

眼光遗传学研究进展

盛旺 综述 陈建苏 唐仕波 审校

中南大学爱尔眼科学院 爱尔眼科研究所, 长沙 410015

通信作者: 陈建苏, Email: chenjiansu2000@163.com; 唐仕波, Email: tangshibo@vip.163.com

【摘要】 光遗传学是一项应用一定波长的光照来精确调控特定细胞或亚结构生物活动的遗传学技术。眼球透明、位置表浅及相对独立等特点增加了光遗传学在眼局部应用的可操作性。将光遗传学应用于眼神经细胞,如视网膜神经节细胞(RGCs),甚至扩展到血管内皮细胞、免疫细胞及其他眼细胞及细胞亚结构,能加深对眼生理的认识,实现对神经退化性疾病、血管异常性疾病、炎症及其他眼相关疾病的治疗。为了使光遗传学在眼科的应用得到扩展,使其功能更趋向于眼自然生理状态,有必要对其有效性、安全性及舒适性进行不断改善。本文根据眼相关研究应用的现状,光敏感度、空间分辨率和时间分辨率等成像问题,局部和全身安全性、特异性和持久性等表达问题,光控化学和新评价途径的技术补充等方面对眼光遗传学技术最新进展进行综述。

【关键词】 眼科; 光遗传学; 神经退化性疾病

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.015

Research progress on ophthalmologic optogenetics

Sheng Wang, Chen Jiangu, Tang Shibo

Aier School of Ophthalmology, Central South University, Aier Eye Institute, Changsha 410015, China

Corresponding authors: Chen Jiangu, Email: chenjiansu2000@163.com; Tang Shibo, Email: tangshibo@vip.163.com

【Abstract】 Optogenetics is a genetic technique that applies illumination with certain wavelength to modulate the biological activity of cells or subcellular components accurately. This technique is friendly to researchers of ophthalmology due to characteristics of the eyes including transparency, accessibility and comparative independence. Optogenetics can be used in retinal neurons, such as retinal ganglion cells (RGCs), even extended to vascular endothelial cells, immune cells and other ocular cells or cell substructures, which can further our understanding of ocular physiology and provide potential, therapeutic approaches for neurodegenerative diseases, vascular diseases, inflammation and other eye-related diseases. Improvement in effectiveness, safety and comfort is pivotal for this technique to expand application in ophthalmology and for its function to reach the physiology state of normal eyes. In this review, a comprehensive analysis of optogenetics progress in ophthalmology was performed. Challenges in imaging including light sensitivity, spatial resolution and temporal resolution, and problems in expression involving local and systemic safety, specificity and persistence were reviewed.

【Key words】 Ophthalmology; Optogenetics; Neurodegenerative disease

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.015

光遗传学是一项应用一定波长的光来精确调控特定细胞或亚结构生物活动的遗传学技术^[1]。从被发现以来,光遗传学技术已被广泛应用于认识及干预神经通路,如研究神经元之间的关系、治疗阿尔茨海默病等^[1-2]。光遗传学亦被应用于神经退化性眼病研究,如视网膜色素变性和年龄相关性黄斑变性等。目前,眼光遗传学的应用范畴有待拓展,其在成像和表达方面的发展也存在很多挑战。本文就眼光遗传学技术及其辅助技术的进展进行综述。

1 光遗传学及眼相关研究应用

光敏蛋白是光遗传学技术的核心,且按来源可被分为动物

视紫红质和微生物视紫红质。动物视紫红质,如脊椎动物视紫红质及视黑素等,通过 11-顺式-视黄醛光异构而激活 G 蛋白信号通路,产生光电转换和信号放大。微生物视紫红质则是通过全-反式-视黄醛光异构为 13-顺式-视黄醛,然后直接作用于细胞膜离子泵或离子通道。在微生物视紫红质中,盐细菌视紫红质(halorhodopsin, NpHR)是典型的光控离子泵型视紫红质,而以 ChR2 (channelrhodopsin-2)为代表的 ChR 则是光控离子通道型视紫红质。

2005 年,Boyden 等^[2]首次报道,使用光刺激即可实现对已转染 ChR2 海马神经元的毫秒级脉冲控制。眼球具有相对独立、透明及解剖位置表浅等特点,为光遗传学在眼部的应用增

