

小鼠转轮运动昼夜节律研究技术的建立

周 岚 曹济民

摘 要 目的 建立一种实时监测小鼠昼夜运动节律的技术。**方法** 将转轮装置及配套设备进行安装和调试,然后实时连续记录 C57BL/6J 小鼠的转轮运动,并通过计算小鼠转轮运动周期、诱导后相角、周期幅度以及运动活性等指标来分析小鼠的昼夜运动节律。**结果** 运用转轮装置可以准确地记录到小鼠昼夜运动节律。C57BL/6J 小鼠诱导后相角为 $(145^{\circ} \sim 170^{\circ}) \pm 6^{\circ}$,在持续黑暗(DD)环境下运动昼夜节律为 $23.5 \pm 0.3\text{h}$ 。结果还发现,这种昼夜运动活性在小鼠间有一定个体差异。分别在 CT(circadian time)14 和 CT22 给予 15min 光诱导,能引起小鼠运动节律分别向后及向前漂移。**结论** 这种转轮装置及分析方法是一种可靠、有效的研究小鼠昼夜运动节律的技术平台。

关键词 转轮运动 转轮装置 昼夜节律 生物钟 小鼠

Techniques for Measuring Mice Circadian Wheel Running Activities. Zhou Lan, Cao Jimin. Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To establish the techniques for recording the circadian wheel running activities in mice. **Methods** We gave an outline of the system setup and the factors necessary to measure mouse circadian rhythms, including choice of mouse strain, facilities and equipment design and construction, experimental design, high-throughput methods, and finally methods for data analysis. **Results** The phase angle of entrainment of C57BL/6J mice was $(145^{\circ} \sim 170^{\circ}) \pm 6^{\circ}$ and the free running period was $23.5 \pm 0.3\text{h}$. The average daily activity was calculated by the sum of the number of wheel revolutions divided by the total numbers of days. The light (100Lux) entrainment at CT14 and CT22 could reset the circadian rhythm. When applied at CT14, light exposure induced a phase-delay of the circadian rhythm of locomotor activity and a phase-advance at CT22. **Conclusion** The established circadian wheel running setup provides an sensitive and quantitative method for circadian rhythm study.

Key words Locomotor activity; Running wheel facilities; Biological clock; Mouse

昼夜节律(circadian rhythm)是生物体功能活动的基本特征之一,其中昼夜运动节律又是节律研究的重要方面。正常人体的昼夜节律由脑内的生物钟(biological clock)控制,该生物钟位于下丘脑的视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)^[1]。尽管昼夜节律起源于体内的生物钟,但环境变化对昼夜节律有明显的影响。光照刺激对昼夜节律的调整起着最重要的作用。光刺激在 24h 周期内的不同时间可使生物钟时相提前或推后。生物节律时相的提前或推后称为时相位移(phase shift),简称相移。当动物处于持续黑暗(constant darkness, DD)环境时,昼夜节律

仍然存在。但这种内源性节律在一定程度上已偏离 24h。这种现象称为“free running”。当这些动物再次暴露于自然的光照-黑暗(light-dark, LD)24h 节律时,内源性生物钟将重新调定,以适应这种以 24h 为周期的环境变化。这一现象称为“光对生物节律的调节效应”^[2]。在节律研究领域,探讨光及其他因素对动物行为节律的影响多通过转轮运动实验来完成。此外,当我们研究一些钟基因及钟控基因对行为节律的影响时,往往将相关基因敲除后进行转轮实验,来验证其对行为节律的影响。在 1994 年, Vitaterna 等首次通过转轮实验证明了 clock 基因敲除小鼠运动行为节律的改变^[3]。此后这一方法成为了运动行为节律研究的经典方法^[4~6]。我国在生物钟研究方面起步较晚,研究技术仍不普及。近几年来笔者实验室致力于行为节律研究,不断摸索转轮行为节律的研究方法,使这一技术逐渐趋于成熟。本文主要讲述了本实验室转轮装置的组成结构和安装方法,以及小鼠昼

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071072);科技部“973”课题(2011CB933504)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理和病理生理学系

