

DOI: 10.13376/j.cbbls/2025064

文章编号: 1004-0374(2025)06-0645-11

脑类器官电生理研究进展

鲍双庆, 常哲瀚, 胡楠, 陈梦梦, 李晓红*

(天津大学医学工程与转化医学研究院, 天津 300072)

摘要: 脑类器官是一种新兴的脑发育和脑疾病研究模型, 包含人脑特有的一些细胞类型和结构特征, 同时具有神经细胞和组织功能分析的电生理学特征。神经电生理活动是神经元发挥功能的重要标志。脑类器官的电生理信号与人脑电生理相似, 其电生理信号的分析和解码能够反映人脑早期网络动力学, 为探究人脑发育、疾病建模和药物筛选等提供重要参考。脑类器官的电生理学研究对充分发挥其应用潜力至关重要。本文回顾了脑类器官的发展及其电生理表现, 综述了体外电生理检测方法的主要进展, 并讨论了体内移植策略对脑类器官电生理的改善效果。最后, 对脑类器官电生理学研究的挑战进行了总结和展望。

关键词: 脑类器官; 神经网络; 功能电生理; 移植

中图分类号: Q424; Q813 **文献标志码:** A

Electrophysiological research progress of brain organoids

BAO Shuang-Qing, CHANG Zhe-Han, HU Nan, CHEN Meng-Meng, LI Xiao-Hong*

(School of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Brain organoids represent a novel model system for the study of brain development and diseases, exhibiting a range of cell types and structural characteristics that are distinct to the human brain. These organoids also possess electrophysiological features, which are crucial for the analysis of neuronal cell and tissue function. Neurophysiological activity serves as a vital indicator of neuronal function. The electrophysiological signals exhibited by brain organoids bear a resemblance to those observed in the human brain. The analysis and decoding of these signals can offer insights into the early network dynamics of the human brain, thereby serving as valuable references for research endeavors focused on brain development, disease modeling, and drug screening. The comprehensive electrophysiological study of brain organoids is imperative to fully harness their potential applications. This paper reviews the development of brain organoids and their electrophysiological performance, summarizes the major advances in *in vitro* electrophysiological detection methods, and discusses the effects of *in vivo* transplantation strategies on the improvement of brain organoid electrophysiology. It concludes with a summary and outlook on the challenges of brain organoid electrophysiology research.

Key words: brain organoids; neural network; functional electrophysiology; transplantation

大脑具有丰富的神经电生理信号, 这些信号反映了人脑发育过程中神经元的活动以及神经发育疾病的起源^[1]。啮齿类动物模型与人脑之间存在物种差异^[2], 而灵长类模型则不易普及^[3]。仅依靠体外分化的二维 (two-dimensional, 2D) 神经元模型无法全面反映人脑发育的特征^[4]。

近年来, 人类诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 技术的突破使干细胞

在体外培养并生长为脑类器官成为可能^[5-9]。多能干细胞可以增殖、分化并自组装成三维 (three-dimensional, 3D) 结构, 生成具有人脑发育过程中细

收稿日期: 2024-11-25; 修回日期: 2025-01-19

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFB4707700, 2021-YFF1200800); 国家自然科学基金项目(82171861, 81971782, 82101853)

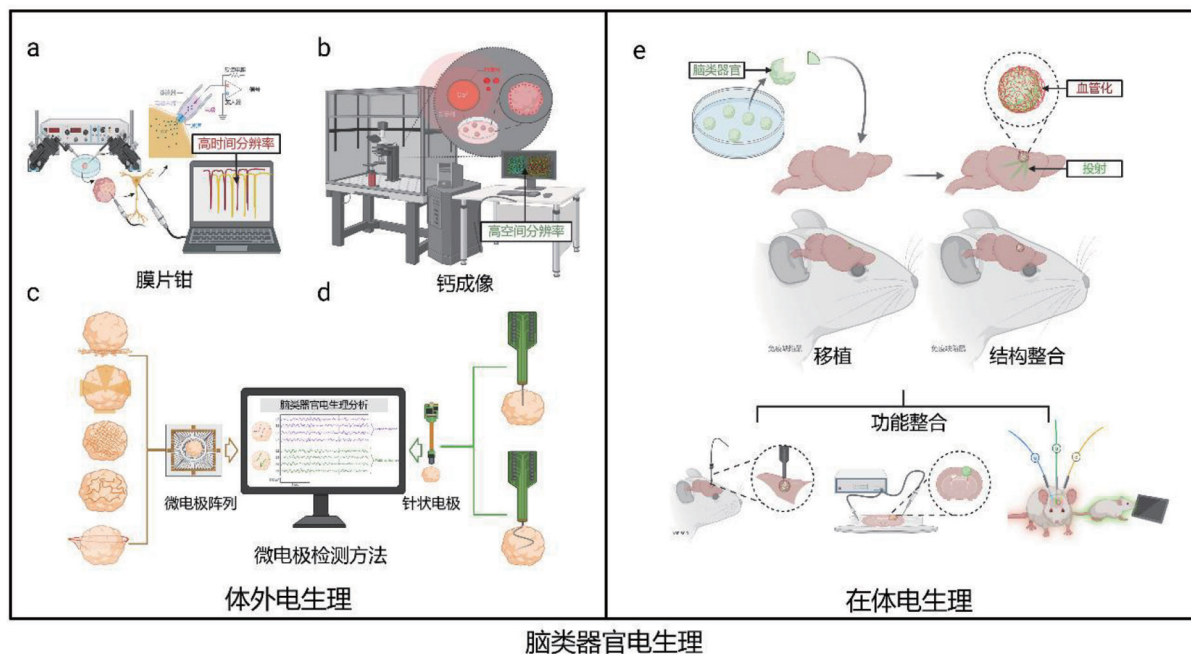
*通信作者: E-mail: xhli18@tju.edu.cn

胞结构、多样性和电生理特性的脑类器官^[10]。脑类器官为研究人脑发育和神经疾病提供了易获取且可靠的平台,弥补了动物模型研究与人类临床研究之间的差距^[11]。脑类器官表现出特定的神经电生理活动,如自发性神经放电和突触电位,与人脑的电生理功能类似^[12, 13]。脑类器官结合膜片钳(patch-clamp)、钙成像、微电极检测等体内外电生理技术,可以表现其独特的神经电生理学特征。膜片钳技术(图1a)能够以高时间分辨率记录神经元电活动,包括动作电位和突触电流,可以检测脑类器官神经元电生理活性^[14-17]。钙成像技术(图1b)通过指示细胞内钙离子浓度变化,间接反映神经元活动状态,具有高空间分辨率,适用于大规模神经网络研究^[18-21]。膜片钳和钙成像可以结合使用^[22],提高电生理检测效率。微电极检测技术(图1c~d)主要包括微电极阵列(microelectrode array, MEA)^[23]和针状电极^[24, 25]。微电极检测技术可以有效记录电生理信息,可以结合化学刺激、电刺激、光遗传学^[26]等手段应用于脑类器官的功能电生理研究。近年来,对脑类器官集成的生物电极方法不断改进,衍生出基于生物和材料融合的新兴脑类器官生物电子学^[27],

