

研究论文

大鼠松果体 Clock 基因和芳烷脒 *N*-乙酰基转移酶基因的昼夜节律性表达及光照影响

王国卿^{1,2}, 杜玉珍², 童建^{2,*}

苏州大学¹医学院基础医学系生理学教研室; ²放射医学与公共卫生学院卫生毒理学教研室, 苏州 215007

摘要: 探讨 12 h 光照、12 h 黑暗交替(12 h-light : 12 h-dark cycle, LD)及持续黑暗(constant darkness, DD)光制下松果体 Clock 基因和芳烷脒 *N*-乙酰基转移酶基因(arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene, NAT)是否存在昼夜节律性表达及其光反应变化。Sprague-Dawley 大鼠在 LD 和 DD 光制下分别被饲养 4 周($n=36$)和 8 周($n=36$)后, 在一昼夜内每隔 4 h 采集一组松果体组织($n=6$), 提取总 RNA, 用竞争性定量 RT-PCR 测定不同昼夜时点样品中 Clock 及 NAT 基因的 mRNA 相对表达量, 通过余弦法和 Clock Lab 软件获取节律参数, 并经振幅检验是否存在昼夜节律。结果如下: (1) 在 DD 或 LD 光制下, 松果体 Clock 和 NAT 基因 mRNA 的表达均呈现夜高昼低的节律性振荡($P<0.05$)。(2) 与 DD 光制下比较, LD 光制下松果体 Clock 和 NAT 基因的表达振幅及峰值相的 mRNA 水平均降低($P<0.05$)。(3) 在 DD 或 LD 光制下, Clock 和 NAT 基因之间显示相似的节律性表达($P>0.05$)。结果表明, Clock 和 NAT 基因在松果体中存在同步的内源性昼夜节律表达, 光照作用可使其表达下调。

关键词: Clock 基因; NAT 基因; 昼夜节律; 光照; 松果体

中图分类号: Q811.213; R322.55; R852.6; R322.81

Circadian rhythms and light responses of clock gene and arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene expressions in the pineal gland of rats

WANG Guo-Qing^{1,2}, DU Yu-Zhen², TONG Jian^{2,*}

¹Department of Physiology, Medical School; ²Department of Toxicology, School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215007, China

Abstract: This study was to investigate the circadian rhythms and light responses of Clock gene and arylalkylamine *N*-acetyltransferase (NAT) gene expressions in the rat pineal gland under the 12 h-light : 12 h-dark cycle condition (LD) and constant darkness (DD). Sprague-Dawley rats housed under the light regime of LD ($n=36$) for 4 weeks and of DD ($n=36$) for 8 weeks were sampled for the pineal gland once a group ($n=6$) every 4 h in a circadian day. The total RNA was extracted from each sample and the semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the temporal changes in mRNA levels of Clock and NAT genes during different circadian times or zeitgeber times. The data were analysed by the cosine function software, Clock Lab software and the amplitude *F* test was used to reveal the circadian rhythm. The main results obtained are as follows. (1) In DD or LD condition, both of Clock and NAT genes mRNA levels in the pineal gland showed robust circadian oscillation ($P < 0.05$) with the peak at the subjective night or at night-time. (2) In comparison with DD regime, the amplitudes and the mRNA levels at peaks of Clock and NAT genes expressions in LD in the pineal gland were significantly reduced ($P < 0.05$). (3) In DD or LD condition, the circadian expressions of NAT gene were similar in pattern to those of Clock gene in the pineal gland ($P > 0.05$). These findings suggest that the expressions of Clock and NAT genes in the pineal gland not only show remarkably synchronous endogenous circadian rhythmic changes, but also response

Received 2004-04-23 Accepted 2004-09-29

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170295), Medical Developmental Foundation of Soochow University (No.EE134031) and Young Teacher's Research Foundation of Soochow University (No.Q3134044).

*Corresponding author. Tel: +86-512-65125041; Fax: +86-512-65304830; E-mail: tongjian@suda.edu.cn

to the ambient light signal in a reduced manner.

