

光控基因技术研究进展

陆绮

韦恩州立大学医学院, 美国密歇根州底特律市 48201

摘要 光控基因技术指将一系列特定基因转进入神经细胞后,可用光的开关来控制神经元活动的技术。经过10余年的发展,光控基因技术成为一项成熟而稳定的生物常规技术。介绍了光控基因技术的历史、发展、其核心工具光敏蛋白的优点和光遗传学工具箱的开发及改进,综述了光控基因技术在神经科学从亚细胞层面到神经网络层面的实验应用,以及在治疗失明、镇痛、治疗心律失常、帕金森病及癌症等方面的临床应用。

关键词 光控基因技术;神经元;基因治疗

光对生物总有特殊意义,而生物基本进化出了对光的反应能力:有些是为了生长或觅食获取物质和能量,而有些是为了规避危险的辐射,还有些是获取外界信息。大自然间进化出了形形色色的感光受体形式,从而介导光照和细胞反应。光遗传学(optogenetics)是近10年来生物工程领域取得的一项巨大突破^[1]。Opto-的意思是光、光学,genetics一词原意为遗传学,所以一般翻译为光遗传学。实际上,optogenetics更确切的含义是光控基因工程技术。在下文中,光遗传学仅指光控神经细胞活动这一狭义概念。这一新兴技术是光学技术和基因工程技术的结合,即将光敏离子通道表达于生物细胞、特别是可兴奋的神经细胞上,给神经细胞活动装上开关。光遗传学的核心工具就是光敏蛋白。光敏蛋白使科学家能够以前所未有的精确选择性激活或者抑制特定神经元。将光敏蛋白表达在培养细胞或活体动物大脑的特定神经元上,可以进行神经网络的结构和功能的科学研究。在临床应用上,科学家和临床医生紧密合作,尝试将光遗传学工具改进为治疗失明、疼痛和精神疾患的新兴疗法。

1 控制神经细胞活动的方法

控制对科学研究具有特殊意义,一方面对一个复杂系统的控制程度,意味着对系统的了解和深入程度;另一方面,对系统有效地控制,可以在系统运行不正常时给予恰当的调整使其恢复正常。因此尝试对神经网络进行控制,一直是神经生物学家梦寐以求的事情。这不但有助于对大脑奥秘的探索,也对治疗神经系统疾病大有帮助。

以往激活神经细胞的实验方法主要是物理的电刺激和化学药物刺激。如图1(a)所示,在组织中插入电极可以介入神经细胞的电活动,这种方法可以有很好的时效性,但是电极材料进入组织,会带来一些伤害。如图1(b)所示,化学方法控制神经细胞活动是因为大部分神经细胞相互交流信息是通过释放神经递质的小包裹——神经囊泡。神经囊泡里有神经递质,神经递质有生物小分子,例如谷氨酸(味精的成分);也有大一点的蛋白小肽段,例如神经肽;还有激素和生长因子。如果把这些生物分子直接释放到神经细胞上,就可以

收稿日期:2017-12-01;修回日期:2018-02-13

作者简介:陆绮,副研究员,研究方向为光控基因技术,电子信箱:qlu@med.wayne.edu

引用格式:陆绮.光控基因技术研究进展[J].科技导报,2018,36(5):39-52;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2018.05.005

控制目标细胞的活动。但化学刺激方法同样会因插入给药管造成侵入伤害,且时效性和空间定位也不好把握。结合了光学技术和基因工程技术的光遗传学技术采用的是插入非常纤细的玻璃光纤,能减少侵入刺激的伤害,且获得非常好的时间和空间精确性。采用不同的光遗传学工具,可以达到不同的结果,如图1(c)和(d)所示,选用图1(c)所示的ChR2(channelrhodopsin)可以用蓝光提高细胞兴奋性,选用图1(d)所示的NpHR(halorhodopsin)可以用施加黄光降低细胞的兴奋性。深层脑刺激还有颅磁刺激(cervical magnetic stimulation),但是颅磁刺激的原理还不明确,虽然在非侵入性和非基因疗法上颅磁刺激有它的优势,但是也有引发癫痫等潜在风险因素,其目标专一性弱于光遗传学刺激。

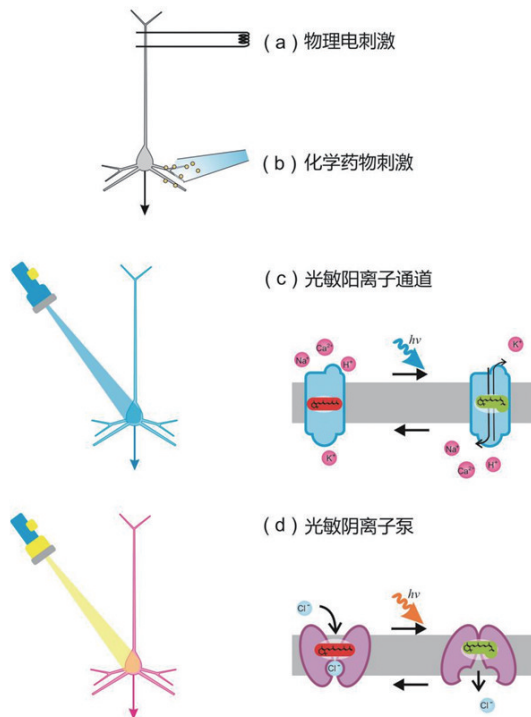


图1 影响神经细胞活动的不同方法

Fig. 1 Different methods of influencing the activity of nerve cells

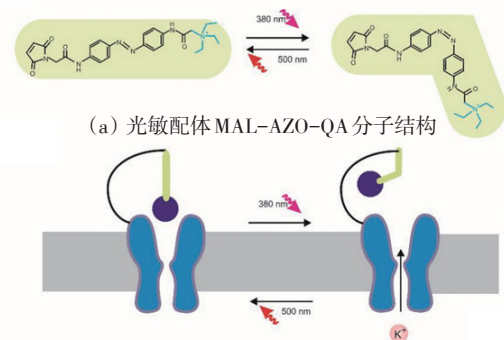
2 光遗传学简史

奥地利神经科学家 Miesenböck 最早开展了现在被称为光遗传学工作^[2-5]。他是第一个把异源的感光蛋白表达在神经肌肉细胞上,并用光控制神经细胞的电活动的科学家。2002年, Miesenböck 实验室的 Zemelman 将果蝇的视紫红质(rhodopsin)和 arrestin-2 以及 G 蛋白

的 alpha 亚基一同表达在神经元上,发现可以用光成功地激活神经细胞。

2005年, Miesenböck 实验室的 Lima 将本不在神经细胞中表达的腺苷酸(ATP)受体 P2X2 通道的 DNA 放入果蝇神经细胞,然后又注射入光敏笼闭 ATP(caged-ATP)^[6]。Caged-ATP 可被光照射后释放出 ATP, 激活 P2X2 受体通道,使果蝇的神经通路中的细胞变为对光敏感。然后 Miesenböck 将这种果蝇的头砍去,当把光照射在果蝇身上时,果蝇的翅膀竟然会产生被光控制的运动,就像头部还存在一样。Miesenböck 的实验第一次证明了这些动物的行为可被远程、不直接接触细胞的方式控制。这就是光遗传学最基本的理念,使用光控制神经细胞的活动。但是 Miesenböck 的实验设计并不能在神经生物学上广泛应用,原因是:1) P2X2 受体很可能是很多神经细胞内源表达的受体;2) 笼闭 ATP 的给药方式如同化学刺激一样,并不是很方便;3) 需要在同一个细胞中转染入多个组分;4) 实际上 Miesenböck 选用的光敏元件动力学(temporal resolution)相当慢,无法形成及时有效的控制。这些都限制了其应用。

与此同时,美国科学家 Kramer 构建了经过基因改造的光敏钾离子通道(图2),开始尝试光控神经细胞活动的基因工程技术,在2004年成功地在体外培养的海马皮层神经元上达到了光控制神经细胞活动的效果^[7]。实验设计是基于钾通道 Shaker,将膜外结构域的一个氨基酸 Glu422 点突变为 Cys, Cys 的硫键可以自发共价结合酰胺结构。此外,又构建了一个 MAQ(MAL-AZO-QA)光敏分子(图2(a)): MAL 是酰胺结构(maleimide), AZO 是叠氮苯(azobenzene)吸收光子可发生光学异构化, QA 是钾通道的阻断剂。当把钾通道表达



(a) 光敏配体 MAL-AZO-QA 分子结构

(b) 钾通道 Shaker 结构示意图

图2 光敏钾离子通道示意

Fig. 2 Schematic diagram of photosensitive potassium channel

在细胞膜上之后,在细胞外溶液中添加 MAQ 光敏分子,光敏分子共价结合在 Cys422 位点。当给与短波长 380 nm 光刺激时,叠氮苯区域 AZO 弯折,QA 离开钾通道,通道打开细胞膜电位变负;当给与长波长 500 nm 光刺激时,叠氮苯区域 AZO 变直,QA 阻断钾通道,细胞兴奋(图 2(b))。

