

哺乳动物昼夜节律调节的神经基础 ——昼夜光感受器*

湛小维 胡志安**

(第三军医大学神经生物学教研室, 重庆 400038)

摘要 哺乳动物昼夜光感受器为一组具有直接感光功能的特殊视网膜神经节细胞, 其基本感光色素为黑视素。昼夜光感受器具有直接、广谱和稳定感受昼夜光变化的功能特点。昼夜光感受器的功能是通过导引作用, 使下丘脑视交叉上核内的昼夜节律活动与外界明-暗周期变化同步。

关键词 昼夜节律, 导引作用, 黑视素, 隐花色素, 视网膜节细胞

学科分类号 Q42

哺乳动物的昼夜节律性活动(包括睡眠、运动、摄食、饮水、体温及内分泌等)主要由下丘脑的视交叉上核调控。视交叉上核的自身节律又受多种授时因子(zeitgeber), 如明-暗周期光信号、环境温度、社交刺激、身体运动、饮食等因素的影响, 这些授时因子通过导引作用(entrainment)使机体的节律性活动与外界环境变化保持同步^[1]。在诸多授时因子中, 来自于明-暗周期的光信号作用尤为令人瞩目。近年的研究发现, 哺乳动物存在一个独立于视觉成像系统以外的非成像感光系统——昼夜光感受系统, 该系统负责感受明-暗周期光信号变化, 其感光分子为黑视素(melanopsin, MLO)。本文拟简要介绍哺乳动物昼夜光感受系统中有关视网膜昼夜光感受器的研究进展。

1 哺乳动物昼夜光感受器形态学基础

通过对视杆、视锥细胞缺失小鼠的研究发现, 哺乳动物昼夜光感受器实际上是一组 MLO 抗体标记为阳性的特殊视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)。这类特殊的 RGCs 具有光敏感性, 因此被称为光敏感性 RGCs。光敏感性 RGCs 主要位于视网膜背侧和颞侧。荧光免疫细胞化学法显示, 大鼠和小鼠的光敏感性 RGCs 分别约占各自 RGCs 总数的 2.5% 和 1%^[2]。

在形态上大鼠光敏感性 RGCs 符合Ⅲ型 RGCs 特征, 它们绝大部分分布于视网膜节细胞层, 另有约 5% 的光敏感性 RGCs 散布于内核层无长突细胞之间。光敏感性 RGCs 的树突和近端轴突呈串珠状, 邻近细胞的树突广泛地交织成网状。无论是节

细胞层的光敏感性 RGCs, 还是位于内核层的光敏感性 RGCs, 其树突均可延伸至内丛状层, 随后在内丛状层与内核层的交界处形成广泛分枝。电镜观察发现, MLO 阳性标记颗粒广泛分布于整个光敏感性 RGCs 的树突中^[3]。

现已知道, 哺乳动物的昼夜光感受器主要投射到视交叉上核。值得注意的是, 光敏感性 RGCs 的部分纤维还可投射到其他脑区。利用逆行标记法和原位杂交法发现, 光敏感性 RGCs 轴突可经视束到达腹外侧膝状体, 并最终终止于膝间小叶。另外, 少部分光敏感性 RGCs 轴突也可投射到下丘脑的亚室旁带、腹外侧视前核以及中脑的橄榄顶盖前核^[4-6]。

2 昼夜光感受器的主要感光分子

哺乳动物的昼夜光感受器有自己特殊的感光分子, 目前基本可以确定的是 MLO。MLO 是 Provencio 等^[7,8]最早于 1998 年在非洲爪蟾感光性皮肤的载黑素细胞内鉴定出的一种新型视蛋白样感光分子。哺乳动物的 MLO 由 Opn4 基因编码, 包含 534 个氨基酸残基, 其氨基酸序列与头足类动物的视蛋白有高度的同源性。MLO 主要见于视网膜 RGCs 层和内核层, 而视杆、视锥细胞以及视网膜以外的其他脑区(如膝状体间小叶、腹外侧膝状体、背外侧膝状体以及橄榄顶盖前核等)迄今未

* 国家自然科学基金资助项目(30270443)。

** 通讯联系人。

Tel: 023-68753704, E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-05-19, 接受日期: 2003-07-09

