

# 光照对大鼠外周血淋巴细胞生物钟相关基因表达的影响

杜玉珍 高锋 童建

**【摘要】目的** 探讨光照对机体外周血淋巴细胞钟基因 clock 及褪黑素膜受体基因(mt1 和 mt2)表达的影响,为生物钟应用于临床提供基础依据。**方法** 将 100 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 2 组,分别在全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下饲养。6 周后用活动度测定仪筛选昼夜节律表现比较一致的大鼠,每组 36 只,再根据不同检测时间点随机分 6 个亚组,每个亚组 6 只,继续于相应光照条件下(全黑暗和光照黑暗交替)饲养 1 周后,收集外周血淋巴细胞。用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测生物钟相关基因 clock、mt1 和 mt2 的变化,用余弦软件进行节律特征分析,并比较在两种光照条件下基因表达的节律变化。**结果** 在全黑暗光制下,clock、mt1 和 mt2 均呈节律性表达,其峰值相位分别位于 CT7、CT9 和 CT11;在光照-黑暗交替(12:12)光制下,各基因表达的节律特征发生了变化,峰值相位分别为 ZT21、ZT8 和 ZT6。在不同光制下,基因表达的强度和振幅有所不同。**结论** 光照能影响外周血淋巴细胞钟基因 clock 及相关基因的表达,光照可能通过 clock 对 mt1 和 mt2 的表达节律起调节作用。

**【关键词】** 生物钟; 外周血淋巴细胞; 钟基因; 褪黑素膜受体

**Effects of light on the expression patterns of circadian clock-related genes in the peripheral lymphocytes** DU Yu-zhen\*, GAO Feng, TONG Jian. \*Clinical Laboratory, The Sixth Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

**【Abstract】Objective** To explore the effects of light on the expression patterns of clock and clock-related genes in peripheral lymphocytes. To develop basic knowledge needed for clinical application of the circadian clock. **Methods** One hundred Sprague-Dawley rats were housed under constant dark (DD) or normal light-dark (LD 12:12) conditions for six weeks. Peripheral lymphocytes were collected at different time points. The expression level of the clock gene and melatonin receptor genes mt1 and mt2 were detected using semi-quantitative RT-PCR. The data were analyzed with cosine software. **Results** Circadian expression of the genes was observed in both groups, but the peak phase, amplitude and strength of expression of each gene differed with the light conditions. **Conclusion** Light influences the expression of clock and clock-related genes in rats' peripheral lymphocytes. The clock gene might play an important role in regulating the expression of mt1 and mt2.

**【Key words】** Circadian clock; Peripheral lymphocytes; Clock gene; Melatonin receptors

从哺乳动物到细菌的大多数生物体在生理、生化和行为水平上都具有以 24 h 为周期的振荡规律,即昼夜节律。它是生物界普遍存在的一种节律,例如睡眠-觉醒更替、体温的波动、激素水平的涨落、识别和记忆能力等都呈昼夜变化。发生昼夜节律的结构基础是分子计时器,简称生物钟。哺乳动物的生物钟中枢定位于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nuclei, SCN)和松果体,这两个核团之间通过神经信号和体液信使相联系。昼夜节律的破坏将导致疾病发生,如时差综合征、抑郁症、阿尔茨海默病(Alzheimer disease)等。近年的研究认为,生物钟紊乱还与糖尿病、乳腺癌、结肠

癌等相关<sup>[1]</sup>。生物钟运行的分子机制为一系列基因及其蛋白产物组成的自我调节转录-翻译反馈环。其中,clock 基因是该反馈环得以维持以及节律输出的重要元件<sup>[2]</sup>。褪黑素(melatonin, Mel)是由松果体分泌的一种时间生物学激素,以组织细胞间化学信使的形式,对 SCN 和外周的生理节律进行昼夜动态调节,其生物学效应主要通过受体起作用。环境信号(光照等)能影响生物钟的运行。

本研究以模拟自然光光照和全黑暗光照条件下饲养的大鼠外周血淋巴细胞为研究对象,比较钟基因 clock、褪黑素膜受体(melatonin membrane receptor)基因 mt1 和 mt2 表达水平的变化,探讨光照对外周血淋巴细胞生物钟相关基因的影响,为生物钟运用于临床提供基础依据。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.06.009

作者单位:200233 上海,上海交通大学附属第六人民医院检验科(杜玉珍、高锋);江苏省苏州大学放射医学与公共卫生学院卫生毒理教研室(童建)

