

研究论文

生物钟基因 *Rev-erb- α* 缺失导致雌鼠生理周期延长

张芹¹, 董珍², 吴曦², 颜洁³, 高基民^{1,*}

¹温州医科大学浙江省模式生物技术与应用重点实验室, 温州 325035; ²南京大学模式动物研究所模式动物疾病研究中心教育部重点实验室, 南京 210061; ³苏州大学系统生物学中心, 苏州 215006

摘要: 在哺乳动物中, 生物节律与生殖生理和生殖内分泌密切相关, 流行病学研究显示长期倒时差的女性表现出生殖力低下和不良妊娠的概率更高, 但是人们对生物节律影响生殖的机制了解还很少。本研究旨在以时钟基因 *Rev-erb- α* 敲除型 (*Rev-erb- α ^{-/-}*) 雌性小鼠为模型初步探索生物节律对生殖的影响。将 *Rev-erb- α ^{-/-}* 和野生型 (*Rev-erb- α ^{+/+}*) 小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配观察生殖力变化, 用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察卵巢组织变化, 将 *Rev-erb- α ^{+/+}* 与 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠分别与 C57BL/6J 雄性小鼠交配后比较见栓后 1.5 d 统计的胚胎数量, 用阴道涂片结合周期图和周期谱观察小鼠生理周期变化。结果显示, *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠与 C57BL/6J 雄鼠交配是不生育的, 并且 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠生成的胚胎数量明显减少。*Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠卵巢存在各级卵泡, 并且结构与野生型 (*Rev-erb- α ^{+/+}*) 雌性小鼠相比无明显差异。*Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠的生理周期较 *Rev-erb- α ^{+/+}* 小鼠周期长约 3.22 d, 较 *Rev-erb- α ^{+/+}* 雌性小鼠延长 63.5%。以上结果提示, 生物钟基因 *Rev-erb- α* 缺失导致雌性小鼠生理周期明显延长, 可能是影响雌性小鼠生育的原因之一。因此, 生物节律的稳定对于生理周期具有重要作用。

关键词: *Rev-erb- α* ; 生理周期; 阴道涂片; 生物节律

中图分类号: R339.2

Circadian clock gene *Rev-erb- α* deficiency prolongs female estrous cyclicity

ZHANG Qin¹, DONG Zhen², WU Xi², YAN Jie³, GAO Ji-Min^{1,*}

¹Zhejiang Province Key Laboratory of Biotechnology and Application Mode, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²MOE Key Laboratory of Model Animal for Disease Study, Model Animal Research Center, Nanjing University, Nanjing 210061, China; ³Center for Systems Biology, Soochow University, Suzhou 215006, China

Abstract: The circadian clock has been linked to female reproductive physiology and endocrine in mammals. Epidemiological studies of female shift workers have shown increased rates of abnormal reproduction and adverse pregnancy. But little is known how the circadian rhythms affect reproduction. The aim of the present study was to investigate the influences of circadian rhythms on estrous cycle in female mice using clock gene *Rev-erb- α* knock out (*Rev-erb- α ^{-/-}*) mice. To test the fertility of *Rev-erb- α ^{-/-}* mice, litter sizes were counted after mating with C57BL/6J male mice. HE staining was used to observe the change of follicle development. The number of embryos of *Rev-erb- α ^{+/+}* and *Rev-erb- α ^{-/-}* female mice was compared 1.5 d after mating with C57BL/6J male mice. Then *Rev-erb- α ^{+/+}* and *Rev-erb- α ^{-/-}* female mice were housed to adult, and daily vaginal lavage with 0.9% saline was used to monitor estrous cycle for at least 30 days. Quantity of various cells was counted on specified smears views after staining. We observed estrous cycles of *Rev-erb- α ^{+/+}* and *Rev-erb- α ^{-/-}* female mice using line plots and periodic spectrograms. The results showed that the *Rev-erb- α ^{-/-}* female mice were infertility, and the number of embryos of *Rev-erb- α ^{-/-}* females was less than that of *Rev-erb- α ^{+/+}* females. However, the follicle development of *Rev-erb- α ^{-/-}* female mice was normal. The estrous cycle of *Rev-erb- α ^{-/-}* female mice was 3.22 days longer than that of *Rev-erb- α ^{+/+}* female mice. The results suggest that loss of *Rev-erb- α* prolongs estrous cycle, which is probably one of the reasons for female mice infertility, and circadian rhythm is important for mammalian estrous cycle.