Key words: Clock gene; arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene; circadian rhythm; light; pineal gland

大多数生物体的生理功能表现出以 24 h 为周期的昼夜节律。产生这种节律的结构基础是分子计时器——昼夜节律生物钟。哺乳类动物的生物钟已被定位于下丘脑前部的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 和松果体^[1,2]。外源光信号的强弱变化通过视网膜-SCN-松果体之间神经信息和体液信息使的相互联系, 形成一个统一协调的昼夜节律整体振荡系统^[2]。Klein 等^[3]认为, 由松果体分泌、释放的重要时间生物学激素——褪黑素(melatonin, MEL), 其合成与分泌受到关键酶——芳烷胺 *N*-乙酰基转移酶(arylalkylamine *N*-acetyltransferase, NAT) 基因的调控。Abe 等^[4]证实哺乳类 SCN 钟基因 Clock 存在着昼夜节律性表达, 光照作用以时相依赖方式可使这种表达上调。而在另一重要钟组织松果体中, 有关 Clock 和 NAT 基因表达的昼夜节律性、二者相关性及其光反应性的报道不多。为此, 本实验在持续黑暗(constant darkness, DD)和 12 h 光照、12 h 黑暗交替(12 h-light : 12 h-dark cycle, LD)光制下, 于不同昼夜时点采集大鼠松果体组织, 进行竞争性半定量 RT-PCR, 测定不同光制各时点下 Clock 和 NAT 基因的 mRNA 表达水平变化。用余弦函数和 Clock Lab 软件获取和分析节律性参数, 旨在探讨松果体 Clock 和 NAT 基因表达的昼夜节律性、光反应性及二者之间的相关性, 以便进一步阐明中枢昼夜节律的分子调节机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组采样 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (70~100 g, 苏州大学医学院实验动物中心 SPF 级), 自由摄食、饮水, 室温维持(25 ± 1)°C。随机分成两大组: DD 组($n=36$, 饲养 8 周, 6 只一笼)和 LD 组($n=36$, 饲养 4 周, 6 只一笼)。光照期的光照度 150 lx, 照射时间为 5:00 至 17:00, 位于鼠笼中央上方。黑暗期采样时红光强度 < 1.0 lx。将光照开始时间定为昼夜 0 时点, 把 24 h 自然时点转换成昼夜时点(circadian time, CT 或 zeitgeber time, ZT)。每组又按各 CT(DD 光制)或 ZT(LD 光制)时点 (02、06、10、14、18、22) 分成 6 小组, 每隔 4 h 采集一组动物的松果体样品, 每

组 $n=6$ 。乙醚麻醉后打开颅腔, 于窦汇正下方直视摘除松果体组织, 迅速冻存于 -80 °C 备用。

1.2 仪器与试剂 PTC-100TM 热循环仪, 美国 MJ Research, Inc; 5810R 冷冻高速离心机, 德国 Eppendorf; MDF-U4086S、-85 °C 冰箱, 日本 SANYO; UV-VIS756MC 紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Gel Doc 2000TM 凝胶成像分析系统, 意大利 BIORAD; SCR-6 稳流稳压电泳仪, 江苏丹阳无线电一厂。焦碳酸二乙酯 (DFPC), 购自 AMRESCO; Trizol、Oligo(dT)₃₆、dNTP、RNasin(核糖核酸酶抑制剂)、Taq 酶、糖原、琼脂糖, 上海 Sangon; M-MuLV 逆转录酶、Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas。其它试剂均为分析纯级。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成 松果体总 RNA 提取按 Trizol 试剂说明书执行。提取的 RNA, 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度值, 计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值, 比值大于 1.7 的样品, 用 0.01% DEPC 水稀释至浓度为 1 µg/µl。按 M-MuLV 逆转录试剂说明书进行 cDNA 合成。

1.4 竞争性 PCR 目的基因 Clock 和 NAT 扩增片段的引物采用计算机在线辅助设计(<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www-results.cgi>)。Clock 基因引物正义链为: 5'-TCA CCA CGT TCA CTC AGG ACA-3', 反义链为: 5'-AAG GAT TCC CAT GGA GCA A-3', 扩增片段长度 375 bp; NAT 基因引物正义链为: 5'-GGG AGC CTC TGG AAT TAA CC-3', 反义链为: 5'-AAA CCC CTT CTG AGG TCT GC-3', 扩增片段长度 300 bp; 内参基因 H3.3 的引物^[5]序列: 正义链为: 5'-GCG TGC TAG CTG GAT GTC TT-3', 反义链为: 5'-CCA CTG AAC TTC TGA TTC GC-3', 扩增片段长度 230 bp。反应总体积为 50 µl, 体系中含模板 4 µl、dNTP 100 µmol、Clock 或 NAT 基因引物对各 0.7 µmol、H3.3 引物对各 0.3 µmol、MgCl₂ 1.5 µmol、10 × buffer 5 µl、Taq 酶 2.5 U。反应液用 30 µl 石蜡油覆盖。95 °C 预变性 5 min 后热循环条件如下: 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 扩增 Clock 和 NAT 基因的循环数分别为 32 和 35, 最

