

光遗传学技术在心律失常研究中的应用及进展

阿依尼尕尔·马木提 周贤惠

(新疆医科大学第一附属医院心脏起搏电生理科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

【摘要】光遗传学技术作为一种新型技术,将光学与遗传学相结合,运用光学方法对心脏系统进行干扰,为心脏电活动的精确反馈与控制提供了新的工具与方法。目前,光遗传学技术在心律失常领域的应用主要集中在通过控制不同类型的心肌细胞,从而实现心脏起搏、除颤或复律、终止心律失常和细胞通讯等。它利用光门控心脏离子通道,以一种特定、可逆和无创伤的方式对心律失常进行电调制,从而干预心律失常的治疗。现对近年来光遗传学在心律失常治疗领域中的应用及进展做一系统阐述。

【关键词】光遗传学;心律失常;光门控;视紫红质通道蛋白 2;治疗;折返

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.07.004

Application and Progress of Optogenetics in Study of Cardiac Arrhythmias

Ayinigaer · Mamuti, ZHOU Xianhui

(Department of Electrophysiology of Cardiac Pacing, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China)

【Abstract】Optogenetics is a kind of new technology combined with genetics and optics. It disturbs the cardiac system by optics, and provides some new tools and methods about accurate feedback and control of the cardiac electrical activity. At present, the application of optogenetics in the field of cardiac arrhythmias, is mainly focused on achieving the cardiac pacing, defibrillation or cardioversion, termination of arrhythmia and cell communication, etc by controlling the different types of myocardial cells. Optogenetics uses optical gating cardiac ion channels to carry out the electromodulation of cardiac arrhythmias by a certain, reversible and noninvasive way, and then to intervene in the treatment of arrhythmias. The application and progress of optogenetics in the field of arrhythmia treatment in recent years are systematically reviewed in this article.

【Key words】Optogenetics; Arrhythmias; Optical gating; Channelrhodopsin 2; Treatment; Reentry

光遗传学技术亦称光基因工程,是光学与遗传学相结合的一种新型技术,运用特定的光学方法对心脏系统进行干扰,增加心肌细胞对光照的敏感性,为心脏电活动的精确反馈与控制提供了新的工具与方法。通过目前已有的研究可知,光遗传学技术在心律失常领域的应用主要集中在通过控制不同类型的心肌细胞,从而实现心脏起搏、除颤或复律、终止心律失常和细胞通讯等。它利用心脏光门控离子通道,以一种特定、可逆和无创伤的方式对心脏电活动进行电调制,从而干预心律失常的治疗。众所周知,心脏受到内源性和外源性自主神经的支配,自主神经系统对心脏功能和心律失常的发生都具有重要意义,通过特定的光学方法影响心脏自主神经功能,从而调控心脏电活动及机械活动。作为一项新型技术,光遗传学技术在治疗

心律失常方面表现出了诸多优点,有极大的临床应用潜力,但在将此技术推广应用于临床治疗的道路上,仍有诸多问题需解决。现通过介绍光遗传学技术目前在心脏领域上已有的研究,拟对近年来光遗传学在心律失常治疗领域中的应用及进展做一系统阐述。

1 光遗传学技术与心脏

光遗传学技术是一项结合光学和遗传学技术,对特定细胞、组织及环路等中的某一特定事件实现精确控制与反馈的新兴生物技术^[1]。在心脏方面,既往光遗传学技术一直都用于心脏的成像,但近期研究发现,光学技术也可用来调节心脏的电生理功能^[2]。通常,光照对心脏的电活动无影响,但通过特定的方法,可使心肌细胞对光照的敏感性增加。使心肌细胞对光照敏感的方法有两种,第一种是通过传递编码光敏

感蛋白的基因视蛋白,视蛋白通常在动物的眼睛以及某些感光细菌和藻类中表达,形成膜结合光敏离子通道和泵^[3]。第二种使心肌细胞对光敏感的方法是直接插入荧光染料分子,荧光染料分子照射后会损伤和/或杀死细胞,这一技术被称为光动力疗法。最近有研究表明,光动力疗法可用于心脏特定部位心肌细胞的消融,从而阻断异常传导和治疗心律失常^[4-5]。

