

DOI: 10.13376/j.cblls/2015190

文章编号: 1004-0374(2015)11-1372-08



徐璿, 教授, 博士生导师。曾任日本 YS 新技术研究所主任研究员、南京大学特聘教授, 现任苏州大学剑桥-苏大基因组资源中心主任。国家杰出青年基金获得者, 国家重大科学研究计划项目首席科学家。主要围绕昼夜节律的分子机制及其生理功能展开系统性研究, 发现了生物钟基因的突变直接改变人类睡眠的相位 (*Nature*, 2005), 揭示了生物钟周期变短是小鼠睡眠与活动相位改变的主要原因 (*Cell*, 2007), 与其他同事合作鉴定了一个生物钟转录因子 DEC2 能够影响睡眠的长短 (*Science*, 2009); 回国后, 利用模式动物的优势, 继续寻找新的生物钟基因 (*EMBO J*, 2010), 通过构建一系列动

物模型并在分析的基础上建立了反馈环之间的互作对昼夜节律周期决定的原理 (*PNAS*, 2013; *NAR*, 2014); 同时, 利用这些模式动物扩展了生物钟对肿瘤发展、饮食行为的影响 (*Cell Death Differ*, 2012; *Cell Report*, 2014), 为系统性理解生物钟对生理、行为的调控建立了一定的基础。

哺乳动物昼夜节律机制研究进展

安 扬, 徐 璿*

(南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

摘 要: 地球以 24 h 为自转周期, 为此, 生活在地球上的不同生物也通过自身约 24 h 的内在节律的形成来适应昼夜环境的变化, 这一系统即为生物钟。在哺乳类动物中, 生物钟主要通过涵盖转录与翻译水平的核心连锁环驱动特异性的转录因子来维持整个基因组转录的昼夜节律性, 从而使得不同组织与器官的生理功能能够适应环境剧烈的昼夜变化。现将在综述哺乳类动物昼夜节律形成机制及其生理功能研究进展的基础上, 对今后的研究方向作出展望。

关键词: 昼夜节律; 哺乳动物; 分子机制; 输入系统; 输出系统; 代谢

中图分类号: Q41; Q955 **文献标志码:** A

The mechanism of mammalian circadian rhythms

AN Yang, XU Ying*

(Model Animal Research Center, Nanjing University, Nanjing 210061, China)

Abstract: The earth's rotation around its axis generates a 24-hour cycle of light and darkness. Therefore, almost all living organisms have evolved internal timekeeper, termed as circadian clock, to anticipate the changes in the physical environment that are tied to the rotation of earth. The mammalian circadian clock is composed of the primary transcriptional and post-translational feedback loop (TTL), associated with one or more "auxiliary" loops to drive the global rhythmic gene expression, thereby ensuring that internal changes take place in coordination with

收稿日期: 2015-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171343, 31230049); 科技部重大研究计划(2010CB945100)

*通信作者: E-mail: yingxutavel@gmail.com; Tel: 0512-65883781

external cycle. Here, we discuss knowledge acquired during the past few years on the molecular mechanism and function of the mammalian circadian system.

Key words: circadian clock; mammalian; input system; output system; metabolism

昼夜节律 (circadian rhythm) 是指生命活动以 24 h 为周期的内在性节律^[1]。地球的自转产生了白天和黑夜, 并出现以 24 h 为周期的昼夜交替。这是地球上所有生物都必须面对的环境挑战, 能够感知并适应这种昼夜变化的生物将获得明显的选择优势。为了适应这种昼夜环境周期性的变化, 地球上几乎所有生物体, 包括藻类、细菌、植物、动物等, 都演化出一个特殊的系统——生物钟, 用以指挥不同组织与器官来适应昼夜节律。生物钟是指由内源性分子时钟控制的日周生理振荡过程, 人类生命活动的各个层面, 包括行为、生理、代谢等都受到生物钟的调控, 并表现出明显的日间节律, 如睡眠与苏醒、警觉程度与运动能力、体温波动、泌尿系统、激素分泌、免疫调节以及细胞因子释放等等^[2-4]。

