

DOI: 10.13376/j.cbls/2024095

文章编号: 1004-0374(2024)07-0929-14

· 技术与应用 ·

光遗传学技术在昼夜节律及相关疾病中的应用研究进展

王舒恒^{1,2}, 白帅东^{1,2}, 白雪^{1,2}, 王威宇^{1,2}, 秦雪梅^{1,2,3}, 高晓霞^{1,2,3*}

(1 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006; 2 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006; 3 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 太原 030006)

摘要: 昼夜节律是生物体响应外部环境 24 小时昼夜更替变化的一种内源性计时系统, 也称生物钟系统, 由中枢及外周生物钟组成, 其通过生物钟基因调节细胞信号分子的节律变化, 从而使大部分细胞生命活动具有时空动态性。昼夜节律失调与多种疾病的发生密切相关, 但其复杂机制尚未解释清楚。光遗传学是利用特定光敏蛋白对细胞进行精确时空控制的一种新技术, 具有非侵入性、可逆性和高时空特异性等优点, 为昼夜节律机制的探究提供了新的视角。本文对光遗传学技术在昼夜节律研究中的应用及其在昼夜节律相关疾病中的研究进展进行综述, 为解决昼夜节律相关疾病提供新思路和新理念。

关键词: 光遗传学; 昼夜节律; 视交叉上核; 生物钟基因; 细胞信号分子

中图分类号: Q3-3; Q41 **文献标志码:** A

Research progress on the application of optogenetics to circadian rhythm and related diseases

WANG Shu-Heng^{1,2}, BAI Shuai-Dong^{1,2}, BAI Xue^{1,2}, WANG Wei-Yu^{1,2}, QIN Xue-Mei^{1,2,3}, GAO Xiao-Xia^{1,2,3*}

(1 Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2 Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3 Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Circadian rhythm, also known as circadian system, is an endogenous time-keeping system that adapts to the change of day-night cycles in the environment. The circadian clock system consists of the central clock and peripheral clocks in peripheral tissues. The circadian clock genes regulate the rhythmic changes of cellular signalling molecules, thereby influencing the spatiotemporal dynamics of cell life activities. In recent years, an increasing number of studies have demonstrated that circadian misalignments may be associated with a wide variety of diseases. Nevertheless, the mechanism underlying this phenomenon remains unclear. Optogenetics is a novel technology that allows precise spatial and temporal control of cells by expressing light-sensitive proteins. This provides a novel perspective for the study of circadian mechanisms, due to their distinguishing features of non-invasiveness, reversibility, and spatiotemporal resolution. This review examines the application of optogenetics in the study of the circadian system and related diseases, with a view to identify new ideas and concepts for the investigation of circadian rhythm-related diseases.

Key words: optogenetics; circadian rhythm; suprachiasmatic nucleus; circadian genes; cellular signalling molecules

收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-05-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82174099); 山西省基础应用项目面上项目(20210302123432); 名优晋药再开发山西省重点实验室项目(202104010910001); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目(201605D111004); 山西省科技创新重点团队项目(201605D131045-18)

*通信作者: E-mail: gaioxiaoxia@sxu.edu.cn

昼夜节律 (circadian rhythm) 是动物为了适应地球昼夜循环变化而进化出的控制自身生理生化和行为功能的 24 小时生理节律。昼夜节律的破坏和失衡会使生物钟信号通路相关蛋白及基因的表达发生改变, 导致神经精神系统疾病和代谢紊乱性疾病等各种疾病的发生^[1]。然而, 生物钟及其相关调控因子的表达具有节律性, 用传统研究手段很难把握其在时间尺度上的节律性调控。因此, 探索新的调控节律的方式来探讨疾病机制变得尤为重要。

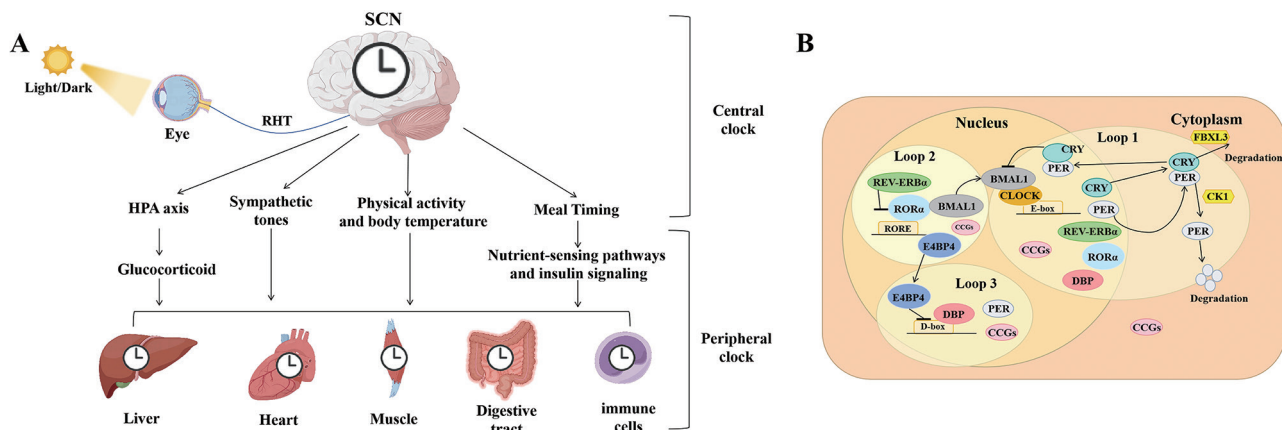
光遗传学技术可以在细胞中载入特定编码光敏基因, 像电路开关一样用光来激活或抑制光敏蛋白, 从而操控细胞的各种生理活动^[2]。光通过光纤以毫秒级速度传输并到达微米级的组织空间区域, 以其高度可调性、可逆性和无损伤等特点实现了实时的动态控制^[3]。且光敏蛋白能够在特定组织细胞中实现靶向表达, 从而在高时间、空间分辨率下控制体内生理变化^[4], 克服了传统药理和电刺激方法的特异性差、起效慢、控制不够精确以及时间分辨率低等缺点。目前, 光遗传学技术因其高度时空特异性、快速可逆和低毒副作用的优势, 被广泛地应用于神经环路探索及各种生理生化信号通路的动态调控研究^[5]。

本文对光遗传学技术在昼夜节律研究中的应用及其在调控昼夜节律相关疾病中的研究进展进行综述, 为光遗传学技术应用于昼夜节律相关疾病分子机制研究提供参考依据。

1 昼夜节律系统概述

1959 年, Halberg^[6] 首次提出昼夜节律一词, 用来表示生物在适应地球 24 小时昼夜自转中形成的一种内源性计时机制, 由输入信号、核心生物钟系统及输出信号三部分组成。哺乳动物视网膜中表达黑视蛋白 (melanopsin) 的自感光视网膜神经节细胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs) 接收来自环境中的光信号, 并通过下丘脑束 (retinohypothalamic tract, RHT) 传输到生物钟控制中枢视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN)^[7]。生物钟基因在大脑其他区域及肝脏、肺、心脏和骨骼肌等各种外周组织中均有表达, 其不同脑区、不同组织中特异性表达且不同步^[8-10]。SCN 作为生物钟的“主起搏器”由大约 20 000 个异质性神经元细胞组成, 能够产生自发的节律性振荡, 并通过独特的耦合机制保持彼此同步^[11], 进一步通过直接和间接的投射以及激素 (如皮质醇和褪黑激素) 的调节来同步不同脑区及各外周生物钟, 以此来协调和同步机体正常的生物钟网络^[12-13]。图 1A 总结了哺乳动物各组织器官生物钟的同步路径。

在分子水平, 生物钟节律最基本的分子机制是由核心生物钟基因组成的转录 - 翻译反馈环路 (transcriptional-translational feedback loops, TTFLs) (图 1B)^[14]。2017 年的诺贝尔生理学或医学奖颁给了它的三位发现者 Jeffrey C Hall、Michael Rosbash 和 Michael W Young, 以表彰他们在研究机体昼夜



(A) SCN通过RHT接收外界的光信号, 调节自身与外界环境时间的同步, 并通过HPA轴、交感神经、运动、体温和进食行为等调控外周生物钟, 确保整个机体内在节律与外部环境时间保持一致。(B) TTFLs包括三个反馈环路: 环1由CLOCK、BMAL1、PER和CRY组成; 环2由BMAL1、REV-ERBs和RORs组成; 环3由DBP和E4BP4构成。它们通过作用于靶基因启动子上的E-BOX、RORE和D-BOX反应元件调控生物钟基因的表达。