光遗传学的重大突破发生在 2002—2003 年,德国科学家 Miesenböck 与合作者 Georg 连续发表了 2 篇微生物中的单个光敏离子通道(channelrhodopsin)ChR1(氢离子泵)^[8]和 ChR2(阳离子通道)^[9]。Miesenböck 和 Georg 是同事,Miesenböck 专门研究微生物感光蛋白,Georg 专攻电生理,当时 Miesenböck 的研究并不受重视,当 Georg 了解到他的研究并表达在爪蟾的卵母细胞并记录到电流后,Miesenböck 的工作才受到很多人的了解。

ChR1 和 ChR2 是光敏离子通道的报道使当时几个非常有想象力的神经生物学家精神为之一振,他们意识到 ChR2 很可能就是最合适的光控技术的效应分子。例如钱永健就进行过实验,并参与了对 ChR 的一系列改进工作^[10]。

在生物科学和临床应用上应用 ChR2 另一个重要条件是 ChR 必须能够表达于哺乳动物细胞上。世界各地有 4 个实验室同时在第一时间开始尝试异位表达于哺乳动物细胞,包括美国斯坦福大学的 Deisseroth 实验室^[11],美国 Case Western Reserve University 的 Landmesser 和 Herlitze 实验室^[12],日本的 Hiromu Yawo 实验室^[13],以及美国韦恩州立大学的潘卓华实验室^[14]。

在 10 年后光遗传学进展如此迅猛的今天,回头看看当时,其实 ChR2 的最先出现非常幸运、也非常巧合。与其他后来发现的光敏蛋白相比,ChR2 有很多优点,如可以顺利地在哺乳动物细胞中表达、上膜容易、不易形成细胞内聚集(aggregation)、几乎没有细胞毒性等。如果最先报道出来的是别的光敏蛋白,很可能光遗传学领域起步的时间会更迟。即使从今天这么多可以备选的光敏蛋白工具箱中比较,ChR2 依然是综合条件最好的一个,而大多数的野生型光敏蛋白基本都有一些表达上的问题。

3 光敏蛋白的优点

直到 ChR2 系列被报道之后,光控基因技术才得以

突飞猛进发展,这是因为以 ChR2 为代表的光敏蛋白有以下优点。

3.1 光敏离子通道的特点

ChR2 之所以是控制动物细胞活动的上佳候选工具,主要有 2 个特点:1) 普适性。ChR2 所使用的是全反式视黄醛(all-trans retinal),全反式视黄醛在动物组织里到处都有,但是动物自身的感光蛋白视紫红质所需要使用的是 11-顺式视黄醛(11-cis retinal),这就需要不断补充。2) 可逆性。ChR2 蛋白不是一次性的,ChR2 表达在细胞膜上以后就可以相对稳定地工作。而视紫红质的功能是一次性的,接受过一次光子后,其构象发生了变化,不能再用了,必须被视网膜色素上皮细胞吞噬视紫红质及其所在的膜结构,进行再生循环;视紫红质安装上 11-顺式视黄醛之后,再重新回到感光细胞上行使功能。因此 ChR2 像一个节能环保的可重复利用装置,而视紫红质是个一次性装置,对于表达在其他细胞上的用途而言,ChR2 可行性明显要高得多。实际上,微生物来源的光敏离子通道都和 ChR2 一样有这些优点。

3.2 光遗传学的优点

综合地看光遗传学有以下优点:1) 精确时间。相比于化学刺激,光遗传学方法将给光的开关打开就可以激活细胞,将给光的开关关闭就结束激活细胞。时间很精确,方便施加高频率的刺激,以及尝试不同频率刺激的效果。2) 精确地点。光敏蛋白是通过遗传物质 DNA 编码的,因此它可以根据科学家的需要连接上不同的启动序列和定位信号肽,选择性表达任何类型的细胞,或者细胞亚区。3) 精确细胞亚型。即使在同一块组织中,比如大脑皮层,也同时有很多种类型的神经细胞,例如同时有兴奋性细胞和抑制性细胞。用传统电刺激的方法,可能会同时刺激 2 种不同功能的细胞,就好比油门刹车一起踩,而脑区真正的功能却难以研究透彻。而利用光遗传学的方法,可以限定如仅仅在兴奋性的细胞中表达光敏蛋白,这样给光的时候,只会激活兴奋性细胞。通过这种方法,可以更加准确地进行生物学研究。4) 干扰作用小。传统的改变细胞活动的方式对生理状态的干扰比较大。传统的电刺激方法和化学刺激方法,需要把电极或者给药管插入神经组织,这些异物的侵入会导致对自然生理状态的变化,如电极和给药管周围可能会有胶质细胞聚集等炎症反应。

4 光遗传学工具箱的开发及改进

4.1 光遗传学工具箱的开发

光信号协调着动植物生理活动的方方面面。例如对于植物来说,从发芽到拔茎、开枝散叶、开花结果等类生理行为和基因表达的节奏均受光照的调控。在细胞内部,光子可激活DNA修复酶对损伤的DNA进行修复,也可以促进含色素的细胞器在胞内空间的重新分布。光信号还为微生物和动物的运动提供了视觉信息。这一切之所以成为可能,是因为细胞含有多种类型的光感受器,光敏蛋白家族(图3)有不同的结构、发色集团、进化起源、光谱范围、动力学、生物物理机制、亚细胞定位和生理作用^[15]。而这些自然起源中就拥有不同功能的光感受器,可以进一步通过基因工程的方法,将它们异位表达在别的细胞或别的生物体内,广泛应用于生物科学的研究和临床应用。甚至将这个思路继续拓展,理论上可以通过基因工程改造,有可能将所有原本不受光子激活的蛋白均改造为光敏蛋白,致使该蛋白参与的生化活动受光的控制。

2002年在眼虫 *Euglena gracilis* 的鞭毛基部发现的光敏腺苷酸环化酶(Adenyl cyclases)(图3(f))^[16]就是一个有趣的例子。眼虫 *Euglena gracilis* 是一种单细胞鞭毛虫,在入射的蓝色光强度突然增大或减小后鞭毛

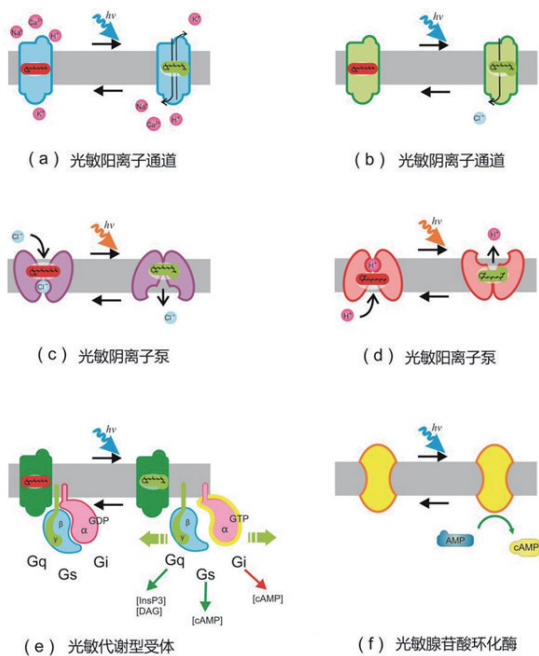


图3 光敏蛋白家族成员示例

Fig. 3 Member examples of the photosensitive protein family

的运动发生变化,从而突然改变游泳的方向。Iseki Mineo等^[16]发现这是由于鞭毛的基部表达一种类似核黄素色素蛋白,这种蛋白接受蓝色光子之后构象改变,导致自身腺苷酸环化酶的活性发生变化,改变细胞内腺苷-3', 5'-环化一磷酸(cAMP)的浓度。由于鞭毛的活动依赖于cAMP,最后鞭毛运动方式的改变使眼虫产生了对蓝光光强突然增强的回避反射行为。

利用这个思路,2006年Isacoff和Trauner实验室合作,成功构建了光敏谷氨酸离子通道(LiGluR)^[17]。他们的实验方案是将离子型谷氨酸受体(iGluR)和激活它的小分子配体通过一个偶氮苯的分子链接共价连在一起。当给光的时候,偶氮苯分子发生光学异构弯折,小分子配体与离子谷氨酸受体结合,激活受体通道。这里光敏感的部位就是这个偶氮苯分子链。