人类认识到昼夜节律的存在始于对植物的观察。早在公元前 4 世纪, 亚历山大大帝的一名手下就记录了罗望子树 (tamarind) 树叶每天周期性的运动, 这可能是对昼夜节律现象的最早描述。对昼夜节律的科学性研究则始于 18 世纪, 法国天文学家 de Mairan 观察到含羞草的叶子表现出以约 24 h 为周期的打开和闭合, 在没有外界光线的情况下, 这种运动仍然保持不变, 从而提出含羞草叶子的周期性运动受内在的“时钟”控制的见解。自此, 人们对生物钟的研究不断深入, 并逐渐从植物拓展到了动物以及人类自身。伴随着现代遗传学的建立和分子生物学的兴起, 一批主导核心生物钟的基因得以被鉴定并注释了功能, 使得生物钟的机制研究取得了长足的发展。近年来, 从高通量系统性数据挖掘, 到一系列生物钟蛋白质晶体结构的解析, 及系统生物学方法的引进, 甚至通过数学模型来整合多水平的数据, 极快地加速了人们对哺乳动物昼夜节律的深入理解^[5]。

1 哺乳动物的生物钟系统

哺乳动物的昼夜节律系统一般由 3 部分组成: 输入通路、核心生物钟以及输出通路。输入通路可以感受外界的光暗变化及其他时间线索, 并负责传递给核心生物钟; 核心生物钟则根据环境时间调节自身内在的节律, 使之与外界环境相协调; 输出通

路是生物钟系统发挥生理功能的平台和途径。生物钟系统具有一个庞大的输出网络, 通过核心生物钟的反馈调节延伸至各组织器官, 指导其生物钟的日周波动。在细胞内部, 生物钟通过转录及翻译水平的反馈环直接或间接地影响关键基因和关键进程。与此同时, 生物钟系统还通过激素以及神经通路影响人类的代谢、生理和行为^[6]。

哺乳动物的生物钟系统具有 3 个基本特点。(1) 内在性。生物钟是一种内在昼夜节律, 其周期接近却不等于 24 h。这种内在的节律使生物体能够预知昼夜环境的周期性变化, 并提前做好准备, 从而主动地适应环境, 而非对环境变化做出被动的反应。这种内在节律性的主要表现为, 当缺乏外界刺激时, 如在恒定的黑暗环境, 昼夜节律仍能持续存在, 并且能够自我维持, 更为重要的是, 这种内在的昼夜节律存在于每一个细胞中, 包括体外培养的细胞^[7]。(2) 可牵引性。哺乳动物的核心生物钟控制基因 (core pacemaker) 位于中枢神经下丘脑的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN)。除了具有普遍的内在分子节律系统外, 它还是一群能迅速对光做出反应的神经元, 能通过感知从视网膜传来的光信号, 迅速进行核受体应答, 经过神经递质传导及时调节机体内在节律, 以使内在的昼夜节律与外界环境相协调^[8]。(3) 温度补偿性。生物钟内在节律很稳定, 不易受温度波动的干扰。

在哺乳动物中, 视交叉上核 (SCN) 在昼夜节律的维持与改变上起着至关重要的作用^[9-10]。人为破坏大鼠的 SCN 将彻底消除其昼夜节律, 而移植入 SCN 又能使昼夜节律恢复正常^[11]。虽然 SCN 区域结构微小, 但它并不是一个均质的核团^[12]。每一瓣 SCN 都分为腹侧的核心控制区和背侧“壳区”^[13]。目前已知腹侧核心区域特异性表达神经肽 VIP, 而背侧为 AVP。腹侧结构起偶联控制作用, 如对运动、体温、心率、褪黑素和激素合成起着关键作用。SCN 的具体解剖结构在不同物种之间变化很大^[14], 但神经肽 VIP 与 AVP 基本都与谷氨酸、GABA 等神经递质共存, 以发挥时钟的上下游调节作用^[15]。VIP 周期性地从核心区释放, 作用于核区和壳区神经表面的 VPAC2 受体, 关闭神经细胞钾离子通道

导致细胞的去极化, 并诱导 *Per1* 和 *Per2* 基因的表达。已有研究表明, VIP 如同生物钟的“统领者”, 驱动机体所有细胞同时校正时间。VIP 基因的缺失会损害细胞的同步化作用, 机体因此出现多节律现象, 从而导致整体节律的削弱。

SCN 的核心钟曾长时间被认为是生物体唯一具有自主振动能力的生物钟, 即周边组织的生物钟不具备自主振动的能力, 只能在 SCN 的起搏下振动。然而, 进一步研究发现, 周边组织的生物钟同样具有自主振动、自我维持节律的能力^[16-17]。因此, SCN 对周边组织的生物钟不再具有支配作用, 而主要起协调作用, 但是如何与周围组织协调的具体机制仍不甚了解。2013 年, Gerber 等^[18] 运用合成串联的顺式转录元件和启动子接荧光素酶报告基因筛选系统 (STAR-PROM), 进行无偏向性筛选外周组织中的早期时钟应答分子。研究发现人和啮齿类动物中的 SRF 基因能够作为即时响应转录因子, 应答 Rho-actin-MRTP 信号通路的调控, 直接激活 *Per2* 等下游基因的转录以传达核心生物钟的同步信息。这一发现为探究生物钟的系统性调控提供了新信息。

