

生物钟研究史话



撰文

奇云（淮南联合大学）

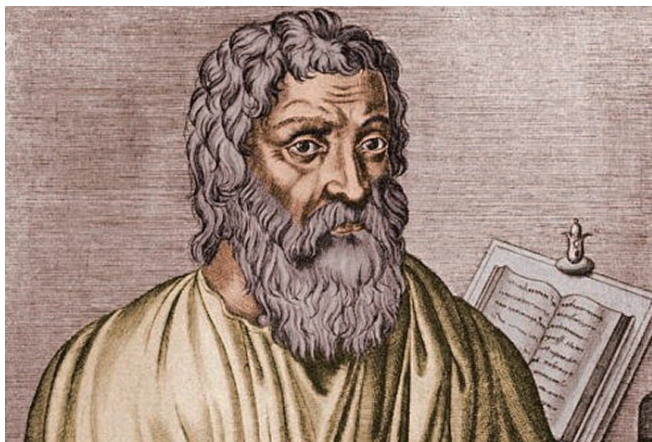
三位美国科学家历时几十年，从果蝇处见微知著，发现了生物钟运行背后的分子机制，荣获了2017年诺贝尔生理学或医学奖。虽然获奖者只有杰弗里·霍尔（Jeffrey C. Hall）、迈克尔·罗斯巴什（Michael Rosbash）和迈克尔·杨

（Michael W. Young）三位，但在生物钟研究的背后，是一系列艰难曲折的探索故事和一长串孜孜不倦的探索者名单。正是由于他们的信念和坚守，才使得生物钟的分子机制研究，激荡出朵朵晶莹剔透的科学浪花。现在，让我们采撷其中几朵和大家共享。

人类早期对生物钟现象的关注

人类最早认识到的生物钟现象，是人自身的周期性变化以及植物的叶、花的朝夕节律性变化。早在古希腊的希波克拉底（Hippocrates）时代，这位令人崇敬的医学先驱者就指出：人的健康、情绪是在他降临人世时就决定了的。希波克拉底嘱咐他的学生们，在诊治疾病时要注意患者的出生年月与病情的发展日期之间波动的情况。

在公元前300年的战国时期，中医经典《黄帝



古希腊学者希波克拉底

由艺术家重新绘制的植物学家林奈的“花钟”



内经》就详细描述了人的身体状况随季节变动而变化的周期性现象。当时的医疗先贤们认为：“人与天地相应”应“因时施治”。即人体功能、活动、病理变化等，受自然界气候变化、时日等影响，而呈现一定的规律性变化，应该选择适当时间治疗疾病，以获得较佳疗效。他们在长期的生活和医疗实践中发现，每日十二时辰的阴阳兴衰，与人体十二经脉的阴阳兴衰相互呼应，时辰变化影响人体经脉气血运行，由此而总结出了“子午流注理论”。当然，中医的子午流注诊疗理论等体现了古人对人体生物钟的直观认识，但缺乏微观求证，理论只停留在直观层面，应用也仅仅停留在“因时施治”“按时给药”等经验层次，并没有深究其背后复杂的基因根源或机理。所以，那些声称“中国人在生物钟研究上的贡献比三位诺奖得主的贡献还大”的人，完全是在夸大其词。

最早关于生物钟记载的故事，发生在公元前300多年。古马其顿国王亚历山大大帝（Alexander the Great）就曾着迷于酸豆树每天按时的开花、凋零现象。他手下的船长安德罗斯申尼斯（Androsthenes），曾向亚历山大大帝描述罗望子树的树叶昼夜开合的现象。达尔文也研究过植物的昼夜节律，并提出昼夜节律的可遗传性。在希腊神话中，花神克洛里



瑞典博物学家卡尔·林奈

斯（Chloris）就是由宙斯之女、掌管季节并代表时间的时序之神霍莉（Horae）协助的。到公元17世纪，英国诗人安德鲁·马维尔（Andrew Marvell）就曾在诗中提及了一种花钟（1681年）——由不同植物做成的时钟，它们的花在一天中开放的时间不同：如此甜美健康的时辰，除了用碧草与鲜花来计算，别无他途！