通讯作者:曹济民,教授,电子信箱:caojimin@126.com

夜运动节律的检测及数据分析方法,希望该技术能促进我国生物钟研究的普及和发展。

材料与方法

1. 实验动物种系选择:用于转轮实验小鼠的种系选择非常重要。一般远系杂交的小鼠,自身昼夜运动周期会不断发生变化,这样的结果很难进行比较分析,也增加了假阳性结果的出现率。例如 BALB/CJ 小鼠昼夜运动周期变化就非常明显,不适合用于转轮实验^[7]。所以一般都选择纯系小鼠,例如 BTBR/J 和 C57BL/6J 小鼠。本实验选择 C57BL/6J 小鼠。

2. 转轮实验所需设备及安装方法:转轮实验主要装置如下:①一间配备空调、有遮光暗室功能的专用实验室;②转轮及放置转轮的有盖塑料小笼,转轮数量视仪器容量和研究规模而定,最高可达 240 套,同时观察 240 小鼠的活动;③可分别容纳转轮装置的密闭、通风、完全光控的小室;④计算机信

号收集系统,笔者实验室使用的是 MiniMitter 公司的转轮装置及记录系统。专用实验室内除进出门外,所有窗体都完全密闭不透光,室内配备红光灯。自制长 1.8m,宽 0.6m,高 0.65m 的木箱,箱体顶端安装由时控开关控制的日光灯(100lux),侧壁通过迂回通路接小型换气扇。右侧壁也装有同样的排气口。箱体内还放置温湿度仪。每一箱体可装 4 个转轮装置,每一转轮小盒内放置 1 只小鼠。转轮上装有磁感应器,小鼠每转 1 圈,就会将 1 个磁信号转换成电信号输送给 QA-4 数据输入装置。每 4 个转轮装置连接 1 个 QA-4 数据输入装置,再通过 C8 电缆与 DP-24 数据端口相连,每个 DP-24 有 6 个数据端口,这样的配置可同时观察 240 只小鼠的活动。DP-24 再通过 C50 电缆与电脑记录系统相连。软件是 Vital-View 数据采集系统。采集到的数据再运用 ActiView™ 数据分析系统进行统计分析(图 1)。

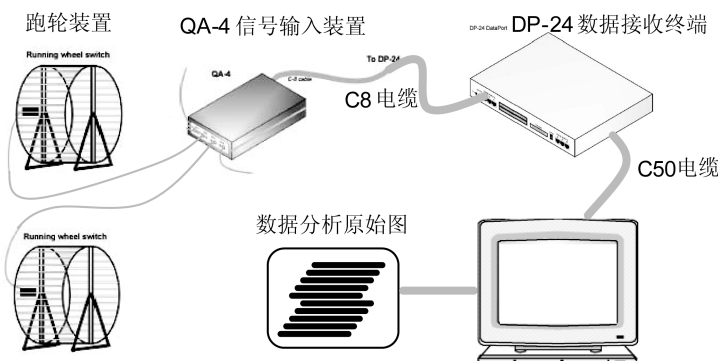


图 1 转轮行为节律记录系统连接方法

转轮装置连接 1 个 QA-4 信号输入装置,再与 DP-24 数据端口相连,每个 DP-24 有 6 个数据端口,DP-24 再与电脑记录系统相连。运用 VitalView 数据获得系统记录小鼠实时运动。采集到的数据再通过 ActiView™ 数据分析系统展示记录结果

3. 实验方案:选取 5~6 周龄的 C57BL/6J 小鼠作为实验对象,体重一般为 22~26g。每只小鼠分别饲养在装有转轮(直径 11.5cm)的塑料小笼(45cm×25cm×20cm)内。实验初首先给予 12h 光照、12h 黑暗[光照(L):黑暗(D)]=12:12|光照周期至少 1 周,当小鼠完全适应环境/运动节律趋于稳定后,再改为完全黑暗的(constant dark, DD)环境记录。在 DD 环境下,我们运用节律研究的专业名词“circadian time”(CT)来描述在全黑环境下生物钟时间,其中 CT0/24 代表白天的开始;CT6 相当于中午 12:00;CT12 代表运动的开始,相当于傍晚 18:00;CT18 相当于午夜 24:00。在 LD 环境下,我们用“zeitgeber time”(ZT)来描述在 LD 环境下的生物钟时间。CT0/24 代表开灯的时间,ZT12 代表关灯的时间。在 CT14 和 CT22 分别给予 15min 光照(100lux),记录其运动节律变化。整个实验过程中都供给足量的食物和饮水,定期清洁笼内粪便。