加了可操作性。2006 年, Bi 等^[3]首次将光遗传学技术应用到视网膜退化性疾病 (retinal degeneration, RD) 小鼠上。RD 是一组渐进性光感受器细胞 (photoreceptor cells, PRCs) 功能退化的致盲眼病, Bi 等^[3]通过玻璃体腔注射腺相关病毒 2 (adenovirus 2, AAV2)-ChR2 转染视网膜内层神经细胞并成功恢复了 RD 小鼠的视觉诱发电位。

目前, 以晚期 RD 的视网膜双极细胞 (retinal bipolar cells, RBCs) 或视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 为靶细胞来实现对 PRCs 的感光替代仍是眼光遗传学研究中常见的思路^[4-14]。而且, 仅有的 2 项临床试验也由此开展: RST-001 是首款通过 FDA 登记的 AAV-ChR2 眼光遗传学针剂; 而 GS030-DP 则是根据新发现的感光红 ChR ChrimsonR^[15] 研发的针剂; 两者玻璃体腔注射均被用于治疗进展性视网膜色素变性, 且正在进行 I / II 期临床试验 (NCT02556736, NCT03326336)。光遗传学在除晚期 RD 之外的眼相关应用中较为少见。Stahl 等^[16]使用光遗传学技术在胆碱能神经元中特异表达 ChR2, 并以此来研究小鼠的眼球运动动力学。该研究表明, 眼光遗传学技术的应用不应该局限于视网膜, 甚至局限于神经细胞。在视网膜胆碱能无长突细胞特异表达 ChR2 光敏系统后, 人为给予光线刺激即可经神经-血管联系使视网膜血管得到扩张^[17]; 而已有研究应用光遗传学技术靶向血管内皮细胞实现对血管的快速收缩^[18]。这说明, 光遗传学技术能人为地实时调控眼血管功能, 并可成为研究眼血流动力学及干预眼血管性疾病, 如视网膜血管阻塞、糖尿病眼血管病变等的重要手段。光遗传学技术还能干预免疫细胞的活性^[19], 其或许能对小胶质细胞及其他眼免疫细胞的活性进行调控, 实现对眼相关炎症的治疗。

眼光遗传学的研究应用存在很多技术挑战, 如应用于眼成像时, 如何提高光敏蛋白的敏感度及分辨率; 进行转染表达时, 如何确保光遗传干预的安全性及持久有效性。当然, 作为眼光遗传学的辅助技术, 光控化学及新的评价途径等也推动着眼光遗传学的发展。

2 眼光遗传成像

目前, 使用转染光敏蛋白的方式治疗 RD 无法完全模拟视网膜成像的生理特点, 如光敏感度、空间分辨率及时间分辨率等。光敏感度是光感受器在一定波长光线刺激下产生光电信号所需的最小光强, 空间分辨率是眼辨析空间上两物体的最短距离, 而时间分辨率是眼辨析不同时间前后同一位置物体改变的最短时间, 三者的改善能够提高眼光遗传学治疗患者的视觉体验及舒适度。

2.1 光敏感度

多数光敏蛋白需要较高光强来诱导激活, 如激活表达 ChR2 的 RGCs 所需最小光强则比视锥细胞光阈值高 4~5 Log 单位^[20]。为了实现自然光线对光敏系统的激活, 需要提高光敏蛋白的光敏感度, 其具体措施包括以下 3 个方面: (1) 使用特异靶向的启动子 该措施能够使特定细胞群的光电信号统一, 避免复杂的信号相互抵消。例如, Chaffiol 等^[21]发现使用携带有 RGCs 特异启动子 SNCG 的光敏系统能使恒河猴视网膜在特

定光强下具有更强的光反应。(2) 使用动物视紫红质 视黑素和脊椎动物视紫红质等 G 蛋白偶联受体具有细胞内信号放大的级联反应^[22]。已有研究证实, 使用这种天然 G 蛋白偶联受体光敏系统在普通的自然光线下即可改善 RD 小鼠视力及视行为^[5, 22-23]。(3) 改进现有光敏蛋白 有研究报道 ChR2 的 H134R、L132C 和 T159S 突变型能降低光敏系统的激活阈值^[6, 24-25], 其中 ChR2-L132C/T159S 处理的 RD 小鼠在较低光刺激下即有明显的视动反应及瞳孔反射^[25]。除了更改突变型, 将光敏蛋白与细胞内光电信号级联组件相绑定亦能增大光敏蛋白的敏感度。van Wyk 等^[23]将光敏蛋白与代谢型谷氨酸受体 6 (metabotropic glutamate receptor 6, mGluR6) 嵌合表达于 RBCs, 仅予以自然光即可恢复 RD 小鼠视行为。

