激方案提供有利的信息。此外,闭环记录和光刺激系统结合将有利于及时反馈疾病的变化,而转录组测序结合光遗传操作可以揭示卒中动物受刺激后表现出行为改善的转录组谱,将有助于识别潜在的卒中恢复的新药物治疗靶点。但其还需克服许多技术障碍,当光被引入脑组织时,会产生显著的光散射,而增加光功率会引起由于光源热量造成光损伤的问题,可能会影响生理和行为功能,因此在未来需要开发低热量光源和更为敏感的光感蛋白,将有助于推进光遗传技术进入临床转化阶段。

## 2 化学遗传学

化学遗传学是在经典遗传筛选的基础上开发的一种以化学小分子为工具来操纵基因工程改造的生物大分子和化学药物分子相互作用的创新技术,其中只由设计药物激活的设计受体(designer receptors exclusively activated by designer drugs, DREADDs)技术在操纵神经元活动中应用最广泛<sup>[16-17]</sup>。DREADDs 技术是指经过修饰的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)只能被药理学惰性配体叠氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO)激活或抑制,激活或抑制后的 GPCR 会选择性地作用于不同的 GPCR 级联反应来调节细胞信号转导,从而调控神经元的放电过程。常用的 DREADDs 受体主要有两种,一种是经过改造的人毒蕈碱受体亚型 M3(hM3Dq),其与 Gq 类的 GPCR 耦合后激活神经元放电;另一种是 hM4Di,其与 Gi 类的 GPCR 耦合后抑制神经元放电<sup>[17-18]</sup>。由于 CNO 能被生物体代谢降解,以及能够随时调节 CNO 的浓度和加入或中止的时间,因此 DREADDs 技术具有可控、可逆和高安全性的特性,更适合应用于需要

长时间观察神经活动的研究中<sup>[17]</sup>。此外, DREADDs 技术与光遗传学技术具有很多相似之处, 但 DREADDs 技术不需要进行开颅手术埋置光纤, 可实现在动物完全自由活动的情​​况下调控特定脑区和神经元的活动, 是一种非侵入性研究神经环路的替代方法<sup>[19]</sup>。

卒中早期由于生命体征不稳定, 难以使用有创的方式进行神经环路的研究, 因此化学遗传学技术在探索卒中急性期的特定神经元活动中发挥不可替代的作用。Wang 等<sup>[20]</sup>建立了一种 *R26-lsl-hM4Di-DREADD; Emx1-Cre* (hM4Di-TG) 双转基因小鼠, 其中 *Emx1-Cre* 能够控制转基因 *hM4Di* 主要表达于包括海马和皮质内的前脑兴奋性神经元亚群。在小鼠缺血前 10 min 或再灌注 30 min 给予 CNO 激活 hM4Di 后, 场兴奋性突触后电位的波幅快速而持续下降, 钾离子诱导的皮质扩散性抑制 (cortical spreading depolarizations, CSDs) 发作被抑制。与对照组相比, CNO 处理组表现出显著的脑梗死体积和神经功能评分改善。提示卒中急性期抑制海马和前脑兴奋性神经元亚群可能能够预防脑损伤扩大。皮质中血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 中间神经元能够通过神经环路的去抑制来调节皮质兴奋程度, 卒中慢性期刺激 VIP 神经元可能帮助恢复卒中后的皮质兴奋性。Motaharinia 等<sup>[21]</sup>在 *Vip-Cre* 小鼠的右前肢 S1 中局部注射两种 AAV

来驱动 VIP 神经元中 hM3Dq 的表达, 给予 CNO 30 min 后观察到卒中小鼠的 iS1 诱发场电位的振幅显著增加。VSD 和在体钙成像结果显示卒中主要干扰了 VIP 神经元中高活性神经元的反应, 并增加了最小活跃神经元的比例, 可能与卒中后的某些抑制或者异常重新连接有关。而 hM3Dq-DREADDs 能够使第 2/3 层兴奋性神经元产生阈下去极化, 保留高活性 VIP 神经元, 从而恢复感觉-功能障碍, 即使在停止注射 CNO 后, 行为学评分也持续改善。提示参与感觉-运动功能的高反应性神经回路的保留可能在卒中的预后中发挥了重要作用, 并且能够作为治疗卒中的潜在靶点。