## 材料与方法

### 一、仪器和试剂

仪器:美国产 PTC-100TM 型(MJ Research, Inc)热循环仪;德国产低温高速离心机(Eppendorf Centrifuge 5417C/R);自制红外线昼夜活动度测定仪。

试剂:焦碳酸二乙酯(DEPC)购自美国 Amresco 公司, M-MuLV 反转录酶购自美国 MBI 公司, Trizole、Oligo dT(36)、dNTP、Taq 酶、琼脂糖购自生工生物试剂公司(Sangon), 淋巴细胞分离液 Ficoll 购自华美试剂公司, 其它试剂均为分析纯级。

### 二、动物分组及饲养

健康的雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠由苏州医学院动物中心提供,共 100 只,随机分 2 组,每组 50 只,分别在全黑暗(全黑暗组)和光照-黑暗交替(交替组)条件下饲养,自由饮水进食,动物房室温维持在(25 ± 2)℃。

光照-黑暗交替时间比为 12:12,即 12 h 光照(光照期 6:00 ~ 18:00)与 12 h 黑暗(黑暗期 18:00 ~ 6:00)交替。光照期光源采用白织灯,置于鼠笼中央,光强度为 250 ~ 350 Lx;黑暗期操作时以手电筒加红色滤光片作红光光源,强度为 10 ~ 15 Lx。将交替组的自然时间转换为授时时间(zeitgeber time, ZT),以光照起点时间作为 ZT0。全黑暗组的昼夜节律时间(circadian time, CT)以外界自然光照起点作为 CT0。1 日中的 24 个时间点依次表述为 ZT/CT1, 2, 3, ……24。

### 三、样品采集

大鼠在上述光照条件下饲养至少 6 周后,用红外线昼夜活动度测定仪监测,筛选活动度的强度和频度比较一致的大鼠为进一步的实验研究对象。每组筛选 36 只,再根据不同检测时间点(ZT/CT2, 6, 10, 14, 18 和 22)随机分成 6 个亚组,每亚组 6 只。

取不同昼夜时点,每间隔 4 h 心脏采血 1 组动物。

于各相应时间点用乙醚麻醉大鼠后,心脏采血 2 ml;肝素抗凝,用 Ficoll 分离单个核细胞,磷酸盐缓冲液(1:4)洗 2 遍;取 5 × 10<sup>6</sup> 个单个核细胞,冻存于 -80℃ 下备用。

### 四、总 RNA 提取和 cDNA 合成

按 Trizole 试剂说明书进行:提取的 RNA 用紫外分光光度计,在波长为 260 nm 和 280 nm 下测定光密度(optical density, OD)值,并计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值。比值大于 1.7 的样品,用 0.01% DEPC 稀释至浓度为 1 μg/μl 后,按 M-MuLV 反转录酶试剂说明书进行 cDNA 反转录合成。

五、半定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

在半定量 PCR 中所用引物序列见表 1。

1. clock 基因 PCR 反应条件:PCR 反应体积为 50 μl,体系中含 dNTP(100 μmol/L)、clock 引物(各 0.7 μmol/L)、组蛋白 3.3(histone 3.3, H3.3)引物(各 0.3 μmol/L)、MgCl<sub>2</sub>(1.2 mmol/L)、缓冲液(10 × 5 μl)、模板 3.5 μl 以及 2.5 U Taq 酶。热循环条件为:94℃ 下 1 min, 55℃ 下 1 min, 72℃ 下 2 min, 共 35 个循环,最后在 72℃ 下作用 8 min。

2. mt1 基因 PCR 反应条件:反应总体积为 50 μl,体系中含 dNTP(100 μmol/L)、mt1 引物(各 0.5 μmol/L)、H3.3 引物(各 0.5 μmol/L)、MgCl<sub>2</sub>(1.5 mmol/L)、缓冲液(10 × 5 μl)、模板 5 μl 以及 2.5 U Taq 酶。热循环条件为:94℃ 下 1 min, 55℃ 下 1 min, 72℃ 下 2 min, 共 35 个循环,最后在 72℃ 下作用 8 min。

3. mt2 基因 PCR 反应条件:反应总体积为 50 μl,体系中含 dNTP(100 μmol/L)、mt2 引物(各 0.5 μmol/L)、H3.3 引物(各 0.3 μmol/L)、MgCl<sub>2</sub>(0.8 mmol/L)、缓冲液(10 × 5 μl)、模板 3 μl 以及 2.5 U Taq 酶。热循环条件为:94℃ 下 1 min, 56℃ 下 1 min, 72℃ 下 2 min, 共 35 个循环,最后在 72℃ 下作用 8 min。

