

腺相关病毒不同转染策略应用于心脏光遗传学的研究

樊哲儒¹ 王龙¹ 王晞² 周芳¹

(1. 武汉大学人民医院麻醉科, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究腺相关病毒不同转染策略构建大鼠心脏光遗传学模型的可行性与有效性。**方法** 20 只 SD 大鼠, 随机分为 4 组: 心肌注射组、心包注射组、心外膜滴涂组、正常对照组, 每组 5 只, 分别心肌注射、心包注射、心外膜滴涂 rAAV9-CAG-hChR2 (H134R)-eYFP, 正常对照组只开胸。造模 4 周后, 超声测量 4 组大鼠左室射血分数及左室短轴缩短率; 记录体表心电图, 测量 RR 间期、PR 间期和 QRS 时限。开胸进行 473 nm 波长蓝光照明实验, 根据光输出信号与心电图判断心脏节律是否被光脉冲捕获。对心脏组织石蜡切片进行 HE 染色和荧光观察。**结果** 心肌注射组、心包注射组、心外膜滴涂组大鼠与正常对照组大鼠相比, 心电参数无显著差异 ($P > 0.05$), 左室射血分数及左室短轴缩短率无显著差异 ($P > 0.05$)。用一定频率和功率的 473 nm 蓝光照射心肌注射部位或心脏, 能捕获心肌注射组和心包注射组心脏的节律, 但不能捕获心外膜滴涂组。HE 染色显示心肌注射组注射部位心肌纤维排列紊乱、炎症细胞浸润。荧光显示心肌注射组、心包注射组、心包滴涂组心室切片均有 ChR2 (H134R) 转染。**结论** 心包注射途径能有效构建大鼠心脏光遗传学模型。

【关键词】 光遗传学; 腺相关病毒; 光敏蛋白质; 光起搏; 心包注射

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2023.12.020

Different Transfection Strategies of Adeno-Associated Virus Applied to Cardiac Optogenetics

FAN Zheru¹, WANG Long¹, WANG Xi², ZHOU Fang¹

(1. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China; 2. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To investigate the feasibility and effectiveness of different transfection strategies of adeno-associated virus to construct a rat cardiac optogenetic model. **Methods** A total of 20 SD rats were purchased and randomly divided into four groups: myocardial injection group, pericardial injection group, epicardial drip coating group and normal control group. The rats ($n = 5$) were injected with rAAV9-CAG-hChR2 (H134R)-eYFP by myocardial injection, pericardial injection and epicardial drip coating respectively. After Four weeks, left ventricular ejection fractions (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) of all rats were measured by ultrasound; record the body surface ECG to measure the RR interval, PR interval and QRS wave time frame. Open-chest light experiments with 473 nm blue light were performed to determine whether the heart rhythm was captured by the light pulse based on the light output signal and the body surface ECG. **Results** The rats in the myocardial injection group, pericardial injection group and epicardial drip coating group, compared with the rats in the normal control group, showed no significant differences in ECG parameters ($P > 0.05$) and no significant differences in LVEF and LVFS ($P > 0.05$). The rhythm of myocardial injection and pericardial injection groups could be captured by irradiating the myocardial injection site or heart with 473 nm blue light of certain frequency and power, but not the epicardial drip coating group. HE staining showed disorganized myocardial fiber arrangement and inflammatory cell infiltration at the injection site in the myocardial injection group. Fluorescence showed ChR2 (H134R) transfection in ventricular sections of the myocardial injection group, pericardial injection group, and pericardial drip coating group. **Conclusion** The pericardial injection can effectively construct cardiac optogenetics model.

