

·基础研究·

光遗传学靶向激活M1区谷氨酸能神经元促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复的初步研究*

邓维维¹ 闵令霞¹ 冯 州¹ 侯景明¹ 刘宏亮^{1,2}

摘要

目的:观察光遗传学靶向激活M1区谷氨酸能神经元对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能恢复的影响。

方法:24只雌性SD大鼠随机分为3组:单纯SCI组(8只),光刺激组(8只)和假刺激组(8只)。应用钳夹法制备大鼠SCI模型。单纯SCI组仅行SCI造模,不作任何干预;光刺激组利用光遗传学技术精确激活SCI大鼠双侧M1区谷氨酸能神经元;假刺激组植入的病毒中不含光敏感蛋白,利用光遗传学技术无法激活谷氨酸能神经元。光刺激组和假刺激组大鼠于造模成功后第3—14天进行470nm蓝光刺激,每日2次,共刺激2周。采用BBB评分和斜坡实验在造模后1—8周时每周评价SCI大鼠的运动功能。在SCI造模后第4周时每组取2只大鼠的脊髓组织进行HE染色观察损伤区域脊髓的修复情况。

结果:实验期间通过光遗传学技术刺激SCI大鼠M1区谷氨酸能神经元总体是安全的。BBB评分和斜坡实验显示,光刺激组SCI大鼠的运动功能从SCI后第2周开始明显要优于单纯SCI组和假刺激组($P<0.01$),其中第4周时光刺激组的BBB评分与其余2组差异最明显($P<0.001$)。单纯SCI组和假刺激组在各时间点的BBB评分和斜坡实验评分均无明显差异($P>0.05$)。SCI造模后第4周时HE染色显示光刺激组脊髓组织的恢复情况明显优于单纯SCI组和假刺激组。

结论:M1区的谷氨酸能神经元在SCI大鼠功能恢复中起着重要作用,未来可以作为一个重要的干预靶点进行深入研究。

关键词 脊髓损伤;光遗传学;初级运动皮层;谷氨酸能神经元;运动康复

中图分类号:R651.2,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-05-0520-06

A preliminary study on effects of optogenetic stimulation of glutamate neurons in the M1 region on the functional recovery of rats with spinal cord injury/DENG Weiwei, MIN Lingxia, FENG Zhou, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(5): 520—525

Abstract

Objective: To investigate the effects of optogenetic stimulation of glutamate neurons in the M1 region on motor function recovery in spinal cord injury (SCI) rats.

Method: The 24 female SD rats were randomly divided into 3 groups: pure SCI group (n=8), stimulation group (n=8) and false stimulation group (n=8). Rat model of T10 spinal cord injury was prepared by clamping method. The pure SCI group only underwent spinal cord injury modeling without any intervention. The stimulation group was given optogenetics to precisely activate glutamate neurons in bilateral M1 region of rats with SCI. The virus implanted in the false stimulation group did not contain light-sensitive proteins and could not activate glutamate neurons using optogenetics. The fiber embedded in the M1 zone of SCI rats was stimulated by 470nm blue light after the successful modeling, twice a day for 2 weeks continuously. BBB score and

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.05.003

*基金项目:国家自然科学基金项目(81671211,81672251);西南医院优秀人才基金项目(2017MPRC—08,SWH2016JSYB—08)

1 陆军军医大学西南医院康复科,全军创伤疾病康复治疗中心,重庆市,400038; 2 通讯作者

第一作者简介:邓维维,女,硕士研究生; 收稿日期:2020-04-27

ramp test were used to evaluate the motor function of SCI rats at 1 to 8 weeks of treatment. Repair of spinal cord injury was observed by HE staining at 4 weeks.