2.2 空间分辨率

视网膜光遗传学空间分辨率的提高可通过以下 2 种措施实现: (1) 模拟视网膜中央-周边感受野 RGCs 和 RBCs 所形成的中央-周边感受野是视网膜对比视觉形成的基础^[26-27]。在 RGCs 水平, 通过单一细胞中心和周边部位分别表达兴奋性和抑制性光敏蛋白来构建细胞的中央-周边感受野。Wu 等^[28]根据细胞突光敏蛋白表达水平和电生理反应区域等指标筛选出一组最佳 RGCs 锚点——Kv2.1 和 NLG1, 前者作为细胞中央锚点具有较小的电生理反应区, 后者作为周边锚点具有较广的电生理反应区, 且两者结合适用于模拟生理中央-周边感受野。在 RBCs 水平, 选择性地靶向 ON 或 OFF 状态的 RBCs 可实现中央-周边感受野的构建。已有证据表明 GRM6 (编码 mGluR6 蛋白) 启动子能使光敏蛋白特异地表达于 ON-RBCs^[5-6, 11, 22-23], 且 van Wyk 等^[23]发现使用 GRM6 启动子转染的 rd1 小鼠 (一种 RD 动物模型) RGCs 出现中央-周边感受野特性。(2) 抑制 RGCs 自发电活动以增加信噪比 缺乏上游 PRCs 的抑制, 病理状态下的 RGCs 将自发产生不自主电节律, 从而增加光电信号背景。Barrett 等^[7]发现眼内注射甲氯灭酸 (meclofenamic acid, MFA)、18-β-甘草亭酸和氟吡汀 3 种药物均能降低 RGCs 自发电脉冲, 且仅给予 MFA 不会降低眼光遗传学系统光敏感度。MFA 是一种缝隙连接阻断剂, 其联合使用于不同的眼光遗传系统均能显著增加 RD 小鼠视网膜光电信噪比^[7-8, 11]。

2.3 时间分辨率

良好的时间分辨率有利于双眼对动态物体的观察^[22]。时间分辨率的大小取决于光敏蛋白的光电动力学快慢。然而, 光电动力的增速伴随着感光敏感度的下降, 即时间分辨率与光敏感度成负相关^[29]。ChR2 的电生理反应迅速, 具有典型的快光电动力学特性; 其激活-失活时间小于 10 ms, 且反应频率可达 40 Hz, 但其光敏感阈值达 1×10^{14} photons/(cm²·s), 比视锥细胞高 4~5 Log 单位^[20]。而 RGCs 视黑素光敏感度比天然 ChR2 高 2~3 Log 单位, 其激活-失活时间可达 10 s 以上, 光电动力严重滞后^[20, 30]。光电动力取决于光敏蛋白信号转换、放大以及湮灭过程。视黑素通过细胞内 Gαi 和 Gβγ 进行换能, 使信号放大; 但该过程较为缓慢, 使得其光敏系统无法避免地具有较低的时间分辨率^[31]。目前, 这种规律已经被打破。例如, 与天然 ChR2 相比, 新发现的一种叫 Chronos 的 ChR 具有更快的光动

力学,且光敏感度也更高^[15]。此外,该规律不适用于抑制性光敏蛋白系统。NpHR 是最早应用于眼光遗传学的抑制性光敏蛋白,其光激活后能增加 Cl⁻内流,从而使细胞膜超级化实现对神经信号的抑制^[32]。NpHR 的突变体 eNpHR 3.0 以及天然质子泵 Arch 和 Arch T 不仅加快了光电动力学,还显著增加了光电流,使感光敏感度得到提升^[29]。之后,Govorunova 等^[33-34]又先后发现了 2 种不同的阴离子通道型视紫红质——蓝隐藻来源的 *GtACRs* 及舒卡多蛋白单胞菌来源的 *PsuACR_973*,前者光电流较 Arch 快,而光敏感度却增加了 1 000 倍,后者激活-失活时间较 *GtACR2* 又缩短了 95%,而光电流幅度增加了近 40%。