2 昼夜节律的分子基础

对昼夜节律分子机制的理解主要来自遗传学

的研究。从 20 世纪 90 年代起, 利用昼夜节律周期的精确性这一特点, 以生物钟周期长短为指标, 通过基因突变和表型筛选结合生物化学方法, 从果蝇、小鼠以及患者中发现了 *Per*、*Clock*、*Ckle/d* 等近 20 种重要的生物钟基因 (表 1)^[19-31]。在此基础上, 提出了一个涵盖转录与翻译水平的多反馈环维持并调节振荡的理论。该理论认为, 两个具有 bHLH-PAS 结构域的转录因子 CLOCK 和 BMAL1 首先激活顺式作用元件 E-box^[32], 以启动 *Per* 和 *Cry* 等下游基因的转录; 数小时后, 积累的 PER 和 CRY 蛋白反过来结合 BMAL1 的 C 端转移活化区域 (TAD), 使 CLOCK/BMAL1 复合物从激活态转为抑制态, 从而抑制下游基因的转录激活^[33], 形成核心负反馈调控环。在核心反馈环外围, 还有 ROR:REV-ERB 和 DBP:E4BP4 两对正负调控反馈回路作用于其他顺式作用元件 D-box 和 RRE-box^[21, 24], 参与核心反馈环的调控。至此, 哺乳动物的昼夜节律调控至少有三组相互连锁的环路协同影响^[34-35]。

在经典的转录调控之外, 许多时钟基因还兼起复杂精细调控的作用, 使反馈环的调节方式更加复杂可变, 如 FBXL3 同时肩负着激活 E-box 和 RRE-box 的功能^[28], 而 PER1 和 PER2 在最新的研究中被发现兼具激活和抑制 E-box 转录活性的双向作用。

表1 哺乳动物生物钟转录-翻译调控主要成员

基因名	蛋白质特征	生物钟功能
<i>BMAL1</i>	含bHLH-PAS结构域转录因子	与CLOCK/NPAS2结合, 激活含E-box基因的转录
<i>CLOCK</i>	含bHLH-PAS结构域转录因子	可与BMAL1结合, 激活含E-box基因的转录
<i>PER1</i> 、 <i>PER2</i> 、 <i>PER3</i>	含PAS结构域的转录调控蛋白	抑制CLOCK-BMAL1介导的转录
<i>CRY1</i> 、 <i>CRY2</i>	转录调控蛋白	结合BMAL1, 抑制CLOCK-BMAL1介导的转录
<i>DEC1</i> 、 <i>DEC2</i>	含bHLH结构的转录因子	抑制CLOCK-BMAL1介导的转录
<i>NPAS2</i>	含bHLH-PAS结构域转录因子	CLOCK的种内同源基因, 可与BMAL1结合激活含E-box基因的转录
<i>DBP-TEF-HLF</i>	含RAR亮氨酸拉链结构域转录因子	激活含D-box基因的转录
<i>E4BP4</i>	转录抑制子	激活含D-box基因的转录
<i>RORA</i> 、 <i>RORB</i> 、 <i>RORC</i>	核受体	激活含RRE-box基因的转录
<i>NR1D1</i> 、 <i>NR1D2</i>	核受体	抑制含RRE-box基因的转录
<i>SIRT1</i>	组蛋白去乙酰化酶, 家族III成员	结合PER2, 抑制CLOCK-BMAL1介导的转录
<i>FBXL3</i> 、 <i>FBXL21</i>	SCF泛素化E3连接酶复合体F-box蛋白	介导CRY的降解, 调控CRY和PER的表达。FBXL3同时结合REV-ERB α , 促进后者从RRE-box解离
<i>FBXW11</i>	SCF泛素化E3连接酶复合体F-box蛋白	调控时钟蛋白的更新
<i>CSNK1D</i> 、 <i>CSNK1E</i>	酪蛋白激酶	磷酸化PER, 使其蛋白质稳定性降低
<i>RACK1</i>	蛋白激酶	磷酸化CLOCK-BMAL1
<i>PRKCA</i>	蛋白激酶	磷酸化CLOCK-BMAL1
<i>AMPK</i>	蛋白激酶	磷酸化CRY1, 启动其降解途径
<i>MAGED1</i>	细胞周期调控蛋白	结合ROR α , 激活含RRE-box基因的转录

