DOI:10.16016/j.1000-5404.201502106

论著

腺相关病毒 AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry 的组织学及通道功能鉴定

刘树雷[1,3],孙 琳[2],吴广延[2],隋建峰[2],曹文富[1] (400016 重庆,重庆医科大学中医药学院中医药教研室[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部教学实验中心[2];400020 重庆,解放军第324医院皮肤科[3])

[摘要] **目的** 对腺相关病毒 AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry 在大鼠内侧前额叶谷氨酸能神经元中表达的组织学及通道功能予以鉴定。**方法** 以立体定位注射技术将腺相关病毒 AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry 注射到 SD 雄性大鼠内侧前额叶,当病毒注射 3~4 周后,采用免疫荧光组织化学技术检测标记蛋白(mCherry)在谷氨酸能神经元(特异启动子 CaMKIIα)的表达情况;利用在体细胞外记录技术观测谷氨酸能神经元所表达的通道蛋白(ChR2)对不同光刺激频率的电生理反应特性。**结果** 病毒成功注射到内侧前额叶并特异表达通道蛋白于谷氨酸能神经元的细胞膜上,表达成功率为(94.6±0.9)%;表达 ChR2 通道蛋白的谷氨酸能神经元对蓝光(470 nm, 20 mW/mm^2,5 ms 波宽,5~80 Hz)产生稳定的光激活反应,并且对低频光刺激(5、10、20 Hz)的反应性优于高频光刺激(40 Hz 和 80 Hz;$P<0.001$)。**结论** 腺相关病毒 AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry 能成功表达在谷氨酸能神经元的细胞膜上,对光刺激有频率选择性。

[关键词] 光遗传学;腺相关病毒;ChR2
[中图法分类号] R-332; R373; R394 [文献标志码] A

Histological features and channel functions of adeno-associated virus AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry in glutamatergic neurons

Liu Shulei[1,3], Sun Lin[2], Wu Guangyan[2], Sui Jianfeng[2], Cao Wenfu[1] ([1] Department of Traditional Chinese Herbs, School of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2] Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3] Department of Dermatology, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing, 400020, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify the histological features and channel functions of adeno-associated AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry expressed in medial prefrontal glutamatergic neurons of rats. **Methods** Adeno-associated AAV 2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry was injected into the medial prefrontal cortex of SD male rats by using stereotaxic apparatus. In 4 to 6 weeks later, immunofluorescence assay was used to detect the expression of mCherry in the glutamate neurons. Electrophysiological characteristics of the channel protein channelrhodopsin-2 (ChR2) expressed in glutamatergic neurons were observed under light stimulations at different frequencies. **Results** The viruses were successfully injected into the medial prefrontal cortex of the rats, and the objective channel protein ChR2 was specifically expressed in the cell membrane of glutamatergic neurons, with an expression rate of (94.6±0.9)%. Glutamate neurons with ChR2 expression showed

[基金项目] 国家自然科学基金预研项目(NSFYY201108);重庆市基础与前沿基金(cstc2014jcyjA1027)重庆市卫生局基金(2013-2-301);博士后基金(2014M5625592)

[通信作者] 曹文富, E-mail:caowenfu9316@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150629.1431.002.html(2015-06-29)

optogenetic stimulation to the blue light (470 nm, 20 mW/mm^2, 5 ms, 5 ~ 80 Hz) stably, and the activations were significant to low frequencies (5, 10 and 20 Hz) than to high frequencies ($P < 0.001$). **Conclusion** Adeno-associated virus AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry successfully leads the expression of channel protein ChR2 in the cell membrane of glutamatergic neurons, and the cells show frequency-selective to light stimulation.