光遗传学技术亦称光基因工程^[6],是通过遗传方法将特异的视蛋白定向到目标神经元上,然后在相应的波长或频率上感受光的刺激,从而达到刺激或抑制神经元的作用,进而控制特定神经回路的活动,最终在调节实验动物的生理活动和行为方面发挥作用^[1]。与传统的物理刺激方法不同,光遗传学技术可将视觉蛋白特异性地转染到特定的细胞中,从而实现对特定类型细胞的刺激掌控。刺激由光蛋白离子通道介导,该通道是沿着神经通路本身的传导方向传递,对实验动物的损伤较小,并且更接近生理状态下神经系统兴奋模式^[7]。

结合光学方法对心脏系统进行干预和观察,可提供一种新的工具与方法,从而精确地反馈与控制心脏电活动,这在以往的药物和电刺激中是不可能实现的。新的全光电生理学实验工具可精确地操控和有效地量化心脏动力学,从而使其具有可比性,能提供关于心律失常的发生和干预、心脏复律和类起搏器功能等的新见解^[8]。

2 光遗传学技术在心脏领域的应用

目前,光遗传学的心脏应用主要集中在控制不同类型心肌细胞的电活动,从而达到光起搏,恢复心肌细胞电传导,实现心脏再同步化、除颤或复律、终止心律失常等^[9-15],以及通过光刺激影响心脏自主神经功能,从而调控心脏电活动及机械活动。

2.1 光遗传学与心脏交感神经

星状神经节是交感神经支配心脏的重要通路,可影响窦房结、房室结、心房和心室的功能^[16]。Wengrowski 等^[17]研究了对心脏交感神经元释放去甲肾上腺素的光遗传学调控及其对心脏电和机械功能的影响。通过光刺激激活心脏交感神经纤维,可明显增加去甲肾上腺素的释放,使得心率加快,心肌收缩力增强,动作电位缩短,更易发生心律失常且病情更重。

在心肌缺血患者中,恶性室性心律失常仍是心脏性猝死的重要原因。心脏交感神经系统,特别是左星状神经节,在调节心室电生理和心律失常中起着重要的作用,其病理性增强易于诱发室性心律失常事件,

而抑制其过度激活具有抗室性心律失常作用^[18]。于锂镭团队通过动物实验研究发现一种可逆、可控的光遗传学方法,可精准可控地抑制左星状神经节神经活性来调节心肌缺血所致的左星状神经节神经活动,从而抑制心肌缺血所致的室性心律失常^[19]。该研究团队发明了一种基于光遗传学原理的小型植入式无线神经调控装置^[20],对神经尤其是心脏自主神经进行精确调控,进而再平衡自主神经功能。该研究目前仍属于动物实验研究,还需在光刺激设备仪器和蓝牙智能调控等多方面进行进一步的探索与完善,或许不久的将来便能将此研究转化应用于临床治疗^[21]。

2.2 光遗传学诱发心律失常

光遗传学可用于瞬时诱发心律失常。光遗传学控制的高精度允许特定细胞在心律失常的产生中发挥作用,从而为心律失常的预防和治疗提供新的见解。

Arrenberg 等^[11]通过照亮连接房室和心室的房室管,成功地抑制了盐系菌视紫红质蛋白表达的斑马鱼胚胎中心脏电信号激活的传递。结果,心房和心室之间的传导被阻断,导致房室传导阻滞现象的发生。

视紫红质通道蛋白 2 (CHR2) 是一种来源于藻类的视蛋白,对蓝光敏感^[3]。Zaglia 等^[22]通过 CHR2 在小鼠心肌细胞中的特异性表达,诱导小鼠发生持续性心律失常。最初,快速 (10 ~ 20 Hz) 光门控起搏无法诱发持续心律失常,当部分小鼠心室缺血后,通过对心肌缺血部分应用相同的光刺激,发现在右心室流出道光门控起搏后,诱发的心律失常持续更久、更复杂,这与右心室流出道发生心律失常的观察结果一致^[23]。Burton 等^[24]采用基因传递技术在单层心肌细胞中表达 CHR2。在计算机控制的照明系统中,能在电波传播前激发单层的部分,从而增加表观传导速度。采用由微镜装置产生的蓝光来控制心肌组织的收缩,并短暂终止电波的单向或双向 (双向阻滞) 传导。此外,能通过使用螺旋波形照明模式来诱发持续的螺旋波 (心脏中出现螺旋波是发生心律失常的标志)。对螺旋波采用不同的照明方式,能完全终止螺旋波或扭转其螺旋度,从而引起心律失常。