【Key words】 Optogenetics; Adeno-associated virus; Photosensitive protein; Optical pacing; Pericardial injection

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81772044); 湖北省重点实验室开放项目 (2021KFY035)

通信作者: 王龙, E-mail: wanglongwhu@163.com

光遗传学是利用遗传技术,将光敏感元件导入细胞或组织,与光学技术结合^[1],对生物特定功能进行研究。2005 年,神经科学领域首次报道光遗传学应用,Boyden 等^[2]将光遗传学应用于神经回路。2010 年 Bruegmann 等^[3]将带有视紫红质通道蛋白-2 (channelrhodopsin-2, ChR2) 的病毒结合到小鼠胚胎干细胞中,用于证明体外光起搏。自此光遗传学应用于心脏^[4-6],开启心脏光遗传学新兴研究方向^[3]。将 ChR2^[1]特定表达于心肌细胞,特定波长蓝光照射导致细胞膜去极化,引发心肌细胞动作电位,使光遗传学成为一种心脏起搏、同步化、终止心律失常的新途径,有望实现无电击和院外转复。药物、电子起搏器等有相关免疫反应、感染风险、设备故障和促心律失常的局限性,这些问题可通过光遗传技术替代解决。本研究利用载有 ChR2 (H134R) 目的基因的重组腺相关病毒血清型 9 (recombinant adeno-associated virus serotype 9, rAAV9)^[7],通过心肌注射、心包注射、心外膜滴涂 3 种途径,将 ChR2 表达于大鼠心肌细胞,给予 473 nm 波长蓝光,探讨不同途径构建大鼠光遗传模型的可行性、安全性和有效性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性 SD 大鼠 20 只,体重 (120 ± 10) g,购自武汉大学人民医院实验动物中心,随机分为 4 组:心肌注射组 ($n=5$),心包注射组 ($n=5$),心外膜滴涂组 ($n=5$),正常对照组 ($n=5$)。携带 eYFP 荧光的载有 ChR2 (H134R) 的 rAAV9 购于武汉枢密脑科学技术有限公司。外科用封合剂购于百特医疗用品贸易(上海)有限公司。

1.2 光遗传模型制备

所有动物均在 20 ~ 25 °C 的无特定病原体级环境内恒温饲养。适应性饲养 1 周后,禁食 8 h,予大鼠腹腔注射 60 mg/kg 的 3% 戊巴比妥钠进行麻醉,将其仰卧位固定于手术台上。行气管插管术,连接小动物呼吸机,正压通气,潮气量 10 ~ 15 mL,呼吸频率 70 次/min。开胸后用扩胸器固定,充分暴露其心室游离壁的同时避免损伤肺叶。心肌注射组开胸术后,用 30 G 胰岛素注射器将 rAAV9 (60×10^{12} μL) 进行心肌注射。心包注射组开胸术后,用 5-0 线穿过心包膜,将心包膜提起与心肌分离出间隙,通过间隙用 30 G 胰岛素注射器将 rAAV9 (60×10^{12} μL) 注射入心包腔内,注射完毕后棉签轻轻按压注射点避免病毒载体随心脏跳动漏出心包外。心外膜滴涂组在开胸术后,用自制固定器在心室游离壁上定位,将相同容量的 rAAV9 载体滴入固定器内,喷入适量外科用封合剂,移除固定器,待封合剂

固定膨胀后关胸。术后逐层缝合关胸,正常对照组大鼠只开胸。4 组大鼠同等条件下给予常规饲料及水饲养 4 周。

1.3 心脏超声检查

光遗传造模 4 周后第 1 天,用超声仪器 (Vino V6) 评估大鼠心脏功能。4 组大鼠腹部注射 3% 戊巴比妥钠 (10 ~ 20 mg/kg) 麻醉,保留大鼠自主呼吸,胸部脱毛后仰卧位固定行经胸超声心动图检查。测量大鼠左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 及左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS),连续 3 次后计算平均值。检查完成后大鼠充分保暖直至清醒。