一方面它们与 CRY1 结合, 抑制 CLOCK/BMAL1 的转录激活活性; 另一方面 PER1、PER2 可以招募 CRY, 干扰 CRY 与 CLOCK/BMAL1 的结合, 通过抑制负调控因子的方法发挥激活 E-box 的作用^[36]。

E-box、RRE-box 等的意义不仅体现在其对于时钟系统振荡规律的实现, 由于其广泛分布于许多基因的启动子或内含子区, 因此, 这套系统同时控制着受到生物钟调控的代谢、生理过程。这些受到时钟蛋白作用的基因被统称为时钟控制基因 (clock control genes, CCGs)^[37]。在迄今进行过生物钟研究的器官组织中, 约占转录组 5%~10% 的基因有节律性表达的特征, 但不同组织间节律性表达的转录组成员却大相径庭。即使在同一组织, 不同时钟蛋白和时钟控制蛋白的表达相位也远不止这三种。因此, 复杂的振荡调控机制就来源于三种作用元件强弱、数量的组合。以 E-box 为主导, 通过在启动子区增加或减少、改变及搭配不同的时钟作用元件, 可以调节下游基因的表达丰度, 调整表达时间, 迁移表达的时相。再配合时钟蛋白反式作用因子在各组织中差异化的表达, 就可创造出千变万化然而受同一信号指挥的复杂时钟振荡系统。

近年来, 高通量分析技术在生物研究中的应用令时钟生物学家们受益匪浅。Koike 等^[38]利用 Chip-sequence 技术测定了一系列核心时钟蛋白在启动子和内含子区的结合位点, 为研究核心钟基因的调控网络提供了宝贵的资源, 并在全基因组范围内测定了各时钟蛋白在不同时间点的染色质结合位点和结合强度, 系统描绘了核心时钟蛋白之间差异化的调控角色。

时钟蛋白翻译后修饰对于哺乳动物生物钟的稳定也有着重要意义。单纯的转录-翻译负反馈调控只需几小时, 有了翻译后修饰的加入, 通过调节时钟蛋白稳定性与延迟入核时间, 机体成功地将生物钟振荡周期调整到了约 24 h^[1]。翻译后修饰的主要工作由激酶完成, 而 DBT 激酶是果蝇中首个发现的生物钟翻译后修饰关键组分, 其在哺乳动物中的同源基因 CK1 δ/ϵ ^[39] 被证实在哺乳动物生物钟翻译后修饰环节起到重要作用^[40-41]。另外, GSK3 β 、PKA、PKC 和 MAPK 等都曾被报道在上调、下调酶活性时会引起生物钟改变, 或与时钟蛋白具有酶与底物的关系^[42-44]。但具体的磷酸化修饰位点及其功能仍有待进一步精确的研究认证。

在哺乳动物生物钟系统中, PER2 的转录后磷酸化修饰是最具代表性的一个。全长的 PER2 蛋白

中分布着超过 60 个丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点, 它们成簇地出现形成了多个磷酸化底物结构域, 可被不同的激酶识别磷酸化, 并产生多种多样的细胞效应。已知以 PER2 为底物的激酶为 CK1 δ/ϵ , 它们可紧随另一未知起始激酶的下游, 磷酸化人源 PER2 的 655 位起 (小鼠为 662 位起) 4 个丝氨酸, 导致 PER2 稳定性的提高^[45-46]。然而, 直到现在这个重要的起始激酶仍没有能够得到成功的鉴定。2013 年, Kaasik 等^[47]报道了一种 PER2 翻译后修饰的新途径。他们在研究激酶 GSK3 β 对时钟蛋白磷酸化修饰时, 意外发现了一种新的激酶底物——O-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (OGT), 而在果蝇 S2 细胞中检测到了 OGT 对关键时钟蛋白 Clock 和 Period 的可逆修饰, 两者结合形成了一个新的互调控系统。在人源系统 HEK293T 细胞中, 这种糖基化修饰位点包含了上述 PER2 的关键激酶调控位点 S662~S674, 提示了该关键位点存在磷酸化和糖基化两种协同影响的修饰方式, 同时, 也在代谢信号与生物钟调谐同步之间架起了桥梁^[47]。