表 1 在半定量 PCR 中使用的各基因引物序列

基因	引物序列	长度
clock	Forward 5'-TCA CCA CGT TCA CTC AGG ACA-3'	375 bp
	Reverse 5'-AAG GAT TCC CAT GGA GCA A-3'	
mt1	Forward 5'-GTG CTA CGT GTT CCT GAT ATG G-3'	360 bp
	Reverse 5'-GGA TCT GAG GCC ACA ATA AGA C-3'	
mt2	Forward 5'-ATC TGT CAC AGT GCG ACC TAC C-3'	292 bp
	Reverse 5'-TTC TCT CAG CCT TTG CCT TC-3'	
H3.3	Forward 5'-GCG TGC TAG CTG GAT GTC TT-3'	230 bp
	Reverse 5'-CCA CTG AAC TTC TGA TTC GC-3'	

PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳后,经溴乙锭染色,用凝胶成像系统记录结果,最后以 Quantityone 软件分析结果,根据目的基因与内对照基因的辉度比值进行相对定量。

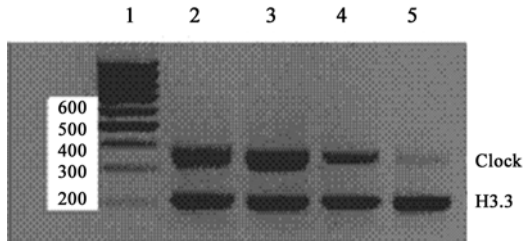
### 六、统计学分析

用余弦分析软件对结果进行分析,并通过振幅检验(F 检验)确定是否存在昼夜节律<sup>[3]</sup>。按照余弦方程进行拟合: $F(t) = M + A \cos(\omega t + \varphi)$ ,式中  $M$  为中值,即涨落变化的中线; $A$  为节律振荡的振幅,表示上下波动幅度; $\varphi$  为峰值相位,即振荡到达顶峰的时刻,可根据  $\omega$  角速度(360°/24 h)将其换算成为昼夜时点。

## 结 果

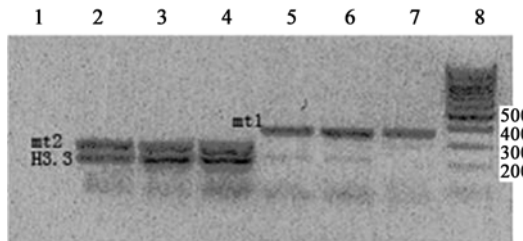
### 一、PCR 扩增电泳结果

根据标准分子标记判断, clock、mt1、mt2、H3.3 扩增片段大小均与设计一致(图 1 和 2)。用 Quantityone 软件测定各条带的辉度, 将各泳道的目的基因辉度与内参基因辉度的比值作为定量依据。



注:泳道 1 为 DNA 分子标准;泳道 2~5 为不同样本的 clock 及内参基因 H3.3 的电泳结果

图 1 clock 基因及内参基因 H3.3 的电泳条带图



注:泳道 1 为空白试剂;泳道 2~4 为 mt1 的电泳结果;泳道 5~7 为 mt2 的电泳结果;泳道 8 为 DNA 分子标准

图 2 mt1、mt2 基因及内参基因 H3.3 的电泳条带图

### 二、各基因表达丰度的余弦分析

在全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下,对淋巴细胞 clock、mt1 和 mt2 基因不同时点的 mRNA 丰度进行余弦分析,结果见表 2~4。按余弦参数分别绘制拟合的昼夜节律曲线,见图 3~5。

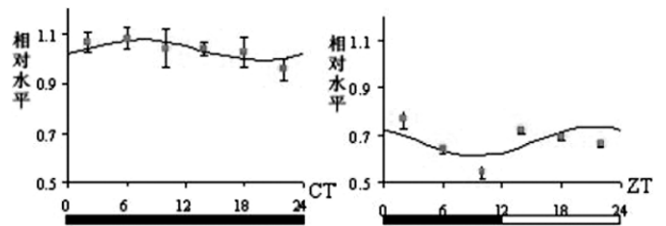
1. clock mRNA 的表达节律:由表 2 和图 3 可见,在全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下,外周血淋巴细胞中 clock 基因的表达均具有昼夜节律性,峰值相位分别处于 CT7 和 ZT21;在全黑暗条件下, clock 的 mRNA 相对水平较高,但振幅略低。