[**Key words**] optogenetics; adeno-associated virus; channelrhodopsin-2; mCherry

Supported by the Pre-research Project of National Natural Science Foundation of China (NSFYY201108), the Project of Chongqing Basic and Frontier Foundation (CSTC2014jcyjA1027), the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-301), and the Postdoctoral Science Foundation of China (2014M5625592). Corresponding author: Cao Wenfu, E-mail: caowenfu9316@163.com

光遗传学是基于分子生物学和光电工程学之上所诞生的一门新兴交叉学科[1-2]。光遗传学技术通过分子生物学手段将来源于低等生物体的视紫红质,如来源于衣藻属的通道视蛋白-2(Channelrhodopsin-2, ChR2),通过基因工程的方法包装成腺相关病毒,把腺相关病毒转染到特定表达在高等哺乳类动物的某类细胞中,同时依据不同的光敏蛋白,对不同波长可见光反应的不同,实现对某一类型细胞或神经元精确调控[3]。最为重要的是,光遗传学技术能够实现自由活动动物神经行为学的毫秒级操控。事实上,在所有的行为学研究方法上,眨眼条件行为却是为数不多的可以精确到毫秒级的行为,然而,目前为止未见任何有关于光遗传学技术应用于眨眼条件行为的研究。我们拟采用大鼠从不同方面结合光遗传学技术对眨眼条件行为进行分析[4]。本实验明确针对腺相关病毒 AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry 在大鼠内侧前额叶谷氨酸能神经元中表达的特异性及其光电效应进行探讨,旨在为进一步在大鼠上探索光遗传学技术解构眨眼条件行为的因果联系提供最基础的材料。

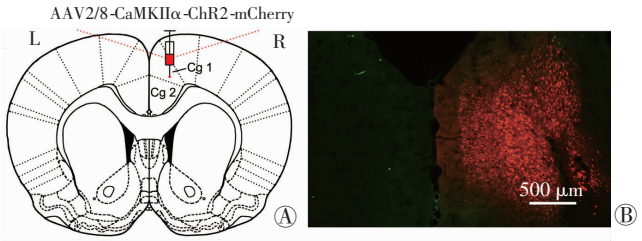
1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物选用雄性 SD 大鼠 30 只,体质量为 300 ~ 350 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。实验期间,所有动物单笼饲养,给予自由进食和饮水,饲养环境保持 12 h 循环灯照。

1.2 病毒注射

氯胺酮(100 mg/kg)和甲苯噻嗪(9 mg/kg)复合腹腔麻醉大鼠后,将其头部固定在脑立体定向仪上(Model 940, David Kopf Instruments, USA),沿颅骨中线切开皮肤和皮下组织暴露前后囟。在右内侧前额叶上颅骨钻一个直径约 0.7 mm 的小孔(前囟前 +1.9 mm,旁开 0.9 mm)。然后将吸取 1.0 μL 病毒载体 AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry 以及空壳病毒载体 AAV2/8-CaMKIIα-mCherry(上海纽恩生物科技有限公司提供)的微量注射器垂直进入内侧前额叶(前囟前 +1.9 mm,旁开 0.9 mm,深度 2.3 mm;图 1A)。通过微量注射泵(53311; Stoelting, USA)控制注射速度(0.05 μL/min),注射完毕后留针 10 min,然后缓慢出针,充分止血,缝合皮肤。



A:病毒在大鼠右内侧前额叶注射位点示意图; B:荧光显微镜观察病毒标记蛋白 mCherry 成功表达在大鼠右内侧前额叶

图 1 大鼠右内侧前额叶经立体定向注射示意图

1.3 免疫组化

病毒注射 3 ~ 4 周后,用 10% 水合氯醛(1 000 mg/kg)腹腔麻醉大鼠,经左心室进入升主动脉快速注入生理盐水 500 mL,然后输入 4 ℃的 4% 多聚甲醛溶液 500 mL,先快后慢。剥开颅骨,小心取出全脑,置于 4 ℃ 4% 多聚甲醛 24 h, 然后再置于 4 ℃ 30% 蔗糖/4% 多聚甲醛 48 h。用 OTC 进行包埋,在冰冻切片机中冰冻连续切片,片厚 30 μm,收集于 0.01 mol/L PBS。脑片用 0.01 mol/L PBS 清洗后,10 min × 3 次,置于 PBS-T(PBS + 0.2% Triton X-100)和 2% 牛血清中 1 h。然后加入一抗(Mouse anti-CaMKIIα 1∶100, C265, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)4 ℃中放置 24 h 后,用 PBS-T 清洗一抗,10 min × 3 次。接着加入二抗(Goat anti-mouse

conjugated to FITC,1∶100,ZF-0312,ZSGB-BIO,Beijing,China)室温避光摇床上孵育 1 h,用 PBS-T 清洗二抗,10 min × 3 次。脑片然后置入 Hoechst(1∶1 000,861405,Sigma-Aldrich,St. Louis,MO,USA)溶液 5 min,用 PBS 清洗,10 min × 3 次。然后封片在荧光显微镜(Olympus BX53F)和激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss LSM 780)下观察拍照。