见有 MLO 的表达。

目前有以下证据支持 MLO 是昼夜感光分子的论点: a. 视网膜的一组节细胞内有 MLO 表达, 且该组节细胞可投射到视交叉上核; b. MLO 与最近发现的一种新型昼夜感光相关神经肽——垂体腺苷酸环化酶活化肽具有共同的细胞定位; c. 能够调节昼夜节律的光线可以引起 MLO 标记阳性的 RGCs 去极化; d. 尽管 MLO 基因敲除小鼠仍能通过光信号的作用与外界明-暗周期保持同步, 但基因敲除小鼠对光线的反应能力却比野生型的低 40%, 从而提示 MLO 在昼夜感光过程中虽非必需, 但却十分重要。

在昼夜节律光导引过程中, 光照导致 MLO 的辅视黄醛分子发生构象改变, 即由原来的 11-顺型转变为全反型, 此反应促进 MLO 与 G-蛋白的 α 亚基相结合, 从而启动光信号传递过程。全反型视黄醛不与视蛋白分离, 可以通过另一种不同波长的光线刺激恢复成 11-顺型^[9~13]。

另一种可能的感光分子是隐花色素 (cryptochrome, CRY)。CRY 是一种与光依赖性 DNA 修复酶相似的黄素蛋白, 属于光裂解酶家族成员。CRY 包括两种形式, 即 CRY1 和 CRY2 (二者有 73% 的同源性)。CRY 被认为是某些植物、昆虫以及非哺乳类脊椎动物 (如两栖类、爬行类和鸟类) 的感光分子。新近研究证实, 果蝇昼夜感光的起搏细胞内存在大量 CRY 蛋白^[14]。CRY1 和 CRY2 的感光过程与甲炔基四氢叶酸和黄素腺嘌呤二核苷酸有关。光量子首先激活甲炔基四氢叶酸, 使其还原为黄素腺嘌呤二核苷酸, 后者通过分子间的氧化还原反应将一个电子传递到 CRY1 或 CRY2 的某个残基中去^[10,15]。

哺乳动物的眼、皮肤、脑等组织中亦有 CRY 分布。原位杂交结果显示, 眼内 CRY1 和 CRY2 基因的表达主要见于 RGCs 层。据最近文献报道, 哺乳动物 CRY 可能作为一种重要的转录因子, 参与生物钟基因转录和翻译的调控^[16]。目前尚无证据证明哺乳动物 CRY 具有昼夜感光功能。

3 昼夜光感受器的感光特性

3.1 直接感光

昼夜光感受细胞可以不依赖于视杆、视锥细胞而直接感光。Berson 等^[17]通过以下实验证实了此结论: a. 利用荧光微球粒注入大鼠下丘脑的视交叉上核, 以此标记出与视交叉上核相联系的 RGCs,

然后运用氯化钴阻断视杆、视锥细胞以及其他神经节细胞对标记细胞的影响, 最后给予光刺激, 结果显示这些细胞同样能够产生电位变化; b. 将标记神经节细胞从视网膜剥离, 这些细胞在离体条件下仍能对光信号发生反应, 由此说明该组 RGCs 具有直接的感光特性。

Foster 等对视杆、视锥细胞缺失小鼠视网膜光谱特性的研究揭示, 视网膜昼夜光感受器的最大吸收光谱为 500 nm 左右, 而感光分子 MLO 的最大吸收光谱为 479 nm, 二者十分相近, 该结果支持 MLO 是哺乳动物视网膜感光分子的论点。最近发现, 人类昼夜感受器的最大吸收光谱约为 483 nm^[6]。

3.2 广谱感光

哺乳动物的视杆、视锥细胞及其双极细胞、神经节细胞等组成的视觉成像系统通常被称为经典感光系统, 其适宜刺激为来自物象细节的单点光线, 这一感光方式就是所谓的窄谱捕集。窄谱捕集的感光方式便于经典感光系统完成光线空间分析, 实现精细的视觉感知功能。与此相反, 昼夜感光系统只对总体光照水平敏感, 其感光方式为广谱捕集。形态学研究证实, 光敏感性 RGCs 及其树突分枝散布于视网膜内, 并且感光分子 MLO 遍及整个树突中。这表明, 光敏感性 RGCs 可以在视网膜的较大范围内参与感光, 进而满足昼夜感光系统对光线进行广谱捕集的要求^[3,18]。

3.3 对光反应相对稳定

光敏感性 RGCs 感知光照水平的另一特点是对光反应的敏感性保持相对稳定。与视杆、视锥细胞不同, 光敏感性 RGCs 对光反应不随光照的变化而立刻发生改变。例如, 当外界光照突然变强时, 视杆、视锥细胞能降低其敏感性, 而光敏感性 RGCs 的敏感性却相对稳定, 它并不随之即刻发生相应变化。虽然光敏感性 RGCs 对光照变化的反应较慢, 但一旦反应发生, 就可以在没有适应的前提下至少持续 20 min, 该特点确保了对平均光照水平稳定的感知, 这正是昼夜节律系统所需要的。也就是说, 昼夜节律系统需要排除视觉干扰的影响, 例如防止瞬时光照对节律位相的影响^[18,19]。