1.4 体表心电图记录与光起搏效应评价

光遗传造模 4 周后第 2 ~ 5 天,4 组大鼠进行光起搏实验,记录体表心电图。大鼠四肢用针刺电极连接 PowerLab 数据采集系统记录 II 导联体表心电图,利用 LabChart 8.0 分析 RR 间期、PR 间期和 QRS 时限。

设置 473 nm 蓝光激光器的脉冲宽度为 20 ms,连续 20 个脉冲,使用不同光照频率与光照功率 (功率范围 0.02 ~ 65.50 mW)^[8]照射心脏 (紧贴心脏表面),根据同步记录的光输出信号与体表心电图判断心脏节律是否被光脉冲夺获。

1.5 HE 染色和 eYFP 荧光观察

完成光照实验的大鼠取心肌组织,生理盐水冲洗干净,4% 多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋切片。用苏木素和伊红染液进行 HE 染色,观察心肌形态学变化。用荧光显微镜观察 eYFP 的绿色荧光,以确定病毒的转染情况。

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,计数资料用率表示,采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

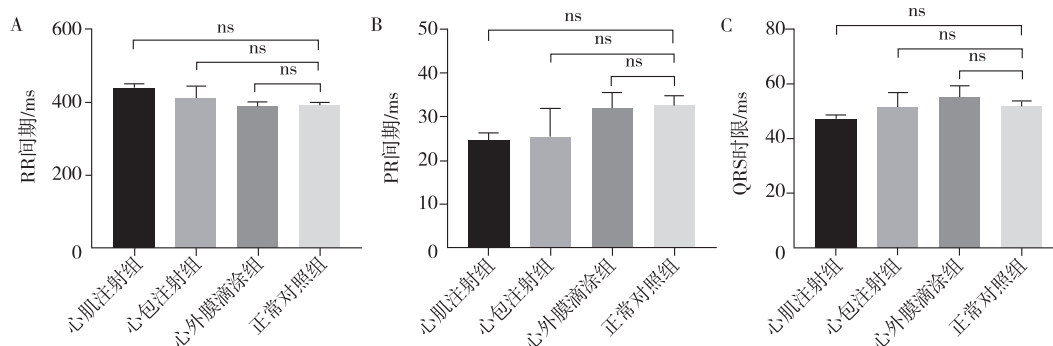
2 结果

2.1 心电指标比较

根据 LabChart 8.0 记录的 II 导联心电图,测量 4 组大鼠心电图相关参数。心肌注射组、心包注射组、心外膜滴涂组大鼠与正常对照组大鼠相比,RR 间期、PR 间期及 QRS 时限无显著差异 (图 1)。

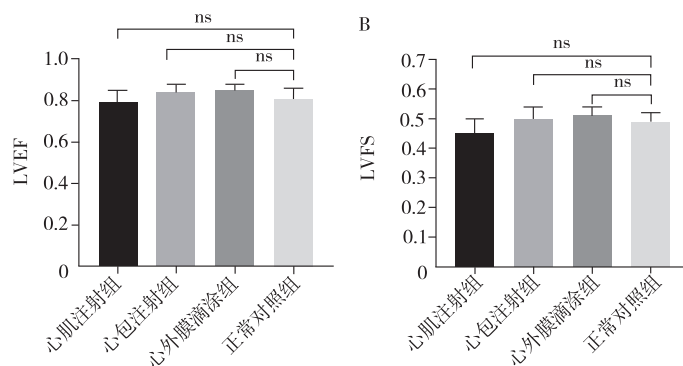
2.2 心功能指标比较

心脏超声结果显示,心肌注射组、心包注射组、心外膜滴涂组大鼠与正常对照组大鼠相比,LVEF 及 LVFS 无显著差异 (图 2)。心肌注射组的 LVEF 及 LVFS 虽略有降低,但无统计学意义。



