



体外培养细胞生物节律研究进展

肖 邦, 崔淑芳

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

【摘要】 所有的生物体都存在着调节自身生命活动的生物钟, 而使得生命体的各种活动得以有规律的进行。例如, 机体内的许多生理活动过程(睡眠-觉醒循环、温度、心率、血压、内分泌、肾脏的活动、肝脏的代谢活动)都受到昼夜节律的调节, 即都在昼夜节律起搏器的控制之下。体外培养的机体组织和细胞的生理活动同样具有生物节律特征。本文对体外培养细胞生物钟进行了简要的概述, 分析了神经元和外周组织细胞生物钟的分子机制以及存在的问题, 为全面阐释生物钟的分子机制提供参考。

【关键词】 体外培养细胞; 生物节律; 研究进展

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0061-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 011. 013

Research progress of biological rhythm of cell cultured in vitro

XIAO Bang, CUI Shu-fang

(Laboratory animal centre of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 All organisms regulate their life activities through the biological clock, which makes a variety of activities regular. For example, many physiological activities such as sleep-wake cycle, temperature, heart rate, blood pressure, endocrine and metabolic activity of the kidney and liver are subject to the regulation of circadian rhythms, that is to say they are all under the control of circadian pacemaker. Physiological activity of cell cultured in vitro also possess rhythms. This paper conducts a brief overview of biological clock of cell cultured in vitro and analyzes the molecular mechanism of the biological clock of the neurons and peripheral tissue cell as well as the existing problems, which provide reference for comprehensive interpretation of the molecular mechanism of biological clock.

【Key words】 Cell cultured in vitro; Biological rhythms; Research progress

1 生物节律概述

1.1 生物钟的组成

生物节律是指机体的活动随时间的变化所表现出来的规律, 主要有日节律、月节律、年节律等。其中, 我们平时所说的节律一般是日节律又称昼夜节律。节律生物钟由三部分组成: 校准时间的输入途径、产生节律信号的中央振荡器、影响生理及行

为节律的输出途径。在大部分的生物体, 包括哺乳动物, 光周期是起节律诱导作用的最主要环境因素。视网膜的光感受器细胞感知的光信号通过一条被称为视网膜下丘脑的路径传递给视交叉上核(SCN)的神经元。SCN 内含有哺乳动物最主要的振荡器起搏点。

除了 SCN 的中枢起搏器外, 其它外周组织诸如心脏、肝、肾、胚胎组织和孤立的细胞中内在振荡器

【基金项目】 上海市科技发展基金项目(12140900200)。

【作者简介】 肖邦(1989-), 男, 硕士生, 专业: 动物学。Email: xiaobangjinli@163.com。

【通讯作者】 崔淑芳(1969-), 女, 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型的研制。Email: youngstar_sf@163.com。

在也相继被发现^[1-2],由此认为自主节律生物钟在机体的每个细胞中都存在。科学家构建生物钟基因(*PERIOD2*)与荧光素酶融合蛋白(*PERIOD2::LUC*)来研究小鼠生物节律的动力学特征发现,外周组织在离体的情况下具有保持节律震荡超过 20 个循环的能力。并且,外周器官在生物节律的周期长度和时相上具有组织特异性^[3]。