图1 哺乳动物生物钟系统的组成(A)和生物钟系统的细胞及分子机制^[14](B)示意图

节律产生的分子机制方面做出的卓越贡献^[15]。TTFLs 存在于机体的每一个细胞组织中, 即使没有任何输入信号时仍可保持近 24 小时节律。生物钟系统复杂且相互关联^[16], 细胞内源性生物钟信号通路是一个高度集成的动态分子网络, 核心生物钟基因之间相互作用, 共同控制着体内复杂的节律网络^[17]。生物钟基因与多种信号分子相互同步, 为各种生理过程提供时间顺序, 各信号分子表达的振幅、频率和相位均能够传递细胞活动的各种信息^[18]。

然而, 现有的研究手段无法对细胞内生物钟节律信号转导过程进行精确的时空控制。目前, SCN 以及外周组织生物钟的确切机制尚未阐明, 并且对其他大脑区域以及生物钟基因控制下的动态节律信号转导机制研究还不够充分。因此, 亟需新的能够通过精确的时间控制动态调控生物钟的方法来研究昼夜节律机制, 从而进一步通过操纵生物钟系统为昼夜节律相关疾病的治疗提供策略。

2 光遗传学技术简介

随着 20 世纪 70 年代一系列细菌视紫红质光敏离子通道蛋白的发现^[19], 1979 年, Francis Crick 首次提出了利用光控制神经元活动的可能性^[20]。2005 年, 斯坦福大学的 Karl Deisseroth 研究团队实现了用蓝光以毫秒级的精度控制视紫红质-2 (channelrhodopsins-2, ChR2) 激活海马神经元细胞的

电位变化, 并首次提出了光遗传学 (Optogenetics) 的概念^[21]。

光遗传学是将光学、遗传学和分子生物学结合, 利用光来精准操控生命活动的技术。光遗传学通常通过质粒转染或病毒感染的方式将光敏基因靶向导入指定细胞, 并用特定的光源刺激光敏蛋白, 引发生物学效应, 从而精准调控细胞的生理状态和功能。光敏蛋白作为光遗传学工具的核心基础元件, 具有感应特定光源并对其产生响应的能力^[22], 其来源广泛, 主要可分为视蛋白依赖光受体和非视蛋白依赖光遗传学元件两大类^[23-24]。光遗传学发展初期, 将 ChR2 引入神经元选择性地操纵神经环路促进人们对大脑深层功能有了实质性的理解^[25]。随着蛋白质组学、细胞生物学和生物化学等学科的介入, 在传统光敏蛋白的基础上, 开发出了更多具有新功能的光敏蛋白调控系统^[26]。科学家们利用光遗传学技术可以时空特异性地对哺乳动物中非神经元细胞内信号转导、亚细胞定位和基因进行动态调控, 使其能够更加全面精准地调控生命活动, 使人们对细胞生物学有了新的见解^[27-28]。

另外, 随着越来越多交叉学科的介入, 光遗传学变得更加贴近临床应用^[29], 为疾病的治疗提供了新型手段, 例如改善神经疾病和恢复视力^[30-31]。表 1 和图 2 对哺乳动物细胞中常用光敏蛋白按照其类型及响应波长的不同进行了归纳和总结。图 3 按照

表1 哺乳动物细胞中常用光敏蛋白的特点

	光响应元件	发光基团	活化与失活光照条件(nm)	结合与解离半衰期	光响应机理	参考文献
视蛋白	ChR2	opsin	450/—	0.2 ms/15 ms	离子通道	[32]
	Melanopsin	opsin	450/—	ms/s	G蛋白偶联受体	[33]
	JellyOp	opsin	470/—	ms/s	G蛋白偶联受体	[34]
	Opto-β2AR	opsin	500/—	s/min	G蛋白偶联受体	[35]
	Arch	opsin	566/—	ms/ms	离子通道	[36]
	NpHR	opsin	590/—	ms/ms	离子通道	[37]
非视蛋白	UVR8	无	300/黑暗	ms/h	解聚	[38]
	PhoCI	无	380/—	min/未报道	光裂解	[39]
	LOV	FMN	450/黑暗	10 s/50 s	结构变异	[40]
	VVD	FMN/FAD	450/黑暗	s/h	同源二聚	[41]
	CRY2	FAD	450/黑暗	s/min	同源二聚	[42]
	CRY2-CIB1	FAD	450/黑暗	10 s/12 min	异源二聚	[43]
	Dronpa	无	500/400	s/s	解聚	[44]
	TiCBD	AdoCbl	545/黑暗	未报道	解聚	[45]
	PhyA	PCB	660/740	未报道	异源二聚	[46]
	PhyB	PCB	660/740	1.3 s/4 s	异源二聚	[47]
	BphP1	BV	760/640	30 s/15 min	异源二聚	[48]

注: —, 不存在失活光照条件

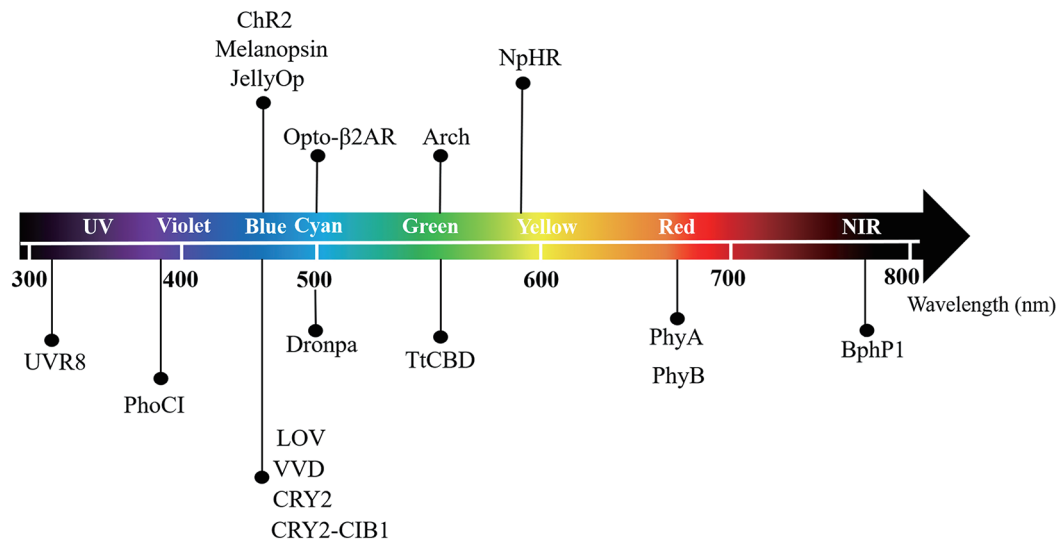


图2 响应不同波长的光遗传学工具总结

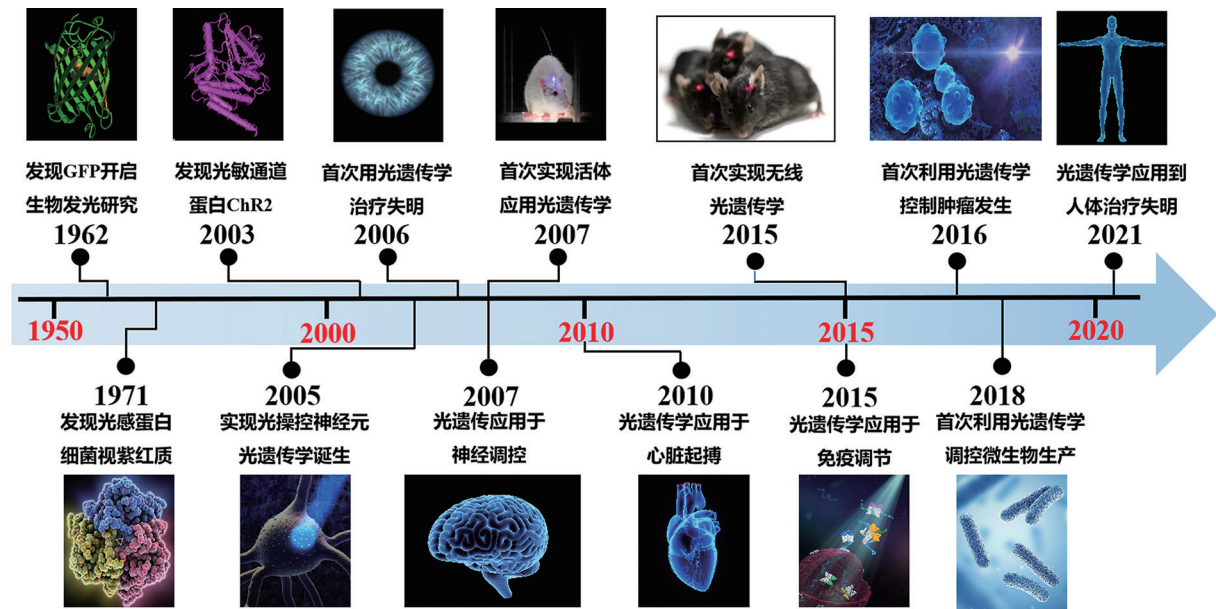


图3 光遗传学技术发展进程关键时间节点

时间发展顺序梳理了光遗传学发展进程中的关键时间节点。

3 光遗传学技术在昼夜节律机制研究中的应用

3.1 光遗传学在昼夜节律中枢视交叉上核中的应用

SCN 包含表达血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、血管加压素 (arginine vasopressin, AVP)、胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 和神经介素 S (neuromedin S, NMS) 等神经肽的主要节律性神经元^[49-51], 可驱动哺乳动物生理和行为的日常昼夜变化。虽然通过传统药理学、电学或化学手段能够调