后 72℃ 延伸 8 min。扩增产物以(1.5~2.0)% 的琼脂糖进行凝胶电泳, 稳压 80 V, 持续 40 min。溴乙锭(EB)染色, 并在凝胶成像分析系统下观察结果、照相存盘。

1.5 数据处理 用 BIORAD 凝胶成像分析系统软件转换数据, 根据各泳道目的基因与内参基因(H3.3)的辉度比值进行相对定量。用余弦分析软件和 Clock Lab 软件获取节律性参数, 并经振幅 *F* 检验确定是否存在昼夜节律。用于拟合的余弦函数方程为: $F(t) = M + A \cos(\omega t + \Phi)$, 其中 *M*(mesor)为中值, 即涨落变化的中线; *A*(amplitude)为节律振荡的振幅, 表示上下波动的幅度; Φ (peak phase)为峰值相位, 是振荡达到峰值的时刻, 可根据 ω 角速度 (360°/24 h) 将其换算成 CT 或 ZT 时点。数据采用 mean ± SD 表示, 组内差异用 SPSS11.0 for Windows 统计软件包进行 *t* 检验; 组间差异用相同软件包进行方差分析(ANOVA), *P* < 0.05 为差异具有

显著性。

2 结果

2.1 不同光制下松果体 Clock 基因的昼夜节律性表达及其光反应性

2.1.1 DD 或 LD 光制下 Clock 基因的昼夜节律性表达 在 DD 或 LD 光制下的不同昼夜时点, Clock 基因半定量 RT-PCR 的扩增结果见图 1; 其 mRNA 表达的昼夜节律参数见表 1; 其昼夜节律性表达的时间模式分别见图 2A 和 B。两种光制下 Clock 基因的昼夜表达, 经振幅 *F* 检验分析, *P* < 0.05 (表 1)。表明无论光照与否, 松果体 Clock 基因表达均存在着明显的夜高昼低的节律性振荡。

2.1.2 光照对 Clock 基因昼夜节律性表达的影响 与 DD 光制下比较, LD 光制下松果体 Clock 基因表达的节律振幅减小(*P* < 0.05), 达到峰值时的 mRNA 水平降低(*P* < 0.05), 而其他节律参数无明显

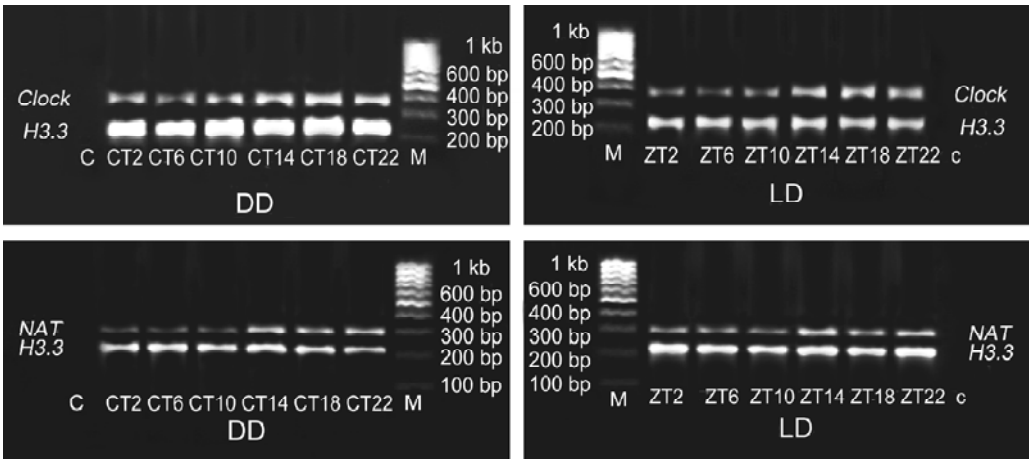


图 1. 半定量 RT-PCR 测定不同光制下大鼠松果体 Clock、NAT 基因的表达

Fig. 1. Semiquantitative RT-PCR of Clock and NAT genes in the pineal gland of rats under different light conditions. C, control; M, marker; CT, circadian time; ZT, zeitgeber time.

