

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-030

## 光遗传学照进生物医学研究进展

于袁欢, 周阳, 王欣怡, 孔德强, 叶海峰

(华东师范大学生命科学学院, 上海市调控生物学重点实验室, 华东师范大学医学合成生物学研究中心, 上海 200241)

**摘要:** 近年来, 光遗传学技术因具有非侵入性、可逆性、时空特异性等优点被广泛应用于生物医学研究领域, 为疾病治疗提供了新思路和新理念。光作为一种理想的基因表达诱导物, 以前所未有的时空精度操控基因表达和细胞行为。随着光遗传学技术的深入研究, 基于光遗传学的个性化精准治疗和临床转化成为可能。本文主要介绍了响应不同波长的光遗传学工具及其用于神经系统疾病、肿瘤、心血管疾病、糖尿病、肠道疾病等精准治疗和用于控制基因转录表达、基因编辑、基因重组以及细胞器运动等应用。同时也介绍了光遗传学技术与智能电子设备的有机结合及其在便携式生物电子药物、人工智能诊疗方面的最新研究进展。光遗传学的迅速发展极大地拓展了传统生物电子医学领域。光控系统的远程可控性、可逆性和无毒性为光遗传学在生物医学中的应用提供了坚实的基础。这些方法的成功将对未来实践中的精准医疗产生持久的影响。最后探讨了光遗传学工具存在的问题和在未来临床应用面临的挑战, 并对其未来发展前景进行了展望。

**关键词:** 合成生物学; 光遗传学; 光控基因开关; 基因治疗; 细胞治疗

**中图分类号:** Q-3 **文献标志码:** A

## Advances in optogenetics for biomedical research

YU Yuanhuan, ZHOU Yang, WANG Xinyi, KONG Deqiang, YE Haifeng

(Synthetic Biology and Biomedical Engineering Laboratory, Biomedical Synthetic Biology Research Center, Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Sciences and School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** Synthetic biology enables rational design of regulatory molecules and circuits to reprogram cellular behaviors, and its applications to human cells could lead to powerful gene- and cell-based therapies, which are well recognized as central pillars of next-generation medicines. However, the safety of these therapies remains to be assessed, and controllability is a critical issue affecting their safety and limiting their clinical applications. In recent years, optogenetic technologies have been widely used in biomedical applications, which provides new insights for treating intractable diseases due to their distinguishing features of non-invasiveness, reversibility, and spatiotemporal resolution. Light is an ideal inducer to control gene expression, enabling precise and spatiotemporal manipulation of

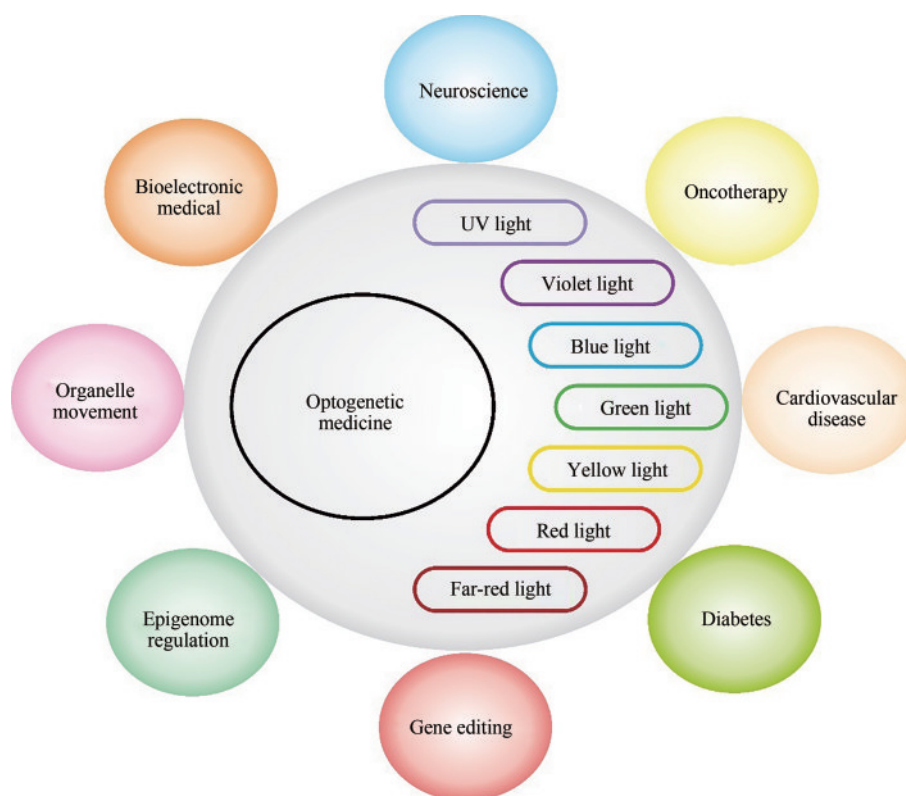
收稿日期: 2022-05-26 修回日期: 2022-09-05

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904500); 国家自然科学基金 (31971346); 上海市科委 (22N31900300)

引用本文: 于袁欢, 周阳, 王欣怡, 孔德强, 叶海峰. 光遗传学照进生物医学研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 102-140

Citation: YU Yuanhuan, ZHOU Yang, WANG Xinyi, KONG Deqiang, YE Haifeng. Advances in optogenetics for biomedical research [J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(1): 102-140

gene expression and cell behaviors by illuminating with light of appropriate intensity and wavelength as a triggering signal to achieve pinpoint spatiotemporal control of cellular activities. With the development of optogenetic toolkits, optogenetics has recently been developed for therapeutic applications. In this review, we summarize various optogenetic tools responsive to different wavelengths and their applications for precise treatment of neurological diseases, tumors, cardiovascular diseases, diabetes, enteric diseases as well as for the optogenetic control of gene transcription, gene editing, gene recombination and organelle movement. At the same time, we introduce recent research progress in portable bioelectronic medicine and artificial intelligence-assisted diagnosis and treatment systems, which are based on optogenetic techniques and the intelligent electronic devices. The rapid development of optogenetics has enormously extended the scope of traditional bioelectronic medicine, and the remote-controllability, reversibility, and negligible toxicity of optical control systems provide a solid foundation for the application of optogenetics in biomedicine. The success of these approaches would have an impact on precision medicine in the future practice. Finally, we also discuss the shortcomings of existing optogenetic tools and the challenges that would be faced in the future clinical applications as well as the prospects of their development.



**Keywords:** synthetic biology; optogenetics; light-controlled gene switch; gene therapy; cell therapy

光遗传学技术是一种将光学和遗传学结合在一起的光控基因技术，它可以通过光以远程、无痕、非侵入性的方式来控制细胞的各种活动。其基本原理是：在细胞中载入特定编码光敏蛋白基因，像电路开关一样用光来激活或抑制光敏蛋白，

从而操控细胞的各种生理活动。2005年，斯坦福大学的Karl Deisseroth研究团队<sup>[1]</sup>首次尝试将来自藻类的一种光敏蛋白（Channelrhodopsin-2, ChR2）导入神经细胞，实现了用蓝光以毫秒级的精度控制神经细胞的电位变化。一年后，韦恩州

立大学的潘卓华研究团队<sup>[2]</sup>将光敏蛋白ChR2导入视网膜神经元中,通过蓝光照射恢复了动物的视觉反应。2010年,光遗传学技术被世界顶级期刊《科学》评为21世纪前十年的重大突破之一<sup>[3]</sup>,被《自然-方法》期刊评为年度最佳方法<sup>[4]</sup>。

光遗传学技术因其非侵入性、高度时空特异性、快速可逆和低毒副作用的优势,近年来取得了蓬勃发展,研究者们已经开发了多种光遗传学工具,实现了用紫外光<sup>[5]</sup>、蓝光<sup>[1, 2, 6-8]</sup>、绿光<sup>[9]</sup>、红光<sup>[10-12]</sup>、远红光<sup>[13-14]</sup>、近红外光<sup>[15]</sup>等不同波长的光来控制细胞基因转录<sup>[14, 16-17]</sup>、基因表达<sup>[7-13]</sup>和基因编辑<sup>[18-21]</sup>,控制细胞信号通路<sup>[7, 13]</sup>,控制细胞迁移和细胞器运动<sup>[22-23]</sup>等。同时,光遗传学技术可应用于时空精准治疗神经系统疾病、肿瘤、心血管、糖尿病、肠道疾病等多种疾病。光遗传学技术的飞速发展开创了精准可控的基因治疗和细胞治疗领域的新纪元。最近,得克萨斯农工大学的Zhou Yubin团队<sup>[24]</sup>发表综述文章,介绍了光遗传学工具及其在细胞生理活动中的各类应用。本文则聚焦于介绍光遗传学工具在生物医学领域的应用研究。

## 1 光遗传学工具简介

近年来,科学家们致力于光遗传学工具的开发。光敏蛋白作为光遗传学工具的基础元件,具有感应特定光源并对其产生响应的能力。光敏蛋白来源广泛,包括细菌、真菌、藻类、植物中的感光蛋白以及脊椎动物视网膜中的视紫红质等。目前,基于对光响应的不同原理,光遗传学工具主要可分为以下四个类型:①基于视蛋白,响应光激活的离子通道和离子泵<sup>[25-28]</sup>;②光照引起蛋白质变构的光敏元件<sup>[29-31]</sup>;③光依赖寡聚或解聚的光敏元件<sup>[32-36]</sup>;④响应光裂解的光敏元件<sup>[37]</sup>。这里,我们按照光敏蛋白响应波长的不同,对哺乳动物细胞中常用光敏蛋白的特点进行了归纳和总结(表1)。

### 1.1 紫外光和紫光激活的光敏元件

目前,科学家们发现了能特异响应紫外光的

蛋白UVR8(UV-B resistance 8)和响应紫光裂解的荧光蛋白PhoCI。UVR8是来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的光敏蛋白<sup>[72]</sup>,在自身色氨酸残基的作用下吸收紫外光(285~315 nm),并发生解聚<sup>[38]</sup>[图1(a)]。在黑暗状态下,UVR8以同源二聚体的形式存在;在紫外光下,UVR8解聚并与COP1蛋白结合,形成异源二聚体<sup>[39]</sup>[图1(b)]。但该蛋白可逆性差,解聚后很难恢复同源二聚的状态<sup>[73]</sup>。PhoCI是另外一种能响应紫光的光敏元件,它是一种荧光蛋白,在紫光(约400 nm)的作用下发生 $\beta$ -消除反应,导致其发生光裂解,随之产生自发解离的小肽片段和一个较大的“空桶”片段<sup>[40-41]</sup>[图1(c)]。然而,可逆性差或不可逆,以及具有较强紫外光毒性的特点限制了上述两种光敏元件的应用。

### 1.2 蓝光激活的光敏元件

在光遗传学工具中,蓝光响应的光敏元件最多,包括:基于视蛋白的离子通道蛋白ChR2<sup>[50-51]</sup>,视黑素蛋白(melanopsin)<sup>[26]</sup>;响应蓝光的变构蛋白LOV(light-oxygen-voltage domain family)<sup>[74-76]</sup>;蓝光下发生二聚的VVD<sup>[8, 49]</sup>,Magnets<sup>[49]</sup>,CRY2-CIB1<sup>[54]</sup>蛋白等。来自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的ChR2是最早应用于光遗传学领域的光敏元件,属于光门控阳离子通道蛋白,可在蓝光的刺激下以毫秒级的精度快速打开并引发 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 等阳离子的内流<sup>[51]</sup>[图2(a)]。视黑素蛋白则是来自哺乳动物的G蛋白偶联受体,蓝光刺激使其发生构象变化而引起一系列细胞级联反应[图2(b)],介导 $\text{Ca}^{2+}$ 内流并激活下游NFAT信号通路<sup>[77]</sup>。

光-氧-电压结构域蛋白家族LOV是广泛存在于真菌、藻类、植物中的蓝光响应蛋白,参与其生长和昼夜节律调节<sup>[44-45]</sup>。近年来,基于LOV蛋白的光遗传学工具得到了广泛的应用,包括调控基因表达<sup>[78]</sup>、控制细胞运动<sup>[79]</sup>、调控蛋白酶的活性<sup>[80]</sup>以及蛋白质的降解<sup>[81]</sup>等。其中,*AsLOV2*(*Arabidopsis sativa* LOV2)结构域是光遗传学工具中最常用的LOV蛋白。在蓝光刺激下,*AsLOV2*的核心与黄素蛋白FMN之间的非共价作用转变为

表1 哺乳动物细胞中常用光敏蛋白的特点

Table 1 Characteristics of photosensitive proteins commonly used in mammalian cells

光响应元件	发光基团	光响应机理	来源	活化与失活 光照条件/nm	结合与解 离半衰期	典型应用	参考 文献
UVR8	—	解聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	300/黑暗	ms/h	控制趋化因子释放	[38]
UVR8-COP1	—	异源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	300/黑暗	ms/h	转基因表达	[39]
PhoCI	—	光裂解	<i>Clavularia</i>	380/—	min/—	控制蛋白质的清除	[40-41]
ChR2	Retinal	离子通道	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	450/—	0.2 ms/ 15 ms	帕金森综合征等神经退行性疾病	[1, 42-43]
Melanopsin	Retinal	离子通道	<i>Mammalian retina</i>	450/—	ms/s	糖尿病血糖控制	[7]
LOV	FMN	结构变异	<i>Avena sativa</i>	450/黑暗	10 s/50 s	钙离子信号控制、基因重组	[44-45]
AsLOV-Zdk1	FMN	解聚	<i>Avena sativa</i>	450/黑暗	s/30~50 s	Notch 信号控制、血糖控制	[46-47]
cpLOV-Zdk2	FMN	解聚	<i>Avena sativa</i>	450/黑暗	s/30~50 s	转录调控、细胞死亡	[48]
VVD	FMN/FAD	同源二聚	<i>Neurospora crassa</i>	450/黑暗	s/h	控制 RNA 功能和代谢、基因重组、细胞消融	[8-49]
CRY2	FAD	同源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	450/黑暗	s/min	细胞坏死	[50-51]
CRY2clust	FAD	同源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	450/黑暗	s/min	钙信号控制	[52]
CRY2olig	FAD	同源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	450/黑暗	s/min	细胞通讯、钙信号控制	[53]
CRY2-CIB1	FAD	异源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	450/黑暗	10 s/ 12 min	表观遗传控制、转录调控、基因重组、RNA 修饰	[54]
nMag-pMag	FMN	异源二聚	<i>Neurospora crassa</i>	450/黑暗	1.5 s/6.8 s	转录调控、基因重组	[49]
EL222	FMN	同源二聚	<i>Erythrobacter litoralis</i>	450/黑暗	s/s	转录调控细胞迁移、细胞死亡	[55]
TtCBD	AdoCbl, MetCbl or CNCbl	解聚	<i>Thermus thermophilus</i>	545/黑暗	—	细胞迁移、转基因表达	[56-59]
Dronpa	—	解聚	<i>Pectiniidae</i>	500/400	s/s	控制 Raf-MEK-ERK 信号	[60-63]
PhyB-PIF3/ PIF6	PCB	异源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	660/740	1.3 s/4 s	T 细胞激活、转基因表达、基因重组	[64-65]
BphS	BV	催化产生 c-di-GMP	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	680~810/—	15 s/90 s	转基因表达、糖尿病血糖控制	[13-14, 18, 66-67]
BphP1-PpsR2	BV	异源二聚	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	760/640	30 s/ 15 min	转基因表达	[68-69]
PhyA-FHY1/ FHL	PCB	异源二聚	<i>Arabidopsis thaliana</i>	660/740	—	转基因表达、转录调控	[70-71]

共价作用，导致其发生构象变化从而解除了 LOV 核心结构域对  $\text{J}\alpha$  螺旋结构的抑制作用<sup>[46-47]</sup>。研究人员利用这一特点，将效应蛋白与 AsLOV 的 C 末端融合。在黑暗状态下，效应蛋白处于抑制状态，而蓝光作用下，效应蛋白从闭锁状态释放，进而发挥其生物学功能<sup>[82]</sup> [图 2(c)]。除此之外，科学家们还通过循环排列获得了一种可以将效应蛋白融合到 N 末端的 LOV 蛋白变体——cpLOV2。在蓝光作用下，cpLOV2 的核心与黄素蛋白 FMN 之间的非共价作用转变为共价作用，导致其发生构象变化，从而解除了 LOV 核心结构域对  $\text{J}\alpha$  螺旋结构

的抑制作用，使得效应蛋白能够发挥其生物学功能<sup>[48]</sup> [图 2(d)]。另一蓝光响应蛋白 VVD 中也含有 LOV 结构域，其 N 端螺旋结构在光刺激的条件下发生空间构象变化，导致其相互作用的结构域靠近，从而形成同源二聚体<sup>[8]</sup> [图 2(e)]。但 VVD 蛋白存在可逆性差、解聚时间长的缺点。因此，Kawano 等在此基础上构建了蓝光诱导的异源二聚系统 Magnets，带正电的 pMag 蛋白与带负电的 nMag 蛋白在蓝光作用下相互吸引，形成异源二聚体。该系统中带同种电荷的氨基酸残基之间存在相互排斥，因此可以很大程度上消减自然情况下

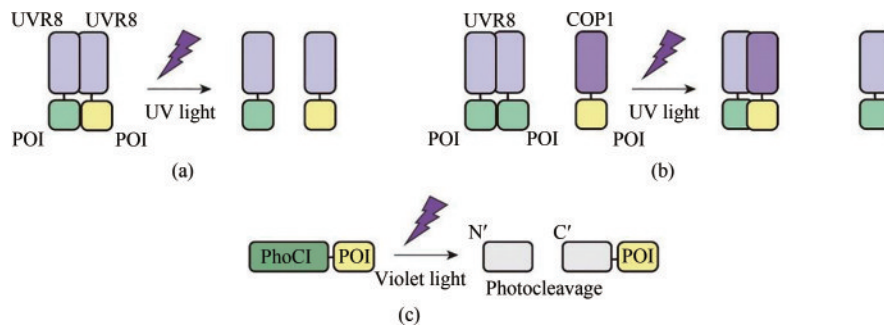


图1 紫外光和紫光响应的光遗传学工具工作原理示意图

(a) 紫外光刺激下，二聚化的UVR8分离为单体，与其相连的目的蛋白也随之解聚为单体。(b) 黑暗条件下，二聚化的UVR8不能与其配体COP1结合；而在紫外光的刺激下，UVR8解聚，并与COP1蛋白结合，形成异源二聚体。(c) 在紫光的照射下，荧光蛋白PhoCI发生断裂，与其相连的目的蛋白从而被释放，PhoCI也因此发生猝灭

POI—目的蛋白

Fig. 1 Schematic diagram for the optogenetic tools responsive to ultraviolet and violet light

(a) In the presence of UV light, homodimerized UVR8 dissociates into monomers and its fused proteins also depolymerizes. (b) Homodimerized UVR8 cannot bind to its ligand COP1 under dark conditions, but UVR8 binds to COP1 to form a heterodimer upon UV light illumination. (c) Violet light induces irreversible self-photocleavage of PhoCI resulting in the quenching of green fluorescence.

POI—protein of interest

的同源二聚化作用<sup>[49, 83]</sup> [图2(f)]。VVD、Magnets蛋白结构小，且其所需的辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)广泛存在于哺乳动物中，使其可以灵活应用于哺乳动物细胞中。除光控二聚化系统之外，研究人员还基于LOV蛋白构建了一种光诱导的蛋白质解离系统LOVTRAP<sup>[84]</sup>，该系统由AsLOV和Zdk1蛋白组成。黑暗条件下，Zdk1结合于LOV结构域，而蓝光照射会使其解离。根据这个特点，通过效应蛋白与LOV或Zdk1融合表达即可引发蓝光介导的效应蛋白的释放，从而发挥效应蛋白的生物学功能[图2(g)]。目前，研究人员通过LOVTRAP成功实现了光控蛋白质的定位<sup>[85-86]</sup>以及蛋白酶的活性<sup>[79]</sup>。此外，Motta-Mena等<sup>[55]</sup>利用光响应的DNA结合蛋白EL222，开发了蓝光调控的转基因表达系统。EL222蛋白包含两个重要的结构域，分别为N端的LOV光响应结构域和C端的螺旋-转角-螺旋(HTH)DNA结合结构域。黑暗条件下，EL222为单体状态，LOV结构域结合在HTH上，阻碍其与DNA结合；蓝光照射下，LOV发生构象变化，从而破坏了其与HTH的结合，EL222形成二聚体并结合在DNA上，从而发挥生物学功能[图2(h)]。

隐花色素系统(CRY2-CIB)作为广泛应用的光遗传学工具之一，是存在于植物和动物中的对蓝光敏感的黄素蛋白，参与昼夜节律的调节以及磁场感应<sup>[87]</sup>。隐花色素CRY2是特定响应蓝光的

蛋白，其能与CIB蛋白在蓝光诱导下形成异源复合物<sup>[54]</sup>。蓝光刺激下，CRY2与CIB形成异源二聚体，黑暗条件下发生解离[图2(i)]。由于CRY2在蓝光诱导下还可以发生同源寡聚<sup>[22]</sup>[图2(j)]，随后，研究者将CRY2蛋白进行突变(E409G, CRY2olig)，增强了蓝光诱导的同源寡聚能力<sup>[53]</sup>[图2(k)]。另外，研究人员发现，CRY2PHR的C末端增加9个氨基酸残基(CRY2clust)能大大增强其CRY2的光诱导簇集[图2(k)]。根据这一现象，研究人员开发了一种由CRY2clust介导的钙离子内流并实现了在小鼠体内的应用<sup>[52]</sup>。然而，蓝光组织穿透能力低且长时间照射有一定细胞毒性，在一定程度上限制了上述蓝光响应的光遗传学工具在体内的应用。

### 1.3 青色光和黄色光激活的光敏元件

Dronpa是一种绿色荧光蛋白，受到光刺激时，具有在荧光态和暗态之间转变的能力<sup>[60]</sup>。青色光(约500 nm)作用下，其变为非荧光状态，而紫色光(约400 nm)的作用使其还原为荧光状态<sup>[61]</sup>。研究人员发现，将Dronpa第145位的赖氨酸突变为天冬氨酸(Dronpa145N)后会形成同源二聚体或同源四聚体，其能在青色光的刺激下分解成单体，并在紫色光的作用下重新形成寡聚体并产生荧光[图3(a)]。研究人员将丙肝病毒蛋白酶