与此相对应, 如果阻碍时钟蛋白的泛素化途径, 同样会造成时钟蛋白的半衰期变化, 进而影响节律的稳定和周期长短, 如缺失 F-box 相关蛋白 FBXL3 或 FBXL21 就会产生相反的生物钟表型^[27]。其中 FBXL3 作为一个双向时钟调控因子, 既结合在 RRE-box 转录抑制复合物中促进其解离, 又结合 CRY1、CRY2 介导两者的泛素化降解。这两种相互独立的调控机制以 FBXL3 为连接点, 将 E-box 与 RRE-box 的转录调控联系起来, 协调统一了时钟的周期决定和自稳态维持^[28, 48]。此外, CK2 α 的磷酸化可以促进 BMAL1 在细胞核内的累积^[49], 而适当的 SUMO 化修饰对于它与 CLOCK 的二聚体结合非常关键^[50], 并且 BMAL1 的 SUMO 化对其自身的泛素化降解更新有积极作用^[51-52]; 另外, 乙酰化 BMAL1 对节律的维持也具有关键作用^[53]。由此可见, 生物钟的转录调控与翻译后修饰相结合, 共同维持了时钟蛋白的功能。

对生物钟的调控还包含了表观遗传学修饰。BMAL1:CLOCK 对时钟控制蛋白启动子的激活与后者启动子区的组蛋白修饰水平变化相偶联。几个重要的染色质修饰蛋白, 如 SIRT1、HDAC3 和甲基转移酶 MLL1, 都被证明能被时钟蛋白招募到 CCG 的启动子区, 参与染色质结构的重塑^[54]。更有趣的是, 时钟蛋白 CLOCK 本身具有组蛋白乙酰化酶的活性, SIRT1 通过与 CLOCK 结合调节其乙酰化酶

活性, 两者协调控制下游启动子区的激活^[55]。

2012年以来, 多个时钟蛋白的晶体结构被成功解析, 为从原子水平更精确地了解生物钟调控机制建立了新的视角。生物钟蛋白的结构并不紧凑, 在结合各种大、小分子时能随配体发生结构变化, 因此, 要使其稳定富集并进行晶体结构测定就显得格外困难。Huang等^[56]成功解析了BMAL1: CLOCK复合物的X-射线晶体结构, 证明了BMAL1和CLOCK的三个结构功能域在形成异源二聚体时会发生紧密结合, 为BMAL1和CLOCK的突变分析和药物靶点设计提供了依据。Schmalen等^[57]解析了小鼠PER2:CRY1复合物晶体结构, 发现mPER2环绕着螺旋状的mCRY1, 并包裹住了mCRY1与FBXL3和CLOCK/BMAL1的结合位点, 仅暴露出了FAD结合簇; 一个锌离子结合位点介导了PER2/CRY1复合物的稳定。PER2与CRY2的结合模式也与PER2/CRY1大体一致^[58]。CRY1、PER1/2/3及FBXL3的单独晶体结构也得以被发现^[59]。微观结构的解谜使得在原子水平探究时钟蛋白多组分复合物相互的靶结合位点成为可能, 也令人更加深刻地理解了复杂复合物组合的效用意义, 并指导靶向治疗的配体选择方案。

经过亿万年的演化, 生物钟的转录-翻译负反馈调控机制已经形成了一套完整严密的体系, 似乎早已在机体调控中占据了必不可少的地位。然而, 最新研究表明, 生物在进化中仍然保留有生物钟的整套备用体系, 即便负反馈调节机制缺失, 这套生物钟的“元祖”仍可为机体维持时钟的稳态。2011年, O'Neill和Reddy^[60]在不具有生物钟核心负反馈环的人血红细胞中发现了一种具有自主生物钟节律的蛋白超氧化物酶。超氧化物酶在之前一直被认为是受转录-翻译负反馈调控机制的指挥, 然而, 众所周知, 哺乳动物成熟的红细胞由于丧失细胞核, 不具有转录功能, 这便否定了超氧化物酶是生物钟下游基因的假设。有趣的是, 超氧化物酶具有生物钟一切必要特征, 其节律性的振荡可以在体外持续数日, 能接受外界信号的同步化并具有温度补偿效应。随后的研究中, 他们沿演化树继续将超氧化物酶的作用前推, 发现其生物钟效应从25亿年前的古生菌起便存在了。由此推测, 超氧化物酶很可能就是生物钟的祖先, 它在25亿年前应阳光和氧气的出现而产生, 和最早产生的时钟蛋白Kai共进化, 并在新的生物钟机制产生时作为桥梁将代谢与时钟紧密相连^[61]。2015年, 美国杜克大学的董欣年实验

室以拟南芥为模式生物, 发现了免疫调控因子NPR1可以响应细胞氧化还原状态来调控时钟基因的转录, 为这两套独立的时钟振荡器间的协作关系架起了桥梁, 也提示了高等生物中这两种振荡系统的调控关系^[62]。

