# 可植入光遗传学神经刺激光极研究\*

岳 森<sup>1,2,4</sup> 袁明军<sup>1,2,4</sup> 张云鹏<sup>1</sup> 王玺渊<sup>3</sup> 王守岩<sup>1 $\triangle$ </sup>

1(中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所,苏州 215163)
2(中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所,长春 130033)

3(山东农业大学,泰安 271018)

4 (**中国科学院大学**,北京 100049)

摘 要:本文为实现多点神经环路、核团功能的在体调控,研发了可植入光遗传学神经刺激光极。首先,使用了柔 性电路板工艺制作光极的基底,将微型发光二极管焊接于基底之上后使用真空气相镀膜技术制作光极的覆盖膜。 然后使用光功率计等设备对光极进行性能测试,结合动物实验实现光极的验证。最终制作完成的光极尺寸为 500  $\mu$ m×150  $\mu$ m(宽度×基底厚度);将其置于生理盐水 14 d 后仍可正常发光;最大发光功率为 9.31 mW,有效光照面 积达到 3.03 mm<sup>2</sup>;在体实验中检测到了光刺激诱发的小鼠皮层响应,并成功调控了小鼠的次级运动皮层。本文研 制的光极具有光照面积大、植入方便、可长期植入等特点,为核团功能调控等研究提供了新的光遗传学工具。 关键词:光遗传学;神经刺激;光极

中图分类号 R318 文献标志码 A DOI 10.7507/1001-5515.20160057

# Development of An Implantable Optrode for Optogenetic Stimulation

YUE Sen<sup>1,2,4</sup> YUAN Mingjun<sup>1,2,4</sup> ZHANG Yunpeng<sup>1</sup> WANG Xiyuan<sup>3</sup> WANG Shouyan<sup>1</sup>

Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China)
(Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China)

3 (Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)4 (University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, an implantable optrode was developed for optogenetics stimulation of neural population in nuclei or multi-sites in neural circuits. The optrode was composed of base layer, micro-light emitting diode (LED) and coating layer. The base layer was a 150  $\mu$ m thick polyimide substrate on which copper wires and contacts were fabricated by flexible printed circuit board processes. The micro-LED was soldered on the contacts using SnBi. Parylene-C was deposited over the optrode as the coating layer using a vacuum vapor deposition system. The optical output power was tested by optical power meter and the insulating property was tested using saline in the experiment. The stimulation function of the optrode was demonstrated through animal experiment. The width of the optrode was 500 µm and the maximum thickness of the optrode was 310 µm at the LED position. The thickness of the parylene coating layer was about 1  $\mu$ m. The maximum optical output power of optrode was 9, 31 mW and the effective illumination area was a 3. 03 mm<sup>2</sup> spherical cap at 650 µm deep in brain tissue. The optrode was still functional after 14 days in physiological saline. Conventional copper electrodes were used to verify the efficacy of the optrode for stimulation and robust spiking activities of the expressing Channelrhodopsin-2 neurons in the entire cortex of a mouce were recorded. Obvious behavior change happened when light stimulation was applied to the expressing Channelrhodopsin-2 neurons in the secondary motor cortex of the mice. The optrode has the characteristics of large effective illumination range, flexible in implantation and long-term implantable, which provide neural population in nuclei research a new tool.

Key words: optogenetics; neural stimulation; optrode

\* 国家自然科学基金面上资助项目(81471745);苏州市神经工程技术重点实验室资助项目(SZS01414);苏州市医疗器械与新医药专项重 点资助项目(ZXY201425)

△通信作者。E-mail: swang@sibet.ac. cn

### 引言

光遗传学是指通过基因工程技术使特定神经元 细胞表达编码了光敏蛋白的外源生物基因,该光敏 蛋白对光敏感且可以实现对神经元细胞刺激或者抑 制性调控,从而通过光来开启或者关闭相关神经环 路<sup>[1-2]</sup>,是神经科学领域的巨大突破,并被 Nature Methods 评选为 2010 年年度方法<sup>[3]</sup>。