3 眼光遗传学的表达

为实现眼光遗传学技术向临床的顺利转化,我们必须关注其光毒性、光蛋白超负荷及其他局部与全身安全性问题,还有其特异性和持久性等表达有效性问题。

3.1 光毒性

在所有光遗传学研究中,眼易受到光毒性损伤^[1]。长时间光照,尤其 465~480 nm 蓝光照射能通过刺激晶状体上皮细胞,减少褪黑素合成,加速白内障形成^[35]。此外,强照度(如 3 000 lx)或长时间低照度(如 200 lx、>48 h)的光能诱使大片的 RPCs 丢失^[36-37]。认识到眼光毒性的重要性,研究者们试图从 2 个方面做出改进:(1)降低有效刺激光强 改进光敏蛋白使其所需激发光在眼细胞承受阈值以下,这将明显降低光损伤的可能性。(2)增加感光光谱波长 在眼光遗传学研究中,Cruxhalorhodopsin^[4]、ReaChR^[9]、ChrimsonR^[14]和 mVChR1^[10]等感光蛋白均能被长波长光激活。其中,ReaChR 是人工合成的感光蛋白 ChR。经橙光刺激(低于人视网膜安全光强),ReaChR 光敏系统即可恢复 rd1 小鼠视网膜和视皮质光反应;类似地结果也在恒河猴和人来源视网膜中得到验证^[9]。此外,绿藻毛枝藻来源的 ChrimsonR 在猴类实验得到初步安全验证,目前已被应用于临床试验中(NCT03326336)。

3.2 光蛋白超负荷

细胞质或膜蛋白的拥挤效应能影响细胞质或细胞膜内大分子的构象、分布、排列及相互作用^[38],而细胞膜结构粘滞度的改变亦能影响细胞的氧化呼吸链^[39]。因光遗传学所涉及光敏蛋白基因多来源于藻类,所以被转染的靶细胞本身不具备特异清除相关蛋白的能力。研究认为细胞中光敏蛋白过多或过长时间的表达能造成蛋白的拥挤效应,甚至造成超负荷而出现细胞毒性^[1]。Gaub 等^[22]建议采用天然动物光敏蛋白,并认为其能借助已有的清除系统减少细胞超负荷。值得注意的是,目前尚无研究发现明确的光蛋白超负荷。至少在形态结构上,经研究者们长期观察,无论玻璃体腔转染人或异源光敏蛋白,转染的视网膜均未发现明显的结构改变^[12]。被转染的细胞是否存在相应的清除能力以代偿拥挤效应或超负荷仍有待进一步研究。

3.3 局部炎症反应

Sugano 等^[10]在 RD 模型大鼠玻璃体腔注射 rAAV 装载的光遗传系统,通过组织病理学检测未发现明显炎症反应;

Ameline 等^[12]对 ChR2-AAV 干预后的 RD 模型进行长期观察,并未发现视网膜厚度异常,也证实了眼光遗传学在眼局部炎症方面的安全性;此外,有研究报道单纯蓝光(波长 450 nm)照射不但未引起炎症反应,还能够降低小胶质细胞促炎因子的表达^[40]。然而,光遗传学可通过干扰免疫细胞的 Ca²⁺内流来改变该细胞的免疫活性^[19]。因此,眼免疫细胞的非特异转染可诱发局部免疫功能紊乱,从而发生炎症反应。

3.4 全身安全性

眼光遗传学应用的全身安全性包括光敏系统免疫原性及系统非特异转染等。眼光遗传学转染路径主要包括玻璃体腔注射以及视网膜下注射等局部路径。由于血-眼屏障的存在,加上各种膜性结构,如晶状体囊膜、玻璃体膜及视网膜内界膜等的隔离,使得眼局部转染对全身的影响减小。Sugano 等^[10]对 RCS 大鼠(一种自发性遗传性视网膜色素变性大鼠)进行 AAV2-mVChR1(一种改良的 ChR1)玻璃体腔注射,发现该系统转染的组织仅局限于眼内,而眼外组织无该光敏系统的表达;同时,在实验鼠外周血中未发现抗-mVChR1,而抗-rAAV 衣壳升高,但小鼠并未出现明显的免疫反应。为了减少异体蛋白引起免疫反应,Gaub 等^[22]建议使用人类天然的光敏蛋白,如视黑素和视紫红质。

