

## 综述

# 光遗传学技术在疼痛研究中的应用

李毅, 郝瀚, 张海林, 杜肖娜\*

河北医科大学药理教研室, 石家庄 050017

**摘要:** 疼痛是影响广泛的临床问题, 目前对于疼痛还缺乏非常有效的特异性药物和治疗方法。疼痛的传导通路涉及外周、脊髓和脊髓上多个水平, 具有复杂多样性的特点。要解决疼痛方面的问题, 首先要对疼痛感觉通路和神经生物学机制有清晰的认识。光遗传学方法是一项能够选择性激活体内特定类型神经元的新技术, 该技术的发展为深入解析神经系统多种传导通路以及调控机制提供了可能。本文综述了迄今在疼痛研究领域的光遗传学技术研究进展, 并列出了在疼痛研究中有潜在应用价值的新型光遗传学方法。

**关键词:** 疼痛; 光遗传学; 伤害性感受器; 背根神经节; 脊髓

**中图分类号:** R338.8

## Application of optogenetic technique in pain research

LI Yi, HAO Han, ZHANG Hai-Lin, DU Xiao-Na\*

*Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China*

**Abstract:** Chronic pain represents a major clinical issue which so far is still in shortage of selective and effective treatment. Multiple components are involved in the pain processing, including peripheral, spinal and supraspinal levels of the nervous system. The core to fight the pain problem effectively is to have a good understanding of nociceptive mechanism and the neurobiology of pain perception. Optogenetic technique allows selective activation of subpopulation neurons and provides possibility for better understanding of complex pathway and modulation mechanism in nervous system. Here we review the researches to date that used optogenetic tools for studying pain pathway, and we also provide a brief overview of some new development in optogenetic techniques that may have great potentials in pain research.

**Key words:** pain; optogenetics; nociceptor; dorsal root ganglion; spinal cord

疼痛感觉起始于外周疼痛感受器的激活, 随后伤害性感受信号通过脊髓背角传输到感觉疼痛的多个脑区, 外周伤害性感受神经纤维兴奋性增加(外周敏化)或中枢伤害性刺激传递过程的变化(中枢敏化)是导致难治性疼痛的主要原因<sup>[1, 2]</sup>。尽管近年来针对疼痛的研究不断取得重要进步, 但是关于疼痛传导通路和行为学机制方面仍有很多悬而未决的问题。与此相对应, 目前对于疼痛还缺乏非常有效的特异性药物和治疗方法, 疼痛仍然是重要的、影响广泛的临床问题。目前, 解决疼痛问题的“瓶颈”

主要是对于疼痛感觉通路和疼痛产生的神经生物学机制缺乏深入的了解。如果有一项能够选择性激活体内特定的疼痛相关神经元亚型的技术, 将有助于我们深入地对疼痛传导通路加以解析, 并为寻找疼痛信息传递过程中的新靶点和研发特异性镇痛药物提供强大的基础研究支持。光遗传学正是这样一种技术, 它可以通过光刺激特异性激活某种类型细胞。光遗传学正在疼痛研究中发挥着重大的作用, 在此我们综述了迄今为止在疼痛外周水平、脊髓水平和脊髓以上水平的传导通路所采用的光遗传学研究。

Received 2016-02-24 Accepted 2016-04-20

\*Corresponding author. Tel: +86-311-86266073; E-mail: duxiaona@hebmu.edu.cn

此外, 我们还列举了某些在疼痛研究中具有潜在应用价值的新型光遗传学方法。

## 1 复杂的疼痛通路

疼痛不像某些神经生物学疾病可以归因于特定的大脑区域, 而是由外周、脊髓和脊髓上水平的多个神经系统组件共同参与形成。其中, 外周伤害性感受器是疼痛通路中的第一个组件, 具有复杂多样性的特点。外周伤害性感受器可根据髓鞘特性、感受刺激类型、肽类释放功能和电压门控钠通道的表达特征等多种方式加以分类<sup>[3]</sup>。因此, 已知的基于外周伤害性感受器特异性特征的转基因小鼠在证明不同伤害性感受器的不同功能方面具有非常重要的应用价值: 如证明感受热痛和机械性疼痛是由不同的伤害性感受器感知<sup>[4, 5]</sup>; 另外参与不同慢性疼痛如炎性和神经性病理痛的伤害性感受器也有所不同<sup>[5-7]</sup>。同样, 基于外周伤害性感受器特异性特征的光遗传学技术, 可在整体系统中激活特定的伤害性感受器, 有助于进一步了解疼痛通路以及确定新的疼痛治疗靶点。