自 2007 年第一次成功实现利用光来控制自由 状态下小鼠运动以来[4],光遗传学实验大多采用以 激光作为光源的光极[5-12]。最早的植入式光极由光 纤和光纤套管组成<sup>[4-5]</sup>,光纤直接与激光器相连,光 纤套管不仅起到固定光纤的作用,还可以用于药物 注射。但是,此光极的光纤在实验过程中需要反复 植入,会对脑组织造成较大损伤。随后出现了一种 改进光极,由一根短光纤嵌入金属管制作而成[6],可 实现一次性较长时间的植入,但该光极需要通过光 纤转接头与激光器连接,这样不仅降低了光传输效 率,还增加了动物背负负荷。随着制造工艺的进步, 尤其是微电子机械系统(micro-electromechanical systems, MEMS)技术的发展与应用,出现了一系 列将光纤与电记录触点相结合的光极[7-9],此类光极 不仅具有与光纤接近的微小尺寸,还可以记录光纤 照射区域内的神经电活动信号。近年来,发光二极 管(light emitting diode, LED)技术在神经工程领 域的应用进一步扩展了光极的种类<sup>[13-15]</sup>。Kim 等<sup>[13]</sup>制作了一种多参数 LED 光极,集成了温度传 感器与光电传感器,并实现了小鼠的无线调控。但 该光极过于柔软,需要通过额外的管道结构才能植 入生物体内。Kwon 等<sup>[14]</sup>在 LED 表面制作锥状的 光纤形成光极,此方法虽然增加了光极的作用深度, 但同时降低了光的传输效率,且工艺较为复杂。Cao 等[15] 使用了柔性电路板工艺制作了一种具有单个 LED 刺激点、三个电记录点的光极,该光极所用 LED 尺寸较大,且封装材料使用了生物兼容性较差 的聚二甲硅氧烷。因此比较而言,激光光源的光极 具有功率较大,较窄光谱带宽,光照方向性好等优 点,但在需要进行大面积光照的核团功能研究或者 需要小动物能够自由移动的行为学研究中[11-12,16-17], 以 LED 作为光源的光极则表现出较大优势。

本文以微 LED 作为光源,应用高精度柔性电路 板加工技术、真空气相镀膜技术以及微焊接工艺,研 制了一种具有神经刺激功能的光极,与低负荷刺激 器结合,实现了小动物麻醉和自由活动两种状态下 的神经调控。本文光极与光纤光极相比具有光照面 积更大、植入更为方便的特点,与相近的 LED 光极 相比具有更好的生物兼容性,能够实现长期植入。

### 1 光极的设计与制作

#### 1.1 目标与方案

光源:目前广泛用于实现刺激神经的光敏感通 道蛋白对光源波长的要求范围为 $(470 \pm 20) \mu m^{[7]}$ , 对光功率密度要求为大于 1 mW/mm<sup>2[5]</sup>。Cree 公 司的 DA3547 型号微 LED 的波长为 460  $\mu m$ ,官方 数据手册显示最大发光功率可达 76 mW,LED 表面 光功率密度远大于 1 mW/mm<sup>2</sup>,可较好地满足光源 要求。

材料:具有较好生物兼容性的材料才能保证光 极的可长期植入。本文光极使用聚酰亚胺(polyimide, PI)作为光极的基底材料,并且使用聚对二甲苯 (parylene)作为光极的覆盖膜材料。聚酰亚胺和聚对 二甲苯都具有稳定的化学性能<sup>[18-19]</sup>,尤其是聚对二甲 苯,不仅绝缘性能优秀,还具有很好的生物兼容性。

结构:如图 1 所示。由于光极需要通过连接器 与刺激器相连,综合考虑连接的稳定性与光极的结 构强度,将光极的尾部设计成了四个焊盘结构。光 极尖端呈梯形形状,有利于插入生物组织并降低对 生物组织的损坏。光极以聚酰亚胺作为基底材料, 微 LED 的正负两极通过铜箔形成的导线连接到光 极的尾部焊盘。光极的可植入部分(图中 AB 段)四 周表面黏附一层 1 μm 厚的透明聚对二甲苯覆盖膜。