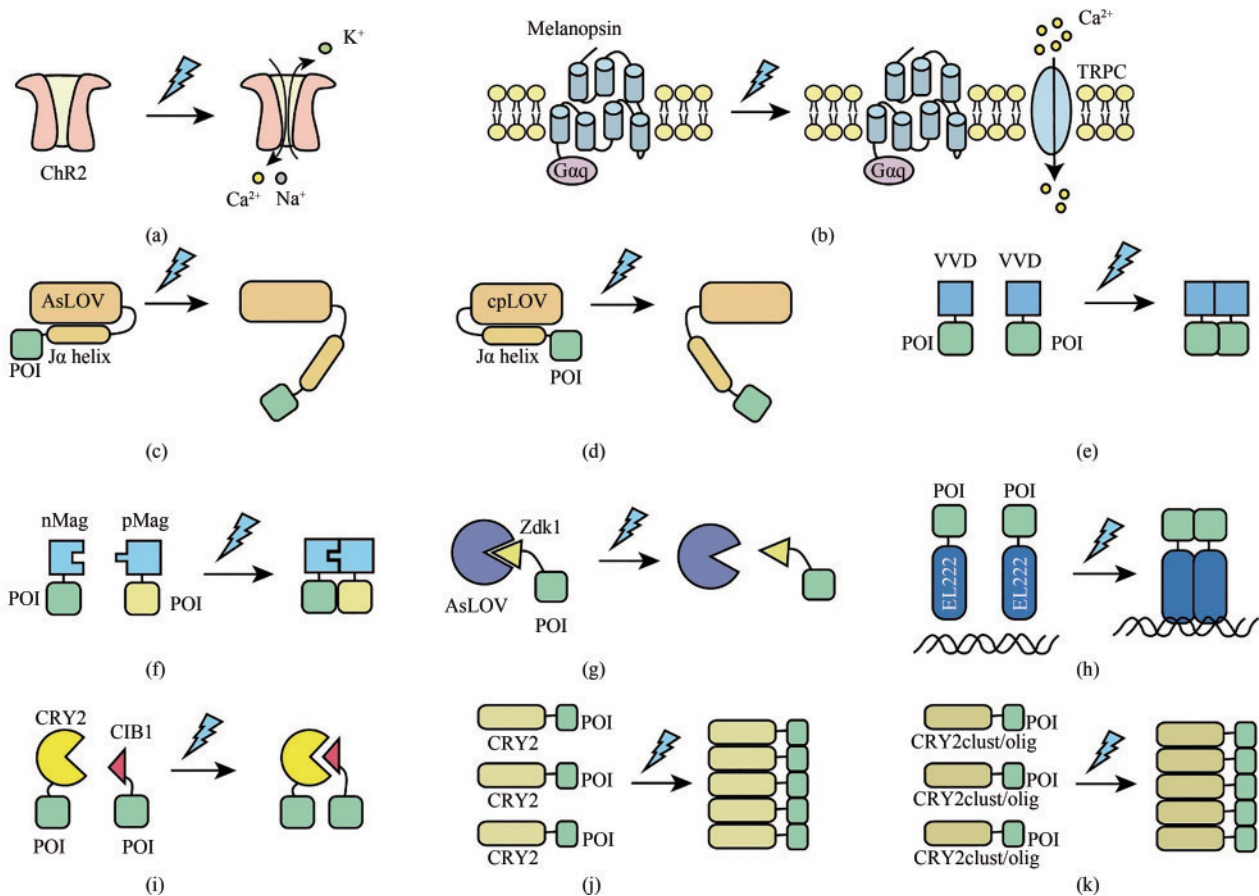


图2 蓝光响应的光遗传学工具工作原理示意图

(a) 蓝光响应的阳离子通道蛋白 ChR2 在蓝光刺激下激活，导致  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$  等内流；(b) 蓝光的照射下，发色团视黄醛异构化，与之相连的视黑素蛋白构象随之发生改变，从而活化 G 蛋白 (Gαq)、磷脂酶 C (PLC) 和磷酸激酶 C (PKC)，引起细胞膜上的瞬时受体电位离子通道 (TRPCs) 和内质网上的钙离子通道打开，使钙离子快速内流；(c) 在蓝光的刺激下，AsLOV 蛋白核心与黄素蛋白 FMN 之间的非共价作用转变为共价作用，产生光诱导的构象变化，解除了 C 端 Jα 螺旋结构对 LOV 核心结构域的抑制作用；(d) 在蓝光的刺激下，cpLOV 蛋白核心与黄素蛋白 FMN 之间的非共价作用转变为共价作用，产生光诱导的构象变化，解除了 N 端 Jα 螺旋结构对 LOV 核心结构域的抑制作用；(e) 蓝光刺激下，VVD 蛋白发生同源二聚，与其相连蛋白的距离随之拉近；(f) 在蓝光的刺激下，带正电的 pMag 蛋白与带负电的 nMag 蛋白发生异源二聚化，与其相连的目的蛋白也随之被拉近结合；(g) LOVTRAP 是蓝光响应蛋白质分离系统。黑暗条件下，Zdk1 蛋白与其分离；(h) 在黑暗状态下，光敏蛋白 EL222 N 端的 LOV 光感受域结合在其 C 端的 HTH DNA 结合域上，EL222 不能二聚且无法与 DNA 结合，蓝光的刺激破坏了 LOV 和 HTH 的结合，EL222 蛋白发生二聚并结合在靶 DNA 序列上；(i) 在黑暗状态下，光敏蛋白 CRY2 与其配体蛋白 CIB1 处于分离状态，蓝光刺激下两者发生二聚；(j) 在黑暗状态下，光敏蛋白 CRY2 处于分离状态，蓝光刺激下发生多聚；(k) 在黑暗状态下，光敏蛋白 CRY2clust/olig 处于分离状态，蓝光刺激下发生多聚

Fig. 2 Schematic diagram for the optogenetic tools responsive to blue light

(a) The blue light-responsive cation channel protein ChR2 is activated to induce influx of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  by blue light illumination. (b) Under blue light illumination conditions, the chromophore retinal is isomerized to lead to the conformational changes of melanopsin thereby activating phospholipase C (PLC) through G protein (Gαq) and phospholipase C (PLC), which triggers  $\text{Ca}^{2+}$  influx by activating transient receptor potential ion channels (TRPCs) on the cell membrane and from the endoplasmic reticulum (ER). (c) With blue light illumination, a light-induced conformation is developed between the AsLOV protein core and the flavoprotein FMN, which results in undocking and unwinding of the LOV2 C-terminal Jα helix. (d) With blue light illumination, a light-induced conformation is formed between the cpLOV and the flavoprotein FMN, which leads to undocking and unwinding of the LOV2 C-terminal Jα helix. (e) Blue light induces the homodimerization of VVD, thus enabling proximity of the fused proteins. (f) Blue light induces the heterodimerization of pMag and nMag, thus enabling proximity of the fused target protein (g) LOVTRAP is a blue light responsive protein dissociation system, which is a reversible light-induced protein system. Zdk1 binds to LOV domain to form a heterodimer under dark conditions, but dissociates from LOV domain upon blue light illumination. (h) Under dark conditions, the N-terminal LOV photoreceptive domain of the light-sensitive protein EL222 binds to its C-terminal HTH DNA-binding domain, thus preventing EL222 dimerization and DNA binding, while blue light irradiation enables EL222 dimerization to recognize its target DNA sequences. (i) Blue light triggers heterodimerization of CRY2 and CIB1 to initiate gene expression. (j) Blue light triggers oligomerization of CRY2, while CRY2 forms a monomer under dark conditions. (k) Blue light triggers multimerization of CRY2clust/olig.

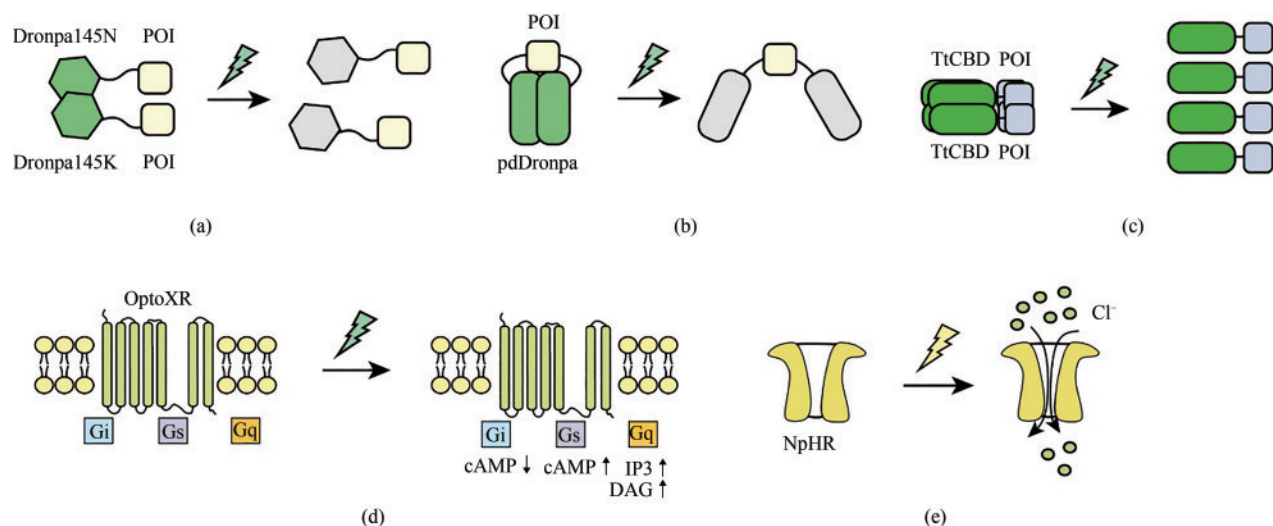


图3 青色光和黄色光响应的光遗传学工具工作原理示意图

(a) 在黑暗条件下，荧光蛋白 Dronpa145N 和 Dronpa145K 蛋白处于二聚化状态；青光照射下，Dronpa 蛋白结构发生改变，呈现为非荧光状态，同时解聚为单体；(b) 在黑暗条件下，光响应荧光蛋白 pdDronpa 处于同源二聚状态，与其相连目的蛋白的活性位点被阻挡，无法发挥生物学活性，青光照射使其解聚，从而使得目的蛋白活性位点暴露；(c) 在黑暗条件下，TtCBD 光敏蛋白处于同源四聚化状态，青光的照射使其解聚为单体；(d) 嵌合视蛋白 optoXRs 在绿光（500 nm）刺激下发生构象变化，从而激活下游信号通路。(e) NpHR 在黄色光刺激下被激活，引发 Cl<sup>-</sup> 内流

Fig. 3 Schematic diagram for the optogenetic tools responsive to cyan and yellow light

(a) The fluorescent proteins Dronpa145N and Dronpa145K dimerizes under dark conditions, while the Dronpa protein undergoes a conformational change that enables depolymerization into monomers in the presence of cyan light. (b) Under dark conditions, pdDronpa homodimerizes and thus blocks the active sites of target proteins, while blue light illumination causes dissociation of the homodimers to expose the active sites of target proteins. (c) Cyan light illumination causes dissociation of the homotetramerized TtCBD. (d) Synthetic light-gated GPCRs (Opto-XRs) undergoes a conformational change that enables the activation of G-protein-mediated intracellular signaling cascades by cyan light illumination. (e) Yellow light-mediated activation of NpHR which triggers Cl<sup>-</sup> influx.

(HCVp) 融合于两个 Dronpa145N 之间，实现了对其活性的控制。黑暗状态下，Dronpa145N 四聚体阻碍了 HCVp 对底物的识别，使其处于抑制状态；青色光刺激下，四聚体解聚，解除了对蛋白酶的抑制作用，HCVp 随之识别其底物并发生水解作用<sup>[62]</sup>。2017年，通过进一步突变，该团队构建了二聚的 Dronpa 蛋白，命名为 pdDronpa，并将其应用于 Ras 等蛋白的调控，实现了青光诱导的 MEK 信号通路的激活<sup>[63]</sup> [图3(b)]。

来自于嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 的 TtCBD 是另外一种青光响应的荧光蛋白<sup>[56-57]</sup>。黑暗条件下，TtCBD 与辅酶 AdoB12 结合，处于四聚体状态，青光照射下，TtCBD 解聚为单体状态。研究人员利用 TtCBD 蛋白，实现了光控细胞行为<sup>[59]</sup> 和光控基因转录表达<sup>[58]</sup> [图3(c)]。研究者还通过将视紫红质 (rhodopsin) 的胞内域替换成不同 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 的胞内域，开发了一组嵌合视蛋白 (optoXRs)。这些改造过的

optoXRs 可以在青光 (500 nm) 的刺激下改变构象来激活下游的生化级联反应，包括不同的 G 蛋白亚基 (Gs 或 Gq) 介导的信号通路<sup>[88]</sup> [图3(d)]。

此外，研究人员在嗜盐碱单胞菌 (*Natronomonas pharaonis*) 中发现了一种可以响应黄色光 (580~590 nm) 的盐细菌视紫红质 NpHR (Halorhodopsin)。该蛋白具有氯离子泵的功能，在黄色光的刺激下可以介导氯离子内流<sup>[89-91]</sup> [图3(e)]。

#### 1.4 红光、远红光和近红外光激活的光敏元件

光的组织穿透性决定了光控系统在体内的应用能力，相比于紫外光、紫光、蓝光、青光和紫光，红光、远红光和近红外光对于生物组织的穿透力强且毒性低，在体内应用中更具优势。因此，越来越多的红光、远红光、近红外光控系统被开发出来。

PhyB (phytochrome B) 是来自于植物拟南芥的光感受蛋白。红光作用导致 PhyB 由失活状态 (Pr) 转变为激活状态 (Pfr), Pfr 状态下的 PhyB 蛋白能与其相互作用的伴侣蛋白 PIF (phytochrome interacting factor) 结合为异源二聚体<sup>[92]</sup>。值得注意的是, 在远红光的刺激下, 该二元复合物会解离。且 PhyB-PIF 的结合和解离均发生在毫秒级别。然而, 该系统需要 PCB 色素分子的协助, 而哺乳动物细胞中并不存在该色素, 需要额外添加。研究人员通过表达 PCB 的合成酶解决了这一问题。利用该系统, 科学家已经实现了红光调控的基因表达以及红光调控的 AKT 信号通路的激活<sup>[64-65]</sup> [图4(a)]。

PhyA (phytochrome A) 是来自植物拟南芥中的另一种光敏蛋白, 与 PhyB 类似, 其在 PCB 色素分子的帮助下可受红光 (660 nm) 和远红光 (730 nm) 调控, 进而可逆地与其伴侣蛋白 FHY1 (far-red elongated hypocotyl 1) 结合<sup>[70]</sup>。根据这一特性, 2022年, 叶海峰研究团队<sup>[71]</sup>报道了通过优化截短 PhyA 蛋白 ( $\Delta$ PhyA), 构建了受红光和远红光调控的光遗传学工具——REDMAP 系统。红光 (660 nm) 照射下,  $\Delta$ PhyA-GAL4 和 FHY1-VP64 二聚并入核, 启动转基因表达, 在远红光 (730 nm) 的照射下解离, 进而终止目的基因的表

达。该系统灵敏度高, 200  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>强度的红光照射 1 s 即可实现诱导 150 倍左右的转基因表达 [图4(b)]。

2017年, 叶海峰研究团队构建了一种远红光 (约 730 nm) 调控的基因表达系统, 该系统包含三个关键模块: ①光感受器 BphS<sup>[93]</sup>, 来源于类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 并经过人工改造的远红光 (730 nm) 响应蛋白, 在远红光照射下可以将哺乳动物细胞中的三磷酸鸟苷 (GTP) 转变成环二鸟苷酸 (c-di-GMP)。②光处理器 p65-VP64-BldD, 一种人工杂交型转录激活子, 它由转录激活子 p65 (NF- $\kappa$ B 转录激活域)、VP64 (单纯疱疹病毒衍生的 VP16 激活子的四聚体) 与 BldD 蛋白融合而成。BldD<sup>[94-95]</sup> 是存在于天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中可特异识别 DNA 片段 (whiG) 的转录因子, 高浓度的 c-di-GMP 可以引发 BldD 同源二聚并结合到 whiG 序列上。③报告系统, 由启动子 P<sub>FRL</sub> (含 whiG 序列) 和报告基因构成。光感受器 BphS 在 730 nm 远红光的照射下将细胞中的 GTP 转变为 c-di-GMP, c-di-GMP 会引起光处理器 p65-VP64-BldD 二聚化入核<sup>[94, 96]</sup>, 并结合到启动子 P<sub>FRL</sub> 上, 激活下游报告基因的表达。

近年来, 研究人员基于来自沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 中的光敏色素

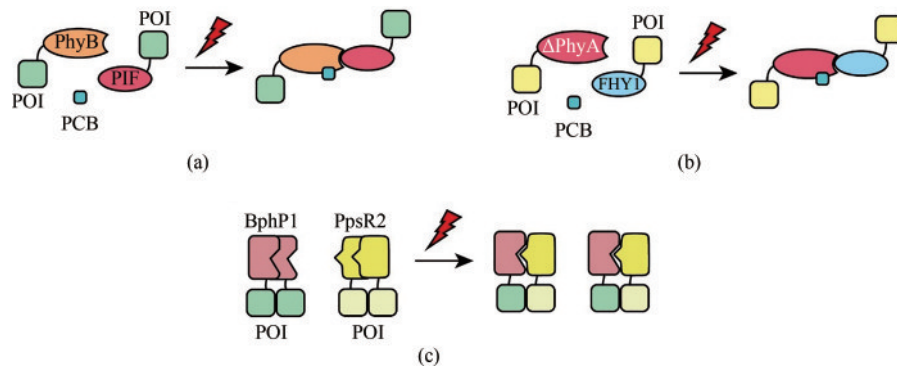


图4 红光响应的光遗传学工具工作原理示意图

(a) 光敏蛋白 PhyB 在黑暗条件下处于失活状态 (Pr), 红光作用导致其转变为激活状态 (Pfr), Pfr 状态下的 PhyB 蛋白在光敏色素 PCB 的帮助下, 与其互作蛋白 PIF 结合为异源二聚体; (b) 截短版的光敏蛋白  $\Delta$ PhyA 在黑暗条件下处于失活状态 (Pr), 红光作用导致其转变为激活状态 (Pfr), Pfr 状态下的 PhyA 蛋白在光敏色素 PCB 的帮助下, 与其互作蛋白 FHY1 结合为异源二聚体; (c) 黑暗状态下, BphP1 以同源二聚体的形式存在; 近红外光作用下, BphP1 发生解聚并与 PpsR2 形成异源二聚体

Fig. 4 Schematic diagram for the optogenetic tools responsive to red/far red light

(a) Phytochrome B (PhyB) maintains at Pr form which is biologically inactive in the dark. Red light illumination converts PhyB into the Pfr form and induces heterodimerization with PIF6 in the presence of the photosensitive pigment PCB. (b) In the dark, truncated Phytochrome A ( $\Delta$ PhyA) maintains at Pr form, red light illumination converts  $\Delta$ PhyA into the Pfr form and induces heterodimerization with FHY1 in the presence of the photosensitive pigment PCB. (c) Red light induces dissociation of homodimerized BphP1 which can interact with PpsR2 to form a heterodimerization pair.

BphP1 (Bacteriophytochrome P1), 构建了近红外光激活的 BphP1-PpsR2 和 BphP1-QPAS1 (PpsR2 的截短蛋白) 系统。黑暗状态下, BphP1 以同源二聚体的形式存在, 近红外光作用下, 其能与 PpsR2 或 QPAS1 形成异源二聚体。该二聚体在红光作用下发生解聚, 具有较好的可逆性<sup>[68-69]</sup> [图4(c)]。

随着光遗传学的不断发展, 光遗传学工具也在不断地“迭代升级”。从紫外光、紫光到蓝光、青光、黄光, 再到红光、远红光、近红外光调控系统, 光的组织穿透性和生物相容性越来越强, 系统的灵敏度和诱导效率也在不断提高。新型光控系统的开发, 极大地推动了光遗传学在基础研究和临床转化中的应用<sup>[97]</sup>。

## 2 在神经科学领域的应用研究

长期以来人类都在积极探索着大脑的奥秘, 而光遗传技术的出现为人类探索大脑提供了一个有力的工具。早在1979年, 科学家 Francis Crick 就指出: 如果能开发一种方法来操纵大脑的各个组成部分, 将非常有意义<sup>[98]</sup>。终于, 在2005年, Karl Deisseroth 团队<sup>[1]</sup>首次证明了光敏感通道蛋白 ChR2 可以感受蓝光的刺激, 并可用于控制哺乳动物神经元的活动。随后, 多种光敏蛋白被相继发现, 通过与遗传学技术相结合衍生出光遗传学技术, 被广泛应用于神经生物学领域中<sup>[99-100]</sup>。

虽然电刺激已被用于控制大脑多种区域的功能和治疗多种神经系统疾病, 但它仍然存在很多副作用, 如脱靶效应、损伤性、非特异性<sup>[101-102]</sup>。相比之下, 光遗传学技术整合了光学和遗传学, 以一种瞬时、快速并可逆的方式控制目标神经元的活动<sup>[103-105]</sup>, 这不仅大大降低了控制神经元过程中产生的神经毒性, 还能够特异性地控制特定类型的神经元<sup>[105-106]</sup>。同时这些光控蛋白系统不仅可以检测脑内信号和探测未知的神经回路<sup>[107-108]</sup>, 在多种类型的神经疾病的治疗方面也有着巨大的潜力。

目前主要有三类光敏蛋白在神经生物学领域中广泛应用, 分别为光敏蛋白 ChR2<sup>[109]</sup>、盐细菌

视紫红质 NpHR<sup>[89-91]</sup> 以及嵌合视蛋白 optoXRs<sup>[88]</sup> [图5(a)]。2017年, 来自耶鲁大学的 Ivan E de Araujo 博士及其同事<sup>[42]</sup>将带有 ChR2 的基因导入到小鼠大脑杏仁核区域里的两组神经, 通过对这两组神经的光学控制发现了这两组控制小鼠猎杀行为神经的功能, 一组协调追逐猎物, 另一组则控制颈部和下颌的肌肉 [图5(b)]。随着光遗传学技术的不断发展, 科学家们不仅在大脑中探索着新的神经通路, 还在周围神经系统中有了重大的发现, 其中疼痛作为高等动物特有的应激神经通路一直备受关注。2019年, Hind Abdo 等<sup>[43]</sup>在《科学》期刊上发表文章, 表示他们通过基因标记发现施旺细胞可作为痛觉神经元的终端感受器来感受疼痛, 并借助 ChR2 光敏蛋白成功验证了该实验结果, 为治疗慢性疼痛药物的开发提供了新方向。除此之外, 瘙痒一直是一种被人们忽略的疾病, 和疼痛不一样, 瘙痒相关的神经通路还不是很清楚, 所以控制慢性瘙痒是一个具有挑战性的临床问题。2017年, 中国科学院神经科学研究所的孙衍刚研究组<sup>[110]</sup>利用病毒载体将 NpHR 的突变体 eNpHR3.0 注射至小鼠脊髓中, 并通过光纤照射浅背脊髓处的臂旁核 (parabrachial nucleus, PBN), 发现小鼠在光照期间的抓挠次数相对不光照期间明显减少, 同时研究人员还将 ChR2 导入至 PBN 中去激活相关神经元, 最终发现瘙痒是通过脊髓-臂旁核投射这条通路传入大脑的 [图5(c)]。

这些光遗传学工具不止被用于神经通路的探索, 还被科学家们用来治疗多种神经系统相关疾病。2009年, Gradinaru 等<sup>[111]</sup>利用基于 ChR2-NpHR 系统的光遗传学技术, 系统地分析了6-羟多巴胺 (6-OHDA) 诱导帕金森模型大鼠的独特电路元件, 克服了传统刺激策略的缺点, 探索了光遗传技术作为治疗帕金森综合征和其他神经退行性疾病的策略。除了帕金森综合征, 癫痫也是一种严重的神经类疾病, 其年发病率为4%~10%<sup>[112]</sup>, 2009年, Tønnesen 等<sup>[113]</sup>将 NpHR 导入海马锥体细胞和颗粒细胞, 然后通过黄色光 (573~613 nm) 诱导, 成功抑制了和癫痫患者的脑电图波形相似的电活动。

以上三种离子通道类光敏蛋白由于缺乏离子

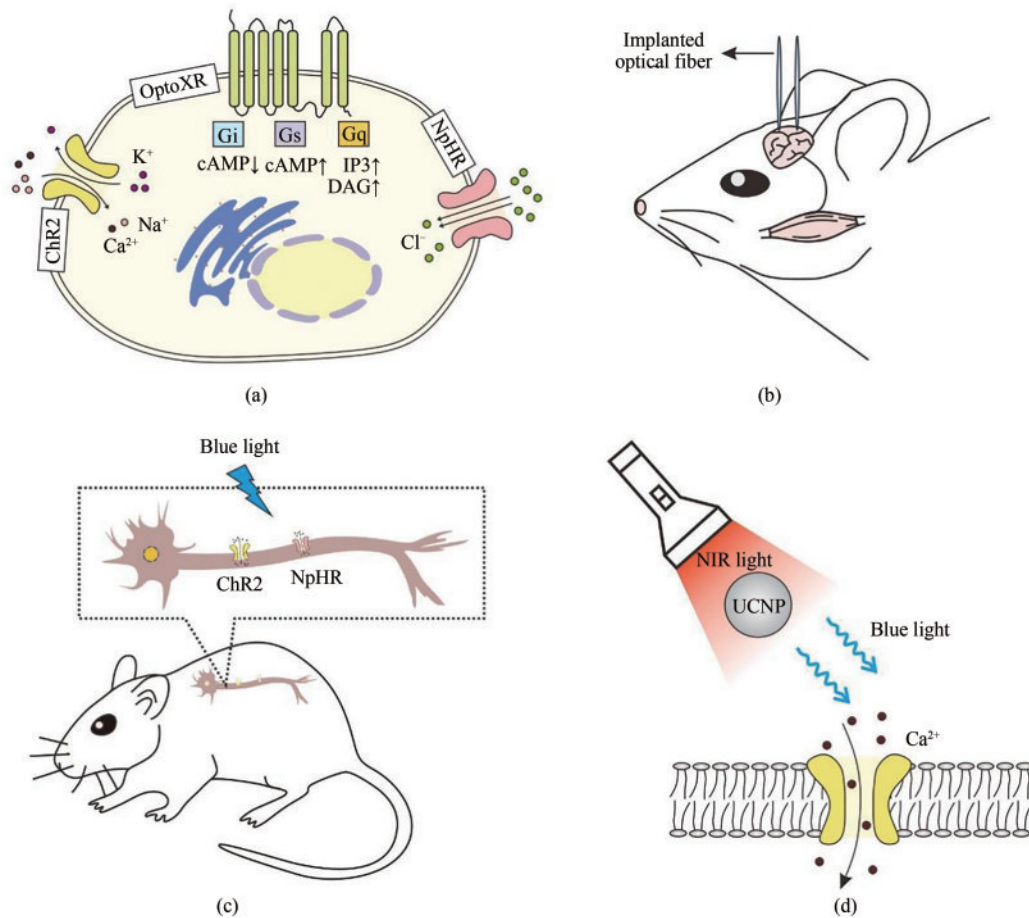


图5 光遗传学工具在神经生物学中的开发和应用

(a) 神经生物学领域中常用的三种光敏蛋白。ChR2 蛋白在蓝光的刺激下可介导  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  等阳离子内流从而触发动作电位。NpHR 蛋白可以在黄色光 (580~590 nm) 的刺激下介导  $\text{Cl}^{-}$  内流, 进而使得神经元超极化抑制神经元的活动。OptoXR 蛋白是将视紫红质 (rhodopsin) 的胞内域替换成不同 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 的胞内域而形成。这些改造过的 optoXRs 可以在绿光 (500 nm) 的刺激下改变自身构象来激活下游的生化级联反应。(b) 将 ChR2 基因导入小鼠大脑杏仁核区域里的两组神经中, 通过植入光纤对其进行光学控制, 发现小鼠猎杀行为神经通路。(c) 将 ChR2/NpHR 基因导入小鼠背部的神经元中, 通过光控该特定神经元的激活和抑制, 发现小鼠瘙痒的相关神经通路。(d) 通过 AAV 将 ChR2 基因导入到小鼠深部脑神经元中, 并将 UCNPs 植入小鼠大脑深处。在体外使用近红外光照射时, UCNPs 可以将近红外光转化成蓝光, 进而激活大脑深处神经元上的 ChR2 蛋白, 引发神经元活化

Fig. 5 Development and application of optogenetic tools in neurobiology

(a) Three major types of opsins used in neurobiology. The blue light-responsive cation channel protein ChR2 is activated to induce influx of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  and trigger an action potential. The yellow light-responsive NpHR is activated to allow chloride ions to enter the cytoplasm. Synthetic light-gated GPCRs (Opto-XRs) is engineered by replacing the intracellular domain of rhodopsin with that of G protein-coupled receptors to enable G-protein mediated intracellular signaling cascades. (b) Genetic targeting of ChR2 into the amygdala region of mouse brain enables optical control of the neural pathway of the mouse-hunting behavior by implanting optical fibers. (c) Genetic targeting of ChR2/NpHR into the cervical dorsal spinal cord of mice enables specific activation or suppression of the neurons, and avoids stimulation of non-targeted cells. (d) ChR2 is delivered into the deep brain neurons of mice by coupling with lanthanide-doped upconversion nanoparticles (UCNP), which can convert blue light to tissue-penetrable NIR light to activate ChR2 expressed dopaminergic neurons.