化学遗传学技术可以在不同时间、以不同剂量和进行可逆操作, 使得从事药物和行为之间相互作用传统研究的科研人员可以在药物治疗的背景下解析特定的脑功能的区域、神经环路甚至是细胞分子水平的功能机制。而许多行为药理学研究探索了药物剂量与操作/靶向行为反应之间的关系, 这种关系也能够通过化学遗传学技术进行更精确的调控。基于这些优势, DREADDs 在未来新药开发方面提供丰富的可能性。此外, 化学遗传学和光遗传学都被认为是操纵神经活动的等效方法, 这些技术可以在相同的实验设计中进行等价交换或者相互补足, 这两种方法结合将会提供非常广泛的应用领域(表 1)。

表 1 光遗传学和化学遗传学技术的比较

Table 1 Comparison of optogenetic and chemogenetics technology

	光遗传学技术 Optogenetics	化学遗传学技术 Chemogenetics
作用 Effect	识别和操纵特定的神经元群体, 有助于揭示神经网络变化和行为之间的因果关系。 Identifying and manipulating specific groups of neurons can help reveal the causal relationship between changes in neural networks and behavior.	
原理 Principle	将外源光敏感蛋白基因转入到靶细胞中, 在细胞膜结构上表达了光敏感通道蛋白。在不同波长的光照刺激下能够控制细胞膜结构上的光敏感通道蛋白的激活与关闭, 从而控制细胞膜上离子通道的打开与关闭, 因此对阳离子或者阴离子的通过产生选择性, 进而造成细胞膜两边的膜电位发生变化, 达到对细胞选择性地兴奋或者抑制的目的。 Exogenous photosensitive protein gene is introduced into target cells, leading to the expression of photosensitive channel proteins on the cell membrane. Under the stimulation of light at different wavelengths, the activation and deactivation of photosensitive channel proteins on the cell membrane can be controlled, thereby regulating the opening and closing of ion channels on the membrane. This results in selectivity for the passage of cations or anions, causing changes in the membrane potential on both sides of the cell membrane, and thus achieving selective excitation or inhibition of the cell.	通过将不同的 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 进行改造, 修饰后的受体只能由人工合成的特殊化合物来激活或者抑制。激活或抑制后的 GPCRs 会选择性地作用于不同的 GPCR 级联反应来调节细胞信号转导, 从而调控神经元的放电过程, 引发细胞不同的兴奋性变化。 By altering different G protein-coupled receptors (GPCRs), the modified receptors can only be activated or inhibited by specially synthesized artificial compounds. Once these GPCRs are activated or inhibited, they selectively impact various GPCR cascade reactions to regulate cellular signal transduction, thus controlling the neuronal firing process and eliciting diverse excitatory changes in cells.