表 1. 不同光制下大鼠松果体 Clock、NAT 基因 mRNA 表达的昼夜节律参数

Table 1. Circadian rhythmic parameters of Clock and NAT genes mRNA expressions in the pineal gland of rats under different light conditions

Gene	Light condition	<i>n</i>	Amplitude	Mesor	Peak phase	Trough phase	mRNA level at peak	mRNA level at trough	<i>P</i>
Clock	DD	36	0.42 ± 0.14	0.99 ± 0.10	CT18	CT6	1.41 ± 0.27	0.57 ± 0.21	*
NAT	DD		0.37 ± 0.11	1.00 ± 0.15	CT17	CT5	1.37 ± 0.25	0.63 ± 0.19	*
Clock	LD	36	0.30 ± 0.10 [#]	0.87 ± 0.09	ZT17	ZT5	1.17 ± 0.24 [#]	0.56 ± 0.17	*
NAT	LD		0.23 ± 0.13 ⁺	0.84 ± 0.11 ⁺	ZT16	ZT4	1.07 ± 0.23 ⁺	0.61 ± 0.15	*

Data were presented as mean ± SD. CT, circadian time; ZT, zeitgeber time; NAT, arylalkylamine *N*-acetyltransferase gene. **P* < 0.05, by the amplitude *F* test; [#]*P* < 0.05 vs Clock in DD and ⁺*P* < 0.05 vs NAT in DD, by one-way ANOVA.

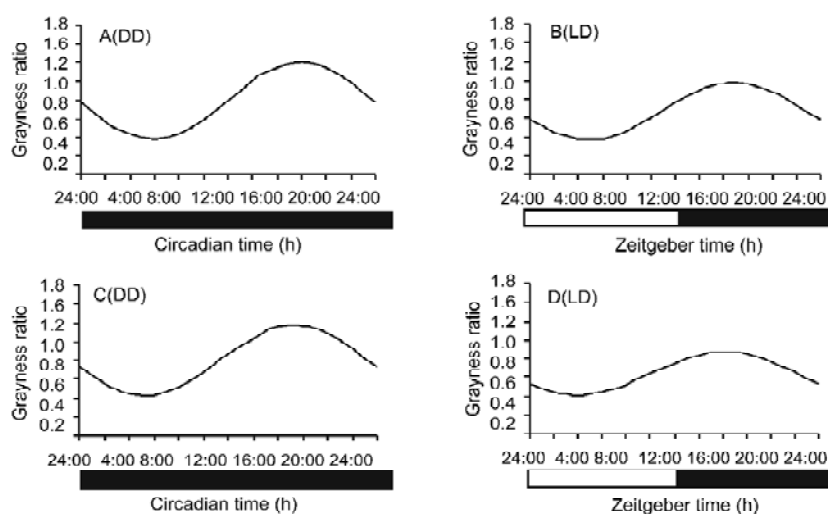


图 2. 不同光制下大鼠松果体 Clock (A 和 B)、NAT (C 和 D) 基因 mRNA 昼夜节律性表达的时间模式

Fig. 2. Temporal patterns of Clock (A and B) and NAT (C and D) genes mRNA circadian expressions in the pineal gland of rats under different light conditions. The transcription levels are expressed by grayness ratio of Clock / H3.3 or NAT / H3.3 bands.

改变($P>0.05$) (表 1, 图 2)。表明光照作用可使松果体 Clock 基因表达量下调, 但不引起其节律相位的明显改变。

2.2 不同光制下松果体 NAT 基因的昼夜节律性表达及其光反应性

2.2.1 DD 或 LD 光制下 NAT 基因的昼夜节律性表达

在 DD 或 LD 光制下, 于不同昼夜时点, NAT 基因半定量 RT-PCR 的扩增结果见图 1; 其 mRNA 表达的昼夜节律参数见表 1; 其昼夜节律性表达的时间模式分别见图 2C 和 D。两种光制下 NAT 基因的昼夜表达, 经振幅 F 检验分析, $P<0.05$ (表 1)。表明无论光照与否, 松果体 NAT 基因表达也均呈现出明显的夜高昼低的节律性振荡。