Tucker实验室^[18]在2010年发表了光控制的蛋白相互作用的工作。如果能用光控制蛋白相互作用当然会是很强大的生物技术工具。该实验室选取了拟南芥的隐花色素(cryptochrome 2, CRY2)和CIB1蛋白,当被蓝紫光激活后,CRY2与CIB1结合。实验的设计方案,是将其他蛋白分别和CRY2与CIB1连接,当给光以后,CRY2与CIB1的结合导致被连接的蛋白距离拉近,从而引发蛋白蛋白相互作用。在进一步实验中,他们将CRY2和CIB1分别与转录因子的不同亚基相连接,然后给光就可以启动基因表达。实际上,动物体内控制昼夜节律的CRY2蛋白本身就是一个内源性光控基因转录因子^[19]。

早在2002年,Quail实验室的Shimizu-Sato Sae就报道了他们构建的光控基因表达系统^[20]。他们使用的是植物中的光敏色素phytochrome及其结合蛋白PIF3。他们分别和转录因子的DNA结合域和激活域构成融合蛋白,当给予红光刺激的时候,光敏色素phytochrome和PIF3结合,转录因子激活域被带到DNA序列附近,启动基因表达。而且他们设计的这个光控基因表达过程是可逆的,当给与红外光刺激的时候,光敏色素phytochrome和PIF3分离,基因的转录就暂停了。

与Miesenböck基本同时开始探索光控神经技术的Kramer在光控钾通道的基础上再接再厉,研制了AAQ^[21]和DENAQ^[22]2种光敏小分子。AAQ、DENAQ和2004年的最早期的MAQ的感光部分一样均为1个叠氮苯结构。它们与MAQ所不同的是,只需要在细胞外部给予光敏小分子,而不需要使用转基因的方法在细胞

上表达特定突变的外源钾通道。Kramer 声称, 化学光 DENAQ 可使视网膜光反应恢复到普通日光强度下, 而且只对视网膜感光细胞死亡的眼睛有效果, 并声称对晚期视网膜色素变性和晚期黄斑病变的病人有治疗效果^[22]。

4.2 光遗传学工具箱的改进

实际上, 如果将光敏蛋白应用于科学研究或临床应用, 目前仍有很多不足和值得改进的地方^[23], 因此许多实验室从多个角度对光遗传学进行改进。

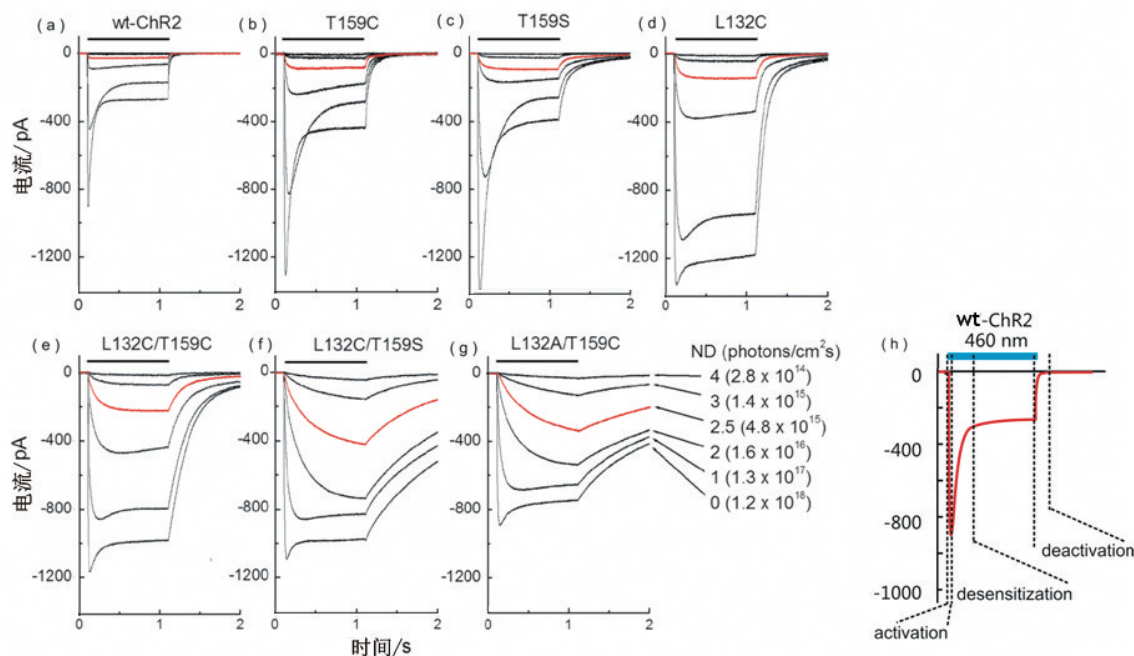
4.2.1 光敏蛋白的改进

2005年, 生成的 ChR2 其实使用起来并不是十分理想^[24], 还有很大的改进空间。比如光敏阈值、表达剂量和光谱限制等。在 ChR2 被成功表达在神经细胞上并成为光遗传学的工具之后, 接下来有许多嵌合重组 (chimeragenesis)、突变 (mutagenesis) 和生物信息学分析的工作不断开展, 尝试解决这些问题。

1) 单通道电导及动力学改进。ChR2 的单通道电导的估计是低于 1 pS^[9,25-26], 这个值是小于普通膜离子通道的电导。而单通道电导直接决定光诱导去极化的阈值和成功率。因此对 ChR2 动力学的改进有 2 个方

向, 第 1 个方向是在 ChR2 的原基因序列上引入突变, 试图增加单通道的电导^[27]。由图 4 可以看出, 影响 ChR2 电流强度最大的因素是脱敏 (desensitization) 的过程。在脱敏过程中, 电流值下降了约 80%。而 ChR2 的各个已被报道的有效突变中, 在减少脱敏过程的同时, 依然无法避免的是失活过程也随之变慢。这说明目前对 ChR2 的突变体都是延长了通道开放的时间, 从而增加总电流, 但是代价是动力学变慢, 即对光刺激的亮灭相应速度变慢。达到这方面改善的有 ChRH134R^[28]、ChRGR^[29]、ChIEF^[26]、ChRT159C^[30]、CatCh (L132C)^[31]、L132CT159C^[27] 及 L132CT159S^[27]。对 ChR2 动力学的改进的第 2 个方向恰好相反, 是侧重于加快动力学过程, 包括加快激活和失活的速度。这对神经生物学研究尤其重要, 特别是希望能够精细编码神经活动的研究^[10,32]。

2) 离子选择性。所有 ChRs 都是非选择性阳离子通道, H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 在生理 pH 值时都可通过 ChRs, 所有 ChRs 的翻转电位接近 0 mV^[8,9,33-35]。因此有许多设计想改变 ChRs 的离子选择性, 例如 CaTCh 对 Ca^{2+} 的通透性选择性加大。CaTCh 对 Ca^{2+} 的通透性并未达到选择性的程度, 如果能构建选择性对 Ca^{2+} 通透的光敏蛋白



图(a)~(g):膜电位钳制在静息电位值 -60 mV, 光波长为 460 nm, 时长为 1 s。光增强幅度 ND(Neutral density)值分别为 $4, 3, 2.5, 2, 1$ 和 0 。红色迹线是由 ND 值为 2.5 。括号中的值为光强的绝对强度。(h)以野生型 ChR2(wt-ChR2)为例, 从给光到峰值的这段过程称为激活(activation)。在给光时间内从峰值降低到平台值(plateau)称为脱敏(densitization)。在给光结束后从平台值降为零电流的时间称为失活(deactivation)。本图修改自于 Pan 等^[27]

图 4 在 HEK 细胞上记录的 ChR2 各个突变体介导的电流

Fig. 4 Current of various ChR2 mutants recorded on HEK cells

通道,将会非常有用,因为 Ca^{2+} 本身就是一个细胞信号信使,参与很多细胞生化过程。还有将 VChR1 与 ChR2 融合蛋白 CIV1 突变为对 Cl^- 通透的阴离子通道,例如 ChloC^[36] 和 iCIV1^[37]。只不过这 2 个结构的通道电流还相当小,达不到 NpHR 的程度。

3) 光谱敏感性。野生型 ChR2 对波长为 460~470 nm 的蓝光最为敏感。但是波谱范围很窄,在波长长一些短一些情况下,ChR2 的光敏感度直线下降。因此,有一部分人的思路是改造 ChR(channelrodopsin),使其对更长波长的光起反应,例如 ChRGR^[29],但是 ChRGR 不是特别有效。还有一部分人的思路是将 ChR2 和来自于 *Volvox carteri* 的 VChR1 形成嵌合体融合蛋白,一部分来自于 ChR2,另一部分来自于 VchR1。因为 VChR1 本身对波长为 535 nm 的光最为敏感^[34]。这类融合蛋白有 CIV1s^[38]、ReaChR^[10] 和 mVChR1^[39]。CIV1s^[38] 波长响应范围为 530 nm 左右,ReaChR 的波长响应范围据称为 590~630 nm,但是由于试验检测的顺序因素,实际上 ReaChR 的峰值也为 530 nm。mVChR1^[39] 的波长响应范围为 468~640 nm。