Key words: *Rev-erb- α* ; estrous cycle; vaginal smear; circadian rhythm

Received 2013-02-01 Accepted 2013-04-12

This work was supported by the National Basic Research Development Program (973 Program) of China (No. 2010CB945100).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-577-86689748; E-mail: jimingao64@163.com

现代不孕不育的患者在人群中的比例大幅上升, 显然已经成为了一种现代病。在不能生育的原因中, 女方因素占 40%~50%^[1]。女性不孕不育的原因有很多种, 其中生活节奏加快和工作压力的影响越显突出^[2]。不孕不育严重影响着家庭的幸福和女性的身心健康。

在人类和啮齿动物中的研究显示, 生物节律对其生殖有重要的作用^[2,3]。生物节律是指以近 24 h 为单位表现出来的机体活动一贯性、规律性的变化模式。在生命过程中, 从分子、细胞到机体、群体的各个层次上都有明显的时间周期现象^[4], 广泛存在的节律使生物能更好地适应外界环境。生物节律是由一组表达在下丘脑的视交叉上核 (SCN) 的时钟基因 (包括 *Clock*、*Bmal1*、*Per1/2*、*Cry1/2*、*Rev-erb- α* 等) 支配, 这些基因管理着相关器官及其周边组织^[5]。时钟基因已被证实表达于子宫^[6]、输卵管、卵巢等生殖器官^[7], 许多时钟基因敲除的小鼠表现出生殖力的下降^[8,9], 但是生物节律和时钟基因作用于卵巢的分子机制还不清楚。*REV-ERB- α* 是一种孤儿核受体。在生物节律调节中, *REV-ERB- α* 通过抑制时钟反馈环的中心因子 *Bmal1* 的转录参与调节生物节律, 是生物节律不可缺少的基因^[10]。

哺乳类的雌性动物性成熟后, 在下丘脑-垂体-卵巢轴的调节下, 卵巢发生周期变化: 卵泡发育、排卵、黄体化和白体化和与之相应的卵巢激素周期性的变化^[11]。在不同激素的作用下, 子宫及阴道粘膜发生周期性的增厚和脱落。这种周期性的变化被称为动情周期, 即发情或生理周期^[12]。雌性小鼠的正常生理周期为 4~5 d, 分四个阶段, 即发情前期、发情期、发情后期和间情期。在这生理周期的四个阶段中, 小鼠只有在发情期接受雄鼠交配。上述显示, 生理周期的长短和时间分布对小鼠的生殖有重要的影响。

随着当今生活节奏的加快和工作上的轮班倒休, 越来越多的人出现生物钟的失调和睡眠时间的减少, 心血管疾病、子宫内膜移位、痛经和乳腺癌的患病风险的升高^[2], 间接导致心理和生理上的变化, 比如抑郁。本研究用不能生育的 *Rev-erb- α* 敲除型 (*Rev-erb- α ^{-/-}*) 雌性小鼠为模型探讨生物钟对生殖的可能影响, 以期临床不孕不育的治疗与预防提供线索。

1 材料与方法

1.1 野生型 (*Rev-erb- α ^{+/+}*) 与 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠的生殖力检测

本研究动物实验方案获得南京大学模式动物研究所实验动物管理委员会批准, 动物实验操作编号为 YX10。*Rev-erb- α ^{+/+}* 小鼠由南京大学模式动物研究所提供, 实验小鼠饲养在 SPF 级环境中, 遗传背景为 C57BL/6J。*Rev-erb- α ^{+/+}* 雌雄小鼠交配, 选取性成熟的 *Rev-erb- α ^{+/+}* 与 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠各 3 只, 1:1 与 C57BL/6J 雄性小鼠配繁殖笼, 记录每窝小鼠生存数量与日期。