选择性 (如 ChR2 允许  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{H}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  的通过), 限制了其在非兴奋性细胞及组织中的应用。2021 年北京师范大学王友军教授课题组与美国得克萨斯农工大学 Zhou Yubin 教授实验室<sup>[114]</sup>合作, 将 LOV2 蛋白插入到 ORAI 钙释放-激活钙调节因子 1 (ORAI1) 钙离子特异性通道蛋白中间, 开发了

具有高度选择性的蓝光精准调控钙离子通道 LOCa。随后, 将该系统导入阿尔兹海默病果蝇中, 使用蓝光照射成功缓解了果蝇阿尔兹海默病的症状。

能够时空特异性、无创控制大脑深部的特定神经细胞将对神经系统的功能研究具有重要意义。

但上述介绍的光控系统多数是由蓝光激发的，其有限的组织穿透能力一直限制着光遗传学技术的进一步应用。因此，2018年日本理化研究所脑科学研究所研究组长 Thomas McHugh 团队开发出上转换纳米颗粒（UCNPs），这种粒子可以将近红外光转化为蓝光或者绿光，从而可以通过体外近红外光照射激活体内组织深处的 ChR2 蛋白，达到控制组织深处神经元的目的，但是由于使用的是 980 nm 光源，导致被照射的局部温度过高而损伤皮肤，不便于临床应用。除此之外，2020年，Gong X 研究团队通过突变 ChR2（ChR2 C128S/D156A/T159C）获得了一种具有超高光敏性的新型阶跃功能视蛋白 SOUL（step-function opsin with ultra-high light sensitivity）。该研究小组在猕猴的大脑皮层深处（约 5.6 mm）神经元上表达了 SOUL 蛋白，通过放置在大脑外膜上的光纤电缆成功激活了相关神经元。该课题组首次展示了一种通过体外光源激活小鼠大脑中的任意区域，并且也是首次在猕猴上实现大面积激活的光遗传学方法<sup>[115]</sup> [图 5(d)]。同年，Karl Deisseroth 团队<sup>[116]</sup> 再次报道了一个可以直接由红光激活的光敏离子通道蛋白 ChRmine，在中脑和脑干结构中实现了深脑（7 mm）特定神经回路的光激活，推动了无创深脑光遗传学的研究。

近年来，非视蛋白类的光遗传学工具也被开发用于神经相关疾病的研究。2020年，Alice Ting 团队<sup>[117]</sup> 开发了基于 LOV 结构域的 FliCre 系统用于时空特异性的神经活性记录。2022年，Zhou Yubin 团队<sup>[118]</sup> 报道了一个单组分的光诱导型核仁靶向工具（pNUTs），可以控制蛋白质在核仁与核质之间的穿梭，用于肌萎缩性侧索硬化症等神经退行性疾病的研究。新型材料和新的光遗传学工具的开发将进一步推动光遗传学在神经科学领域的应用。

### 3 在肿瘤治疗领域的应用研究

近年来，免疫疗法已成为多种癌症的有效治疗手段<sup>[119-120]</sup>。基于过继细胞转移（ACT）的免疫治疗可以介导转移性癌症患者的肿瘤消退<sup>[121-122]</sup>。

然而，过继细胞无法运输到目的肿瘤位置，使得这类治疗方法存在一定的局限性<sup>[123-125]</sup>。为了克服这一局限性，人们开发了光控系统，使免疫细胞能够识别并追踪到肿瘤特异性抗原并根除肿瘤细胞<sup>[126]</sup>。

2014年，Xu 等<sup>[127]</sup> 开发了一个视紫红质  $\alpha$  亚基与趋化因子受体-4（CXCR4） $\alpha$  亚基偶合的光控抗肿瘤系统。该系统可在 505 nm 光照下激活 T 细胞内趋化因子信号并促使 T 细胞向肿瘤迁移。利用该系统，光激活的趋化因子受体 4 系统（PA-CXCR4）可在体内将过继转移的 CD8<sup>+</sup> T 细胞招募到肿瘤部位，抑制肿瘤生长 [图 6(a)]。该系统可以通过使用特定波长的光来控制 T 细胞运输到目标肿瘤组织，为癌症免疫治疗打开了新的大门。

2012年，He 等<sup>[128]</sup> 利用近红外光作为触发器，通过控制树突状细胞或其他免疫细胞中 Ca<sup>2+</sup> 响应的基因表达来进行免疫治疗。该系统由 Ca<sup>2+</sup> 释放-激活通道（CRAC）和能将近红外光转化为蓝光的 UCNPs。光控 Ca<sup>2+</sup> 释放激活通道（Opto-CRAC）包含一个钙释放-激活钙调节因子 1（ORAI1）和一个融合了蓝光响应的 LOV2 结构域的合成基质相互作用分子 1（STIM1）。在蓝光照射下，LOV2 结构域羧基末端的 J $\alpha$  螺旋脱位，暴露 STIM1 蛋白 C 末端，刺激 ORAI1 Ca<sup>2+</sup> 通道，从而启动钙依赖的转基因表达，诱导免疫应答 [图 6(b)]。当 Opto-CRAC 系统注射到黑色素瘤 B16-OVA 小鼠模型时，CD8<sup>+</sup> T 细胞比例在光诱导后明显上调，显著抑制了肿瘤生长。这项研究意味着人们可以实现远程无痕调节钙信号。

2019年，Zhao 等<sup>[129]</sup> 设计了蓝光控制抗肿瘤相关细胞因子（IL-2、IL-15 和 TNF- $\alpha$ ）的转录表达系统 [图 6(c)]。通过细胞水平和人肝癌细胞异种移植瘤模型小鼠体内的研究，结果显示蓝光对 HEK-293T 细胞和人原代 T 细胞中细胞因子的基因表达均有时空特异性调控作用，且这种光调控的基因转录表达策略显著增强了 T 细胞的扩增能力和细胞溶解活性，且在人肝癌细胞异种移植模型小鼠体内表现出高效的清除作用。该研究通过蓝光远程控制 T 细胞实现了实体肿瘤治疗，提供了一种新颖的实体瘤免疫治疗策略。

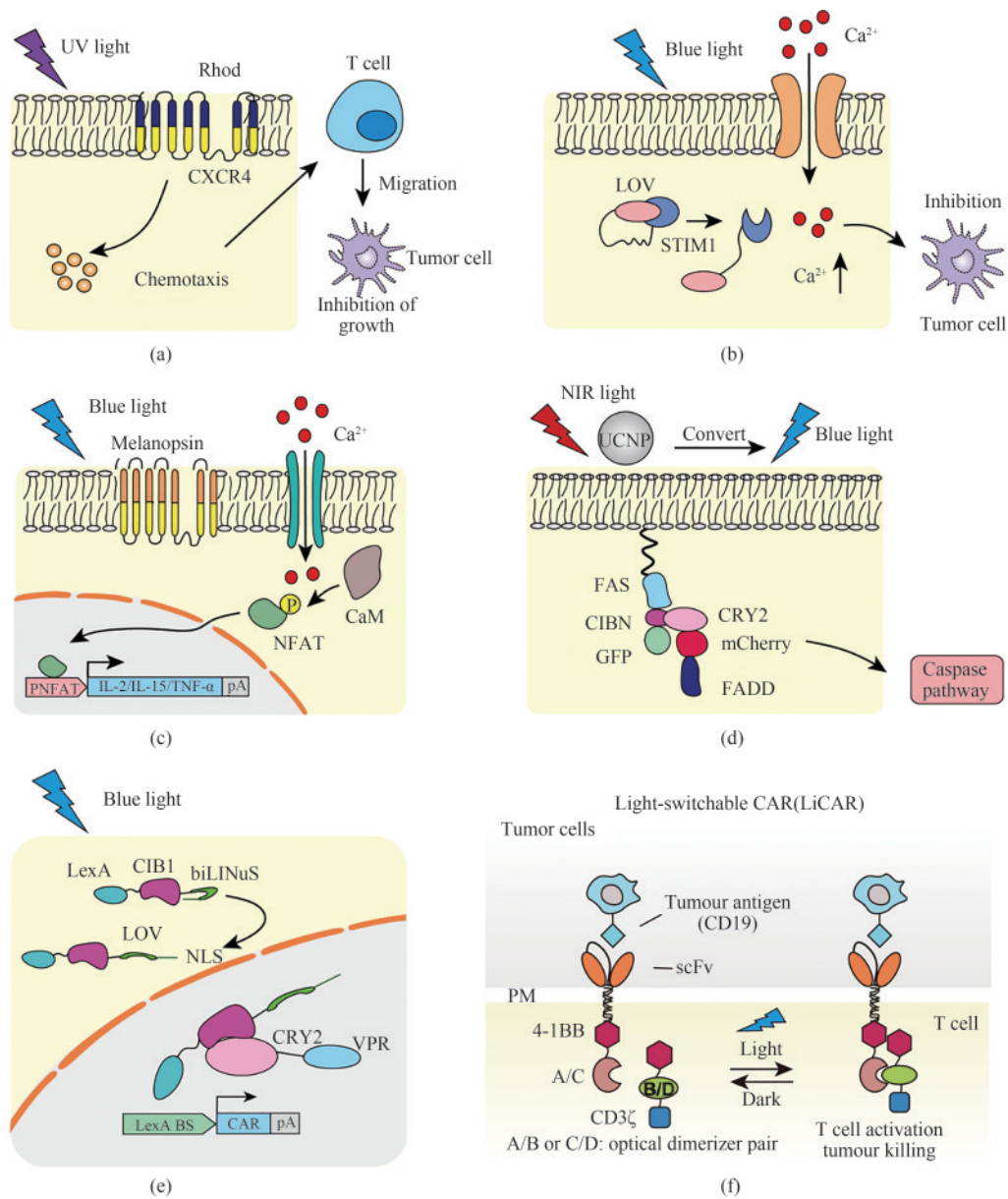


图6 光遗传学工具在肿瘤治疗中的应用

(a) 基于光控趋化因子受体的小鼠黑色素瘤免疫治疗。在 505 nm 波长的光照下，紫质  $\alpha$  亚基和趋化因子受体-4 (CXCR4) 组成的嵌合光激活趋化因子受体被激活，产生趋化因子信号并诱导 T 细胞极化，靶向至肿瘤部位，抑制肿瘤生长。(b) 基于 Opto-CRAC 的细胞免疫治疗光遗传学系统。在蓝光的照射下，LOV2 结构域羧基末端的  $J\alpha$  螺旋脱位，暴露出 STIM1 蛋白的 C 末端，从而刺激 ORAI1  $Ca^{2+}$  通道，启动钙依赖级联反应，激活 T 细胞并诱导免疫应答，从而杀伤肿瘤。(c) 基于视黑素蛋白的肿瘤免疫治疗光遗传学系统。在蓝光的照射下，视黑素蛋白促进钙离子内流，诱导钙依赖的 NFAT 信号通路启动，表达抗肿瘤因子 IL-2/IL-15/TNF- $\alpha$ ，从而抑制肿瘤生长。(d) 光控细胞自噬系统用于肿瘤治疗。在上转化纳米材料 UCNP 的作用下，组织穿透性更强的近红外光转化为蓝光，激活隐花色素系统 CIBN 与 CRY2 蛋白二聚化结合，从而将自噬相关蛋白 FADD 招募到质膜上的 FAS 蛋白，启动细胞自噬级联反应致使肿瘤细胞死亡。(e) LINTAD 系统用于肿瘤治疗。蓝光照射后，LOV 蛋白变构暴露出核定位信号 NLS，从而将 LexA-CIB1-biLINuS 带入核内，与 CIB1 的光敏伴侣蛋白 CRY2 结合，共定位于报告系统的操纵序列上，激活 CAR 的表达。(f) LiCAR 系统用于肿瘤治疗。光敏蛋白在蓝光照射下相互结合，从而招募 CD3 $\zeta$  结构域形成结构域完整的 CAR 受体，用于肿瘤细胞的识别和杀伤

Fig. 6 Optogenetic tools used for tumor therapy

(a) Photochemokine receptors used for immunotherapy in murine melanoma. Under 505 nm light illumination, the chimeric photoactivated chemokine receptor composed of rhodopsin  $\alpha$  subunit and chemokine receptor-4 (CXCR4) is activated to induce T cell polarization, resulting in the inhibition of tumor growth. (b) Opto-CRAC for cellular immunotherapy. Under blue light illumination, the  $J\alpha$  helix at the carboxyl terminus of LOV2 domain dislocates to expose the C-terminus of STIM1 protein, which stimulates the ORAI1  $Ca^{2+}$  channel to initiate the calcium-dependent cascade and

modulation of T cell activities. (c) Melanopsin-based optogenetic systems for tumor immunotherapy. Blue light illumination changes the conformation of the light receptor melanopsin, which sequentially triggers calcium influx and initiates the calcium-dependent NFAT signaling pathway to induce expression of the anti-tumor cytokines (IL-2/IL-15/TNF- $\alpha$ ). (d) Photo-controlled autophagy for tumor therapy. The coupled nanomaterial UC-NPs convert near-infrared light to blue light, which can further induce dimerization of CIBN and CRY2 proteins, thereby recruiting the autophagy-related protein FADD to the FAS protein on plasma membranes and initiating the autophagy cascade. (e) LINTAD systems used for cancer therapy. Under blue light illumination, LOV undergoes allosterically change that exposes the nuclear localization signal NLS, which causes translocation LexA-CIB1-biLINuS into the nucleus, wherein CIB1 and its photosensitive chaperone protein CRY2 colocalize on the operon sequence to initiate CAR expression. (f) LiCAR systems for cancer therapy. The CD3 $\zeta$  domain is recruited by photosensitive proteins responsive to blue light to form a complete CAR-receptor to inhibit the tumor growth.

为了提高在体内深部肿瘤的治疗效率, Zheng等<sup>[130]</sup>开发了一种可以将近红外光转化为蓝光的UCNPs, 实现了近红外光调控的肿瘤治疗。死亡受体(Fas)属于肿瘤坏死因子受体超家族, 在配体活化后与Fas相关死亡结构域(FADD)相结合, 诱导细胞的凋亡。该系统基于隐花色素CRY2-CIB1蓝光调控系统, 在蓝光诱导下, Fas-CIB1-EGFP和CRY2-mCherry-FADD能够可逆结合, 使得质膜上FADD转位至Fas, 激活凋亡信号, 诱导细胞凋亡。研究者们通过将UCNPs与隐花色素介导的细胞自噬系统共转到肿瘤中, 实现了体外近红外光照射即可有效杀伤深部组织的肿瘤<sup>[130]</sup>[图6(d)]。葡萄膜黑色素瘤也是成年人最常见的致命性眼内原发性恶性肿瘤<sup>[131-133]</sup>, 2020年, Zhang等<sup>[134]</sup>在视网膜下注射B16细胞建立葡萄膜黑色素瘤模型, 并利用该系统实现了葡萄膜黑色素瘤的光遗传学治疗。2021年, He Lian等<sup>[135]</sup>构建了基于混合系激酶区域样蛋白(MLKL)的光控细胞坏死系统(LiPOP1)。MLKL蛋白是细胞坏死的下游信号蛋白, 在受体作用蛋白1(RIPK1)和受体作用蛋白3(RIPK3)的作用下磷酸化, 从而暴露出N端的4个螺旋结构域(HBD), 引起细胞膜穿孔和细胞的坏死。研究者将CRY2蛋白与MLKL蛋白N端结构域融合表达, 在蓝光照射下, 蛋白寡聚, 促使细胞坏死。LiPOP1系统不依赖于死亡受体信号通路, 而是通过光照以更直接的方式控制细胞的坏死, 研究者成功在小鼠模型中验证了该系统可以在体内促进细胞坏死, 从而清除肿瘤细胞<sup>[135]</sup>。

此外, 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)免疫疗法也被广泛应用于肿瘤免疫治疗, 能够有效识别并杀伤目标肿瘤细胞<sup>[136-138]</sup>。然而, 在不同病人中, T细胞的反应性、功能持续性以及副作用均有差异, 且存在不可控导致的细胞因子风暴、神经

毒性等副作用问题<sup>[139-140]</sup>, 因此要开发能够时空特异性精准控制的CAR-T技术<sup>[141]</sup>。最近, 研究人员将光遗传学与CAR-T细胞疗法相结合, 开发了一个光诱导的核易位二聚系统(LINTAD)<sup>[30]</sup>。该系统是通过控制嵌合抗原受体的基因表达来控制CAR-T细胞的激活。具体来说, 隐花色素蛋白CRY2与转录激活子VPR融合表达在核内, 而其伴侣蛋白CIB1与LexA蛋白在胞质内融合表达, 且在C端连接一个蓝光响应的核定位信号。在蓝光的照射下,  $\alpha$ 螺旋展开, 暴露出核定位信号NLS, LexA-CIB1-biLINuS融合蛋白随之进入细胞核, 与此同时, CIB1与CRY2相互结合, 在LexA的帮助下被招募到操纵子LexA-BS上, 激活CAR的表达, 从而抑制肿瘤的生长[图6(e)]。研究表明, LINTAD系统可以作为一种有效的工具, 无创精准地激活CAR-T细胞, 用于光控肿瘤免疫治疗。

2021年, Nguyen NT等<sup>[142]</sup>将CAR胞内域分割为两部分: 一部分通过CAR跨膜域锚定在细胞膜上; 另一部分游离在细胞质中。研究人员利用CRY2/CIBN及LOV-ssrA/sspB二聚系统, 构建了蓝光调控的CAR-T系统(LiCARs)。基于CRY2/CIBN的LiCARs系统中, 光敏蛋白CRY2与4-1BB及CD3 $\zeta$ 结构域融合表达并游离于细胞质中; CIBN融合到CAR胞内域4-1BB的C端。在蓝光照射下, CRY2/CIBN形成二聚体, 从而招募CD3 $\zeta$ 结构域, 形成结构域完整的CAR, 行使肿瘤细胞的识别和杀伤功能。LOV2-ssrA是光氧电压结构域AsLOV2与细菌肽ssrA融合蛋白, 在蓝光照射下与其伴侣蛋白sspB二聚, 由此研究人员构建了基于LOV-ssrA/sspB的LiCARs系统, 用于光控肿瘤细胞的识别和杀伤, 且该版本具有更优的肿瘤杀伤效果[图6(f)]。此外, 研究人员为了解决蓝光组织透性差的问题, 利用UCNPs, 将近红外光转化成蓝光, 在小鼠体内实现了通过近红外光时空特异性

地控制 CAR-T 细胞功能，并杀伤肿瘤细胞，极大地提高了小鼠的存活率。与之类似，He Lian 等<sup>[48]</sup>利用 cpLOV2 蛋白，将 ssrA 融合到 cpLOV2 的 N 端 (ssrA-cpLOV2)，在蓝光照射下，通过与伴侣蛋白 sspB 二聚化招募 CD3 $\zeta$  结构域，从而形成结构域完整的 CAR，对肿瘤细胞进行杀伤。

上述内容主要聚焦于光遗传学在哺乳动物细胞中用于肿瘤治疗的研究。除此之外，有研究者利用厌氧菌对肿瘤的靶向和定植的优点，结合光遗传学技术开发了光控工程菌，实现了对肿瘤细胞的抑制或杀伤<sup>[143]</sup>。2021 年，天津大学王汉杰课题组<sup>[144]</sup>开发了一种可注射水凝胶体系，利用近红外光照射增强对癌症的治疗。该系统由三部分组成，分别是：UCNPs、光敏剂以及光响应蓝藻聚球菌 (*Synechococcus elongatus*, PCC 7942)。研究人员利用 UCNPs 将近红外光转化为红光，通过红光照射激活光敏剂释放活性单线态氧，从而实现了对肿瘤细胞的清除。同时，利用红光照射诱导细菌产生氧气，改变肿瘤厌氧微环境，从而提升了光动力疗法治疗癌症的效果<sup>[145]</sup>。同年，该团队又开发了基于上转换材料的近红外光响应工程菌，上转换纳米材料将近红外光转换为蓝光，从而诱导光敏蛋白 EL222 的二聚，启动肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$  的表达，在小鼠体内实现了对肿瘤细胞的抑制。

上述研究成果均表明光遗传学技术是一种高效的时空特异性控制方法，在肿瘤治疗中具有极大的应用潜力和价值。然而，光遗传学在免疫治疗中的应用依旧存在较多的挑战，尤其是其在生物组织内的低效率光激活（与工程化策略、组织透性、光敏感性等有关）<sup>[24]</sup>。随着新型高灵敏度红光响应蛋白的开发以及新型光源技术的发展，这些难题有望被攻克，并为新一代光控免疫治疗奠定基础。

## 4 在心血管疾病领域的应用研究

心血管疾病是全世界最常见的导致人类死亡和残疾的疾病之一<sup>[146-148]</sup>。随着药理学的发展、手术治疗技术的提升以及早期临床研究的推

进<sup>[149-150]</sup>，虽然死亡率明显降低，但仍然有许多患者面临着心血管疾病带来的重大风险，包括心室重塑<sup>[151]</sup>、心肌缺血甚至死亡<sup>[152]</sup>。因此，开发能够治疗心肌损伤的新方法对于该疾病具有重要意义。

2017 年，斯坦福大学的 Y Joseph Woo 团队<sup>[153]</sup>提出了一种全新的光控生物系统，他们将蓝细菌直接注射到急性心肌梗死啮齿动物模型中，并予以光照处理，蓝细菌则在光合作用下产生氧气，从而增加了心脏组织的氧合作用、代谢活性和心脏功能 [图 7(a)]。经验证，该光合作用系统是无毒的，具有良好的生物相容性，不会引起病理免疫反应。这种利用光合细菌为缺血心肌细胞供氧的方法是一种开创性的治疗方法，在缺血性疾病和微血管疾病的治疗中具有很大的应用潜力。