脊髓背角是大部分初级感觉传入神经末梢的投射部位, 是疼痛通路的二级神经元存在部位(三叉神经伤害性感受器是一个例外)<sup>[8]</sup>。脊髓背角是中枢神经系统痛觉信息整合加工的重要部位, 由初级感觉传入末梢、脊髓中间神经元、脊髓投射神经元和脊髓内的下行纤维组成, 构成复杂的神经网络, 是感觉信息传入的门户和整合的初级中枢, 在疼痛信息传递过程中发挥着重要作用。脊髓背角大部分的神经元是中间神经元<sup>[9]</sup>。在慢性疼痛状态下脊髓背角的兴奋和抑制之间的平衡可能被打乱。例如, 脊髓背角 GABA 能和甘氨酸能中间神经元功能下降参与神经病理性疼痛的痛觉过敏反应<sup>[10, 11]</sup>; 而且不同亚型的脊髓谷氨酸能中间神经元可能在急性、炎性和神经性疼痛状态中有不同的作用<sup>[12]</sup>。迄今为止, 我们对于背角中间神经元通路的认识主要是基于电生理和药理学方法的研究。鉴于中间神经元在疼痛的门控制理论中的关键作用<sup>[13]</sup>, 利用光遗传学将特定区域特定细胞类型特异性激活(或抑制)在研究脊髓背角神经环路中有重要价值。

背角神经元直接投射的主要目标是臂旁核区和丘脑。从臂旁核区和丘脑开始, 躯体感觉皮层、前扣带回、前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)和杏仁核也相继被激活<sup>[14-16]</sup>。值得注意的是慢性疼痛状态

常伴随心理症状, 如焦虑和抑郁<sup>[17]</sup>, 因此了解脑区中关于疼痛感觉和情感部分的相互作用对探究新的疼痛治疗方法也非常重要。疼痛通路中需要考虑的另一个重要环节是下行疼痛调节系统, 下行疼痛调节系统是由大脑高级中枢下传给脊髓背角的调节信号。光遗传学方法是研究动物的疼痛行为中这些上行通路和下行通路的重要手段。

## 2 疼痛研究中光遗传学技术的发展及应用

### 2.1 伤害性感受器的光遗传学研究

利用光遗传学技术刺激特定的外周伤害性感受器, 是研究不同外周伤害性感受器亚型与相关的脊髓通路的重要手段<sup>[18]</sup>。Dong 和 Zylka 等的研究表明 Mas 相关 G 蛋白耦联受体 D (Mas related G protein coupled receptor D, Mrgprd) 主要特异性地表达于大鼠和小鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)和三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)的非肽能神经元<sup>[19, 20]</sup>, 因此可以用来标记非肽能伤害性感受器。这些神经元似乎只参与介导机械伤害感受, 而不参与感受伤害性热或冷刺激<sup>[6]</sup>。尽管解剖学上已知这些 Mrgprd 阳性的传入纤维主要终止于脊髓背角浅 II 层, 但对于其与脊髓背角神经元怎样建立联系还知之甚少<sup>[18, 21]</sup>, 相对于外周伤害性感受器神经元的特异性标记物的研究, 已知的脊髓背角神经元特异性标记物相对较少。所以, 为了研究与 Mrgprd 阳性传入纤维联系的脊髓背角神经元, Wang 和其同事使用了一种将光遗传学和电生理学相结合的方法<sup>[18]</sup>。他们首先建立了在 Mrgprd 基因位点敲入 channelrhodopsin-2 的小鼠, 使得此伤害性感受器可以被蓝光特异性激活, 然后在脊髓切片中通过短波高频蓝光刺激 Mrgprd 表达的纤维末端, 同时用膜片钳方法记录背角浅 II 层神经元电流变化, 发现激光刺激可在 50% 的 II 层神经元中诱发兴奋性突触后电位。因此, 背角 II 层中其它没有应答的神经元有可能是接收其它纤维(如肽能伤害性感受器神经纤维)的传入。在该实验中脊髓切片并没有附着神经节(DRG), 说明对轴突末端 channelrhodopsin-2 的刺激就足以引起突触后激活。这一研究突显了光遗传学在理解背角内复杂的疼痛相关通路方面的潜力, 不像传统电生理方法需要对传入纤维行无选择性的电刺激或伤害性刺激, 光遗传学方法可以精确地刺激特定的伤害性感受器亚群, 这对理解外周伤害性感受器和脊髓神经元之间的联系有很大帮助。