1.2 雌鼠卵巢的组织石蜡切片

选取同窝 2~3 月龄 *Rev-erb- α ^{+/+}* 与 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠, 颈椎脱臼法处死后切开腹部取卵巢。4% 多聚甲醛溶液常温下固定 4 h。依次经 50%、70%、80%、90% 乙醇分别脱水 1 h, 再经 95%、100% 乙醇依次脱水 2 h。二甲苯透明 5~6 min, 透蜡过夜后用石蜡包埋机 (Leica, EG1160, 德国) 包埋组织。将包埋好的组织蜡块修整后用石蜡切片机 (Leica, RM2235, 德国) 切片, 最后用苏木精-伊红染色, 显微镜 (OLYMPUS, BX51, 日本) 下观察。

1.3 统计胚胎期第 2 天时的胚胎数量

选取性成熟的 *Rev-erb- α ^{+/+}* 与 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠各 7 只, 1:2 与 C57BL/6J 雄性小鼠配繁殖笼。将见栓的小鼠于 1.5 d 颈椎脱臼法处死, 切开腹部取输卵管, 用 PBS 溶液 (mmol/L: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 44.3, KH₂PO₃ 41.4, pH 7.4) 冲刷输卵管。立体显微镜 (Leica, M50, 德国) 下统计胚胎数量。

1.4 小鼠阴道涂片实验

分笼时将同窝 *Rev-erb- α ^{+/+}* 与 *Rev-erb- α ^{-/-}* 雌性小鼠作为 1 对放一起, 2 对置于一笼, 等小鼠 2~3 月龄时进行实验, 时间固定在每天上午 8:30~9:00 进行。用左手拇指和食指固定小鼠的颈部, 将小鼠倒放在手掌上, 用左手小指固定小鼠尾巴。抓取小鼠后, 用移液枪吸取 20 μ L 生理盐水对准小鼠阴道反复缓慢抽吸 2~3 次, 将抽吸液滴到载玻片上, 然后用枪头均匀涂开。自然晾干后, 放入甲醇中固定 3 min。自然干燥后, 经碱性美蓝溶液 (配方: 0.3 g 美蓝粉末, 0.005 g KOH, 溶于 15 mL 95% 乙醇中, 再加入 50 mL 水) 染色 15 min。过水数遍, 自然晾干, 显微镜 (OLYMPUS, BX51, 日本) 下观察。

1.5 统计学处理

实验数据以 mean \pm SD 表示, 使用 GraphPad Prism 5 软件分析数据, 采用 *t* 检验, *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠不能生育

雌性小鼠在 6 周时发育到性成熟，选取性成熟的 *Rev-erb-α*^{+/+} 和 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠分别与 C57BL/6J 的可育雄性小鼠交配，统计每次的产仔数量显示，*Rev-erb-α*^{+/+} 雌性小鼠平均每次产仔数量是 7 只，交配持续到 32 周时，*Rev-erb-α*^{+/+} 雌性小鼠的产仔总数是 48 ± 12，并且这些子鼠能够正常发育；而 *Rev-erb-α*^{-/-} 的雌性小鼠没有子鼠出生，即总数为 0 ($P < 0.05$) (图 1)，提示 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠不能正常繁育后代。

2.2 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠卵巢组织结构无异常

在成年 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠卵巢中，卵泡发育正常，和野生型的无明显差异，能够看到典型的原始卵泡，初级卵泡，次级卵泡和窦性卵泡，同时可见结构正常的成熟黄体 (图 2)，提示 *Rev-erb-α* 缺失不会导致各级卵泡发育的异常。

2.3 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠能够形成早期胚胎

由于 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠的各级卵泡发育和黄体成熟无异常，说明 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌鼠在一定程度上能够排卵，接下来检测这些卵细胞能否正常发育以及与精细胞形成早期胚胎。与 C57BL/6J 性成熟雄性小鼠交配后，取见栓后 1.5 d 的 *Rev-erb-α*^{+/+} 与 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠输卵管观察，可见 1-、2-、4-