生物钟对下游信号通路和生理行为的调控同样是复杂而多通路的。除了经典的E-box、D-box、RRE-box转录控制系统, 还存在线粒体调控、细胞质信号通路激活等多种调控模式。Joseph实验室研究发现, NAD⁺生物合成酶NAMPT作为一个时钟下游控制基因, 存在24h节律振荡, 其振荡导致了下游NAD⁺合成的节律性振荡, 并进一步导致了线粒体去乙酰化酶SIRT3的活性以及线粒体氧耗产生了24h节律性振荡。这样以NAD⁺作为桥梁的关关节律性使线粒体能量合成效用与机体饥饿-进食的周期性活动得以协同^[63]。2015年, Lipton等^[63]研究发现, BMAL1除作为核心生物钟蛋白在细胞核中发挥作用外, 还可以在细胞质中作为翻译激活因子, 受mTOR信号通路磷酸化激活, 指导细胞质中蛋白质的合成, 使下游蛋白质合成产生节律性的振荡。

3 昼夜节律对输出系统的影响

生物钟对于机体内稳态和正常生理活动的维持的意义是不言而喻的, 它关联了睡眠、饮食、认知、行为、情绪、代谢等诸多生理指标, 与下游信号的偶联和对外周器官的信号输出影响着整个机体内稳态的自持, 关系到生物是否能保证自身各部位协调有序并与环境相适应。这其中, 生物钟与代谢和情绪控制之间的关联最为关注, 因其与疾病和生活品质的影响最为显著, 有着广阔的实际意义和应用前景。

长久以来, 人们普遍认为进食与活动是同步调控的生物学行为, 即进食行为随活动行为的开始和进行而进行。然而, 有一类“夜食综合征”患者, 常常在夜晚有进食的冲动。本实验室在研究哺乳类从PER基因演化而来的3个同源基因PER1、PER2、PER3功能分化时, 发现当突变hPER1基因上与hPER2同源位点的丝氨酸后, 这种突变的转基因小鼠并不表现出PER2突变所具有的家族性早睡早起的疾病表征, 而是发生了进食节律的相位前移, 导致能量的摄入和消耗之间失去了偶联关系。这样的小鼠在饲喂高脂饲料后, 产生了显著的肥胖表型。由此说明, 在进化的过程中, PER基因在哺

乳动物中逐渐演变为了3个横向同源基因,并各自担负了新的功能,PER2作为核心成员继续承担生物钟的核心调控,决定睡眠-觉醒行为的规律,而PER1的进化为高等生物的代谢行为提供了更精细的调控系统。此外,PER1与PER2在不同组织中对于生物钟的调控存在周期和相位的差异,进一步揭示了哺乳动物进食行为与活动行为的部分独立性^[64]。在前有的研究中发现,明亮的灯光有助于改善精神性疾病患者的抑郁症状而有可能激发躁狂,相反,昏暗的环境有助于稳定情绪以缓解急性躁狂症的发生。因此,躁狂症和抑郁症在日照较长的夏天和短日照的冬天发病频率各有不同^[65]。然而实际上,情绪疾病患者在一天当中也往往有显著的情绪波动。Ikeda等^[66]发现在小鼠的肾上腺皮质内存在一个新的旁分泌途径,肾上腺皮质的被膜下细胞增生导致阿片类小肽BAM22等的高表达,以旁分泌的方式激活CXCR7受体信号途径,最终增强糖皮质激素——著名的压力荷尔蒙在血液内的日间波动振幅,进而影响情绪,使雌性小鼠表现出抗抑郁的表型。然而,这样的旁分泌途径并不影响糖皮质激素的下丘脑-垂体-肾上腺的反馈轴以及总糖皮质激素的释放量。这种不改变周期、相位而只改变振幅的调控机制为生物钟对情绪的影响提供了一个新的视角和途径,提示了生物钟对于情绪管理有着极为复杂的调控模式,也为疾病治疗提供了一个十分有利的可能视角。

而果蝇中关于该领域的研究或许也可以给哺乳动物的生物钟-行为调控模式提供一些提示。一个在人类中高度保守的基因Ataxin-2在果蝇中被证明能与一个PER已知的翻译激活子TYF结合,共同激活PER的翻译^[67-68]。Ataxin-2在人类的同源基因已被证明与小脑萎缩性共济失调和脊髓侧索硬化症相关。而带有Ataxin-2突变的患者早在出现小脑共济失调前就已经患有快速动眼睡眠障碍^[69]。这一研究成果提示,Ataxin-2有可能在哺乳动物中仍然担任相似的时钟调控功能,并直接影响机体神经及睡眠的稳态保持。