1.4 在体光诱发细胞外记录

病毒注射 3 ~ 4 周后,用 10% 水合氯醛(1 000 mg/kg)腹腔麻醉大鼠,沿颅骨中线切开皮肤和皮下组织暴露前后囟,用颅骨钻去除右内侧前额叶上的颅骨,并小心去除硬脑膜。用电动微推进器(PC-5N, Narishige, Tokyo,Japan)将 1 个光电极(由 1 根光纤和 16 根微电极丝构成)缓慢推到右内侧前额叶病毒注射位置。光电极的光纤连接到 1 个 470 nm 的 LED(M470F1, Thorlabs,Newton,New Jersey,USA)上,并通过刺激器控制器触发模式(Master-9, A. M. P. I., Jerusalem, Israel)。当记录到光反应细胞后,给予一串光刺激(470 nm,20 mW/mm^2,5 ms 波宽,5 ~ 80 Hz),神经元的动作电位通过多通道细胞外放大器(model 3600,A-M Systems,Sequim,WA,USA)放大后(× 1 000,0.3 ~ 5 kHz),用生理记录仪(Powerlab 16/35,ADInstuments, New South Wales, Australia)记录。放电数据通过 NeuroExplorer 4 (MicroBrightField,Williston,VT,USA)分析。

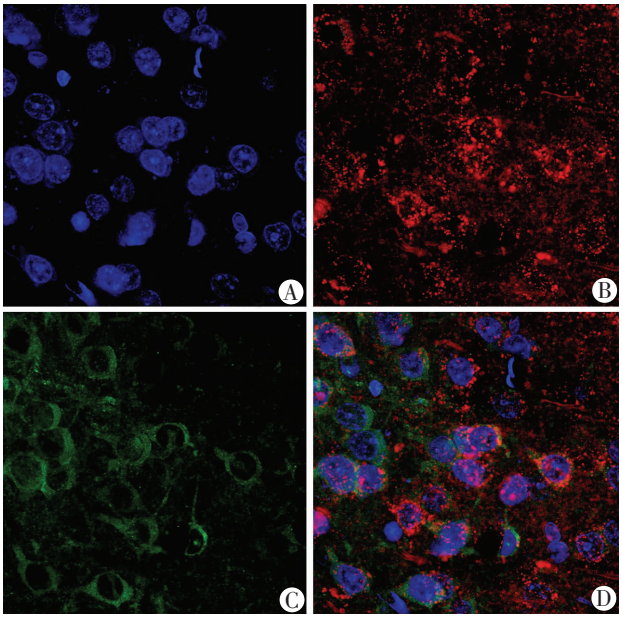
1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 软件中单因素方差分析,进行统计学处理,两两之间的多重比较采用 Tukey。

2 结果

2.1 免疫组化证实 ChR2-mCherry 特异表达在谷氨酸能神经元上

病毒经立体定向注射,在特异性启动子 CaMKIIα 的控制下,ChR2-mCherry 成功在大鼠右内侧前额叶神经元上表达(图 1B)。免疫组化分析结果显示(94.6 ± 0.92)%(图 2)的 CaMKIIα 表达的谷氨酸能神经元表达 ChR2-mCherry 蛋白,提示该病毒具有很高的感染率。另外,(98.87 ± 0.35)% 表达 ChR2-mCherry 的神经元是 CaMKIIα 表达的神经元,提示该病毒感染的特异性很高。