细胞的早期胚胎。统计结果显示 (图 3)，两种基因型小鼠各细胞期胚胎相比无明显差异，而 *Rev-erb-α*^{+/+} 雌性小鼠的胚胎总数是 10.67 ± 0.76，*Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠的胚胎总数明显减少，为 6.83 ± 1.14 ($P < 0.05$)，提示 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠虽然能够正常排卵，但卵子受精后形成的早期胚胎数量明显减少。

2.4 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠的生理周期延长

野生型小鼠各期阴道涂片中细胞特征见图 4。

发情前期：涂片中大而圆的有核上皮细胞占优

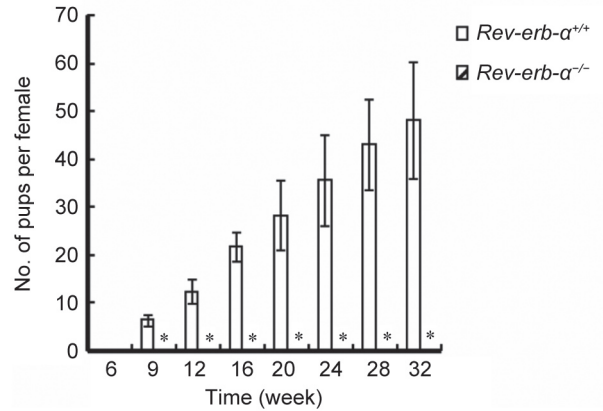


图 1. *Rev-erb-α*^{+/+} 与 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠的生殖力比较
Fig. 1. Comparison of fertility between *Rev-erb-α*^{+/+} and *Rev-erb-α*^{-/-} female mice. *Rev-erb-α*^{-/-} mice could not give birth to any pups. Mean ± SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs *Rev-erb-α*^{+/+}.

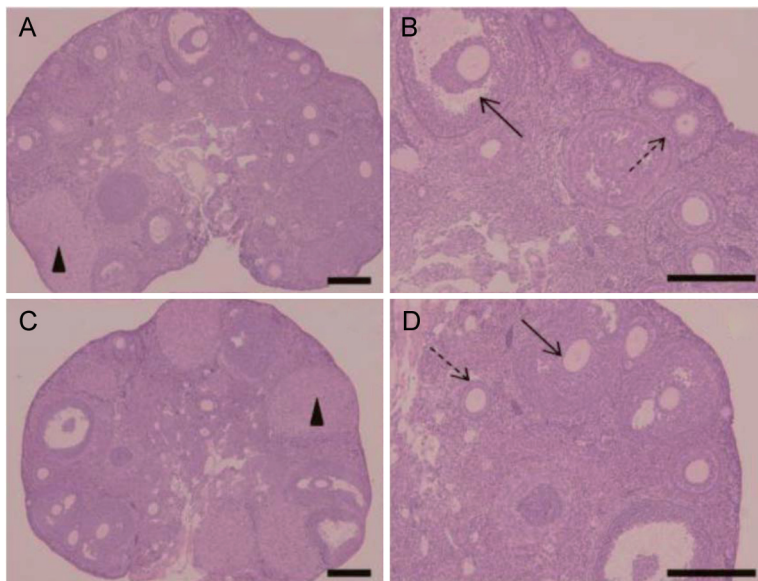


图 2. *Rev-erb-α*^{+/+} 与 *Rev-erb-α*^{-/-} 雌性小鼠的卵巢组织切片染色图

Fig. 2. *Rev-erb-α*^{+/+} (A, B) and *Rev-erb-α*^{-/-} (C, D) ovarian slices in female mice stained with haematoxylin-eosin (HE). Arrow heads, corpus luteum; Arrows, antral follicles; Dotted arrows, secondary follicles. Scale bar, 200 μm.