Result: The BBB scores showed that the motor function of each group increased with the extension of time, but the BBB score of the light stimulation group was higher than that of the pure SCI group and the false stimulation group ($P<0.01$). Slope experiment showed that the slope angle of the light stimulation group was higher than that of the SCI group and the false stimulation group every week ($P<0.001$). HE staining showed that the recovery of spinal cord tissue in the light stimulation group was significantly better than that in the pure SCI group and the false stimulation group.

Conclusion: Optogenetic activation of glutamate-energy neurons in M1 region selectively can ameliorate the recovery of injured spinal cord tissue, thus promote the motor function recovery of SCI rats.

Author's address Department of Rehabilitation, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing, 400038

Key word spinal cord injury; optogenetics; primary motor cortex; glutamatergic neuron; motor recovery

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是当今世界主要致残疾病之一,不仅影响患者个人的生活质量,而且给家庭和社会造成沉重的经济负担。目前对于脊髓损伤仍缺乏有效的干预手段,探索新型治疗手段是当今SCI研究领域的热点。我们曾利用功能磁共振技术证实SCI患者早期即存在着脑结构和功能的重塑,尤其是SCI患者M1区兴奋性的增加是后期功能恢复的关键^[1-2]。由于在M1区不仅存在兴奋性神经元(谷氨酸能神经元),同时也存在了抑制性神经元[γ -氨基丁酸(GABA)能神经元],到底是何种神经元在SCI的功能恢复中起着重要作用目前尚不清楚。光遗传学技术是近年来发展起来的一种精准神经调控技术,可以精确激活光刺激区域某一特定类型的神经元^[3]。目前国内外尚没有光遗传学技术在SCI后运动功能恢复中的研究报道。在本研究中,我们使用光遗传学技术靶向激活SCI大鼠M1区的谷氨酸能神经元,探索其对SCI大鼠脊髓损伤运动功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

10周龄、体重(220 ± 20)g成年雌性、SPF级SD大鼠(陆军军医大学动物中心提供),按随机数字表法分为3组:单纯SCI组(8只),假刺激组(8只),光刺激组(8只)。按照每笼两只老鼠安置在标准实验室笼子里,光/暗周期为12/12h,饲养温度为(24 ± 2)°C,随意获取食物和水。术后1—8周,每周观察各组大鼠运动功能变化,第4周取脊髓组织进行HE染色。主要实验材料:5%水合氯醛(7ml/kg)、3%戊

巴比妥钠、手术器械、注射器、生理盐水、4%多聚甲醛、乙醇、石蜡、二甲苯、荧光显微镜、50g动脉瘤夹。

1.2 分组及干预方法

按随机数字表法分为3组:单纯SCI组(8只),假刺激组(8只),光刺激组(8只),三组大鼠均作SCI模型,单纯SCI组仅使其SCI不做其他干预,其余两组在SCI模型的基础上植入对应病毒并进行光刺激(其中假刺激组注射病毒为AAV-CaMKII α -mCherry;光刺激组注射病毒为AAV-CaMKII α -ChR2-mCherry)。

1.3 病毒植入

注射方法和剂量参照我们之前的发表的文章^[4]。具体步骤如下:先用3%戊巴比妥钠(40mg/kg, i.p.)麻醉大鼠,诱导后将其固定于数字立体定向框架内。随后,在头皮顶部开一个切口,根据bregma的位置,在M1区用钻子钻出两个小洞[一侧坐标:正侧(AP)=+0.74mm,中外侧(ML)=-1.5mm,背腹侧(DV)=-0.5mm;另一侧坐标:AP=+0.74mm, ML=+1.5mm, DV=-0.5mm]。我们使用立体定位控制微量调节注射器泵以0.05 μ l/min的速度慢慢注入3 μ l含有病毒的液体,该病毒由Taitool生物科学(上海,中国)提供。其中假刺激组注射病毒为AAV-CaMKII α -mCherry,该病毒含有CaMKII α 基因启动子序列,可以精确感染谷氨酸能神经元,但不含光通道蛋白基因,所以光照后不能激活M1区的谷氨酸能神经元。光刺激组注射病毒为AAV-CaMKII α -ChR2-mCherry,含有CaMKII α 基因启动子序列和光通道蛋白基因,可以精确地感染谷氨酸能的神经元并被相应的蓝光激活。注射后,针头留在原