加速了脑类器官的电生理学研究进程。目前,脑类器官电生理学除了应用于研究神经发育和药物筛选领域,由电子器件和脑类器官组成的混合计算系统也开拓了新的生物融合的人工智能领域^[28]。

在脑类器官体外电生理研究中,多能干细胞诱导神经元成熟的过程缓慢并伴有内部缺氧坏死,影响其生长发育。此外,缺乏外在的感觉输入,缺少完整神经环路使脑类器官电生理信号不成熟^[29]。在体移植策略^[30, 31]可以使脑类器官得到血管浸润,促进其结构和功能成熟,并与宿主建立神经环路连接,从而改善其电生理表现,是研究脑类器官电生理的可靠途径(图1e)。

尽管脑类器官在模拟人脑结构和功能方面取得了显著进展,但仍面临诸多挑战。其中,脑类器官的电生理信号能否完全代表人脑、电生理检测技术在类器官中的应用复杂性,以及体内移植脑类器官技术难点及其伦理问题,都是亟待解决的关键问题,克服这些难点挑战是未来研究的重要方向。本文回顾脑类器官的发展及其电生理表现,综述脑类器官电生理在体外和体内的研究进展,重点总结膜片钳、钙成像、微电极技术在脑类器官研究中的应用特点,



a: 膜片钳技术检测脑类器官电生理, 检测信号具有高时间分辨率特点。b: 钙成像检测脑类器官电生理, 检测信号具有高空间分辨率特点。c: 脑类器官微电极检测技术MEA, 包含2D MEA (第1个)和3D MEA (依次为包裹式、网格、网状共生、篮状)。d: 脑类器官微电极检测技术针状电极, 分为刚性和柔性。e: 脑类器官在体电生理; 体内移植策略为脑类器官提供在体环境, 使其能够与宿主组织整合血管化获得营养并发育成熟; 产生投射与宿主神经回路建立功能连接, 通过在体的电生理方法例如微电极、膜片钳、光遗传、双光子等方法验证功能整合。

图1 脑类器官电生理

并讨论移植脑类器官对其电生理表现的改善效果。最后, 本文对脑类器官电生理学当前所面临的挑战进行总结和展望。

1 脑类器官研究概况

脑类器官是由干细胞衍生的三维培养产物, 指所有模拟脑部结构(如大脑、中脑、小脑等)的类器官, 在细胞类型组成、基因表达、神经元迁移行为和电生理活动等方面与人脑发育过程相似^[32]。Lancaster等^[33]在2013年首次正式提出脑类器官的概念: 人类多能干细胞衍生的包含多个大脑区域的3D类器官培养系统, 称之为脑类器官, 对3D脑类器官的概念进行了规范的定义, 是神经类器官中专门模拟大脑组织和功能的重要分支。

1.1 脑类器官的培养

大脑在发育的过程中, 不同区域的细胞受到细胞间通讯和不同信号组合的梯度调控^[34, 35], 由此衍生出脑类器官的两种培养方法。以Lancaster等^[33]为代表, 通过非定向分化方法构建的脑类器官能够产生代表多种脑区的神经元以及神经胶质细胞(部分文献也称“全脑类器官”)^[36, 37]。但是由于分化的随机性, 其分化效率和细胞类型的倾向性差异很大^[33, 38], 批次间可控性低、重复性差, 并不稳定。与之对应, 定向分化策略采用模式化因子组合, 如视黄酸(retinoic acid, RA)、Wnt蛋白(Wnt proteins, WNTs)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)等, 来调控特定信号通路的表达, 模拟体内特定脑区的发育过程, 从而在体外产生一定程度上代表此脑区的区域特异性脑类器官^[39-41]。目前, 已报道能够构建多种区域特异性脑类器官^[40], 包括前脑^[42]、中脑^[43, 44]、丘脑^[45]、纹状体^[46]、下丘脑^[47]、海马体^[48]、小脑^[49, 50]等。这些区域特异性脑类器官的靶向组装可以产生相互作用的脑区组装体(assembloids), 更利于对不同脑区间或不同细胞间的迁移、突触连接、长距离神经投射连接等方面进行研究。向阳飞团队通过这种方法先后构建了中间神经元迁移模型^[51]、丘脑和皮质类器官投射模型^[45]和延髓类器官融合丘脑的三叉丘脑投射模型^[52]。为了深入地了解人脑发育的区域间相互作用, 需要构建更精细的区域特异性脑类器官。

1.2 与2D模型的区别

与传统2D神经元模型相比, 脑类器官的3D培养特性可以从神经祖细胞中生成多种不同亚型的

神经元, 例如生长抑素(somatostatin, SST)神经元、小清蛋白(parvalbumin, PV)能神经元等 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能神经元亚型^[53], 而2D培养通常只能维持某种特定神经元^[54]。此外, 3D与2D模型在细胞增殖模式上表现出显著差异。在3D环境中, 相同类型的细胞可以诱导出不同的增殖区域, 其中外围细胞能够更好地获取营养和氧气, 分裂速度更快^[55]。3D模型在药物处理过程中表现出更强耐药性^[56], 说明其凋亡机制区别于2D模型。3D模型比2D模型更能体现人脑神经发育结构特征, 二者的电生理学表现存在差异, 脑类器官的电生理更有探索意义。