4) 生物信息学对基因组分析。另外一条改进光遗传学工具箱的方法就是在大自然中寻找。2013 年,John L. Spudich 实验室的 Govorunova 等^[40] 在 *platyomonas subcordiformis* 中筛选到了 PsChR。PsChR 的单通道电导就要高于 ChR2,因此是个很有潜力的光遗传学工具。2014 年,Klapoetke 等^[41] 从 *Chlamydomonas noctigama* 中筛选出了 Chrimson。Chuong 等^[32] 也筛选出了一系列工具光敏蛋白。2015 年,John L. Spudich 实验室的

Govorunova 等^[42] 在蓝藻 (*cryptophyte algae*) 中发现了阴离子通道 GtACR。

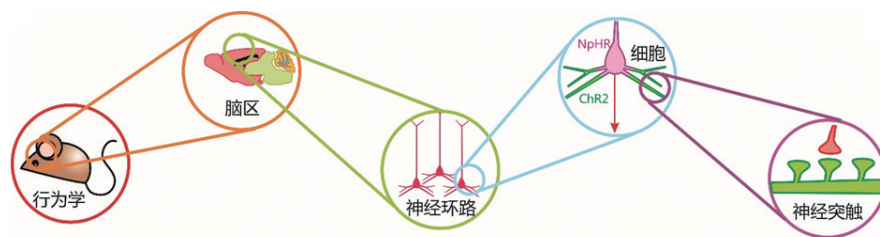
4.2.2 病毒载体的改进

基因传递到细胞内的方法对光遗传学的成功也至关重要。腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 载体被认为是最有前途的一种。AAV 有很多的优点,例如非致病性、非免疫原性、不裂解细胞等等。而且 AAV 感染的速度非常快,体外细胞转染后第 3 天即可观察到转基因的表达。AAV 载体家族有很多种,对不同的细胞和组织可选用特定的最佳载体^[43]。美国食品药品监督管理局批准的基因疗法所使用的病毒载体即 AAV。Hauswirth 实验室对 AAV 外壳的衣壳蛋白进行了系统的研究^[44-45]。针对不同的 AAV 血清,在衣壳蛋白的突变可显著提高转导效率^[46]。将 AAV 载体进行自定向进化筛选后的血清型突变体可显著提高基因治疗的效率^[47]。目前,AAV 已经成功将光敏感蛋白 ChR2 表达在视网膜的神经节细胞和双极细胞上^[48-50]。到目前为止,在视网膜上表达效果最好的是血清型突变 7m8。

5 光遗传学应用

5.1 神经生物学研究

光遗传学目前已在神经生物学研究中从整体到局部各个层面上获得应用(图 5)。由于光遗传学在时间和空间上的精确性及一定的非侵入性,使得光遗传学在深入研究复杂行为背后的神经机制有得天独厚的优势。以下为光遗传学在神经科学研究上应用的经典例子。



从左至右依次为整体动物的行为学实验、脑区间信息传输的神经环路实验、皮层内部神经环路实验、亚细胞分区表达不同类型的光敏蛋白实验及神经突触信号传递和突触成像实验

图 5 光遗传学可应用于神经生物学研究的从整体到局部各个层面示意

Fig. 5 Diagram of photogenetics that can be applied to neurobiological research from the whole to the local level

5.1.1 整体行为学范例:睡眠、清醒行为

光遗传学研究睡眠周期的工作集中在位于下丘脑后部的下泌素神经元(hypocretin neuron)和脑干区的去甲肾上腺素的蓝斑核神经元(locus coeruleus,

LC)^[51]。下泌素神经元对睡眠的稳定特别重要,下泌素分泌紊乱会导致不规则地突然进入睡眠的发作性嗜睡病。2007 年,Karl Deisseroth 实验室的 Adamantidis 等^[51] 将光敏蛋白 ChR2 表达在下泌素神经元上,并将

光纤固定埋植入小鼠的头部。通过不同的给光刺激方式,直接地、专一地光刺激下丘泌素神经元,可从任一慢波睡眠(NREM)和快速眼动睡眠(REM)转换为觉醒状态。值得注意的是,利用5~30 Hz的光脉冲串延迟到清醒状态的时间,而1 Hz的光脉冲串则没有。这项研究确定了一个遗传背景明确的行为功能实验,并发现了神经细胞的活动是频率依赖性的,同时找到了发作性嗜睡病这一特定的临床病症和神经生理学之间的因果关系。

脑干区的分泌去甲肾上腺素的蓝斑核神经元也参与了睡眠-觉醒过程。2010年,Karl Deisseroth实验室的Carter等^[52]继续利用光遗传学方法将ChR2表达在蓝斑核神经元上,观察蓝斑核神经元在睡眠觉醒行为中的作用。在去甲肾上腺素能蓝斑核神经活动与觉醒和觉醒周期相关。研究发现蓝斑核神经元发放神经冲动在皮层活动、睡眠到苏醒的过渡和一般状态的觉醒也具有频率依赖性;还发现,蓝斑持续稳定地在5 Hz及更高频率发放引起可逆的行为抑制。这些结果表明,蓝斑在调节生物体觉醒功能中起到的是一个微调的作用,研究发现去甲肾上腺素能的过量发放将导致类似于患有精神障碍病患的攻击行为。

睡眠的节律研究是一个方面,由于人们发现很多精神疾病的恶化都伴随着睡眠的紊乱,那么睡眠对于维持正常的大脑认知活动的作用又是什么?2011年,Rolls运用光遗传学方法选取了睡眠和记忆能力的关系做了一个有趣的尝试^[53]。因为记忆巩固被认为是在睡眠状态下进行的功能,而睡眠有几个特定的参数包括持续时间、强度和连续性。睡眠连续性的破坏伴有记忆无法正常巩固保存。这一发现已提出了睡眠的连续性是否是用于记忆巩固的重要问题。他们把光敏蛋白ChR2表达在下丘泌素神经元上,在不同的时间间隔激活这些神经元使小鼠进入启动觉醒的状态,同时控制不影响睡眠总时间和强度的前提下进行分段睡眠。他们发现支离破碎的睡眠显著影响了小鼠记忆巩固的能力,但如果睡眠的平均持续时间维持在正常的62%~73%的范围内则没有影响。这一实验成功地利用光遗传学的方法系统地操纵了睡眠行为,结论是睡眠的强度和总长度并不是最重要的,不间断睡眠的最小单位才是记忆巩固的关键。

5.1.2 皮层脑区层面范例:癫痫症研究

皮质癫痫是在大脑皮层周期性发作的兴奋异常。

皮质癫痫可由病变引起,例如肿瘤或血管畸形;或因外伤或感染伤害到大脑;或在出生前大脑发育异常。在这种条件下,神经元形态或结构的变化,使该区域更容易兴奋,更容易产生惊厥。皮质癫痫没有有效的药物治疗,手术切除致痫灶只在少数情况下是成功的,许多患者没有有效的治疗方法。2012年Wykes等使用由破伤风毒素在运动皮层注射感染的方法诱导出癫痫的小鼠动物模型。同时他们把halorhodopsin通过慢病毒转染入靶向癫痫病灶的神经元;halorhodopsin是一个光敏离子泵,施加黄光可使神经元超极化而活动受到抑制。实验结果显示,癫痫发作时,给予黄光足以抑制和衰减癫痫发作。这一实验给予治疗皮质癫痫提供了新的临床治疗思路,也对研究癫痫病症本身有帮助。

5.1.3 神经环路层面范例:参与记忆功能的神经环路

谈及光遗传学在经典神经生物学问题上的精彩应用,就必须谈到刘旭在麻省理工学院利根川实验室的对记忆机制的研究工作。刘旭本科毕业于复旦大学生命科学学院,博士后期间的工作2014年被评为全球十大科技突破,也获得了当年美国史密森尼创造力大奖(Smithsonian American Ingenuity Award)。然而令人痛惜的是,2015年2月8日,刘旭在芝加哥的寓所高血压突发脑溢血去世。刘旭的博士后导师、诺贝尔奖获得者利根川进在他追悼会上说:“刘旭是标记和操纵记忆领域研究的第一人,他的贡献会永远留在人类的集体记忆中。”

记忆一直是神经科学家最神往的研究领域,同时也是最虚无缥缈的:动物的记忆不是纪录在某些特定的神经元中,而是纪录在大群神经元的连接组合(环路)中。而且很多件事可以记在一大群神经元之间不同的环路上。因此想用光学遗传学标记与某项记忆有关的神经元,再用光学刺激使它们兴奋以达到该项记忆的回放,看来是不可能的。而刘旭的贡献恰恰就是完成了这个“不可能任务”。