4. 数据分析:在实验的中途也可进行数据初步分析,以提前获取和判断生物节律变化趋势。一般在获取存储数据后,数据分析在另一台电脑上进行,目的是不干扰连续记录。当转轮实验完全结束后,可将所得数据拷贝出来,用另一台电脑

的分析软件进行最后具体分析,系统又可投入下一轮实验。我们主要通过 4 个指标衡量小鼠的昼夜运动节律:自由运动周期;诱导后的相角改变;周期幅度;每日运动活性。

自由运动周期(free running period)是通过全黑暗状态下相位变化计算得出。我们一般是通过 χ^2 周期图或线性回归分析来获得结果。这两种方法已被生物钟实验室广泛采用,用它来分析一些低水平的和不正常活性运动的出现。到目前为止,自由运动周期是衡量昼夜运动节律改变的最重要指标。诱导后的相角(phase angle of entrainment)反映了夜行动物活性运动开始与黑暗周期开始的不同步变化。分别对 LD 的最后 7 天和 DD 的开始 7 天活性运动开始点作线性回归分析,两条直线形成的角度称为诱导后的相角。当动物诱导后出现不正常的相角,说明光受体或 SCN 输入通路上的某些复合物有可能出现突变,昼夜钟基因自身出现突变也可能诱导相角改变。

昼夜振幅(circadian amplitude)就是用快速傅立叶变换分析法对昼夜运动高峰的频谱密度进行分析。它可以估计一些重要昼夜复合物的活性节律。昼夜振幅主要是衡量节律的稳定性。昼夜振幅低则说明钟基因节律振荡的不稳定性或小鼠

的运动活性较低。如果昼夜振幅非常低,说明此动物的活动是无节律的。平均每日运动活性是用转轮次数总和除以总天数所得的结果。低活性水平可能由一些生理功能失常引起,而且与昼夜振幅相关,因为活性水平低,昼夜活性的差异就会明显降低。

结 果

1. 在 LD 环境下小鼠昼夜运动节律的特征: C57BL/6J 小鼠在 LD 12:12 的环境下,光照对其运动节律起到明显的诱导作用。在每天的 ZT12,小鼠准时开始跑轮运动,持续约 12h。每天的 ZT24,灯一亮,小鼠的跑轮活动急剧减少,很快进入睡眠阶段,也持续约 12h。说明 C57BL/6J 小鼠能随着光照改变表现出明显的 24h 昼夜运动节律(图 2A)。

2. 在 DD 环境下小鼠昼夜运动节律的“free run-

ning”特征:当小鼠在 LD 环境下完全适应后,改为 DD 光制。DD 环境下 C57BL/6J 小鼠表现出“free running”特征。其运动行为的昼夜变化仍然非常分明,只是运动周期略有缩短,其自身运动周期由 24h 变为 $23.5 \pm 0.3h$,运动时相向前漂移。说明 SCN 自身震荡的节律为 $23.5 \pm 0.3h$ 。C57BL/6J 小鼠诱导后相角为 $(145^{\circ} \sim 170^{\circ}) \pm 6^{\circ}$ (图 2A)。

3. 在前半夜或后半夜短暂光暴露对小鼠运动节律的不同诱导效应:CT14 光照后,小鼠运动节律向后漂移 $2.3 \pm 0.5h$; CT22 光照后,小鼠运动节律向前漂移 $2.2 \pm 0.6h$ (图 2)。记录原始图非常清晰,诱导效果明显、准确。说明我们的转轮监测系统工作稳定、可靠。