2 脑类器官体外电生理

脑类器官体外电生理检测方法通常包括膜片钳技术、钙成像、微电极方法。

2.1 膜片钳技术检测脑类器官电生理

膜片钳技术利用玻璃微电极与细胞膜进行高阻抗封接^[57], 可以对吸附在毛细玻璃微电极尖端的几个平方微米的膜片进行稳定电位水平的通电检测^[58]。膜片钳技术检测信号具有高时间分辨率, 能捕捉到神经元中精确到毫秒级别的电信号变化, 提供神经元突触电流或电压幅值数据。该技术可以同时记录突触前和突触后的活动, 进而研究完整的突触功能^[59]。Landry等^[60]通过膜片钳捕获脑类器官动作电位, 发现四个月龄的脑类器官神经元动作电位相较于三个月时表现出更成熟的单个完整峰值, 电生理更成熟, 完全成熟时还能够捕捉到连续发放的多个动作电位。此外, 膜片钳技术还可以使用其他电生理学参数来进一步优化脑类器官神经元的分析, 例如输入电阻、反弹电位、去极化电位(spike afterdepolarization gradient, SAG)比率等^[61-63]。全细胞膜片钳技术还可以提供神经元的长时程增强(long-term potentiation, LTP)、场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)等电信号^[60, 64-66], 可用于脑类器官中突触传递和可塑性研究。然而, 膜片钳技术在脑类器官应用中仍存在一些不足。膜片钳获取脑类器官中单个神经元电生理学需要急性切片, 而Brüggemann等^[65]提到在膜片钳操作过程中, 机械损伤可能导致细胞内电化学环境的改变, 会影响电生理活动的测量。脑类器官的3D结构增加了精确定位和记录单个神经元电活动的难度, 并且膜片钳技术的检测范围只能是单个或几个细胞间的电生理活动, 无法提供关于神经元

群体网络的电生理信号^[67]。

2.2 钙成像检测脑类器官电生理

神经元兴奋伴随钙离子内流产生钙离子浓度变化，钙成像技术通过检测神经元钙离子浓度变化，间接反映电生理活动^[68-71]。该技术的优势在于可反映神经元群体活动状态，广泛应用于脑类器官的神经网络功能研究。Samarasinghe 等^[72]利用高灵敏度的钙指示剂，首次在模拟瑞特综合征 (Rett syndrome, RTT) 的脑类器官中观察到过度同步放电和异常高频持续钙信号，揭示了其神经网络失调的特性。Sloan 等^[73]通过在脑类器官中引入成熟的星形胶质细胞，使用钙成像研究神经元与胶质细胞的互动，揭示了成熟星形胶质细胞对神经元钙信号通路的调控作用，说明钙成像技术可研究脑类器官细胞间相互作用。尽管钙成像有较高的空间分辨率，但是时间分辨率较低，目前较灵敏的 GCaMP8 (genetically encoded calcium indicator 8, GCaMP8) 指示器仍存在大约 20 ms 的峰值上升时间和 150 ms 衰减^[74]的时延，限制了对快速电信号的捕捉。为弥补这一不足，一些研究将钙成像与高时间分辨率的电生理技术 (如膜片钳技术或 MEA) 结合^[22]，以获取更全面的电生理信息。此外，钙成像在脑类器官中的应用也面临诸多挑战，例如脑类器官中心区域的钙信号瞬变分辨率会低于边缘区域，且成像焦平面深度受样本大小和指示剂效果等限制，不适合长时间电生理监测^[75]。

2.3 脑类器官微电极检测技术

2.3.1 MEA

MEA 技术是一种通过布置在培养皿中的微电

极来记录神经元群体电活动的常用方法^[76]。MEA 技术因其同时记录多点电生理信号的能力，广泛用于神经网络活动的监测。MEA 的优势在于低侵入性、实时监测多点神经活动且具备较高的时间分辨率，相较于其他方法可以长期、稳定地监测脑类器官中的自发电活动、放电模式以及神经网络的同步行为等^[77]，这些信号为脑类器官中神经元发育和功能提供了重要的研究数据^[78]。根据应用于脑类器官的结构形式，MEA 主要分为传统的平面电极阵列 (2D MEA) 和三维电极阵列 (3D MEA) (图 2)。

(1) 2D MEA

2D MEA 通常由多个电极排列在二维平面上，用于记录神经元的电活动。按照电极数量，2D MEA 可以进一步分为低密度 MEA 和高密度 MEA。低密度 MEA^[63]适合记录皮层神经元网络的早期发育，展示网络拓扑和连接强度随发育进程的变化。低密度 MEA 通道较少，更适用于一些需要快速、低成本、覆盖大范围的实验，数据处理压力较小^[13]。Sharf 等^[25]开发的金属氧化物半导体 (complementary metal oxide semiconductor, CMOS) 高密度 MEA 提高了信号记录密度和空间分辨率，增加了空间记录灵活性，并且支持长达六个月的记录。该技术在神经网络的初期发育研究中应用广泛，尤其是当神经元培养物平铺在电极表面时^[79]，能够高效地捕捉到神经元之间的尖峰放电和爆发模式及其变化。

2D MEA 仅能捕捉脑类器官底部的电生理活动，虽然通过切片方法可以获取脑类器官内部神经元电活动，但不易获得 3D 空间内的神经信号分布，难以全面理解内部神经网络的动态行为。近年来研