2. mt1 mRNA 的表达节律:由表 3 和图 4 可见,在全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下,外周血淋巴细胞中 mt1 基因的表达均具有昼夜节律性,峰值相位分别处于 CT9 和 ZT8;在光照-黑暗交替(12:12)条件下 mt1 的 mRNA 相对水平的振幅明显高于全黑暗条件下近 4 倍。

表 2 2 组 clock mRNA 表达的昼夜节律参数比较

组别	n	峰值相位	振幅	中值
全黑暗组	36	-111.60	0.04155	1.0348 ± 0.0309
交替组	36	-320.27	0.06230 <sup>a</sup>	0.6743 ± 0.0287

注:与全黑暗组比较,<sup>a</sup>P < 0.05



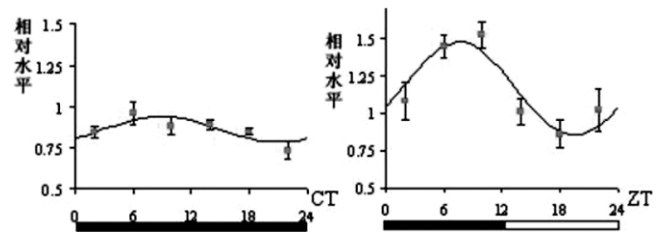
注:横轴下方的黑(黑暗)白(光照)棒表示光照情况

图 3 全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下 clock mRNA 的昼夜节律曲线图

表 3 2 组 mt1 mRNA 表达的昼夜节律参数

组别	n	峰值相位	振幅	中值
全黑暗组	36	-134.52	0.07798	0.8601 ± 0.0420
交替组	36	-113.62	0.31480 <sup>a</sup>	1.1622 ± 0.2239

注:与全黑暗组比较,<sup>a</sup>P < 0.05



注:横轴下方的黑(黑暗)白(光照)棒表示光照情况

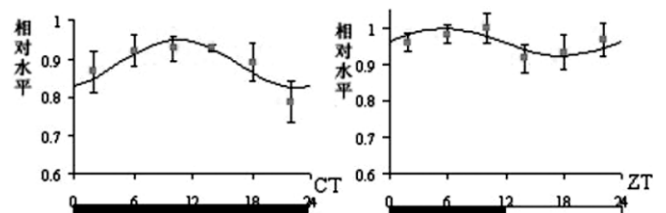
图 4 全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下 mt1 mRNA 的昼夜节律曲线图

3. mt2 mRNA 的表达节律:由表 4 和图 5 可见,在全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下,外周血淋巴细胞中 mt2 基因的表达均具有昼夜节律性,峰值相位分别处于 CT11 和 ZT6。在光照-黑暗交替(12:12)条件下 mt2 的 mRNA 相对水平略高于全黑暗条件下的表达水平,但振幅明显低于全黑暗条件,只有全黑暗条件下的 1/2。

表 4 2 组 mt2 mRNA 表达的昼夜节律参数

组别	n	峰值相位	振幅	中值
全黑暗组	36	-158.17	0.06235	0.8864 ± 0.0263
交替组	36	-85.13	0.03708 <sup>a</sup>	0.9606 ± 0.0441

注:与全黑暗组比较,<sup>a</sup>P < 0.05



注:横轴下方的黑(黑暗)白(光照)棒表示光照情况

图 5 全黑暗和光照-黑暗交替(12:12)条件下 mt2 mRNA 的昼夜节律曲线图

## 讨 论

clock 基因是转录-翻译分子反馈环的重要元件,同时还是作用于生物钟下游基因 E-box 的转录因子,因此在分子生物钟的研究中具有十分重要的意义。褪黑素是由松果体在光照-黑暗交替过程中的黑暗期合成和分泌的激素。褪黑素的合成分泌节律是昼夜节律生物钟输出的重要激素信号,其主要通过膜受体途径发挥功能,已克隆和鉴定的膜受体有 mt1 (Mel 1a) 和 mt2 (Mel 1b) 亚型<sup>[4]</sup>。

本研究发现, clock 基因在全黑暗和光照-黑暗交替条件下均具昼夜节律性表达,这说明 clock 基因的节律性表达是内源性的,而不是环境光照信号诱导的结果。但在两种光制条件下, clock 基因表达的峰值相位不一样,同时表达的水平 and 振幅也不尽相同,提示光照对外周血淋巴细胞 clock 基因表达有一定的调节作用。通过对褪黑素膜受体基因 mt1、mt2 的测定,发现这两个亚型在外周血淋巴细胞中均有昼夜节律性的表达。mt1 的表达在全黑暗和光照-黑暗交替光制下,峰值相位十分接近,但其表达水平在光照-黑暗交替光制下的波动幅度明显大于在全黑暗条件下。mt2 的表达在全黑暗和光照-黑暗交替光制下的峰值相位差较大,在全黑暗光制下的振幅高于光照-黑暗交替光制下。这些差别可能与 mt1 和 mt2 的信号转导机制和功能方面的不同有关。