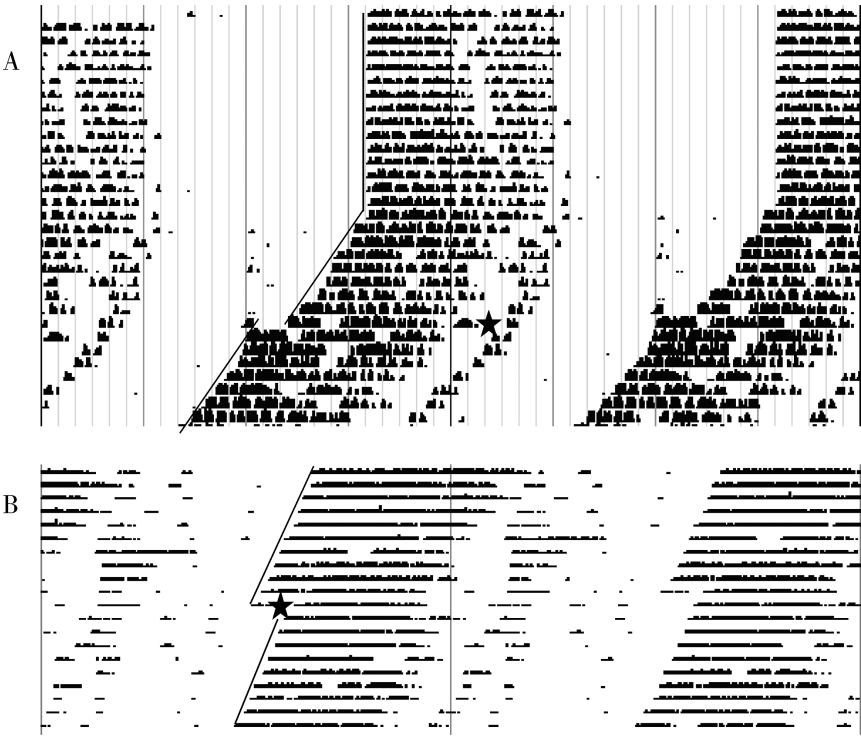


图 2 C57BL/6J 小鼠转轮运动昼夜节律记录

A. 在 LD 环境下,小鼠表现 24h 昼夜节律,在 DD 环境下运动节律向前漂移,在 CT14 给予 15min 光照,引起运动节律向后漂移;B. 在 CT22 给予 15min 光照,引起运动节律向前漂移。图中黑线是小鼠每天活性运动开始时的连线,用于测量诱导后相角,★表示光照开始的时间点

4. 运动周期和运动活性的观察:见图 3。我们选取了 C57BL/6J 小鼠在 LD 和 DD 环境下的运动记录,用 ActiView™ 数据分析系统来分析小鼠的运动周期和运动活性。C57BL/6J 小鼠在 DD 环境下运动周期为 $23.5 \pm 0.3h$,由于运动周期小于 24h,所以表现为运动开始时间向前漂移,因此运动活性上升期也逐渐提前。在 LD 环境下运动周期为 $24.0 \pm 0.1h$ 。

