

医学院校本科生开展光遗传学实验技术原理及应用的教學初探

庄羽翔¹ 隋建峰² 叶建宁³

¹重庆医科大学附属第三医院放射科 401120; ²陆军军医大学基础医学院基础医学教学实验中心, 重庆 400038; ³陆军军医大学第二附属医院神经内科, 重庆 400037

通信作者: 叶建宁, Email: jningye@tom.com

【摘要】 本文对国内医学院校开展针对本科生的光遗传学实验技术原理与应用教学的必要性、主要内容、教学难点及教学实施过程中应注意的理论和实践问题进行了初步分析; 特别强调了应重点讲解的技术原理, 包括其何以实现对特定的神经通路进行选择性的干预, 何以分别实现对细胞兴奋或抑制效应的双向控制, 以及开展光遗传学实验的主要过程。最后对近期在授课过程中的体会进行了初步总结, 以供相关院校基础医学实验教学参考, 并推动国内医学院校本科生光遗传学实验教学的开展。

【关键词】 光遗传学; 神经科学; 光敏蛋白

【中图分类号】 R33

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2019.05.008

The principle and application of optogenetics experimental technology for undergraduates in medical colleges

Zhuang Yuxiang¹, Sui Jianfeng², Ye Jianning³

¹The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China; ²Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University, Chongqing 400038, China; ³Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: Ye Jianning, Email: jningye@tom.com

【Abstract】 In this paper, we have made a preliminary analysis on the necessity, main contents and difficulties in teaching medical undergraduates the principles and applications of optogenetics experimental technology. We focused on theory and practice teaching and emphasized on the most important technological principles, including how to achieve selective intervention of specific neural pathways; how to achieve two-way control of cell excitation or inhibition effect and the main process of the experiment. Finally, we have summarized our recent experience in the teaching process, to provide reference for basic medical experiments teaching in related medical colleges, so as to promote optogenetics experimental teaching for undergraduates in domestic medical colleges.

【Key words】 Optogenetics; Neuroscience; Photosensitive protein

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1485.2019.05.008

光遗传学(optogenetics)又称光刺激基因工程(optical stimulation plus genetic engineering),是一种通过联合使用光学技术和重组 DNA 技术实现对细胞或分子进行精确操控的变革性研究手段^[1-4]。该技术的关键在于首先在靶细胞表达外源性微生物视蛋

白,如通道视紫红质(channelrhodopsin, ChR),然后进行光刺激干预。使视蛋白对光照发生相应的反应,进而使神经元产生兴奋或者抑制效应^[5]。目前,世界上有越来越多的科学家正在利用该技术研究大脑的工作原理,并不断取得里程碑式的突破^[6-8]。但是,目

前国内医学院校本科生关于光遗传学实验技术原理及应用的课程设置似乎没有跟上快速发展的神经科学研究趋势。鉴于 21 世纪自然科学的重心已转移到生命科学特别是神经科学,以及该技术在神经科学的重要性,值得在本科生课堂教学中尝试介绍。为此,本文就在本科生课堂开展“光遗传学实验技术原理及应用”教学进行了相关探讨,就开展该课程的重要性、必要性、可行性及应注意问题进行了分析。

1 光遗传学实验技术特点及其在神经科学中的重要性

相对于传统的不可逆性的电毁损、机械性毁损技术,光遗传学实验技术对于神经细胞的操控具有的最大优点是对细胞类型的选择性强,并可分别实现兴奋或抑制双向调控^[3-4]。而相对于神经药理学方法的可逆性失活技术,光遗传学技术对神经细胞操控的主要优点是时间分辨率高^[1-2]。这些特点克服了传统电生理学或药理学手段控制细胞或整体活动的各种弊端,实现了针对特定的神经元及其特定的投射通路进行精确的操控干预,这对神经科学的重要性不言而喻。近年来神经科学采用该技术已在许多方面包括生理性回路和病理性回路研究领域取得突破性进展^[9-11],这些工作对阐明大脑的工作原理、解开大脑的奥秘具有划时代的意义。此外,通过光遗传学技术也可调控特定的信号传导通路,进而观察动物行为的改变。因此,光遗传学技术虽然起源于神经科学,但是随着其迅猛发展,其应用已逐步推广到细胞生物学、药理学等许多领域^[12-14]。