此外，还有许多心脏疾病与组织兴奋性丧失有关，会引发心律失常<sup>[154]</sup>。对此，植入式电子心血管装置 (IECDs) 被广泛用于这些心脏疾病的治疗，包括心脏起搏器、心脏转复器或心脏除颤器<sup>[155]</sup>。2010 年，Bruegmann 等<sup>[156]</sup>首次利用光激活的非选择性阳离子通道 ChR2，分别在体外、体内水平刺激心肌细胞。该方法能够通过光照不同位置精确地控制激活区域，并使心肌细胞长时间去极化，从而改变起搏和自发性心律失常 [图 7(b)]。2015 年，Nussinovitch 和 Gepstein<sup>[157]</sup>将 ChR2 通过腺相关病毒 AAV9 转导到心肌部位，并采用一根光纤耦合单色 LED (450 nm) 进行光照刺激。这些研究成果通过光照激活来同步心室激活的频率，缩短了心室激活的时间，在体内有效地控制了心脏的兴奋性。2017 年，Yu 等<sup>[158]</sup>通过腺相关病毒将一种抑制性光敏视蛋白 Arch-T 递送到比格犬的左星状神经元中，并用发光二极管 (565 nm) 进行光照，研究发现光照后神经元功能、活性及交感神经心率变异性指数被显著抑制，且在撤去光照 2 h 后，恢复正常。光照显著抑制了缺血诱导的心律失常，说明该光遗传学疗法能够可逆地抑制左星状神经元的神经活动，提高其电生理稳定性，改善心肌缺血诱导的心律失常<sup>[158]</sup> [图 7(c)]。除此之外，光敏 G 蛋白偶联受体也被用于心脏起搏和心律失常治疗，在心脏的各种生理和

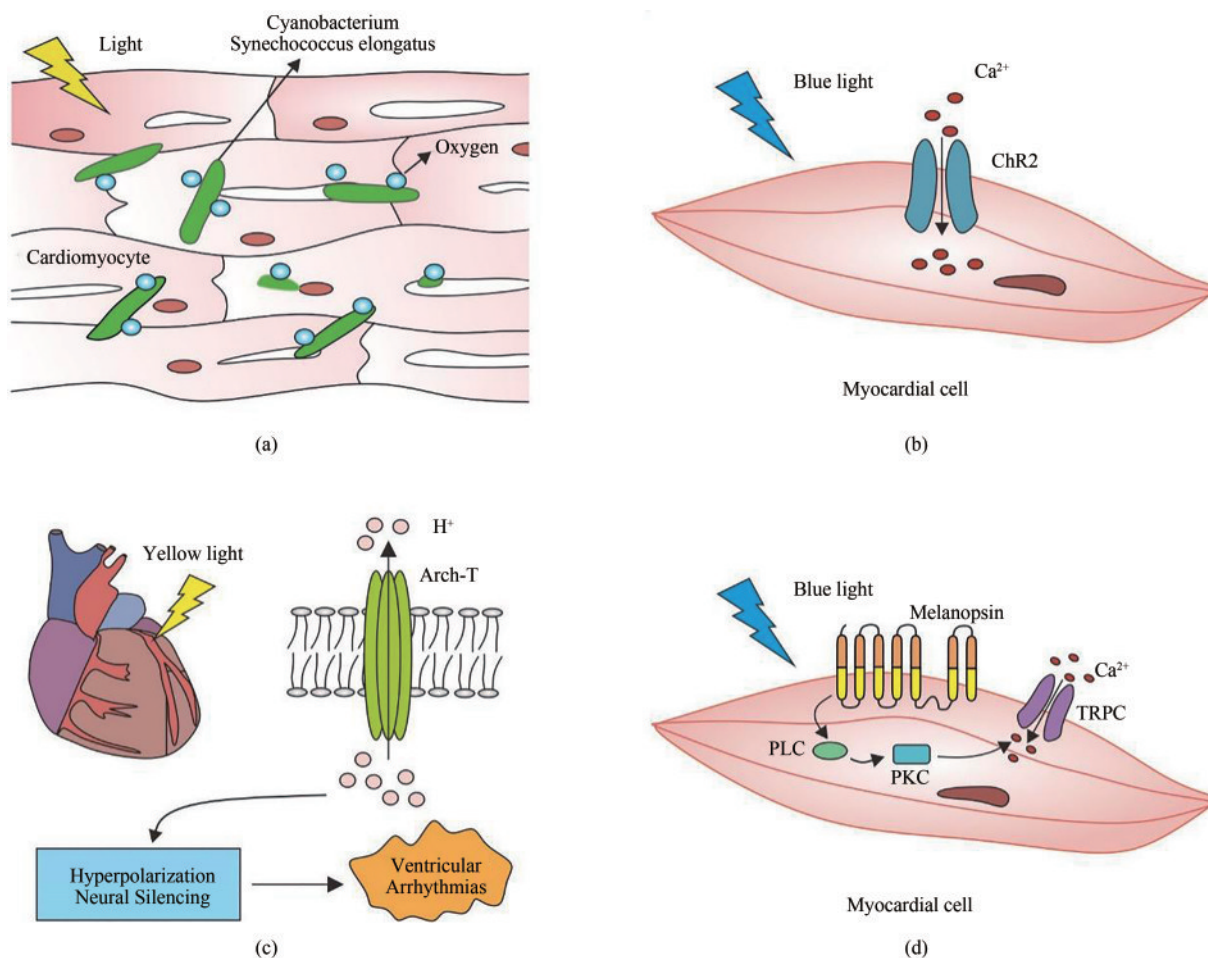


图7 光遗传学工具在心血管疾病中的应用

(a) 蓝细菌光合系统用于治疗心肌缺血。将蓝细菌直接注射于急性心肌梗死模型大鼠心脏内。光照条件下，蓝细菌在光合作用中产生氧气，增加心肌细胞代谢活性，改善心室功能，从而缓解急性组织缺血；(b) 光遗传学心脏起搏器。通过使用非选择性阳离子通道 ChR2 来控制心脏的兴奋性，从而实现光控心脏起搏；(c) 抑制性光敏蛋白系统在心血管疾病中的应用。在黄光照射条件下，Arch-T 促使  $H^+$  外流，抑制心肌活性，缓解心律失常；(d) 调节心肌细胞活性的光遗传起搏器。视黑素是一种光激活的 G 蛋白偶联受体，在 470 nm 蓝光照射下，能够激活磷脂酶 C 活性，催化 PIP<sub>2</sub> 水解产生 IP<sub>3</sub>，导致  $Ca^{2+}$  释放，增强心肌细胞的起搏活性

Fig. 7 Applications of optogenetic tools in treating cardiovascular diseases

(a) Cyanobacterial photosynthetic systems for myocardial ischemia treatment. The cyanobacteria are injected into the hearts of the acute myocardial infarction model rats to produce oxygen through photosynthesis under light illumination conditions, which increases the metabolic activity of cardiomyocytes to improve ventricular function and alleviate acute tissue ischemia. (b) Optogenetic pacemakers. The non-selective cation channel ChR2 is used to control the cardiac excitability. (c) Inhibitory photosensitive protein systems for cardiovascular diseases treatment. ARCH-T mediated  $H^+$  efflux can inhibit myocardial activity and alleviate arrhythmia under yellow light illumination. (d) Optogenetic pacemakers for modulating cardiomyocyte activity. Melanopsin, a photoactivated G-protein-coupled receptor, activates the phospholipase C and catalyzes the hydrolysis of PIP<sub>2</sub> to produce IP<sub>3</sub>, enabling release of  $Ca^{2+}$  and enhancement of the pacing activity of cardiomyocytes under blue light (470 nm) illumination conditions.

病理条件下均起着重要的作用<sup>[159-160]</sup>。2014年，Beiert等<sup>[161]</sup>开发了一种基于视黑素蛋白的光遗传学工具，在470 nm蓝光照射下，能够激活磷脂酶C活性，催化PIP<sub>2</sub>水解生产IP<sub>3</sub>，导致 $Ca^{2+}$ 释放，增强心肌细胞的起搏活性，并能够在体外和体内以高时空分辨率研究Gq信号级联对心肌细胞起搏的影响<sup>[161]</sup> [图7(d)]。

## 5 在糖尿病治疗中的应用研究

糖尿病严重影响着人类的健康，目前，糖尿病患者主要是通过口服降糖药物、注射胰岛素或GLP-1进行治疗，但是这些方法给患者的生活带来了极大的不便，胰岛素注射不当会导致低血糖风险的产生。因此，研究者们通过合成生物学的

方法, 开发出了治疗糖尿病的新策略, 包括使用小分子物质 (咖啡因和齐墩果酸)<sup>[13, 162]</sup>、葡萄糖感受器<sup>[163]</sup>、胰岛素感受器、蓝光以及磁诱导的基因环路来进行治疗。光遗传学具有非侵入性和时空特异性优势, 在上述新兴治疗方法中脱颖而出。

2011年, 苏黎世联邦理工学院的 Martin Fussenegger 团队<sup>[7]</sup>开发了蓝光调控的转基因表达系统, 并将其应用于二型糖尿病的治疗。该团队将来自于视网膜神经细胞中的视黑素光敏蛋白表达于 HEK-293 细胞中, 在蓝光刺激下, 视黑素蛋白构象发生变化并引起下游信号通路的变化, 导致细胞膜上的钙离子通道打开, 使大量钙离子内流, 激活下游 NFAT 信号通路, 诱导 NFAT 特异性识别的人工启动子, 启动下游胰高血糖素样肽 (GLP-1) 的表达 [图 8(a)]。研究人员将包含该系统的定制化细胞经微胶囊包裹后移植到 db/db 二型糖尿病小鼠体内, 通过蓝光诱导, 成功实现了对 db/db 小鼠的血糖稳态的控制。该方法首次将光遗传学应用于糖尿病治疗, 为糖尿病的治疗提供了新思路。2012年, 华东理工大学的杨弋团队<sup>[8]</sup>报道了基于 Vivid 蛋白的蓝光控制转基因表达系统, 并将其用于一型糖尿病的治疗。蓝光照射下, Vivid 蛋白形成二聚体, 使 Gal (第 1~65 位氨基酸) 二聚化后特异性识别含有 5×UAS 操纵序列的人工启动子序列并启动下游胰岛素基因的表达。他们将该系统的质粒使用流体动力学尾静脉注射方法注射并转染小鼠肝脏细胞, 蓝光照射后, 糖尿病小鼠的血糖显著下降。然而蓝光的组织透性较差, 为了解决这一问题, 该团队在此基础上与叶海峰团队<sup>[164]</sup>合作开发了一种基于 BRET (生物发光能量共振转移) 的 LuminON 基因表达调控系统 [图 8(b)]。在该系统中, 研究者将荧光素酶与光敏元件融合表达, 在加入底物 Furimazine 后, 荧光素酶即可催化该底物并发出 460 nm 波长的蓝光, 从而激活光敏元件, 启动目的基因的转录与表达。该系统无需外部光源的照射, 避免了蓝光在体内穿透性差的问题。研究者们利用 LuminON 系统调控胰岛素的表达, 实现了在糖尿病小鼠餐后血糖稳态的控制。此外, 离子通道型光敏蛋白 ChR2 也被用于糖尿病血糖的控制, ChR2 可以在蓝光照射下引起细胞钙离子内流, 从而促进胰岛素的释放。

2014年, 研究人员利用 ChR2 实现了蓝光控制的胰岛素释放<sup>[165]</sup>。次年, 研究人员将 ChR2 蛋白转入胰岛细胞 (MIN6) 中, 在蓝光刺激下, ChR2 蛋白被激活, 引发 Ca<sup>2+</sup>内流介导的胰岛素释放, 在糖尿病小鼠中实现了光照降血糖。然而由于 MIN6 细胞还可以感应葡萄糖刺激, 因此易受到外界葡萄糖的干扰, 绝缘性较差<sup>[166]</sup>。

远红光具有组织透性强、无毒副作用的特点, 在体内应用中具有更广泛的应用价值。2017年, 华东师范大学的叶海峰团队<sup>[13]</sup>开发了一套基于远红光响应的糖尿病血糖稳态控制系统。在远红光照射下, BphS 将 GTP 转化为 c-di-GMP, 从而使 p65-VP64-BldD 转录因子二聚化, 并结合到特异性启动子上激活基因的表达。通过将远红光系统与电子工程学、软件工程学进行结合, 研究者在 db/db 小鼠中实现了血糖依赖性降血糖药物释放, 达到了半自动化控制小鼠血糖稳态的效果<sup>[13]</sup>。2022年, 该团队在此基础上构建了远红光激活的类胰岛定制化细胞 (FAID) 用于长期血糖稳态控制, 在糖尿病小鼠中实现了 40 多天的血糖稳态控制, 同时改善了小鼠的氧化应激水平、减轻了糖尿病相关的并发症<sup>[67]</sup>。同年, 该团队开发了一个模块小且高度灵敏的响应红光和远红光的光遗传学工具——REDMAP, 并将其用于一型糖尿病的治疗<sup>[71]</sup> [图 8(c)]。在红光照射下, 光敏蛋白二聚, 转录激活子随即被招募到启动子附近诱导降糖药物胰岛素的表达。研究人员将含有 REDMAP 系统的工程化细胞通过微胶囊包裹后, 皮下移植到糖尿病鼠的背部, 并进行光照诱导胰岛素表达控制血糖。该系统灵敏度高, 只需要早晚各一分钟光照就可以达到降低小鼠血糖的目的, 与现有系统相比极大地缩短了光照时间。同时, 研究人员也在糖尿病大鼠中验证了该系统通过短时间光照控制血糖水平的能力, 为光控糖尿病治疗提供了一种更加便捷、可行的手段, 推动了光遗传学技术在糖尿病治疗中的应用。

## 6 在肠道疾病治疗中的应用研究

肠道菌群在维持肠道正常结构及生理功能、抵抗病原菌感染以及参与免疫调节等方面均发挥

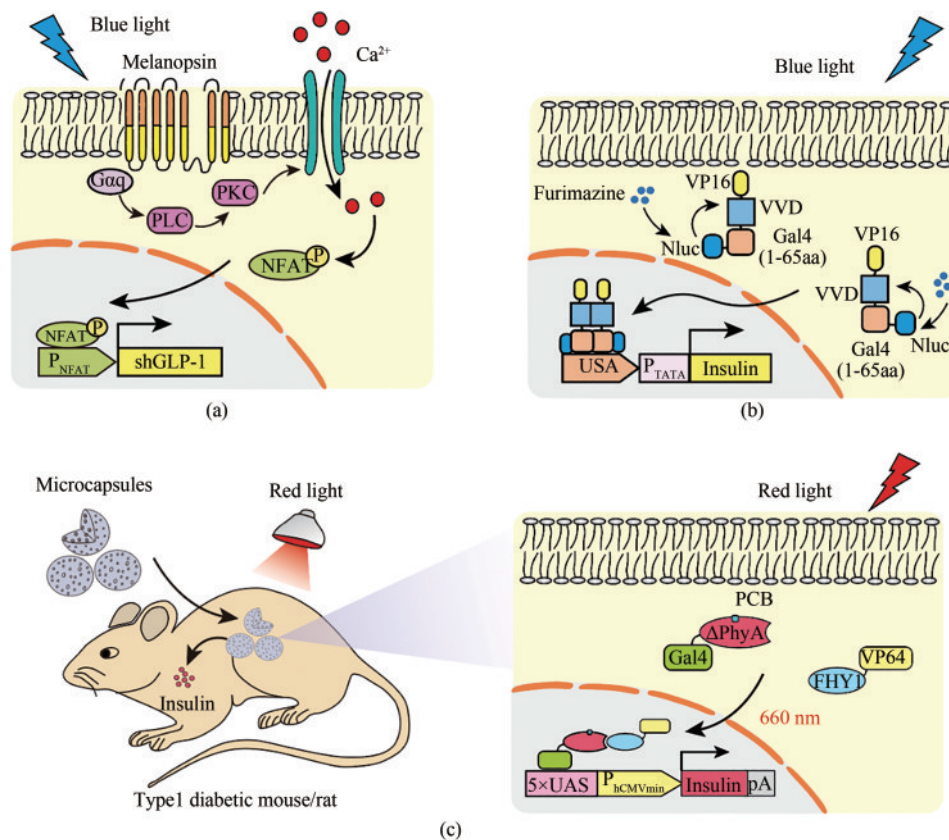


图8 治疗糖尿病的光遗传学工具

(a) 基于视黑素的蓝光调控系统对糖尿病的治疗。在蓝光的刺激下，视黑素 (Melanopsin) 构象发生改变，从而活化G蛋白 (Gαq)，磷脂酶C (PLC) 和磷酸激酶C (PKC)，导致瞬时受体电位离子通道 (TRPCs) 和胞内细胞器 (内质网) 钙离子通道打开，引起钙离子的快速内流，使NFAT磷酸化并入核，从而激活NFAT响应的启动子 ( $P_{NFAT}$ )，启动 *GLP-1* 基因的表达，达到控制血糖稳态的效果。(b) 基于光-氧-电压结构域的光受体蛋白对糖尿病的治疗。加入底物后，荧光素酶催化发出蓝光，光敏蛋白Vivid二聚化，与其相连的Gal4 (1-65 aa) 识别结构域随之发生二聚，入核并作用于其DNA结合位点5×UAS操纵序列上，与其融合的转录激活子VP16招募转录因子激活胰岛素的表达，从而达到降血糖的效果。(c) 基于 $\Delta$ PhyA的红光调控系统对糖尿病的治疗。红光刺激下， $\Delta$ PhyA-GAL4与FHY1-VP64二聚结合形成复合体，入核并作用于其DNA结合位点5×UAS操纵序列上启动胰岛素的表达。将含有该系统的工程化细胞通过微胶囊包裹移植到糖尿病鼠的背部皮下，并给予光照，实现了红光介导的血糖稳态控制

Fig. 8 Optogenetic tools for diabetes therapy

(a) Melanopsin-based blue light regulatory systems for diabetes treatment. Upon blue light stimulation, the melanopsin conformation is changed, thereby activating phospholipase C (PLC) through G protein (Gαq) and phospholipase C (PLC), which triggers  $Ca^{2+}$  influx by the activation of transient receptor potential ion channels (TRPCs) on the cell membrane and from the endoplasmic reticulum (ER). The activated NFAT translocates into the nucleus, and binds to its specific promoter ( $P_{NFAT}$ ), which initiates the *GLP-1* gene expression to control blood glucose homeostasis. (b) The light-oxygen-voltage domain-based blue light regulatory system for diabetes treatment. In the presence of substrate, blue light is produced by the luciferase-catalyzed reaction, leading to the dimerization of the photosensitive protein Vivid. The DNA binding domain Gal4 (1-65 aa) fuses with Vivid and VP16 for incorporation into the nucleus to bind to the DNA operator ( $5 \times UAS$ ), which initiates the expression of insulin to control blood glucose homeostasis. (c)  $\Delta$ PhyA-based red light regulatory systems for diabetes treatment. Under red light illumination, the hybrid transactivator FHY1-VP64 can be translocated into nucleus by photosensitive DNA binding elements ( $\Delta$ PhyA-Gal4), in which it can bind to a particular operon sequence ( $5 \times UAS$ ) to initiate the expression of insulin. The microcapsules containing engineered cells are implanted into the back of diabetic mice, through which the cells can be induced to produce insulin to control blood glucose homeostasis under red light illumination conditions.

着重要作用，其分泌的化学物质与肠道正常功能及机体免疫能力的维持息息相关<sup>[167]</sup>。人类的许多疾病包括炎症性肠病、糖尿病、肥胖、免疫力低下等都与肠道菌群的紊乱有关<sup>[168]</sup>。精准调控原位

肠道细菌代谢，对由于肠道菌群失调引起的疾病具有重要意义<sup>[169]</sup>。光遗传学为体外无创调控工程菌的代谢及定植提供了全新的策略。

2020年，王汉杰课题组<sup>[170]</sup>设计构建了光诱导

的基因工程微生物纳米系统。研究人员利用蓝光敏感的pDAWN系统,构建了蓝光响应的工程菌,该工程菌在蓝光的刺激下可诱导目的基因的表达。随后,研究人员通过一种上转换纳米材料(upconversion rods, UCRs)的光转换特性,将近红外光转化为蓝光,诱导工程菌表达免疫因子TGF- $\beta$ 1,实现了对溃疡性结肠炎的有效抑制<sup>[170]</sup>。随后,该团队进一步构建了肠道定植的光响应工程菌,实现了*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)在肠道的定植<sup>[171]</sup>。通过UCRs将近红外光转变成蓝光,在小鼠体内实现了光诱导抗炎因子的表达,改善了葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的慢性结肠炎相关症状。近期,该团队利用乳酸乳球菌为底盘,设计构建了蓝光响应的工程菌,并利用小肠靶向的微球系统将工程菌递送至肠道<sup>[172]</sup>。实验表明:在焦虑模型小鼠中,蓝光诱导分泌 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的乳酸乳球菌(LL-GABA)可以一定程度缓解小鼠焦虑症状;在帕金森综合征模型小鼠中,蓝光诱导分泌粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的乳酸乳球菌(LL-G-CSF)可以缓解帕金森症状。此外,蓝光诱导分泌胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的乳酸乳球菌(LL-GLP-1),光诱导表达的GLP-1可通过刺激肠神经激活迷走神经通路,从而诱发脑内神经元兴奋。

## 7 在基因编辑、基因转录调控表达中的应用研究

众所周知,生命的密码蕴藏在基因中,基因储存着生命生长、发育、繁殖、衰老等过程的全部信息,决定着生命的基本构造和性能。现代医学研究证明,除外伤外,几乎所有疾病的发生都与基因密切相关。因此,能够精确地操控基因对我们认识复杂的生命系统以及医学的发展具有重大意义<sup>[173]</sup>。

### 7.1 基于Cre重组酶的基因重组应用研究

位点特异性重组酶系统是基因组工程研究中强有力的基因操纵工具,其中Cre重组酶系统是最常用的,它能够催化两个loxP位点之间的DNA发

生删除、插入、翻转、替换等特异性DNA操控<sup>[174]</sup>。近年来,为了实现时空特异性精准控制的基因重组,研究者们开发出了蓝光、远红光调控的Cre-loxP系统。2010年,杜克大学的Chandra L Tucker研究团队<sup>[54]</sup>最早开发出了蓝光调控的基于隐花色素CRY2-CIBN蛋白的分割型Cre系统。该系统将Cre重组酶分割成N端(CreN,第19~104个氨基酸)和C端(CreC,第106~343个氨基酸)两部分,并分别与光敏隐花色素2(CRY2)以及CRY2的配体蛋白CIBN融合,形成CRY2-CreN和CIBN-CreC两种融合蛋白。只有在蓝光照射情况下,CRY2发生构象变化并与CIBN蛋白结合,才会使CreN和CreC结合形成完整Cre重组酶,进而执行基因重组功能[图9(a)],然而该系统的基因重组效率较低。2016年,东京大学的Moritoshi Sato团队<sup>[83]</sup>开发了另一种蓝光调控的分割型Cre重组酶系统(命名为PA-Cre),同样利用蓝光响应的来源于丝状真菌(*Neurospora crassa*)的二聚化蛋白nMag和pMag分别与CreN和CreC融合,在蓝光的照射下实现高度时空特异性精确诱导基因重组[图9(b)]。

然而蓝光的毒性以及透皮性问题限制了这类系统的转化研究和临床应用,因此需要开发更先进的光控Cre重组酶系统。2020年,叶海峰团队<sup>[66]</sup>开发了一个远红光调控的Cre-loxP重组酶系统(命名为FISC),该系统是基于该团队在2017年开发的BphS-BldD远红光调控转基因表达系统,由响应远红光的光敏蛋白BphS,响应c-di-GMP的BldD蛋白,来自热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)的自发相互作用蛋白Coh2、DocS以及Cre重组酶组装拼接而成。同样将Cre重组酶分成CreN59(第1~59个氨基酸)和CreC60(第60~343个氨基酸)两部分,其中CreN59与Coh2蛋白融合被组成型启动子表达,CreC60与DocS蛋白融合被远红光诱导表达,分割的Cre重组酶在Coh2与DocS蛋白的自发相互作用下重新形成有功能的完整Cre重组酶,进而诱导基因重组<sup>[66]</sup>[图9(c)]。利用远红光具有低毒、高度时空特异和强组织穿透性的优势,该系统成功实现了小鼠体内基因的精确改造,并表现出更高的重组效率。