续表 1

	光遗传学技术 Optogenetics	化学遗传学技术 Chemogenetics
时间上 Temporally	在时间上的精确度可达到毫秒级别甚至是亚毫秒级别。 Precision can reach the level of milliseconds or even sub-milliseconds.	小时级,化合物是被临床认可的副作用低的药物,可实现长达数小时持续控制神经元活动而不影响细胞正常生理,具有较高的安全性。 On an hourly scale, the compound is a clinically recognized drug with low side effects, capable of continuously controlling neuronal activity for several hours without affecting normal cellular physiology, with a high safety.
空间上 Spatially	空间上的精确度能达到单个细胞级别。 Precision can reach the level of individual cells.	空间上能控制某类特定的细胞,如 VIP 神经元群。 Spatially, it can control specific types of cells, such as VIP neuron groups.
操作 Operationally	1. 可控性高,通过控制激光,可以精准地、随时地调节给神经元刺激的强度; 1. High controllability. By manipulating the laser, the intensity of stimulation delivered to neurons can be precisely and instantly adjusted; 2. 开颅手术埋置光纤,需要光纤、激光控制器等,操作相对有难度; 2. Implantation of optical fibers through craniotomy requires equipment such as fibers and laser controllers, making the operation relatively challenging; 3. 需要连接光控制器,可能对某些行为测量造成限制。 3. Connection to a light controller is necessary, which may impose limitations on certain behavioral measurements.	1. 非侵入性手段,不需要进行开颅手术埋置光纤; 1. A non-invasive approach that does not require cranial surgery for fiber implantation; 2. 实验要求较低,只需要注射或喂食化合物控制,操作简单。 2. Lower experimental requirements, only necessitating injection or oral administration of compounds for control, making the operation straightforward.
注意 Notice	1. 光源在脑组织中的透射率方面的影响; 1. Impact of light source transmission in brain tissue; 2. 光源产生的热量对组织的影响。 2. Effect of heat generated by the light source on the tissue.	1. 化合物的扩散范围、生理代谢等难以控制,时间和空间上的精确度比光遗传学低; 1. Diffusion range and physiological metabolism of compounds are difficult to control, resulting in lower temporal and spatial precision compared to optogenetics; 2. 刺激的强度无法掌控。 2. Intensity of stimulation cannot be precisely controlled.
应用 Application	1. 抑制或激活某个神经环路后观察动物行为学的改变; 1. Observing behavioral changes in animals after inhibiting or activating a certain neural circuit; 2. 深部核团向皮质的未知投射; 2. Unknown projections from deep nuclei to the cortex; 3. 长程、多突触神经回路的投射; 3. Projections of long-range, polysynaptic neural circuits; 4. 可以在体细胞或其末端进行,也可与跨突触示踪剂联合进行,以分析卒中恢复过程中回路的各组分参与情况的变化。 4. Can be performed in somatic cells or their terminals and can also be combined with trans-synaptic tracing agents to analyze changes in the participation of circuit components during stroke recovery.	1. 抑制或激活某个神经环路后观察动物行为学的改变; 1. Observing behavioral changes in animals after inhibiting or activating a certain neural circuit; 2. 神经环路功能的验证,包括中枢内的神经环路、中枢到外周的神经环路以及特定神经环路功能的验证; 2. Validation of neural circuit functions, encompassing neural circuits within the central nervous system, from the central to the peripheral nervous system, and the verification of specific neural circuit functionalities; 3. 疾病治疗时,需要长期的神经环路调节; 3. Long-term modulation of neural circuits is required for the treatment of diseases; 4. G 蛋白偶联受体已被 FDA 许可,为新药开发提供可能性。 4. GPCRs have been authorized by the FDA, providing opportunities for the development of new drugs.

### 3 在体双光子钙成像技术

钙是位于细胞内的一个重要信使,神经元中钙通量的动态变化可以反映局部皮质回路的功能变化。在静息状态下,大部分神经元的胞内钙离子浓度为 50~100 nmol,而当神经元活动的时候,胞内钙离子浓度能上升 10~100 倍,钙离子浓度与神经递质的突触囊泡的胞吐释放等神经元活动过程密切

相关<sup>[22]</sup>。神经元钙成像技术的原理就是借助钙离子浓度与神经元活动之间的严格对应关系,利用钙离子指示剂将神经元中的钙离子浓度通过荧光强度表现出来,最后通过荧光显微镜监测神经元活动<sup>[23]</sup>。因此,当利用光刺激或化学刺激诱导神经元活动发生改变时,钙成像技术能够实时反馈神经元活动信号。传统的宽场荧光显微镜由于光散射的影响,只能对大脑浅层的神经元或在离体组织上

进行成像,共聚焦显微镜由于光损伤较大,一般也只用于离体钙成像。双光子荧光显微镜是结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激发技术的一种新技术,其荧光分子可以同时吸收 2 个长波长的光子来激发荧光。在体双光子钙成像技术使人们能够在活体动物内监测钙活动,并具有较高的 3D 分辨率,较低的信噪比和光损伤<sup>[24]</sup>。