Nav1.8 主要在伤害性感受器中表达, 表达 Nav1.8 的初级传入神经元与炎性痛和神经性疼痛有关。已经有许多研究使用 Nav1.8 基因控制的 Cre 重组小鼠作为背景来研究特定基因在伤害感受和疼痛行为中的作用<sup>[22]</sup>。Daou 等在 Nav1.8 Cre 小鼠的基础上将 channelrhodopsin-2 特异性表达于 Nav1.8 阳性的疼痛感受器中, 随后通过蓝光刺激该小鼠的爪部可诱导小鼠的伤害性反射的行为。此外该研究中通过背角浅层的 I、II 层 c-Fos 标记显示激光激活了包括肽能伤害性感受器和非肽能伤害性感受器。而且, Daou 等还发现光遗传学刺激 Nav1.8 的伤害性感受器也能引发长时间的机械超敏和热刺激超敏反应, 这与小鼠慢性疼痛模型状态类似。由于疼痛具有重要的情感成分, 该研究也观察到在光刺激下动物可以产生条件性位置厌恶。总之, 这是第一次通过光遗传学方法刺激外周伤害性感受器从而在清醒和自由活动动物触发疼痛行为<sup>[23]</sup>。

## 2.2 疼痛脊髓水平调控的光遗传学研究

近些年随着转基因动物等技术的发展, 人们对脊髓背角的神经网络结构和功能有了更深入的了解。但基于脊髓的解剖结构特点, 目前还没有对整体动物脊髓水平疼痛环路的光遗传学研究。原因是脊髓处于脊柱的包围之下, 而动物清醒状态下脊柱活动范围大, 光纤的固定有一定的难度。所以到目前为止脊髓水平疼痛调控环路的光遗传学研究基本采用脊髓切片的离体实验。如 Honsek 等<sup>[24]</sup>将 VGlut3-cre 小鼠和 cre 依赖的 channelrhodopsin-2 小鼠杂交, 使 channelrhodopsin-2 特异性地表达在 VGlut3<sup>+</sup> 神经元中, 然后通过制备保留 DRG 及脊神经的脊髓切片, 用激光刺激 DRG 部位即可在脊髓背角记录得到 VGlut3<sup>+</sup> 神经末梢兴奋诱发的突触后效应。通过运用不同类型受体阻断剂, Honsek 等发现投射于脊髓背角的 A 型和 C 型 VGlut3<sup>+</sup> 神经末梢的突触前抑制受不同受体调控, 如  $\mu$  型阿片受体主要对 C 型 VGlut3<sup>+</sup> 神经末梢产生突触前抑制,  $\delta$  型阿片受体对两类 VGlut3<sup>+</sup> 神经末梢不产生明显突触前抑制作用, 而 GABA<sub>B</sub> 受体对两类 VGlut3<sup>+</sup> 神经末梢均有强大的突触前抑制作用。这一研究通过光遗传学方法证实了不同感觉传入神经末梢受体的特异分布, 这对未来有针对性地研发调节痛觉或非痛觉神经信息传导的药物有重要的理论指导意义。此外, 最近 Zhang 等<sup>[25]</sup>运用狂犬病毒逆标和光遗传学结合方法证明了延髓头端腹内侧区 (rostromedial

medulla, RVM) 的 GABA 能神经元发出下行调控纤维对脊髓背角的传入神经纤维末梢起到突触前抑制性调节作用。

如前所述, 脊髓由初级感觉传入末梢、脊髓中间神经元、脊髓投射神经元和脊髓内的下行纤维组成复杂的神经网络。虽然目前对这一脊髓痛觉调控环路的认识还比较片面, 但随着转基因动物技术的发展和新型光遗传学技术的产生 (如下述), 人们对脊髓水平痛觉调控环路将有进一步认识。