控 SCN 介导昼夜节律行为, 但是这些方法无法精准地、高时空特异性地控制 SCN 中的神经元。故 SCN 控制节律行为的具体分子机制一直无法阐明。而光遗传学技术可精确地操纵 SCN 及其特定节律性神经元, 能够明确 SCN 的生物钟分子、放电活动和节律信号网络对昼夜节律生理行为的影响, 及其在昼夜节律中的作用。

VIP 神经元在 SCN 调控昼夜节律功能方面发挥主要作用^[52]。Mazuski 等^[53] 将 ChR2 表达于体外培养的 SCN VIP 神经元中, 在高频率的光照刺激下能够影响 VIP 的释放并改变生物钟基因的表达。

Jones 等^[54]在体内 SCN VIP 神经元中表达 ChR2, 在模拟长光周期的光遗传刺激下小鼠昼夜节律行为活动发生改变, 提前/延迟了 SCN 中 *Per2* 的节律相位。Todd 等^[55]采用光遗传学技术在体内揭示了 SCN VIP 神经元和下丘脑背内侧神经元之间具有双突触连接, 并通过单细胞测序技术确定了 VIP 神经元控制节律行为的两种不同细胞亚型。

SCN 中其他非 VIP 神经元在调节昼夜节律过程中也发挥关键作用。Hume 等^[56]在大鼠视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的 AVP 神经元中表达 ChR2, 利用光照刺激 SCN 中 AVP-RGC 轴突引起 AVP 释放。2010 年, Hannibal 等^[57]报道了 CCK 在 SCN 壳区和核区均有表达, 其受到 VIP 神经元的支配, 但 CCK 神经元不具有光响应性, 也不表达核心生物钟蛋白 *Per1*, 认为 CCK 信号可能不直接参与光诱导的生物钟复位和核心生物钟的调节。然而, 2023 年严军课题组^[58]利用光遗传学技术探究了 SCN 中 CCK 神经元调控昼夜节律的功能和神经机制, 光照在体激活 CCK 神经元能够引起小鼠节律行为的相位前移, 激活 VIP 神经元能够诱导相位后移, 表明 SCN 中的 CCK 神经元可以与 VIP 神经元形成负反馈环路, 抑制 VIP 神经元, 以此削弱光照对 SCN 的去同步化作用, 从而稳定长日照下的节律行为。表 2 对当前应用光遗传学调控 SCN 的研究进行了归纳和总结。

综上所述, 光遗传学在时间和空间上的精确性及一定的非侵入性, 使其在深入研究昼夜节律和复杂行为背后的神经机制方面具有得天独厚的优势, 促进了对大脑中昼夜节律神经环路功能和机制的解析, 对昼夜节律相关疾病的研究意义重大。

3.2 光遗传学诱导信号级联通路调控生物钟基因

除视网膜外, 哺乳动物的各组织并不直接感光, 因此可以用具有高时空分辨率的光遗传工具来控制^[67]。通常, 视网膜接收光信号后沿 RHT 传递至 SCN, 进而增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 激活环磷酸腺苷-反应元件结合蛋白 (cAMP responsive element bind protein, CREB), 激活后的 CREB 与 *Per1* 和 *Per2* 启动子中的反应元件 (cAMP response element, CRE) 结合, 诱导转录^[68]。在已知的影响生物钟的信号分子中, G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 及其下游信号级联可以调节生物钟分子元件的表达和生物钟相位周期^[69]。其中, GPCRs 可以通过源自异源三聚体 G 蛋白或 β 抑制蛋白 (β -arrestin) 的途径调节细胞生理机能^[70]。目前, 用光遗传学

精确操控 G 蛋白偶联受体驱动膜电位和影响细胞内钙的光依赖性变化来改变生物钟基因的研究已有报道。

3.2.1 Melanopsin 调控生物钟基因

iPRGCs 中由 *Opn4* 基因驱动表达的 Melanopsin 在调节昼夜节律中具有重要作用^[71]。Melanopsin 作为一个光敏色素蛋白, 是一种很有前途的光遗传学工具, 可作为 G 蛋白偶联受体通路的选择性光开关分子应用到由生物钟基因介导的细胞内信号动态网络的研究中。

2007 年, Ukai 等^[72]将 *Opn4* 和 *Per2::LUC* 荧光素酶报告基因转染至 NIH3T3 细胞中, 蓝光照射 6 h, *Per2* 发生 1.8 h 的相位提前和 2.5 倍的振幅变化。通过添加钙螯合剂 BAPTA-AM 和磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 抑制剂, 能够抑制光刺激引起的相位变化, 表明 PLC 介导的细胞内 Ca^{2+} 释放在光依赖 Melanopsin 调节细胞生物钟变化中至关重要。同年, Pulivarthy 等^[73]采用慢病毒将 *Opn4* 导入表达 *Per2::LUC* 荧光素酶报告基因的 HEK293T 细胞中, 使其稳定表达 Melanopsin; 使用 480 nm 蓝光在不同昼夜节律时间 (circadian time) CT12、22 和 3 照射, 其中 CT12 照射增强了其振幅, 而对其相位没有影响; CT22 和 CT3 照射对其振幅变化影响较小, 但相位改变却很大 (15 s 的照射即可产生约 4 h 的相移), 且相移幅度随着光刺激持续时间的增加而增加。进一步通过检测不同时间点 CREB 及其磷酸化表达水平, 证实光触发了 pCREB 与 *Per2* 启动子 CRE 位点的结合, 推测 *Opn4* 的异位表达调节细胞内 Ca^{2+} 动力学并导致 CREB 磷酸化, 然后在光刺激下调节 *Per2* 基因介导的昼夜节律。此外, 2012 年, Balazs^[74]将 *Opn4* 导入 NIH3T3 细胞中, 通过测定生物钟基因 mRNA 表达水平考察 Melanopsin 对其转录的影响; 在 488 nm 蓝光刺激后 4 h, *Cry2* 表达上调; 通过测定 Ca^{2+} 含量变化, 发现蓝光刺激后细胞内 Ca^{2+} 内流增加, 可能诱发 CREB 磷酸化, 增强生物钟基因的表达 (图 4)。这些结果表明, 在体外细胞水平上能够依赖 Melanopsin 的感光特性来调节哺乳动物的生物钟状态。