正式提出和记载植物生物钟现象的人，是如今人们熟知的、以创建动植物分类和双名命名法而享誉世界的瑞典博物学家卡尔·林奈（Carolus Linnaeus）。1751年，他注意到黄鹌菜和蒲公英每天都以半小时为周期绽放、凋落。于是，林奈就把它们和金丝桃、万寿菊、睡莲等不同时间开放的花种在一起，把花圃修建得像钟面一样，组成花的“时钟”。这些花在二十四小时内陆续开放，人们只要看看什么花刚刚开放，就知道大致是几点钟。



ELEMENTS OF THE PHILOSOPHY OF PLANTS:
CONTAINING THE PRINCIPLES OF SCIENTIFIC
BOTANY ... WITH A HISTORY OF THE
SCIENCE, AND PRACTICAL ILLUSTRATIONS

AUGUSTIN PYRAMUS DE CANDOLLE, KURT POLYCARP JOACHIM SPRENGEL



上：瑞士植物学家德堪多关于植物内在节律的著作
下：法国天文学家让-雅克·道托思·麦兰

6世纪末，英国剑桥大学彼得豪斯学院建造了一座老式花钟，它的12个罗马数字是用经过修剪的黄杨灌木造型的，指针用砍去树枝的紫杉来充当，在罗马数字外，栽上对应时间开放或闭合的花卉，这样可较正确地反映一天的钟点。

载入生物钟研究史册的含羞草

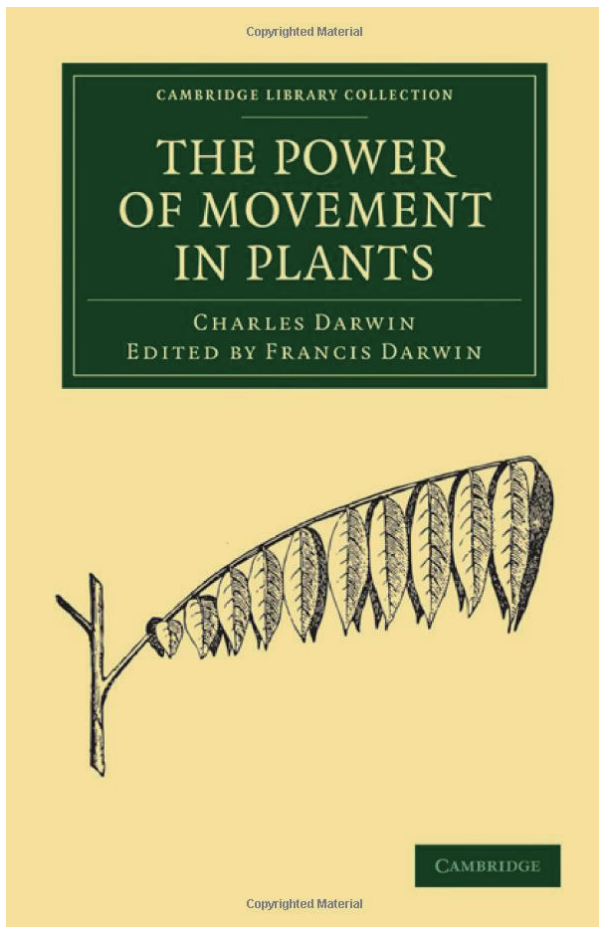
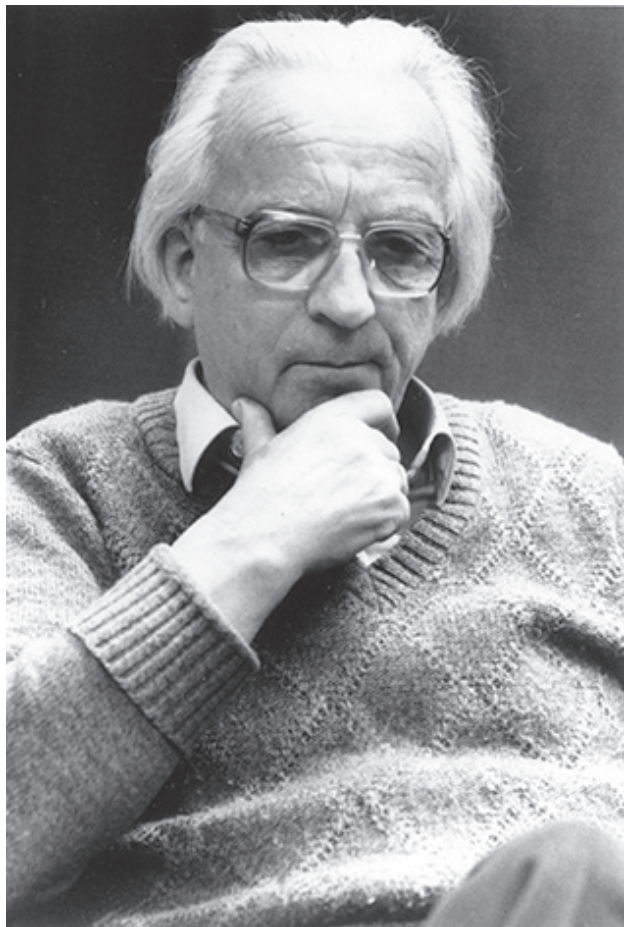
谈及生物钟研究的历史，绕不开一盆聪明的含羞草。