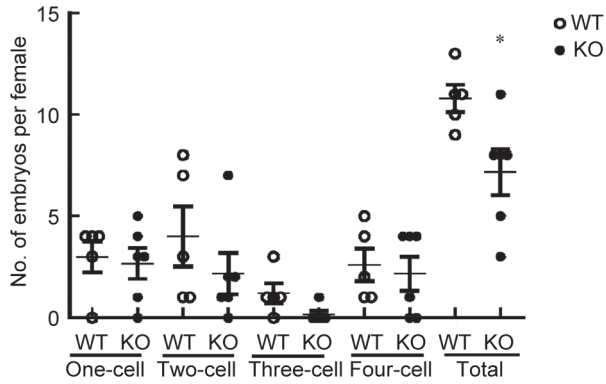


图 3. *Rev-erb-α^{+/+}*与*Rev-erb-α^{-/-}*雌性小鼠分别与C57BL/6J 雄性小鼠交配见栓后1.5天统计的胚胎数量比较
 Fig. 3. Number of embryos in oviduct of *Rev-erb-α^{+/+}* (WT) and *Rev-erb-α^{-/-}* (KO) female mice 1.5 d after mating with C57BL/6J male mice. Mean ± SD, n = 6. *P < 0.05 vs WT.

势，或成单个或成片分布。并有少量白细胞 (图 4A)。

发情期：涂片中有很多无核的角化鳞状上皮细胞，细胞大而扁平，边缘不整齐，有时成片分布。无或有较少白细胞和有核上皮细胞 (图 4B)。

发情后期：涂片中有许多白细胞及有核上皮细胞，角化细胞明显减少 (图 4C)。

间情期：小鼠阴道粘膜变薄，大量白细胞游离到阴道。涂片中几乎都是白细胞，无或有少量有核上皮细胞 (图 4D)。

小鼠各期阴道涂片中各细胞数量变化见表 1。

在野生型小鼠阴道涂片中主要存在三种细胞：有核上皮细胞，无核角化上皮细胞，白细胞，其中还有少量血细胞。由于小鼠的周期是连续变化，部分图片所处的时期不能较正确的辨认，所以我们视野中的三种主要细胞计数，计算各种细胞的百分数。将数据 (取一对数据为例) 做成折线图 (图

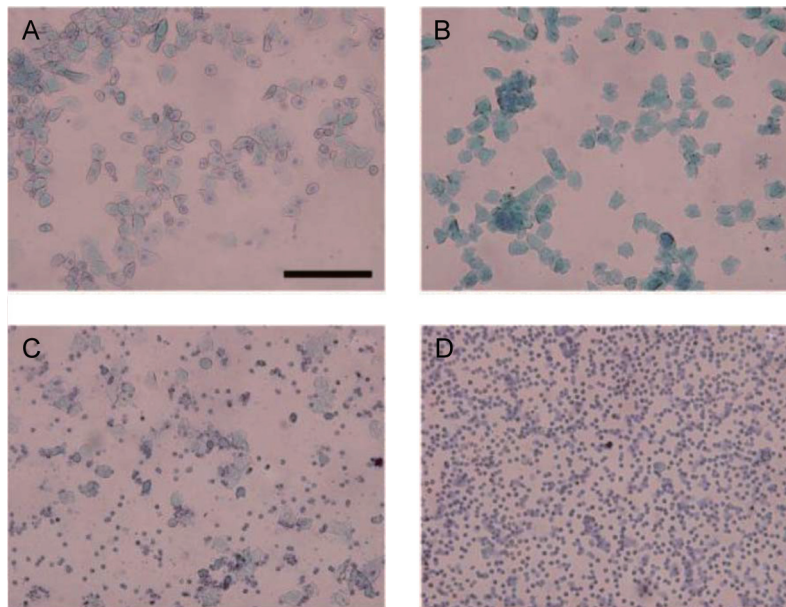


图 4. 野生型小鼠生理周期各期阴道涂片图

Fig. 4. Stages of the estrus cycle in vaginal smears of wild type mice. A: proestrus; B: estrus; C: metestrus; D: diestrus. Scale bar, 200 μm.