3.5 特异性和持久性

提高光遗传学表达的特异性在一定程度上增加了其眼科应用的安全性,同时也有利于其在 RD 眼内的功能成像。例如,启动子 GRM6 能靶向于 ON-RBCs^[5-6,11,22-23];SNCG 能靶向于恒河猴 RGCs^[21];VGAT 特异表达于视网膜抑制性中间神经元,而在 RPCs、RBCs、RGCs 和 Müller 细胞等兴奋性神经细胞中不被表达^[41]。眼光遗传学系统特异表达可通过设计特异的启动子实现,但仍须考虑 AAV 装载的光敏系统能否到达靶定的细胞。目前眼内转染光敏系统的方式为玻璃体腔注射或视网膜下注射,且前因可操作性较强,更适合临床转化。然而,AAV 系统穿透视网膜的能力有限,故经玻璃体腔注射途径无法使足够有效的 AAV 系统到达 RGCs,甚至 RBCs。Pan 等^[29]认为在临床中可以考虑联合玻璃体切割与内界膜剥除术以改善经玻璃体腔转染的穿透能力。

光敏系统眼内转染过程是有创的,其增加了眼内感染等并发症的风险。为了减少眼内多次注射,维持光敏系统较长时间的表达是必要的。有研究在 rd1 小鼠视网膜下注射视黑素光敏系统,连续观察 13 个月,仍能发现视网膜中视黑素的高表达,且小鼠瞳孔光反射和视觉行为均得到维持^[13]。此外,靶细胞的选择可直接影响光敏系统的持久性。例如,在视网膜色素变性中,神经退化从 PRCs 开始,之后可波及到 RBCs, RGCs 是最保守的细胞;而在 Leber 遗传性视神经病变和显性视神经萎缩等视神经退化性疾病中, RGCs 首先受到影响,而表达视黑素光敏系统的 RGCs 能抵抗疾病损害^[42]。

4 眼光遗传学辅助

4.1 光控化学

光控化学系利用小分子化合物在特定光条件下发生构象

改变的特性,实现细胞膜离子通道的阻断和非阻断效应的一种光电调控手段^[43]。最经典的光控化学物质是偶氮苯。有趣的是,偶氮苯光控物质能特异地表达于已退化 PRCs 下游的 RGCs, Tochitsky 等^[43]发现这种特异性机制为已退化 PRCs 下游的 RGCs 细胞膜高表达 P₂X 受体,而 P₂X 受体是偶氮苯进入细胞的必要条件。RD 小鼠玻璃体腔注射一种被称为 DENAQ 的小分子使得 RGCs 在自然白光下即产生电脉冲,同时也恢复了实验鼠的电生理及视行为^[44]。然而, DENAQ 在注射后几天内即被清除,其非持久性成为主要缺点。Tochitsky 等^[45]发现 DENAQ 的类似物 BENAQ 可将单次注射的作用时间延长至 1 个月,且在小鼠和兔眼实验中证实 BENAQ 的使用浓度超过所需浓度 10 倍仍不会造成光敏蛋白超负荷等细胞损害。使用羧基乙酸共聚物作为 DENAQ、QAQ 等偶氮苯物质的缓释载体能够将光控物质作用时间延长至少 2 个月^[46]。此外, Laprell 等^[47]发现一种新的非偶氮苯光控物质 DAD,其与 DENAQ 及 BENAQ 类似,能够影响神经细胞的 HCN 通道;与偶氮苯光控物质相比, DAD 具有更高的水溶性,有利于穿透视网膜组织; DAD 亦能特异靶向已退化 PRCs 下游的 RGCs,并产生中央-周边感受野,但其具体机制尚不清楚。

4.2 新辅助设备

眼光遗传学表达并产生相应的效应需要通过特定的检测途径进行判定,如电生理和视行为等。新的评价途径需在灵敏度、可操作性、直观性及其他特性方面进行优化。例如, Lu 等^[25]利用旋转的光栅制作了一种能够灵敏评估小鼠视觉行为的装置,并通过该装置区分出不同 ChR2 突变亚型的感光灵敏度; Jia 等^[48]将电生理传出线改为蓝牙传输,能实时检测自由活动小鼠的电生理变化,减少了麻醉等操作对电生理的影响; Cheong 等^[14]将钙离子感受器 GCaMP6s 和光敏系统共同转染 RD 小鼠,仅通过自适应光学扫描激光检眼镜即可直接活体检测视网膜细胞的不同光电反应。

除了新的评价手段,眼光遗传学也朝着个性化方向不断地发展。RD 患者所处病程可能不同,而且周围光照环境也会随着活动和时间发生变化。因此, Soltan 等^[49]研发了一款充电式头戴光源系统。该系统能够将投向佩戴者眼前的光线通过微型电子计算机处理转化为适配光敏蛋白敏感度的光信号,最高可达 8 100 像素。在 GS030-DP 的临床试验中,一款类似的并命名为 GS030-MD 的光源系统被用来配合 ChrimsonR 以弥补其光敏感度的缺陷(NCT03326336)。