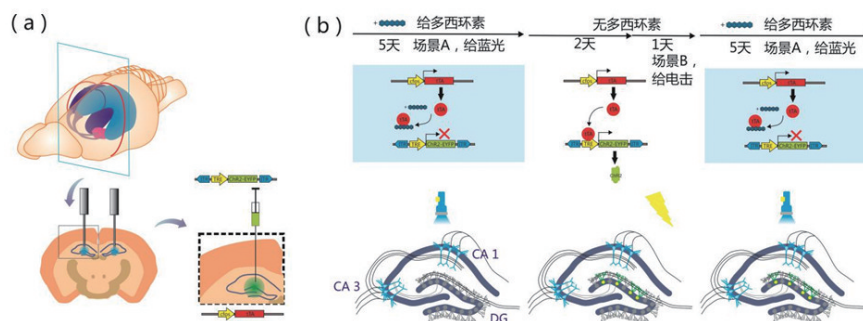
近50年来,记忆的一个研究重点是小鼠脑中一个叫“海马”的结构。当动物处在不同的空间位置(场景)、经历不同的事件时,海马中的大批神经细胞就不断地活动,用这些神经活动代表目前的经历,并利用这些神经元的顺序活动把事件和当前位置联系起来形成记忆,例如某位置有食物,某位置有危险等。而当动物回想起经历过的情景时,海马中的那些神经细胞就会有同样的活动,使老鼠再次有身历其境的感觉。人类的“情景记忆”(episodic memory),例如想起上周末下午

的事情,也是通过类似的神经过程完成。刘旭等^[54]做的第1部分工作是用光遗传学的方法将记忆环路标记出来,并证明用光刺激可以激活某一特定记忆,并人为控制小鼠的回想(memory recall以往已经形成的记忆的重新激活)。

刘旭等的实验的设计得非常巧妙,其关键是在一大群海马神经元中,只让与某一记忆相关的神经细胞表达ChR2,这样当光照时在一大群神经元中时,只有与这个记忆有关的神经细胞才被激活,达到回放特异记忆的目的。刘旭等先通过训练使老鼠形成“条件化恐惧”(fear conditioning),即让无害的刺激(如声音)和电击同时出现,重复多次后小鼠就形成了“声音出现之后就会有电击”这样一个记忆,并在下次声音出现时回忆起电击的恐惧记忆,在行为上产生了恐惧的反应:肢体僵硬(freezing)。

在老鼠的海马中,怎样让把声音与电击联系起来的神活动标记上ChR2呢?刘旭等知道当神经元活动时,会表达一个叫*c-fos*的基因。利用这个线索,他们做了一个转基因老鼠,在*c-fos*基因上插入了一个叫tTA的“转录激活因子”。在训练这些转基因老鼠前,在它们的海马中注入了特制的、搭载ChR2的病毒。这些特制病毒在神经细胞中平时并不能制造ChR2,只有在同时存在tTA时才能被激活、大量制造ChR2。这样,在对这些转基因老鼠进行条件恐惧训练时,海马中代表条件恐惧记忆的神经元就会活动,以此启动*c-fos*基因。而*c-fos*基因的启动又引发tTA的合成,合成出的tTA就让细胞中的病毒大量生产ChR2。这些ChR2就会让这些神经元对光敏感,在蓝光照射下被激活。如此,刘旭他们造出了一个人工的链式反应,即神经活动→*c-fos*→tTA→ChR2→光敏感。而这个链式反应只发生在

受训练时因产生记忆而活跃的神经元上,而不活跃的神经元则没有*c-fos*开启也就不会变得对光敏感。有了这个链式反应,他们在受过训练的小鼠海马中埋设了光纤,当用光纤导入蓝光时小鼠就会回忆起条件恐惧的记忆,出现肢体僵硬的行为。图6为修改自刘旭等在《Nature》上的原文,讲述这个实验。为了确证,他们加了“多西环素”这个反向对照的环节,从正反两方面证明光照引发的僵硬反应与基因表达有关。图6右图为海马皮层脑区的局部放大,以及显示将AAV9-TRE-ChR2-EYFP病毒载体注射到*c-fos*-tTA转基因小鼠的海马齿状回(dentate gyrus, DG)脑区。如上所述,*c-fos*-tTA转基因小鼠表达tTA这一转录激活因子,tTA的表达依赖于*c-fos*基因激活的条件。当新的学习过程可以激活*c-fos*基因时,tTA蛋白也同时表达。在多西环素存在的情况下,多西环素与tTA蛋白结合,不会引起病毒合成ChR2。而当没有多西环素的情况下,新表达的tTA可以让AAV9-TRE-ChR2-EYFP病毒合成光敏蛋白ChR2。小鼠在场景A中进行5天的适应性训练,同时用光纤给予蓝光刺激,这5天也给予多西环素。在多西环素存在的条件下,光敏蛋白ChR2不表达。然后不继续喂食多西环素2天,在场景B的条件下同时给予电击。此时参与了恐惧记忆形成的细胞(标记为黄色)内有tTA的表达,自由的tTA进一步引发光敏蛋白ChR2的表达。由于ChR2是和绿色荧光蛋白EYFP形成融合蛋白为绿色,图6中用绿色轮廓标记表示有ChR2蛋白表达的细胞。然后接下来5天把小鼠放回场景A和有西环素存在的条件下进行5天的测试,同时给予蓝光。蓝光可以激活与恐惧记忆相关的细胞,因此在无害的场景下,小鼠依然表现出肢体僵直的恐惧反应,说明小鼠的恐惧记忆被激活回放了。



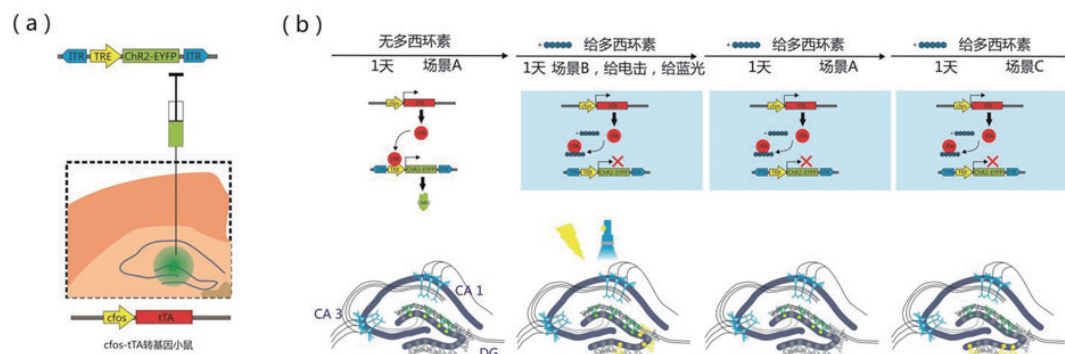
(a)左上为小鼠大脑示意,其中参与记忆形成和回放的海马标记为蓝色,其他脑结构如新皮层、小脑和脑干标记为肉红色。左下为小鼠大脑的冠状切面,以及光纤埋植位点。(b)基本实验方案示意

图6 恐惧记忆回放实验基本方案示意

Fig. 6 Basic schematic diagram of the fear memory replay experiment

Steve Ramirez 和刘旭再接再厉,在 2013 年又做出了将不存在的记忆强行植入小鼠的记忆环路的实验(图 7)。他们先让在无害场景 A 中激活的神经元表达光敏蛋白 ChR2。然后在另一个场景 B 中给予电击,同时用蓝光激活与场景 A 有关的记忆神经元,即表达了光敏蛋白 ChR2 的那一群细胞。这时,虽然电击本身并没有激活这一群与场景 A 关联的记忆细胞环路,但是由于电击的同时给予蓝光的人工激活,场景 A 的记忆细胞就和电击这一恐惧形成了记忆联系。之后当把小鼠放回场景 A 中,虽然场景 A 本身是一个无害环境,小鼠依然表现出肢体僵直的恐惧反应。说明小鼠已经在人工干预的情况下,形成了错误的扭曲的记忆,达到了操纵记忆的实验目的。*c-fos*-tTA 转基因小鼠表达 tTA 这一转录激活因子, tTA 的表达依赖于 *c-fos* 基因激活的条件。当新的学习过程可以激活 *c-fos* 基因时, tTA 蛋白也同时表达。在多西环素存在的情况下,多西环素与 tTA 蛋白结合。当没有多西环素的情况下,新表达的 tTA 可以在