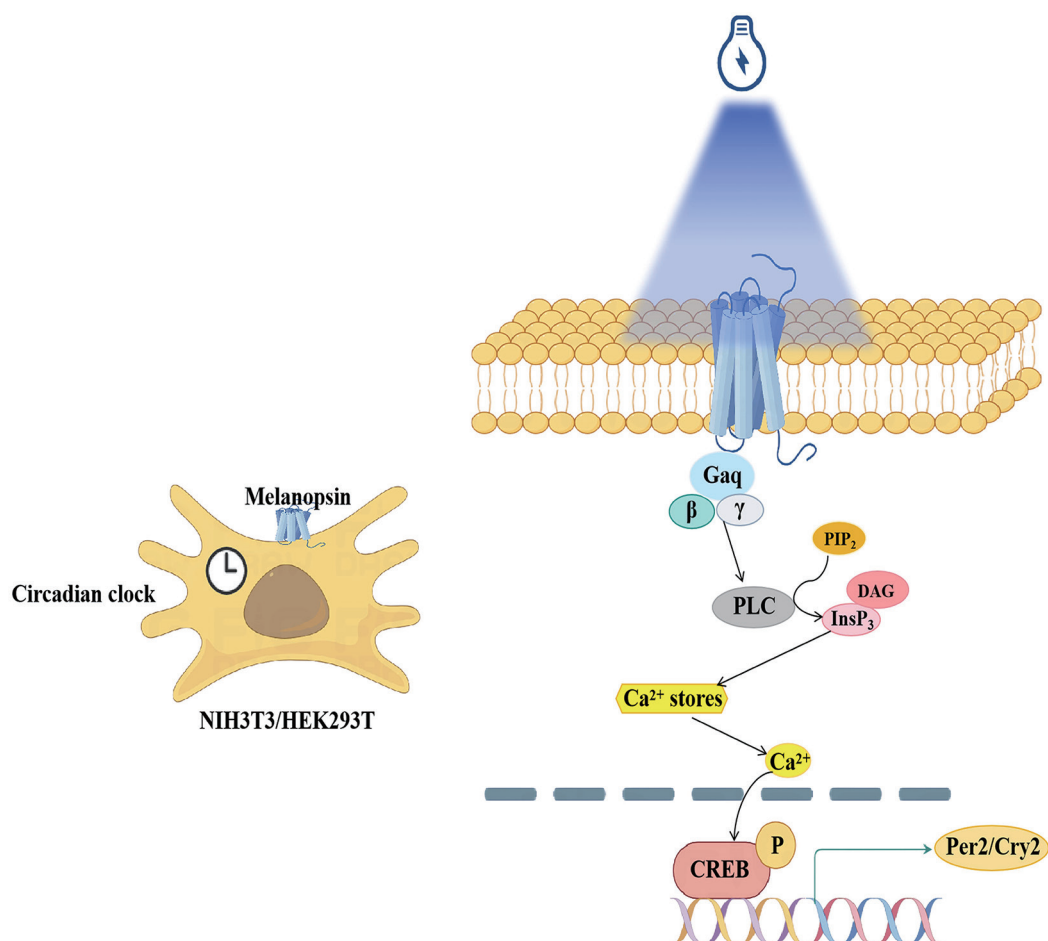
3.2.2 cAMP 信号通路调控生物钟基因

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 是细胞信号转导中重要的第二信使。在生物钟系统中, cAMP 通过与生物钟基因自主反馈回路相互作用, 将环境信号传递给分子振荡网络, 从而重置其节律性表达^[75]。因此, 通过光遗传学操作影

表2 光遗传学应用于SCN生物功能研究

时间	动物	神经元细胞	光遗传学工具	刺激方式	结论	参考文献
2015	PER2::LUC小鼠	Drd1a	ChR2	470 nm, 8 Hz, 1 h	光激活时, CT12~18相位延迟, CT18~24相位提前	[54]
	PER2::LUC小鼠	Drd1a	NpHR	590 nm, 8 Hz, 1 h	光抑制时, CT0~6相位延迟, CT6~12相位提前	
	Drd1a-Cre小鼠	Drd1a	ChR2	470 nm, 8 Hz, 1 h	光刺激后, 小鼠昼夜节律行为活动发生改变	
2018	VIP-Cre小鼠	VIP	ChR2	470 nm, 2~20 Hz, 15 ms, 1 h	VIP神经元在放电速率上具有昼夜节律变化	[55]
	PER2::LUC小鼠	VIP	ChR2	470 nm, 5或20 Hz, 15 ms	20 Hz刺激引起1.5 h相位延迟, 而5 Hz刺激则没有	
	PER2::LUC小鼠	VIP	ChR2	465 nm, 5或20 Hz, 15 ms, 1 h	刺激VIP神经元导致小鼠的运动节律相位延迟	
2018	VIP-Cre小鼠	VIP	ChR2	470 nm, 2 ms, 20 s	白天谷氨酸能神经元引发SCN神经元突触后动作电位强于夜晚	[59]
2019	AVP-eGFP大鼠	AVP	ChR2	470 nm, 20 Hz, 5 ms, 2 s / 3 s	光激活AVP-RGC轴突引起SCN中AVP释放	[56]
2020	VIP-IRES-Cre小鼠	VIP	ChR2	470 nm, 10 Hz, 10 ms, 10 s	VIP神经元调节室旁核 (SPZ)-下丘脑背内侧核 (DMH)脑区环路的活动节律	[55]
2020	VIP-IRES-Cre小鼠	VIP	ChR2	465 nm, 10 ms, 2 s / 60 s	SCN以VIP神经元为输出信号, 投射至视网膜GABA能神经元	[60]
2020	VIP-IRES-Cre小鼠	VIP	ChR2	460 nm, 0.5~40 Hz, 0.3~3 ms, 5 s	VIP神经元主要驱动GABA信号对其下游神经元活性产生影响	[61]
	VIP-IRES-Cre小鼠	VIP	Arch	565 nm, 10 s	VIP神经元的抑制输入会显著影响昼夜节律放电模式	
2020	VIP-cre和PER2::LUC小鼠	VIP	ChR2	470 nm, 10 Hz, 15 ms, 1 h	早期刺激引起相位延迟; 晚期刺激引起相位提前	[62]
	AVP-Cre小鼠和PER2::LUC小鼠	AVP	ChR2	470 nm, 10 Hz, 15 ms, 1 h	没有产生明显相移	
2021	PER2::LUC小鼠	—	ChrimsonR	625 nm, 7~13 Hz, 10 ms	光照刺激改变了离体SCN中Per2节律变化	[63]
2021	VIP-Cre小鼠和PER2::LUC小鼠	VIP	ChR2	470 nm, 10 Hz, 8 h	体内光照刺激VIP神经元改变了Per2节律相位	[64]
2023	AVP-Cre小鼠	AVP	ChrimsonR	635 nm, 5 Hz, 50 ms, 120 s	光照刺激AVP神经元增加体内VIP神经元Ca ²⁺ 释放	[65]
2023	CCK-IRES-Cre小鼠和VIP-IRES-Cre小鼠	CCK	hChR2	470 nm, 4 Hz, 10 ms, 1 h	CCK与VIP形成负反馈环路, 抑制VIP能够削弱光照对SCN的去同步化作用, 从而稳定长日照下的节律行为	[58]
2023	GAD67-Cre小鼠和PER2::LUC小鼠	GABA	bPAC	470nm, 10 Hz, 20 ms, 1h	SCN中cAMP在光遗传学操作下产生较大的相位延迟, 也能够改变小鼠昼夜节律行为活动	[66]

注: 刺激方式参数包括激光波长(nm)、频率(Hz)、激光脉冲宽度(ms)、刺激持续时间(s或h)。



蓝光照射下, Melanopsin构象发生改变, 从而活化Gaq和PLC, PLC水解 PIP_2 生成DAG和 InsP_3 , 通过这些次级信号分子引发细胞内部 Ca^{2+} 释放, 诱发CREB磷酸化, 调节 Per2 和 Cry2 表达。Gaq: G蛋白; PIP_2 : 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸; DAG: 甘油二酯; InsP_3 : 肌醇1,4,5-三磷酸。