运动的出现和消失与灭灯和开灯完全一致。小鼠的昼夜运动幅度差异明显。软件的运行分析也很令人满意。

讨 论

我们实验室成功建立了上述小鼠转轮运动昼夜节律研究技术平台,该平台运转稳定,所获数据准确。基于该平台,我们已获得大量实验数据。这一技术平

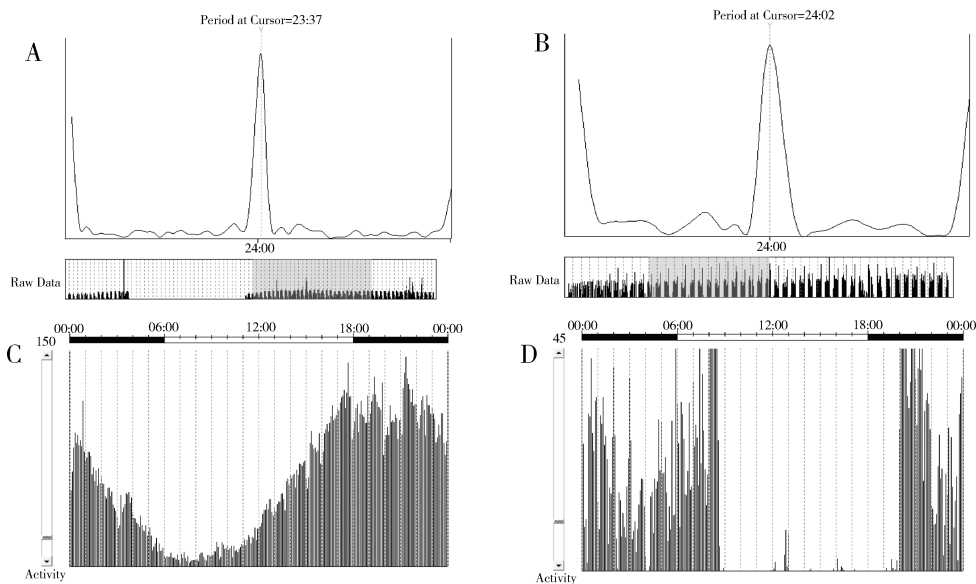


图3 小鼠昼夜运动周期和运动活性记录图

A. FFT法检测小鼠全黑环境下自身昼夜运动周期; B. FFT法检测小鼠在LD环境下昼夜运动周期; C. 小鼠在DD环境下昼夜运动活性差异及较大的周期运动幅度; D. 小鼠在LD环境下昼夜运动活性差异

台可达到高通量的研究规模。由于1个C50电缆可同时连接10个DP-24数据端口,因此可同时监测240只小鼠的转轮运动。转轮的数量规模依实验室空间和实验要求而定。

转轮实验的程序设计依实验目的而定。一般首先给予LD 12:12光照周期,适应至少1周以后,再改为完全黑暗的DD环境,这样持续20天左右,也可根据实验需要,采用全光照或不同的光照制度,来检测一些异常的行为改变。因此一轮实验往往需要1~2个月的时间。

如前述,衡量小鼠昼夜节律的指标主要有4个:自身运动周期、诱导后的相角、周期幅度、每日运动活性。这些参数都可由小鼠跑轮记录结果直接推出。当在LD和DD环境下,不追加其他干预时,其中任何一个参数超过了平均值的3倍标准差(SD)则推断它可能存在相关节律基因的遗传突变,从而决定它的遗传特性^[8,9]。当我们给予一些外界干预,例如改变光照刺激,改变进食饮水制度,给予某些药物等,如果小鼠的运动周期等指标出现改变,说明这些授时因子有可能引起SCN内某些钟基因表达的改变。

小鼠一般在出生后5~6周后即已成熟。到12周以后,其生育功能开始明显下降。所以我们一般选择6~12周最佳测试年龄的小鼠进行跑轮实验。在实验设计中,还需注意的一个问题是,小鼠在1个多月的跑轮实验结束后,其行为特征变得敏感、易激惹、

攻击性强和很难掌控,所以跑轮实验后的小鼠不宜用于应激相关实验;相应地在转轮试验前也不能进行影响其运动活性相关的侵害性实验。

当开始一轮实验前,要准备好所有装备,包括系统的调试、动物生活用品如垫料、食物和水瓶等。每个轮子都要用硅材料喷洒润滑,保证其能顺畅旋转。垫料要适量,过多会影响轮子自由运转。转轮被放入光线密闭的箱体中,观测其转动是否能激活感应装置。我们一般在关灯前的一两个小时开始实验,一方面是因为小鼠是夜行动物,在夜晚来临前开始实验,不会中途打断它的正常休息;另一方面是,轮子对小鼠来说是个新鲜事物,这种新鲜的转轮运动也可能改变小鼠昼夜节律的相移,因此我们在小鼠刚刚开始其新一轮的运动周期时开始实验,能减少相移的发生^[10,11]。一旦将小鼠放入转轮,就要给他提供食物和水,并开始记录数据。鼠箱内的光照也很重要,目前多使用LED灯。荧光灯产热较多,通风设备很难稳定调节小室内温度。LED灯中以绿色LED灯较好,它比白色LED灯产热少,更节能,使用寿命更长。只有合适的光强和波谱才能产生满意的光诱导结果。每次实验开始都要先给予12:12 LD光照至少1周,在这期间,都要尽可能查找问题,例如,水瓶漏水,小鼠低活性,过高活性(多由缺少水或食物引起),线路连接失败,时控开关失灵,灯管或换气扇损坏。一定要在LD环境结束前,将这类问题找到并解决,并一