处5min后退出,让病毒扩散到周围组织。拔针后缝合伤口,待老鼠恢复清醒后,放回鼠笼饲养。

1.4 光纤植入

在注射病毒3周(病毒基本表达)后植入光纤,用3%戊巴比妥钠(40mg/kg, i.p.i)麻醉大鼠,并将其置于数字立体定位架(Narishige, 东京, 日本)。在剃掉头发并在头皮顶部开一个切口后,在M1区用牙钻钻出8个小洞。光纤(直径0.25mm, 多利安式眼镜, QC, 加拿大)被植入大鼠运动皮层两侧(± 1.70 mm前, 前囟 ± 1.70 mm的侧中线, 1.70mm以下硬脑膜)和剩下的6个孔与田螺修复安装。最后用502胶水和牙水泥粘接颅骨上的伤口。激光刺激不早于病毒注射后四周,以便有足够的时间进行病毒转染和视蛋白表达。光刺激系统由500mW 470nm激光发生器、62.5/125—SMA/FC“中间导通光纤”、FC—FC耦合陶瓷套管和50/125—FC“脑内植入光纤”组成。光纤与470nm激光发生器相连接,通过分片2适配器与波形发生器示波器相连接。通过设置波形发生器上的刺激参数(如光脉冲刺激时间、频率、占空比、总刺激时间),控制激光发生器发射相应的脉冲。根据ChR2通道蛋白^[5]的光电特性,根据相关报道^[6]采用光刺激的脉宽选择为15—20ms,频率选择1—50Hz,对大鼠大脑区域进行光遗传学研究。于造模成功后第3—14天利用470nm蓝光进行刺激,根据Alilain方案^[7],波长为470nm,每分钟30次,共4min,休息3min,每次重复3个周期,每天2次,每周5次。对于2周的光刺激和所有的手术都应该注意无菌操作。

1.5 SCI动物模型制备

植入光纤3天后,用5%水合氯醛(7ml/kg体重)麻醉大鼠,并将其置于立体定位架上,暴露T8—10椎板处的脊髓。各组大鼠脊髓均暴露,用50g动脉瘤夹压迫T9脊髓60s,在此期间伴有尾摇和后肢反射,提示SCI模型成功。术后,大鼠注射青霉素(200000U/只/天),然后放回笼子,术后连续7天皮下注射以防止感染。在伤后生存期间,每天两次监测大鼠的一般健康、感染和活动能力。术后护理包括每天两次人工膀胱排尿,直至大鼠自发排尿。

1.6 行为学观察

采用BBB评分^[8]和斜坡试验观察SCI大鼠的运

动功能恢复情况。于SCI术后1—8周每周对各组大鼠进行BBB行为学评分(0分为全瘫,21分为正常)和斜坡实验(坡度从20°—90°,每两个坡度之间间隔5°)检测双后肢的运动功能和部分支撑抓握能力,行为学评分均由实验室两名不知情的人员进行。

1.7 HE染色

SCI造模术后第4周(蓝光刺激后第2周)每组处死2只大鼠进行脊髓组织取材,染色观察各组SCI处的组织变化。苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)在4%多聚甲醛(PFA, 0.1M磷酸缓冲液, pH 7.4)中固定含有损伤区域的脊髓T9节段,4℃, 24h。然后,将组织切片分别转移到75%、85%、95%和100%不同浓度的乙醇中15min,并分别脱水。之后,脊髓节段T9采用不同浓度的乙醇、二甲苯和石蜡进行透明包埋。接下来用冷冻切片机将脊髓组织切片,片厚3 μ m,把切片用蒸馏水在室温清洗3—7天,然后使用明矾苏木精染核10—15min,用流水冲洗后再用伊红染色2min。最后脱水、清透、装瓶。仔细检查损伤区组织切片的范围,使用Olympus BX53F荧光显微镜(日本),使用4 $\times$ 物镜获取损伤区组织切片的图像。