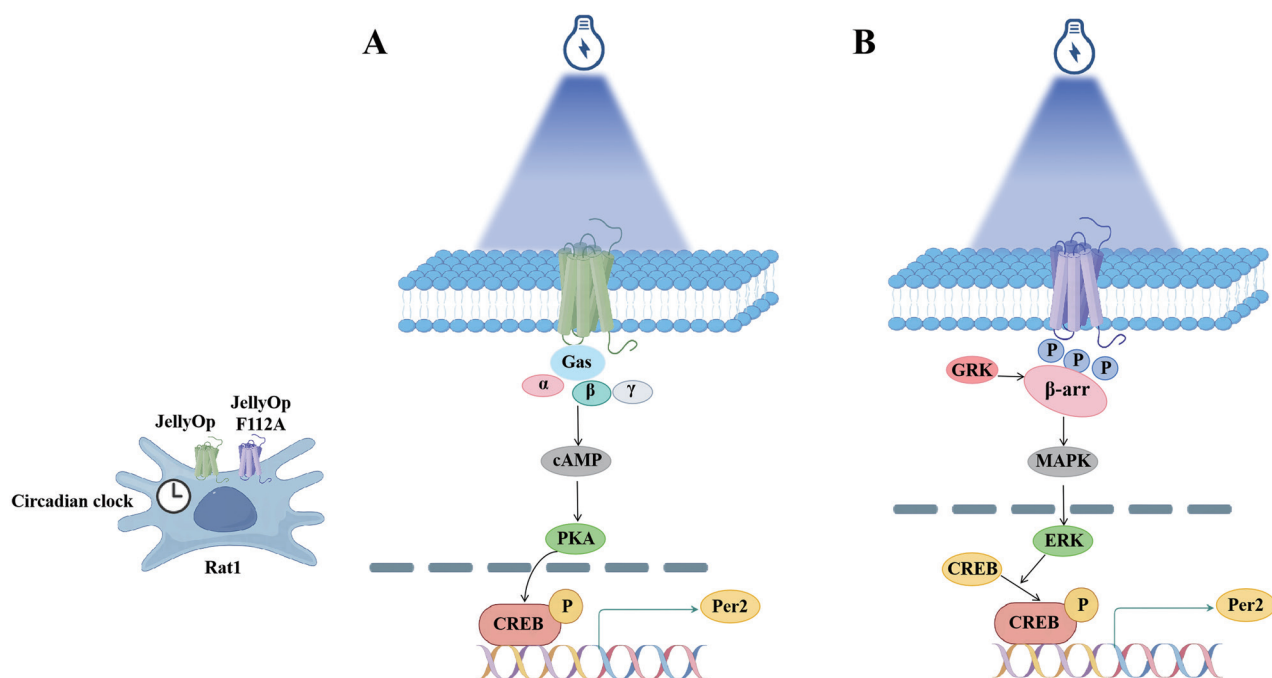
图4 光遗传学操控Melanopsin改变生物钟基因表达

响细胞内 cAMP 浓度进而控制生物钟基因的表达是一种可行的方法。箱型水母光敏蛋白 (JellyOp) 是一种能够激活 GPCRs 并通过 G 蛋白 (Gas) 放大信号介导 cAMP 产生反应的光遗传学工具^[34]。另外, 光激活腺苷酸环化酶 (beggatoa photoactivatable adenylyl cyclase, bPAC) 是一种在蓝光照射下可以控制 cAMP 的产生, 并诱发细胞生理反应的光遗传学工具^[76]。因此, 它们适合于研究 cAMP 对昼夜节律调节的贡献。

2017年, Bailes等^[67]将 JellyOp 导入表达 Per2::LUC 荧光素酶报告基因的 Rat1 细胞中, 470 nm 蓝光刺激后, 可以观察到 Per2 相位和振幅的明显变化; 2 min 的光照诱导细胞内 cAMP 浓度平均增加 29 倍, 表明 JellyOp 激活了 Gas 信号, 并驱动 cAMP 表达增加, 进而调控 Per2 (图 5A)。接着, 将 JellyOp 进行定点突变改造为能够激活 β -arrestin 信号的 JellyOp F112A, 并将其导入表达 Per2::LUC 荧光素

酶报告基因的 Rat1 细胞中, 蓝光刺激下使 Per2 节律发生改变。与 JellyOp 相比, JellyOp F112A 的激活引起 Per2 节律相位提前, JellyOp 激活引起 Per2 节律相位延迟; 而且 JellyOp F112A 调控生物钟表达的机制与 JellyOp 不同, 推测其可能通过激活 β -arrestin 进而与 MAPK、ERK 和 CREB 的相互作用有关 (图 5B)。

此外, 2021年, Blaum^[77]在 U2OS 细胞中转染 bPAC 质粒, 475 nm 蓝光照射下引起 Per1 表达上调; 进一步将 Bmal1::LUC 荧光素酶报告基因导入 U2OS 细胞中, 在 Bmal1 相位低谷时照射蓝光会引起相位延迟, 而在 Bmal1 峰值时照射会引起相位提前。2023年, Ono等^[66]利用包含 bPAC 的 AAV 病毒感染携带 PER2::LUC 荧光素酶报告基因的 GAD67-Cre 小鼠 SCN 切片, 在 Per2 表达峰值 (CT6 和 CT12) 时用 470 nm 蓝光照射 1 h, Per2 的相位延迟偏移,



(A)蓝光照射下, JellyOp构象发生改变, 从而活化Gas和cAMP, 进一步激活PKA诱发CREB磷酸化, 调节Per2表达; (B)蓝光照射下, JellyOp F112A构象发生改变, 从而活化GRK和β-arr, 进一步激活MAPK及下游ERK, 诱发CREB磷酸化, 调节Per2表达。Gas: G蛋白; PKA: 蛋白激酶A; GRK: G蛋白偶联受体激酶; β-arr: β抑制蛋白; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶; ERK: 细胞外信号调节激酶。

图5 光遗传学操控cAMP通路改变生物钟基因表达

且具有时间依赖性; 进一步, 将包含 bPAC 且依赖 Cre 表达的 AAV 病毒注射到 GAD67-Cre 小鼠 SCN 中, 采用红外传感器测量小鼠运动节律情况, 470 nm 蓝光刺激 1 h 后小鼠的行为节律发生改变, 且昼夜节律周期在刺激前(后)存在显著差异。这些结果表明, 光遗传学操纵 cAMP 能够在体外及活体内改变昼夜节律变化。

3.2.3 光诱导转录效应系统调控生物钟基因

光诱导转录效应(light-inducible transcriptional effectors, LITEs)是一种集成了转录激活因子样效应物(transcription activator-like effectors, TALE)、拟南芥光敏蛋白隐花色素2蛋白(cryptochrome 2, CRY2)和钙整合素结合蛋白1(calcium- and integrin-binding protein 1, CIB1)的控制细胞内源性过程的光遗传学系统。在没有蓝光照射的情况下, TALE-CIB1结合靶基因的启动子区域, 而CRY2在细胞核内保持游离。蓝光照射下TALE-CIB1与CRY2二聚化并诱发靶基因转录^[78]。LITE能够对许多细胞功能进行高精度的时空控制, 是一种理想的精确调节生物钟基因表达的方法。

2017年, Cotterell^[79]使用光诱导转录效应(LITE

2.0)系统将TALE-CIB1、Cry2phrr-vp64和Per2::LUC荧光素酶报告基因转染至HEK 293细胞中, 在450 nm蓝光下照射3h, Cry2phrr-vp64y与结合在Per2基因启动子上的TALE-CIB1发生二聚化, 诱导Per2表达量显著增加(图6)。

综上所述, Melanopsin、JellyOp、bPAC和CRY2-CIB1的光遗传学激活能够驱动生物钟基因发生改变, 表明通过光遗传学手段成功操纵了昼夜节律。光遗传学能快速、有效以及特异性地控制生物钟信号通路, 使得在准确定量生物钟基因表达的基础上进行高时间和空间精度的体内生物钟基因调节成为可能。这不仅提供了调节昼夜节律生物钟信号的新方法, 有助于了解生物钟介导的细胞动态信号通路的级联传递规律以及不同生物钟基因的作用效能^[80], 而且为探究生物钟基因如何调控昼夜节律紊乱相关疾病的生理过程提供新思路。

4 光遗传学技术在昼夜节律相关疾病中的研究进展

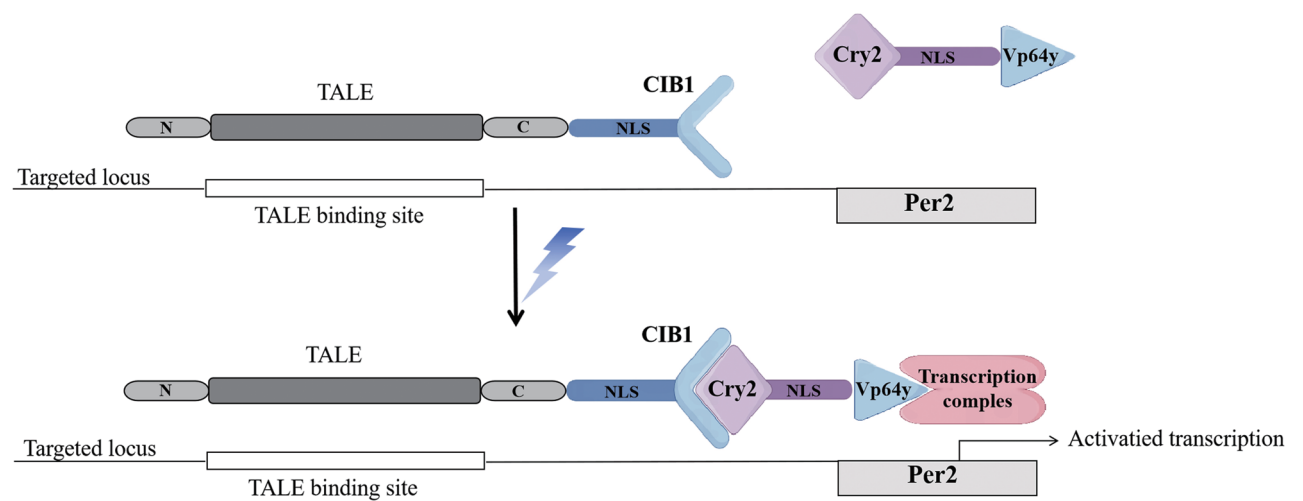
不良的生活方式(如长期轮班工作、频繁航空旅行等)往往会导致内部生物钟与外部环境的不同

