



中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心 (神经科学研究所)

Institute of Neuroscience Chinese Academy of Sciences



当前位置: 首页 > 新闻 > 科研进展

>2020年

活体单细胞成像揭示生物钟的发育过程

发布时间: 2020-03-14

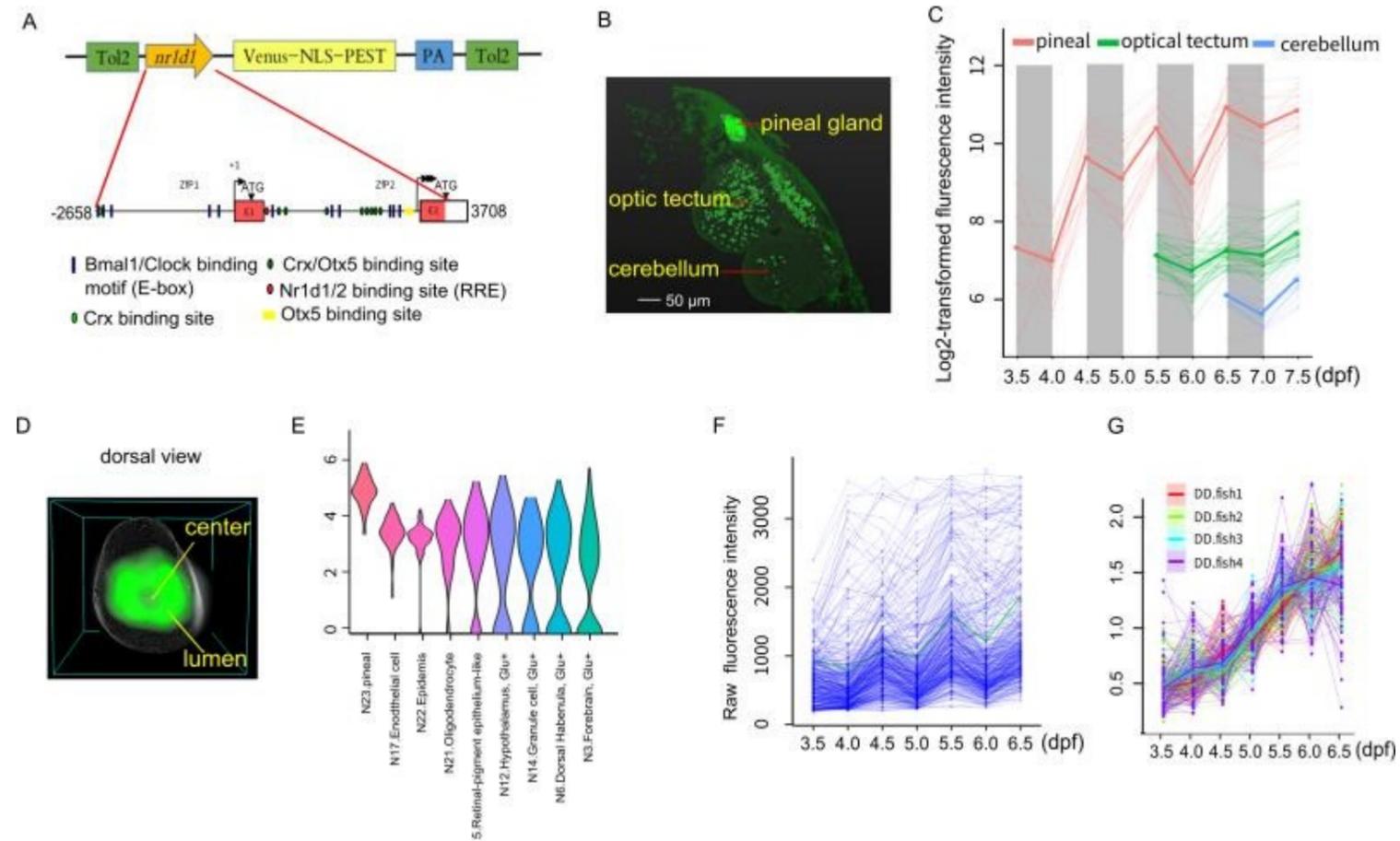
2020年3月14日,《PLOS Biology》期刊在线发表了题为《斑马鱼生物钟的活体单细胞成像》的研究论文。该研究由中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(神经科学研究所)、上海脑科学与类脑研究中心、神经科学国家重点实验室严军研究组、何杰研究组与安徽医科大学附属第一医院的李元海教授合作完成。该研究成功构建了可以活体实时观测斑马鱼单细胞节律的报告基因系统,并利用该系统研究了单细胞水平的生物钟在发育过程中是如何建立的,进而发现光照在斑马鱼的单细胞生物钟发育中的重要作用。