在全黑暗条件下, clock、mt1 和 mt2 的峰值相位分别为 CT7、CT9 和 CT11,提示昼夜节律信号的传递顺序为 clock→mt1→mt2。我们比较模拟自然光照条件下(12:12)与全黑暗内源条件下各基因昼夜表达的变化,发现 clock 的峰值相位、振幅以及平均表达水平都有较大的变化,而 mt1 和 mt2 则只有振幅或峰值相位的明显变化。因此认为 mt1 和 mt2 的表达可能受

clock 表达规律变化的影响。

生物节律受各种外界环境因素的影响,而光照是最重要的影响因素。clock 基因是昼夜节律分子振荡器的核心元件之一,直接作用于 E-box 而启动下游基因的转录。所以当 clock 的表达因光照发生改变时,可直接影响下游基因的转录,进而影响机体的生物学效应。褪黑素膜受体是褪黑素发挥效应的重要因素,在许多疾病如缺血性脑卒中及老年性痴呆患者中,都可检测到异常褪黑素膜受体的昼夜表达。阿尔茨海默病则是昼夜节律紊乱性疾病,20 世纪 90 年代曾采用光照疗法改善患者的症状;近年的研究发现,该病患者 SCN 中的钟控基因——血管升压素 mRNA 的表达比正常人低 3 倍,并且无明显昼夜节律<sup>[5]</sup>。本研究结果可为昼夜节律紊乱性疾病的机制探讨以及光照在此类疾病中的治疗作用提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Ishida N. Circadian clock, cancer and lipid metabolism. *Neurosci Res*, 2007, 57:483-490.
- [2] Jin X, Shearman LP, Weaver DR, et al. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 1999, 96:57-68.
- [3] Teicher MH, Barber NI. COSIFIT: an interactive program for simultaneous multioscillator cosinor analysis of time-series data. *Comput Biomed Res*, 1990, 23: 283-295.
- [4] Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, et al. Melatonin. *Curr Med Chem*, 1999, 6:501-518.
- [5] Liu RY, Zhou JN, Hoogendijk WJ, et al. Decreased vasopressin gene expression in the biological clock of Alzheimer disease patients with and without depression. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000, 59:314-322.

(收稿日期:2008-10-19)

(本文编辑:吴倩)

· 消息 ·

## 中国康复医学会第十二次全国脑血管病康复学术会议通知

中国康复医学会脑血管病康复专业委员会拟于 2009 年 10 月 23 日至 26 日在浙江省温州市召开第十二次脑血管病康复学术会议。会议由中国康复医学会脑血管病康复专业委员会主办,温州医学院附属第二医院、温州市中医院承办,浙江省康复医学会协办。本次学术大会是脑血管病康复领域的一次高水平学术盛会,邀请国内著名康复医学专家和神经病学专家作专题报告,对于了解国内外康复医学最新进展,学习国内外先进的脑血管病康复及神经病学理念、知识是一次极好的机会。欢迎广大从事康复医学、神经病学的同仁参加会议。参会者可获得国家级继续教育 I 类学分。

**会议主题** 强化卒中临床治疗与康复的结合,提高卒中患者生存质量。**征文内容** 卒中及其康复的基础与临床研究;康复评定方法和治疗技术;卒中单元及团队工作方式;社区康复;认知和精神心理障碍康复;康复工程;中国传统医学康复;神经康复及其他。**投稿要求** 未曾在全国性学术会议或全国性公开刊物上发表过的论文、综述等,文责自负。论文文稿内容包括题目、作者、800 字以内的中文摘要(目的、材料和方法、结果和结论)及正文等。请注明作者姓名、单位名称、职务/职称、通讯地址及邮编、E-mail 等。本次会议只接受 E-mail 投稿,来稿请寄:lmj512@163.com, wangxt66@gmail.com。截稿日期为 2009 年 9 月 30 日。**会议联络** E-mail:lmj512@163.com, wangxt66@gmail.com;电话:0577-88816734, 0577-88816191;传真:0577-88816191。注册方法请详见本刊网站。

中国康复医学会脑血管病康复专业委员会