步，造成生物钟混乱，增加疾病发生的概率^[81]。许多疾病的发病率和严重程度与昼夜节律紊乱密切相关，比如神经精神类疾病、代谢性疾病和肠道炎症等^[82]。近年来，昼夜节律对人类健康的影响越来越受到重视。因此，维持昼夜节律的稳定对人类健康生命活动具有重要的意义^[1]。但长期以来，机体如何维持自身节律的稳定性以及昼夜节律与疾病之间的关系还不清楚，具体机制尚未解决。随着光遗传学工具不断的进步，可将光遗传学应用于疾病治疗(图7)，特别是解决传统生物学方法无法解决的问

题，为从昼夜节律角度改善疾病提出新的方法，为生命健康领域发展提供新思路。

4.1 昼夜节律相关的神经精神系统疾病

中枢生物钟系统紊乱会导致抑郁症(MDD)^[83]、阿尔茨海默症(AD)^[84]和睡眠障碍(CRSD)^[85]等疾病的产生，故昼夜节律紊乱可能是这些神经精神类疾病的重要发病机制。例如，特殊光线能够引起昼夜节律紊乱进而影响抑郁情绪；昼夜节律紊乱会导致AD患者的记忆缺陷症状^[86]；生物钟系统功能失调或人的内源振荡器与外部环境之间未同步会引起



在黑暗状态下，结合在靶基因*Per2*启动子区域的TALE-CIB1与光敏蛋白CRY2处于分离状态，而蓝光刺激下发生二聚化，诱导*Per2*转录。vp64y：强转录激活结构域；NLS：核定位序列。

图6 蓝光诱导LITE 2.0系统调节*Per2*表达原理示意图

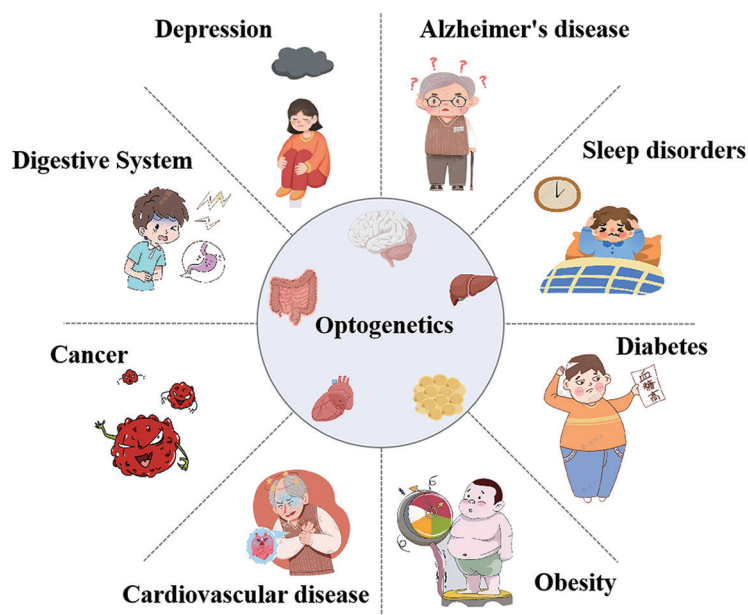


图7 光遗传学技术在昼夜节律相关疾病中的应用

睡眠障碍^[87]。本课题组观察到慢性应激致抑郁大鼠模型的中枢神经递质节律紊乱现象^[88],并进一步在昼夜节律紊乱大鼠模型中发现中枢外周生物钟基因的失调^[89]。但昼夜节律紊乱导致神经精神类疾病的机制还不完全清楚,还需进行更多的研究。

An等^[90]发现夜间蓝光能够诱发小鼠产生抑郁样行为,通过光遗传学和神经示踪技术揭示了一条从ipRGCs传输光信息至背侧僵核边缘区(dorsal perihabenular pHb, dpHb)并投射至伏隔核(nucleus accumbens, Nac)最终诱发抑郁表型的神经环路,且该环路受到昼夜节律门控调节。Vadnie等^[91]采用光遗传学操纵SCN神经活动改变其节律以确定SCN在调节抑郁焦虑样行为中的作用,研究结果表明,抑制SCN介导的节律会诱发小鼠抑郁焦虑样行为。Todd等^[92]以阿尔茨海默病患者经常表现出日落综合征这一临床现象为研究背景,利用光遗传学技术探究昼夜节律是否直接调节这种具有节律性的攻击行为,最终揭示了室旁核(subparaventricular zone, SPZ) GABA神经元接收SCN VIP神经元输入并支配腹内侧下丘脑(ventromedial hypothalamus, VMH)神经元的一条功能性神经环路,在该环路中SCN调节小鼠的攻击性。Ono等^[93]利用光遗传学技术证明SCN中GABA能神经元负向调控下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)中的促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF)神经元,介导SCN睡眠/觉醒的昼夜节律变化,促进觉醒。

4.2 昼夜节律相关的代谢性疾病

长期睡眠不足和轮班工作的人更容易患代谢性疾病^[94]。昼夜节律紊乱会引起葡萄糖代谢、胆固醇和胆汁酸代谢异常,能够诱发肥胖^[95]、非酒精性脂肪肝(NAFLD)^[96]、糖尿病^[97]和心血管疾病^[98],甚至癌症^[99]的发生。本课题组复制NAFLD大鼠模型,通过转录组学技术发现肝脏核心生物钟基因紊乱^[100]。而生物钟基因调节机体代谢功能,若机体生物钟被扰乱,会导致机体代谢紊乱^[101]。因此,揭示代谢性疾病中的昼夜节律调控基因及作用机制将会为疾病的治疗提供新视角、新思路和新策略。

Grippe等^[102]报道了SCN中D1多巴胺受体(Drd1)缺失会引起小鼠肥胖及昼夜节律紊乱,而利用光遗传学刺激SCN可恢复由高脂饮食诱导的肥胖症状。Ye等^[33]将Melanopsin表达于HEK-293细胞中,在蓝光刺激下,其构象发生变化并引起下游信号通路变化,导致胰高血糖素样肽(GLP-1)的表达,成

功实现了对db/db小鼠血糖稳态的控制。Bruegmann等^[103]利用光激活的非选择性阳离子通道ChR2,分别在体外、体内刺激心肌细胞,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。Zhao等^[104]构建了一种基于Melanopsin的光遗传学工具,将其导入工程化T细胞中,在蓝光刺激下可以诱导Ca²⁺内流,使活化的T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)核易位诱导T细胞分泌大量IL-2、IL-15和TNF- α ,增强T细胞的杀伤作用,为免疫细胞治疗实体瘤提供了一种新的策略。

4.3 昼夜节律相关的消化系统疾病

在肠道中,肠道微生物会参与昼夜节律调控过程,通过释放代谢信号分子参与生物钟的调控,进而影响机体代谢^[105]。吴宝剑课题组^[106]证明肠道生物钟基因在结肠炎(UC)发病机制中起调控作用。因此,精准调控肠道生物钟基因进而影响微生物代谢,对治疗由肠道菌群失调引起的疾病具有重要意义^[107]。

Cui等^[108]构建了响应蓝光的工程菌,在蓝光的刺激下实现了小鼠体内光诱导工程菌表达转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1),改善了葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的慢性结肠炎相关症状。之后,他们构建了另一种光响应工程菌重组大肠杆菌Nissle 1917(*Escherichia coli* nissle 1917, EcN),其能够实现在小鼠中光遗传激活白细胞介素-10(IL-10)的表达,进而下调炎症级联和基质金属蛋白酶,从而减缓炎症反应,恢复肠黏膜功能,改善UC^[109]。因此,光遗传学技术为肠道疾病的调控提供了全新的策略。

5 总结与展望

综上所述,光遗传学技术因其高时空特异性的优势实现了对SCN和生物钟分子信号通路精确的调控,克服了传统电、化学和药理手段的不足与劣势,为昼夜节律的基础研究提供了强有力的技术支持。目前,在与昼夜节律相关疾病的研究中已经有科学家将光遗传学应用于SCN来探究节律与疾病的关系,其已成为揭示昼夜节律与疾病相互作用机制的关键研究技术之一。

但该技术的应用仍存在不足与挑战:神经元及细胞信号分子受到生物钟的影响均具有节律性,在这个复杂的细胞内信号动态网络中,生物钟基因在接收细胞信号传入时需要与输入周期同步,延迟或

提前生物钟相位均会导致信号传入没有响应。然而, 光遗传学调控 SCN 神经元及信号通路的研究大多数都是急性刺激。应该考虑到节律相位的影响, 采用光遗传学进行刺激时应关注目标信号分子和神经元活动的窗口期; 也要注重 SCN 中不同细胞亚型之间的联系在节律调节中的作用; 更重要的是, SCN 作为昼夜节律的中枢管理器, 如何与其他脑区及外周保持同步。这些问题需要进一步探究。目前, 相关研究报道较少, 且尚未有将光遗传学应用于细胞生物钟信号通路调控来改善疾病治疗的研究。