1.8 统计学分析

研究数据使用SPSS 18.0软件进行统计分析。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。三组间差异采用重复测量的多因素方差分析,设定 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 病毒表达及安全性结果

本实验病毒植入部位主要为大鼠双侧M1区,待病毒注射3周后病毒稳定表达时,应用免疫组化检测病毒表达的细胞选择性,可见本实验注射的ChR2-mCherry能特异性表达在谷氨酸能神经元(图1)。整个实验期间各组大鼠生命体征平稳、未发生死亡现象。假刺激组和光刺激组的大鼠在接受光刺激时,并未诱发癫痫、惊厥等症状。以上初步说明光刺激大鼠M1区谷氨酸能神经元是安全的。

2.2 大鼠BBB评分

造模后第1周3组大鼠BBB评分之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。从第2周开始,光刺激组BBB

评分明显高于其他2组,差异具有显著性意义($P<0.01$)。其中,在第4周时,光刺激组的BBB评分较其他2组差异最大($P<0.001$)。SCI组和假刺激组在各时间点BBB评分均无明显差异($P>0.05$)。以上结果说明光遗传学刺激SCI大鼠M1区谷氨酸能神经元从2周时可以明显促进大鼠BBB评分的恢复(图2)。

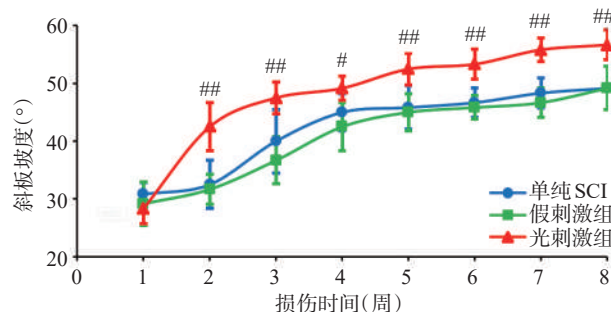
2.3 斜坡实验

造模后第1周时3组大鼠斜坡度数之间差异无显著性意义($P>0.05$)。术后从第2周开始,光刺激组斜坡度数明显高于其他2组,差异具有显著性意义($P<0.01$)。SCI组和假刺激组在各时间点斜坡度数均无明显差异($P>0.05$)。以上结果说明光遗传学刺激SCI大鼠M1区谷氨酸能神经元从2周时可以明显促进大鼠后肢稳定及抓握功能的恢复(图3)。

2.4 HE染色

研究发现光刺激组的脊髓修复形态明显好于其他两组:脊髓空洞面积较小,灰质与白质边界清晰,

图3 SCI后1—8周每周各组斜坡实验结果



注: # $P<0.05$, ## $P<0.01$

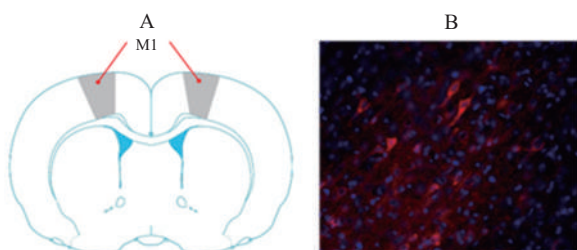
神经纤维结构清晰,坏死、萎缩神经元较少,见图4。以上结果说明光遗传学刺激SCI大鼠M1区谷氨酸能神经元可以明显减轻SCI大鼠SCI区域的继发性损伤。