表1. 生理周期各个阶段阴道涂片中各细胞特征

Table 1. Characteristics of cell species during different stages of estrous cycle

Stage of cycle	Nucleated epithelia	Cornified epithelia	Leukocytes	Time of duration
Proestrus	60%–80%	10%–20%	0–20%	7–15 h
Estrus	0–5%	90%–100%	0–5%	9–15 h
Metestrus	30%–40%	0–10%	40%–50%	10–14 h
Diestrus	0–10%	0–1%	90%–100%	60–70 h

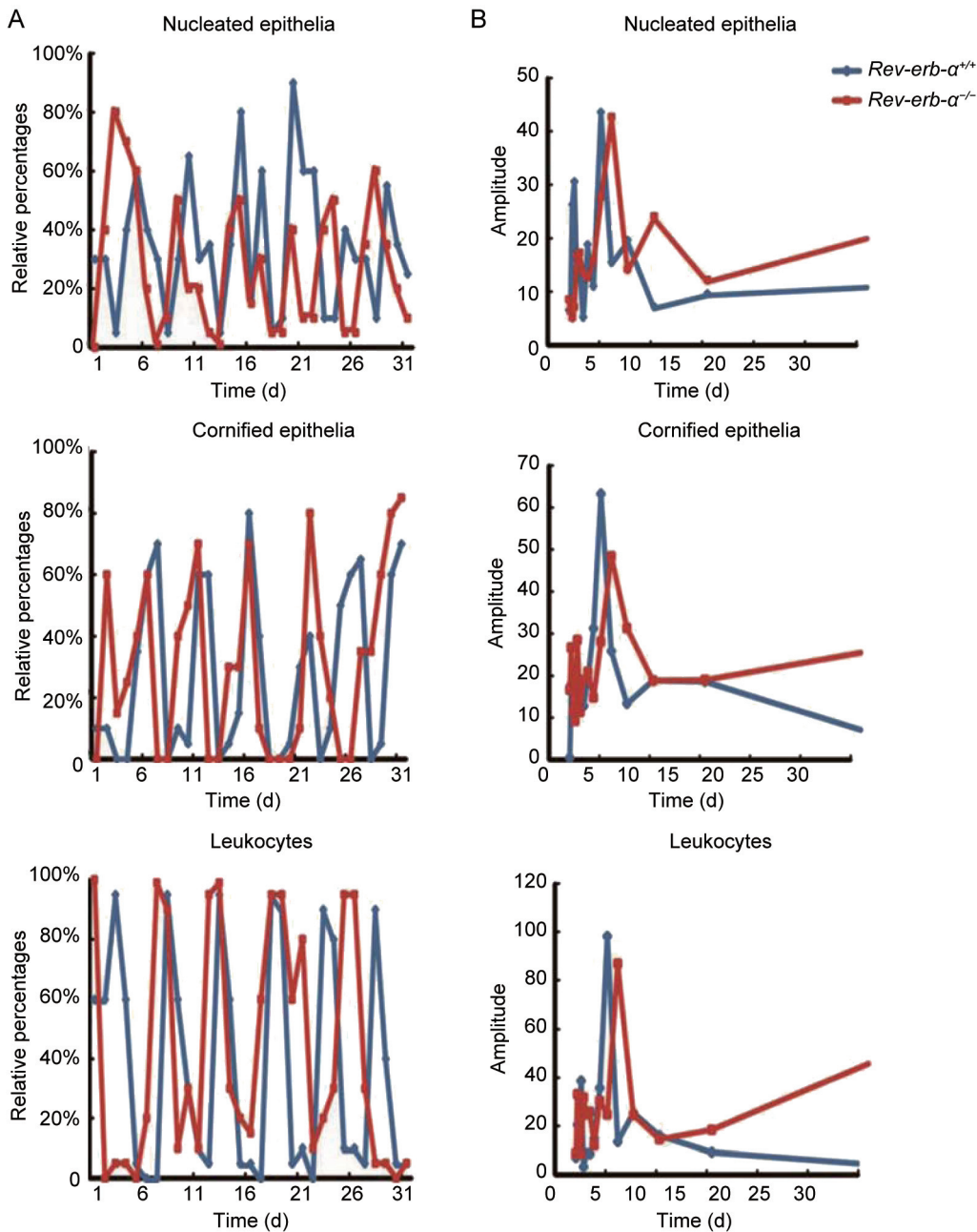


图 5. 小鼠阴道涂片中各类细胞的周期图及周期谱

Fig. 5. Periodogram and periodic spectrum of various types of cells in the mouse vaginal smear. *A*: Periodic line chart. The data of one pair of mice from five pairs were exhibited to describe percentage changes of various cells during 30 d; *B*: Periodic spectrum by using fast Fourier transform method. Maximum amplitude of *Rev-erb- α ^{+/+}* mice corresponded to the main period of 5.17 d, and maximum amplitude of *Rev-erb- α ^{-/-}* mice primary period of 6.20 d.

5A)。同时，根据 30 d 小鼠阴道涂片的记录数据，假设细胞曲线满足三角函数的线性组合，为了得到与细胞曲线周期最接近的三角函数，利用快速傅立叶变换，将采样点分解成为振幅分量和周期分量。图 5B 中，横坐标表示周期分量 N/n (N 表示采样的