3.4 受视杆、视锥细胞通路的影响

昼夜光感受过程主要依赖光敏感性 RGCs, 但这一过程还可能受到其他途径如视杆、视锥细胞的影响。David-Graya 等发现, 一种生活于洞穴中的盲鼯鼠, 其视杆、视锥细胞虽然不能进行视觉成

像,但却可能具有昼夜感光功能.新近文献报道,大约有1/4的光敏感性RGCs接受视杆、视锥细胞的传入.另外,视交叉上核也可接受来自视杆、视锥细胞的纤维传入.上述证据说明,光导引作用可能并非由光敏感性RGCs单独完成,视杆、视锥细胞在一定程度上参与了光敏感性RGCs的昼夜光感受功能.视杆、视锥细胞如何参与RGCs的光导引作用,目前尚不清楚^[5].

4 昼夜光感受器的生理功能

4.1 调节昼夜节律

在无任何人为给定时间提示的条件下,哺乳动物自身昼夜节律(即自由运转节律)并不是与地球明-暗周期相一致的24 h(例如人类为25.1 h).外界光信号等因素通过生物体自身昼夜节律调节系统使机体的节律活动保持与外界环境同步.目前,对于视网膜昼夜光感受器功能研究的重要实验模型是无视杆、视锥细胞的基因突变小鼠,这种基因突变小鼠仍能通过昼夜节律调节系统维持正常的节律性活动,例如睡眠-觉醒节律、运动节律以及多种激素(如褪黑素、糖皮质激素、甲状腺激素等)的分泌节律等.视网膜昼夜光感受器是昼夜节律调节系统的重要组成部分,它是光导引作用的第一步.如果完全剥离动物昼夜光感受器,机体昼夜节律则出现严重紊乱.在基因突变所致RGCs发育不全的小鼠上发现,光敏感性RGCs对于视交叉上核的昼夜周期维持系统的发育并非必需,但对于光导引作用以及决定昼夜节律周期却十分重要^[20].

在光导引过程中,昼夜光感受器的主要作用是感受和传递光信号.光刺激作用于光敏感性RGCs,引起感光色素分子的构象发生改变,光敏感性RGCs因此而兴奋并释放谷氨酸、垂体腺苷酸环化酶活化肽等递质,通过这些神经递质调节下丘脑视交叉上核的活动,如视交叉上核生物钟基因(如c-fos、per1和per2等)的转录和翻译等.其中,垂体腺苷酸环化酶活化肽的主要作用可能是调节视交叉上核内的谷氨酸信号传递途径,但其具体机制有待进一步证实.此外值得一提的是,少数光敏感性RGCs还可以直接投射到睡眠控制区——下丘脑腹外侧视前区,从而提示,光线有可能通过视网膜感受器传入途径来直接影响机体的睡眠行为.

4.2 其他功能

昼夜光感受器除了参与环境光信号对机体昼夜节律的导引作用以外,最近发现该系统还存在其他

功能(图1):a.少部分感光性RGCs纤维投射到中脑的顶盖前核,参与瞳孔对光反射;b.一部分细胞纤维进入下丘脑的亚室旁带,参与抑制机体的运动活动(即遮蔽效应)^[3].

另外,该系统还参与调节情绪和行为活动.因此,这种新型感光系统在机体的生理和健康方面起着十分重要的作用.

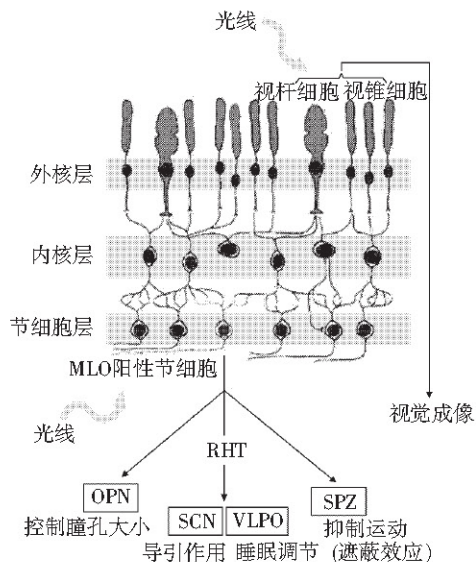


Fig. 1 Schematic model of photoreception in the mammalian retina

图1 哺乳动物视网膜内光感受模式

RHT: 视网膜下丘脑束; OPN: 橄榄顶盖前核; SPZ: 亚室旁带; SCN: 视交叉上核; VLPO: 腹外侧视前核; MLO: 黑视素.