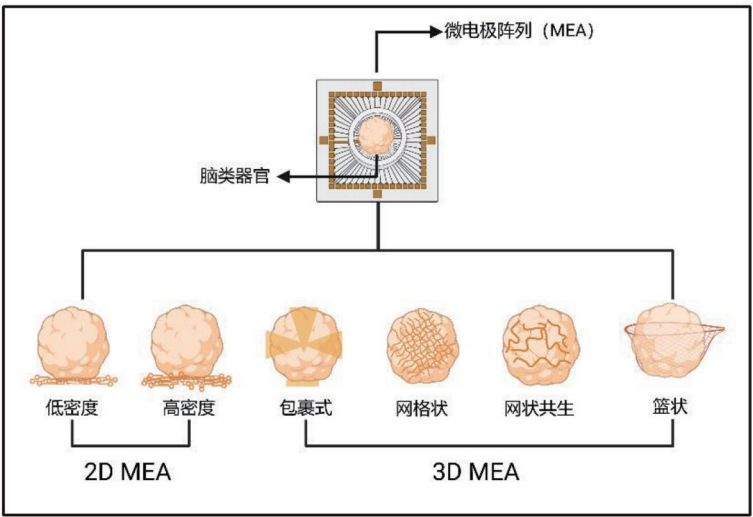


图2 脑类器官微电极检测技术——MEA

究者们设计出适用于脑类器官三维结构的电极方案 3D MEA。

(2) 3D MEA

与 2D MEA 相比, 3D MEA 的电极可以穿透脑类器官内部, 实现更大范围和更深层次的电信号监测。这种三维结构的电极阵列通过更深层的电极布局, 提供了对脑类器官多层神经网络活动的更全面理解。Huang 等^[23]提出了一种壳膜 3D MEA 系统, 通过在三维空间内排列电极, 显著提高了信号捕捉的稳定性和精确性, 能记录到脑类器官内部更复杂的神经活动, 包括内部网络的突发信号和同步放电。然而, 由于其刚性结构植入的特点, 长期记录时间和效果可能不如柔性 3D MEA 系统。研究者们已经开发出电极包裹式方法代替植入式, 柔性电极能够贴合脑类器官的表面, 实现更自然、低侵入性的电生理监测。Park 等^[80]开发了一种 3D 柔性神经接口平台, 可以根据脑类器官的几何形状进行包裹, 不会对类器官造成显著的物理损伤, 灵活适应脑类器官的发育过程, 适合长时间连续监测神经元活动。在此基础上, 网格电极的设计进一步考虑到 3D 组织内部信号。Li 等^[81]开发的网状纳米电子设备具有极高的柔韧性, 能够嵌入到脑类器官的三维结构中, 伴随着脑类器官自发组织和发育过程而实时监测。Wu 等^[82]开发的脑类器官上下半球表面包裹式网格电极, 能获取更多通道同步信号和网络活动。网格电极系统能够灵活稳定地适应脑类器官的生长过程, 但这种长期测量需要脑类器官生长在稳定贴壁培养环境中, 可能会干扰脑类器官的内在发育。

Yang 等^[83]改进设计篮状网格结构适用于脑类器官悬浮培养的长期记录。这类柔性网格共生电极可获得脑类器官良好电生理信号表现的同时, 适应脑类器官的生长兼容和长期监测, 会成为脑类器官电极未来设计的趋势。

2.3.2 针状电极

MEA 电极对类器官的固定能力较弱, 对于脑类器官内部信号的精准获取依然受限。插入式针状电极可以植入到脑类器官内部以获得电生理信号^[25]。根据材质不同, 其分为刚性电极和柔性电极 (图 3)。刚性电极有良好的机械支撑力, 生产工艺相对成熟, 成本较低, 操作较简单, 可直接植入脑类器官, 但适应性较差, 无法大幅度地弯曲或拉伸^[84]。柔性电极具有机械灵活性和耐久性, 易折叠, 但需借助支撑物进行脑类器官植入^[24, 85], 且成本较高, 工艺复杂。由 Jun 等^[86]开发的 Neuropixels 刚性电极, 能够同时记录脑类器官内多个神经元的电活动, 精确定位神经元单元的动作电位和神经网络的群体爆发, 并且能够记录到如 θ 振荡等高级电生理现象^[25]。然而, 该研究并没提供长期监测表现, 提示长时间植入电极可能会导致组织反应。相比之下, 柔性电极在生物相容性和长期电信号记录的稳定性方面具有优势。Chung 等^[87]以柔性聚合物膜替代传统的硅材料, 植入鼠脑长达半年时间内未发生明显的免疫反应。李晓红团队^[88, 89]使用具备较高生物相容性和长期稳定性柔性针状电极在体外与脑类器官构建成复合体, 能够持续记录脑类器官时间跨度为两个月的体外电生理表现。柔性电极

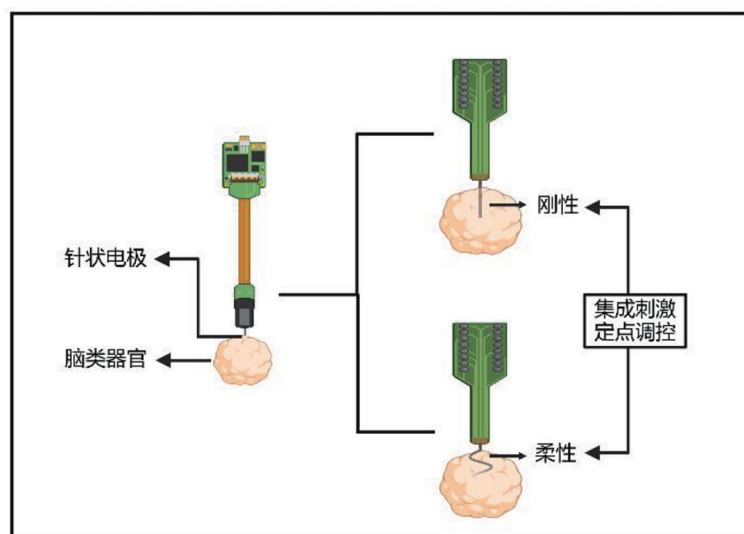


图3 脑类器官微电极检测技术——针状电极

在脑类器官中更适用,可以持续不断地监测神经元的动作电位^[90]。随着神经信号需求提高,针状电极功能不再局限于简单记录神经元的动作电位,还需要考虑增加刺激调控或提高分辨率等其他的功能^[91]。例如集成光刺激位点的电极可实现对神经信号进行光遗传刺激^[92,93]。刺激可用于调控脑类器官电生理表现,在构建的复合体中,电极施加的电刺激调控脑类器官神经功能网络成熟,并能在结构上表现加速神经元分化、突触形成来验证^[88,89]。针状电极可实现脑类器官内部的信号采集,但空间分布仍然有限,无法同时实现对脑类器官表面电信号的测量,更适合脑类器官的定点调控。

2.4 脑类器官电生理技术的应用

脑类器官电生理技术通常与各类神经刺激方式相结合,应用于神经发育和学习记忆探索等研究。刺激方式一般分为:化学刺激、电刺激、光刺激和物理场刺激。

化学刺激物通过作用于特定的神经递质受体、离子通道等,改变脑类器官内的电生理活动,利于研究神经元之间的相互作用及网络动态。通过调控神经元的兴奋性和抑制性突触传递,如使用 GABA 受体阻滞剂抑制 GABA 神经元活性,可揭示抑制性神经元在维持网络稳定性中的作用^[25]。河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)可以阻断钠离子通道,从而阻断神经元的动作电位,完全抑制尖峰活动,用于研究药物对网络活动的抑制作用^[25]。化学刺激有助于模拟和研究神经系统疾病(如癫痫)中的功能异常,通常在 MEA 检测中使用^[94],部分也结合膜片钳记录^[95]。不过,化学刺激不适用对脑类器官的局部特定区域进行精确的电生理调控。