尺寸和硬度:为减小对脑组织的损伤,结合小鼠 的脑图谱,确定光极的宽度不应超过 500 μm。光极 应具有一定弹性,过于柔软会影响植入的精度,过于 坚硬则容易在植入过程造成较大组织损伤。本文光 极通过使用不同厚度的材料模拟植入过程,最终确 定光极基底厚度为 150 μm。光极的尺寸如图 2 所示, 其中导线宽度为 50 μm,微 LED 尺寸为 350 μm× 470 μm×155 μm(Cree DA3547)。

### 1.2 制作

光极的制作主要使用柔性电路板工艺和真空气 相镀膜技术。制作工艺流程如图 3 所示。基底材料 选用聚酰亚胺。如图 3(a)所示裁剪出一块厚为 150 μm、长宽都为 100 mm 的聚酰亚胺基板,使用 异丙醇进行清洗后在 100 ℃下热烘 30 min。如图 3 (b)所示在聚酰亚胺基板上涂一层 13 μm 厚的环氧 树脂胶,然后再贴合一层 18 μm 厚的铜箔。如图 3 (c)所示利用加热滚轮加压的方式在铜箔表面贴合



Fig. 1 Design of the optrode



图 2 光极尺寸示意图 Fig. 2 Dimension of the optrode

一层 25  $\mu$ m 厚的负性光致抗蚀剂(主要成分为季戊 四醇三丙烯酸酯)。而如图 3(d)所示是一个光化学 图形转移过程,按照设计好的线路(导线和焊盘)进 行紫外线曝光。曝光区域是光极的导线和焊盘位 置。曝光之后用显影液(主要成分为碳酸钠)将未曝 光区域去除。剩下的光致抗蚀剂(已发生光聚合反 应)在铜箔表面形成了光极的导线和焊盘图形。图 3(e)则为利用刻蚀液(主要成分为双氧水和盐酸)将 裸露的铜箔去除。图 3(f)利用强碱溶液(主要成分 为氢氧化钠)将光致抗蚀剂去除,让线路完全露出, 并对线路进行化学镍金表面处理,在铜的表面形成 厚约 3  $\mu$ m 的镍,然后在镍的表面形成 0.08  $\mu$ m 厚 的金。这样可以防止铜被氧化或者腐蚀,并且利于 之后的焊接(微 LED 焊接)和接触(光极尾部焊盘与 连接器的接触)。表面处理之后,利用激光切割技术 围绕线路和焊盘将基板切割成如图 2 所示的形状。

如图 3(g)所示,微 LED 焊接过程为:使用针尖 蘸取少量无铅低温锡膏(DAIKIN HANDA,DA-309Bi,熔点 138 ℃)黏附在 LED 焊盘上,然后将微 LED 正负极对准 LED 焊盘的正负极放置在 LED 焊盘表面,使用镊子轻压 LED 使锡膏粘住 LED,然 后将光极转移至预热台加热区域,考虑到锡膏与预 热台不是直接接触并且为了提高焊接质量,将预热 台温度设定为 230 ℃。在预热台加热区放置 2 s 后 移至预热台的室温区域冷却。之后再用数字万用表 (型号FlukeF18B,美国)的LED测试档测试焊接后



图 3 光极制作工艺流程图

(a)裁剪基材;(b)贴合铜箔;(c)涂覆负性光致抗蚀剂;(d)图形转移;(e)刻蚀;(f)剥离抗蚀剂;(g)焊接微 LED;(h)真空气相镀膜 Fig. 3 Fabrication flow chart of the optrode

(a) cut the substrate; (b) paste the copper foil; (c) coat the negative photoresist; (d) pattern transfer process; (e) etch the unexposed copper foil; (f) peel off the residual photoresist; (g) solder the LED; (h) fabricate the parylene coating layer