1.2 生物钟的分子机制

无论是中枢生物钟还是外周生物钟,振荡器是其最为关键的部分,它是由一组呈近日节律表达的基因(*CLOCK*、*BMAL1*、*PER*、*CRY*、*DEC* 等)及其编码的蛋白质(*CLOCK*、*BMAL1*、*PER*、*CRY*、*DEC* 等)组成。在这个振荡器中异二聚体转录因子 *CLOCK*-*BMAL1* 驱动 *PER* 和 *CRY* 的自身抑制因子 *PER* 和 *CRY* 蛋白的表达。*CLOCK*-*BMAL1* 的再活化发生在 *PER* 和 *CRY* 蛋白更新几个小时之后^[4]。进一步研究发现,TRAP150(甲状腺激素受体相关蛋白 150)是 *CLOCK*-*BMAL1* 的激活因子,其把 *CLOCK*-*BMAL1* 与靶基因启动子联系起来,可以促进 *CLOCK*-*BMAL1* 与靶基因的结合^[5]。Cao 等^[6]证明,机体通过 mTOR/4E-BP1 信号通路对 SCN 生物钟传输及同步化过程进行调控。科学家最新的研究发现,真核生物生物节律的保持存在转录调控循环之外的机制—氧化还原平衡节律^[7]。进一步的研究证实在生物进化的过程中过氧化物酶蛋白是保守的生物钟标志分子^[8]。

2 体外培养细胞的生物节律

2.1 视交叉上核神经元细胞生物节律

SCN 内含有哺乳动物最主要的振荡器起搏点,体外培养的 SCN 神经元的神经冲动发放频率同样保持节律性。研究人员通过微阵列法体外培养新生大鼠 SCN 神经元细胞发现,单个 SCN 神经元具有维持自主节律性震荡几天或几周的潜能;同时,可逆性地阻断神经元细胞的神经冲动发放 2.5 d 后,还具有节律性,而且阻断前后其生物节律的相位没有发生改变^[9]。另外,研究还发现一个培养单元中的神经元细胞尽管具有许多功能性的突触,但是每个神经元细胞表现出的节律性行为并不是同步的;进一步的研究显示,体外培养的 SCN 神经元细胞系(SCN2.2 细胞)不仅表现出生物钟基因(*PER*)表达的节律性而且其内源性的 2-脱氧葡萄糖摄取行为也同样具有节律性^[10]。

2.2 其他神经元细胞生物节律

除了 SCN 神经元细胞外,高等生物体的其他神经组织细胞(如视网膜细胞、松果体细胞)在体外培养的条件下同样表现出节律性的生理性活动(如褪黑色素分泌)。例如,仓鼠的视网膜及鸡的松果体细胞在体外培养的条件下,其分泌褪黑色素的活动具有昼夜节律性;在持续黑暗的条件下,褪黑色素至少可以持续 5 个 24 h 周期性释放^[11]。Leonardo 等^[12]选择 8 日龄鸡胚的原代视网膜细胞来研究细胞中黑素蛋白基因 *OPN4X*、*OPN4M*,生物钟基因 *CLOCK*、*PER2*,乙酰基转移酶的表达类型。结果发现,在持续黑暗(DD)条件下细胞中上述所检测基因的转录无节律性;而在 12 h 光照:12 h 黑暗(12 L:12 D)的条件下,*CLOCK*、*PER2*、*OPN4M*、乙酰基转移酶的转录具有节律性;并且对于松果体细胞,这种周期活动会随着光照周期的变化而发生相迁移,如在 12 L:12 D 光照周期下,提前或延迟光照 6 h 都会使细胞的褪黑色素释放节律发生相应的时相迁移。由此认为,体外培养细胞的光感受器可以介导细胞生物节律根据光周期的变化而发生相应的时相迁移^[13]。

2.3 成纤维细胞生物节律

体内无论是中枢 SCN 还是外周组织器官都有生物节律振荡器的存在,并且体外培养的神经元细胞依然保持着节律震荡的特性,后续研究证实体外培养的外周组织细胞同样也具有生物节律。研究人员在对大鼠成纤维细胞(rat-1 成纤维细胞)的研究中发现,血清休克可对 rat-1 成纤维细胞生物钟基因(*C-fos* 和 *Rper*)的表达造成短暂刺激,而且生物钟基因这种刺激性表达可以很好地模拟体内 SCN 光诱导生物钟基因的表达。另外还发现,体外 rat-1 成纤维细胞生物钟基因短暂的刺激性表达与体内肝脏生物钟基因的表达相类似^[14]。