卒中会导致梗死周围皮质的轴突-突触连接被破坏,并长期抑制丘脑-皮质突触扣的兴奋性。光刺激能够激活丘脑-皮质回路并诱导功能连接(functional connectivity, FC)重塑,这个过程涉及到新的突触和轴突扣的形成,而这些新生突触和轴突伴随着感觉诱发的钙瞬变。通过 GCaMP6s 标记这些钙信号,能够非常清晰地观察到丘脑-皮质回路的投射过程<sup>[25]</sup>。此外,神经元活动在卒中时期会产生扩散性去极化(spreading depolarization, SD)并向梗死周围传播<sup>[26]</sup>,病理性的神经活动所致的神经元肿胀、树突棘损伤等问题越来越受到人们关注。在体双光子钙成像能够监测单个神经元或神经元群体的活动模式,以更好地理解 SD 与卒中的关系<sup>[27]</sup>。在卒中急性期,SD 会促使梗死附近半暗带的快速的树突珠状变化,引起树突和树突棘的急性损伤,从而扩大缺血核心范围<sup>[28]</sup>。在缺血去极化波期间,小鼠体感皮层顶端树突结构的丢失被证实与细胞内钙离子水平的增加同步<sup>[29]</sup>,因此钙浓度的变化可用于评估脑损伤程度。此外,体内双光子钙成像显示 SD 发生率的降低可能与小胶质细胞缺失有关<sup>[30-31]</sup>。在目前,小胶质细胞的作用仍受到争议,利用高速活体双光子激光扫描显微镜记录缺血性卒中急性期的小胶质细胞钙信号,将为评估小胶质细胞在卒中的作用提供了必要的工具。

在基因编码的钙指示剂和高分辨率成像技术的推动下,科学家们可以在更高通量的细胞中观察特异性的神经元放电及其放电模式和规律。例如,双光子显微镜显示通过注射表达钙指示剂 GCaMP6s 的 6 s-AAV 转导的神经元被证明能够记录大约 1500 个锥体神经元活动,而对皮质锥体神经元中表达 GCaMP6s 的转基因小鼠能够记录大约 2300 个神经元活动。与被 AAV 转导的神经元相比,特异性的转基因 GCaMP 能够在较低的 GCaMP6 表达水平上有更快的荧光动力学,提示了 GCaMP 的递送方式可能会影响其性质<sup>[32]</sup>。另外,通过优化双光子显微镜传递的激光功率和激发效率将允许

在相似的信噪比和采样频率下跟踪超过 10 000 个锥体神经元,为追踪多个脑区域的代表性神经元种群提供了更多可能性<sup>[33]</sup>。然而,钙成像技术也有局限性,即需要在动物麻醉的情况下进行,而麻醉本身可能也会影响神经元的活动。最近的 Nature 杂志上报道了一种将显微镜改良为介观物镜面向大脑上方,双光子物镜面向水平方向,最后通过微棱镜成像的正交轴成像模式。这种新型技术打破了传统只能在麻醉状态下进行局部神经元活动监测的成像方式,使科学家们能够对清醒小鼠同时进行局部微电路细胞分辨率的双光子钙成像和整个大脑皮质的介观广角钙成像<sup>[34]</sup>。

#### 4 磁共振成像技术

磁共振成像在卒中的诊断和研究中发挥着重要作用。根据不同的研究目的,中枢神经系统的 MRI 有多种方法,如弥散张量成像(diffusion tensor imaging, DTI)、fMRI、脑灌注成像等,其中 fMRI 被广泛应用于研究激活脑区之间的 FC<sup>[35]</sup>。fMRI 是一种依靠血氧水平依赖信号(blood oxygen level dependent, BOLD)反应脑内神经元活动的成像方式<sup>[36]</sup>。神经元活动时,局部脑血流量增加程度高于耗氧量,这种差异使活动区的静脉血氧浓度较周围组织明显升高,去氧血红蛋白相对减少。由于氧合血红蛋白的反磁效应和脱氧血红蛋白的顺磁效应,脱氧血红蛋白浓度低的体素会导致 BOLD 信号升高,而浓度高的体素会导致 BOLD 信号降低。在 fMRI 的基础上还衍生出了许多分析 FC 的方法,如独立成分分析<sup>[37]</sup>、脑动力学分析<sup>[38]</sup>、低频振荡振幅分析<sup>[39-40]</sup>等。这些分析方法能够从不同方面揭示卒中的 FC 状态。