3 讨论

运动功能障碍是SCI患者常见的症状,严重影响其生活质量。研究者在过去的几十年里对SCI后的神经修复展开了大量研究,包括药物治疗,手术治疗,干细胞移植治疗等,但这些方法的治疗效果并不令人满意,而且当前针对SCI局部缺血缺氧、兴奋性氨基酸毒性、炎症反应的临床药物试验均被证明无效^[9],因此为SCI的治疗寻找新的有效的策略是一个长期的医学探索问题。在本研究中,我们首次证明利用光遗传学技术靶向激活M1区谷氨酸能神经元能显著促进SCI大鼠损伤脊髓组织的恢复,进而改善其运动功能。

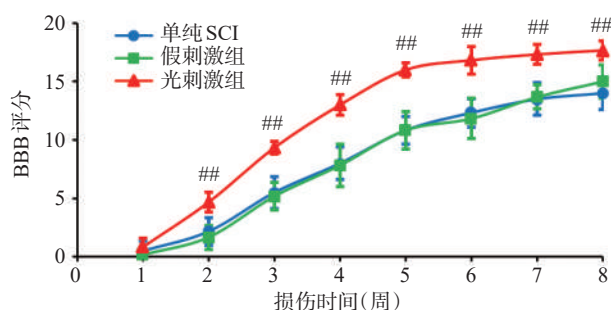
重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)和电刺激是一种公认的促进运动功能恢复的康复方式。有研究已经证实rTMS可以用于神经损伤患者的偏瘫、痉挛、吞咽困难等症状的治疗^[10]。电刺激如经颅直流电刺激也被报道可以改善训练效果,提高运动功能,能够安全地调节大脑的兴奋性和功能可塑性^[11]。此外,有报道称rTMS也能促进SCI后运动功能的恢复^[12]。更多的证据表明大脑运动皮层的刺激在SCI后神经再生和运动功能恢复中起到重要作用,如Bonizzato等^[13]证明了与连续的脊髓刺激相比,大脑刺激加速和增强了SCI后运动的长期恢复;Zareen等^[14]证明了慢性

图1 免疫组化检测病毒表达情况



SCI大鼠双侧M1区注射示意图(图A)
免疫组化检测病毒表达的细胞选择性鉴定,可见ChR2-mCherry能特异性表达在谷氨酸能神经元上(图B)。

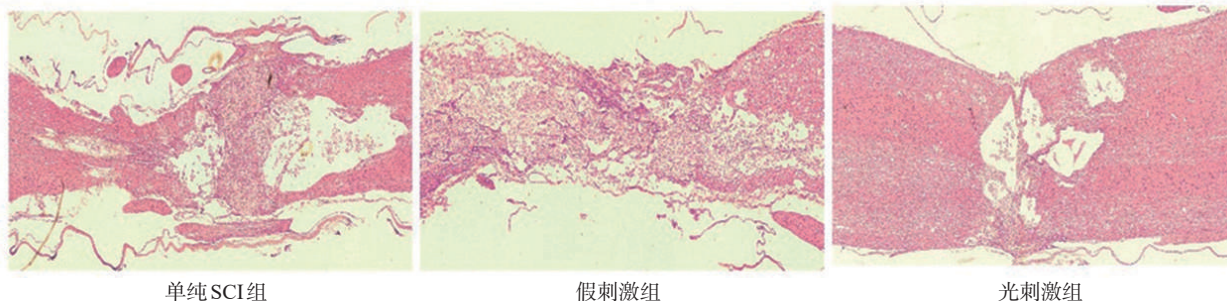
图2 SCI后1—8周每周各组BBB评分



注: ## $P<0.01$

图4 SCI后4周脊髓损伤节段组织切片

(HE染色, ×4)



运动皮层电刺激可以重新激活轴突生长和突触形成过程中不同的信号通路,从而使因SCI或脑卒中而导致的皮质脊髓束受损后的轴突发芽,最终促进功能恢复。以上研究说明,现有的磁刺激或者电刺激调控大脑皮层兴奋性可以促进脊髓损伤的功能恢复。但由于大脑皮层存在各种类型的神经元,尤其是M1区作为常用刺激靶点,包含着谷氨酸能神经元和GABA能神经元,到底是何种神经元的兴奋性增强在SCI恢复中起着重要作用,一直以来缺少相关的研究。