5 小结

眼光遗传学利用光实现对眼特定神经细胞及其亚结构电活动的调控。目前眼光遗传学多局限于晚期 RD 的研究。为了使光遗传学在眼科的应用得到扩展,使其更安全、有效地在眼局部表达,使其功能更趋向于眼自然生理状态,研究者在眼光遗传成像光敏感度、空间分辨率和时间分辨率以及眼光遗传学的表达安全性、特异性和持久性等方面对其进行了改进。此外,新的光控化学及评价途径为眼光遗传学提供了技术补充。为了眼光遗传学的临床转化,各种改进措施的优化以及整

合须进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience [J]. Nat Neurosci, 2015, 18 (9) : 1213 - 1225. DOI: 10. 1038/nn. 4091.
- [2] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity [J]. Nat Neurosci, 2005, 8 (9) : 1263 - 1268. DOI: 10. 1038/nn1525.
- [3] Bi A, Cui J, Ma YP, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration [J]. Neuron, 2006, 50 (1) : 23 - 33. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2006. 02. 026.
- [4] Chuong AS, Miri ML, Busskamp V, et al. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin [J]. Nat Neurosci, 2014, 17 (8) : 1123 - 1129. DOI: 10. 1038/nn. 3752.
- [5] Cehajic-Kapetanovic J, Eleftheriou C, Allen AE, et al. Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin [J]. Curr Biol, 2015, 25 (16) : 2111 - 2122. DOI: 10. 1016/j. cub. 2015. 07. 029.
- [6] Macé E, Caplette R, Marre O, et al. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice [J]. Mol Ther, 2015, 23 (1) : 7 - 16. DOI: 10. 1038/mt. 2014. 154.
- [7] Barrett JM, Degenaar P, Sernagor E. Blockade of pathological retinal ganglion cell hyperactivity improves optogenetically evoked light responses in rd1 mice [J/OL]. Front Cell Neurosci, 2015, 9 : 330 [2018-07-23]. [https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC4548307/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4548307/). DOI: 10. 3389/fncel. 2015. 00330.
- [8] Barrett JM, Hilgen G, Sernagor E. Dampening spontaneous activity improves the light sensitivity and spatial acuity of optogenetic retinal prosthetic responses [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6 : 33565 [2018-07-26]. [https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC5030712/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5030712/). DOI: 10. 1038/srep33565.
- [9] Sengupta A, Chaffiol A, Macé E, et al. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina [J]. EMBO Mol Med, 2016, 8 (11) : 1248 - 1264. DOI: 10. 15252/emmm. 201505699.
- [10] Sugano E, Tabata K, Takahashi M, et al. Local and systemic responses following intravitreal injection of AAV2-encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 in a genetically blind rat model [J]. Gene Ther, 2016, 23 (2) : 158 - 166. DOI: 10. 1038/gt. 2015. 99.
- [11] Eleftheriou CG, Cehajic-Kapetanovic J, Martial FP, et al. Meclofenamic acid improves the signal to noise ratio for visual responses produced by ectopic expression of human rod opsin [J]. Mol Vis, 2017, 23 : 334 - 345.
- [12] Ameline B, Tshilenge KT, Weber M, et al. Long-term expression of melanopsin and channelrhodopsin causes no gross alterations in the dystrophic dog retina [J]. Gene Ther, 2017, 24 (11) : 735 - 741. DOI: 10. 1038/gt. 2017. 63.
- [13] De Silva SR, Barnard AR, Hughes S, et al. Long-term restoration of visual function in end-stage retinal degeneration using subretinal human melanopsin gene therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (42) : 11211 - 11216. DOI: 10. 1073/pnas. 1701589114.
- [14] Cheong SK, Strazzeri JM, Williams DR, et al. All-optical recording and stimulation of retinal neurons *in vivo* in retinal degeneration mice [J/OL]. PLoS One, 2018, 13 (3) : e0194947 [2018-10-23]. [https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC5875792/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5875792/). DOI: 10. 1371/journal. pone. 0194947.
- [15] Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations [J]. Nature Methods, 2014, 11 (3) : 338 - 346. DOI: 10. 1038/nmeth. 2836.
- [16] Stahl JS, Thumser ZC, May PJ, et al. Mechanics of mouse ocular motor plant quantified by optogenetic techniques [J]. J Neurophysiol, 2015, 114 (3) : 1455 - 1467. DOI: 10. 1152/jn. 00328. 2015.
- [17] Ivanova E, Yee CW, Sagdullaev BT. Leveraging optogenetic-based neurovascular circuit characterization for repair [J]. Neurotherapeutics, 2016, 13 (2) : 341 - 347. DOI: 10. 1007/s13311-015-0419-x.