一项研究结合 fMRI 和 DTI 分析纤维束的多模态成像方式,运用独立成分分析发现卒中患者静息态脑网络的背侧注意网络的双侧顶叶和扣带回的 BOLD 显著降低,提示存在 FC 异常。DTI 结果显示 FC 减少的大部分区域伴随着纤维数量的增加,而高纤维浓度区域神经元较少,这是由于纤维束相较于神经元需要更少的血供和更低的氧水平,因此 FC 的减少可能与大脑白质结构重塑有关<sup>[37]</sup>。额顶叶网络包含额叶皮质,如 M1、背侧和腹侧运动前皮质(dorsal and ventral premotor cortices, PMd/PMv)以及辅助运动区(supplementary motor areas, SMA)和顶叶皮质,如后顶叶皮质和顶叶内沟内的节点,被认

为在初级运动网络中起自上而下的作用,从而控制运动输出。fMRI 已被应用于临床评估额顶叶网络内和额顶叶网络与其他脑区之间的 FC。Stewart 等<sup>[41]</sup>通过任务态 fMRI 横向揭示了卒中康复期的运动选择可能与前运动-前额叶回路激活强度和 FC 相关。该研究发现,卒中患者在执行任务时,其包括右顶下小叶等多个患侧和健侧脑区域被激活。运动反应能力较差的患者激活的脑区域主要集中于患侧 PMd 和背外侧前额叶皮质 (dorsolateral prefrontal cortex, DLPFC),其脑内 iM1-PMd 连接程度升高,iPMd-DLPFC 连接程度降低;相反,运动反应能力较好的患者 PMd 和 DLPFC 的激活程度降低,iPMd-DLPFC 连接程度降低,iPMd-DLPFC 连接程度升高。提示卒中后的康复程度可能与患侧运动前区和前额叶脑区的参与模式有关。Olafson 等<sup>[38]</sup>则利用了脑动力学分析方法揭示了康复时期卒中个体的纵向脑活动模式。该研究表明卒中会导致视觉网络、额顶叶网络,运动网络和默认模式网络被激活,而卒中个体处于额顶叶高振幅激活状态的时间越长,额顶叶网络内的 FC 增加,运动恢复越好。此外,Schulz 等<sup>[42]</sup>联合 fMRI 和动态因果模型观察到卒中恢复良好的患者在简单的视觉引导下用偏瘫手握拳时,iM1-前顶内沟的有效连接显著增强,患侧额顶网络内的耦合模式接近正常。上述这些研究表明,额顶叶回路在卒中康复的过程中具有重要作用,有利于卒中后的神经重塑。

表 2 在体双光子钙成像和磁共振成像技术的比较

Table 2 Comparison of *in vivo* two-photon calcium imaging and magnetic resonance imaging technology

	在体双光子钙成像技术 <i>In vivo</i> two-photon calcium imaging	磁共振成像技术 Magnetic resonance imaging
作用 Effect	记录大脑中的神经元的活动,为光遗传或化学遗传刺激后的神经活动的变化模式提供直观的成像结果。 Identifying and manipulating specific groups of neurons can help unveil the causal relationship between neural network changes and behavior.	
原理 Principle	钙离子是一类重要的神经元胞内信号分子,当神经元膜电位发生去极化,产生的动作电位传导到神经元轴突末梢时,细胞膜上的电压门控钙离子通道打开,大量钙离子内流,包含神经递质的囊泡由突触前膜释放至后膜,下游神经元就得以接收到上游的信号。利用钙离子指示剂将神经元中的钙离子浓度变化通过荧光强度表现出来,最后通过荧光显微镜监测神经元活动。 Calcium ions are crucial intracellular signaling molecules in neurons. When the neuronal membrane depolarizes and conducts an action potential to the axon terminals, voltage-gated calcium channels on the cell membrane open, allowing a large influx of calcium ions. Vesicles containing neurotransmitters are then released from the presynaptic membrane to the postsynaptic membrane, enabling downstream neurons to receive signals from upstream ones. By using calcium indicators, changes in calcium ion concentration within neurons can be represented through fluorescence intensity, which is then monitored using a fluorescence microscope to observe neuronal activity.	利用射频电磁波对至于静磁场中含有自旋不为零的原子核物质进行激发,发生核磁共振,用感应线圈采集磁共振信号,按照一定数学方法进行处理而建立的成像方法。 This imaging method is established by using radiofrequency electromagnetic waves to excite substances with non-zero spin atomic nuclei in a static magnetic field, generating nuclear magnetic resonance. The resonance signals are then collected by an induction coil and processed through specific mathematical methods to create images.