## 2.3 通过光遗传学技术与疼痛相关的特定脑区

迄今为止, 运用光遗传学技术研究啮齿类动物疼痛相关脑区的报道相对较少。Crock 和其同事在 2012 年发表的文章中通过光遗传学刺激来探究内脏疼痛动物模型中杏仁核的作用<sup>[26]</sup>。Crock 等在研究中采用膀胱扩张来模拟内脏痛, 使用腹肌的肌电图 (VMR) 作为内脏敏感性的指标。杏仁核部位主要参与疼痛的情感反应, 以前的研究已经表明内脏疼痛可诱导杏仁核 c-fos 的表达增加<sup>[27]</sup>。为了进一步研究这个问题, Crock 等在右侧杏仁核注射可以表达 channelrhodopsin-2 的单纯疱疹病毒 (HSV) 病毒载体。在膀胱扩张之前、期间和之后进行激光刺激 30 min, 结果发现膀胱扩张前激光刺激增加可上调 VMR 敏感性, 此超敏反应可维持至停止激光刺激后长达 15 min, 这个结果为杏仁核神经元激活诱发内脏疼痛提供了直接的证据。

已知参与疼痛调节另一个重要脑区域是 PFC, 与杏仁核一样, 该区域也与疼痛经历里的情感成分密切相关。最近的一项研究表明, 将由钙离子 / 钙调素依赖的蛋白激酶 II alpha 启动子 (CaMKIIa) 控制的 channelrhodopsin-2 在 PFC 的锥体神经元 (该区域主要的兴奋性神经元) 表达后<sup>[28]</sup>, 激光激活 PFC 的下边缘皮质 (IL) 区不仅使该区域的神经元自发性兴奋性增加, 而且使动物对外周伤害性及非伤害性刺激的反应更为敏感; 相反, IL 的激光刺激会使同在 PFC 区的前边缘皮质 (PL) 区域神经元兴奋性降低, 这说明 IL 区域对 PL 区域具有抑制性调节作用。该研究也表明光遗传学方法和与电生理学方法联合应用对研究疼痛的脑内调节环路有重要的价值。

另有研究应用光遗传学方法探索参与阿片类药物镇痛的新的大脑区域。阿片类药物镇痛药物有重要的临床意义, 但由于其耐受性及成瘾性而受到限制<sup>[29]</sup>, 对参与阿片耐受和成瘾性的脑区和细胞类型的了解

有助于解决这个问题。Nestler 等研究<sup>[30]</sup>证实 RGS9-2 (regulator of G protein signaling 9-2) 对吗啡耐受起负性调节作用, 而且证明了 RGS9-2 在伏隔核 (NAc) 中的吗啡耐受调控中发挥重要作用。Gaspari 等利用光遗传学方法证明 NAc 区域表达 RGS9 的神经元的活化会导致热板实验中镇痛耐受性的快速形成<sup>[31]</sup>。NAc 神经元有两类亚群: 一类是主要表达多巴胺 D1 受体 (D1 型, 直接通路) 的神经元, 另一类是富含多巴胺 D2 受体 (D2 型, 间接通路) 的神经元。利用受 Cre 重组酶控制的、选择性地激活上述两类 NAc 神经元亚群中的 channelrhodopsin-2, 结果表明吗啡耐受主要被 D1 型神经元调控, D1 型神经元是主要表达  $\mu$  阿片受体的神经元 (MORs)<sup>[32]</sup>。

### 3 新型光遗传学研究方法

#### 3.1 新型的“类”光遗传学方法

虽然基础神经生物学研究证明光遗传学是一种非常有用的工具, 但是, 因为它需要外源光敏感分子在目标系统中表达, 使得这种方法的在体应用复杂繁琐, 有局限性。最近出现了一种新的“opto-pharmacology”方法, 即通过某种化合物应用使得特定细胞类型产生光敏感特性<sup>[33]</sup>。例如 Kokel 等最近发现一种新型的小分子“optovin”, 这个小分子可以赋予瞬时受体电位阳离子通道成员 A1 (TRPA1) 光敏感性<sup>[34]</sup>。该离子通道是瞬时受体电位家族 (TRP) 的一部分, TRP 家族在外周存在有害刺激时充当换能器, TRPA1 可以被伤害性冷刺激激活, 也可以对化学刺激物 (如福尔马林和芥子油) 产生反应, 并且也可以介导机械性伤害感受<sup>[35, 36]</sup>。Optovin 是通过筛选斑马鱼胚胎的一个化合物库而鉴定到的。Optovin 对紫外线敏感, 可以使小鼠 DRG 细胞的一个亚群对光产生反应, 经鉴定这个细胞亚群为表达 TRPA1 的伤害性感受器。Kokel 等的研究中还证实 Optovin 也可以赋予转染 TRPA1 的人类胚胎肾 (HEK) 细胞光敏感性, 该研究的意义在于不需要基因操作就可以赋予调节疼痛感受的 TRPA1 神经元光敏感性<sup>[34]</sup>。这种方法可以用于未来疼痛的研究和治疗。