的 LED 能否发光,发光则表面 LED 焊接成功。如 图 3(h)所示使用真空气相镀膜系统(型号 Specialty coating systems PDS2010,美国)在光极的可植入部 分镀上一层 1 μm 厚的聚对二甲苯。

## 2 光极的性能测试与功能验证

#### 2.1 性能测试

主要对光极的绝缘性能、发光功率进行了测试。 2.1.1 绝缘测试 采用对比实验方案来确定光极 的绝缘性能。首先配置浓度为0.9%的氯化钠溶液 100 mL,然后取三个未镀聚对二甲苯的光极(三个 光极编号为a、b、c)和三个镀有聚对二甲苯的光极 (三个光极编号为A、B、C),再使用数字万用表(型 号 FLUKE 18B)对不同条件下(置于干燥空气中、浸 入氯化钠溶液中、浸入氯化钠溶液一定时间后取出 等状态)的光极进行 LED 导通测试。实验记录如表 1 所示。表中"一"表示不导通。

2.1.2 光功率测试 将光极连接到直流电源分析 仪(型号 Agilent N6705B,美国),使用光功率计(型 号 THORLABS PM100D,美国)对光极的发光功率 进行测试。分别测试三个光极的光功率-电流曲线, 取光功率的平均值,得到如图 4 所示的光功率-电流 关系图。光功率-电流关系近似为指数曲线关系,驱 动电流 25 mA 时的光功率为 9.31 mW。本研究组 自主研发的无线刺激器的供电电流范围为 2~8 mA,建立指数模型并进行拟合,可计算出光极连接 无线刺激器时光功率范围为 1.2~3.9 mW。

#### 表1 光极绝缘性能测试结果记录表(单位:V)

Tab. 1 Insulation performance test results of the optrode (unit: V)

测试条件	<b>光极</b> a	光极 b	光极 c	光极 A	光极 B	光极 C
空气中	2.64	2.63	2.64	2.63	2.63	2.65
完全浸入时	0.00	0.00	0.00	2.63	2.63	2.65
浸入 10 s 后	2.64	2.62	2.61	2.62	2.63	2.65
<b>浸入</b> 30 min 后	_	_	_	2.63	2.63	2.65
浸入 12 h 后	_	_	_	2.63	2.63	2.65
<b>浸入</b> 24 h后	_	_	_	2.63	2.63	2.65
<b>浸入</b> 14 d 后	_	_	_	2.63	2.63	2.65

2.1.3 刺激范围模拟测量 假设光极周围生物组 织各向同性并使用球冠模型模拟微 LED 光源,建立 如图 5 所示的光极在生物体内平面散射模型<sup>[5]</sup>。结 合微 LED 尺寸( $350 \mu m \times 470 \mu m \times 155 \mu m$ )和发散 角( $126^{\circ}$ ),将球冠的高设定为  $155 \mu m$ ,球半径为  $275 \mu m$ 。球冠模型光源功率取值为 1 mW。引发光 遗传学现象的光功率密度需要大于 1 mW/mm<sup>2</sup>,所 以由图 5 可以看出在光源总功率为 1 mW 的情况 下,光极的有效作用范围为  $100 \mu m$ (与微 LED 表面 的距离),通过球冠面积计算公式计算出最大有效作 用面的面积为 0. 49 mm<sup>2</sup>(球冠的球面面积)。随着 光功率的提高,光极的有效作用范围不断扩大。当 光极工作在发光功率 3. 9 mW 时,有效作用范围约 为 250  $\mu$ m,最大有效作用面的面积达到 0. 98 mm<sup>2</sup>。 而在相同范围内,以直径 200  $\mu$ m、发散角 32°的光纤 为例<sup>[5]</sup>,其最大有效作用面的面积只有 0. 096 mm<sup>2</sup> (平面面积)。