A:细胞核染色;B:病毒表达的荧光蛋白;C:谷氨酸能神经元免疫荧光;D:A,B,C 三幅图片合成

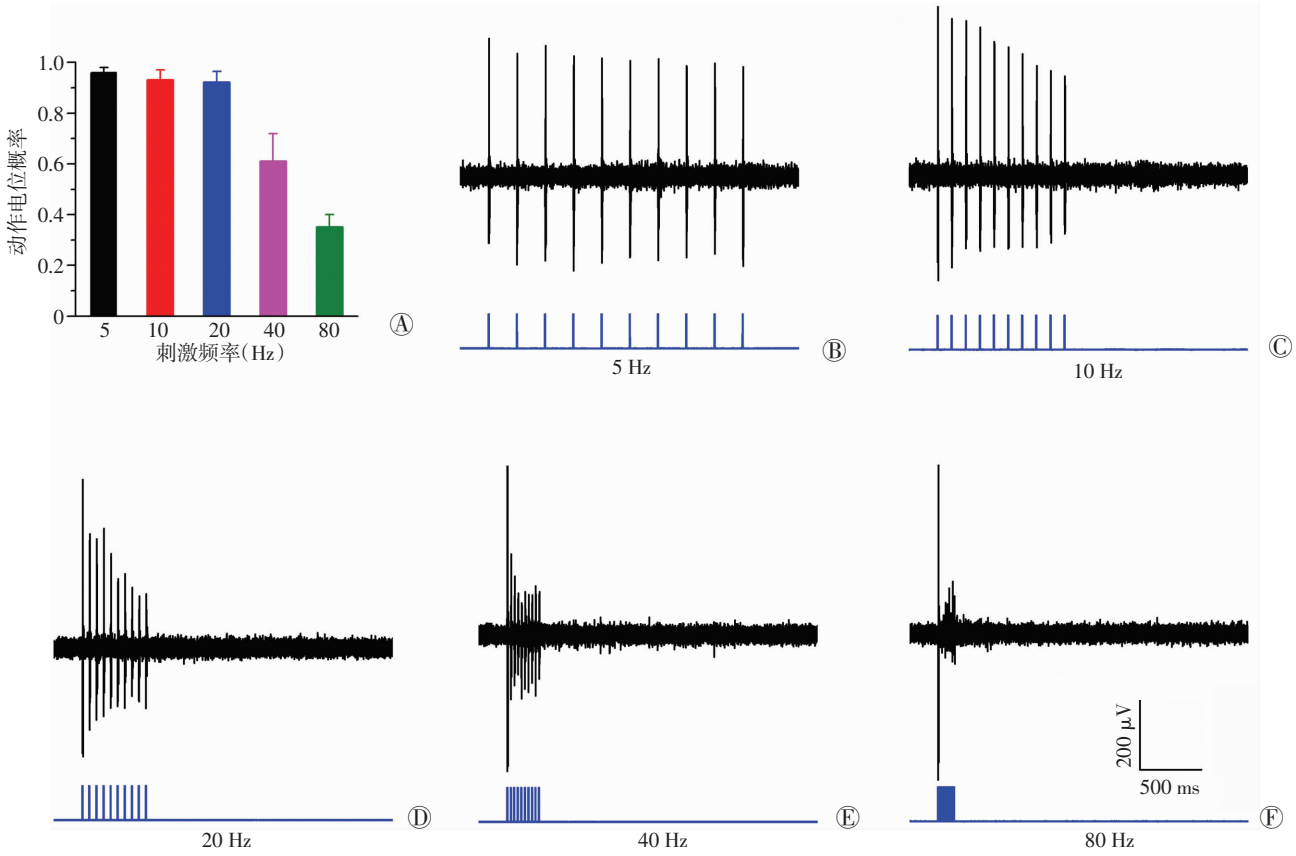
图 2 免疫组化检测病毒表达的细胞选择性鉴定
(激光共聚焦显微镜 ×40)