2.4 干细胞生物节律

干细胞作为一种尚未分化的组织细胞,以其为模型研究生物钟随着细胞分化而发生变化对于了解生物钟的发生、发展具有特殊的应用意义。Inada 等^[15]的研究证实,原代分离的胚胎干细胞和来源于转基因小鼠(*Per2::Luc* 小鼠)胚胎的唾液腺细胞的生物钟基因表达节律性在体外培养的条件会随着胚胎的发育而发生改变;细胞的生物钟可以被重编程因子重新编程。另外, Tsinkalovsky 等^[16]也发现体外培养的造血干细胞生物钟基因的表达也会随

着细胞的分化而发生改变。在干细胞除了生物钟基因的表达会随着细胞分化而发生改变外,细胞的其他活动(如葡萄糖吸收)的节律特征也同样会发生改变。Paulose 等^[17]研究发现,未分化的干细胞表现出吸收葡萄糖的节律性而时钟基因的表达没有节律性;而干细胞分化后,在所检测的生物钟基因中部分时钟基因呈现节律性表达,并且细胞葡萄糖吸收的节律振幅幅度增强。

2.5 其他外周细胞生物节律

研究较多且成熟的体外培养细胞模型可以使我们对生物钟的了解更加深入,但是,却不够全面,对其他细胞模型的研究可以很好地解决这个问题。研究人员利用血清诱导两种不同来源(血小板来源、颈动脉来源)的血管平滑肌细胞(VSMCs)后发现,两种来源细胞的生物钟基因(*CRY1*, *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *PER3* 和 *REV-ERBA*)呈现明显的节律性表达。值得注意的是,*CLOCK* 在血小板来源的 VSMCs 中节律性表达,而在颈动脉来源的 VSMCs 中没有呈现节律性表达;并且与颈动脉来源的 VSMCs 相比,血小板来源的 VSMCs 中这些时钟基因(*CRY1*, *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *PER3* 和 *REV-ERBA*)的表达显著减弱^[18],这一结果提示不同种类或者来源的外周细胞维持生物节律的分子机制可能不同。

3 体外培养细胞生物节律的相关机制

3.1 体外培养神经元细胞生物节律的相关机制

3.1.1 神经元之间通过接触连接的方式来影响生物节律的维持

基于体外培养的细胞表现出令人惊奇的生物节律,科学家深入地探索了细胞维持其生物节律的分子机制。研究人员通过在神经元和神经胶质细胞中引入示踪分子(神经生物肽)以及采用对细胞缝隙连接分子—特异性连接蛋白进行免疫标记的方法来对体外培养的 SCN 细胞之间的缝隙连接在其生物节律产生中的作用进行评价。实验发现:星型胶质细胞相互之间通过连接蛋白广泛地连接,而神经元细胞之间以及神经元细胞与星型胶质细胞之间并没有缝隙连接的存在。这一结果支持了体外培养的 SCN 神经元细胞自主发放节律性神经冲动是单个细胞的节律性行为的假设^[19]。研究进一步证明,生物钟基因(*PER1*、*PER2* 和 *CRY1*)是维持 SCN 神经元细胞生物节律的必须基因,而另外的两个生物钟基因(*CRY2* 和 *PER3*)的失活仅仅引起了