光遗传学的另外一个弊端是必须首先在测定部位植入光纤, 这也限制了该方法多个部位的广泛应用 (如脊髓)。化学遗传学是另一种常用人工控制神经元兴奋性的方法, 如 DREADDS 方法<sup>[37, 38]</sup>, 这种方法的本质与光遗传学方法类似, 即人为调控特

定细胞功能 (神经元兴奋性), 通过构建特异的受体-配体对达到这一目的。但这种方法的缺点是其反应速度慢 (依赖于胞内 G 蛋白信号通路), 不能像光遗传学技术那样瞬时控制细胞功能。2016 年 Berglund 等<sup>[39]</sup>在其研究工作中新建立了一种光遗传学与化学遗传学相结合的方法。他们将细菌的荧光素酶 (luciferase) 与 channelrhodopsin 融合在一起, 荧光素酶在其底物荧光素 (luciferin) 存在的条件下催化后者产生化学荧光, 该荧光可瞬间有效地激活 channelrhodopsin, 进而激活相应的神经元。这一方法结合了光遗传学与化学遗传学的优点, 在神经科学研究中有较大的应用前景。

#### 3.2 光敏感受体方法

2013 年 Barish 等<sup>[40]</sup>研发出了一种光敏感  $\mu$  阿片受体 (opto-MOR), 这是一种介导吗啡镇痛作用的主要受体类型。该研究将视紫红质分子的光学活性部分和 MOR 受体中与 G 蛋白信号传导部分组合在一起, 这种组合受体在 HEK 细胞系统中能被光激活, 并具有激活内源性 MOR 受体细胞内信号通路的能力。2015 年 Siuda 等<sup>[41]</sup>通过同样的策略建立了另一种 opto-MOR, 并将其转染在包括 DRG 神经元、脑水管周灰质 (PAG) 和中脑腹侧被盖区 (VTA) 的 GABA 能神经元, 证明了光刺激 opto-MOR 可很好地模拟 MOR 激活后的体内作用。这些研究结果提示 opto-MOR 方法有望在未来痛觉研究中发挥重要作用, 特别是在解决长期吗啡治疗患者的中枢神经系统成瘾性问题中有重要的潜在应用价值。

#### 3.3 新型“柔性”光遗传学技术

如前所述, 由于在脊髓插入光遗传学纤维具有很大的技术困难。迄今为止, 几乎没有在整体动物水平的直接作用于脊髓背角的光遗传学研究。而 Rogers 的实验小组在 2015 年研究建立的“柔性可伸展可植入微型光电无线光遗传技术”是光遗传学技术的一项突破性进展。这一方法采用一种柔性生物可溶性高分子材料, 与射频 (radio frequency, RF) 接收装置和 LED 装置整合起来。其大小可为 0.7 mm × 3.8 mm × 6 mm, 重量仅约 16 mg。这一组合装置可植入外周神经周围或脊髓硬膜下, 直接激活外周神经或脊髓背角特定类型神经纤维或神经元, 以观察自由活动动物的疼痛行为变化<sup>[42]</sup>。此外, 该装置还可进一步对柔性材料加以改造, 使其同时兼具光学刺激和给药功能<sup>[43]</sup>, 这对研究外周或中枢疼痛信号传递及功能调节等具有重要意义。