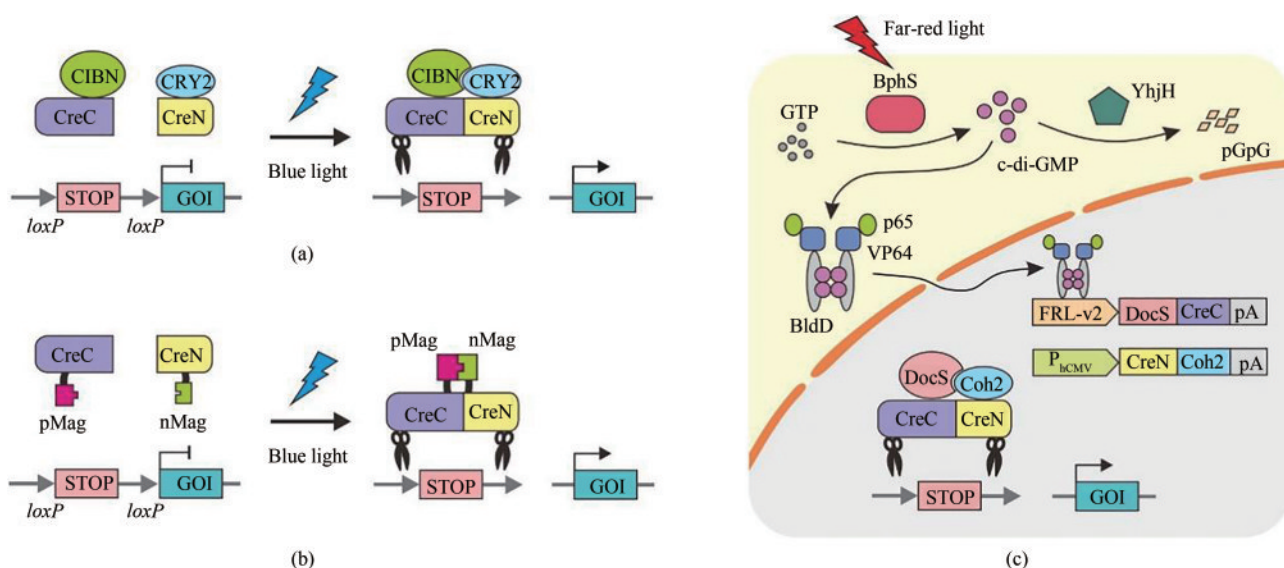


图9 基于 split-Cre 重组酶的光控基因重组系统

(a) 基于 CRY2-CIBN 的光控 Cre 重组酶系统。黑暗状态下，由于 CreC 和 CreN 被分成无活性的两部分，因而不具有基因重组功能。在蓝光照射下，CRY2 发生构象改变与 CIBN 结合，拉动 CreC 和 CreN 形成完整有活性的 Cre 重组酶对相关基因进行重组。(b) 基于 pMag-nMag 的光控 Cre 重组酶系统。在蓝光照射下，pMag 与 nMag 结合，拉动 CreC 和 CreN 形成完整的 Cre 重组酶，进而对相关基因进行重组。(c) 基于 BphS-BldD 的远红光调控基因重组系统 (FISC 系统)。在远红光的照射下，光敏蛋白 BphS 将细胞中的 GTP 转变成 c-di-GMP，引发融合了转录激活子 p65-VP64 的 BldD 蛋白二聚化入核，激活 DocS-CreC 融合蛋白的表达。CreN-Coh2 融合蛋白则由 CMV 启动子强启动表达。CreN 和 CreC 在 Coh2-DocS 两个自发强相互作用蛋白的拉动下结合形成完整 Cre 重组酶，进而行使功能

Fig. 9 Light-controlled DNA recombination based on split-Cre recombinase

(a) Photoactivatable Cre recombinase systems based on Cry2-CIBN. Under dark conditions, Cre recombinase is dissociated into two inactive parts. Under blue light illumination, CRY2 undergoes a conformational change and binds to CIBN, which induces CreC and CreN to form a complete Cre recombinase for restoration of its activity. (b) Photo-controlled Cre recombinase systems based on Magnet (pMag and nMag). Blue light illumination enables the dimerization of pMag and nMag to reconstitute a complete Cre recombinase to permit light-dependent DNA recombination. (c) A far-red light-inducible split Cre-*loxP* (FISC) system. Under far-red light illumination, the photosensitive protein BphS converts GTP into c-di-GMP within cells, which triggers the dimerization of BldD to fuse with transcriptional activator p65-VP64 for translocation into the nucleus to initiate the expression of DocS-CreC. Constitutive expressed CreN-Coh2 is driven by the CMV promoter. The catalytic activities of Cre recombinase can be restored through affinity interactions of their respective Coh2 and DocS fusion domains.

## 7.2 基于 CRISPR-Cas9 技术的基因编辑应用研究

近年来，CRISPR-Cas9 基因编辑技术因其高效、操作简便、成本低而备受科学界瞩目。该系统由 Cas9 核酸酶和单链向导 RNA (sgRNA) 构成，二者形成的复合物在 sgRNA 的引导下识别目标 DNA 序列并引发 DNA 的双链断裂，而后机体通过非同源末端连接 (NHEJ) 和同源重组修复 (HDR) 两种方式对断裂的 DNA 进行修复。该技术对于基因功能的研究以及基因疾病的治疗具有重要意义。然而，CRISPR-Cas9 技术由于不可控性导致的脱靶效应却极大地限制了它的临床应用，因此，研究者们开发了一系列可控的 CRISPR-Cas9 系统。最早期开发的可控 CRISPR-Cas9 系统是由

抗生素类化学药物调控的系统，包括四环霉素调控系统<sup>[175]</sup>、雷帕霉素调控系统<sup>[176]</sup>、4-羟基他莫昔芬调控系统<sup>[177-178]</sup>等，但这些化学药物都存在副作用，一旦进入体内，不能被快速清除。因此，光控 CRISPR-Cas9 系统被开发出来，可实现时空特异性精准的基因编辑控制。2015 年，东京大学的 Moritoshi Sato 研究团队<sup>[19]</sup>开发了一个蓝光调控的分割型 CRISPR-Cas9 系统 (命名为 pa-Cas9)，该系统是将 Cas9 分割成 N 端 (NCas9，第 2~713 个氨基酸) 和 C 端 (CCas9，第 714~1368 个氨基酸) 两部分，同样利用蓝光响应的二聚化蛋白 pMag 和 nMag 分别与 NCas9 和 CCas9 融合，在蓝光的照射下实现高度时空特异性精确诱导基因编辑 [图 10(a)]。2016 年，Sangeeta N. Bhatia 研究团

队<sup>[21]</sup>开发了一个紫外光调控的CRISPR-Cas9系统,该系统设计了一个可以阻遏sgRNA与目标DNA结合的寡核苷酸链:在非激活状态下,该寡核苷酸链与sgRNA的种子序列互补结合,使sgRNA不能发挥引导功能;而在紫外光照射情况下,该寡核苷酸链被光切割分解,释放出sgRNA的种子序列,进而引导Cas9核酸酶切割DNA[图10(b)]。2021年,Zhou Yubin研究团队<sup>[48]</sup>构建了一个蓝光控制的CRISPR-Cas9抑制系统(LiCASINO),该系统将Cas9蛋白的抑制蛋白Acr II A4融合到cpLOV2的N端,在黑暗状态下,Acr II A4功能被cpLOV2阻碍。在蓝光照射下,Acr II A4暴露出来,从而抑制Cas9蛋白的切割功能。

然而,蓝光和紫外光这类短波长光的透皮性较差,仅能透过皮肤0.1~1 mm,在体内实际应用中很难较好地发挥功能,因此有研究者开发出了具有深层组织穿透性的近红外光、远红光调控的CRISPR-Cas9基因编辑系统。2019年,宋玉君研究团队<sup>[179]</sup>开发了一个近红外光(980 nm)调控系统,该系统需借助UCNPs将近红外光转换成紫外光来释放Cas9和sgRNA的复合物从而发挥基因编辑功能[图10(c)]。2020年2月,平渊研究团队<sup>[15]</sup>开发了一个第二近红外窗口光(NIR-II,1064 nm)调控的基因编辑系统。该系统包含两个主要成分:阳离子包被的金纳米颗粒(APC)和热诱导启动的Cas9质粒。APC具有高效转染效率,可以通过静电作用与热诱导Cas9质粒形成一个复合物并将其高效递送进入细胞。通过1064 nm激光的照射产生的热量来激活热诱导Cas9的表达,从而行使基因编辑功能[图10(d)]。

尽管纳米材料在一定程度上解决了光的组织透性问题,然而,纳米材料的光转化效率和对组织的潜在生物毒性限制了其进一步应用。因此,2020年,叶海峰团队<sup>[18]</sup>开发了一个远红光调控的分割型Cas9基因编辑系统(命名为FAST),该系统工作原理类似于上述FISC系统,将Cas9核酸酶的N端(第2~713个氨基酸)和C端(第714~1368个氨基酸)分别与Coh2蛋白、DocS蛋白融合。其中NCas9-Coh2融合蛋白由远红光诱导表达,而DocS-CCas9融合蛋白由CMV启动子启动表达。

因此,只有在远红光照射情况下,才会形成完整Cas9核酸酶发挥基因编辑功能<sup>[18]</sup>[图10(e)]。该系统仅由基因元件构成,仅需低强度的远红光LED灯照射即可激活,无需借助纳米材料,具有远程无痕、安全可控、时空特异性、适合体内应用的优势。

### 7.3 基于CRISPR-dCas9技术的基因转录应用研究

除基因组编辑外,调控基因组基因的转录表达对于研究复杂的基因网络以及疾病治疗应用同样具有重要的意义。尤其是CRISPR-Cas9技术诞生以后,研究人员发现Cas9核酸酶的突变版本dCas9(dead Cas9)通过与转录激活子或抑制子结合,能够具有激活或抑制特定基因转录的功能,因而成为操纵目标内源基因表达的有力工具<sup>[180-181]</sup>。2015年,Nihongaki等<sup>[182]</sup>开发了基于CRY2-CIB1蓝光调控系统的CRISPR-dCas9基因激活系统,该系统包含三种主要构件:dCas9和CIB1构成的融合蛋白,CRY2和转录激活子形成的融合蛋白,sgRNA。dCas9-CIB1融合蛋白在sgRNA的引导下会与目标DNA结合,当蓝光照射时,CRY2会与CIB1相互结合,拉动转录激活子至相应目标DNA处,激活基因的表达[图11(a)]。2017年,Nihongaki等<sup>[16]</sup>又开发了基于pMag-nMag蓝光调控系统的CRISPR-dCas9基因激活系统(命名为padCas9系统),该系统将pMag和nMag蛋白分别与分割型dCas9的N端和C端融合,只有在蓝光照射下才能形成完整有功能的dCas9,进而发挥转录激活功能[图11(b)]。研究人员还将该系统用于激活诱导性多能干细胞中的*NEUROD1*基因,使其分化为神经元<sup>[16]</sup>。2021年,Zhou Yubin团队<sup>[48]</sup>利用蓝光响应的*ssrA-cpLOV2/sspB*蛋白对,与CRISPR-dCas9系统联合,构建了蓝光控制的基因转录系统。

同样,为了克服蓝光系统的缺点,2018年,叶海峰团队<sup>[14]</sup>开发一种远红光调控的CRISPR-dCas9基因激活装置(命名为FACE),该系统仍基于BphS-BldD远红光调控转基因表达系统,通过远红光的照射表达出MS2-p65-HSF1转录激活子融合

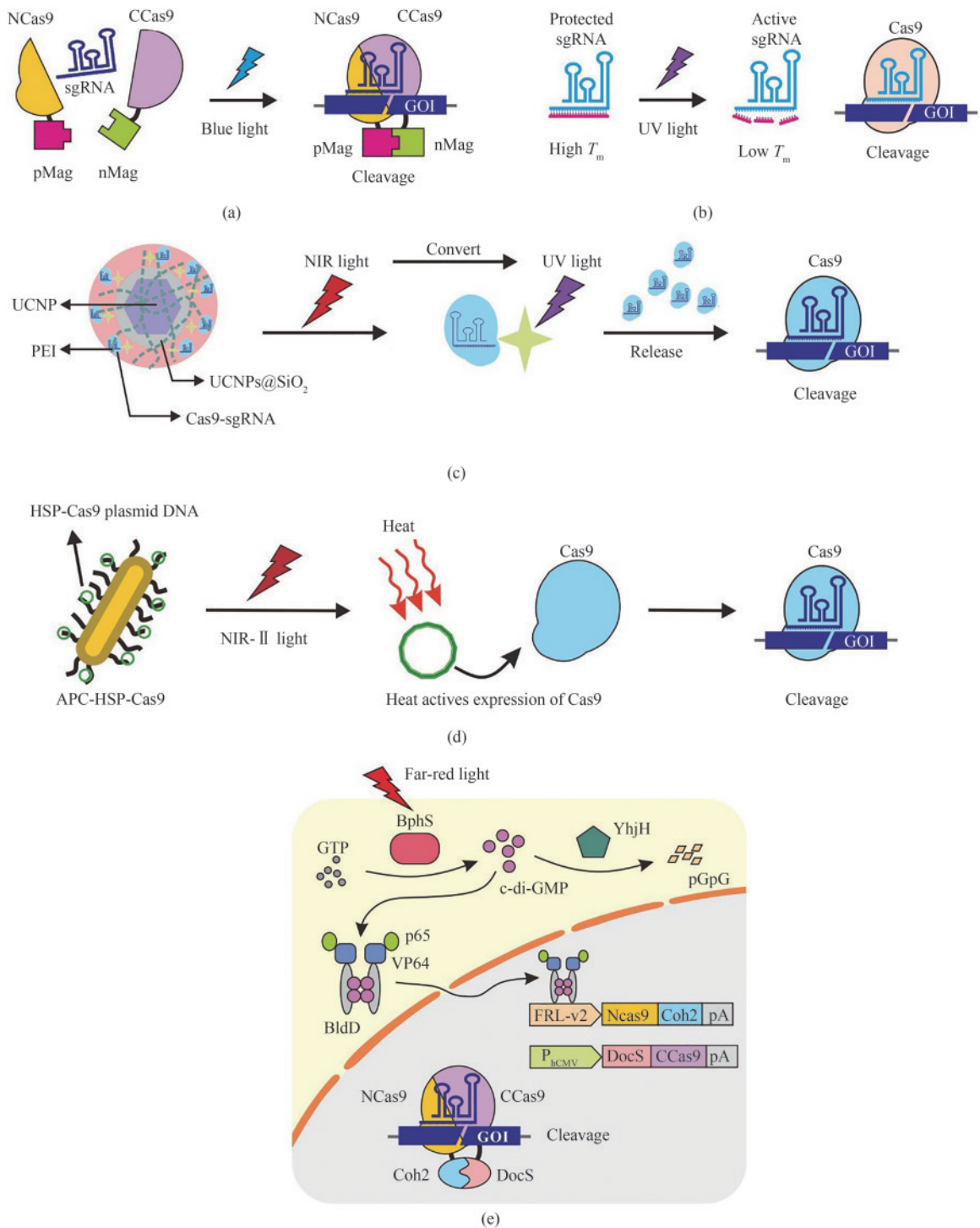


图10 基于CRISPR-Cas9的光控基因编辑系统

(a) 基于 pMag-nMag 的光控 CRISPR-Cas9 系统。黑暗状态下，NCas9 和 CCas9 以无活性状态存在，不具有活性；而在蓝光照射下，pMag 与 nMag 结合，拉动 NCas9 和 CCas9 形成完整的 Cas9 核酸酶对相关基因进行编辑。(b) 基于 Protected-sgRNA 的光控 CRISPR-Cas9 系统。在黑暗情况下，sgRNA 的种子序列被一个能被 365 nm 紫外光诱导切割的寡核苷酸链结合；在紫外光照射下，该寡核苷酸断裂，使 sgRNA 的种子序列暴露出来，从而引导 Cas9 切割相关 DNA。(c) 基于 UCNPs 材料的近红外光调控的 CRISPR-Cas9 系统。该系统将 Cas9-sgRNA 的复合物通过 PEI，SiO<sub>2</sub> 材料包裹在 UCNPs 材料外侧，UCNPs 可以将 980 nm 近红外光转换为紫外光，紫外光可引发 Cas9-sgRNA 复合物的彻底释放，进而对相关基因进行编辑。(d) 基于 APC 金纳米颗粒的第二近红外窗口光调控的 CRISPR-Cas9 系统。该 APC 金纳米颗粒可携带热诱导启动子启动的 Cas9 质粒，并将其高效运输至小鼠体内器官和组织。在 1064 nm 的第二近红外窗口光照射下，APC 金纳米颗粒可以将光能转化为热能，激活其携带的热启动质粒表达 Cas9 核酸酶，从而发挥基因编辑功能。(e) 基于 BphS-BldD 的远红光调控基因编辑系统

(FAST)。原理同图9(c), 远红光激活NCas9-Coh2融合蛋白的表达, CMV启动子驱动表达DocS-CCas9融合蛋白。NCas9和CCas9在Coh2-DocS两个自发强相互作用蛋白的拉动下结合形成完整的Cas9核酸酶, 进而行使基因编辑功能

**Fig. 10** Light-controlled gene editing systems based on CRISPR-Cas9

(a) Photoactivatable CRISPR-Cas9 systems based on pMag-nMag. Under dark conditions, Cas9 is splitted into two fragments without nuclease activity. With blue light illumination, the NCas9 and CCas9 domains can be reassociated to form a complete Cas9 by the light-dependent dimerization of pMag and nMag, thereby reconstituting editing for targeted genes. (b) Photoactivatable CRISPR-Cas9 systems based on protected sgRNA. Under dark conditions, the seed sequence of sgRNA is bound by an oligonucleotide that could be cleaved by UV light. With UV light illumination, the oligonucleotide is broken, and the seed sequence of sgRNA is exposed to allow Cas9 to bind to and cleave the target DNA. (c) Near-infrared light-regulated CRISPR-Cas9 systems based on UCNP. The Cas9-sgRNA complex is wrapped on the outside of UCNP by PEI and SiO<sub>2</sub>, which have the capability to convert near-infrared light (980 nm) to ultraviolet light for the Cas9-sgRNA complex to bind to target genes. (d) CRISPR-Cas9 systems based on APC gold nanoparticles. Cas9 plasmids carrying the heat-induced promoter can be efficiently delivered into mice by APC gold nanoparticles. Under near infrared light irradiation at 1064 nm, APC gold nanoparticles can convert light energy to heat, which activates the expression of Cas9 nuclease for genome editing. (e) A far-red light-activated split-Cas9 (FAST) system. The far-red light activates the expression of the fusion protein NCas9-Coh2, and the CMV promoter drives the expression of the fusion protein DocS-CCas9, which consequently activates Cas9 nuclease by heterodimerization between Coh2 and DocS.

蛋白从而发挥转录激活功能 [图11(c)]。该系统不仅可用于诱导性多能干细胞神经分化, 还可用于小鼠肌肉组织中基因的激活<sup>[14]</sup>。为了进一步提高内源基因转录的效率, 2022年, 叶海峰团队<sup>[71]</sup>利用REDMAP工具来调控MS2-p65-HSF1转录激活子的表达 [图11(d)], 只需要1s的光照即可激活内源基因的高效转录表达。此外, 研究人员将该工具导入到小鼠的肝脏和肌肉中, 实现了在小鼠深部组织内基因的转录激活。

#### 7.4 基于CRISPR-Cas12a/dCas12a技术的基因编辑和基因转录应用研究

Cas12a是Cas蛋白家族的成员, 属于II类V型核酸酶, 可以在CRISPR-derived RNA (crRNA)的引导下识别目标DNA序列并引发DNA的双链断裂, 无需tracrRNA的协助<sup>[183-184]</sup>。此外, 与识别富含G碱基的PAM序列的Cas9蛋白不同, Cas12a识别富含T碱基的PAM序列, 与Cas9蛋白互为补充, 扩展了CRISPR技术在基因编辑领域的应用范围<sup>[185-186]</sup>。为了提高基因编辑的可控性和精准性, 来自东京大学的Moritoshi Sato研究团队<sup>[187]</sup>设计了一个蓝光诱导的分割型的Cas12a平台。首先, 研究者筛选了Cas12a蛋白的分割位点, 并通过小分子调控的二聚化系统验证核酸酶活性, 最终将Cas12a蛋白分为N端的730个氨基酸 (NCas12a) 和C端的498个氨基酸 (CCas12a) 并具有良好的可调节性。随后, 研究人员将两部分Cas12a蛋白分

别与Magnets系统的两个光敏蛋白融合表达, 在蓝光照下, 光敏蛋白二聚, 使得分割的Cas12a蛋白重新结合并恢复核酸酶活性, 进而实现时空特异性的基因编辑 [图12(a)]。

为了进一步扩大CRISPR-Cas12a在体内的应用价值, 2021年, 华东师范大学叶海峰研究团队<sup>[188]</sup>开发了一个远红光调控的CRISPR-Cas12a基因编辑系统 (命名为FICA), 实现了对多种基因的高效切割。研究者利用远红光诱导Cas12a蛋白的表达, 在crRNA的帮助下, Cas12a蛋白结合靶基因并进行高效的切割 [图12(b)]。此外, 研究人员利用SunTag技术, 开发了远红光调控的CRISPR-dCas12a基因激活系统 (命名为FIdCA)<sup>[188]</sup>。在远红光照射下, dCas12a-GCN4被表达出来, 并在crRNA的引导下结合到靶序列上, 同时GCN4招募合成的转录激活子scFv-p65-HSF1, 进而激活目的基因的转录 [图12(c)]。利用FIdCA系统, 研究人员成功实现了对内源基因HBB的高效激活, 并在小鼠体内验证了该系统激活基因转录的能力。

#### 7.5 RNA水平的基因表达调控研究

相对于DNA水平的调控, 在RNA水平上的操纵不会改变基因组的信息, 具有更加安全的特点。此外, 时空特异性操纵RNA对于理解活细胞中RNA的生理功能至关重要。来自德国波恩大学的Andreas Möglich研究团队<sup>[189]</sup>从放线菌

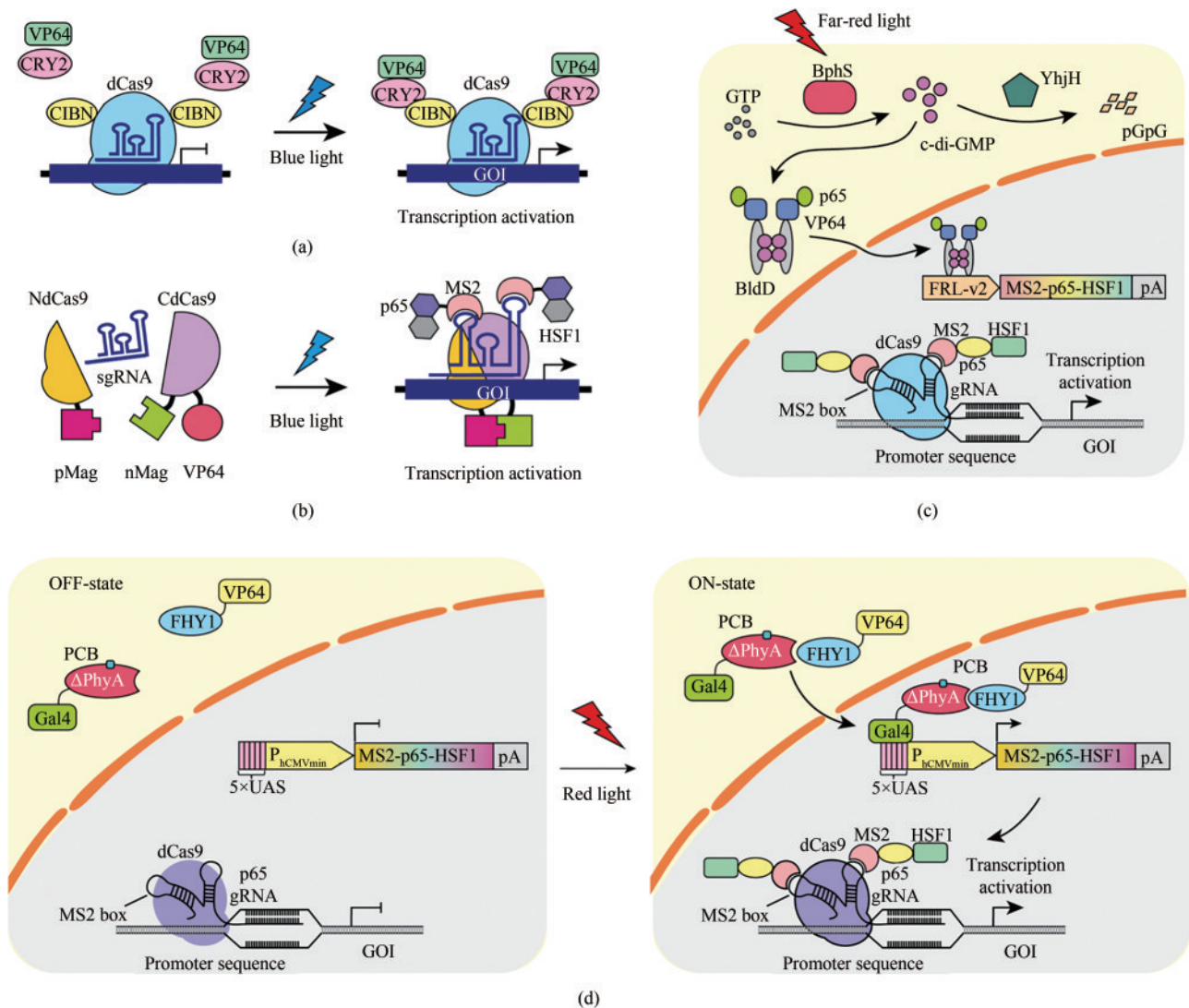


图 11 基于 CRISPR-dCas9 的光控基因转录系统

(a) 基于 CRY2-CIBN 的光控 dCas9 基因转录系统。黑暗情况下，N 端 dCas9 和 C 端 dCas9 处于无活性的分离状态；当蓝光照射时，CRY2 发生构象改变与 CIBN 结合，带动融合在 CRY2 蛋白上的转录激活子 VP64 激活下游基因的表达。(b) 基于 SAM 和 pMag-nMag 的蓝光调控 dCas9 基因转录系统。SAM 是指在 sgRNA 的茎环结构上插入了能被 MS2 蛋白识别的 MS2-box 序列，使得融合了 p65-HSF1 复合型转录激活子的 MS2 蛋白可以发挥转录激活的功能。在蓝光的照射下，由 pMag 和 nMag 蛋白的相互作用拉动 N 端 dCas9 和 C 端 dCas9 结合形成完整有活性的 dCas9，并在 SAM 系统的作用下就激活相关基因转录表达。(c) 基于 SAM 和 BphS-BldD 的远红光调控基因转录系统 (FACE 系统)。黑暗状态下，无法激活基因转录；只有在远红光的照射下，才可诱导 SAM 系统的 MS2-p65-HSF1 融合蛋白表达，进而通过 sgRNA-dCas9 系统的定位作用激活相关基因的表达。(d) 基于 REDMAP 的光控 dCas9 基因转录系统。黑暗状态下，无法激活基因的转录；在红光的照射下， $\Delta$ PhyA 与 FHY1 形成异源二聚体，启动 SAM 系统的 MS2-p65-HSF1 融合蛋白的表达；进而通过 sgRNA-dCas9 系统的定位作用实现对靶基因的转录激活

Fig. 11 Light-controlled gene transcription systems based on CRISPR-dCas9

(a) Photoactivable dCas9-mediated transcription systems based on CRY2-CIBN. Under dark conditions, dCas9 is splitted into two fragments without catalytic activity. With blue-light illumination, CRY2 undergoes a conformational change that enables interactions with CIBN, which causes translocation of the transactivator VP64 to activate downstream gene transcription. (b) Blue light-controlled dCas9-mediated gene transcription systems based on SAM and pMag-nMag. SAM, a synergistic activation mediator that extends guide RNAs with an insertion of a MS2-box sequence into the loop of gRNA, can recruit effector protein to initiate gene transcription. Under blue-light illumination conditions, the NdCas9 and CdCas9 domains can be reassociated to form a complete dCas9 by the light-dependent dimerization of pMag and nMag, thereby activating the downstream gene transcription. (c) A far red light-controlled gene transcription system based on SAM and BphS-BldD. Under far-red light illumination conditions, the fused protein MS2-p65-HSF1 can express to activate the target gene transcription. (d) Light-controlled dCas9-mediated gene transcription systems based on REDMAP. Under red-light illumination conditions, the heterodimerization of  $\Delta$ PhyA and FHY1 enables the expression of the fused protein MS2-p65-HSF1 to activate endogenous gene expression by sgRNAs-mediated recruitment of the transcriptional activator domain.