总数， $1 \leq n \leq N - 1$)，而纵坐标代表每个周期的振幅分量，振幅为振幅分量值 $\times N/2$ 得到了小鼠的周期谱 (图 5B)。

图 5A 的周期振荡是依据不同细胞百分比，这里的振荡稳固性是指振荡幅度的大小：当振幅比较

大时, 最小值和最大值的差别就比较大, 实验结果也很明显, 反之振幅比较小的时候, 最小值和最大值的差别就比较小, 检测的误差较大, 就会容易破坏最后对周期的判断。图 5B 是对图 5A 用快速傅立叶分析方法得到的周期谱, 比较有核细胞、角化细胞和白细胞主周期所对应的振幅, 白细胞的主周期振幅最大, 角化细胞次之, 有核细胞最小。在这里, 我们将次周期的振幅忽略不计 (因为次周期的振幅明显小于主周期振幅), 因此主周期所对应的振幅就可以看成是图 5A 的振幅。周期谱图显示, *Rev-erb-α^{+/+}* 小鼠的最高振幅对应的主周期是 5.17 d, 而 *Rev-erb-α^{-/-}* 小鼠最高振幅的主周期为 6.20 d, 较 *Rev-erb-α^{+/+}* 小鼠延长 1.03 d。同时从图中可以看出, 白细胞的振幅最大, 因此振荡稳固性最好, 其次便是角化细胞。所以在用阴道涂片计算小鼠的生理周期时, 以白细胞或角化细胞为标准得到的结果较准确。整合 5 对实验小鼠的数据, 以白细胞的周期为标准统计, *Rev-erb-α^{+/+}* 成年雌性小鼠的发情周期平均为 (5.07 ± 0.04) d, *Rev-erb-α^{-/-}* 的发情周期平均为 (8.29 ± 0.75) d ($P < 0.05$), 差异有统计学意义 (图 6), 提示 *Rev-erb-α* 敲除导致雌性小鼠的生理周期延长

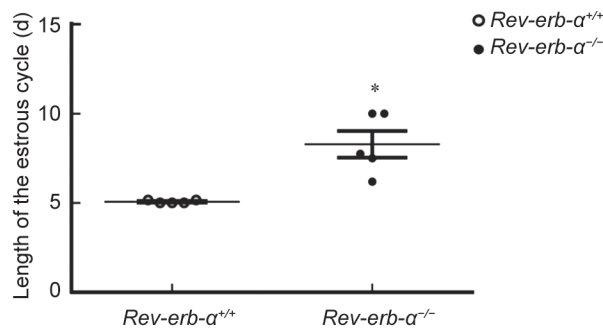


图 6. *Rev-erb-α^{+/+}*与*Rev-erb-α^{-/-}*成年雌性小鼠的发情周期
Fig. 6. Length of estrous cycle of *Rev-erb-α^{+/+}* and *Rev-erb-α^{-/-}* adult female mice. Mean \pm SD, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs *Rev-erb-α^{+/+}* mice.