除此之外, 在神经精神系统疾病、代谢性疾病和消化系统疾病等诸多疾病中, 要考虑到一些慢性疾病的生理变化是一个过程, 应尝试以慢性、长期的方式进行调控。因此, 利用光遗传学技术调控生物节律进而影响不同疾病的进程是一种新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Neves AR, Albuquerque T, Quintela T, et al. Circadian rhythm and disease: relationship, new insights, and future perspectives. *J Cell Physiol*, 2022, 237: 3239-56
- [2] Tan P, He L, Huang Y, et al. Optophysiology: illuminating cell physiology with optogenetics. *Physiol Rev*, 2022, 102: 1263-325
- [3] Petrovic J, Lange F, Hohlfeld D. Fiber-based optrode with microstructured fiber tips for controlled light delivery in optogenetics. *J Neural Eng*, 2023, 20: 9
- [4] Keshmiri Neghab H, Soheilifar MH, Grusch M, et al. The state of the art of biomedical applications of optogenetics. *Lasers Surg Med*, 2022, 54: 202-16
- [5] Chen B, Cui M, Wang Y, et al. Recent advances in cellular optogenetics for photomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114457
- [6] Halberg F. Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Int Z Vitaminforsch Beih*, 1959, 10: 225-96
- [7] Brown RL, Robinson PR. Melanopsin -- shedding light on the elusive circadian photopigment. *Chronobiol Int*, 2004, 21: 189-204
- [8] Begemann K, Neumann AM, Oster H. Regulation and function of extra-SCN circadian oscillators in the brain. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020, 229: e13446
- [9] Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 517-49
- [10] Finger AM, Kramer A. Peripheral clocks tick independently of their master. *Genes Dev*, 2021, 35: 304-6
- [11] Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19: 453-69
- [12] Li Y, Androulakis IP. Light-induced synchronization of the SCN coupled oscillators and implications for entraining the HPA axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 960351
- [13] Reiter RJ, Rosales-Corral S, Sharma R. Circadian disruption, melatonin rhythm perturbations and their contributions to chaotic physiology. *Adv Med Sci*, 2020, 65: 394-402
- [14] 王帅. 时钟蛋白REV-ERB α 调控NLRP3炎症小体及溃疡性结肠炎的分子机制研究[D]. 广州: 暨南大学, 2019
- [15] Huang RC. The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: the 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomed J*, 2018, 41: 5-8
- [16] Hirai T. Regulation of clock genes by adrenergic receptor signaling in osteoblasts. *Neurochem Res*, 2018, 43: 129-35
- [17] Doupé DP, Perrimon N. Visualizing and manipulating temporal signaling dynamics with fluorescence-based tools. *Sci Signal*, 2014, 7: rel
- [18] Isomura A, Ogushi F, Kori H, et al. Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes Dev*, 2017, 31: 524-35
- [19] Oesterhelt D, Stoerkenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol*, 1971, 233: 149-52
- [20] Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods*, 2011, 8: 26-9
- [21] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 1263-8
- [22] Jang J, Woolley GA. Directed evolution approaches for optogenetic tool development. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49: 2737-48
- [23] Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 1213-25
- [24] Zhang K, Cui B. Optogenetic control of intracellular signaling pathways. *Trends Biotechnol*, 2015, 33: 92-100
- [25] Zhang H, Fang H, Liu D, et al. Applications and challenges of rhodopsin-based optogenetics in biomedicine. *Front Neurosci*, 2022, 16: 966772
- [26] Repina NA, Rosenbloom A, Mukherjee A, et al. At light speed: advances in optogenetic systems for regulating cell signaling and behavior. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2017, 8: 13-39
- [27] Emiliani V, Entcheva E, Hedrich R, et al. Optogenetics for light control of biological systems. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 55
- [28] Kawamura G, Kokaji T, Kawata K, et al. Optogenetic decoding of Akt2-regulated metabolic signaling pathways in skeletal muscle cells using transomics analysis. *Sci Signal*, 2023, 16: eabn0782
- [29] Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med*, 2021, 27: 1223-9
- [30] Li Y, He Y, Chen M, et al. Optogenetic activation of adenosine A2A receptor signaling in the dorsomedial striatopallidal neurons suppresses goal-directed behavior. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41: 1003-13

- [31] Liu MM, Dai JM, Liu WY, et al. Human melanopsin-AAV2/8 transfection to retina transiently restores visual function in rd1 mice. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9: 655-61
- [32] Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 13940-5
- [33] Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, et al. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*, 2011, 332: 1565-8
- [34] Bailes HJ, Zhuang LY, Lucas RJ. Reproducible and sustained regulation of G α s signalling using a metazoan opsin as an optogenetic tool. *PLoS One*, 2012, 7: e30774
- [35] Siuda ER, McCall JG, Al-Hasani R, et al. Optodynamic simulation of β -adrenergic receptor signalling. *Nat Commun*, 2015, 6: 8480
- [36] Chow BY, Han X, Dobry AS, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, 2010, 463: 98-102
- [37] Han X, Boyden ES. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One*, 2007, 2: e299
- [38] Zhang X, Dong C, Huang W, et al. Rational design of a photo-responsive UVR8-derived protein and a self-assembling peptide-protein conjugate for responsive hydrogel formation. *Nanoscale*, 2015, 7: 16666-70
- [39] Zhang W, Lohman AW, Zhuravlova Y, et al. Optogenetic control with a photocleavable protein, PhoCl. *Nat Methods*, 2017, 14: 391-4
- [40] Alexandre MT, Arents JC, van Grondelle R, et al. A base-catalyzed mechanism for dark state recovery in the *Avena sativa* phototropin-1 LOV2 domain. *Biochemistry*, 2007, 46: 3129-37
- [41] Heintzen C, Loros JJ, Dunlap JC. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 2001, 104: 453-64
- [42] Park H, Kim NY, Lee S, et al. Optogenetic protein clustering through fluorescent protein tagging and extension of CRY2. *Nat Commun*, 2017, 8: 30
- [43] Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, et al. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2010, 7: 973-5
- [44] Zhou XX, Chung HK, Lam AJ, et al. Optical control of protein activity by fluorescent protein domains. *Science*, 2012, 338: 810-4
- [45] Jost M, Fernández-Zapata J, Polanco MC, et al. Structural basis for gene regulation by a B12-dependent photoreceptor. *Nature*, 2015, 526: 536-41
- [46] Ochoa-Fernandez R, Samodelov SL, Brandl SM, et al. Optogenetics in plants: red/far-red light control of gene expression. *Methods Mol Biol*, 2016, 1408: 125-39
- [47] Zhou Y, Kong D, Wang X, et al. A small and highly sensitive red/far-red optogenetic switch for applications in mammals. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 262-72
- [48] Redchuk TA, Omelina ES, Chernov KG, et al. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 633-9
- [49] Piggins HD, Cutler DJ. The roles of vasoactive intestinal polypeptide in the mammalian circadian clock. *J Endocrinol*, 2003, 177: 7-15
- [50] Reghunandanan V. Vasopressin in circadian function of SCN. *J Biosci*, 2020, 45: 140
- [51] LeSauter J, Bhuiyan T, Shimazoe T, et al. Circadian trafficking of calbindin-ir in fibers of SCN neurons. *J Biol Rhythms*, 2009, 24: 488-96
- [52] Ono D, Honma KI, Honma S. Roles of neuropeptides, VIP and AVP, in the mammalian central circadian clock. *Front Neurosci*, 2021, 15: 650154
- [53] Mazuski C, Abel JH, Chen SP, et al. Entrainment of circadian rhythms depends on firing rates and neuropeptide release of VIP SCN neurons. *Neuron*, 2018, 99: 555-63
- [54] Jones JR, Tackenberg MC, McMahon DG. Manipulating circadian clock neuron firing rate resets molecular circadian rhythms and behavior. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 373-5
- [55] Todd WD, Venner A, Anaclet C, et al. Suprachiasmatic VIP neurons are required for normal circadian rhythmicity and comprised of molecularly distinct subpopulations. *Nat Commun*, 2020, 11: 4410
- [56] Hume C, Allchorne A, Grinevich V, et al. Effects of optogenetic stimulation of vasopressinergic retinal afferents on suprachiasmatic neurones. *J Neuroendocrinol*, 2019, 31: e12806
- [57] Hannibal J, Hundahl C, Fahrenkrug J, et al. Cholecystokinin (CCK)-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus: innervation, light responsiveness and entrainment in CCK-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 2010, 32: 1006-17
- [58] Xie L, Xiong Y, Ma D, et al. Cholecystokinin neurons in mouse suprachiasmatic nucleus regulate the robustness of circadian clock. *Neuron*, 2023, 111: 2201-17
- [59] Cheng J, Huang X, Liang Y, et al. Plasticity of light-induced concurrent glutamatergic and GABAergic quantal events in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, 2018, 33: 65-75
- [60] Harding C, Bechtold DA, Brown TM. Suprachiasmatic nucleus-dependent and independent outputs driving rhythmic activity in hypothalamic and thalamic neurons. *BMC Biol*, 2020, 18: 134
- [61] Paul S, Hanna L, Harding C, et al. Output from VIP cells of the mammalian central clock regulates daily physiological rhythms. *Nat Commun*, 2020, 11: 1453
- [62] Patton AP, Edwards MD, Smyllie NJ, et al. The VIP-VPAC2 neuropeptidergic axis is a cellular pacemaking hub of the suprachiasmatic nucleus circadian circuit. *Nat Commun*, 2020, 11: 3394
- [63] Kim S, McMahon DG. Light sets the brain's daily clock by regional quickening and slowing of the molecular clockworks at dawn and dusk. *Elife*, 2021, 10: e70137
- [64] Tackenberg MC, Hughey JJ, McMahon DG. Optogenetic stimulation of VIPergic SCN neurons induces photoperiodic-like changes in the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci*, 2021, 54: 7063-71
- [65] Tsuno Y, Peng Y, Horike SI, et al. *In vivo* recording of suprachiasmatic nucleus dynamics reveals a dominant role