电刺激能够通过直接改变神经元的电活动来影响脑类器官中的神经网络连接。Cai 等^[28]的研究探索了如何利用脑类器官进行储备计算。这种方法在处理复杂的时间序列数据和模式识别任务中具有应用前景,为开发基于脑类器官的生物计算机提供了参考^[96]。研究提出一种电子硬件和脑类器官混合的计算系统——脑类器官智能复合体,即在输入和输出层使用普通计算硬件,并通过电刺激训练输出层以读取储备层(脑类器官)的活动,从而对原始输入数据进行预测或分类。通过无监督学习,他们模拟了脑类器官对外界刺激的响应,实现了对声音的识别。这一研究证明脑类器官具备初步的计算能力和复杂的神经回路特性^[28]。尽管与具有长短期记忆的人工神经网络相比,脑类器官更为准确,但效

率稍低,然而该研究成功构建了首个基于脑类器官的活体人工智能计算平台,证明这种智能复合体具有生物智能研究价值。

光刺激通常使用光遗传技术,能够精确控制脑类器官中特定神经元或群体网络的激活与抑制,具有时空优势。Watanabe 等^[97]使用光遗传学刺激神经元,结合 MEA 记录神经活动,发现脑类器官特定神经元的去极化活动能够有效引发网络同步化。光刺激编码可通过设计特定波长、光强、刺激时间等参数实现对单个神经元或神经群体的同步活动调控。在帕金森小鼠模型中,移植的人胚胎干细胞衍生的多巴胺能神经元对宿主运动缺陷改善效果可被光遗传学沉默逆转^[98]。Osaki 等^[99]构建的运动神经元给予光遗传刺激可控制肌肉收缩,模拟肌萎缩侧索硬化的病理特征,说明光遗传技术可以作为研究神经疾病神经元回路的有效工具。

物理场刺激在脑类器官中的应用也逐渐被探索,已有报道低强度超声^[90]和微重力场^[100]等能够分别对脑类器官产生不同生物效应,低强度超声能够促进神经祖细胞增殖,而微重力场则加速脑类器官的成熟分化。Fantana 等^[101]利用脉冲电磁场刺激促进二维神经细胞轴突再生,有研究报道^[102]这种刺激可影响鼠脑内神经递质浓度,在脑类器官中有广阔应用场景。虽然目前物理场刺激在脑类器官研究中的应用仍处于初步阶段,但其对脑类器官电生理在非侵入性调控和神经网络活动模式优化方面具有重要的潜在应用。

3 脑类器官体内电生理

脑类器官在体外电生理中存在两方面挑战:首先,脑类器官缺少关键的细胞类型,如血管内皮细胞体系、小胶质细胞以及髓鞘化相关少突胶质细胞体系等,导致中心区域易坏死和发育不成熟。其次,体外的脑类器官缺少类似体内的生理环境,包括输入输出的机制和完整的神经环路。相较于体外培养,体内移植策略使脑类器官能够建立功能性血管网络,获得持续营养供应,从而显著提升神经元成熟度。此外,移植后的脑类器官能够与宿主神经回路建立实际的功能连接,表现出更加复杂的电生理和形态学特征^[76,99,100]。

Mansour 等^[103]首次将脑类器官移植到成年小鼠大脑中,成功地建立了一种体内模型来研究人类大脑。体内脑类器官电生理学表现出逐渐增强的神经同步性,更短时间范围内神经元群体同步爆发。

这与体外放电频率和模式显著不同: 体外的神经元通常表现为稀疏且孤立的自发放电, 而体内脑类器官中的神经元放电频率随着时间的推移增加, 且对环境变化表现出更强的敏感性和适应性。移植后神经网络发育更成熟, 能够产生更持续和复杂的电活动。通过光遗传学激活体内脑类器官中的神经元时, 宿主大脑的场电位 (local field potential, LFP) 发生变化, 表明移植物与宿主之间存在了功能性连接。Revah 等^[104] 也发现移植物对外界感觉刺激做出同步反应, 能够通过感官输入被激活。Jgamadze 等^[30] 验证了在体脑类器官的神经元在宿主动物视觉刺激下产生了事件相关电位和自发性放电率改变, 并且在不同方向的视觉漂移光栅刺激下观察到特定方向的光栅运动会引起某些神经元的显著电生理反应, 而对其他方向的反应较弱。这说明脑类器官能够在移植后与宿主大脑整合并参与视觉信息处理。Mansour 等^[103] 验证功能连接只是在短时间内能通过刺激移植物在宿主中检测到对应的信号, 表明局部连接; Revah 研究^[104] 则是通过动物行为学, 对应检测到移植物变化, 证明整合到宿主功能环路中。通过光遗传技术和急性切片膜片钳电生理记录发现, 移植神经元的膜电容比体外类器官中的神经元更大, 树突棘密度更高^[104], 说明移植神经元经历了更高级的发育, 形成了功能性突触整合到宿主大脑中。在体环境允许脑类器官接受感官信息输入和参与行为反馈, 更接近自然的发育过程。

Mansour、Jgamadze 等使用的是刚性电极阵列, 具有组织损耗且通道有限 (仅 16、32 或 64 通道) 等局限, 能够记录的神经元数量较少, 且电极植入引起的细胞和血管损伤会触发免疫胶质细胞增生, 不利于脑类器官在体长期检测。李晓红团队^[88-90] 的研究通过 64 通道柔性电极在体记录脑类器官移植自发放电、局部场电位及其与宿主大脑的功能连接, 发现低强度超声预处理脑类器官显著提高神经元活动水平和功能连接复杂度, 增加长距离轴突投射; 而电刺激则显著提高尖峰发放率和爆发数量, 缩短尖峰间隔, 对高频信号调控更明显。两种物理场刺激均改善在体电生理表现, 同时促进移植物与宿主功能整合及行为恢复; 利用柔性电极分析脑类器官与宿主之间的连接强度和互相关性, 发现移植物在宿主脑中实现信号处理和信息传递, 参与宿主脑的神经功能调节。不过这些研究中使用的电极通道数和信号质量仍有提升空间。未来需要开发具有更低创伤性、高信噪比多通道且适合脑类器官在体

移植和调控的电生理系统, 以支持更长时间、更全面的在体电生理研究。

4 总结和展望

脑类器官为研究人脑发育、神经系统疾病建模以及药物筛选提供了独特的 3D 平台, 弥补了 2D 细胞模型和动物模型的不足。脑类器官的电生理特征与人脑相似, 可以通过膜片钳技术、钙成像和微电极阵列等多种电生理检测技术捕捉神经元的电活动, 揭示其发育状态和功能特性。然而, 脑类器官电生理学研究仍面临以下挑战。