图 4 光极发光功率与驱动电流关系图 Fig. 4 Optical output power versus current in measurement

2.2 小鼠麻醉状态下的功能验证

使用激光光纤对本文设计制作的光极进行了对 比实验以验证本文光极的神经刺激功能。实验体为 整个脑皮层表达了 Channelrhodopsin-2(ChR2)的麻 醉状态下的转基因小鼠。将光极植入麻醉状态下的 小鼠的脑皮层并连接无线刺激器,同时在小鼠脑皮 层另一处植入信号采集微电极(直径为 30 μm 的铜 丝)。使用多通道生理信号采集系统(型号 Cerebus,美国)进行信号记录。之后再将光极换成激光 光纤进行刺激与信号采集,得到另一组信号数据。 共进行了两种模式的刺激,分别为 1 Hz 频率、10 ms 刺激时长和 20 Hz 频率、10 ms 刺激时长,实验结果 如图 6 所示。由图可以看出,光极成功引发表达了 ChR2 的小鼠脑皮层的兴奋。在 1 Hz 频率下,诱发 信号形状一致,说明光极与激光具有相同的刺激效 果。在 20 Hz 频率下,光极刺激同样可以诱发相似 神经活动。

2.3 小鼠自由移动状态下的功能验证

使用 Thy1-ChR2-EYFP(Thymocyte antigenl-Channelrhodopsin2-Enhanced yellow fluorescent protein)转基因小鼠进行了在体实验验证。将光极 植入小鼠次级运动皮层,使用自主研发的无线刺激 器驱动光极,刺激器通过自制背包固定在小鼠背部。 术后 5 天在小鼠处于自由活动状态下进行刺激实 验,如图 7 所示。图 7 左小鼠处于静止状态,此时光 刺激没有开启。图 7 右是光刺激开启之后的小鼠状 态,小鼠明显由静止进入运动状态。实验结果表明 本文光极在小鼠自由移动状态下能够成功实现神经 刺激功能。

# 3 结论

本文设计并制作了一种具有神经刺激功能的光 遗传学光极。光极尺寸为 500  $\mu$ m×150  $\mu$ m(宽度× 基底厚度),置于生理盐水 14 d 后仍可正常发光,最 大发 光 功 率 为 9.31 mW,有 效 光 照 面 积 达 到 3.03 mm<sup>2</sup>,在体实验成功验证了本文光极的神经刺 激作用。本文光极与光纤光极<sup>[5-12]</sup>相比具有光照面 积更大、植入更为方便的特点,与相近的 LED 光 极<sup>[13-15]</sup>相比具有更好的生物兼容性,能够实现长期 植入,为需要刺激较大核团区域的核团功能研究、要 求实验体活动范围较大的行为学研究提供了较好的



Fig. 5 Simulation results of light intensity distribution as light propagates through the brain tissue





Fig. 6 Comparison of the recording signal resulting from laser stimulation and optrode stimulation



光刺激开启前

光刺激开启后

图 7 自由移动状态下小鼠实验记录图 Fig. 7 Freely-moving mouce with an optrode implanted

实验解决方案。此外,本文光极的解决方案还具有 工艺简单、制作周期短、成本低廉等特点,容易实现 大批量生产,对神经科学的研究具有积极意义。

#### 参考文献

- [1] WARDEN M R, CARDIN J A, DEISSEROTH K. Optical neural interfaces [J]. Ann Rev biomed Eng, 2014, 16: 103-129.
- [2] 陈宜张. 光遗传学研究[J]. 科学(上海), 2014, 66(4): 21-26.
- [3] Editorial. Method of the Year 2010 [J]. Nat Methods, 2011, 8(1): 1.
- [4] ADAMANTIDIS A R, ZHANG Feng, ARAVANIS A M, et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons [J]. Nature, 2007, 450 (7168): 420-424.
- [5] ARAVANIS A M, WANG Liping, ZHANG Feng, et al. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology [J]. J Neural Eng, 2007, 4(3): S143-S156.
- [6] ZHANG Feng, GRADINARU V, ADAMANTIDIS A R, et al. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures [J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 439-456.
- [7] WU Fan, STARK E, IM M, et al. An implantable neural probe with monolithically integrated dielectric waveguide and

recording electrodes for optogenetics applications [J]. J Neural Eng, 2013, 10(5): 056012.