4 生物钟前景展望

生物钟的分子机理研究经过了宏观到微观,孤立到系统的发展历程,至今已经取得了骄人的成果;但是从系统水平去理解生物钟对机体的调控机制,目前来看还是相当贫乏。以日本Ueda实验室为代表的一批研究者正在利用转录组学的方法结合系统

生物学方法,试图揭示转录因子组如何直接调控着整体水平的转录节律。而Takahashi实验室正在尝试全面解析所有生物钟相关蛋白的晶体结构,试图从结构水平理解哺乳类动物生物钟形成机制。Schibler实验室也正在从整体动物水平观察各种组织之间的生物钟是如何偶联和协调调控的。而随着生物钟机理的深入和逐步解析,生物钟与转化医学的关系也变得越来越有吸引力。现代人的生活方式常常严重干扰了体内的昼夜节律,这对研究生物钟系统与转化医学的关系提出了迫切要求。以Fu和Ptacek研究组为代表的研究人员正在收集睡眠与生物钟紊乱的家系,鉴定影响人生物钟行为的基因,研究其分子机制。然而,仍有一些重要的问题有待解决,如很多生物钟紊乱导致的疾病是生物钟系统作为整体发挥了作用,还是特定的生物钟基因具有独立的作用,其治疗的对策制定是完全不同的。更重要的是,虽然动物模型的研究,尤其是生物钟突变小鼠的研究已经提供了大量的证据,但迄今对人的疾病、行为相关的直接证据还非常少。未来对这些问题的深入研究可能会对相关疾病的诊断、预防以及治疗产生深远的影响。

[参 考 文 献]

- [1] Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 2002, 418(6901): 935-41
- [2] Panda S, Hogenesch JB, Kay SA, et al. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 2002, 417(6886): 329-35
- [3] Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 2010, 330(6009): 1349-54
- [4] Kalsbeek A, la Fleur S, Fliers E. Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab*, 2014, 3(4): 372-83
- [5] Hasegawa Y, Arita M. Optimal implementations for reliable circadian clocks. *Phys Rev Lett*, 2014, 113(10): 108101
- [6] Cermakian N, Sassone-Corsi P. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(1): 59-67
- [7] Nagoshi E, Saini C, Bauer C, et al. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 2004, 119(5): 693-705
- [8] Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 1063-102
- [9] Rusak B, Zucker I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev*, 1979, 59(3): 449-526
- [10] Kalsbeek A, Kreier F, Fliers E, et al. Circadian control of metabolism by the suprachiasmatic nuclei. *Endocrinology*, 2007, 148(12): 5635-9
- [11] Ralph MR, Foster RG, Davis FC, et al. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period.

- Science, 1990, 247(4945): 975-8
- [12] Schaap J, Albus H, vanderLeest H, et al. Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15994-9
- [13] Welsh DK, Takahashi JS, Kay S, et al. Suprachiasmatic nucleus: Cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72(1): 551-77
- [14] Morin LP, Shivers KY, Blanchard JH, et al. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 2006, 137(4): 1285-97
- [15] Aton SJ, Huettner JE, Straume M, et al. GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(50): 19188-93
- [16] Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5339-46
- [17] Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 1998, 93(6): 929-37
- [18] Gerber A, Esnault C, Aubert G, et al. Blood-borne circadian signal stimulates daily oscillations in actin dynamics and SRF activity. *Cell*, 2013, 152(3): 492-503
- [19] Shearman LP, Sriram S, Weave DR, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288(5468): 1013-9
- [20] Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, et al. Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, 2001, 105(5): 683-94
- [21] Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 2002, 110(2): 251-60
- [22] Miyamoto Y, Sancar A. Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6097-102
- [23] Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*, 1997, 389(6650): 512-6
- [24] Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, et al. A functional genomics strategy reveals *rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 2004, 43(4): 527-37
- [25] Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, et al. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev*, 2001, 15(8): 995-1006
- [26] Wang X, Tang J, Xing L, et al. Interaction of MAGED1 with nuclear receptors affects circadian clock function. *EMBO J*, 2010, 29(8): 1389-400
- [27] Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, et al. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 2013, 152(5): 1106-18
- [28] Shi G, Xing L, Liu Z, et al. Dual roles of FBXL3 in the mammalian circadian feedback loops are important for period determination and robustness of the clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(12): 4750-5
- [29] Chang HC, Guarente L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*, 2013, 153(7): 1448-60
- [30] Jordan SD, Lamia KA. AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 366(2): 163-9
- [31] Robles MS, Boyault C, Knutti D, et al. Identification of RACK1 and protein kinase Calpha as integral components of the mammalian circadian clock. *Science*, 2010, 327(5964): 463-6
- [32] Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 1998, 280(5369): 1564-9
- [33] Xu H, Gustafson C, Sammons PJ, et al. Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C terminus. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(6): 476-84
- [34] Ueda HR, Hayashi S, Chen W, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet*, 2005, 37(2): 187-92
- [35] Ukai-Tadenuma M, Yamada RA, Xu N, et al. Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell*, 2011, 144(2): 268-81
- [36] Akashi M, Okamoto A, Tsuchiya Y, et al. A positive role for PERIOD in mammalian circadian gene expression. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 1056-64
- [37] Duffield GE. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15(10): 991-1002
- [38] Koike N, Yoo SH, Huang HC, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 2012, 338(6105): 349-54
- [39] Lowrey PL. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 2000, 288(5465): 483-92
- [40] Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, et al. Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 2005, 434(7033): 640-4
- [41] Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 2001, 107(7): 855-67
- [42] Hirota T, Lewis WG, Liu AC, et al. A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20746-51
- [43] Shim HS, Kim H, Lee J, et al. Rapid activation of CLOCK by Ca²⁺-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep*, 2007, 8(4): 366-71
- [44] Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert S, et al. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7728-33
- [45] Xu Y, Toh KL, Jones CR, et al. Modeling of a human

- circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. *Cell*, 2007, 128(1): 59-70
- [46] Vanselow K, Vanselow JT, Westermark, et al. Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev*, 2006, 20(19): 2660-72
- [47] Kaasik K, Kivimae S, Allen JJ, et al. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab*, 2013, 17(2): 291-302
- [48] Yan J, Shi G, Zhang Z, et al. An intensity ratio of interlocking loops determines circadian period length. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(16): 10278-87
- [49] Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, et al. CK2 α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(4): 446-8
- [50] Cardone L, Hirayama J, Giordano F, et al. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*, 2005, 309(5739): 1390-4
- [51] Kwon I, Lee J, Chang SH, et al. BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(19): 7318-30
- [52] Lee J, Lee Y, Lee MJ, et al. Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(19): 6056-65
- [53] Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 2007, 450(7172): 1086-90
- [54] Sahar S, Sassone-Corsi P. The epigenetic language of circadian clocks[M]//Achim Kramer, Martha Meroow (eds). *Circadian clocks*. Heidelberg: Springer, 2013: 29-44
- [55] Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 2008, 134(2): 329-40
- [56] Huang N, Chelliah Y, Shan Y, et al. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex. *Science*, 2012, 337(6091): 189-94
- [57] Schmalen I, Reischl S, Wallach T, et al. Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. *Cell*, 2014, 157(5): 1203-15
- [58] Nangle SN, Rosensweig C, Koike N, et al. Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex. *Elife*, 2014, 3: e03674
- [59] Kucera N, Schmalen S, Hennig R, et al. Unwinding the differences of the mammalian PERIOD clock proteins from crystal structure to cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(9): 3311-6
- [60] O'Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, 2011, 469(7331): 498-503
- [61] Edgar RS, Green EW, Zhao YW, et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*, 2012, 485(7399): 459-64
- [62] Zhou M, Wang W, Karapetyan S, et al. Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. *Nature*, 2015, 523(7561): 472-6
- [63] Lipton JO, Yuan ED, Boyle LM, et al. The circadian protein BMAL1 regulates translation in response to S6K1-mediated phosphorylation. *Cell*, 2015, 161(5): 1138-51
- [64] Liu Z, Huang M, Wu X, et al. PER1 phosphorylation specifies feeding rhythm in mice. *Cell Rep*, 2014, 7(5): 1509-20
- [65] Wehr TA, Turner EH, Shimada JM, et al. Treatment of rapidly cycling bipolar patient by using extended bed rest and darkness to stabilize the timing and duration of sleep. *Biol Psychiatry*, 1998, 43(11): 822-8
- [66] Ikeda Y, Kumagai H, Skach A, et al. Modulation of circadian glucocorticoid oscillation via adrenal opioid-CXCR7 signaling alters emotional behavior. *Cell*, 2013, 155(6): 1323-36
- [67] Lim C, Allada R. ATAXIN-2 activates PERIOD translation to sustain circadian rhythms in *Drosophila*. *Science*, 2013, 340(6134): 875-9
- [68] Zhang Y, Ling J, Yuan C, et al. A role for *Drosophila* ATX2 in activation of PER translation and circadian behavior. *Science*, 2013, 340(6134): 879-82
- [69] Velazquez-Perez L, Voss U, Rodríguez-Labrada R, et al. Sleep disorders in spinocerebellar ataxia type 2 patients. *Neurodegener Dis*, 2011, 8(6): 447-54