2 医学院校本科生开展光遗传学实验技术原理与应用教学的必要性

虽然近年来光遗传学技术在神经科学被广泛应用,由该技术支持的实验研究不断获得突破,但是目前国内医学院校关于光遗传学实验技术的课程教学远没有跟上日新月异的神科学研究趋势。受国内医学院校传统的教学内容安排的限制,关于神经科学理论和实验技术的课程在本科生多未开展,相关的研究进展更难以在实验课堂上得到演示。这种状况值得引起关注。神经科学研究目前采用最受重视的研究策略是分子细胞水平的测量联合整体水平的观察,整体水平的神经行为学实验结合特异性的神经通路干预研究备受重视,而光遗传学技术以其独特的选择性优势在各种神经回路分析过程被广泛采

用^[1-6]。应该尝试在本科生教学内容中加以介绍让本科生理解光遗传学技术的基本概念、实验的基本过程,及其在基础研究及应用研究中的应用。相关内容的学习不仅有助于本科生了解先进的研究方法和相关原理,对于了解脑科学研究的最近前沿也具有重要价值。

3 医学院校本科生开展光遗传学实验技术原理及应用教学的主要内容

光遗传学实验技术的主要过程^[1-4,6-7]包括:①找寻合适的光敏通道蛋白,需要有天然光敏性,或经基因重组修饰。②遗传信息的传递,通过转染、转基因动物等方式将光敏基因遗传信息传递给目标细胞。③目的基因表达特异性确认及功能验证,包括功能学鉴定、形态学鉴定。④通过行为或离体脑片测试评估细胞活动干预后的在体或离体效果。

从上述具体内容看,光遗传学实验所需的背景知识并不深奥,本科生在学习过生物化学的基本知识后已完全可以理解该技术的原理和应用。为了便于理解,根据近年在我校本科生开展的光遗传学实验技术原理及应用教学的经验,鉴于其与技术相关的知识点相对分散,该课程的讲解可以“问题式”引导为宜,这样可以凝聚重点,引起学生思考,加强印象。建议光遗传学实验技术原理及应用教学的主要内容可以按照以下六个问题按顺序进行由浅入深的讲授。

3.1 发展该技术理由

应强调是为了实现高时间及空间分辨率地干预特定的神经元活动以及特定的神经回路活动,甚至特定的蛋白分子功能的需要。这里需要与传统的干预技术包括电生理和药理学技术相对照。

3.2 实现选择性干预的基本策略

应强调光照本身并无选择性,病毒扩散过程也无选择性;但“目的基因是否表达”可被选择性控制,这是技术原理的关键所在。

3.3 如何选择性表达光敏分子

应强调通过细胞特异的启动子能够实现选择性转录和表达过程。应列出常用的细胞特异启动子。例如,谷氨酸能神经元的启动子是 CaMKII α ;胶质细胞的启动子是 GFAP,等等。

3.4 如何确定光敏通道表达的范围

通过荧光蛋白报告基因表达的荧光蛋白产物实现观察,这里要给出清晰的病毒表达荧光图片,并对

照讲解。

3.5 如何验证光敏分子表达的特异性及功能

给出相关的荧光蛋白结合相关的组织化学实验结果,解释如何验证目的基因表达的特异性。解释以离体电生理实验验证光敏蛋白功能的基本原理。

3.6 如何分别实现对胞细胞的兴奋或抑制效应(双向控制)

取决于表达的光敏分子的类型。应强调阳离子通道蛋白对蓝光敏感,例如视紫红质通道蛋白 2 型(channelrhodopsin2, ChR2);阴离子通道蛋白对黄光敏感,例如嗜盐菌视紫红质(halorhodopsin)。并简单回顾细胞的动作电位和静息电位基本概念。

4 医学院校本科生开展光遗传学实验技术原理及应用教学中的难点

4.1 如何实现对特定的神经通路的选择性干预

这里需要强调两种方式。对于简单通路而言,采用一般选择方法即转染胞体,而照射轴突即可,即针对轴突末梢而不针对细胞体的干预,可做到相对精确;而对于复杂通路的精确选择,需采用逆向选择法,即采用双病毒策略或转基因动物结合单病毒技术。这里涉及复杂的分子生物学技术前沿知识,应慎重取舍讲授的重点内容,确保学生理解。