2.2.2 光照对 NAT 基因昼夜节律性表达的影响

与 DD 光制下比较, LD 光制下松果体 NAT 基因表达的节律振幅减小($P<0.05$), 节律振荡的中值下降($P<0.05$), 达到峰值时的 mRNA 水平降低($P<0.05$), 而其他节律参数无明显改变($P>0.05$) (表 1, 图 2)。表明光照作用也能导致松果体 NAT 基因表达下调, 但不引起其节律相位的明显改变。

2.3 不同光制下松果体两种基因(Clock、NAT)昼夜节律性表达的比较

在 DD 或 LD 光制下, 与 Clock 基因相比, NAT 基因表达的昼夜节律参数及其时间模式均无显著性

差异($P>0.05$) (表 1)。表明在松果体中, NAT 基因与 Clock 基因的昼夜节律性表达是同步发生的。

3 讨论

哺乳类松果体不仅表现内分泌输出效应, 而且自身也起着昼夜节律振荡器的作用, 其光信号输入通路和内分泌输出通路均与中枢节律振荡密切相关^[6, 7]。在 SCN 输出性振荡节律的驱动下, 松果体分泌 MEL 的节律呈现昼低夜高变化^[3, 6]。作为体液信使, MEL 发挥编码夜晚期间节律运行的作用^[2], 但其效应主要取决于 NAT 基因表达的节律性水平^[3]。Clock 基因作为重要的钟基因之一, 已被证实主要在 SCN、松果体和视网膜上表达^[8], 是维持内源性生物钟运行的必要元件。Clock 基因的表达可维持近 24 h 的周期^[9], 其表达可受光照的改变直接影响下游基因的转录。该基因突变后, 小鼠丧失昼夜节律的内源性和持续性, 而增加外源性 Clock 基因的 mRNA 含量, 能使小鼠昼夜节律加快^[10]。因此, Clock 和 NAT 基因在昼夜节律的调节和维持中具有重要作用。本实验在 DD 光制下, 观察到松果体 Clock 和 NAT 基因均存在明显的内源性昼夜节律表达, 峰值和谷值均分别出现于主观夜晚和主观白天, 这与以往报道相一致^[3, 11]。以往文献报道认为 Clock 基因 mRNA 的丰度在钟结构中以持续而恒定

的水平表达, 24 h 内不具有明显的昼夜节律性振荡^[12, 13], 这可能是由于本实验所用的竞争性 RT-PCR 法, 在灵敏度检测方面高于以往文献中采用的原位杂交法^[14, 15], 使得较弱的 mRNA 昼夜振荡变化能够表现出来; 另一可能原因是本实验进行昼夜全程多时点采样, 而以往报道中多采用白天、黑夜两个时点取样^[4, 11, 13], 难以反映 24 h 内基因表达的昼夜动态变化。

为了探讨光导引对松果体 Clock、NAT 基因节律性表达的影响, 实验中采用 LD(12 h:12 h)光制, 分别模拟自然白天和黑夜, 发现光照条件下松果体两种基因的节律性表达依然存在, 而光照引起各自表达的节律振幅、峰值相的 mRNA 水平降低, 但不引起各自节律相位的明显改变。提示光照可导致松果体 Clock 和 NAT 基因表达下调。Namihira 等^[11]曾报道, 松果体 Clock 基因及其功能伴侣基因 Bmal1 的表达呈现相互反时相的昼夜节律性振荡, 30 min 光照均不影响二者的表达水平。这可能与以往的检测方法和实验光照时间过短有关。Abe 等^[4]指出, 在 DD 光制下, SCN 的 Clock 基因存在昼高夜低的节律性表达, 其峰值和谷值分别出现于 CT6 和 CT18 至 22, 光导引以时相依赖方式上调其 mRNA 水平。这些与本实验在松果体上观察到的结果恰好相反, 表明在松果体和 SCN 中, Clock 基因的表达存在昼夜节律时相上的显著差异。Foulkes 等^[16]发现, 尽管松果体的节律性活动受控于 SCN, 但也可能部分独立于 SCN。在 MEL 节律性合成的机制中, 通过 cAMP 反应分子调控器反馈环路的作用, 松果体本身具有后效生物钟特性; 在无 SCN 的参与下, 松果体 MEL 可直接受光影响^[17]并经其 SCN 上高敏感的受体作用调节 SCN 的节律输出^[18, 19]。提示松果体 Clock 基因昼夜节律性表达, 可能存在着非依赖 SCN 的 Clock 基因的振荡机制, 即除了共同的 E-box 结合方式外[Clock、Bmal1 基因产物 CLOCK:BMAL1 蛋白在细胞核内形成杂二聚体, 作为正向调节子与下游基因 Per (period)、Cry (cryptochromes) 或 tim (timeless) 启动子区的 E-box 结合, 激活基因的转录和翻译^[7, 12, 20]], 松果体 Clock 基因表达可能还有其他的光导引通路和转录调节机制。