细胞生物节律周期长度的改变^[20]。

3.1.2 神经元之间通过分泌多巴胺来影响生物节律的维持

神经递质多巴胺及其受体(*D1*、*D2*、*D4*、*D5* 受体)在神经元之间的联系过程中扮演着极其重要的角色。那么,神经递质多巴胺在神经元细胞生物钟的维持中是否同样也有其重要意义?为此,科学家进行了一系列相关研究。研究人员发现,加入到培养基的多巴胺、多巴胺受体激动剂或者抑制剂对在 33℃ 下培养了 24 h 的神经视网膜细胞的褪黑色素释放活动具有显著影响:浓度为 0.1 μmol/L 的多巴胺对视网膜细胞褪黑色素的释放没有抑制作用,而高浓度的(1 ~ 1000 μmol/L)多巴胺却可以以剂量依赖的方式抑制褪黑色素的释放。而且实验进一步证明,多巴胺的这种作用受多巴胺受体(*D2*/*D4* 受体)介导,*D2* 和 *D4* 受体激动剂(100 μmol/L)可抑制褪黑色素的释放,*D2*/*D4* 选择性受体拮抗剂(100 μmol/L)与多巴胺一起加入到培养基可以阻断多巴胺对褪黑色素释放的抑制作用。从而推断在哺乳动物视网膜细胞中多巴胺可能抑制其褪黑色素的释放,而且这种作用可能是由 *D2*/*D4* 多巴胺能受体介导^[21]。

3.1.3 功能性生物钟的同步化需要谷氨酸盐的诱导

影响细胞生物节律的神经递质除了多巴胺外,其他神经递质(例如谷氨酸盐)在细胞生物钟同步化的诱导过程中亦发挥重要作用。Leonardo 等^[12]证明,在持续黑暗(DD)条件下,谷氨酸盐能够诱导 *CLOCK* 基因的节律性表达,并可强烈地抑制黑素蛋白基因(*OPN4X*、*OPN4M*)的表达,而对生物钟基因(*PER2*)及乙酰基转移酶的转录并未产生影响。因此 Leonardo 推断功能性生物钟的同步化需要谷氨酸盐的诱导。以上的研究表明,神经元细胞之间通过分泌某些信号物质(例如多巴胺、谷氨酸盐)或者接触连接的方式来影响生物节律的维持。

3.1.4 其他影响神经元细胞生物节律的分子机制

目前,传统的神经元细胞生物节律产生及维持机制无法完全解释某些现象。因此,科学家们开始尝试从新的方向来阐明其他相关信号转导机制。Rodriguez 等^[22]近期研究发现,不同的生物钟调节性输入途径驱动相同的神经活动节律。另外,该小组还发现,相同的离子电流在不同的条件下扮演不同的角色,而不同的电流在相同的条件下也可以扮

演相同的角色。据此,Rodriguez 开创了一个研究生物钟机制及其功能调节的新方向。

3.2 体外培养外周组织细胞生物节律相关机制

3.2.1 体外培养成纤维细胞生物节律相关机制

3.2.1.1 神经元的可扩散信号影响成纤维细胞的代谢活动及 *per* 基因表达

与体内 SCN 神经元细胞相似,体外培养的神经元细胞同样具有分泌信号物质来控制外周组织细胞生物钟的功能。研究人员证实,体外培养的 SCN 神经元细胞系(SCN2.2 细胞)通过分泌可扩散信号物质(如多巴胺)使与其共培养的成纤维细胞(NIH/3T3 细胞)的代谢活动及 *PER* 基因表达产生节律性特征;NIH/3T3 细胞所获得节律的时相较 SCN2.2 细胞的节律晚 4 ~ 12 h,这和体内发现的 SCN 与外周组织之间的时相关系相似。而且 NIH/3T3 细胞生物节律的保持依赖于 SCN2.2 细胞持续的特异性信号输出;通过血清震荡来诱导产生生物节律的细胞不能驱动与其共培养的非处理细胞生物钟基因(*PER1* 和 *PER2*)的节律性表达。这表明 *PER*、*CRY* 的节律性表达不足以充当起搏器的角色。因此,SCN 神经元细胞特异性的信号输出对于驱动外周组织细胞生物节律是必须的^[10]。