4.1 细胞方面

脑类器官的细胞状态是脑类器官电生理研究的基础, 但目前在细胞方面仍面临诸多挑战。首先, 细胞异质性是主要问题, 不同批次生产的类器官细胞组成存在差异, 这种异质性会影响电生理结果的复现。需要进一步开发标准化的培养和分化协议, 以提高细胞的一致性和可重复性^[105]。其次, 脑类器官成熟度不够会限制其电生理功能表现。除了优化培养方案, 还可以使用其他外部干预方式, 如电刺激可以促进皮质类器官的分化和成熟^[89], 形成明显的皮层结构和功能, 但刺激效率和一致性仍然存在。此外, 细胞间信号传递的复杂性也为电生理研究带来了挑战。细胞之间的信号传递在电生理研究中扮演着重要角色。不同类型的神经元和胶质细胞通过化学和电信号相互作用, 复杂的网络连接可能会影响电生理信号的解读。需要深入理解这些细胞间的相互作用, 才能准确分析电生理数据。

4.2 电极方面

电极的性能直接影响电生理信号的质量, 从电极角度还需考虑以下问题: 首先是电极设计, 现有的电生理检测技术难以全面覆盖脑类器官的 3D 结构, 检测精度和范围有待进一步提高^[61]。需要设计符合脑类器官的 3D 结构的多样化多电极阵列等新型柔性生物电极, 以提高信号的捕捉能力。其次是电极生物相容性, 电极材料生物相容性对电生理信号捕获成功至关重要^[106]。低生物相容性的材料可能导致细胞的炎症反应或死亡, 影响监测效果和结果可重复性。电极表面材料化学性质和物理形态会影响细胞的附着和电信号的传递, 优化电极材料和表面处理是提高电极性能的关键。最后是电信号处理方面, 随着电极通道的数量增加, 脑类器官电生理数据采集和分析的复杂性也随之增加。除了高效处理和分析大量数据, 提取有效信号, 对信号的准

确分类分选也尤为重要。开发新的算法和软件工具,将有助于提高数据处理的效率和准确性。

在未来在体电生理可应用无线系统,一定程度上可以解决布线和电极支架带来的安全和移动性降低问题。同时,在体调控除了传统的“开环”刺激系统,可以引入“闭环”刺激模式使其能够根据个体需求定制刺激调控^[107],从而提升精准度与有效性。这一领域的持续研究将推动个性化神经调控和脑机接口的发展。

[参 考 文 献]

- [1] Pagel JF. Neurosignals – Incorporating CNS electrophysiology into cognitive process. *Behav Brain Sci*, 2005, 28: 75-6
- [2] Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, et al. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, 2019, 573: 61-8
- [3] Mitchell AS, Hartig R, Basso MA, et al. International primate neuroscience research regulation, public engagement and transparency opportunities. *Neuroimage*, 2021, 229: 117700
- [4] Paşca AM, Park JY, Shin HW, et al. Human 3D cellular model of hypoxic brain injury of prematurity. *Nat Med*, 2019, 25: 784-91
- [5] Xu R, Boreland AJ, Li X, et al. Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable microglia ratio for modeling brain development and pathology. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 1923-37
- [6] Bodnar B, Zhang Y, Liu J, et al. Novel scalable and simplified system to generate microglia-containing cerebral organoids from human induced pluripotent stem cells. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 682272
- [7] Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2329-40
- [8] Sun G, Chiuppesi F, Chen X, et al. Modeling human cytomegalovirus-induced microcephaly in human iPSC-derived brain organoids. *Cell Rep Med*, 2020, 1: 100002
- [9] Kim H, Xu R, Padmashri R, et al. Pluripotent stem cell-derived cerebral organoids reveal human oligodendrogenesis with dorsal and ventral origins. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 890-905
- [10] Sidhaye J, Knoblich JA. Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death Differ*, 2021, 28: 52-67
- [11] Damianidou E, Mouratidou L, Kyrousi C. Research models of neurodevelopmental disorders: the right model in the right place. *Front Neurosci*, 2022, 16: 1031075
- [12] Sood D, Cairns DM, Dabbi JM, et al. Functional maturation of human neural stem cells in a 3D bioengineered brain model enriched with fetal brain-derived matrix. *Sci Rep*, 2019, 9: 17874
- [13] Fair SR, Julian D, Hartlaub AM, et al. Electrophysiological maturation of cerebral organoids correlates with dynamic morphological and cellular development. *Stem Cell Rep*, 2020, 15: 855-68
- [14] Linders LE, Supiot LF, Du W, et al. Studying synaptic connectivity and strength with optogenetics and patch-clamp electrophysiology. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 11612
- [15] Jakubiec M, Abram M, Zagaja M, et al. Novel alaninamide derivatives with drug-like potential for development as antiseizure and antinociceptive therapies-*in vitro* and *in vivo* characterization. *ACS Chem Neurosci*, 2024, 15: 2198-222
- [16] Barba-Vila O, Mastio A. Unique properties of thalamocortical projections to the gustatory cortex. *J Neurosci*, 2024, 44: e0033242024
- [17] Pons-Bennaceur A, Lozovaya N. Electrophysiological investigation of NMDA current properties in brain slices. *Methods Mol Biol*, 2017, 1677: 231-9
- [18] Rich PD, Thiberge SY, Scott BB, et al. Magnetic voluntary head-fixation in transgenic rats enables lifespan imaging of hippocampal neurons. *Nat Commun*, 2024, 15: 4154
- [19] Ohtake M, Abe K, Hasegawa M, et al. Encoding of self-initiated actions in axon terminals of the mesocortical pathway. *Neurophotonics*, 2024, 11: 033408
- [20] Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, et al. Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium*, 1990, 11: 157-79
- [21] Grienberger C, Giovannucci A, Zeiger W, et al. Two-photon calcium imaging of neuronal activity. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 67
- [22] Kleindienst T, Lohmann C. Simultaneous patch-clamping and calcium imaging in developing dendrites. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, 2014: 324-8
- [23] Huang Q, Tang B, Romero JC, et al. Shell microelectrode arrays (MEAs) for brain organoids. *Sci Adv*, 2022, 8: eabq5031
- [24] Kita Y, Tsuruhara S, Kubo H, et al. Three-micrometer-diameter needle electrode with an amplifier for extracellular *in vivo* recordings. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2008233118
- [25] Sharf T, van der Molen T, Glasauer SMK, et al. Functional neuronal circuitry and oscillatory dynamics in human brain organoids. *Nat Commun*, 2022, 13: 4403
- [26] Shiri Z, Simorgh S, Naderi S, et al. Optogenetics in the era of cerebral organoids. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 1282-94
- [27] Tran HN, Gautam V. Micro/nano devices for integration with human brain organoids. *Biosens Bioelectron*, 2022, 218: 114750
- [28] Cai H, Ao Z, Tian C, et al. Brain organoid reservoir computing for artificial intelligence. *Nat Electron*, 2023, 6: 1032-9
- [29] Chen H, Jin X, Li T, et al. Brain organoids: establishment and application. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 1029873
- [30] Jgamadze D, Lim JT, Zhang Z, et al. Structural and functional integration of human forebrain organoids with the injured adult rat visual system. *Cell Stem Cell*, 2023, 30: 137-52.e7