从单细胞生物到人,二十四小时昼夜节律(circadian rhythm)是极为普遍的生物学现象。生物的生理过程和行为通过生物节律与外界二十四小时光照周期同步。在分子水平上,脊椎动物的昼夜节律主要是由核心钟基因构成的转录/翻译反馈回路产生的。在组织和器官水平上,昼夜节律由核心钟和周边组织的钟组成。核心钟被普遍认为位于哺乳动物的SCN或斑马鱼的松果体,接受光信号的输入,然后通过神经递质或激素等把节律信号传递到周边组织。在成年动物体内,绝大部分细胞都能在核心钟的指挥下自主地产生节律基因的振荡。然而,有研究表明在胚胎干细胞中,节律基因的振荡是缺失的。这说明生物钟的振荡是在发育过程中逐渐建立的,但是目前尚不清楚单个细胞的钟是如何在发育过程中建立的。斑马鱼体外受精且全身透明,非常利于活体成像研究,因此被广泛用于动物发育研究中。很多研究表明光照对斑马鱼幼鱼的生物钟发育起着非常重要的作用。但是,外界光刺激到底是启动了细胞内的节律振荡,还是仅仅同步了各细胞内已经存在的振荡,一直存在着争议。这些问题只能通过单细胞生物钟报告基因的活体成像解决。

该研究利用转基因技术第一次成功构建了可以活体实时观测单细胞节律的斑马鱼模型(*nr1d1:VNP*) (图A)。他们使用双光子显微镜对该荧光鱼系进行了单细胞水平的发育时间点成像。在全脑水平,发现*nr1d1:VNP*报告基因的表达从松果体中的感光细胞开始,然后扩散到其它大脑区域(视顶盖和小脑等)的细胞中(图B,C)。通过对斑马鱼中*nr1d1:VNP*阳性细胞的3D重构,他们发现*nr1d1:VNP*阳性细胞主要分布在松果体腔周围,而在中部则密度较低(图D),同时使用单细胞RNA-seq技术锁定了大脑中表达*nr1d1:VNP*细胞的分子类型(图E)。通过对松果体进行更高分辨率的成像,他们发现大部分的*nr1d1:VNP*阳性细胞的表达都呈现昼夜节律振荡叠加在发育趋势上的特征(图F)。最为有趣的是,在光/暗(LD)周期下,不同细胞的*nr1d1:VNP*表达显示出同步的昼夜节律振荡。然而,在光刺激缺失的全暗(DD)环境下,细部中的*nr1d1:VNP*昼夜节律表达被显著抑制,但其随发育上升的趋势不受影响(图G)。这些研究结果表明,发育早期光刺激是启动核心钟细胞内的24小时周期节律振荡的重要开关。

在这项工作中,研究者首次实现了在单细胞水平下监测斑马鱼幼鱼中昼夜节律基因的表达,揭示了细胞中的昼夜节律在发育过程中是如何被逐步建立起来的。这种新的*nr1d1:VNP*节律报告鱼系在昼夜节律研究中将有广泛的应用,比如可以用于研究昼夜节律与体内细胞周期之间的关系、可以对昼夜节律进行细胞型特异性成像、用于筛选影响昼夜节律和睡眠的药物等等。

该项工作由严军组高级工程师王海芳、中国福利会国际和平妇幼保健院的杨泽勇博士与安徽医科大学附属第一医院的李星星在严军研究员、何杰研究员以及李元海教授的共同指导下完成。严军研究组博士后黄登峰，何杰课题组喻曙光也做了重要贡献。本工作得到国家自然科学基金青年项目、上海自然科学基金、国家自然科学基金面上项目，以及国家自然科学基金中以合作项目的支持。



图注: 单细胞水平揭示斑马鱼全脑细胞昼夜节律发育的过程。(A) 不稳定荧光蛋白报告基因 (nr1d1:VNP) 斑马鱼模型的构建; (B) 双光子显微镜下观察nr1d1:VNP在斑马鱼幼鱼脑内的表达; (C) 不同脑区内nr1d1:VNP阳性细胞的荧光报告基因随斑马鱼发育的动态表达; (D) nr1d1:VNP阳性细胞在斑马鱼脑内的3D细胞密度分布; (E) 利用单细胞RNA-seq分析对脑中nr1d1:VNP阳性的细胞进行分类; (F) 松果体内的细胞nr1d1:VNP的表达呈现节律振荡叠加在发育趋势上的特征; (G) 在全暗环境下松果体细胞内nr1d1:VNP节律性振荡被显著抑制, 但随发育上升的趋势不受影响。