- of arginine vasopressin neurons in circadian pacesetting. *PLoS Biol*, 2023, 21: e3002281
- [66] Ono D, Wang H, Hung CJ, et al. Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Sci Adv*, 2023, 9: eabq7032
- [67] Bailes HJ, Milosavljevic N, Zhuang LY, et al. Optogenetic interrogation reveals separable G-protein-dependent and -independent signalling linking G-protein-coupled receptors to the circadian oscillator. *BMC Biol*, 2017, 15: 40
- [68] Güler AD, Ecker JL, Lall GS, et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, 2008, 453: 102-5
- [69] Nakagawa S, Nguyen Pham KT, Shao X, et al. Time-restricted G-protein signaling pathways via GPR176, Gz, and RGS16 set the pace of the master circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5055
- [70] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, et al. β -arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 483-510
- [71] Lax P, Ortuño-Lizarán I, Maneu V, et al. Photosensitive melanopsin-containing retinal ganglion cells in health and disease: implications for circadian rhythms. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3164
- [72] Ukai H, Kobayashi TJ, Nagano M, et al. Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 1327-34
- [73] Pulivarthi SR, Tanaka N, Welsh DK, et al. Reciprocity between phase shifts and amplitude changes in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 20356-61
- [74] Balazs DA. Melanopsin over-expression renders NIH3T3 fibroblast cells light responsive [D]. New Orleans: Tulane University, 2012
- [75] Ikegami K, Nakajima M, Minami Y, et al. cAMP response element induces *Per1* *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531: 515-21
- [76] Yang S, Constantin OM, Sachidanandan D, et al. PACmn for improved optogenetic control of intracellular cAMP. *BMC Biol*, 2021, 19: 227
- [77] Blaum CM. Optogenetic manipulation of circadian rhythms[D]. Lübeck: University of Lübeck, 2021
- [78] Konermann S, Brigham MD, Trevino A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 2013, 500: 472-6
- [79] Cotterell AC. Optogenetic regulation of *mPer2*[D]. Atlanta: Morehouse School of Medicine, 2017
- [80] Cannarsa M, Liguori F, Pellicciotta N, et al. Light-driven synchronization of optogenetic clocks. *BioRxiv* (Preprint), 2024
- [81] Ball LJ, Palesh O, Kriegsfeld LJ. The pathophysiologic role of disrupted circadian and neuroendocrine rhythms in breast carcinogenesis. *Endocr Rev*, 2016, 37: 450-466
- [82] Škrlec I, Talapko J, Džijan S, et al. The association between circadian clock gene polymorphisms and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Biology (Basel)*, 2021, 11: 20
- [83] Germain A, Kupfer DJ. Circadian rhythm disturbances in depression. *Hum Psychopharmacol*, 2008, 23: 571-85
- [84] TTIwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-54
- [85] Sun SY, Chen GH. Treatment of circadian rhythm sleep-wake disorders. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2022, 20: 1022-34
- [86] Wang M, Yu H, Li S, et al. Altered biological rhythm and Alzheimer's disease: a bidirectional relationship. *Curr Alzheimer Res*, 2021, 18: 667-75
- [87] Bolsius YG, Zurbruggen MD, Kim JK, et al. The role of clock genes in sleep, stress and memory. *Biochem Pharmacol*, 2021, 191: 114493
- [88] Wang P, Gao X, Zhao F, et al. Study of the neurotransmitter changes adjusted by circadian rhythm in depression based on liver transcriptomics and correlation analysis. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12: 2151-66
- [89] 侯婉婷. 柴胡低极性部位对昼夜节律紊乱的调节作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2022
- [90] An K, Zhao H, Miao Y, et al. A circadian rhythm-gated subcortical pathway for nighttime-light-induced depressive-like behaviors in mice. *Nat Neurosci*, 2020, 23: 869-80
- [91] Vadvie CA, Petersen KA, Eberhardt LA, et al. The suprachiasmatic nucleus regulates anxiety-like behavior in mice. *Front Neurosci*, 2022, 15: 765850
- [92] Todd WD, Fenselau H, Wang JL, et al. A hypothalamic circuit for the circadian control of aggression. *Nat Neurosci*, 2018, 21: 717-24
- [93] Ono D, Mukai Y, Hung CJ, Chowdhury S, et al. The mammalian circadian pacemaker regulates wakefulness via CRF neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Sci Adv*, 2020, 6: eabd0384
- [94] Sooriyaarachchi P, Jayawardena R, Pavey T, et al. Shift work and the risk for metabolic syndrome among healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 2022, 23: e13489
- [95] Chaix A, Lin T, Le HD, et al. Time-restricted feeding prevents obesity and metabolic syndrome in mice lacking a circadian clock. *Cell Metab*, 2019, 29: 303-19
- [96] Mukherji A, Dachraoui M, Baumert TF. Perturbation of the circadian clock and pathogenesis of NAFLD. *Metabolism*, 2020, 111S: 154337
- [97] Chellappa SL, Qian J, Vujovic N, et al. Daytime eating prevents internal circadian misalignment and glucose intolerance in night work. *Sci Adv*, 2021, 7: eabg9910
- [98] Chellappa SL, Vujovic N, Williams JS, et al. Impact of Circadian disruption on cardiovascular function and disease. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30: 767-79
- [99] Sulli G, Lam MTY, Panda S. Interplay between circadian clock and cancer: new frontiers for cancer treatment. *Trends Cancer*, 2019, 5: 475-94
- [100] 高晓霞. 一种柴胡不同极性部位在保肝及调节昼夜节律紊乱的应用: 中国, CN116942715A[P]. 2023-10-27
- [101] Pan X, Mota S, Zhang B. Circadian clock regulation on lipid metabolism and metabolic diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1276: 53-66
- [102] Grippio RM, Tang Q, Zhang Q, et al. Dopamine signaling

- in the suprachiasmatic nucleus enables weight gain associated with Hedonic feeding. *Curr Biol*, 2020, 30: 196-208.e8
- [103] Bruegmann T, Boyle PM, Vogt CC, et al. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *J Clin Invest*, 2016, 126: 3894-904
- [104] Zhao B, Wang Y, Tan X, et al. An optogenetic controllable T cell system for hepatocellular carcinoma immunotherapy. *Theranostics*, 2019, 9: 1837-50
- [105] Bishehsari F, Voigt RM, Keshavarzian A. Circadian rhythms and the gut microbiota: from the metabolic syndrome to cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16: 731-9
- [106] Wang S, Lin Y, Yuan X, et al. REV-ERB α integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- κ B/NLRP3 axis. *Nat Commun*, 2018, 9: 4246
- [107] Zhu W, Winter MG, Byndloss MX, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. *Nature*, 2018, 553: 208-11
- [108] Cui M, Sun T, Li S, et al. NIR light-responsive bacteria with live bio-glue coatings for precise colonization in the gut. *Cell Rep*, 2021, 36: 109690
- [109] Cui M, Pang G, Zhang T, et al. Optotheranostic nanosystem with phone visual diagnosis and optogenetic microbial therapy for ulcerative colitis at-home care. *ACS Nano*, 2021, 15: 7040-52