感染有 AAV9-TRE-ChR2-EYFP 病毒载体的细胞中启动光敏蛋白 ChR2 的表达。手术后的鼠放入场景 A 中,同时不提供多西环素。允许小鼠自由探索场景 A。在这个实验条件下,参与记忆场景 A 的 DG 或 CA1 细胞兴奋,在图中以黄色表示空间记忆导致的细胞兴奋。同样的这些细胞中 tTA 转录因子表达,并进一步使这些细胞标记上光敏蛋白 ChR2。第 2 天小鼠被放入场景 B 中,场景 B 中同时给予电击伤害性刺激,小鼠产生肢体僵直的恐惧反应。被场景 B 和电击恐惧性刺激激活的细胞标记为黄色。同时给予蓝光,蓝光激活表达有光敏蛋白 ChR2 的细胞,被蓝光激活的细胞标记为绿色。黄色细胞和绿色细胞同时兴奋,但是只有黄色细胞是由于真实的刺激,绿色细胞是“人工刺激”。然后下一天又把小鼠置于场景 A 中,这时候小鼠对安全的环境场景 A 也产生了肢体僵直的恐惧反应,因此这是一个扭曲的、不真实的记忆。之后又把小鼠置于场景 C 中,小鼠的反应正常,没有恐惧反应。



(a) 小鼠海马脑区示意。其中参与记忆编码和重读取的海马皮层标记为蓝色。大脑新皮层、小脑和脑干标记为肉红色。海马皮层脑区的局部放大,以及显示将 AAV9-TRE-ChR2-EYFP 病毒载体注射到 *c-fos*-tTA 转基因小鼠的海马齿状回(DG)脑区。(b) 浅蓝色阴影表示在相应的阶段,在饮食中存在多西环素。黄色闪电符号表示足部电击,蓝色手电筒表示光纤给蓝光。绿色轮廓代表神经元编码被标记的 ChR2-EYFP。黄色细胞代表自然激活的神经细胞。被蓝光激活的细胞标记为绿色。灰色细胞代表未被激活的神经细胞

图 7 建立虚假记忆基本实验方案示意

Fig. 7 Diagram of basic experimental scheme for the establishment of false memory

刘旭等的实验虽然并不是为了“植入记忆”这个科幻电影中的目的,但却在基础科研领域产生了重大影响。神经系统怎样把人生经历记住至今仍然是个谜,但刘旭等人的工作把破解这个谜推进了一步。这个工作也是光学遗传学帮助基础研究的一个成功例子。

5.2 临床应用

不但神经生物学家很兴奋,悬壶济世的医生也很

兴奋,因为光遗传学方法很可能给疾病的治疗方案提供全新的思路。目前快速发展的转化研究(translational research)就是将基础研究转化为临床应用的尝试。在 Pubmed 上搜索“optogenetics AND”就会发现光遗传学在以下几个领域有相当规模的应用,例如失明、痛觉、癫痫、心脏病、成瘾和脊髓损伤等。

由于技术本身的限制,目前光遗传学的临床应用

还比较有限。但是光遗传学在精神疾病的治疗方面依然有广阔的前景。毕竟光学遗传学提供了一个威力强大的开关,为今后控制癫痫、抑郁症、睡眠失调、精神分裂等精神疾病提供了一个干预的手段。这样的设想,对于饱受疾病折磨的人来说,简直是太美妙了。服用药物作用弥散,分布在整个身体,对无关的系统可能造成不必要的副作用;而在靶点位置的药物浓度却又可能太低而无效。同时,很多药物无法通过血脑屏障,有些精神类药物对心血管系统还有很大的副作用。药物的吸收依赖于健康的消化系统,而药物的代谢、排泄对肝脏、肾脏也是个很大的负担。对孕妇和哺乳期妇女而言,服用化学药物也是个巨大的问题。长期使用化学药物还有耐受性的问题,用药剂量不断上升,而药效却越来越差。而光遗传学的方法完全可以克服这些困难,达到理想的治疗效果。

虽然电极刺激和颅磁刺激也可以避免化学药物的缺点,但是这两种方法也有自己的问题。对电极刺激和经颅磁刺激而言,最大的问题是不能区分细胞的种类。而在每个特定脑区中,有兴奋性细胞也有抑制性细胞,电极刺激和颅磁刺激都只能同时刺激所有细胞,综合的效果不确定且未必理想。目前利用电极的深部脑刺激要求将电极尖端准确埋植入目标脑区内;电刺激的效果与电极尖到细胞距离平方成反比。这样实际上效果只出现在电极周围的一小范围内。电极尖经常被神经胶质细胞包裹,使刺激失效。以治疗帕金森的深部脑刺激为例,经常是刚开始效果奇佳,但几个月后就需不断增加刺激电流而效果不断下降。而光刺激可以避免这个缺点,因为光是可以透过相当厚度的组织的,使光遗传学疗法的侵入性损伤要小于电极刺激。光刺激相比于经颅磁刺激,虽然后者是无损性脑刺激,但磁刺激激活的脑区较广,而且会带来相当的热效应,并不能持续应用。

而光学遗传手段极大地避免了不精准和不持久的问题。通过前面的描述可以知道有很多手段使 ChR2 这类光敏蛋白表达在特定的神经元上,而用光照激活神经活动也可以精确定位在与疾病有关的脑结构上。这样通过精确遗传和精确光照,双重手段就能在特定的时间、地点干预特定的神经活动。这是其他治疗手段所没有的特殊优点。

5.2.1 光遗传学治疗失明

大约有 10% 的失明患者失明的原因是由于感光细

胞死亡,这类被称为视网膜色素变性病(Retinitis Pigmentosa, RP)。视网膜色素变性病是感光细胞视杆细胞退行性病变并先死亡,然后影响到感光视锥细胞的死亡,最后失明。相比起其他失明原因如白内障和角膜受损,感光细胞死亡的病例更难进行医疗干预和治疗,并已成为眼科疾病中的重大难题。

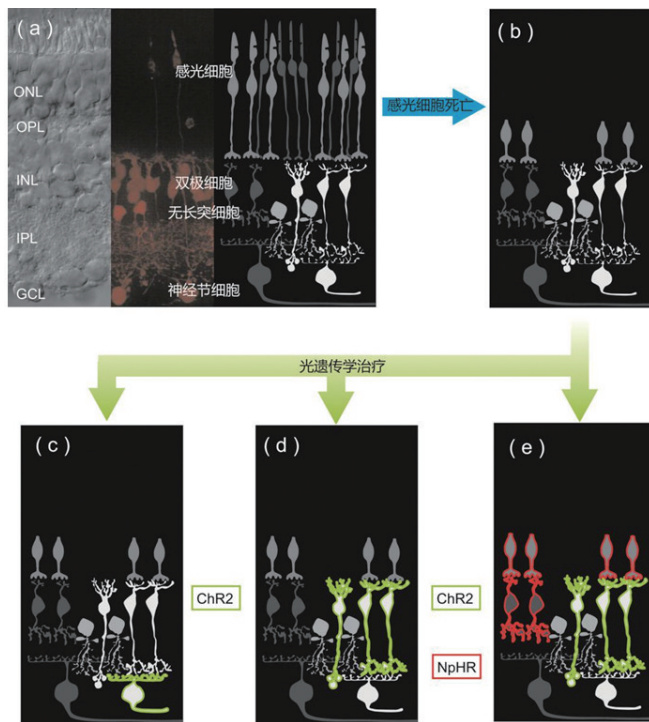
密歇根州韦恩州立大学医学院的潘卓华是第一批意识到光敏蛋白 ChR2 在生物学上有着广泛应用前景的科学家之一^[14,55]。但是主要治疗失明的方法是仿生学的仪器植入及干细胞疗法。当时潘卓华刚刚独立,他很想以治疗失明为主要研究方向。在 2003 年底当潘卓华阅读到 Nagel 发表的两篇光敏蛋白通道的文章^[8-9],他立刻知道,这就是他要找的东西,他的实验思路是将光敏蛋白表达在视网膜第二级和第三级神经元上,将本来没有感光功能的细胞转变为能被光所兴奋的细胞,从而治疗失明。2004 年初潘卓华就向彼得·海格曼实验室借了 ChR2 的质粒,开始体外 HEK 细胞表达的实验,预实验的成功使潘卓华大受鼓舞,于是在 2004 年初提交了 ChR2 哺乳动物表达的基金申请以后,开始进行病毒载体的合成,进行视网膜和皮层细胞的表达。当时病毒载体的合成是在新西兰的一家公司 GeneDetect。当时潘卓华选取的是 AAV2,这是一个很幸运的选择,将病毒载体注射入大鼠眼球后获得很高的表达率,而且成功使本来不感光的第三极神经节细胞感知光信号^[14]。