比较不同光制下松果体两种基因昼夜节律性的表达, 发现在同一光制下 NAT 基因与 Clock 基因的表达是同步发生的。Takekida 等^[21]证实, 大鼠松果体 Per1 和 Per2 基因的 mRNA 节律性表达模式与 NAT

基因的非常相近。Simonneaux 等^[7]最近报道, 松果体 Per1、Per3、Cry1 和 Cry2 基因的转录水平均于夜间增加, 其中夜间 Per1 和 Cry2 基因的高水平表达可因光照或 β -肾上腺素能拮抗剂作用而抑制, 这与 NAT 基因的表达有着共同的节律性特点。本实验和其他报道的结果^[3, 6, 7, 11, 21]表明, 松果体 Clock、NAT、Cry2 和 Per 基因的 mRNA 水平均显示相似的夜高昼低节律性变化, 而光照作用可下调上述基因的表达, 这与 MEL 的节律振荡^[3]相一致。至于这些基因表达与 MEL 合成以及在昼夜节律调节方面是否存在功能协调性, 有待今后进一步探讨。

* * * * *

本文工作完成于苏州大学放谢医学与防护省级重点实验室, 特此感谢!

参考文献

- 1 Wang GQ (王国卿), Tong J. Advances in study on molecular mechanism of circadian clock in pineal gland. Chin J Hemorrh (中国血液流变学杂志) 2003; 13(4): 430-436 (Chinese, English abstract).
- 2 Stehle JH, von Gall C, Korf HW. Melatonin: a clock-output, a clock-input. J Neuroendocrinol 2003; 15(4): 383-389.
- 3 Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. Recent Prog Horm Res 1997; 52: 307-358.
- 4 Abe H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M, Yu W, Honma K. Phase-dependent induction by light of rat Clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus. Mol Brain Res 1999; 66(1-2): 104-110.
- 5 Futscher BW, Blake LL, Gerlach JH, Grogan TM, Dalton WS. Quantitative polymerase chain reaction analysis of mdm1 mRNA in multiple myeloma cell lines and clinical specimens. J Analytical Biochem 1993; 213(2): 414-421.
- 6 Fukada Y, Okano T. Circadian clock system in the pineal gland. Mol Neurobiol 2002; 25(1): 19-30.
- 7 Simonneaux V, Poirel VJ, Garidou ML, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E, Pévet P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. Mol Brain Res 2004; 120(2): 164-172.
- 8 Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. Biochem Biophys Res Commun 1998; 250(1): 83-87.
- 9 Piggins HD. Human clock genes. Ann Med 2002; 34(5): 394-400.

- 10 Barinaga M. New clues found to circadian clocks-including mammals' *Science* 1997; 276(5315): 1030-1031.
- 11 Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett* 1999; 267(1): 69-72.
- 12 Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280(5369): 1564-1569.
- 13 Abe H, Honma S, Namihira M, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neurosci Lett* 1998; 258(2): 93-96.
- 14 顾晓松, 谭湘林, 丁斐. 分子生物学理论与技术. 北京: 北京科学技术出版社, 2002, 118-120.
- 15 Hamoui S, Benedetto JP, Garret M, Bonnet J. Quantitation of mRNA species by RT-PCR on total mRNA population. *PCR Methods Appl* 1994; 4(3):160-166.
- 16 Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH, Sassone-Corsi P. Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 14140-14145.
- 17 Illnerova H, Sumova A. Photic entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production. *J Biol Rhythms* 1997; 12(6): 547-555.
- 18 Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 1987; 435(1-2): 359-362.
- 19 Zhou XJ (周先举), Jiang XH, Yu GD, Yin QZ. Modulation of circadian rhythm of discharges of suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slices by melatonin. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2000; 52(3): 215-219 (Chinese, English abstract).
- 20 Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TDL, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 1998; 280(5369): 1599-1603.
- 21 Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH, Okamura H. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci* 2000; 12(12): 4557-4561.