- [8] KANNO S, LEE S, HARASHIMA T, et al. Multiple optical stimulation to neuron using Si opto-neural probe with multiple optical waveguides and metal-cover for optogenetics [C]// 35th Annual International Conference of the IEEE EMBS. Osaka: 2013: 253-256.
- [9] ZHANG J, LAIWALLA F, KIM J A, et al. A microelectrode array incorporating an optical waveguide device for stimulation and spatiotemporal electrical recording of neural activity [C]// Engineering in Medicine and Biology Society (EM-BC). Minneapolis: 2009; 2046-2049.
- [10] HIRA R, HONKURA N, NOGUCHI J, et al. Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex [J]. J Neurosci Methods, 2009, 179(2): 258-263.
- [11] WARDEN M R, SELIMBEYOGLU A, MIRZABEKOV J J, et al. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge [J]. Nature, 2012, 492(7429): 428-432.
- [12] WITTEN I B, STEINBERG E E, LEE S Y, et al. Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement [J]. Neuron, 2011, 72(5): 721-733.

(下转第 367 页; Continued on Page 367)

filtering [C]// IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: Nano to Macro, 2004. IEEE, 2004: 336-339.

- [6] PENNEC X, FILLARD P, AYACHE N. A riemannian framework for tensor computing [J]. Int J Comput Vis, 2006, 66(1): 41-66.
- [7] ARSIGNY V, FILLARD P, PENNEC X, et al. Log-Euclidean metrics for fast and simple calculus on diffusion tensors
  [J]. Magnetic Resonance in Medicine, 2006, 56(2): 411-421.
- [8] FILLARD P. Riemannian processing of tensors for diffusion MRI and computational anatomy of the brain [D]. Nice: University of Nice-Sophia Antipolis, 2008.
- [9] COLLARD A, BONNABEL S, PHILLIPS C A. Anisotropy

preserving DTI processing [J]. Int J Comput Vis, 2014, 107 (1): 58-74.

- [10] BASSER P J, PIERPAOLI C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI [J]. J Magn Reson Ser B, 1996, 111(3): 209-219.
- [11] 邵宇,刘莹,孙富春.基于 Riemann 度量的张量值图像各向异 性插值[J].清华大学学报:自然科学版,2012,52(4):550-556.
- [12] YANG Feng, ZHU Y M, MAGNIN I E, et al. Featurebased interpolation of diffusion tensor fields and application to human cardiac DT-MRI[J]. Med Image Anal, 2012, 16(2): 459-481.

(收稿:2014-04-02 修回:2015-03-10)

#### (上接第 342 页; Continued from Page 342)

- [13] KIM T I, MCCALL J G, JUNG Y H, et al. Injectable, cellular-scale optoelectronics with applications for wireless optogenetics [J]. Science, 2013, 340(6129): 211-216.
- [14] KWON K Y, KHOMENKO A, HAQ M, et al. Integrated slanted microneedle-LED array for optogenetics [C]// 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). Osaka: 2013: 249-252.
- [15] CAO H, GU Ling, MOHANTY S K, et al. An integrated μLED optrode for optogenetic stimulation and electrical recording [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2013, 60(1): 225-229.
- [16] SMITH K S, VIRKUD A, DEISSEROTH K, et al. Reversible online control of habitual behavior by optogenetic perturbation of medial prefrontal cortex [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(46): 18932-18937.
- [17] ZALOCUSKY K, DEISSEROTH K. Optogenetics in the behaving rat: integration of diverse new technologies in a vital animal model [J]. Optogenetics, 2013, 1: 1-17.
- [18] 周洪波,李刚,张华,等.简易低成本柔性神经微电极制作方法 [J].光学精密工程,2007,15(7):1056-1063.
- [19] 芮岳峰,王亚军,刘景全,等. 基于 Parylene 的柔性生物微电极 阵列的制作[J]. 纳米技术与精密工程,2011,09(5):422-426. (收稿:2015-05-27 修回:2015-08-24)