2.2 在体光诱发细胞外记录

通过在体细胞外记录,给予不同频率的 470 nm 蓝光刺激,观察其诱发的细胞动作电位特点。我们观察到,表达有光敏基因 ChR2 的内侧前额叶谷氨酸能神经元对蓝光(470 nm,20 mW/mm^2,5 ms 波宽,5 ~ 80 Hz)产生稳定的反应(图 3B ~ F),在 5、10 Hz 及 20 Hz 的光刺激模式下,动作电位发放概率未见明显差异(P = 1.025,图 3A ~ D),但是在 40 Hz 和 80 Hz 的刺激模式下,动作电位发放概率相对低频刺激呈现显著下降改变(P < 0.001,图 3A、E、F)。空壳病毒载体 AAV2/8-CaMKIIα-mCherry 虽能特意表达在谷氨酸能神经元上,但不能对蓝光诱发出时相锁定的动作电位。总体结果符合谷氨酸能神经元-ChR2 对于高低频刺激反应差异性的特性[15]。

3 讨论

神经科学界长期以来一直追求能从整体水平来认识大脑的高级功能。然而神经科学研究中传统的药理学及电刺激手段缺乏细胞特异性及时间空间选择性,然而在很多研究方面受到很大限制[5-6]。然而光遗传学具有高度的细胞选择性,是区别其他神经科学研究手段的重要特征之一,本文中主要依靠启动子的选择



A:光刺激频率与表达了ChR2的谷氨酸神经元发生动作电位概率统计图;B:谷氨酸能神经元对5 Hz光刺激反应特性一次记录;C:谷氨酸能神经元对10 Hz光刺激反应特性一次记录;D:谷氨酸能神经元对20 Hz光刺激反应特性一次记录;E:谷氨酸能神经元对40 Hz光刺激反应特性一次记录;F:谷氨酸能神经元对40 Hz光刺激反应特性一次记录

图3 不同的光刺激频率对诱发表达了ChR2谷氨酸能神经元发生动作电位情况

性来达到ChR2在内侧前额叶的谷氨酸能神经元上的表达。CaMKⅡα是广泛表达在中枢神经系统内的一类第二信使相关的蛋白激酶分子,在被证实可作为兴奋性的谷氨酸能神经元的遗传性标志[5-6]。携带CaMKⅡα启动子的病毒载体可特异性的感染在包括前额叶、听皮层、视皮层、海马、丘脑、杏仁体等的兴奋性谷氨酸能神经元,在CaMKⅡα启动子控制下携带有ChR2基因的病毒载体可将ChR2基因选择性的表达在谷氨酸能神经元上,并亦应用在帕金森症、药物成瘾、抑郁、焦虑、精神分裂症、恐惧以及学习记忆相关的研究中[7-13]。

光遗传学技术具有特异性以及空间和时间上的优越性使得该技术具有广泛的应用前景,其通常采取的两种遗传策略将视蛋白表达于特定细胞学类型的神经元中[8]:一是通过细胞类型特异性启动子,二是通过转基因动物。本研究采用的是第一种方式,通过立体定向手段,将携带有细胞特异性启动子的视蛋白病毒载体注射到大脑特定核团。然后利用光神经界面,将来自于激光或发光二极管的光源植入表达有视蛋白的脑区,利用不同波长的光刺激,从而实现对清醒、自由活动动物进行功能获得或缺失的实验目的[9]。功能获得或缺失是通过两大类微生物视蛋白实现的[8]。第一类是执行功能获得性方式的微生物视蛋白,如本文使用的ChR2,本身为光敏感的阳离子通道,当被蓝光激活后可使神经元产生去极化乃至动作电位。第二种为执行功能屏蔽性微生物视蛋白,如盐细菌视紫红质又名光驱动氯离子泵,当被黄光激发时会使细胞产生超极化[7-13]。

腺相关病毒AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry中的ChR2是一种非选择性阳离子通道蛋白,光照下ChR2蛋白发生光学异构反应,ChR2蛋白上的全反式视黄醛转变为13-顺视黄醛。ChR2蛋白的构象改变

导致其通道打开,大量的细胞外阳离子发生内流,形成光电流[9]。ChR2的最大吸收波长是460 nm,并且对光刺激的反应极为迅速,在几个微秒内就能形成光电流。虽然ChR2对不同的阳离子没有非选择性,但其对不同的阳离子通透性有差异,对Ca^{2+}的通透性最大,是形成光电流的主要离子[14-15]。虽然ChR2对光照能稳定地、快速地产生反应,本文结果证实谷氨酸能神经元表达ChR2后对40Hz以下的光刺激反应性较好,随着光刺激频率的提高,其动作电位的发放频率动作电位发放概率显著下降。本实验结果不仅能为光刺激参数的选择提供重要参考,而且为不同光刺激模式下的在体实验提供了电生理学依据。