2.3 光遗传学技术在缓慢性心律失常中的应用

在某些转基因动物体内,通过心肌细胞中 CHR2 的表达,心脏的光门控起搏可发挥作用^[1],Vogt 等^[25]将具有心肌趋向的腺相关病毒与红色荧光蛋白 (mCherry) 染料融合表达的 CHR2,系统地注射到野生型小鼠心脏内,4 ~ 10 周后,在整个心脏中可检测到 mCherry 荧光染色。分离的单细胞显示,平均 58% 的心肌细胞为 mCherry 荧光染色阳性,表现为光诱导电

流内流,引起动作电位和心肌收缩。在 74% 的小鼠体内,对左心室引起心室起搏的脉冲照明,需更高的光强度,以缩短脉冲持续时间或照明强度。体内光门控起搏在长时间内稳定,对正常窦性心律无不良影响,终止刺激后的心电参数提示起搏时心输出量充足^[25]。该实验证实基因转移可产生足够的 CHR2 光门控电流,可用于体内光门控起搏,为未来的光门控起搏器和无痛除颤治疗奠定基础。

Scardigli 等^[26]应用闭环电路方法模拟穿过心室的再入电回路。他们开发了一个全光学平台以实时监测和调控心脏电活动,通过该方法可在房室传导阻滞恢复正常的心电活动,并恢复心室内正常电传导。这项创新使得通过实时光刺激控制正常和异常心律成为可能,并为此提供了可行方案。

2.4 光遗传学技术终止快速性心律失常

有研究表明,通过光干预终止快速性心律失常是可行的,这一发现可能会影响心律失常治疗方案的发展。光遗传学干预暂时调节心脏电功能,不会导致心脏组织的电特性永久改变。重要的是,光干预终止心律失常可避免高压电击除颤产生的副作用。

2.4.1 室性快速性心律失常的终止

光门控去极化离子通道在成年大鼠心脏中表达,通过短暂的心室表面局部照明,可使室性心动过速(VT)不经消融或电击而终止。自然电化学梯度驱动的光诱导电流可有效、重复地终止单形和多态 VT,为生物心律失常的终止提供理论依据^[27]。

为探讨光干预终止室性心律失常的作用,Nyins 等^[27]用腺相关病毒载体编码光门控去极化离子通道激活视紫红质,将其在成年大鼠心脏中转基因表达,从而实现视紫红质介导的去极化和起搏。其次,在 Langendorff 装置中,用脉冲起搏诱发光基因修饰心脏的 VT,然后通过程序化的局部心外膜照明来诱发 VT。470 nm 单脉冲光照射(1 000 ms, 2.97 mW/mm²)能终止 97% 的单形性 VT 和 57% 的多形性 VT,而无照明组为 0%。光图显示心律失常终止前电压信号明显延长,动作电位时程缩短,几乎完全抑制光致心律失常的终止。实验结果显示,局部心外膜照明光基因修饰后的成年大鼠心脏,可以有效和重复的方式,使室性心律失常不经消融或电击而终止^[27]。上述研究表明,光门控去极化离子通道通过短暂和局部的心外膜照射而被激活。这种生物终止心律失常的方法使人们能不用电而精确地控制异常心律,从而使正常心律得以恢复。

2.4.2 心室颤动的终止

光遗传学除颤是一种理论上的电治疗替代方法,

它涉及心脏光敏离子通道的扩展(通过基因或细胞治疗)和心脏表面的照明(通过植入的 LED 阵列),以激发光诱导的激活。Karathanos 等^[28]为明确这种治疗是否能终止心室颤动,并确定光敏离子通道特性和照明结构,对模拟人心室快速起搏诱导心室颤动的模型进行电生理模拟。当大多数心室组织被光直接刺激时,心室颤动被终止,光的强度足以在一个不耦合的细胞中诱发动作电位。蓝光照明未成功地终止心室颤动,但用注入红光源的密集阵列照射红光敏感离子通道,却成功地起到了除颤作用^[28]。此实验结果表明,视蛋白的光敏性是决定光除颤效果的最重要因素,红光敏感离子通道在心脏的成功表达,对于基于光遗传学的 LED 阵列进行除颤治疗的有效发展必不可少。