注:与正常对照组相比,3 组大鼠心电图指标均无统计学差异 ($P > 0.05$); ns 为无统计学差异。

图 1 4 组大鼠心电图指标比较



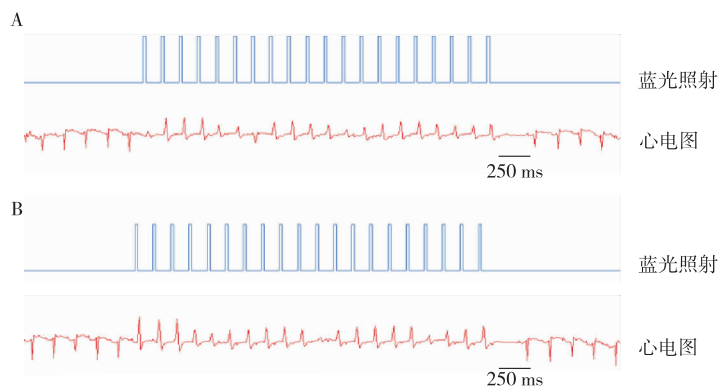
注:与正常对照组相比,3 组大鼠心功能指标均无统计学差异 ($P > 0.05$); ns 为无统计学差异。

图 2 4 组大鼠心功能指标比较

2.3 光起搏有效性评价

病毒转染 4 周后,使用 20 个脉冲宽度 20 ms 的 473 nm 蓝光照射大鼠心脏或注射部位,达到一定脉冲

频率与光照功率范围后能夺获心肌注射组、心包注射组大鼠心脏的节律,但不能夺获心外膜滴涂组和正常对照组心脏的节律(图 3)。



注:A 为心包注射组大鼠光起搏右心室注射部位(频率 9 Hz,脉冲宽度 20 ms,光照功率 36.8 mW);B 为心肌注射组大鼠光起搏右心室注射部位(频率 9 Hz,脉冲宽度 20 ms,光照功率 36.8 mW)

图 3 光起搏有效性情况

2.4 心肌 HE 染色

心包注射组和心外膜滴涂组大鼠心肌切片之间 HE 染色无明显区别,心肌纤维排列规则,细胞膜完整,轮廓清晰,未见明显炎症细胞浸润。心肌注射组注射部位(右心室)心肌切片显示心肌纤维排列紊乱,炎症细胞浸润(图 4)。

2.5 eYFP 的荧光表达

荧光显微镜下观察到 3 组大鼠心房切片偶见绿色荧光。心包注射组心室切片、心外膜滴涂组心外膜处心室切片显示绿色荧光,心肌注射组注射部位心室切片显示绿色荧光(图 5)。