本实验通过立体定向技术将腺相关病毒AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry注射在大鼠内侧前额叶,组织学方法证实ChR2-mCherry特异表达在谷氨酸能神经元上,电生理方法进一步证实ChR2特异表达在谷氨酸能神经元上,结果证实AAV2/8所承载的CaMKIIα-ChR2-mCherry信息能特异性的靶向呈递到大鼠的谷氨酸能神经元上。这为我们下一步应用光遗传学技术在大鼠上探索和了解眨眼条件行为的相关神经机制提供了直接的可行性技术支持。

总之,本研究结果为以后在大鼠神经系统行光遗传学研究时选择光刺激参数提供了参考依据。更为重要的是,本研究直接证明了腺相关病毒AAV2/8-CaMKIIα-ChR2-mCherry在大鼠能较特异性表达在谷氨酸能神经元上,为今后在大鼠神经系统利用这一类腺相关病毒作行为学研究打下了坚实的基础。

参考文献:

[1] Deisseroth K. Optogenetics[J]. Nat Methods, 2011, 8(1): 26-29.

[2] Zhang F, 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.

[3] Robinson M J, Warlow S M, Berridge K C. Optogenetic excitation of central amygdala amplifies and narrows incentive motivation to pursue one reward above another[J]. J Neurosci, 2014, 34(50): 16567-16580.

[4] Wang X, Pinol R A, Byrne P, *et al*. Optogenetic stimulation of locus ceruleus neurons augments inhibitory transmission to parasympathetic cardiac vagal neurons via activation of brainstem alpha1 and beta1 receptors[J]. J Neurosci, 2014, 34(18): 6182-6189.

[5] van-Bergeijk P, Adrian M, Hoogenraad C C, *et al*. Optogenetic control of organelle transport and positioning[J]. Nature, 2015, 518(7537): 111-114.

[6] Benson D L, Isackson P J, Gall C M, *et al*. Contrasting patterns in the localization of glutamic acid decarboxylase and Ca2+/calmodulin protein kinase gene expression in the rat central nervous system[J]. Neuroscience, 1992, 46(4): 825-849.

[7] Hamilton L S, Sohl-Dickstein J, Huth A G, *et al*. Optogenetic activation of an inhibitory network enhances feedforward functional connectivity in auditory cortex[J]. Neuron, 2013, 80(4): 1066-1076.

[8] Lin J Y, Sann S B, Zhou K, *et al*. Optogenetic inhibition of synaptic release with chromophore-assisted light inactivation (CALI)[J]. Neuron, 2013, 79(2): 241-253.

[9] Van-Dort C J, Zachs D P, Kenny J D, *et al*. Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(2): 584-589.

[10] Wu M C, Chu L A, Hsiao P Y, *et al*. Optogenetic control of selective neural activity in multiple freely moving Drosophila adults[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(14): 5367-5372.

[11] Goshen I. The optogenetic revolution in memory research[J]. Trends Neurosci, 2014, 37(9): 511-522.

[12] Iyer S M, Delp S L. Neuroscience. Optogenetic regeneration[J]. Science, 2014, 344(6179): 44-45.

[13] Yizhar O, Fenno L E, Davidson T J, *et al*. Optogenetics in neural systems[J]. Neuron, 2011, 71(1): 9-34.

[14] Creed M, Pascoli V J, Luscher C. Addiction therapy. Refining deep brain stimulation to emulate optogenetic treatment of synaptic pathology[J]. Science, 2015, 347(6222): 659-664.

[15] Stefanik M T, Kupchik Y M, Brown R M, *et al*. Optogenetic evidence that pallidal projections, not nigral projections, from the nucleus accumbens core are necessary for reinstating cocaine seeking[J]. J Neurosci, 2013, 33(34): 13654-13662.

(收稿:2015-01-26;修回:2015-03-26)

(编辑 栾 嘉)