2.4.3 房性快速性心律失常的终止

心房纤维化会导致心房组织发生结构重构、电重构及功能异常,与房性快速性心律失常和其他心律失常,以及卒中和心肌病等多种疾病的发生相关^[29]。Boyle 等^[30]通过临床上对心房纤维化患者磁共振扫描重建心房电生理模型,来探索光遗传学方法终止房性心动过速的可行性,并比较两种不同照射方式的区别:分布式和靶向式。结果表明,在将光敏感蛋白基因 CHR2 传递到心肌细胞并成功表达时,模拟显示目标光脉冲持续时间长于房性心动过速周期,可有效和可靠地终止房性心动过速,表明靶向光遗传学刺激可能是一种更可靠的除颤方法。

2.4.4 心房颤动的终止

心房颤动常涉及折返电活动(如螺旋波),Bingen 等^[31]进行了一项通过光诱导螺旋波终止的可行性研究。他们通过慢病毒载体在新生大鼠心房肌细胞单层中表达钙转运 CHR,然后在快速电起搏单层诱发折返性心律失常,并尝试用光照去颤动。弱脉冲光和长脉冲光均可终止转染钙转运通道视紫红质的单层细胞的折返电活动,而无钙转运通道表达的单层细胞则不起作用。螺旋波转移至单层心肌细胞边缘后,心律失常终止。这一研究表明,在光基因工程的作用下,光致心律失常本身所产生的光诱导去极化电流可有效地终止单层心房肌细胞中的螺旋波。这些结果为不经心脏外部放电除颤便可终止心房颤动提供了理论依据,为光遗传学治疗心房颤动开拓了道路。

3 光遗传学治疗心律失常的优点与局限性

光遗传学技术作为在过去 10 年中对神经生物学影响最大的技术之一,在临床疾病研究方面也展示了巨大的潜力^[32]。在治疗心律失常方面,光遗传学技术表现出了诸多优点,如光敏感蛋白可在心脏的靶细胞

和靶部位更精准地表达,光敏感蛋白的组合可形成兴奋和抑制的双向调控,光波刺激的阈值低和不适反应少等,使得光遗传学在心律失常领域得到人们越来越多的关注与重视。

对于目前的遗传学技术来说,将光敏感蛋白在活体心脏中表达已可以实现,但将光遗传学技术应用于临床还有许多问题需解决。对于人体心脏,外源性光照能否安全有效地启动光敏感蛋白,其表达能否长期安全有效等问题,仍需进一步探究,载体的选择和干预方式等技术上也需更多的试验来给出更多的研究数据^[33]。

虽然目前治疗心律失常仍以药物治疗、射频消融及电除颤等方式为主,但随着人们不懈的探索与发现,光遗传学作为一种无创又新型的技术方法,在心律失常的临床治疗方面将会有理想的发展前景,具有极大的应用潜力。