fMRI 不仅应用于临床卒中研究,在识别遗传操作后的神经元活动变化方面也被广泛使用。Vahdat 等<sup>[14]</sup>利用 fMRI 分别在小鼠卒中前后监测 iM1 光刺激所诱导的神经元活动变化。fMRI 结果显示,在卒中前,iM1 刺激激活了脑内多个区域,包括 iM1、iM2、iS1、iStr 和同侧丘脑以及 cM1 和对侧小脑;在卒中后 15 d,BOLD 信号主要集中于同侧丘脑区,而不是同侧皮质区,而卒中后的 29 d BOLD 信号主要集中在 iM1 和 iS1,其中仅有 iS1 的 BOLD 信号幅度超过非刺激组,并与行为改善呈正相关,提示卒中早期 iM1 刺激可能首先诱导丘脑-皮质回路恢复,随后皮质-皮质回路持续恢复。最近报道的锰离子增强 MRI (manganese enhanced MRI, MEMRI) 也被应用于卒中后神经环路研究。锰是一种  $\text{Ca}^{2+}$  类似物,能够通过电压门控钙通道进入活跃的神经元中,因此 MEMRI 能够通过评估钙信号的动态变化直接测量脑区的神经活动,进行神经连接示踪和脑功能成像等研究。由于低剂量的锰就能产生高激活信号,其相对安全性和非侵入性可以连续或重复地对同一只动物成像,因此 MEMRI 能够在实验中用于纵向观察,在神经环路研究中具有广泛的应用前景<sup>[43-44]</sup>。综上所述,在体双光子钙成像技术和磁共振成像技术均能用于记录大脑神经元的活动,表 2 比较了二者之间的区域,方便读者在后续研究中选择合适的成像方法。

续表2

	在体双光子钙成像技术 <i>In vivo</i> two-photon calcium imaging	磁共振成像技术 Magnetic resonance imaging
优缺点 Advantages and disadvantages	<p>优点:可以记录神经网络内单个神经元的活动或网络中神经元的活动,并可以进行细胞类型和神经元亚群特异性分析。 缺点:细胞分辨率水平的神经元活动只能在小视野中进行检查,无法监测不同脑区之间的神经元的集体活动。</p> <p>Advantages: This method allows for the recording of activity from individual neurons within neural networks or groups of neurons in the network, and enables analysis specific to cell types and neuronal subpopulations.</p> <p>Disadvantages: Neuronal activity at the cellular resolution level can only be examined within a limited field of view, making it impossible to monitor the collective activity of neuronal groups across different brain regions.</p>	<p>优点:允许在同一动物的宏观解剖水平上监测神经元重组过程;能够反映全脑功能状态改变和结构连接之间的相互作用。 缺点:时间和空间分辨率低。</p> <p>Advantages: It allows monitoring of neuronal reorganization processes at the macroscopic anatomical level in the same animal; capable of reflecting the interactions between changes in global brain functional states and structural connectivity.</p> <p>Disadvantages: Low temporal and spatial resolution.</p>
应用 Application	<p>1. 活体记录神经元的活动和神经元树突和树突棘的活动; 1. Recording the activity of neurons <i>in vivo</i>, as well as the activity of their dendrites and dendritic spines; 2. 对神经元突触前和突触后进行功能成像; 2. Performing functional imaging of presynaptic and postsynaptic sites of neurons; 3. 用于理解单个神经元与其所在的神经环路中的关系; 3. Utilized to understand the relationship between individual neurons and the neural circuits they belong to; 4. 新生突触和轴突伴随着钙瞬变,可以用于反映神经环路的神经重塑过程。 4. Formation of new synapses and axonal processes, accompanied by calcium transients, can be used to reflect the neuroplasticity processes in neural circuits.</p>	<p>1. DTI 能够对感兴趣的神经环路进行纤维成像,反映疾病状态下及恢复过程中神经环路的纤维变化; 1. DTI allows for the imaging of fibers within specific neural circuits, reflecting the changes in these fibers under disease conditions and throughout the recovery process; 2. fMRI 能够反映控制神经元活动的操作中神经元活动变化,以及在纵向研究中反映不同时期功能连接的变化; 2. fMRI can reveal changes in neuronal activity during manipulations controlling neuronal activity, as well as changes in functional connectivity at different times in longitudinal studies; 3. 检查全脑重塑情况。 3. Examines whole-brain reorganization.</p>