近几年,本课题组通过功能磁共振技术对SCI后的大脑结构和功能重塑进行了系列研究。我们发现SCI患者早期即存在着脑结构和功能重塑^[2],并且通过随访研究,发现SCI后大脑M1区自发神经活动越高,患者6个月后的运动功能恢复就越好^[1],结合前期有动物研究表明SCI后大脑M1区神经兴奋性增高是促进后期功能恢复的主要原因^[15],我们认为激活SCI大鼠的大脑M1区运动神经元可能是促进SCI后功能恢复的新策略。已知在M1区既存在兴奋性神经元(谷氨酸能神经元),同时存在抑制性神经元(GABA能神经元)。以往有研究表明GABA受体激动剂(蝇蕈醇)激活M1区抑制性神经元,可降低M1区神经活性,进而导致脊髓损伤猕猴运动功能恢复受阻^[16]。这和我们研究的结果基本吻合:本研究中观察到精确激活M1区谷氨酸能神经元可以明显促进SCI后运动功能的恢复。以往的磁刺激和电刺激虽然都能一定程度上改善患者的功能障碍,但是效果都不理想,其原因可能是它们的刺激范围不明确,不仅激活了M1区的兴奋性神经元,同时也可能激活了M1区的抑制性神经元,导致M1区兴

奋程度受到两种神经元激活程度的叠加影响而减弱。

近年来,光遗传学技术因其能精确调控某一类型的神经元而成为研究特定神经元类型的有力工具。如Lu等^[17]通过光遗传学技术确定了几个对脑卒中后运动功能康复有效的脑区和神经回路。Shah等^[18]研究表明,使用光遗传学方法选择性地刺激小脑外侧核的神经元,即使在缺血性脑卒中小鼠停止刺激2周后,也能带来强劲而持久的恢复。这些结果也证实了光遗传学技术在精准控制大脑与功能恢复之间起到巨大作用。有学者利用光遗传学技术精确激活正常大鼠M1区的谷氨酸能神经元,观察到光刺激时能够诱发大鼠的不自主运动^[19]。这与我们的实验一致:我们使用光遗传学技术可以精准地刺激M1区谷氨酸能神经元。我们的研究发现M1区谷氨酸能神经元的精确激活在SCI后功能恢复中起到巨大作用,未来精确激活M1的谷氨酸能神经元可能是SCI新的治疗方向。了解脑区、细胞类型和驱动功能恢复的机制可能有助于开发用于SCI治疗的精确的脑刺激技术,并为SCI治疗确定潜在的药物靶点。

本研究存在的主要不足为:本研究用HE染色显示脊髓组织的恢复情况的确过于简单、单薄;虽然我们观察到光遗传学技术精准刺激M1区谷氨酸能神经元可以促进SCI后功能恢复,但其机制尚不清楚。以往有研究表明脑刺激能促使一些神经营养因子的表达,如Cheng等^[20]研究表明光遗传学促进脑卒中后运动功能恢复是由于重复神经元刺激的脑卒中小鼠脑源性神经营养因子、神经生长因子、神经营养因子3等活性依赖性神经营养因子在大脑皮

层表达增加;Shah等^[18]使用光遗传学方法选择性地刺激脑卒中大鼠的小脑外侧核的神经元,结果显著增加了同侧躯体感觉皮层的轴突生长蛋白GAP43。我们由此推测光遗传学精准刺激SCI大鼠的M1区谷氨酸能神经元可能通过上调损伤区域的神经营养因子表达,促进轴突再生,进而促进SCI大鼠运动功能的恢复。后续我们将进一步深入研究其机制,应用免疫组化或者定量分析等方法,检测神经元凋亡情况,胶质增生或者轴突再生的情况以及神经营养因子表达情况以为临床运用提供更可靠的理论依据。