3.2.1.2 成纤维细胞生物节律基因的表达需要周围细胞的旁分泌信号支持

神经元细胞的可扩散信号可以影响与其共培养的成纤维细胞的生物节律,另有研究证实,成纤维细胞生物钟基因的节律性表达同样需要周围非神经元细胞旁分泌信号的支持,而且这种旁分泌信号并不需要具有节律性。而且,周围其他表现出生物节律的节律性信号并不会对成纤维细胞的原有生物节律(周期和时相)产生影响^[23]。

3.2.1.3 细胞内环境可以对生物钟基因表达水平之间的差异进行补偿

在机体的几乎所有的细胞中,生物钟都是由生物钟基因的节律性转录环路来驱动的。Matsumura 等^[24]发现细胞特异性的内环境也会对生物钟产生影响。他们发现,生物钟基因表达时相相互之间的关系在外周组织是相似的,然而同一生物钟基因的表达水平在组织之间的差异却可达三倍之多。同时,他们还发现,使用不同浓度血清来培养成纤维细胞并不会对其生物钟基因的表达产生显著性的影响。据此可以推断细胞内环境(例如氧化还原反应潜能、代谢物的成分等)可以对生物钟基因表达

水平的差异进行定量的补偿。

3.2.1.4 功能性的 *CRY* 基因为成纤维细胞产生生物节律所必须

外来的信号是通过影响细胞固有的生物钟基因以及生物钟控制的相关基因来调节细胞生物节律的,只有阐明固有生物钟及其相关基因,才能真正认识其内在的分子机制。研究者采用来源于转基因小鼠(*CRY* 突变小鼠)的细胞(*CRY* 突变细胞系)以及野生型细胞对比研究体外培养成纤维细胞生物钟分子机制时发现,*CRY* 蛋白调控着细胞生物节律周期的时间长度,细胞如缺失功能性的 *CRY* 基因,则不能产生生物节律^[25],从而初步确定 *CRY* 是成纤维细胞的固有生物钟基因。

3.2.1.5 *BMAL1* 的 O 连接 N-乙酰葡萄糖胺糖基化调节 NIH3T3 成纤维细胞生物节律

虽然说环境信号及细胞内部代谢过程在协调和整合 24 h 的生物节律过程中发挥至关重要的作用,但是翻译后修饰在调节生物钟关键蛋白中也扮演着重要角色。Li 等^[26]发现,*BMAL1* 存在 O 连接 N-乙酰葡萄糖胺糖基化修饰,这种修饰可以使其稳定并且增强其的转录活性。而抑制 *BMAL1* O 连接 N-乙酰葡萄糖胺糖基化会导致生物钟基因节律性表达降低。基于 O 连接 N-乙酰葡萄糖胺糖基化作用对葡萄糖水平敏感,Li 认为此种修饰可能是连接机体代谢与生物节律的新机制。

3.2.1.6 组织特异性的 *PER1/2* 和 *DEC2* 的相互作用调节成纤维细胞生物节律

在动物体内,细胞生物钟基因突变而引发的表型变化可以被细胞间的偶联机制所掩盖,从而稳定细胞的生物节律。Tsang 等^[27]通过实验发现,成纤维细胞生物钟基因 *PER* 和 *DEC2* 相互作用的主要方式是协同作用;细胞在缺失 *PER2* 的情况下,*DEC2* 使其生物钟不稳定,并且这种作用具有组织特异性。同时敲除细胞的 *PER1* 和 *DEC2* 或 *PER2* 和 *DEC2* 发现其表现出生物节律的能力大大降低,从而得出 *DEC2* 与 *PER* 相互作用来稳定细胞生物节律周期的结论。

3.2.2 外周组织在细胞和组织的水平上存在着组织特异的节律震荡同步化因子

研究人员发现 SCN 中 *PER2* 基因的损伤并没有使外周组织的生物节律消失,而只是引起了动物体组织之间或者是个体之间的生物节律时相不一致。由此研究人员一致认为,外周组织具有自主保持生