## 5 小结

本文回顾了当前应用于解析卒中后神经环路重建的主要的先进技术,其中光遗传学和化学遗传学技术用于操纵特定的神经元群体,有助于揭示神经网络变化和行为之间的因果关系;而在体双光子钙成像和 MRI 等成像技术能够提供神经元的活动模式和大脑区域之间激活模式,使人们能够更深入地了解脑网络重组和神经环路形成。这些技术相结合将为分析神经可塑性过程以及开发卒中的新疗法开辟了无限的可能性。无论是使用药理学方法还是使用神经调控手段治疗卒中的功能障碍,都必须要了解清楚调节与治疗过程及行为康复相关的神经机制,可视化技术最终为这些治疗方法提供明确的治疗效果和精确的靶向性。尽管目前这些技术仍存在组织光损伤、成像延迟等局限性,相信在未来的开发中,解决这些技术难题将有助于提供更准确的神经活动机制,进一步推进其在临床神经科学的应用。

### 参考文献:

[ 1 ] GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden

of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [ J ]. Lancet Neurol, 2021, 20( 10 ): 795-820.

[ 2 ] 高倩, 王建宇, 孟伟建, 等. 大豆皂苷 Bb 预处理对脑缺血再灌模型大鼠的神经保护作用 [ J ]. 中国比较医学杂志, 2022, 32( 7 ): 74-80.

GAO Q, WANG J Y, MENG W J, et al. Neuroprotective effect of soyasaponin Bb pretreatment in cerebral ischemia/reperfusion model rats [ J ]. Chin J Comp Med, 2022, 32( 7 ): 74-80.

[ 3 ] CETO S, COURTINE G. Optogenetic interrogation of circuits following neurotrauma [ J ]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 803856.

[ 4 ] 张游, 靳子言, 尹亚龙, 等. 电针足三里、内关穴对大鼠缺血性损伤后神经可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的影响 [ J ]. 中国比较医学杂志, 2023, 9( 6 ): 16-23.

ZHANG Y, JIN Z Y, YIN Y L, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity-related factors GAP-43 and SYN after ischemic injury in rats [ J ]. Chin J Comp Med, 2023, 9( 6 ): 16-23.

[ 5 ] BICE A R, XIAO Q, KONG J, et al. Homotopic contralesional excitation suppresses spontaneous circuit repair and global network reconnections following ischemic stroke [ J ]. Elife, 2022, 11: e68852.

[ 6 ] WAHL A S. State-of-the-art techniques to causally link neural plasticity to functional recovery in experimental stroke research