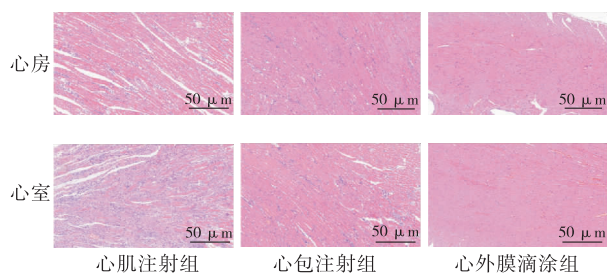


图 4 3 组大鼠心肌 HE 染色病理图比较

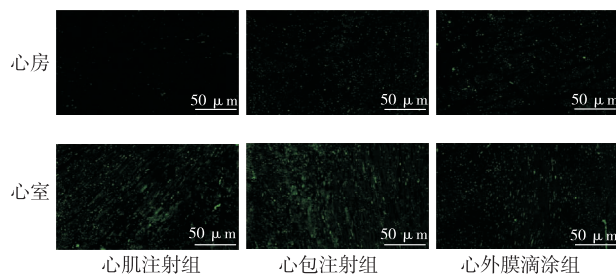


图 5 3 组大鼠心房、心室的 eYFP 绿色荧光图

3 讨论

心脏光遗传学是一种新兴的操作和技术,将光学与遗传学结合,利用基因编辑技术,在心肌细胞插入光敏感生物元件,通过光电流引发心肌细胞电活动。ChR2 是一种快速门控非选择性光敏阳离子通道,来源于莱茵衣藻,可在哺乳动物细胞中稳定安全地表达,主要传导 Na^+ 和 K^+ , ChR2 激活引发向内电流和细胞膜去极化。心脏光遗传学常使用 ChR2 (H134R),是 ChR2 的第一个突变体,与 ChR2 相比脱敏性降低,可产生两倍光电流,虽然通道开关速度减慢,但仍在毫秒水平^[9]。AAV 是一种单链 DNA 病毒,长度为 18 ~ 25 nm。根据病毒衣壳蛋白氨基酸序列,AAV 分为多个血清型。其中 AAV9 与其他血清型相比,具有心肌细胞趋向性及心肌转染效率高等优点^[7,10],适用于构建心脏光遗传学模型。既往已有研究证明可通过静脉注射途径构建心脏光遗传模型,但与构建模型的途径相比,静脉注射所需的大剂量^[11]限制了静脉注射的发展。

本研究采用了三种方式构建大鼠心脏光遗传模型,分析其对心脏组织分布和转导效果的影响,评估各种方式的可行性与安全性。心肌注射可在注射部位局部实现高效的心肌细胞基因转移,实现 1 : 1 心脏起搏,但与其他途径相比,心肌注射方式产生强烈的心肌内炎症和心肌细胞坏死^[12],更易导致心室颤动^[13]。水凝胶已用于药物输送系统^[14],实现皮肤、骨骼、血管等组织的修复和再生。本研究中使用的外科用封合剂,是一种合成水凝胶,已成熟应用于临床。但由于本实验:(1)未对 rAAV9 与外科用封合剂的相互作用进行验证,rAAV9 转染效率是否受影响有待研

究;(2)操作过程中,液体在心外膜表面的流动性可能导致病毒的流失,实际转染量低于预期,结果中荧光虽提示心外膜滴涂组大鼠心外膜处有病毒转染,但未能有效传递基因以实现心脏起搏。心包腔是天然的包膜,心包注射可将 rAAV9 限制在心包内,延长病毒与心肌接触时间,增大接触面积,实现病毒的靶向传递,减少病毒对其他组织可能产生的副作用。此外,心包注射已应用于药物、质粒、细胞、生物制剂的传输^[13],显示心包注射在治疗心律失常、血管损伤和心肌梗死中的潜力。本研究中,心包注射不仅对大鼠心脏的电生理与功能影响较小,且能实现 1 : 1 心脏起搏。

虽然本实验表明心包途径是一种有效的传递基因的方式,但仍具有局限性。首先,心包注射组大鼠心房未能有效表达 ChR2,实现心房夺获。其次,病毒在心脏组织的分布与心包内病毒的清除率密切相关,注射入心包的病毒能否在清除前转染至心肌细胞有待进一步研究。另外,病毒量的选择也很重要,如何达到最大效率转染且不至于心脏压塞还有待探讨。最后,本研究所有的结果是在啮齿动物实验中得到的,啮齿动物与人类之间有不同的心血管解剖结构和生理^[15],尚需在与人类有类似结构或生理的大型动物(如犬、猪)中进行进一步研究,提供临床转化的数据。