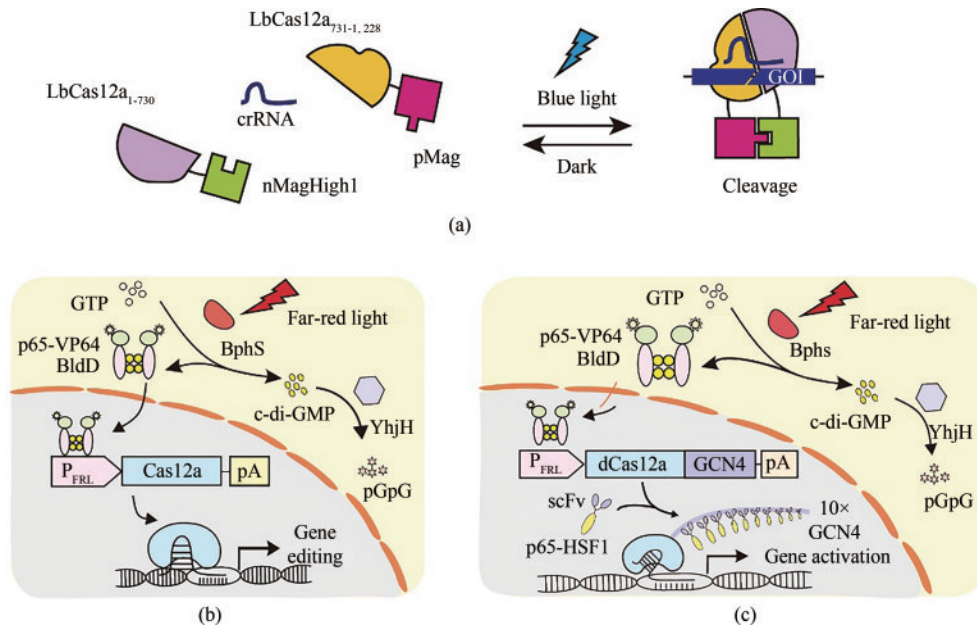


图12 基于CRISPR-Cas12a/dCas12a技术的光控基因转录和基因编辑系统

(a) 蓝光诱导的分割型 Cas12a 基因编辑系统。在蓝光照射下，光敏蛋白 pMag 与 nMagHigh1 形成二聚体，拉动 N 端 LbCas12a 和 C 端 LbCas12a 结合形成完整的 Cas12a，使其恢复核酸酶活性，并在 crRNA 的引导下实现对目的 DNA 的切割。(b) 远红光调控的 Cas12a 基因编辑系统。光敏蛋白 BphS 在远红光照射下将 GTP 转化为 c-di-GMP，使得人工合成的转录激活子 p65-HSF1-BldD 同源二聚，并转位到细胞核内与操作子结合，诱导 Cas12a 表达，并在 crRNA 的引导下切割目的 DNA。(c) 基于 SunTag 和 BphS-BldD 的远红光调控的 dCas12a 基因转录系统。同样地，SunTag 系统中的 dCas12a-GCN4 只有在远红光照射时才可以表达，通过招募 scFv 融合表达的激活子，在 crRNA 的引导下靶向目的基因位点，实现对靶基因的激活

Fig. 12 Light-controlled gene transcription and editing systems based on CRISPR-Cas12a/dCas12a

(a) Blue light-controlled split-Cas12a gene editing systems. Under blue-light illumination conditions, pMag and nMagHigh1 that are fused to dCas12a are reassociated by the dimerization of pMag and nMag, thereby recovering the catalytic activity of Cas12a to cleave the target DNA sequence. (b) Far-red light-controlled Cas12a gene editing systems. Under far-red light illumination conditions, BphS can convert GTP into c-di-GMP to trigger the dimerization of p65-HSF1-BldD for binding with the operator to induce the expression of Cas12a for targeted genome cleavage. (c) Far-red light-controlled gene transcription systems based on SunTag and BphS-BldD. Under far-red light illumination conditions, the expression of the fusion protein dCas12a-GCN4 can be induced to activate the target gene transcription by the recruitment of the transactivator fused with ScFv.

*Nakamurella multipartita* 中鉴定出了一种能够在蓝光刺激下结合特定 RNA 序列的光蛋白 PAS-ANTAR-LOV，并将其命名为 PAL。研究者通过对 RNA 适配体的多重优化和筛选，最终获得了与 PAL 特异性结合能力最优的 RNA 序列 (53.19 适配体)，并将其应用于转录的调控。研究人员将这段特异性的 RNA 插入到 mRNA 的 5' UTR 区，在蓝光照射下，PAL 蛋白可以与之特异性结合，从而抑制 mRNA 的翻译，而在黑暗状态下，PAL 蛋白解离，恢复蛋白的表达，实现了在 RNA 水平上的光控基因表达<sup>[189]</sup> [图 13(a)]。同年，该团队进一步拓展了 PAL 蛋白的功能，用于 miRNA 和 shRNA 的功能调控，为光遗传学在 RNA 水平的调控奠定了基础<sup>[190]</sup>。

2022 年，华东理工大学的杨弋团队<sup>[191]</sup> 将转录

抗终止蛋白 LicT 中能够特异性结合 RNA 序列的 CAT 结构域 (Coantiterminator) 与 VVD 蛋白融合，构建了一个蓝光响应的 RNA 结合蛋白 (LicV)。在蓝光照射下，VVD 蛋白二聚，从而使得 CAT 蛋白形成稳定的二聚体，并结合核糖核酸抗终止子 (RAT) RNA 序列 [图 13(b)]。研究者通过对该工具进行理性设计和扩展，实现了对 RNA 的定位、剪接、翻译和稳定性的时空特异性调控，为光遗传学在 RNA 功能调控方面的应用提供了一个强有力的新工具。

## 8 在控制细胞器的移动和定位中的应用

众所周知，细胞器在细胞中的转运和分布对

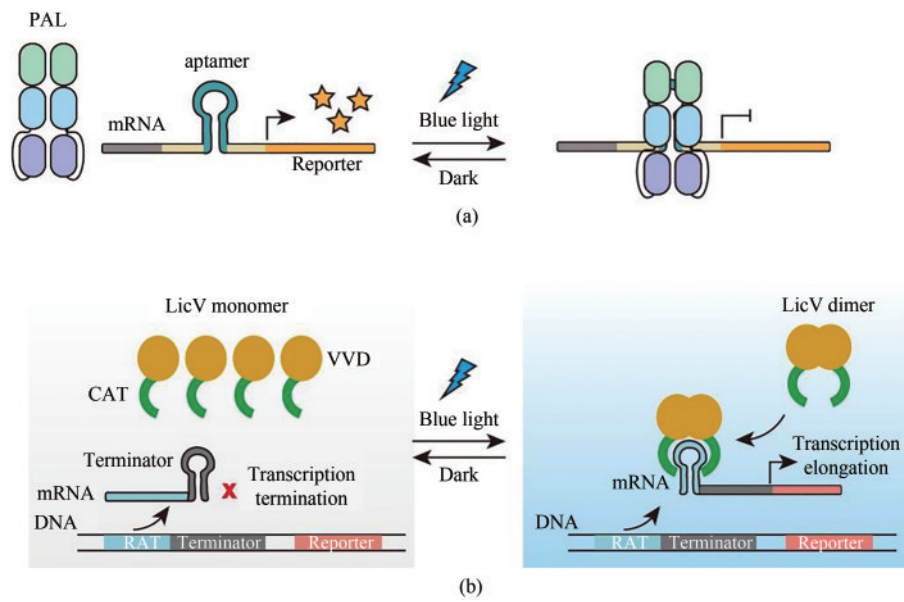


图13 光控RNA水平的基因表达调控系统

(a) 基于PAL蛋白的转录调控系统。黑暗状态下，PAL蛋白与RNA适体分离，报告基因表达；在蓝光照射下，PAL蛋白与RNA适体结合，阻碍报告基因的表达；(b) 基于LicV蛋白的转录调控系统。mRNA上存在一段茎环结构的终止序列，阻碍了报告基因的表达，当蓝光照射时，VVD蛋白二聚，导致CAT形成二聚体，并与核糖核酸抗终止子序列（RAT）结合，打开了茎环结构，从而恢复了报告基因的表达

Fig. 13 Light-controlled transgene expression systems based on RNA level

(a) Light-controlled transgene expression systems based on PAL. Under dark conditions, PAL is dissociated from the RNA aptamer to initiate reporter gene expression. With blue light illumination, PAL can bind to RNA aptamer, which can suppress the reporter gene expression. (b) Light-controlled transgene expression systems based on LicV. A stem-loop inserted termination sequence hinders the reporter gene expression, and under blue light illumination, the dimerized VVDs enables dimerization of CATs, which binds to the RAT sequence and unfold the stem-loop, thereby restoring the reporter gene expression.

于细胞的生理功能具有重要的作用<sup>[192]</sup>，细胞本身具有完整的一套系统能够让细胞器在正确的时间定位至正确的位点<sup>[193-194]</sup>，其基本原理是以细胞骨架为“道路”，以分子马达（molecular motor）作为“轨道车”来牵引细胞器沿着细胞骨架移动到不同的位置。分子马达又分为动力蛋白（dynein）和驱动蛋白（kinesin），动力蛋白向细胞核方向运送，驱动蛋白向细胞边缘运送<sup>[195-196]</sup>。为了研究特定细胞器的转运和定位对细胞具体功能的影响，科学家利用光遗传学建立了控制细胞器运动的方法。

### 8.1 利用CRY2-CIB1系统控制细胞器的移动和定位

2015年，Duan等<sup>[197]</sup>利用CRY2-CIB1系统来控制细胞中细胞器的转运和分布。其基本原理是将CRY2蛋白和特定的细胞器（线粒体、溶酶体和过氧化物酶体）相融合，CIB1蛋白和分子马达相融合。在蓝光的刺激下，CRY2和CIB1蛋白发生异

源二聚化从而使分子马达拉动细胞器朝特定的方向运动。如果解除蓝光的刺激，CRY2和CIB1蛋白则会自动解离，导致细胞器和分子马达的解离，最终细胞器在细胞内得以重新分布[图14(a)]。该方法可以实现空间上的定位以及对细胞器的可逆控制。

### 8.2 利用基于LOV系统控制细胞器的移动和定位

2015年，Van Bergeijk等<sup>[198]</sup>利用基于光-氧-电压结构域的光受体LOV蛋白开发了一个用蓝光控制细胞器运输的方法。在蓝光的刺激下，与特定细胞器融合的LOV蛋白暴露出铰链区，并和连接有分子马达的ePDZ蛋白特异性结合，最终实现了对细胞器的转运和定位[图14(b)]。该课题组通过在原代大鼠海马神经元中运用此方法可逆地控制核内体的聚集和分散，进而成功控制了突触的生长<sup>[198]</sup>。

这些系统的建立充分证明了光遗传学系统控制细胞器运动和再定位的可行性，对细胞器的运动和定位研究具有重要的价值。

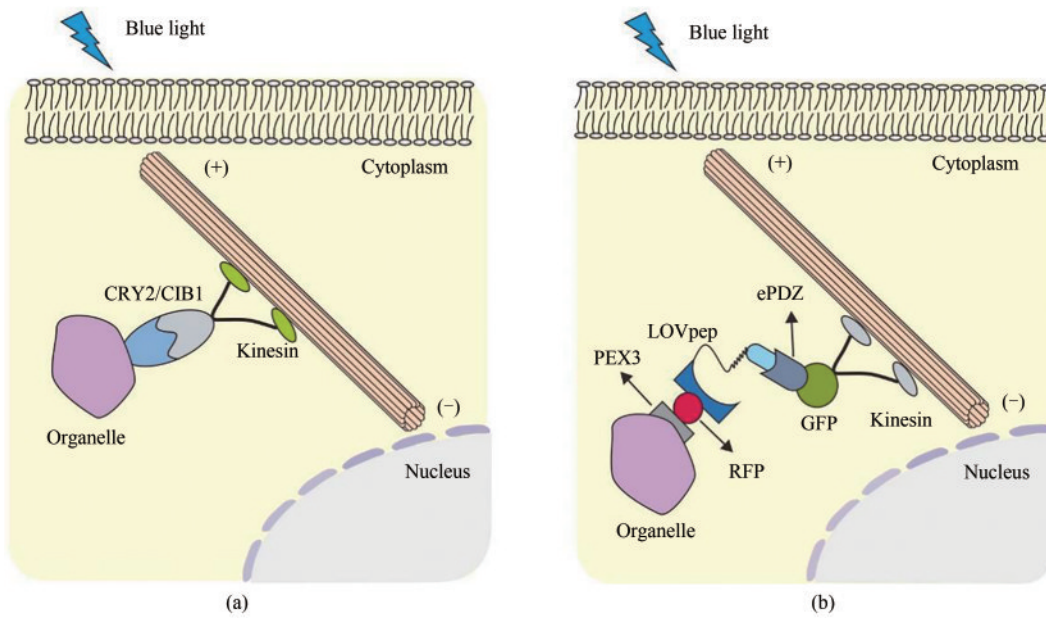


图14 光控细胞器运动和定位

(a) 基于CRY2-CIB1的光控细胞器定位系统。黑暗情况下，CRY2和CIB1蛋白处于游离状态，细胞器和分子马达没有相互作用；当接受到蓝光刺激后，融合有细胞器的CRY2蛋白和融合有马达分子的CIB1蛋白发生异源二聚，从而使得细胞器在分子马达的作用下被运送到细胞核或者细胞膜。(b) 基于LOV的光控细胞器定位系统。黑暗情况下，LOV蛋白处于游离状态；在蓝光的照射下，融合有PEX-LOV的细胞器会与工程化PDZ结构域ePDZb1（融合了分子马达）结合，在分子马达的驱动下，实现细胞器的转运或再定位

Fig. 14 Light-controlled movement and localization of organelles

(a) Light-controlled organelle localization based on CRY2-CIB1. Under blue-light illumination conditions, CRY2 undergoes a conformational change that enables interactions with CIBN for the movement of organelles driven by the molecular motor. (b) Light-controlled localization of organelles based on LOV. Under blue light irradiation conditions, the organelles fused with PEX-LOV can bind to the engineered PDZ domain ePDZb1 fused with molecular motor, leading to the movement and localization of organelle.

## 9 在生物电子药物中的应用研究

半导体合成生物学致力于探索工程细胞与半导体材料之间的协同作用，包括细胞与电、热、光等信号间的相互作用，为智能电子药物诊疗系统的研发提供了关键的技术支撑，有望用于数字化精准治疗，实现全自动闭环稳态控制。基于光遗传学的生物医学电子装置能够远程无痕地控制基因的转录表达，为基因治疗和细胞治疗<sup>[199]</sup>提供了一种全新的智能化的治疗方法。此外，基于光遗传学的闭环神经调节工具也取得了较大的进展。

### 9.1 大脑控制的转基因表达系统用于基因和细胞治疗

目前绝大多数光遗传学系统在实际应用中使用的电源装置是体外光源或者可植入光纤，这些

光源为有线装置，需要人工手动控制光源的开关，在实际应用中并不方便。近年来，随着智能生物电子设备开发工作的兴起，来自瑞士苏黎世联邦理工学院的Martin Fussenegger团队开发了一种可移动的无线供电光遗传学植入装置，该装置具有治疗依从性和宿主移动性的特点，可以通过人类大脑活动和精神状态无线控制哺乳动物细胞中基因的转录表达。这是一项开创性的研究工作，标志着科学家可以对人思维的脑电波进行识别，并通过无侵害性的远红光将它们反馈到基因网络中，调节转基因表达<sup>[200]</sup> [图15(a)]。

简单地说，脑电波（EEG）接收器捕捉到特定的大脑电波，并将信号传递给脑-计算机接口（BCI），当接收到的脑电波超过一定阈值时，BCI会做出响应，打开近红外LED灯，包含光响应基因环路的细胞则会启动下游报告基因的表达，产生报告蛋白分泌型碱性磷酸酶（SEAP）。因此，通过脑机接口技术和光遗传学技术结合，可以实现

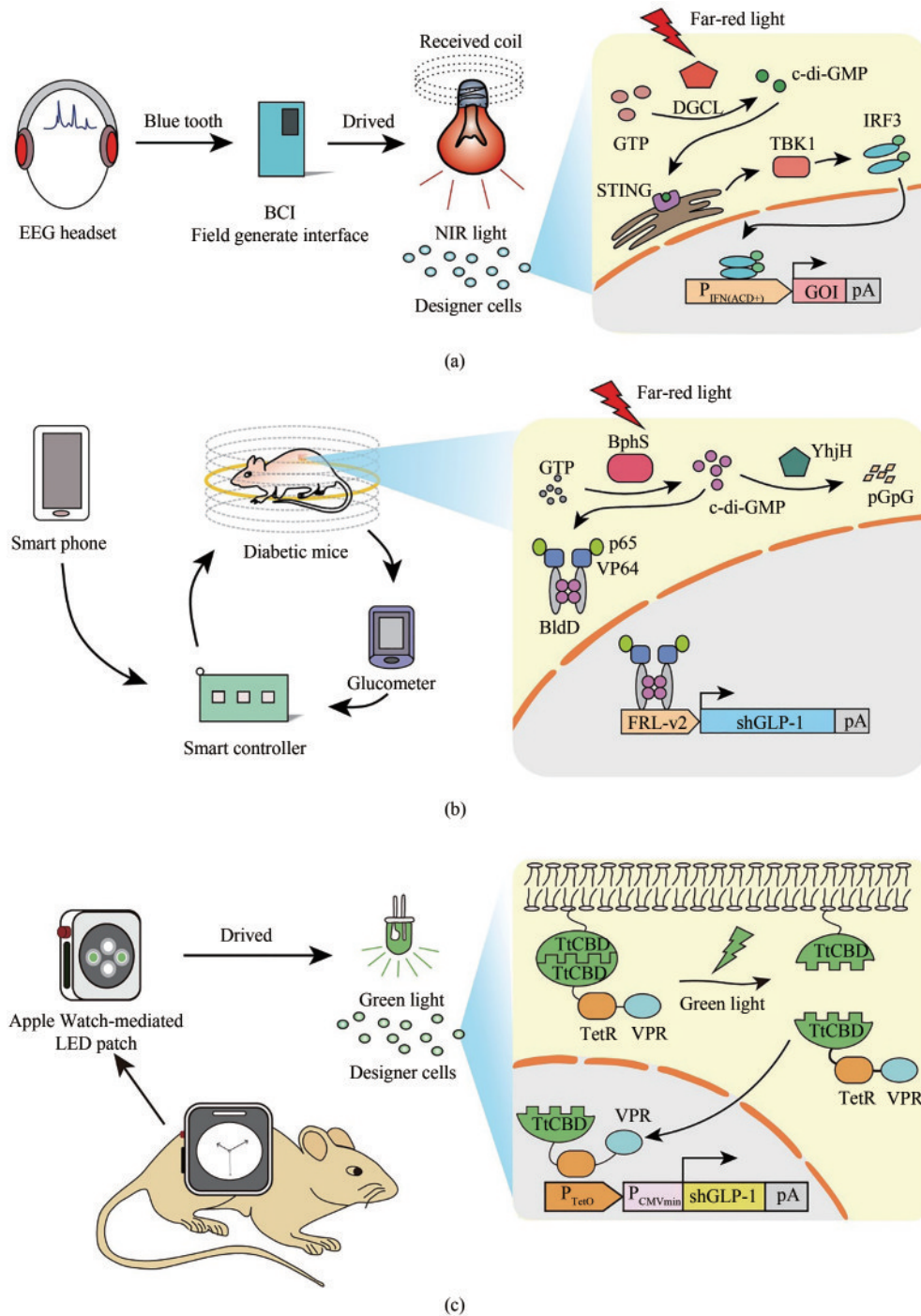


图15 光遗传学工具用于智能化生物电子医疗

(a) 大脑控制转基因表达的无线供电光遗传学植入系统。该大脑思维控制的转基因表达装置可以通过人类大脑活动无线控制细胞中的基因表达。脑电图 (EEG) 耳机捕捉脑电波活动, 并通过蓝牙传输到场强发生器接口 (BCI), 调节近红外发光二极管的开启, 从而控制近红外光激活细菌双胍酸环化酶 (DGC), 将GTP转化为c-di-GMP, 激活干扰素基因刺激因子 (STING) 依赖的信号通路, 从而启动目的基因的表达。(b) 基于光控定制化细胞的半自动糖尿病智能诊疗系统。血糖仪测得血糖数据后, 可通过蓝牙将数据自动传输到智能控制器和智能手机上。智能控制器会根据预设的血糖值和光照强度针对血糖浓度的高低输出不同强度的远红光。在远红光照射下, 细菌光感受器BphS将细胞内的GTP转化为c-di-GMP, 使杂交型转录激活子p65-VP64-BldD二聚化入核上, 结合到嵌合启动子上, 启动胰岛素或胰高血糖素样肽基因的转录表达, 从而控制血糖稳态。(c) 可穿戴式智能电子手表控制的血糖稳态调控系统。该系统利用智能手表发射的绿光激活小鼠皮下的人工定制化细胞。手表背部发光二极管开启时, 锚定在细胞膜上绿光响应的TtCBD蛋白解聚, TtCBD与杂交型转录激活子TetR-VPR从细胞膜掉落, 入核并启动胰高血糖素样肽基因的转录表达, 从而控制血糖稳态

**Fig. 15** Optogenetic tools for intelligent bioelectronic medicine

(a) A brain-controlled wireless-powered optogenetic implant device for transgene expression. This brain-controlled transgenic expression device can wirelessly control gene expression through human brain activities. Electroencephalogram (EEG) headset captures brain wave activities and transmits them to the field intensity generator interface (BCI) through Bluetooth, which integrates with a near-infrared LED. The bacterial diguanylate cyclase (DGC) can be activated by near-infrared light, which converts GTP into c-di-GMP for the activation of the STING signal pathway to initiate the transgene expression. (b) Semi-automatic intelligent diagnosis and treatment systems based on optogenetic designer cells for diabetes treatment. The blood glucose value detected from the blood glucose monitor can be automatically transmitted to the smart controller and smart phone through Bluetooth. The smart controller can regulate far-red light intensity based on the blood glucose value. Under far-red light irradiation, BphS converts intracellular GTP into c-di-GMP, which dimerizes the hybrid transcriptional activator p65-VP64-BldD into the nucleus for binding to the chimeric promoter to initiate the expression of insulin or GLP-1 for controlling blood glucose homeostasis. (c) Wearable smart watch-controlled optogenetic systems for diabetes treatment. The system utilizes green light from a smartwatch to activate artificially customized cells implanted into the skin of mice. The green light-responsive TtCBD is anchored onto the cell membrane. When the LEDs are turned on, TtCBD is depolymerized, and the hybrid transcriptional activator TetR-VPR is separated from the cell membrane to initiate the transcription expression of GLP-1 for controlling blood glucose homeostasis.