- [18] Zhang S, Cui N, Wu Y, et al. Optogenetic intervention to the vascular endothelium [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 74 : 122 - 129. DOI: 10.1016/j.vph. 2015. 05. 009.
- [19] He L, Zhang Y, Ma G, et al. Near-infrared photoactivatable control of Ca²⁺ signaling and optogenetic immunomodulation [J/OL]. *eLife*, 2015, 4 : e10024 [2018 - 11 - 01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4737651/>. DOI: 10.7554/eLife.10024.
- [20] Koizumi A, Tanaka KF, Yamanaka A. The manipulation of neural and cellular activities by ectopic expression of melanopsin [J]. *Neurosci Res*, 2013, 75 (1) : 3 - 5. DOI: 10.1016/j.neures. 2012. 07. 010.
- [21] Chaffiol A, Caplette R, Jaillard C, et al. A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in macaque retina [J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (11) : 2546 - 2560. DOI: 10.1016/j.yimthe. 2017. 07. 011.
- [22] Gaub BM, Berry MH, Holt AE, et al. Optogenetic vision restoration using rhodopsin for enhanced sensitivity [J]. *Mol Ther*, 2015, 23 (10) : 1562 - 1571. DOI: 10.1038/mt. 2015. 121.
- [23] van Wyk M, Pielecka-Fortuna J, Löwel S, et al. Restoring the on switch in blind retinas: Opto-mGluR6, a next-generation, cell-tailored optogenetic tool [J/OL]. *PLoS Biol*, 2015, 13 (5) : e1002143 [2018 - 07 - 28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4423780/>. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002143.
- [24] Pan ZH, Ganjawala TH, Lu Q, et al. ChR2 mutants at L132 and T159 with improved operational light sensitivity for vision restoration [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9 (6) : e98924 [2018 - 08 - 20]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0098924>. DOI: 10.1371/journal.pone.0098924.
- [25] Lu Q, Ganjawala TH, Hattar S, et al. A robust optomotor assay for assessing the efficacy of optogenetic tools for vision restoration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59 (3) : 1288 - 1294. DOI: 10.1167/iovs.17-23278.
- [26] Chaffiol A, Ishii M, Cao Y, et al. Dopamine regulation of GABAA receptors contributes to light/dark modulation of the on-cone bipolar cell receptive field surround in the retina [J]. *Curr Biol*, 2017, 27 (17) : 2600 - 2609. DOI: 10.1016/j.cub. 2017. 07. 063.
- [27] Johnson KP, Zhao L, Kerschensteiner D. A pixel-encoder retinal ganglion cell with spatially offset excitatory and inhibitory receptive fields [J]. *Cell Rep*, 2018, 22 (6) : 1462 - 1472. DOI: 10.1016/j.celrep. 2018. 01. 037.
- [28] Wu C, Ivanova E, Zhang Y, et al. rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells *in vivo* [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (6) : e66332 [2018 - 08 - 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683040/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0066332.
- [29] Pan ZH, Lu Q, Bi A, et al. Optogenetic approaches to restoring vision [J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2015, 1 : 185 - 210. DOI: 10.1146/annurev-vision-082114-035532.
- [30] Tu DC, Zhang D, Demas J, et al. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells [J]. *Neuron*, 2005, 48 (6) : 987 - 999. DOI: 10.1016/j.neuron. 2005. 09. 031.
- [31] Kankanamge D, Ratnayake K, Samaradivakara S, et al. Melanopsin (Opn4) utilizes Gαi and Gβγ as major signal transducers [J/OL]. *J Cell Sci*, 2018, 131 (11) : jcs212910 [2018 - 08 - 13]. <https://jcs.biologists.org/content/131/11/jcs212910.long>. DOI: 10.1242/jcs.212910.
- [32] Busskamp V, Duebel J, Balya D, et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa [J]. *Science*, 2010, 329 (5990) : 413 - 417. DOI: 10.1126/science.1190897.
- [33] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Janz R, et al. Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics [J]. *Science*, 2015, 349 (6248) : 647 - 650. DOI: 10.1126/science.aaa7484.