次性给予充足的水和食物。

参考文献

- 1 Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*, 1989, 69(3):671-707
- 2 Morin LP. The circadian visual system. *Brain Res Rev*, 1994, 19(1):102-127
- 3 Vitaterna MH, King DP, Chang AM, *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 1994, 264(5159):719-725
- 4 Casiraghi LP, Croci DO, Poirier F, *et al.* "Time sweet time": circadian characterization of galectin-1 null mice. *J Circadian Rhythms*, 2010, 8:4
- 5 Morin LP, Studholme KM. Millisecond light pulses make mice stop running, then display prolonged sleep-like behavior in the absence of light. *J Biol Rhythms*, 2009, 24(6):497-508
- 6 Pendergast JS, Friday RC, Yamazaki S. Endogenous rhythms in Period1 mutant suprachiasmatic nuclei in vitro do not represent circadian

- behavior. *J Neurosci*, 2009, 29(46):14681-14686
- 7 Shimomura K, Low-Zeddies SS, King DP, *et al.* Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Res*, 2001, 11(6):959-980
- 8 Duangdao DM, Clark SD, Okamura N, *et al.* Behavioral phenotyping of neuropeptide S receptor knockout mice. *Behav Brain Res*, 2009, 205(1):1-9
- 9 Sutton GM, Perez-Tilve D, Nogueiras R, *et al.* The melanocortin-3 receptor is required for entrainment to meal intake. *J Neurosci*, 2008, 28(48):12946-12955
- 10 Janik D, Godfrey M, Mrosovsky N. Phase angle changes of photically entrained circadian rhythms following a single nonphotic stimulus. *Physiol Behav*, 1994, 55(1):103-107
- 11 VanReeth O, Turek FW. Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by dark pulses or benzodiazepines. *Nature*, 1989, 339(6219):49-51

(收稿:2011-01-29)

MTH1 基因的低表达对 HeLa 细胞内 RNA 氧化程度的影响

戴大鹏 干 伟 张立群 聂 犇 徐仁爱 蔡剑平

摘 要 **目的** 建立敲减 MTH1 基因的 HeLa 细胞稳定细胞株,研究 MTH1 基因的低表达对 HeLa 细胞内 RNA 氧化程度的影响。**方法** 设计并合成针对 MTH1 基因的 3 条 siRNA,分别转染 HeLa 细胞,选择干扰效果最为理想的靶序列连接入反转录病毒载体 Retro-Q,在 293T 细胞内包装病毒颗粒,将病毒转染 HeLa 细胞后使用嘌呤霉素筛选抗性克隆株,用 western blot 技术检测克隆株的 MTH1 的表达量以确定干扰效果最理想的稳定细胞株,用 API5000 型质谱仪检测稳定细胞株 RNA 中的 8-oxoG 与 G 的含量以评价 RNA 的氧化程度。**结果** 本研究设计的 3 条 siRNA 中有 2 条干扰效率可达 90% 以上,所建立的敲减 MTH1 基因 HeLa 细胞稳定细胞株的干扰效果达 80% 以上,质谱检测结果表明 MTH1 基因低表达的稳定细胞株每 10⁶ 个 G 中含有 14.9 个 8-oxoG,而对照细胞中则仅含 9.7 个 8-oxoG。**结论** MTH1 基因的低表达可引起 HeLa 细胞中 RNA 氧化程度明显升高。

关键词 8-oxoG RNA 干扰 MTH1

Oxidization Level Analysis of RNA in MTH1 Knocking Down HeLa Cell. Dai Dapeng, Gan Wei, Zhang Liqun, Nie Ben, Xu Renai, Cai Jianping. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract Objective To construct cell lines with decreased levels of MTH1 expression, and to investigate the influence of lowering MTH1 expression on the oxidation level of RNA in HeLa cells. **Methods** Three siRNA targeting to MTH1 ORF region was designed and synthesized. Target sequences with the highest RNA interface efficiency were then introduced into retrovirus vector Retro-Q and used for the package of virus particles which could infect HeLa cells to get the resistant cell clones. Western blot analysis was carried out to screen most reasonable stable cell lines with highest RNAi efficiency. API500 mass spectrometer was used for the detection of 8-oxoG and G amounts at last in order to evaluate the oxidation level of RNA. **Results** Two of three siRNA could get more than 90% knocking down effi-

基金项目:科技部国际科技合作计划(2006DFB31410);卫生部北京医院面上项目(BJ-2008-77)

作者单位:100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所卫生部老年医学重点实验室(戴大鹏、干伟、张立群、蔡剑平);325035 温州医学院药学院药理教研室(聂犇、徐仁爱)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com