4.2 如何对基于神经递质分类的不同类型神经元进行选择标记和干预

这是该技术的难点。应强调 Ach 能、GABA 能、DA 能等神经元的启动子过长,病毒包装困难,需联合 Cre 重组酶技术实现对其选择性标记。应细致讲解 Cre 重组酶的特殊作用及非特异性启动子的使用的关键策略。先将目的基因序列进行倒位,局部注射病毒使所有类型的细胞均受到转染,但只有存在 Cre 重组酶的细胞,才可实现目的基因的倒位,继而进行表达。

4.3 如何选择性标记与特定功能相关的活动神经元并进行选择性干预

首先强调其理论假设是,特定的活动神经元群活动对应于特定的行为,然后细致讲解双启动子技术。即药物依赖型启动子 TRE 和活动依赖型启动子 FOS 的应用。最后应注意,需简单说明光遗传学实验技术的局限及相关技术的发展^[1-2,4,6],包括对神经细胞的非生理性兴奋问题、转染效率问题、光敏蛋白长期表达的潜在安全性问题、启动子的特异性问题、光纤埋置的有创问题,等等。简单提及纳米技术驱

动神经元兴奋、声遗传学技术、磁遗传学技术、化学遗传学技术。其中最成熟的是后者,可适当展开对于化学遗传学技术的介绍。最后,可选择几个生理及病理回路研究案例具体分析该技术的应用及相关实验发现,以进一步拓展学生的思维^[9-13]。

5 医学院校本科生开展光遗传学教学的实施

本科生开展光遗传学实验技术原理及应用教学既可在前期基础课程中进行,也可在后期临床课程教学中完成。前者的优点是利于学生较早了解这一技术的原理及应用需求,对后续的相关学习特别是早期进入课题组及相关文献的阅读具有支撑作用。后者的优点是学生已经建立系统的基础医学知识特别是分子生物学知识,课堂理解更为容易。但是,综合两种方式的优点及教学实施的可行性,并考虑到减少对于原有教学实施计划的冲击,建议在医学机能综合实验课程或医学实验设计课程的计划内理论教学中列入该内容。相关课程在国内各医学院校本科生均已开展,且有一定的理论内容设置,适当调整理论课安排即可加入该内容。

根据上述设想,近年在我校临床专业五年制和八年制本科生开展了光遗传学实验技术的原理及应用教学的初步尝试,并通过学生对于光遗传学相关研究文献的阅读理解程度分析了学生对于该实验技术的掌握情况。研究发现,与开展此内容教学之前的年度相比,学生对于相关研究文献的阅读理解能力大有提高,提示在具备的初步的分子生物学知识的基础上,学生完全可以理解光遗传学实验技术的原理和应用等相关内容。

此外,在八年制的实验课堂上,近期以大鼠海马电活动记录的干预效应为观察对象,尝试进行了光遗传学技术的实验教学。要求学生完成大鼠的手术及病毒立体定位微注射过程;观察光敏通道表达情况(教师已备好图片);光敏通道功能的在体验证过程;利用前期的病毒注射大鼠,完成海马细胞电活动记录并观察激光照射效应——放电活动和场电位变化。从初步实施情况看,该实验项目的开展能促进学生对于光遗传学技术及其应用的理解,有助于开阔学生的思维和视野,提高其综合技能,培养学生的求知欲。

总之,医学院校本科生开展光遗传学实验技术原理及应用教学有助于本科生对于相关学科前沿和进展的了解和兴趣培养,有助于发展他们对科学的

爱好,有助于提升医学生的基本科学素养。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 庄羽翔、隋建峰:论文撰写;隋建峰、叶建宁:论文构思、总体把关、论文审订