通过人类的意念控制基因的表达。该光响应基因环路主要由一种光依赖性细菌二鸟苷酸环化酶 (DGCL) 组成, 它能将细胞中的 GTP 转化为环二鸟苷酸单磷酸 (c-di-GMP)<sup>[201]</sup>。c-di-GMP 结合并激活内质网上的干扰素基因刺激因子 (STING)<sup>[202]</sup>, 这进一步激活了 TBK1 介导的转激活因子 IRF3 的磷酸化。磷酸化的 IRF3 进入细胞核, 与人工合成的启动子结合, 驱动下游转基因表达。该研究工作概念性验证了通过意念控制报告基因的表达。

脑机接口技术和光遗传学技术的结合是下一代智能药物输送系统的一个突破, 这种由大脑控制的生物电子医疗设备将来有望实现通过监测脑电波来协调控制基于光控基因表达的药物释放, 用于治疗神经疾病, 如慢性头痛、癫痫等。随着细胞治疗方法的出现和迭代, 医生看病、诊断和开具处方药物的传统疾病治疗方式将发生巨大的改变。

## 9.2 智能手机超远程控制基因表达用于血糖稳态控制

2017年, 华东师范大学叶海峰团队在智能细胞治疗方面取得了重大进展, 他们首次将生物工程、软件工程和光遗传学技术相结合, 实现了通过手机 APP 超远程控制移植在糖尿病小鼠体内的光控细胞表达降糖药物。研究人员构建了远红光调控基因表达的工程细胞, 并将这些光控工程细胞移植到糖尿病小鼠体内, 根据小鼠的血糖高低, 采用合适的光照时间和强度进行光照处理, 诱导胰岛素 (insulin) 或胰高血糖素样肽 (GLP-1) 的

表达, 从而维持糖尿病小鼠体内的血糖稳态<sup>[13, 203]</sup> [图 15(b)]。

更重要的是, 研究人员还开发了一款智能手机软件 ECNU-TeleMed APP 作为光源远程控制系统, 通过光电信号转化控制器, 可以将电子信号转换为光信号, 光信号再次控制细胞内一系列生物反应信号。远红光响应的工程细胞作为药物输出模块, 用于接收智能手机驱动的近红光信号, 从而完成电子信号与生物信号的衔接, 最终实现手机远程控制降糖药物表达维持血糖稳态。手机软件既可以通过预设的程序控制降血糖药物的表达释放, 同时也可通过血糖仪自动反馈的血糖信号调整降血糖药物的表达释放, 具有血糖依赖的半自动控制血糖稳态的特点。总之, 半导体合成生物学为精准控制血糖稳态提供了一种全新的策略, 在糖尿病血糖稳态控制中具有独特的潜力, 为智能化电子药物的发展奠定了基础。

## 9.3 智能手表控制基因表达用于二型糖尿病治疗

可穿戴的智能电子设备, 如智能手表等, 通常配备有绿色的 LED, 通过光体积描记术来监测心率、血压等健康指标, 而这一类配备光源的智能设备为光遗传学技术提供了便携的、患者接受度更高的光照设备。2021年, 苏黎世联邦理工学院的 Martin Fussenegger 团队<sup>[58]</sup>将智能手表与光遗传学工具相结合, 开发了一个绿光操纵的、智能手表控制的基因表达系统 (glow control), 并应用于二型糖尿病的治疗 [图 15(c)]。

CarH 是嗜热细菌 (*Thermus thermophilus*) 来源的光感受器, 能够保护细菌免受太阳光带来的

毒性影响。然而，该蛋白需要持续的光照刺激才能保持活性状态。因此，研究人员聚焦于 CarH 蛋白的钴胺素结合域 (*Tt*CBD)，当 *Tt*CBD 与发色团脱氧腺苷钴胺结合时，可以在黑暗状态下形成二聚体，一旦受到绿光刺激时，解离为单体。根据这一特性，研究人员构建了一个膜定位信号与 *Tt*CBD 结构域的融合蛋白 (*Myr-Tt*CBD) 和一个合成的转录激活子 (*TetR-VPR*) 与 CBD 结构域的融合蛋白 (*Tt*CBD-*TetR-VPR*)。黑暗状态下，*Tt*CBD 形成二聚体，转录激活子被限制在细胞膜上，无法行使转录激活功能；在绿光刺激下，*Tt*CBD 解离，*Tt*CBD-*TetR-VPR* 转运到细胞核，与 *TetR* 响应的启动子 ( $P_{Tet}$ ) 结合，从而诱导 hGLP-1 表达。接着，研究人员将含有该元件的细胞通过微胶囊包裹后皮下移植到小鼠背部，并将智能手表“佩戴”到小鼠身上，利用智能手表控制绿光光照，从而诱导 hGLP-1 的表达，显著降低了小鼠的血糖并控制了其体重，实现了二型糖尿病模型小鼠的便携治疗。Glow Control 系统将光遗传学技术与现有的可穿戴电子设备连接起来，为实时远程可控的细胞治疗提供了可能性，推动了疾病管理或生活方式的改善。此外，利用人工智能 (AI) 算法可以自动、实时地干预病情，最终实现治愈疾病的目标。

#### 9.4 智能闭环系统用于外周神经调节

通过刺激外周神经系统可以缓解一些疾病的临床症状。目前，医学上主要依靠电刺激来进行神经调节。电极与神经的直接物理耦合会导致损伤和炎症，连续的刺激也会给患者带来不适和疼痛，特别是治疗间歇性症状（例如，突然尿急）。不仅如此，传统的电刺激方式还缺乏器官和组织特异性，精准性差。而光遗传学则可以通过间歇性、时空特异性刺激，精准地控制神经的活动，为无创、便携式的治疗提供了新的可能。

2018 年，John A. Rogers 团队构建了一套智能神经调节系统 (CLOC)，可以实时监测膀胱充盈和排空状态，并集成信息后通过微型 LED 控制光敏抑制视蛋白 Arch 的功能，在膀胱不充盈状态下给予适当的光照刺激，Arch 蛋白即可引发质子外

流从而抑制膀胱壁中感觉神经元的活性，缓解膀胱的过度活跃，实现了对膀胱功能的闭环控制。该系统由五部分构成：①传感模块，一个低模量、可拉伸的应变计，环绕膀胱以监测膀胱活动（充盈和排空）；②光电刺激模块，一对微型的 LED，可以将光直接传输到膀胱进行光遗传神经调节；③电源模块，一个薄型柔软基站，该基站插在腹部皮肤和肌肉之间，用于对微型 LED 执行器进行双向通信和无线控制；④无线控制模块，一个无线手机单元，可以将能量分配到整个系统；⑤用户操作模块，一个定制的软件，以实现操作数据的实时可视化、存储、分析以及设置光照的方式和参数，用于开放式或闭环式干预<sup>[204]</sup>。

总之，研究者将具有反馈控制功能的柔软生物物理传感器与光遗传学工具结合，成功地实现了对大鼠膀胱功能的调节。该系统在外周神经系统调节的生理和病理生理学的临床研究具有广泛的用途，为未来闭环控制技术奠定了基础。

#### 9.5 无线光电刺激系统用于脊髓神经调节

尽管研究者们已经开发了多种工具对外周神经以及大脑中的神经进行时空特异性控制，但是针对脊髓中神经元的控制工具还不够完善。2022 年，Grégoire Courtine 团队<sup>[205]</sup>报道了一个超灵敏的无线光电刺激系统用于腰椎脊髓的闭环光刺激。该系统由三部分组成：①微型 LED 集成载体（贴合脊髓的硬脊膜，具有柔软可拉伸的特点）；②微型 LED 上的硅酮磷光基质涂层（提供机械保护及光转换，从而兼容响应不同波长的光敏蛋白）；③一个轻量级的、头戴式的无线平台（为微型 LED 充电并处理生理信号以进行闭环光刺激控制）。该系统中，无线平台可以收集生理信息和实时处理数据，通过带有涂层的微型 LED 发光，刺激 ChR2 蛋白，引发  $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  等阳离子的内流，从而激活椎体神经元活性，控制小鼠的运动行为。研究人员利用该装置在小鼠体内对任何目标神经元和通路进行安全和长期的光刺激，揭示了各种神经元亚型、感觉通路在健康和脊髓损伤小鼠运动控制中的作用<sup>[205]</sup>。

## 9.6 自动化的光遗传刺激闭环系统用于癫痫治疗

闭环光遗传刺激可以激活或抑制神经元，有望替代手术切除疗法治疗癫痫。2022年，Jaideep Kapur团队<sup>[206]</sup>报道了一个高效、自动化的光遗传刺激闭环系统用于癫痫的治疗干预。该系统中，闭环部分包含一个在线的癫痫发作检测算法，可以检测和评估癫痫发作。研究者使用一种连续的、完全卷积的神经网络回归器，从局部场电位记录中分析癫痫发作的复杂特征，进行评估。当检测到癫痫发作时，即启动光学探头，刺激抑制性光敏视蛋白 ArchT 引发质子外流，使得神经元超极化，神经元活性被抑制，从而控制癫痫发作。由于该系统的模块化设计，场电位记录耳机和光学探头是分别植入的，抗干扰能力强，使用灵活，执行简单。癫痫的检测和光递送的执行速度快，可进行精确定时。研究人员证明了该系统在体内应用中检测癫痫发作和减少假阳性方面比现有技术具有更好的效果<sup>[206]</sup>。

半导体合成生物学将生物系统与电子工程技术相结合，促进了智能化生物系统的研发。基于光遗传学的生物电子药物的发展推动了新型的诊疗一体化概念的实施，解决了目前移动医疗系统存在的诊断和给药之间缺乏联系的问题，有望用于多种代谢性疾病的治疗，符合人类安全医疗应用的标准<sup>[207]</sup>，助力基于精准细胞治疗的临床转化<sup>[208]</sup>。

## 10 总结与讨论

合成生物学以工程化的设计理念，通过对细胞进行合理的设计、改造，使其具有特定响应外界刺激如小分子化合物<sup>[209-210]</sup>、温度<sup>[211]</sup>、磁<sup>[212]</sup>、超声<sup>[213-214]</sup>以及光的能力，并随之产生相应的输出。光相较于其他诱导物具独特优势：光可以实现非侵入性，远程无痕的控制，可以随时撤除，快速开关，可以实现时空特异性的精准控制，而且毒性极低，安全可靠，因而被广泛应用。目前，科学家们利用光遗传学技术，已经实现了光控诱导基因的表达、光控基因编辑、光控细胞迁移等。除此之外，研究者们还利用光激活或抑制细胞信号通

路、代谢通路等，如2021年，Jing Ji等<sup>[135]</sup>利用光对非细胞凋亡的细胞死亡进行了调控；2022年，Petr Broz教授等<sup>[215]</sup>开发出蓝光调控的细胞凋亡、坏死和焦亡，拓宽了光遗传学的应用范围。在疾病治疗领域，光的非侵入性及可快速撤除的特点使其成为代替传统疗法的极佳选择，具有广阔的应用场景。目前光遗传学技术已经应用于治疗神经系统疾病、肿瘤、心血管疾病、糖尿病、基因疾病、肠道疾病的研究。

光遗传学工具的快速发展为人们提供了多种选择，理想的光遗传学工具能促进光遗传学在临床应用的应用。未来，在开发和选择光遗传学工具时需要考虑以下几点：

(1) 光敏蛋白的大小 腺相关病毒具有较好的安全性，范围广的宿主细胞，广泛应用于基因治疗和基础医学研究。因此基因编码长度在腺相关病毒的包装范围之内将有利于其在基因治疗领域的应用。

(2) 光敏蛋白所响应的光的波长 响应蓝光的光敏蛋白较多，但蓝光的组织穿透能力较差，大大降低了其应用潜力。为了解决这一难题，科学家通过引入UCNPs，将组织穿透性高的红光转化为蓝光，成功实现了蓝光在深层组织中的应用。此外，科学家将微型LED植入深层组织，该方法也可解决蓝光组织穿透性差的问题。蓝光的毒性也阻碍了其广泛的应用，开发快速响应蓝光的光敏蛋白降低光照时长或许能解决这一问题。相比之下，波长较长的光如红光、远红光、近红外光等具有较强的组织穿透能力且能量低，对细胞或机体伤害低，可以作为理想的光敏蛋白。

(3) 是否需要额外添加辅助色素 大部分光敏蛋白的辅助色素为内源性，不需要额外添加，但仍有部分光敏蛋白依赖于植物来源的色素，需要额外添加色素才可发挥作用，尽管其可以通过色素和光进行双重的更加严谨的调控，但这一程度上也限制了其在哺乳动物体内的应用，开发依赖哺乳动物内源性色素的光遗传学工具有利于其在临床领域的应用。

(4) 可逆性和动力学特点 可根据实际需要和应用场景选择合适的光遗传学工具。

(5) 安全性 光遗传学技术应用于细胞治疗时, 仍需解决底盘细胞的安全性和长期性问题, 开发来源于患者自身的且易于工程化的原代细胞作为底盘细胞有望解决这一难题。

值得强调的是, 在半导体合成生物学思想的指导下, 以光遗传学技术为桥梁搭建的活细胞-半导体材料杂合体系, 为智能生物电子药物的开发提供了全新的思路和技术手段。同时, 对现有的发展完善的智能设备的合理利用, 将进一步推动新型数字化、精准化的诊疗设备的发展, 在便捷的、精准可控的疾病诊疗中具有重要的意义。

虽然光遗传学有了长足的发展, 但是走向临床还有很多问题亟待解决。如在神经科学领域, 常用的实验方案 (30 mW) 产生的热量 (0.2~2 °C) 会对温度敏感性神经元的行为产生影响<sup>[216]</sup>, 有实验表明, 在未表达视蛋白的神经元中, 仅光照 (3~15 mW) 即可抑制特定神经元的尖峰活性<sup>[217]</sup>。在肿瘤治疗等领域, 由于光的组织穿透性有限, 光线较难穿透位于机体深处的实体瘤, 因而可能无法达到最佳的治疗效果<sup>[97]</sup>。不过, 近几年也有研究者们利用 NanoLuc 和底物反应产生的荧光来激活光系统<sup>[33, 135, 164]</sup>, 使得光系统摆脱了对光照设备的依赖, 一定程度上解决了光照组织穿透性差的问题, 也降低了光对生物体的损伤, 为光遗传学走向临床开辟了一个新的思路。

综上所述, 虽然光遗传学工具在疾病治疗领域的应用还存在一定问题, 但随着合成生物学和光遗传学的不断发展, 相信上述问题都将随之解决。同时, 光遗传学技术与跨学科的结合使更加精准化、智能化的应用逐渐成为可能。未来, 光遗传学工具的不断开发将引发基础研究、生物医药研发以及临床疾病诊疗等领域的迅速发展。

## 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] BI A D, CUI J 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.
- [3] THE NEWS STAFF. Insights of the decade. Stepping away from the trees for a look at the forest. Introduction[J]. *Science*, 2010, 330(6011): 1612-1613.
- [4] Method of the year 2010[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 1.
- [5] FAVORY J J, STEC A, GRUBER H, et al. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(5): 591-601.
- [6] WU Y I, FREY D, LUNGU O I, et al. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells[J]. *Nature*, 2009, 461(7260): 104-108.
- [7] YE H F, DAOUD-EL BABA M, PENG R W, et al. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice[J]. *Science*, 2011, 332(6037): 1565-1568.
- [8] WANG X, CHEN X J, YANG Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(3): 266-269.
- [9] KAINRATH S, STADLER M, REICHHART E, et al. Green-light-induced inactivation of receptor signaling using cobalamin-binding domains[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(16): 4608-4611.
- [10] LEVSKAYA A, WEINER O D, LIM W A, et al. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction[J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 997-1001.
- [11] HEYES D J, KHARA B, SAKUMA M, et al. Ultrafast red light activation of *Synechocystis phytochrome* Cph1 triggers major structural change to form the Pfr signalling-competent state[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52418.
- [12] KABERNIUK A A, SHEMETOV A A, VERKHUSHA V V. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 591-597.
- [13] SHAO J W, XUE S, YU G L, et al. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(387): eaal2298.
- [14] SHAO J W, WANG M Y, YU G L, et al. Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(29): E6722-E6730.
- [15] CHEN X H, CHEN Y X, XIN H H, et al. Near-infrared optogenetic engineering of photothermal nanoCRISPR for programmable genome editing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(5): 2395-2405.
- [16] NIHONGAKI Y, FURUHATA Y, OTABE T, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce

- neuronal differentiation [J]. *Nature methods*, 2017, 14(10): 963-966.
- [17] POLSTEIN L R, GERSBACH C A. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(3): 198-200.
- [18] YU Y H, WU X, GUAN N Z, et al. Engineering a far-red light-activated split-Cas9 system for remote-controlled genome editing of internal organs and tumors[J]. *Science Advances*, 2020, 6(28): eabb1777
- [19] NIHONGAKI Y, KAWANO F, NAKAJIMA T, et al. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(7): 755-760.
- [20] HEMPHILL J, BORCHARDT E K, BROWN K, et al. Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(17): 5642-5645.
- [21] JAIN P K, RAMANAN V, SCHEPERS A G, et al. Development of light-activated CRISPR using guide RNAs with photocleavable protectors[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(40): 12440-12444.
- [22] BUGAJ L J, CHOKSI A T, MESUDA C K, et al. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(3): 249-252.
- [23] WAGNER J C, PLATT R J, GOLDFLESS S J, et al. Efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Plasmodium falciparum*[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(9): 915-918.
- [24] TAN P, HE L, HUANG Y, et al. Optophysiology: illuminating cell physiology with optogenetics[J]. *Physiological Reviews*, 2022, 102(3): 1263-1325.
- [25] 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.
- [26] HANKINS M W, PEIRSON S N, FOSTER R G. Melanopsin: an exciting photopigment[J]. *Trends in Neurosciences*, 2008, 31(1): 27-36.
- [27] WEISSENBERGER S, SCHULTHEIS C, LIEWALD J F, et al. PAC $\alpha$ -an optogenetic tool for *in vivo* manipulation of cellular cAMP levels, neurotransmitter release, and behavior in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2011, 116(4): 616-625.
- [28] NOGLY P, STANDFUSS J. Light-driven Na<sup>+</sup> pumps as next-generation inhibitory optogenetic tools[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(5): 351-353.
- [29] GLANTZ S T, BERLEW E E, JABER Z, et al. Directly light-regulated binding of RGS-LOV photoreceptors to anionic membrane phospholipids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(33): E7720-E7727.
- [30] HUANG Z L, WU Y Q, ALLEN M E, et al. Engineering light-controllable CAR T cells for cancer immunotherapy[J]. *Science Advances*, 2020, 6(8): eaay9209.
- [31] ALI A M, REIS J M, XIA Y, et al. Optogenetic inhibitor of the transcription factor CREB[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(11): 1531-1539.
- [32] RIZZINI L, FAVORY J J, CLOIX C, et al. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein[J]. *Science*, 2011, 332(6025): 103-106.
- [33] KIM C K, CHO K F, KIM M W, et al. Luciferase-LOV BRET enables versatile and specific transcriptional readout of cellular protein-protein interactions[J]. *eLife*, 2019, 8: e43826.
- [34] PATEL A L, YEUNG E, MCGUIRE S E, et al. Optimizing photoswitchable MEK[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(51): 25756-25763.
- [35] JUNG H, KIM S W, KIM M, et al. Noninvasive optical activation of Flp recombinase for genetic manipulation in deep mouse brain regions[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 314.
- [36] YAO S Q, YUAN P, OUELLETTE B, et al. RecV recombinase system for *in vivo* targeted optogenomic modifications of single cells or cell populations[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(4): 422-429.
- [37] ENDO M, IWAWAKI T, YOSHIMURA H, et al. Photocleavable cadherin inhibits cell-to-cell mechanotransduction by light[J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(10): 2206-2214.
- [38] ZHANG X L, DONG C M, HUANG W Y, et al. Rational design of a photo-responsive UVR8-derived protein and a self-assembling peptide-protein conjugate for responsive hydrogel formation[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(40): 16666-16670.
- [39] CHEN D, GIBSON E S, KENNEDY M J. A light-triggered protein secretion system[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 201(4): 631-640.
- [40] REED E H, SCHUSTER B S, GOOD M C, et al. SPLIT: stable protein coacervation using a light induced transition[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(3): 500-507.
- [41] ZHANG W, LOHMAN A W, ZHURAVLOVA Y, et al. Optogenetic control with a photocleavable protein, PhoCl[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 391-394.
- [42] ZHANG W M, ZHAO G H, LUO Z Q, et al. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome[J]. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf3981.
- [43] ABDO H, CALVO-ENRIQUE L, LOPEZ J M, et al. Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation[J]. *Science*, 2019, 365(6454): 695-699.
- [44] ALEXANDRE M T A, ARENTS J C, VAN GRONDELLE R,

- et al. A base-catalyzed mechanism for dark state recovery in the *Avena sativa* phototropin-1 LOV2 domain[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(11): 3129-3137.
- [45] HEINTZEN C, LOROS J, DUNLAP J C. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting[J]. *Cell*, 2001, 104: 453-464.
- [46] FREDDOLINO P L, DITTRICH M, SCHULTEN K. Dynamic switching mechanisms in LOV1 and LOV2 domains of plant phototropins[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(10): 3630-3639.
- [47] HARPER S M, NEIL L C, GARDNER K H. Structural basis of a phototropin light switch[J]. *Science*, 2003, 301(5639): 1541-1544.
- [48] HE L, TAN P, ZHU L, et al. Circularly permuted LOV2 as a modular photoswitch for optogenetic engineering[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(8): 915-923.
- [49] KAWANO F, SUZUKI H, FURUYA A, et al. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6256.
- [50] 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.
- [51] NAGEL G, SZELLAS T, HUHN W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(24): 13940-13945
- [52] PARK H, KIM N Y, LEE S, et al. Optogenetic protein clustering through fluorescent protein tagging and extension of CRY2[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 30.
- [53] TASLIMI A, VRANA J D, CHEN D, et al. An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4925.
- [54] 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.
- [55] MOTTA-MENA L B, READE A, MALLORY M J, et al. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(3): 196-202.
- [56] WANG R, YANG Z G, LUO J R, et al. B<sub>12</sub>-dependent photoresponsive protein hydrogels for controlled stem cell/protein release[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(23): 5912-5917.
- [57] JOST M, FERNÁNDEZ-ZAPATA J, POLANCO M C, et al. Structural basis for gene regulation by a B<sub>12</sub>-dependent photoreceptor[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 536-541.
- [58] MANSOURI M, HUSSHER M D, STRITTMATTER T, et al. Smart-watch-programmed green-light-operated percutaneous control of therapeutic transgenes[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3388.
- [59] XU D D, RICKEN J, WEGNER S V. Turning cell adhesions ON or OFF with high spatiotemporal precision using the green light responsive protein CarH[J]. *Chemistry*, 2020, 26(44): 9859-9863.
- [60] HABUCHI S, ANDO R, DEDECKER P, et al. Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(27): 9511-9516.
- [61] DAY R N, DAVIDSON M W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging[J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(10): 2887-2921.
- [62] ZHOU X X, CHUNG H K, LAM A J, et al. Optical control of protein activity by fluorescent protein domains[J]. *Science*, 2012, 338(6108): 810-814.
- [63] ZHOU X X, FAN L Z, LI P P, et al. Optical control of cell signaling by single-chain photoswitchable kinases[J]. *Science*, 2017, 355(6327): 836-842.
- [64] TOETTCHER J E, WEINER O D, LIM W A. Using optogenetics to interrogate the dynamic control of signal transmission by the Ras/Erk module[J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1422-1434.
- [65] OCHOA-FERNANDEZ R, SAMODELOV S L, BRANDL S M, et al. Optogenetics in plants: red/far-red light control of gene expression[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1408: 125-139.
- [66] WU J L, WANG M Y, YANG X P, et al. A non-invasive far-red light-induced split-Cre recombinase system for controllable genome engineering in mice[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3708.
- [67] YU G L, ZHANG M L, GAO L, et al. Far-red light-activated human islet-like designer cells enable sustained fine-tuned secretion of insulin for glucose control[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(1): 341-354.
- [68] REDCHUK T A, OMELENA E S, CHERNOV K G, et al. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(6): 633-639.
- [69] REDCHUK T A, KARASEV M M, VERKHUSHA P V, et al. Optogenetic regulation of endogenous proteins[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 605.
- [70] SOROKINA O, KAPUS A, TERECSKEI K, et al. A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2009, 3: 15.
- [71] ZHOU Y, KONG D Q, WANG X Y, et al. A small and highly sensitive red/far-red optogenetic switch for applications in