5 结语与展望

上述有关哺乳动物昼夜光感受器的研究发是生物节律研究领域的重大突破.尽管如此,关于哺乳动物昼夜光感受器的诸多问题仍有待进一步阐明,如昼夜光感受器的分子感光机制、与视杆、视锥细胞功能联系、昼夜光感受器在整个昼夜节律调节系统中的功能地位等.我们相信,深入了解昼夜光感受器的功能,揭示生物节律的神经机制,将为解决人类日益严重的昼夜节律和睡眠紊乱等问题提供新的途径.

致谢 美国南卡罗来纳大学昼夜节律实验室 Refinetti 教授提供了大量资料和宝贵意见.第三军医大学生理教研室李希成教授、劳动卫生教研室余争平教授仔细审阅了本文.在此,一并致谢.

参 考 文 献

- Refinetti R. Circadian Physiology. Florida: CRC Press LLC, 2000. 61 ~ 69
- Freedman M S, Lucas R J, Soni B, *et al.* Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, 1999, **284** (5413): 502 ~ 504
- Hattar S, Liao H W, Takao M, *et al.* Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 2002, **295** (5557): 1065 ~ 1070
- Bellingham J, Foster R G. Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Research*, 2002, **309** (1): 57 ~ 71
- Foster R G, Hankins M W. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retina Eye Res*, 2002, **21** (6): 507 ~ 527
- Lu J, Shiromani P, Saper C B. Retinal input to the sleep-active ventrolateral preoptic nucleus in the rat. *Neuroscience*, 1999, **93** (1): 209 ~ 214
- Provencio I, Rodriguez I R, Jiang G, *et al.* A novel human opsin in the inner retina. *J Neuroscience*, 2000, **20** (2): 600 ~ 605
- Provencio I, Jiang G, De-Grip W J, *et al.* Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1998, **95** (1): 340 ~ 345
- Provencio I, Sugden D, Green C B, *et al.* Cultured amphibian melanophores: a model system to study melanopsin photobiology. *Meth in Enzym*, 2000, **316**: 291 ~ 309
- Wolf G. Three vitamins are involved in regulation of the circadian rhythm. *Nutrition Reviews*, 2002, **60** (8): 257 ~ 260
- Panda S, Sato TK, Castrucci A M, *et al.* Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*, 2002, **298** (5601): 2213 ~ 2216
- Ruby N F, Brennan T J, Xie X, *et al.* Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 2002, **298** (5601): 2211 ~ 2213
- Michael M. Circadian rhythms: circadian photoreception. *Science*, 2003, **299** (5604): 213 ~ 214
- Helfrich-Forster C, Winter C, Hofbauer A, *et al.* The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, 2001, **30** (1): 249 ~ 261
- Lucas R J, Foster R G. Circadian clocks: a cry in the dark? *Curr Biol*, 1999, **9** (21): 825-828
- Paul F D. Signs of the time: environmental input to the circadian clock. *J Exper Botany*, 2002, **53** (374): 1535 ~ 1550
- Berson D M, Dunn F A, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 2002, **295** (5557): 1070 ~ 1073
- Provencio I, Rollag M D, Castrucci A M. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, 2002, **415** (6871): 493
- Barinaga M. Circadian clock: how the brain's clock gets daily enlightenment. *Science*, 2002, **295** (5557): 955 ~ 957
- Wee R, Castrucci A M, Provencio I. Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in *math5^{-/-}* mice. *J Neuro*, 2002, **22** (23): 10427 ~ 10433

Neurophysiological Basis of The Regulation of Circadian Rhythms in Mammals: Circadian Photoreceptor*

CHEN Xiao-Wei, HU Zhi-An**

(Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Circadian photoreceptor in mammals is a kind of specific retinal ganglion cells which are light sensitive. Melanopsin has been proposed as an important photoreceptive molecule for the mammalian circadian system. Circadian photoreceptors are functionally characterized by the direct sensitivity to light with broad spectrum and the relatively high stability. The major circadian pacemaker in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus is entrained to the light/dark cycles from the outside world by circadian photoreceptors.

Key words circadian rhythms, entrainment, melanopsin, cryptochrome, retinal ganglion cells

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30270443).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68753704, E-mail: zhianhu@yahoo.com.cn

Received: May 19, 2003 Accepted: July 9, 2003