物节律的震荡器,同时在细胞和组织的水平上存在着组织特异的节律震荡同步化因子^[3]。

3.2.3 细胞间的相互作用或者肿瘤样微环境影响肿瘤细胞生物节律

另外,基于前人在研究中的发现:富含肿瘤干细胞(CSCs)的C6神经胶质瘤的生物钟基因(如PER)的表达具有昼夜节律性,并且这些生物钟基因在缺乏所有生长因子的培养基条件下表达节律性特别的明显,Sharma等^[28]采用了一种鉴定单个CSCs的方法用于单个细胞节律性行为的分析。结果发现,单层培养的CSCs的Per蛋白的行为—细胞核内定位不具有节律性,所以他们推测细胞间的相互作用或者是肿瘤样微环境能使肿瘤细胞表现出节律性行为。

3.2.4 外周组织细胞生物节律的其他机制

不同的组织细胞通过合成和分泌不同的信号物质来执行不同的生物学功能,所以生物节律调节也会存在不同的信号机制。Bernat等^[29]发现神经性营养因子受体(P75^{NTR})可以改变时钟基因在成纤维细胞的震荡节律。而在另外一项外周破骨细胞的研究显示,糖皮质激素通过介导外周破骨细胞的生物节律而导致破骨细胞相关基因的节律性表达:糖皮质激素可以使体外培养的破骨细胞时钟基因和破骨相关基因的节律性表达明显同步化^[30]。Okamura等^[31]最近还发现抑制细胞生物钟基因的甲基化作用可以使小鼠胚胎成纤维细胞生物节律的周期延长。

尽管如此,人们对外周培养细胞生物节律产生及维持机制的了解也仅仅是在外周信号影响和调节以及少数相关基因以及他们的产物上,而对于信号物质是如何影响和调节细胞固有生物钟基因表达,特别是对其里面所包含的确切信号通路以及由通路构成的复杂网络机制,目前尚不清楚,并且组织特异时钟基因的表达也不尽相同。因此,对体外培养的细胞特别是外周组织细胞生物节律还需要更加深入、全面的研究。

4 展望

越来越多的研究表明,体外培养的无论是中枢神经细胞(SCN)还是周围组织的体细胞(包括癌细胞)都可以表现出明显的昼夜节律。而且随着各种类型细胞生物钟的不断发现,生物钟节律振荡的机制也在不断地被阐明。借助体外培养手段研究生

物钟的不断深入将会促进人们对机体内生物钟复杂机制有一个更新的了解,同时通过体内试验和体外试验的结合,生物钟的调控机制将会逐步被阐明。相信随着研究的不断深入,生物节律内在的分子机制终将会被完全揭示。

参考文献:

- [1] Storch KF, Lipan o, Leykin I, *et al.* Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart[J]. *Nature*, 2002, 417(6884): 78–83.
- [2] Kita Y, Shiozawa M, Jin W, *et al.* Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(1): 55–65.
- [3] Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, *et al.* PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(15): 5339–5346.
- [4] Rosbash M, Bradley S, Kadener S, *et al.* Transcriptional feedback and definition of the circadian pacemaker in *Drosophila* and animals[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2007, 72: 75–83.
- [5] Lande-Diner L, Boyault C, Kim JY, *et al.* A positive feedback loop links circadian clock factor CLOCK-BMAL1 to the basic transcriptional machinery[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(40): 16021–16026.
- [6] Cao R, Robinson B, Xu H, *et al.* Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling[J]. *Neuron*, 2013, 79(4): 712–724.
- [7] O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, *et al.* Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote[J]. *Nature*, 2011, 469(7331): 554–558.
- [8] Edgar RS, Green EW, Zhao Y, *et al.* Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms[J]. *Nature*, 2012, 485(7399): 459–464.
- [9] Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, *et al.* Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms[J]. *Neuron*, 1995, 14(4): 697–706.
- [10] Allen G, Rappe J, Earnest DJ, *et al.* Oscillating on borrowed time: diffusible signals from immortalized suprachiasmatic nucleus cells regulate circadian rhythmicity in cultured fibroblasts[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(20): 7937–7943.
- [11] Tosini G, Menaker M. Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, iguana iguana[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(3): 1105–1114.
- [12] Lima LH, Santos KP, Lauro AM. Castrucci, Clock genes, melanopsins, melatonin, and dopamine key enzymes and their modulation by light and glutamate in chicken embryonic retinal