- [34] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Rodarte EM, et al. The expanding family of natural anion channelrhodopsins reveals large variations in kinetics, conductance, and spectral sensitivity [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 43358 [2018 - 08 - 23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5335703/>. DOI: 10.1038/srep43358.
- [35] Alkozi HA, Wang X, Perez de Lara MJ, et al. Presence of melanopsin in human crystalline lens epithelial cells and its role in melatonin synthesis [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 154 : 168 - 176. DOI: 10.1016/j.exer. 2016. 11. 019.
- [36] Benedetto MM, Guido ME, Contin MA. Non-visual photopigments effects of constant light-emitting diode light exposure on the inner retina of Wistar rats [J/OL]. *Front Neurol*, 2017, 8 : 417 [2018 - 08 - 27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5566984/>. DOI: 10.3389/fneur. 2017. 00417.
- [37] Garcia-Ayuso D, Galindo-Romero C, Di PJ, et al. Light-induced retinal degeneration causes a transient downregulation of melanopsin in the rat retina [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 161 : 10 - 16. DOI: 10.1016/j.exer. 2017. 05. 010.
- [38] Guigas G, Weiss M. Effects of protein crowding on membrane systems [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858 (10) : 2441 - 2450. DOI: 10.1016/j.bbmem. 2015. 12. 021.
- [39] Budin I, de Rond T, Chen Y, et al. Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition [J]. *Science*, 2018, 362 (6419) : 1186 - 1189. DOI: 10.1126/science.aat7925.
- [40] Cheng KP, Kiernan EA, Eliceiri KW, et al. Blue light modulates murine microglial gene expression in the absence of optogenetic protein expression [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 21172 [2018 - 07 - 10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4756664/>. DOI: 10.1038/srep21172.
- [41] Xu GZ, Cui LJ, Liu AL, et al. Transgene is specifically and functionally expressed in retinal inhibitory interneurons in the VGAT-ChR2-EYFP mouse [J]. *Neuroscience*, 2017, 363 : 107 - 119. DOI: 10.1016/j.neuroscience. 2017. 09. 006.
- [42] Ksendzovsky A, Pomeranec IJ, Zaghoul KA, et al. Clinical implications of the melanopsin-based non-image-forming visual system [J]. *Neurology*, 2017, 88 (13) : 1282 - 1290. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003761.
- [43] Tochitsky I, Helfft Z, Meseguer V, et al. How azobenzene photoswitches restore visual responses to the blind retina [J]. *Neuron*, 2016, 92 (1) : 100 - 113. DOI: 10.1016/j.neuron. 2016. 08. 038.
- [44] Tochitsky I, Polosukhina A, Degtyar VE, et al. Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells [J]. *Neuron*, 2014, 81 (4) : 800 - 813. DOI: 10.1016/j.neuron. 2014. 01. 003.
- [45] Tochitsky I, Trautman J, Gallerani N, et al. Restoring visual function to the blind retina with a potent, safe and long-lasting photoswitch [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 45487 [2018 - 08 - 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5390669/>. DOI: 10.1038/srep45487.
- [46] Groynom R, Shoffstall E, Wu LS, et al. Controlled release of photoswitch drugs by degradable polymer microspheres [J]. *J Drug Target*, 2015, 23 (7-8) : 710 - 715. DOI: 10.3109/1061186X. 2015. 1060978.
- [47] Laprell L, Tochitsky I, Kaur K, et al. Photopharmacological control of bipolar cells restores visual function in blind mice [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127 (7) : 2598 - 2611. DOI: 10.1172/JCI92156.
- [48] Jia Y, Khan W, Lee B, et al. Wireless opto-electro neural interface for experiments with small freely behaving animals [J/OL]. *J Neural Eng*, 2018, 15 (4) : 046032 [2018 - 08 - 23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6091646/>. DOI: 10.1088/1741-2552/aac810.
- [49] Soltan A, Barrett JM, Maaskant P, et al. A head mounted device stimulator for optogenetic retinal prosthesis [J/OL]. *J Neural Eng*, 2018, 15 (6) : 065002 [2018 - 10 - 21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6372131/>. DOI: 10.1088/1741-2552/aadd55.

(收稿日期:2018-11-06 修回日期:2019-09-23)

(本文编辑:刘艳)