3 讨论

本研究结果显示, *Rev-erb-α^{-/-}* 雌性小鼠的生理周期较 *Rev-erb-α^{+/+}* 长。因此 *Rev-erb-α* 影响小鼠的生理周期, 影响小鼠的生殖, *Rev-erb-α^{-/-}* 雌性小鼠能够与野生型成年雄鼠交配见栓并能形成早期胚胎。由于所用小鼠为全身敲除型品系, 故 *Rev-erb-α^{-/-}* 雌性小鼠的生理周期延长可能是导致 *Rev-erb-α^{-/-}* 雌性小鼠不能生育的原因之一, 但本研究尚

不能排除其它因素的影响。

在自然界中, 从单细胞, 植物到哺乳动物的所有行为和生命活动均存在着一定的规律和周期性变化, 比如睡眠、物质代谢、能量代谢、体温调节等, 这种 24 h 的昼夜节律是由位于下丘脑 SCN 的内部时钟推动的^[13]。机体内的生物节律产生依赖于 SCN 中基因转录和翻译的正负反馈, 这个反馈环的中心是转录因子 CLOCK 和 BMAL1, 促进 PERs 和 CRYs 的表达。CRYs 和 PERs 作为转录抑制因子会抑制 *Clock* 和 *Bmal1* 的表达, 而 REV-ERB- α 和 RORs 也会调节 *Bmal1* 的转录^[10,14]。破坏生物节律会引发多种病理状态, 尤其会影响机体的生殖功能。研究显示, 在哺乳动物中, 生物钟会调节血清中多种激素 (例如生殖器官发育所必需的雌激素和睾酮^[7]、促进排卵的黄体生成素^[15]) 的水平, 改变光照和黑暗时间会改变性激素峰值的产生和发情周期, 破坏 SCN 和持续光照会导致雌性小鼠持续发情^[16], 而 *Clock* 突变小鼠的性激素水平产生发情周期性紊乱, 这些研究表明生物节律对于生殖系统的正常生理功能具有重要作用。

我们研究使用的 *Rev-erb-α* 敲除小鼠是另一个时钟基因缺陷的模型。*Rev-erb-α^{-/-}* 小鼠在持续黑暗环境下节律变短, 并且相位前移^[5]。*Rev-erb-α^{-/-}* 雌鼠不可育, 并且生理周期延长, 这种生殖缺陷可能是由于卵巢中卵泡发育的异常引起的, 但是 *Rev-erb-α^{-/-}* 卵巢组织切片 HE 染色显示, 各个阶段的卵泡发育都是正常的, 并且能够排卵生成黄体, 这个结果表明 *Rev-erb-α^{-/-}* 雌性小鼠生理周期的延长不是卵巢发育异常导致的。*Rev-erb-α^{-/-}* 雌性小鼠成功交配后能够产生早期胚胎, 但是早期胚胎的数量比野生型小鼠显著减少, 这是否与生理周期的延长有相关性尚不能确定。另一方面 *Rev-erb-α^{-/-}* 小鼠生物节律的异常也可能是导致生理周期延长的原因。正常的生理周期不仅受到卵巢的调节, 中枢神经系统和内分泌系统对于生理周期也有重要作用, 下丘脑 - 垂体调节并释放的促性腺激素调节卵巢中雌激素和孕酮的合成, 这些性激素的水平随着卵泡发育与排卵的发生, 发生周期性改变, 这对于子宫内膜的周期性变化和生理周期的循环非常重要^[17], 至于 *Rev-erb-α* 是否影响这些激素的合成与分泌有待进一步研究。

小鼠生育是一个复杂的过程, 不仅与小鼠生理周期有关, 还与小鼠的排卵及卵子的质量, 受精,