参考文献

- [1] 陆琦. 光控基因技术研究进展[J]. 科技导报, 2018, 36(5): 39-52.
Lu Q. Research progress on light-operated genetic technology [J]. Science and Technology Review, 2018, 36(5): 39-52.
- [2] 吴菲菲, 谢祥军, 罗婷婷, 等. 遗传学技术在神经科学中的应用策略[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(3): 354-358. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2017.03.018.
Wu FF, Xie XJ, Luo TT, et al. Application Strategy of genetics technology in neuroscience [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2017, 33(3): 354-358. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2017.03.018.
- [3] 滕孝宇, 李云庆. 光遗传学技术——控制神经元活动的“开关”[J]. 专家述评, 2017(5): 1-4. DOI: 10.13276/j.issn.1674-8913.2017.05.001.
Teng XY, Li YQ. Optogenetic technique — a switch of controlling the activities of neurons [J]. Expert Review, 2017(5): 1-4. DOI: 10.13276/j.issn.1674-8913.2017.05.001.
- [4] 孙昌昱. 光遗传学及其在神经科学方面的应用与进展[J]. 生物学通报, 2016, 51(9): 1-6. DOI: 10.3969/j.issn.0006-3193.2016.09.001.
Sun CY. Optogenetics and its application and progress in neuroscience [J]. Bulletin of Biology, 2016, 51(9): 1-6. DOI: 10.3969/j.issn.0006-3193.2016.09.001.
- [5] 王晓敏, 于爱萍, 王国宝, 等. 视紫红质通道蛋白 2 在系统神经科学研究中的应用与展望[J]. 生命科学, 2017, 29(8): 797-803. DOI: 10.13376/j.cbbs/2017109.
Wang XM, Yu AP, Wang GB, et al. Application and outlook of channelrhodopsin-2 in system neuroscience [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2017, 29(8): 797-803. DOI: 10.13376/j.cbbs/2017109.
- [6] 柯美玲, 余维. 记忆痕迹细胞和记忆提取的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(18): 2755-2756. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2017.18.005.
Ke ML, Yu W. Research progress on memory engram cells and memory retrieval [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2017, 33(18): 2755-2756. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2017.18.005.
- [7] 周亭亭, 胡海岚. 胜利经历重塑丘脑-前额叶皮层神经通路以稳固社会等级[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(11): 1379-1382. DOI: 10.11844/cjcb.2017.11.9001.
Zhou TT, Hu HL. History of winning remodels thalamo-PFC circuit to reinforce social dominance [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2017, 39(11): 1379-1382. DOI: 10.11844/cjcb.2017.11.9001.
- [8] 刘兆瑞, 张雪寒. 用光遗传方法激活前额叶皮层对脑区 c-Fos 表达的影响[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2017, 38(3): 11-16. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2017.03.003.
Liu ZR, Zhang XH. Effects of optogenetics stimulation of prefrontal pyramidal neurons on c-Fos expression in prefrontal-related regions [J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2017, 38(3): 11-16. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2017.03.003.
- [9] 杨燕飞, 黄志力. 特异性控制神经元活性法研究睡眠-觉醒机制新进展[J]. 神经药理学报, 2018, 8(1): 25-34. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1396.2018.01.004.
Yang YF, Huang ZL. Recent advance on sleep-wake regulation based on novel techniques for specific manipulations of neuron activities [J]. Acta Neuropharmacologica, 2018, 8(1): 25-34. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1396.2018.01.004.
- [10] Yang L, Dong F, Yang Q, et al. FGF 13 selectively regulates heat nociception by interacting with Nav1.7 [J]. Neuron, 2017, 93(4): 806-821. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.01.009.
- [11] Zhang BB, Yao YY, Zhang HF, et al. Left habenula mediates light-preference behavior in zebrafish via an asymmetrical visual pathway [J]. Neuron, 2017, 93(4): 914-928. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.01.011.
- [12] 李平, 王晓琴, 孙振武, 等. 药物成瘾记忆及其神经环路研究进展[J]. 生物学杂志, 2018, 35(1): 93-96. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2018.01.093.
Li P, Wang XQ, Sun ZW, et al. Research progress in drug addiction memory and its neural circuitry [J]. Journal of Biology, 2018, 35(1): 93-96. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2018.01.093.
- [13] 王正文. 光遗传学和化学遗传学在抑郁症研究中的应用[J]. 济宁医学院学报, 2017, 40(5): 366-371. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2017.05.013.
Wang ZW. Advances in research on depression by optogenetics and chemogenetic [J]. Journal Jining Medical University, 2017, 40(5): 366-371. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2017.05.013.
- [14] 姜婵, 王晞, 刘自强. 利用光遗传学技术实现光起搏的实验研究[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2017, 31(3): 255-259. DOI: 10.13333/j.cnki.cjcpe.2017.03.017.
Jiang C, Wang X, Liu ZQ. An experimental study of optical cardiac pacing by optogenetics [J]. Journal of Chinese Heart Pacing and Electrocardiogram, 2017, 31(3): 255-259. DOI: 10.13333/j.cnki.cjcpe.2017.03.017.

(收稿日期:2018-11-17)

(本文编辑:唐宗顺)