- [J]. *Neural Plast*, 2018, 2018: 3846593.
- [7] PING A, PAN L, ZHANG J, et al. Targeted optical neural stimulation: a new era for personalized medicine [J]. *Neuroscientist*, 2023, 29(2): 202–220.
- [8] GENG Y, LI Z, ZHU J, et al. Advances in optogenetics applications for central nervous system injuries [J]. *J Neurotrauma*, 2023, 40(13/14): 1297–1316.
- [9] CHENG M Y, ASWENDT M, STEINBERG G K. Optogenetic approaches to target specific neural circuits in post-stroke recovery [J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13(2): 325–340.
- [10] LIM D H, LEDUE J, MOHAJERANI M H, et al. Optogenetic approaches for functional mouse brain mapping [J]. *Front Neurosci*, 2013, 7: 54.
- [11] CHENG M Y, WANG E H, WOODSON W J, et al. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(35): 12913–12918.
- [12] SHAH A M, ISHIZAKA S, CHENG M Y, et al. Optogenetic neuronal stimulation of the lateral cerebellar nucleus promotes persistent functional recovery after stroke [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46612.
- [13] ADAM Y, KIM J J, LOU S, et al. Voltage imaging and optogenetics reveal behaviour-dependent changes in hippocampal dynamics [J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 413–417.
- [14] VAHDAT S, PENDHARKAR A V, CHIANG T, et al. Brain-wide neural dynamics of poststroke recovery induced by optogenetic stimulation [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(33): eabd9465.
- [15] LIM D H, LEDUE J M, MOHAJERANI M H, et al. Optogenetic mapping after stroke reveals network-wide scaling of functional connections and heterogeneous recovery of the peri-infarct [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(49): 16455–16466.
- [16] BISELLI T, LANGE S S, SABLOTTNY L, et al. Optogenetic and chemogenetic insights into the neurocircuitry of depression-like behaviour: a systematic review [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 9–38.
- [17] VAN STEENBERGEN V, BAREYRE F M. Chemogenetic approaches to unravel circuit wiring and related behavior after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2021, 345: 113839.
- [18] OZAWA A, ARAKAWA H. Chemogenetics drives paradigm change in the investigation of behavioral circuits and neural mechanisms underlying drug action [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 406: 113234.
- [19] PATI S, SALVI S S, KALLIANPUR M, et al. Chemogenetic activation of excitatory neurons alters hippocampal neurotransmission in a dose-dependent manner [J]. *eNeuro*, 2019, 6(6): ENEURO.0124–ENEURO.0119.
- [20] WANG Y C, GALEFFI F, WANG W, et al. Chemogenetics-mediated acute inhibition of excitatory neuronal activity improves stroke outcome [J]. *Exp Neurol*, 2020, 326: 113206.
- [21] MOTAHARINIA M, GERROW K, BOGHOZIAN R, et al. Longitudinal functional imaging of VIP interneurons reveals sup-population specific effects of stroke that are rescued with chemogenetic therapy [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6112.
- [22] OH J, LEE C, KAANG B K. Imaging and analysis of genetically encoded calcium indicators linking neural circuits and behaviors [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2019, 23(4): 237–249.
- [23] 孙伟铭, 刘观秀, 董香丽, 等. 双光子钙成像技术在非人灵长类动物大脑皮层神经元功能的研究现状 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(7): 949–954.
- SUN W M, LIU G X, DONG X L, et al. Research status of two-photon calcium imaging of cortical neuronal functions in non-human Primates [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(7): 949–954.
- [24] XIONG H, TANG F, GUO Y, et al. Neural circuit changes in neurological disorders: evidence from *in vivo* two-photon imaging [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 87: 101933.
- [25] TENNANT K A, TAYLOR S L, WHITE E R, et al. Optogenetic rewiring of thalamocortical circuits to restore function in the stroke injured brain [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15879.
- [26] 梁新宜, 但炜, 练欢, 等. 皮层扩散性去极化在急性脑损伤中的研究进展 [J]. *临床神经外科杂志*, 2021, 18(6): 709–713.
- LIANG X Y, DAN W, LIAN H, et al. Research progress of cortical spreading depolarization in acute brain injury [J]. *J Clin Neurosurg*, 2021, 18(6): 709–713.
- [27] SHIH A Y, BLINDER P, TSAI P S, et al. The smallest stroke: occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(1): 55–63.
- [28] RISHER W C, ARD D, YUAN J, et al. Recurrent spontaneous spreading depolarizations facilitate acute dendritic injury in the ischemic penumbra [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(29): 9859–9868.
- [29] MURPHY T H, LI P, BETTS K, et al. Two-photon imaging of stroke onset *in vivo* reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(7): 1756–1772.
- [30] SZALAY G, MARTINECZ B, LÉNÁRT N, et al. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11499.
- [31] TVRDIK P, KEARNS K N, SHARIFI K A, et al. Calcium imaging of microglial network activity in stroke [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2034: 267–279.
- [32] WEI Z, LIN B J, CHEN T W, et al. A comparison of neuronal population dynamics measured with calcium imaging and electrophysiology [J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16(9): e1008198.
- [33] SOFRONIEW N J, FLICKINGER D, KING J, et al. A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for *in vivo* imaging [J]. *Elife*, 2016, 5: e14472.