以眼球为目标组织应用光遗传学有得天独厚的优势:1) 眼球是个相对封闭的腔,注射入眼球的病毒载体将会以较高浓度稳定停留在眼球内^[56],不会扩散和稀释。2) 眼睛作为中枢神经系统的一部分,有免疫豁免的特性^[57],注射入眼球的载体不易激发机体免疫反应,从而不会导致免疫系统激活带来的组织伤害,免疫细胞不会进入眼睛内部攻击外源蛋白。3) 眼睛本身就是个感光器官,眼球解剖组织的天然设计本身就是最有利于光线集中和聚焦到视网膜上的,同时也不需要外源光纤。

实验动物上的初步成功给治疗视网膜色素变性的失明患者带来了希望。2009 年成立的 RetroSense Therapeutics 公司与潘卓华合作率先尝试用光遗传学方法来治疗失明。2015 年 8 月, RetroSense Therapeutics 获得美国食品药品监督管理局临床实验批准,第一批进行试验的患者有 15 人,这项实验的编号为 NCT02556736。

第一步实验目的是使用低浓度检测病毒载体介导的光敏蛋白的安全性,以及剂量递增的耐受性检测。临床试验的结果为阴性。由于是低浓度和未基因改造的ChR,这个结果符合预期。由于这是第一次临床试验为光遗传学,它的结果将具有光遗传学的其他医疗应用的巨大意义。

这个临床试验所采用的治疗方法仍是选用ChR2的第一代产品(图8)。为改善视力恢复,进一步的改善仍然需要。这些措施包括提高ChR的特性,如光灵敏度和光谱选择性,以适应对视力的恢复和针对特定的视网膜细胞类型,从而更好地模仿可能在视网膜的内视觉特性。



(a) 视网膜纵切面示意。左边为相差显微镜下小鼠视网膜纵切面。视网膜分为5层,从光信号传输的方向如图中是从上到下,将光信号转换为电信号的是外核层(ONL)的感光细胞。感光细胞将电信号传给内核层(ONL)的双极细胞,这中间要经过外侧网状层(OPL)的处理加工。双极细胞将电信号传给无长突细胞和神经节细胞,这中间要经过内侧网状层(IPL)的处理加工。神经节细胞位于神经节细胞层(GCL)。(b) 视网膜退化性病变中,视杆细胞完全死亡,之后视锥细胞先丧失外部感光的部分,只留下胞体。最后视锥细胞也会完全死亡。(c)(d)(e)为几种光遗传学治疗失明的策略示意。(c)将光敏蛋白ChR2表达在ON类型神经节细胞上,(d)将光敏蛋白ChR2表达在ON类型双极细胞上,(e)将光敏蛋白ChR2表达在ON类型双极细胞上,同时将光敏蛋白NpHR表达在OFF类型双极细胞上

图8 光遗传学治疗失明疗法示意

Fig. 8 Diagram for the treatment of blindness by optogenetics

5.2.2 光遗传学缓解疼痛

Delp 与 Deisseroth 实验室合作将光敏蛋白表达在外周痛觉神经元上来控制疼痛反应^[58]。通过腺相关病毒载体 AAV 将图 3(a) 所示的光敏阳离子通道表达在小鼠外周痛觉神经元上,当皮肤外给予光刺激时,提升痛觉信息的敏感度。而通过腺相关病毒载体 AAV 将图 3(b) 或 3(c) 所示的光敏阴离子通道表达在小鼠外周痛觉神经元上,当皮肤外给予光刺激时,会降低痛觉信息的感受和传输。通过转染不同类型的光敏蛋白,从而可以调制痛觉神经系统的感受和功能。这项工作不但有助于对疼痛的机制研究,而且对治疗疼痛提供了新的可能,也许未来有一天,将光照在疼痛的部位就可以消解痛苦。

Circuit Therapeutics 公司与 Deisseroth 合作,尝试将光敏阴离子通道或者离子泵表达在痛觉神经细胞上,然后用皮肤外给光从而抑制疼痛。这样抑制疼痛的开关就可以把握在患者手中,而且可以立即止疼,不会影响到其他部位,同时不必担心药物的适应性和成瘾性等副作用。

5.2.3 光遗传学治疗心律失常

心律失常(cardiac arrhythmias),也被称为心脏节律紊乱,症状为不规则的心跳速度,太快或者太慢。许多类型的心律失常没有症状,有些症状是心悸或者感觉心跳间隙停顿。更严重的是可能会有胸闷、呼吸急促或胸痛。虽然大多数类型的心律失常并不严重,但是严重的患者可能会有中风、心脏骤停或心脏衰竭。心律失常影响到数以百万计的人。80%的心脏性猝死是室性心律失常的结果。

科学家尝试使用光遗传学治疗心律失常^[59]。因为用光束来控制心肌细胞可以达到无侵入性创伤。目前在啮齿类动物上已经成功使用 AAV2 病毒载体将光敏蛋白 ChR2 表达在心肌细胞上,然后用节律蓝光来协调心肌细胞的兴奋性周期,达到治疗心律失常的效果。

5.2.4 光遗传学治疗帕金森病症

帕金森病(Parkinson's Disease),是一种中枢神经细胞退化性病变。基本认为受到影响的脑区为中脑基底核(basal ganglia)和黑质(substantial nigra)。基底核和黑质是多巴胺能神经元集中的脑区,帕金森病人基底核和黑质核团发生神经萎缩和死亡后,各个脑区的多巴胺系统严重受损,最先受到影响的是运动神经系统,发生颤抖,僵硬,行走动作缓慢。这之后,睡眠、感

觉、情绪、思维和行为可能会出现问題,并发抑郁症。

由于涉及帕金森症的脑区和失明一样,局限于一个相对封闭的核团,这是光遗传学在治疗帕金森病上的一个有利条件,因为载体可以将光敏蛋白准确投递到目标脑区。而其他的中枢神经系统病症,例如抑郁症、精神分裂症等,参与的脑区多、范围广,应用光遗传学疗法难度就比较高。光遗传学在帕金森病治疗的进展有综述详细分析^[60]。目前效果显著的研究方法是使用D1-Cre-转基因小鼠^[61],即Cre重组酶选择性在多巴胺能神经元内表达,这样再注射Cre依赖的光敏蛋白,可以达到较好的细胞选择性。因此和治疗失明一样,要将光遗传学应用于治疗帕金森病,还需要找到细胞特异性表达的启动子。

5.2.5 光遗传学治疗癌症

癌症作为一种严重威胁人类生存和幸福的疾病,受到诸多研究的关注。科学家也尝试用光遗传学技术建立新的癌症治疗方法^[62]。但是目前这更多是一种设想,有待于更合适的光遗传学工具发展后进行应用。治疗思路为,将光敏蛋白定向表达达到癌症细胞,避开正常细胞;然后通过给光刺激激发细胞凋亡,或者抑制细胞迁移,关闭原癌基因,表达白细胞识别抗原等方式,定向杀死癌细胞。

5.3 光遗传学疗法局限性

光遗传学疗法面对的问题有技术上的,也有伦理上的考量。毕竟光遗传学是一个转基因疗法。

基因治疗最重要的一点就是:安全第一。在临床上将光敏蛋白通道引入人体的基因治疗方法有两个较大的局限性:一是引入载体本身可能会激发机体免疫反应;二是光敏蛋白本身引发的免疫反应。光敏蛋白本身作为非细胞内源的蛋白,它的表达本身就有可能给细胞带来负担,挤占其他蛋白生产的资源,甚至细胞膜上表达的空间。

另外,光遗传学方法还需要提供稳定的光源,类似于心脏起搏器的电源一样,需要稳定长时间工作的光源,而且避免发热。对于像深层脑刺激这一类的刺激方式,波长越长越好,因为可以穿透到深层部位。但是波长较长的光,发热效应较厉害,因此还同时需要光敏感度高的光敏蛋白,力求光较弱发热量较小的情况下能引起光反应。要达到临床应用,需构建更方便安全的给光方式。此外,是否能构建更方便安全的给光方式;对于需要有节律性的给光或者持续给光的情况下,

能否开发出体内细胞自发给光的方法,来完全移除外光源。

6 结论

光遗传学或光控基因技术具有划时代的意义。随着多种光遗传学工具的开发、在各类神经环路上的研究探索,以及临床治疗上的大胆尝试,光遗传学在近10年取得了突飞猛进的进步。而在未来,和更多学科的交叉与合作,一定会给光遗传学带来更多可能。光刺激所用的光都是恒定波长的稳定光,如果利用计算机编程的技术产生不同可变刺激频率甚至波长的入射光,将给神经活动控制带来更精细、更自然的效果。此外光遗传学的大力发展也启发了磁遗传学、声遗传学等多种方法,甚至是机械力遗传学。也有人提到将光遗传学和CRISPR基因编辑技术相结合,用光来定时定点进行精准基因编辑。未来光遗传学还可以与大数据分析技术相结合,无论是光遗传学工具的改进或者是神经环路的信息反馈,都需要人工智能的高通量分析和数据解析。在未来如果光遗传学还有进一步的发展,就要尝试与更多学科和技术分支相合作。

致谢 潘卓华教授(Wayne State University)和吴建永教授(Georgetown University)对本文提出修改意见。

参考文献(References)

- [1] Deisseroth K, Feng G, Majewska A K, et al. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits[J]. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26(41): 10380-10386.
- [2] Miesenböck G. The optogenetic catechism[J]. *Science*, 2009, 326(5951): 395-399.
- [3] Zemelman B V, Lee G A, Ng M, et al. Selective photostimulation of genetically chARGed neurons[J]. *Neuron*, 2002, 33(1): 15-22.
- [4] Miesenböck G. Lighting up the brain[J]. *Scientific American*, 2008, 299(4): 52-59.
- [5] Miesenböck G, Kevrekidis I G. Optical imaging and control of genetically designated neurons in functioning circuits[J]. *Annual Review of Neurosci*, 2005, 28: 533-563.
- [6] Lima S Q, Miesenböck G. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons[J]. *Cell*, 2005, 121(1): 141-152.