- mammals[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 262-272.
- [72] CHRISTIE J M, ARVAI A S, BAXTER K J, et al. Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1492-1496.
- [73] SARRIS M, OLEKHNOVITCH R, BOUSSO P. Manipulating leukocyte interactions *in vivo* through optogenetic chemokine release[J]. *Blood*, 2016, 127(23): e35-e41.
- [74] LEE J, NATARAJAN M, NASHINE V C, et al. Surface sites for engineering allosteric control in proteins[J]. *Science*, 2008, 322(5900): 438-442.
- [75] PETER E, DICK B, BAEURLE S A. Mechanism of signal transduction of the LOV2-Ja photosensor from *Avena sativa*[J]. *Nature Communications*, 2010, 1: 122.
- [76] LUNGU O I, HALLETT R A, CHOI E J, et al. Designing photoswitchable peptides using the AsLOV2 domain[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(4): 507-517.
- [77] HARTWICK A T E, BRAMLEY J R, YU J N, et al. Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2007, 27(49): 13468-13480.
- [78] BAASKE J, GONSCHOREK P, ENGESSER R, et al. Dual-controlled optogenetic system for the rapid down-regulation of protein levels in mammalian cells[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 15024.
- [79] VAN HAREN J, CHARAFEDDINE R A, ETTINGER A, et al. Local control of intracellular microtubule dynamics by EB1 photodissociation[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(3): 252-261.
- [80] BUBECK F, HOFFMANN M D, HARTEVELD Z, et al. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 924-927.
- [81] RENICKE C, SCHUSTER D, USHERENKO S, et al. A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(4): 619-626.
- [82] GIL A A, CARRASCO-LÓPEZ C, ZHU L Y, et al. Optogenetic control of protein binding using light-switchable nanobodies[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4044.
- [83] KAWANO F, OKAZAKI R, YAZAWA M, et al. A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(12): 1059-1064.
- [84] FOIGHT G W, WANG Z Z, WEI C T, et al. Multi-input chemical control of protein dimerization for programming graded cellular responses[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(10): 1209-1216.
- [85] VISWANATHAN R, HARTMANN J, PALLARES CARTES C, et al. Desensitisation of Notch signalling through dynamic adaptation in the nucleus[J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40(18): e107245.
- [86] YUMEREFENDI H, WANG H, DICKINSON D J, et al. Light-dependent cytoplasmic recruitment enhances the dynamic range of a nuclear import photoswitch[J]. *ChemBioChem*, 2018, 19(12): 1319-1325.
- [87] GRIFFIN E A, STAKNIS D, WEITZ C J. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock[J]. *Science*, 1999, 286(5440): 768-771.
- [88] AIRAN R D, THOMPSON K R, FENNO L E, et al. Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling[J]. *Nature*, 2009, 458(7241): 1025-1029.
- [89] ZHANG F, WANG L P, BRAUNER M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry[J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 633-639.
- [90] GRADINARU V, ZHANG F, RAMAKRISHNAN C, et al. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 154-165.
- [91] ZHAO S L, CUNHA C, ZHANG F, et al. Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity[J]. *Brain Cell Biology*, 2008, 36(1/2/3/4): 141-154.
- [92] HUGHES R M, BOLGER S, TAPADIA H, et al. Light-mediated control of DNA transcription in yeast[J]. *Methods*, 2012, 58(4): 385-391.
- [93] PIATKEVICH K D, SUBACH F V, VERKHUSHA V V. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(8): 3441-3452.
- [94] TSCHOWRI N, SCHUMACHER M A, SCHLIMPERT S, et al. Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development[J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1136-1147.
- [95] BUSH M J, TSCHOWRI N, SCHLIMPERT S, et al. C-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(12): 749-760.
- [96] RYU M H, GOMELSKY M. Near-infrared light responsive synthetic c-di-GMP module for optogenetic applications[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(11): 802-810.
- [97] ASH C, DUBEC M, DONNE K, et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods[J]. *Lasers in Medical Science*, 2017, 32(8): 1909-1918.
- [98] CRICK F H. Thinking about the brain[J]. *Scientific American*, 1979, 241(3): 219-232.

- [99] DEISSEROTH K, FENG G P, MAJEWSKA A K, et al. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2006, 26(41): 10380-10386.
- [100] ADAMANTIDIS A R, ZHANG F, DE LECEA L, et al. Optogenetics: opsins and optical interfaces in neuroscience[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014, 2014(8): 815-822.
- [101] BURN D J, TRÖSTER A I. Neuropsychiatric complications of medical and surgical therapies for Parkinson's disease[J]. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 2004, 17(3): 172-180.
- [102] LIU A L, VÖRÖSLAKOS M, KRONBERG G, et al. Immediate neurophysiological effects of transcranial electrical stimulation[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5092.
- [103] ZEMELMAN B V, LEE G A, NG M, et al. Selective photostimulation of genetically ChARGed neurons[J]. *Neuron*, 2002, 33(1): 15-22.
- [104] 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.
- [105] LIMA S Q, MIESENBÖCK G. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons[J]. *Cell*, 2005, 121(1): 141-152.
- [106] SCHROLL C, RIEMENSPERGER T, BUCHER D, et al. Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae[J]. *Current Biology*, 2006, 16(17): 1741-1747.
- [107] JUNG J C, MEHTA A D, AKSAY E, et al. *In vivo* mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2004, 92(5): 3121-3133.
- [108] HELMCHEN F, FEE M S, TANK D W, et al. A miniature head-mounted two-photon microscope: high-resolution brain imaging in freely moving animals[J]. *Neuron*, 2001, 31(6): 903-912.
- [109] HAN X, BOYDEN E S. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution[J]. *PLoS One*, 2007, 2(3): e299.
- [110] MU D, DENG J, LIU K F, et al. A central neural circuit for itch sensation[J]. *Science*, 2017, 357(6352): 695-699.
- [111] GRADINARU V, MOGRI M, THOMPSON K R, et al. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry[J]. *Science*, 2009, 324(5925): 354-359.
- [112] NGUGI A K, BOTTOMLEY C, KLEINSCHMIDT I, et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(5): 883-890.
- [113] TØNNESEN J, SØRENSEN A T, DEISSEROTH K, et al. Optogenetic control of epileptiform activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(29): 12162-12167.
- [114] HE L, WANG L Q, ZENG H X, et al. Engineering of a bona fide light-operated calcium channel[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 164.
- [115] GONG X, MENDOZA-HALLIDAY D, TING J T, et al. An ultra-sensitive step-function opsin for minimally invasive optogenetic stimulation in mice and macaques[J]. *Neuron*, 2020, 107(1): 38-51.e8.
- [116] CHEN R, GORE F, NGUYEN Q A, et al. Deep brain optogenetics without intracranial surgery[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(2): 161-164.
- [117] KIM C K, SANCHEZ M I, HOERBELT P, et al. A molecular calcium integrator reveals a striatal cell type driving aversion[J]. *Cell*, 2020, 183(7): 2003-2019.e16.
- [118] TAN P, HONG T T, CAI X L, et al. Optical control of protein delivery and partitioning in the nucleolus[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(12): e69.
- [119] STANCULEANU D L, DANIELA Z, LAZESCU A, et al. Development of new immunotherapy treatments in different cancer types[J]. *Journal of Medicine and Life*, 2016, 9(3): 240-248.
- [120] LIZÉE G, OVERWIJK W W, RADVANYI L, et al. Harnessing the power of the immune system to target cancer[J]. *Annual Review of Medicine*, 2013, 64: 71-90.
- [121] RESTIFO N P, DUDLEY M E, ROSENBERG S A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(4): 269-281.
- [122] KHADER S A, DIVANGAHI M, HANEKOM W, et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2019, 129(9): 3482-3491.
- [123] FISHER B, PACKARD B S, READ E J, et al. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1989, 7(2): 250-261.
- [124] GRIFFITH K D, READ E J, CARRASQUILLO J A, et al. *In vivo* distribution of adoptively transferred indium-111-labeled tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in patients with metastatic melanoma[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1989, 81(22): 1709-1717.
- [125] FRIDMAN W H, PAGÈS F, SAUTÈS-FRIDMAN C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(4): 298-306.
- [126] TAN P, HE L, HAN G, et al. Optogenetic immunomodulation: shedding light on antitumor immunity[J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(3): 215-226.

- [127] XU Y X, HYUN Y M, LIM K, et al. Optogenetic control of chemokine receptor signal and T-cell migration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(17): 6371-6376.
- [128] HE L, ZHANG Y W, MA G L, et al. Near-infrared photoactivatable control of Ca<sup>2+</sup> signaling and optogenetic immunomodulation[J]. *eLife*, 2015, 4: e10024.
- [129] ZHAO B X, WANG Y C, TAN X H, et al. An optogenetic controllable T cell system for hepatocellular carcinoma immunotherapy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1837-1850.
- [130] ZHENG B, WANG H J, PAN H Z, et al. Near-infrared light triggered upconversion optogenetic nanosystem for cancer therapy[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(12): 11898-11907.
- [131] KALIKI S, SHIELDS C L. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer[J]. *Eye*, 2017, 31(2): 241-257.
- [132] AMARO A, GANGEMI R, PIAGGIO F, et al. The biology of uveal melanoma[J]. *Cancer Metastasis Reviews*, 2017, 36(1): 109-140.
- [133] SHAIN A H, BAGGER M M, YU R, et al. The genetic evolution of metastatic uveal melanoma[J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(7): 1123-1130.
- [134] ZHANG M L, LIN X, ZHANG J P, et al. Blue light-triggered optogenetic system for treating uveal melanoma[J]. *Oncogene*, 2020, 39(10): 2118-2124.
- [135] HE L, HUANG Z X, HUANG K, et al. Optogenetic control of non-apoptotic cell death[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(13): 2100424.
- [136] JACOBY E, NGUYEN S M, FOUNTAINE T J, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12320.
- [137] MAUS M V, JUNE C H. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy[J]. *Clinical Cancer Research*, 2016, 22(8): 1875-1884.
- [138] FRIGAULT M J, LEE J, BASIL M C, et al. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells[J]. *Cancer Immunology Research*, 2015, 3(4): 356-367.
- [139] TOKAREW N, OGONEK J, ENDRES S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells[J]. *British Journal of Cancer*, 2019, 120(1): 26-37.
- [140] CALIENDO F, DUKHINOVA M, SICILIANO V. Engineered cell-based therapeutics: synthetic biology meets immunology[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 43.
- [141] CRUZ C R, HANLEY P J, LIU H, et al. Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience[J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(6): 743-749.
- [142] NGUYEN N T, HUANG K, ZENG H X, et al. Nano-optogenetic engineering of CAR T cells for precision immunotherapy with enhanced safety[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(12): 1424-1434.
- [143] ZHOU S B, GRAVEKAMP C, BERMUDES D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(12): 727-743.
- [144] ZHANG X Y, ZHANG Y Y, ZHANG C N, et al. An injectable hydrogel co-loading with cyanobacteria and upconversion nanoparticles for enhanced photodynamic tumor therapy[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 201: 111640.
- [145] PAN H Z, LI L Y, PANG G J, et al. Engineered NIR light-responsive bacteria as anti-tumor agent for targeted and precise cancer therapy[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 426: 130842.
- [146] FLORES-MATEO G, CARRILLO-SANTISTEVE P, ELOSUA R, et al. Antioxidant enzyme activity and coronary heart disease: meta-analyses of observational studies[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2009, 170(2): 135-147.
- [147] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, GO A S, et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2015, 131(4): e29-e322.
- [148] PRIORI S G, BLOMSTRÖM-LUNDQVIST C, MAZZANTI A, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: the Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC)[J]. *European Heart Journal*, 2015, 36(41): 2793-2867.
- [149] COHEN J E, PURCELL B P, MACARTHUR J W, et al. A bio-engineered hydrogel system enables targeted and sustained intramyocardial delivery of neuregulin, activating the cardiomyocyte cell cycle and enhancing ventricular function in a murine model of ischemic cardiomyopathy[J]. *Circulation Heart Failure*, 2014, 7(4): 619-626.
- [150] ASCHEIM D D, GELIJNS A C, GOLDSTEIN D, et al. Mesenchymal precursor cells as adjunctive therapy in recipients of contemporary left ventricular assist devices[J]. *Circulation*, 2014, 129(22): 2287-2296.
- [151] YANKEY G K, LI T L, KILIC A, et al. Regional remodeling strain and its association with myocardial apoptosis after myocardial infarction in an ovine model[J]. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2008, 135(5): 991-998.e2.
- [152] VELAZQUEZ E J, LEE K L, DEJA M A, et al. Coronary-ar-

- tery bypass surgery in patients with left ventricular dysfunction[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 364(17): 1607-1616.
- [153] COHEN J E, GOLDSTONE A B, PAULSEN M J, et al. An innovative biologic system for photon-powered myocardium in the ischemic heart[J]. *Science Advances*, 2017, 3(6): e1603078.
- [154] AMBROSI C M, BOYLE P M, CHEN K, et al. Optogenetics-enabled assessment of viral gene and cell therapy for restoration of cardiac excitability[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17350.
- [155] KOLOSSOV E, BOSTANI T, ROELL W, et al. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203(10): 2315-2327.
- [156] BRUEGMANN T, MALAN D, HESSE M, et al. Optogenetic control of heart muscle *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(11): 897-900.
- [157] NUSSINOVITCH U, GEPSTEIN L. Optogenetics for *in vivo* cardiac pacing and resynchronization therapies[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(7): 750-754.
- [158] YU L L, , ZHOU L P, CAO G, et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017, 70(22): 2778-2790.
- [159] TILLEY D G. G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function[J]. *Circulation Research*, 2011, 109(2): 217-230.
- [160] KOCKSKÄMPER J, ZIMA A V, RODERICK H L, et al. Emerging roles of inositol 1, 4, 5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2008, 45(2): 128-147.
- [161] BEIERT T, BRUEGMANN T, SASSE P. Optogenetic activation of Gq signalling modulates pacemaker activity of cardiomyocytes[J]. *Cardiovascular Research*, 2014, 102(3): 507-516.
- [162] BOJAR D, SCHELLER L, HAMRI G C E, et al. Caffeine-inducible gene switches controlling experimental diabetes[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2318.
- [163] XIE M Q, YE H F, WANG H, et al.  $\beta$ -Cell-mimetic designer cells provide closed-loop glycemic control[J]. *Science*, 2016, 354(6317): 1296-1301.
- [164] LI T, CHEN X J, QIAN Y J, et al. A synthetic BRET-based optogenetic device for pulsatile transgene expression enabling glucose homeostasis in mice[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 615.
- [165] REINBOTHE T M, SAFI F, AXELSSON A S, et al. Optogenetic control of insulin secretion in intact pancreatic islets with  $\beta$ -cell-specific expression of Channelrhodopsin-2[J]. *Islets*, 2014, 6(1): e28095.
- [166] KUSHIBIKI T, OKAWA S, HIRASAWA T, et al. Optogenetic control of insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Gene Therapy*, 2015, 22(7): 553-559.
- [167] BELKAID Y, HAND T W. Role of the microbiota in immunity and inflammation[J]. *Cell*, 2014, 157(1): 121-141.
- [168] DURACK J, LYNCH S V. The gut microbiome: relationships with disease and opportunities for therapy[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(1): 20-40.
- [169] ZHU W H, WINTER M G, BYNDLOSS M X, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis[J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 208-211.
- [170] CUI M H, SUN T, LI S, et al. NIR light-responsive bacteria with live bio-glue coatings for precise colonization in the gut[J]. *Cell Reports*, 2021, 36(11): 109690.
- [171] CUI M H, PANG G J, ZHANG T, et al. Optotheranostic nano-system with phone visual diagnosis and optogenetic microbial therapy for ulcerative colitis at-home care[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(4): 7040-7052.
- [172] PAN H Z, SUN T, CUI M H, et al. Light-sensitive lactococcus lactis for microbe-gut-brain axis regulating via upconversion optogenetic micro-nano system[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(4): 6049-6063.
- [173] COMMITTEE ON SCIENCE T, LAW, POLICY, et al. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health [M]. //OLSON S. International Summit on Human Gene Editing: A Global Discussion. Washington (DC): National Academies Press, 2016.
- [174] NAGY A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring[J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 99-109.
- [175] DOW L E, FISHER J, O'ROURKE K P, et al. Inducible *in vivo* genome editing with CRISPR-Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(4): 390-394.
- [176] ZETSCHKE B, VOLZ S E, ZHANG F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(2): 139-142.
- [177] DAVIS K M, PATTANAYAK V, THOMPSON D B, et al. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(5): 316-318.
- [178] NGUYEN D P, MIYAOKA Y, GILBERT L A, et al. Ligand-binding domains of nuclear receptors facilitate tight control of split CRISPR activity[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12009.
- [179] PAN Y C, YANG J J, LUAN X W, et al. Near-infrared upconversion-activated CRISPR-Cas9 system: a remote-controlled

- gene editing platform[J]. *Science Advances*, 2019, 5(4): eaav7199.
- [180] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [181] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [182] NIHONGAKI Y, YAMAMOTO S, KAWANO F, et al. CRISPR-cas9-based photoactivatable transcription system[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(2): 169-174.
- [183] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [184] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- [185] KIM D, KIM J, HUR J K, et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 863-868.
- [186] KLEINSTIVER B P, TSAI S Q, PREW M S, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 869-874.
- [187] NIHONGAKI Y, OTABE T, UEDA Y, et al. A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(9): 882-888.
- [188] WANG X Y, DONG K L, KONG D Q, et al. A far-red light-inducible CRISPR-Cas12a platform for remote-controlled genome editing and gene activation[J]. *Science Advances*, 2021, 7(50): eabh2358.
- [189] WEBER A M, KAISER J, ZIEGLER T, et al. A blue light receptor that mediates RNA binding and translational regulation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(11): 1085-1092.
- [190] PILSL S, MORGAN C, CHOUKEIFE M, et al. Oporibogenetic control of regulatory RNA molecules[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4825.
- [191] LIU R M, YANG J, YAO J, et al. Optogenetic control of RNA function and metabolism using engineered light-switchable RNA-binding proteins[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(5): 779-786.
- [192] VALE R D. The molecular motor toolbox for intracellular transport[J]. *Cell*, 2003, 112(4): 467-480.
- [193] WILLIAMSON R E. Organelle movements along actin filaments and microtubules[J]. *Plant Physiology*, 1986, 82(3): 631-634.
- [194] PERICO C, SPARKES I. Plant organelle dynamics: cytoskeletal control and membrane contact sites[J]. *New Phytologist*, 2018, 220(2): 381-394.
- [195] BAAS P W, DEITCH J S, BLACK M M, et al. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(21): 8335-8339.
- [196] CONDE C, CÁCERES A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10(5): 319-332.
- [197] DUAN L T, CHE D, ZHANG K, et al. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(5): 671-682.
- [198] VAN BERGEIJK P, ADRIAN M, HOOGENRAAD C C, et al. Optogenetic control of organelle transport and positioning[J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 111-114.
- [199] FISCHBACH M A, BLUESTONE J A, LIM W A. Cell-based therapeutics: the next pillar of medicine[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(179): 179ps7.
- [200] FOLCHER M, OESTERLE S, ZWICKY K, et al. Mind-controlled transgene expression by a wireless-powered optogenetic designer cell implant[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5392.
- [201] JENAL U, MALONE J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria[J]. *Annual Review of Genetics*, 2006, 40: 385-407.
- [202] BURDETTE D L, MONROE K M, SOTELO-TROHA K, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP[J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 515-518.
- [203] GOMELSKY M. Photoactivated cells link diagnosis and therapy[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(387): eaan3936.
- [204] MICKLE A D, WON S M, NOH K N, et al. A wireless closed-loop system for optogenetic peripheral neuromodulation[J]. *Nature*, 2019, 565(7739): 361-365.
- [205] KATHE C, MICHOU D, SCHÖNLE P, et al. Wireless closed-loop optogenetics across the entire dorsoventral spinal cord in mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(2): 198-208.
- [206] BATABYAL T, BRODOVSKAYA A, WILLIAMSON J, et al. A deep learning-based automated closed-loop optogenetic system for neuromodulation during seizures[EB/OL]. *bioRxiv* (2022-04-21)[2022-05-01]. <http://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.11.487951v1>.
- [207] TANG J, DU Y P, LEE C A, et al. Low-intensity far-red light inhibits early lesions that contribute to diabetic retinopathy: *in vivo* and *in vitro*[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2013, 54(5): 3681-3690.
- [208] ZHANG F, TZANAKAKIS E S. Amelioration of diabetes in a murine model upon transplantation of pancreatic  $\beta$ -cells with optogenetic control of cyclic adenosine monophosphate[J].

- ACS Synthetic Biology, 2019, 8(10): 2248-2255.
- [209] XIE M Q, YE H F, HAMRI G C E, et al. Antagonistic control of a dual-input mammalian gene switch by food additives[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(14): e116.
- [210] GITZINGER M, KEMMER C, FLURI D A, et al. The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 40(5): e37.
- [211] CHEN R, ROMERO G, CHRISTIANSEN M G, et al. Wireless magnetothermal deep brain stimulation[J]. *Science*, 2015, 347(6229): 1477-1480.
- [212] HERNÁNDEZ-MORALES M, SHANG T, CHEN J J, et al. Lipid oxidation induced by RF waves and mediated by ferritin iron causes activation of ferritin-tagged ion channels[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(10): 3250-3260.e7.
- [213] DECKERS R, QUESSON B, ARSAUT J, et al. Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(4): 1175-1180.
- [214] PAN Y J, YOON S, SUN J, et al. Mechanogenetics for the remote and non-invasive control of cancer immunotherapy[J]. *The FASEB Journal*, 2018, 32: 674.24.
- [215] SHKARINA K, HASEL DE CARVALHO E, SANTOS J C, et al. Optogenetic activators of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2022, 221(6): e202109038.
- [216] YIZHAR O, FENNO L E, DAVIDSON T J, et al. Optogenetics in neural systems[J]. *Neuron*, 2011, 71(1): 9-34
- [217] OWEN S F, LIU M H, KREITZER A C. Thermal constraints on *in vivo* optogenetic manipulations[J]. *Nature Neuroscience*, 2019, 22(7): 1061-1065.



**通讯作者:** 叶海峰(1981—),男,研究员,博士生导师。主要从事合成生物学与生物医学工程领域的研究。利用合成生物学的理念和方法对细胞进行遗传学改造和重编程,重新设计、构建智能基因网络调控系统用于疾病的精准治疗。研究内容包括:遗传控制系统设计构建、智能细胞药物设计构建、光遗传学工具开发、精准可控的肿瘤免疫治疗、药物工程菌设计改造等。

E-mail: hfye@bio.ecnu.edu.cn



**第一作者:** 于袁欢(1992—),女,博士。研究方向为合成生物学与生物医学工程。

E-mail: yuyuanhuan@admin.ecnu.edu.cn



**第一作者:** 周阳(1994—),男,博士研究生。研究方向为合成生物学与生物医学工程。

E-mail: 52191300036@stu.ecnu.edu.cn