- [31] Wilson MN, Thunemann M, Liu X, et al. Multimodal monitoring of human cortical organoids implanted in mice reveal functional connection with visual cortex. *Nat Commun*, 2022, 13: 7945
- [32] Gordon A, Yoon SJ, Tran SS, et al. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 331-42
- [33] Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501: 373-9
- [34] Bhaduri A, Sandoval-Espinosa C, Otero-Garcia M, et al. An atlas of cortical arealization identifies dynamic molecular signatures. *Nature*, 2021, 598: 200-4
- [35] Li Y, Li Z, Wang C, et al. Spatiotemporal transcriptome atlas reveals the regional specification of the developing human brain. *Cell*, 2023, 186: 5892-909.e22
- [36] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 2014, 345: 1247125
- [37] Sabate-Soler S, Bernini M, Schwamborn JC. Immunocompetent brain organoids—microglia enter the stage. *Prog Biomed Eng*, 2022, 4: 042002
- [38] Camp JG, Badsha F, Florio M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 15672-7
- [39] Lindenhofer D, Haendeler S, Esk C, et al. Cerebral organoids display dynamic clonal growth and tunable tissue replenishment. *Nat Cell Biol*, 2024, 26: 710-8
- [40] Lancaster MA, Corsini NS, Wolfinger S, et al. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 659-66
- [41] Zhang Z, O'Laughlin R, Song H, et al. Patterning of brain organoids derived from human pluripotent stem cells. *Curr Opin Neurobiol*, 2022, 74: 102536
- [42] Birey F, Andersen J, Makinson CD, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, 2017, 545: 54-9
- [43] Qian X, Jacob F, Song MM, et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc*, 2018, 13: 565-80
- [44] Jo J, Xiao Y, Sun AX, et al. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 248-57
- [45] Xiang Y, Tanaka Y, Cakir B, et al. hESC-derived thalamic organoids form reciprocal projections when fused with cortical organoids. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 487-97.e7
- [46] Miura Y, Li MY, Birey F, et al. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1421-30
- [47] Huang WK, Wong SZH, Pather SR, et al. Generation of hypothalamic arcuate organoids from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1657-70.e10
- [48] Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun*, 2015, 6: 8896
- [49] Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*, 2015, 10: 537-50
- [50] Valiulahi P, Vidyawan V, Puspita L, et al. Generation of caudal-type serotonin neurons and hindbrain-fate organoids from hPSCs. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 1938-52
- [51] Xiang Y, Tanaka Y, Patterson B, et al. Fusion of regionally specified hpSC-derived organoids models human brain development and interneuron migration. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 383-98.e7
- [52] Pang W, Zhu J, Yang K, et al. Generation of human region-specific brain organoids with medullary spinal trigeminal nuclei. *Cell Stem Cell*, 2024, 31: 1501-12.e8
- [53] Xu R, Brawner AT, Li S, et al. OLIG2 drives abnormal neurodevelopmental phenotypes in human iPSC-based organoid and chimeric mouse models of down syndrome. *Cell Stem Cell*, 2019, 24: 908-26.e8
- [54] Li X, Shopit A, Wang J. A comprehensive update of cerebral organoids between applications and challenges. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7264649
- [55] Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*, 2008, 3: 1172-84
- [56] Aljitawi OS, Li D, Xiao Y, et al. A novel three-dimensional stromal-based model for *in vitro* chemotherapy sensitivity testing of leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55: 378-91
- [57] Orwar O, Jardemark K, Jacobson I, et al. Patch-clamp detection of neurotransmitters in capillary electrophoresis. *Science*, 1996, 272: 1779-82
- [58] Green DJ, Gillette R. Patch- and voltage-clamp analysis of cyclic AMP-stimulated inward current underlying neurone bursting. *Nature*, 1983, 306: 784-5
- [59] Vandael D, Okamoto Y, Borges-Merjane C, et al. Subcellular patch-clamp techniques for single-bouton stimulation and simultaneous pre- and postsynaptic recording at cortical synapses. *Nat Protoc*, 2021, 16: 2947-67
- [60] Landry CR, Yip MC, Zhou Y, et al. Electrophysiological and morphological characterization of single neurons in intact human brain organoids. *J Neurosci Methods*, 2023, 394: 109898
- [61] Tasnim K, Liu J. Emerging bioelectronics for brain organoid electrophysiology. *J Mol Biol*, 2022, 434: 167165
- [62] Sivitilli AA, Gosio JT, Ghoshal B, et al. Robust production of uniform human cerebral organoids from pluripotent stem cells. *Life Sci Alliance*, 2020, 3: e202000707
- [63] Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell*, 2019, 25: 558-69.e7
- [64] Shen H. Robots record brain activity inside neurons. *Nature*, 2016, 532: 135-6