参考文献

- [1] Deisseroth K. Optogenetics[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(1):26-29.
- [2] Karathanos TV, Boyle PM, Trayanova NA. Light-based approaches to cardiac arrhythmia research: from basic science to translational applications[J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2016, 10(suppl 1):47-60.
- [3] Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(24):13940-13945.
- [4] Avula UMR, Yoon HK, Lee CH, et al. Cell-selective arrhythmia ablation for photomodulation of heart rhythm[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(311):311ra172.
- [5] Calkins H, Kuck KH, Cappato R, et al. 2012 HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design[J]. *Europace*, 2012, 14(4):528-606.
- [6] Peralvarez-Marín A, Garriga P. Optogenetics comes of age: novel inhibitory light-gated anionic channels allow efficient silencing of neural function[J]. *Chembiochem*, 2016, 17(3):204-206.
- [7] Lin SC, Deisseroth K, Henderson JM. Optogenetics: background and concepts for neurosurgery[J]. *Neurosurgery*, 2011, 69(1):1-3.
- [8] Entcheva E, Bub G. All-optical control of cardiac excitation: combined high-resolution optogenetic actuation and optical mapping[J]. *J Physiol*, 2016, 594(9):2503-2510.
- [9] Nussinovitch U, Gepstein L. Optogenetics for in vivo cardiac pacing and resynchronization therapies[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(7):750-754.
- [10] Bruegmann T, Boyle PM, Vogt CC, et al. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(10):3894-3904.
- [11] Arrenberg AB, Stainier DY, Baier H, et al. Optogenetic control of cardiac function[J]. *Science*, 2010, 330(6006):971-974.
- [12] Crocini C, Ferrantini C, Coppini R, et al. Optogenetics design of mechanistically based stimulation patterns for cardiac defibrillation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35628.
- [13] Herron TJ, Lee P, Jalife J. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues[J]. *Circ Res*, 2012, 110(4):609-623.
- [14] Nyns EC, Kip A, Bart CI, et al. Optogenetic termination of ventricular arrhythmias in the whole heart: towards biological cardiac rhythm management[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(27):2132-2136.
- [15] Wang Y, Lin WK, Crawford W, et al. Optogenetic control of heart rhythm by selective stimulation of cardiomyocytes derived from Pnmt⁺ cells in murine heart[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:40687.
- [16] Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, et al. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9):1500-1515.
- [17] Wengrowski AM, Wang X, Tapa S, et al. Optogenetic release of norepinephrine from cardiac sympathetic neurons alters mechanical and electrical function[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 105(2):143-150.
- [18] 周明敏, 刘育. 心-心交感神经反射与室性心律失常[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2019, 33(1):59-62.
- [19] Yu L, Zhou L, Cao G, et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(22):2778-2790.
- [20] 武汉大学. 一种基于光遗传学的无线神经调控装置: CN201710113614. 4 [P]. 2017-06-20.
- [21] 郭潇雅. 用蓝牙连接生命[J]. *中国医院院长*, 2017, (10):32-33.
- [22] Zaglia T, Pianca N, Borile G, et al. Optogenetic determination of the myocardial requirements for extrasystoles by cell type-specific targeting of ChannelRhodopsin-2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(32):E4495-E4504.
- [23] Dobrzynski H, Anderson RH, Atkinson A, et al. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 139(2):260-288.
- [24] Burton RA, Klimas A, Ambrosi CM, et al. Optical control of excitation waves in cardiac tissue[J]. *Nat Photonics*, 2015, 9(12):813-816.
- [25] Vogt CC, Bruegmann T, Malan D, et al. Systemic gene transfer enables optogenetic pacing of mouse hearts[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(2):338-343.
- [26] Scardigli M, Müllenbroich C, Margoni E, et al. Real-time optical manipulation of cardiac conduction in intact hearts[J]. *J Physiol*, 2018, 596(17):3841-3858.
- [27] Nyns ECA, Kip A, Bart CI, et al. Optogenetic termination of ventricular arrhythmias in the whole heart: towards biological cardiac rhythm management[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(27):2132-2136.
- [28] Karathanos TV, Bayer JD, Wang D, et al. Opsin spectral sensitivity determines the effectiveness of optogenetic termination of ventricular fibrillation in the human heart: a simulation study[J]. *J Physiol*, 2016, 594(23):6879-6891.
- [29] 王燕, 许纲, 程立君, 等. 心房纤维化研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(3):389-392.
- [30] Boyle PM, Murphy MJ, Karathanos TV, et al. Termination of re-entrant atrial tachycardia via optogenetic stimulation with optimized spatial targeting: insights from computational models[J]. *J Physiol*, 2018, 596(2):181-196.
- [31] Bingen BO, Engels MC, Schali MJ, et al. Light-induced termination of spiral wave arrhythmias by optogenetic engineering of atrial cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 104(1):194-205.
- [32] 郭轩彤, 张春波. 光遗传学技术研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(3):87-96.
- [33] 王晞, 来欣. 光遗传学技术与光起搏——心电生理研究中的新手段[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2014, 28(4):283-285.

收稿日期:2019-10-09