4 结论

本研究初步证明了运用光遗传学技术靶向激活SCI大鼠M1区的谷氨酸能神经元能明显改善损伤组织的恢复,进一步促进SCI后运动功能的恢复。未来可以将如何精确激活M1区的谷氨酸能神经元作为一个重要的干预靶点进行深入研究。

参考文献

- [1] Hou J, Xiang Z, Yan R, et al. Motor recovery at 6 months after admission is related to structural and functional reorganization of the spine and brain in patients with spinal cord injury[J]. Hum Brain Mapp, 2016, 37(6):2195—2209.
- [2] Hou JM, Yan RB, Xiang ZM, et al. Brain sensorimotor system atrophy during the early stage of spinal cord injury in humans[J]. Neuroscience, 2014, 266:208—215.
- [3] Hartmann J, Krueger D, De Renzis S. Using optogenetics to tackle systems-level questions of multicellular morphogenesis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2020, 66:19—27.
- [4] Wu GY, Liu SL, Yao J, et al. Medial prefrontal cortex-pons nuclei projections modulate suboptimal cue-induced associative motor learning[J]. Cereb Cortex, 2018, 28(3):880—893.
- [5] Watanabe H, Sano H, Chiken S, et al. Forelimb movements evoked by optogenetic stimulation of the macaque motor cortex[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):3253.
- [6] Lin CI, Chiao CC. Blue light promotes neurite outgrowth of retinal explants in postnatal ChR2 Mice[J]. eNeuro, 2019, 6(4): DOI: 10.1523/ENEURO.0391-18.2019
- [7] Alilain WJ, Li X, Horn KP, et al. Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2008, 28(46):11862—11870.
- [8] 谢财忠, 李向哲, 方露, 等. 超短波对急性脊髓损伤大鼠神经功能及BDNF-TrkB表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(4):385—391.
- [9] Brown AR, Martinez M. From cortex to cord: motor circuit plasticity after spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(12):2054—2062.
- [10] Cirillo G, Di Pino G, Capone F, et al. Neurobiological after-effects of non-invasive brain stimulation[J]. Brain Stimul, 2017, 10(1):1—18.
- [11] Huang L, Deng Y, Zheng X, et al. Transcranial direct current stimulation with halo sport enhances repeated sprint cycling and cognitive performance[J]. Front Physiol, 2019, 10:118.
- [12] Kumru H, Benito-Penalva J, Valls-Sole J, et al. Placebo-controlled study of rTMS combined with Lokomat(RR) gait training for treatment in subjects with motor incomplete spinal cord injury[J]. Exp Brain Res, 2016, 234(12):3447—3455.
- [13] Bonizzato M, Pidpruzhnykova G, DiGiovanna J, et al. Brain-controlled modulation of spinal circuits improves recovery from spinal cord injury[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):3015.
- [14] Zareen N, Dodson S, Armada K, et al. Stimulation-dependent remodeling of the corticospinal tract requires reactivation of growth-promoting developmental signaling pathways[J]. Exp Neurol, 2018, 307:133—144.
- [15] Sawada M, Kato K, Kunieda T, et al. Function of the nucleus accumbens in motor control during recovery after spinal cord injury[J]. Science, 2015, 350(6256):98—101.
- [16] Nishimura Y, Onoe H, Morichika Y, et al. Time-dependent central compensatory mechanisms of finger dexterity after spinal cord injury[J]. Science, 2007, 318(5853):1150—1155.
- [17] Lu C, Wu X, Ma H, et al. Optogenetic Stimulation enhanced neuronal plasticities in motor recovery after ischemic stroke[J]. Neural Plast, 2019, 2019:5271573.
- [18] 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.
- [19] Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, 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.
- [20] Cheng MY, Wang EH, Woodson WJ, et al. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(35):12913—12918.