- [65] Brüggemann A, Stoelzle S, George M, et al. Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording. *Small*, 2006, 2: 840-6
- [66] Suk HJ, van Welie I, Kodandaramaiah SB, et al. Closed-loop real-time imaging enables fully automated cell-targeted patch-clamp neural recording *in vivo*. *Neuron*, 2017, 95: 1037-47.e11
- [67] Gao J, Liao C, Liu S, et al. Nanotechnology: new opportunities for the development of patch-clamps. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19: 97
- [68] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 11-21
- [69] Tippani M, Pattie EA, Davis BA, et al. CaPTure: Calcium PeakToolbox for analysis of *in vitro* calcium imaging data. *BMC Neurosci*, 2022, 23: 71
- [70] Tada M, Takeuchi A, Hashizume M, et al. A highly sensitive fluorescent indicator dye for calcium imaging of neural activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Neurosci*, 2014, 39: 1720-8
- [71] Brömmel K, Maskri S, Maisuls I, et al. Synthesis of small-molecule fluorescent probes for the *in vitro* imaging of calcium-activated potassium channel K(Ca) 3.1. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 8277-84
- [72] Samarasinghe RA, Miranda OA, Buth JE, et al. Identification of neural oscillations and epileptiform changes in human brain organoids. *Nat Neurosci*, 2021, 24: 1488-500
- [73] Sloan SA, Darmanis S, Huber N, et al. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells. *Neuron*, 2017, 95: 779-90.e6
- [74] Zhang Y, Rózsa M, Liang Y, et al. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature*, 2023, 615: 884-91
- [75] de Melo Reis RA, Freitas HR, de Mello FG. Cell calcium imaging as a reliable method to study neuron-glia circuits. *Front Neurosci*, 2020, 14: 569361
- [76] Spira ME, Hai A. Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8: 83-94
- [77] Le Floch P, Li Q, Lin Z, et al. Stretchable mesh nanoelectronics for 3D single-cell chronic electrophysiology from developing brain organoids. *Adv Mater*, 2022, 34: e2106829
- [78] Soscia DA, Lam D, Tooker AC, et al. A flexible 3-dimensional microelectrode array for *in vitro* brain models. *Lab Chip*, 2020, 20: 901-11
- [79] Cotterill E, Hall D, Wallace K, et al. Characterization of early cortical neural network development in multiwell microelectrode array plates. *J Biomol Screen*, 2016, 21: 510-9
- [80] Park Y, Franz CK, Ryu H, et al. Three-dimensional, multifunctional neural interfaces for cortical spheroids and engineered assembloids. *Sci Adv*, 2021, 7: eabf9153
- [81] Li Q, Nan K, Le Floch P, et al. Cyborg organoids: implantation of nanoelectronics via organogenesis for tissue-wide electrophysiology. *Nano Lett*, 2019, 19: 5781-9
- [82] Wu Y, Cheng J, Qi J, et al. Three-dimensional liquid metal-based neuro-interfaces for human hippocampal organoids. *Nat Commun*, 2024, 15: 4047
- [83] Yang X, Forró C, Li TL, et al. Kirigami electronics for long-term electrophysiological recording of human neural organoids and assembloids. *Nat Biotechnol*, 2024, 42: 1836-43
- [84] Xia X, Yang J, Liu Y, et al. Material choice and structure design of flexible battery electrode. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10: e2204875
- [85] Button VLSN. Chapter 2 - electrodes for biopotential recording and tissue stimulation[M]// Principles of Measurement and Transduction of Biomedical Variables. Amsterdam, Netherland: Academic Press, 2015: 25-76
- [86] Jun JJ, Steinmetz NA, Siegle JH, et al. Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity. *Nature*, 2017, 551: 232-6
- [87] Chung JE, Joo HR, Fan JL, et al. High-density, long-lasting, and multi-region electrophysiological recordings using polymer electrode arrays. *Neuron*, 2019, 101: 21-31.e5
- [88] Hu N, Shi JX, Chen C, et al. Constructing organoid-brain-computer interfaces for neurofunctional repair after brain injury. *Nat Commun*, 2024, 15: 9580
- [89] Li XH, Hu N, Chang ZH, et al. Brain organoid maturation and implantation integration based on electrical signals input. *J Adv Res*, 2024, S2090-1232: 00378-3
- [90] Li XH, Guo D, Chen LQ, et al. Low-intensity ultrasound ameliorates brain organoid integration and rescues microcephaly deficits. *Brain*, 2024, 147: 3817-33
- [91] 都展宏, 鲁艺, 蔚鹏飞, 等. 植入式神经电极阵列器件与材料的研究进展. *物理化学学报*, 2020, 36: 82-94
- [92] Spieth S, Brett O, Seidl K, et al. A floating 3D silicon microprobe array for neural drug delivery compatible with electrical recording. *J Micromech Microeng*, 2011, 21: 125001
- [93] 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. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2013, 2013: 253-6
- [94] Yokoi R, Shibata M, Odawara A, et al. Analysis of signal components < 500 Hz in brain organoids coupled to microelectrode arrays: a reliable test-bed for preclinical seizure liability assessment of drugs and screening of antiepileptic drugs. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 28: 101148
- [95] Saleem A, Santos AC, Aquilino MS, et al. Modelling hyperexcitability in human cerebral cortical organoids: oxygen/glucose deprivation most effective stimulant. *Heliyon*, 2023, 9: e14999
- [96] Smirnova L, Caffo B, Johnson EC. Reservoir computing with brain organoids. *Nat Electron*, 2023, 6: 943-44
- [97] Watanabe M, Buth JE, Vishlaghi N, et al. Self-organized cerebral organoids with human-specific features predict effective drugs to combat zika virus infection. *Cell Rep*,

- 2017, 21: 517-32
- [98] Steinbeck JA, Choi SJ, Mrejeru A, et al. Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 204-9
- [99] Osaki T, Uzel SGM, Kamm RD. Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Sci Adv*, 2018, 4: eaat5847
- [100] Marotta D, Ijaz L, Barbar L, et al. Effects of microgravity on human iPSC-derived neural organoids on the International Space Station. *Stem Cells Transl Med*, 2024, 13: 1186-97
- [101] Fontana F, Cafarelli A, Iacoponi F, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation enhances neurite outgrowth in neural cells and modulates inflammation in macrophages. *Eng Regen*, 2024, 5: 80-91
- [102] 陈波, 蒋辰宇, 苏小娟, 等. 脉冲电磁场对小鼠运动水平及脑内神经递质浓度影响研究. *集成技术*, 2023, 12: 1-9
- [103] Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 432-41
- [104] Revah O, Gore F, Kelley KW, et al. Maturation and circuit integration of transplanted human cortical organoids. *Nature*, 2022, 610: 319-26
- [105] Forro C, Caron D, Angotzi GN, et al. Electrophysiology read-out tools for brain-on-chip biotechnology. *Micromachines (Basel)*, 2021, 12: 124
- [106] Eremeev AV, Lebedeva OS, Bogomiakova ME, et al. Cerebral organoids-challenges to establish a brain prototype. *Cells*, 2021, 10: 1790
- [107] Kanta V, Pare D, Headley DB. Closed-loop control of gamma oscillations in the amygdala demonstrates their role in spatial memory consolidation. *Nat Commun*, 2019, 10: 3970