- 33(47): 18631–18640.
- 24 Honsek SD, Seal RP, Sandkuhler J. Presynaptic inhibition of optogenetically identified VGluT3<sup>+</sup> sensory fibres by opioids and baclofen. *Pain* 2015; 156(2): 243–251.
- 25 Zhang Y, Zhao S, Rodriguez E, Takatoh J, Han BX, Zhou X, Wang F. Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J Clin Invest* 2015; 125(10): 3782–3794.
- 26 Crock LW, Kolber BJ, Morgan CD, Sadler KE, Vogt SK, Bruchas MR, Gereau RW 4th. Central amygdala metabotropic glutamate receptor 5 in the modulation of visceral pain. *J Neurosci* 2012; 32(41): 14217–14226.
- 27 Han JS, Neugebauer V. Synaptic plasticity in the amygdala in a visceral pain model in rats. *Neurosci Lett* 2004; 361(1–3): 254–257.
- 28 Ji G, Neugebauer V. Modulation of medial prefrontal cortical activity using *in vivo* recordings and optogenetics. *Mol Brain* 2012; 5: 36.
- 29 Ling W, Mooney L, Hillhouse M. Prescription opioid abuse, pain and addiction: clinical issues and implications. *Drug Alcohol Rev* 2011; 30(3): 300–305.
- 30 Zachariou V, Georgescu D, Sanchez N, Rahman Z, DiLeone R, Berton O, Neve RL, Sim-Selley LJ, Selley DE, Gold SJ, Nestler EJ. Essential role for RGS9 in opiate action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13656–13661.
- 31 Gaspari S, Papachatzaki MM, Koo JW, Carr FB, Tsimpanouli ME, Stergiou E, Bagot RC, Ferguson D, Mouzon E, Chakravarty S, Deisseroth K, Lobo MK, Zachariou V. Nucleus accumbens-specific interventions in RGS9-2 activity modulate responses to morphine. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39(8): 1968–1977.
- 32 Cui Y, Ostlund SB, James AS, Park CS, Ge W, Roberts KW, Mittal N, Murphy NP, Cepeda C, Kieffer BL, Levine MS, Jentsch JD, Walwyn WM, Sun YE, Evans CJ, Maidment NT, Yang XW. Targeted expression of mu-opioid receptors in a subset of striatal direct-pathway neurons restores opiate reward. *Nat Neurosci* 2014; 17(2): 254–261.
- 33 Kramer RH, Mourot A, Adesnik H. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci* 2013; 16(7): 816–823.
- 34 Kokel D, Cheung CY, Mills R, Coutinho-Budd J, Huang L, Setola V, Sprague J, Jin S, Jin YN, Huang XP, Bruni G, Woolf CJ, Roth BL, Hamblin MR, Zylka MJ, Milan DJ, Peterson RT. Photochemical activation of TRPA1 channels in neurons and animals. *Nat Chem Biol* 2013; 9(4): 257–263.
- 35 Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003; 112(6): 819–829.
- 36 Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427(6971): 260–265.
- 37 Lee HM, Giguere PM, Roth BL. DREADDs: novel tools for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2013; 19(4): 469–473.
- 38 Vrontou S, Wong AM, Rau KK, Koerber HR, Anderson DJ. Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin *in vivo*. *Nature* 2013; 493(7434): 669–673.
- 39 Berglund K, Clissold K, Li HE, Wen L, Park SY, Gleixner J, Klein ME, Lu D, Barter JW, Rossi MA, Augustine GJ, Yin HH, Hochgeschwender U. Luminopsins integrate opto- and chemogenetics by using physical and biological light sources for opsin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(3): E358–E367.
- 40 Barish PA, Xu Y, Li J, Sun J, Jarajapu YP, Ogle WO. Design and functional evaluation of an optically active mu-opioid receptor. *Eur J Pharmacol* 2013; 705(1–3): 42–48.
- 41 Siuda ER, Copits BA, Schmidt MJ, Baird MA, Al-Hasani R, Planer WJ, Funderburk SC, McCall JG, Gereau RW 4th, Bruchas MR. Spatiotemporal control of opioid signaling and behavior. *Neuron* 2015; 86(4): 923–935.
- 42 Park SI, Brenner DS, Shin G, Morgan CD, Copits BA, Chung HU, Pullen MY, Noh KN, Davidson S, Oh SJ, Yoon J, Jang KI, Samineni VK, Norman M, Grajales-Reyes JG, Vogt SK, Sundaram SS, Wilson KM, Ha JS, Xu R, Pan T, Kim TI, Huang Y, Montana MC, Golden JP, Bruchas MR, Gereau RW 4th, Rogers JA. Soft, stretchable, fully implantable miniaturized optoelectronic systems for wireless optogenetics. *Nat Biotechnol* 2015; 33(12): 1280–1286.
- 43 Jeong JW, McCall JG, Shin G, Zhang Y, Al-Hasani R, Kim M, Li S, Sim JY, Jang KI, Shi Y, Hong DY, Liu Y, Schmitz GP, Xia L, He Z, Gamble P, Ray WZ, Huang Y, Bruchas MR, Rogers JA. Wireless optofluidic systems for programmable *in vivo* pharmacology and optogenetics. *Cell* 2015; 162(3): 662–674.