参考文献

- [1] Ambrosi CM, Entcheva E. Optogenetic control of cardiomyocytes via viral delivery[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1181:215-228.
- [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.
- [3] Bruegmann T, Malan D, Hesse M, et al. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo[J]. *Nat Methods*, 2010, 7(11): 897-900.
- [4] Nussinovitch U, Gepstein L. Optogenetics for in vivo cardiac pacing and resynchronization therapies[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(7): 750-754.
- [5] Jia Z, Valiunas V, Lu Z, et al. Stimulating cardiac muscle by light: cardiac optogenetics by cell delivery[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4(5): 753-760.
- [6] Entcheva E. Cardiac optogenetics[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(9): H1179-H1191.
- [7] Inagaki K, Fuess S, Storm TA, et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8[J]. *Mol Ther*, 2006, 14(1): 45-53.
- [8] 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.
- [9] Lin JY. Optogenetic excitation of neurons with channelrhodopsins: light instrumentation, expression systems, and channelrhodopsin variants[J]. *Prog Brain Res*, 2012, 196:29-47.
- [10] Garcia-Olloqui P, Rodriguez-Madoz JR, di Scala M, et al. Effect of heart ischemia and administration route on biodistribution and transduction efficiency of AAV9 vectors[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(1): 123-134.

- [11] Gruntman AM, Bish LT, Mueller C, et al. Gene transfer in skeletal and cardiac muscle using recombinant adeno-associated virus[J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2013, Chapter 14; Unit 14D.3.
- [12] Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors[J]. *Circulation*, 1999, 99(2): 201-205.
- [13] Ho HMK, Craig DQM, Day RM. Access routes, devices and guidance methods for intrapericardial delivery in cardiac conditions[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2022, 32(4): 206-218.
- [14] Chen Y, Li C, Li C, et al. Tailorable hydrogel improves retention and cardioprotection of intramyocardial transplanted mesenchymal stem cells for the treatment of acute myocardial infarction in mice[J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(2): e013784.
- [15] Liu S, Li K, Wagner Florencio L, et al. Gene therapy knockdown of Hippo signaling induces cardiomyocyte renewal in pigs after myocardial infarction[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(600): eabd6892.

收稿日期:2022-12-22

《心血管病学进展》对投稿中表格制作的要求

表格可用全线表、省线表(包括三线表)和无线表。表格应是完整的、可独立存在的形象化语言,表格的内容应简洁直观,以数字表达为主,避免与文字表述过于重复,同时表格应具有自明性。

1. 表格的组成。(1)表序和表题:表序即表格的序号,一篇论文中如只有一个表格则表序编为表1,有两个及以上的表格,应按先后标出表的序号。序号用阿拉伯数字表示,置于表的上方。表题应准确得体、简洁精练,中间不用标点,末尾不加句号。(2)表头:对表格各行和各列单元格内容进行概括和提示的栏目,反映了表身中该栏信息的特征或属性。(3)表身:表头之外的单元格总体,是表格的主体,表身中单元格内的数值不宜带单位;表身中如果一个单元格内包含两个数据,其中一个数据应用括号,同时需要在表头或标注中说明;表身中单元格内可使用空白或一字线“—”填充,如果需要区别数据“不适用”和“无法获得”,前者可采用空白单元格,后者可采用一字线,并在正文或标注中说明这种区别。(4)表注:必要时,应将表中的符号、标记、代码,以及需要说明的事项,以最简练的文字,横排于表身下。

2. 表格制作的要求。(1)主谓清楚:表的横表头为主语,指表中所要说明的对象;纵表头为谓语,表示对主语的说明,读表的顺序为:主语→谓语→数据。特殊情况时,主、谓语可以换位,但换位后的主谓语的性质不变。作者在设计表格时,应力求科学、准确、一目了然。一个好的表格应具有语言学上的逻辑性,即主谓清楚、层次分明、标目合理。(2)数字准确:表格内的数字应准确无误,一律用阿拉伯数字,上下个位数对齐,数字中如有“±”或“~”号,则以其为中心对齐。表内不宜用“同上”“同左”“同类”词,须填入具体的数字或文字。(3)表格内的单位:表头中量和单位的标注形式应为“量的名称或符号/单位符号”;表格中涉及的单位全部相同时,宜在表的右上方统一标注。(4)表格中的统计学符号:论文中的显著性检验,只在表下注释 *P* 值是不够的,应将检验方法、计算结果及 *P* 值均列出,以便读者进一步了解实际差异的大小。

本刊编辑部