- cells[J]. *Chronobiol Int*, 2011,28(2): 89–100.
- [13] Gwinner E, Hau M, Heigl S. Melatonin; generation and modulation of avian circadian rhythms [J]. *Brain Res Bull*, 1997,44(4): 439–44.
- [14] Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells[J]. *Cell*, 1998,93(6): 929–937.
- [15] Inada Y, Uchida H, Umemura Y, *et al.* Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos [J]. *FEBS Lett*, 2014,588(3): 459–465.
- [16] Tsinkalovsky O, Filipski E, Rosenlund B, *et al.* Circadian expression of clock genes in purified hematopoietic stem cells is developmentally regulated in mouse bone marrow [J]. *Exp Hematol*, 2006,34(9): 1249–1261.
- [17] Paulose JK, Rucker EB, Cassone VM. Toward the beginning of time: circadian rhythms in metabolism precede rhythms in clock gene expression in mouse embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2012,7(11): 49555.
- [18] Lin C, Tang X, Zhu Z, *et al.* The rhythmic expression of clock genes attenuated in human plaque-derived vascular smooth muscle cells[J]. *Lipids Health Dis*, 2014,13: 14.
- [19] Welsh DK, Reppert SM. Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus [J]. *Brain Res*, 1996,706(1): 30–36.
- [20] Liu AC, Welsh DK, Ko CH, *et al.* Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network [J]. *Cell*, 2007,129(3): 605–616.
- [21] Tosini G, Dirden JC. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina; in vitro evidence[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 286(2): 119–122.
- [22] Rodriguez JC, Blitz DM, Nusbaum MP. Convergent rhythm generation from divergent cellular mechanisms[J]. *J Neurosci*, 2013,33(46): 18047–18064.
- [23] Noguchi T, Wang LL, Welsh DK. Fibroblast PER2 circadian rhythmicity depends on cell density[J]. *J Biol Rhythms*, 2013, 28(3): 183–192.
- [24] Matsumura R, Okamoto A, Node K, *et al.* Compensation for intracellular environment in expression levels of mammalian circadian clock genes[J]. *Sci Rep*, 2014,4: 4032.
- [25] Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, *et al.* Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts [J]. *Science*, 2001,292(5515): 278–281.
- [26] Ma YT, Luo H, Guan WJ, *et al.* O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013,431(3): 382–387.
- [27] Tsang AH, Sánchez-Moreno C, Bode B, *et al.* Tissue-specific interaction of Per1/2 and Dec2 in the regulation of fibroblast circadian rhythms [J]. *J Biol Rhythms*, 2012,27(6): 478–489.
- [28] Sharma VP, Anderson NT, Geusz ME. Circadian properties of cancer stem cells in glioma cell cultures and tumorspheres [J]. *Cancer Lett*, 2014,345(1): 65–74.
- [29] Baeza-Raja B, Eckel-Mahan K, Zhang L, *et al.* p75 neurotrophin receptor is a clock gene that regulates oscillatory components of circadian and metabolic networks[J]. *J Neurosci*, 2013,33(25): 10221–10234.
- [30] Fujihara Y, Kondo H, Noguchi T, *et al.* Glucocorticoids mediate circadian timing in peripheral osteoclasts resulting in the circadian expression rhythm of osteoclast-related genes [J]. *Bone*, 2014,61: 1–9.
- [31] Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, *et al.* RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock[J]. *Cell*, 2013,155(4): 793–806.

[修回日期]2014-10-21