- [7] Banghart M, Borges K, Isacoff E, et al. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing[J]. *Nature Neuroscience*, 2004, 7(12): 1381-1386.
- [8] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, et al. Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae[J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2395-2398.
- [9] Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. *PNAS*, 2003, 100(24): 13940-13945.
- [10] Lin J Y, Knutsen P M, Muller A, et al. ReaChR: A red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation[J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16(10): 1499-1508.
- [11] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8(9): 1263-1268.
- [12] Li X, Gutierrez D V, Hanson M G, et al. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin[J]. *PNAS*, 2005, 102(49): 17816-17821.
- [13] Ishizuka T, Kakuda M, Araki R, et al. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels[J]. *Neuroscience Research*, 2006, 54(2): 85-94.
- [14] Bi A, Cui J, Ma Y P, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration[J]. *Neuron*, 2006, 50(1): 23-33.
- [15] Miesenböck G. Optogenetic control of cells and circuits[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27: 731-758.
- [16] Iseki M, Matsunaga S, Murakami A, et al. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*[J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 1047-1051.
- [17] Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, et al. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch[J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(1): 47-52.
- [18] Kennedy M J, Hughes R M, Peteya L A, et al. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(12): 973-975.
- [19] Vitaterna M H, Selby C P, Todo T, et al. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2[J]. *PNAS*, 1999, 96(21): 12114-12119.
- [20] Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman J M, et al. A light-switchable gene promoter system[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(10): 1041-1044.
- [21] Polosukhina A, Litt J, Tochitsky I, et al. Photochemical restoration of visual responses in blind mice[J]. *Neuron*, 2012, 75(2): 271-282.
- [22] Tochitsky I, Polosukhina A, Degtyar V E, et al. Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells[J]. *Neuron*, 2014, 81(4): 800-813.
- [23] Feldbauer K, Zimmermann D, Pintschovius V, et al. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump[J]. *PNAS*, 2009, 106(30): 12317-12322.
- [24] Lin J Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: Features, limitations and future developments[J]. *Experimental Physiology*, 2011, 96(1): 19-25.
- [25] Bamann C, Kirsch T, Nagel G, et al. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 375(3): 686-694.
- [26] Lin J Y, Lin M Z, Steinbach P, et al. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(5): 1803-1814.
- [27] Pan Z H, Ganjawala T H, Lu Q, et al. ChR2 mutants at L132 and T159 with improved operational light sensitivity for vision restoration[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98924.
- [28] Nagel G, Szellas T, Kateriya S, et al. Channelrhodopsins: Directly light-gated cation channels. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33(4): 863-866.
- [29] Wen L, Wang H, Tanimoto S, et al. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin[J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12893.
- [30] Berndt A, Yizhar O, Gunaydin L A, et al. Bi-stable neural state switches[J]. *Nature Neuroscience*, 2009, 12(2): 229-234.
- [31] Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski R E, et al. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca^{2+} -permeable channelrhodopsin CatCh[J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(4): 513-518.
- [32] Chuong A S, Miri M L, Busskamp V, et al. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin[J]. *Nature Neuroscience*, 2014, 17(8): 1123-1129.
- [33] Berthold P, Tsunoda S P, Ernst O P, et al. Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1665-1677.
- [34] Zhang F, Prigge M, Beyriere F, et al. Red-shifted optogenetic excitation: A tool for fast neural control derived from *Volvox carterii*[J]. *Nature Neuroscience*, 2008, 11(6): 631-633.
- [35] Tsunoda S P, Hegemann P. Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation[J]. *Photochem Photobiol*, 2009, 85(2): 564-569.
- [36] Berndt A, Lee S Y, Ramakrishnan C, et al. Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel[J]. *Science*, 2014, 344(6182): 420-424.
- [37] Wietek J, Wiegert J S, Adeishvili N, et al. Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel[J]. *Science*, 2014, 344(6182): 409-412.
- [38] Prigge M, Schneider F, Tsunoda S P, et al. Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(38): 31804-31812.
- [39] Tomita H, Sugano E, Murayama N, et al. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified *Volvox*

- channelrhodopsin-1[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(8): 1434–1440.
- [40] Govorunova E G, Sineshchekov O A, Li H, et al. Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(41): 29911–29922.
- [41] Klapoetke N C, Murata Y, Kim S S, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(3): 338–346.
- [42] Govorunova E G, Sineshchekov O A, Janz R, et al. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics[J]. *Science*, 2015, 349(6248): 647–650.
- [43] Surace E M, Auricchio A. Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer[J]. *Vision Research*, 2008, 48(3): 353–359.
- [44] Kay C N, Ryals R C, Aslanidi G V, et al. Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62097.
- [45] Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17(3): 463–471.
- [46] Daya S, Berns K I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(4): 583–593.
- [47] Gray S J, Blake B L, Criswell H E, et al. Directed evolution of a novel adeno-associated virus (AAV) vector that crosses the seizure-compromised blood-brain barrier (BBB)[J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(3): 570–578.
- [48] Cronin T, Vandenberghe L H, Hantz P, et al. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2014, 6(9): 1175–1190.
- [49] Lu Q, Ganjawala T H, Ivanova E, et al. AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates[J]. *Gene Therapy*, 2016, 23(8/9): 680–689.
- [50] Macé E, Caplette R, Marre O, et al. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores On and Off visual responses in blind mice[J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23(1): 7–16.
- [51] Adamantidis A R, Zhang F, Aravanis A M, et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons[J]. *Nature*, 2007, 450(7168): 420–424.
- [52] Carter M E, Yizhar O, Chikahisa S, et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons[J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(12): 1526–1533.
- [53] Rolls A, Colas D, Adamantidis A, et al. Optogenetic disruption of sleep continuity impairs memory consolidation[J]. *PNAS*, 2011, 108(32): 13305–13310.
- [54] Liu X, Ramirez S, Pang P T, et al. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall[J]. *Nature*, 2012, 484(7394): 381–385.
- [55] Hegemann P. Algal sensory photoreceptors[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 167–189.
- [56] Ivanova E, Hwang G S, Pan Z H, et al. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2010, 51(10): 5288–5296.
- [57] Boye S E, Boye S L, Lewin A S, et al. A comprehensive review of retinal gene therapy[J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(3): 509–519.
- [58] Iyer S M, Montgomery K L, Towne C, et al. Virally mediated optogenetic excitation and inhibition of pain in freely moving nontransgenic mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3): 274–278.
- [59] Vogt C C, Bruegmann T, Malan D, et al. Systemic gene transfer enables optogenetic pacing of mouse hearts[J]. *Cardiovascular Research*, 2015, 106(2): 338–343.
- [60] Parker K L, Kim Y, Alberico S L, et al. Optogenetic approaches to evaluate striatal function in animal models of Parkinson disease[J]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2016, 18(1): 99–107.
- [61] Kravitz A V, Freeze B S, Parker P R, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry[J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 622–626.
- [62] Ingles-Prieto A, Reichhart E, Schelch K, et al. The optogenetic promise for oncology: Episode I[J]. *Molecular & Cellular Oncology*, 2014, 1(4): e964045.

Progress in optogenetics

LU Qi

School of Medicine, Wayne State University, Detroit 48201, Michigan, United States

Abstract Optogenetics technology refers to transfection of specific genes into neurons and the neural activity can be turned on and off with the light. After ten years of development, optogenetics has become a mature and stable routine biological technology. This review focuses on the history of optogenetics, its development and various newly developed toolboxes. Finally, the application of optogenetics in neuroscience from the subcellular level to the neural network level and the clinical application in the treatment of blindness and analgesia are introduced.

Keywords optogenetics; neuron; gene therapy ●



(责任编辑 王志敏)