1729年，法国天文学家让-雅克·道托思·麦兰 (Jean-Jacques d'Ortous de Mairan) 观察到，含羞草在白天的时候会精神抖擞地展开叶片，而到了夜晚，它们的叶片就会合拢垂下。他不禁好奇起来，于是便把含羞草放到一个不透光的碗橱里，试图看看含羞草的叶片会不会发生变化。

观察它在黑暗环境中的反应后发现，从不同时间段的观察结果来看，尽管含羞草一直在暗处，但它的叶子仍然有节奏地开合——仿佛有自己的昼夜时间表。在它的“主观黑夜”里，它的叶子打蔫，而在它的“主观白天”里，叶子又挺起来。此外，所有的叶子都在同一时间完成这一活动。可以说，是麦兰第一次记录了内源性



含羞草叶片展开和闭合



左：德国生物学家欧文·本林 右：查尔斯·达尔文和他的儿子合著的《植物活动的力量》

的，而不是光或其他外因造成的昼夜节律性的振荡。当然，麦兰并没有意识到生物钟的存在。他只是认为，含羞草可以通过特别的手段，或许是靠温度的变化，来感知阳光。麦兰的这个发现，比“昼夜节律”这个词的正规使用还早了230年。

继麦兰之后，法国农学家亨利-路易斯·杜哈麦·芒修 (Henri-Louis Duhamel du Monceau) 做了一个类似的实验。他把含羞草放到一个黑暗并保持温度恒定的环境中，发现含羞草叶片的昼夜变化仍然存在。由此他认为，植物的叶在恒定的条件下的律动周期，不仅不依赖光，而且不依赖温度，它的存在是内源性的。

查尔斯·达尔文 (Charles Darwin) 对这些发现深感兴趣，他设计了一种装置来测量叶子的活动，并在与儿子合著的《植物活动的力量》

(*The Power of Movement in Plants*) 一书中发表了自己的研究成果 (1880年)。但是，直到欧文·本林 (Erwin Bünning) 在德国进行开创性研究，对生物节律严格的科学研究才算真正开始。1930年，本林发现，在恒定的黑暗环境中，普通菜豆的叶子以平均24.4小时为周期做振荡运动。由此，他确定了昼夜节律生物钟的一个显著特点：当处于恒定环境时，植物以接近但不是刚好24小时为周期做节律运动。在持续的光亮或黑暗环境下的这种活动模式叫作“自由运转节律” (free-running rhythm)。这种节律是生来就有的，并固定存在于基因组之中，所以明暗周期或其他诱因可以让这种节律协调同步，但却不能引发它。这种自由运转节律就好像是遗传的时钟一样嘀嗒作响。

对生物钟的广泛和深入的研究是从20

世纪中期开始的。德国生物学家欧文·本林、尤金·沃尔特·路德维格·阿绍夫 (Jürgen Walther Ludwig Aschoff) 和美国生物学家科林·皮登觉 (Colin Pittendrigh) 被认为是生物钟研究的开创者。本林研究的是植物的叶闭合活动的生物钟行为, 阿绍夫研究的是人的体温、活动等和鸟类的一些生物钟行为, 而皮登觉研究的则是果蝇运动的生物钟行为。

他们三人所研究的生物系统虽然不同, 但总结出几乎相同的关于生物钟的几个基本特征: 生物钟是内源的、自主的、不依赖于环境变化的生物节律; 昼夜节律的生物钟周期近于24小时; 生物钟能在不同的温度条件下保持稳定; 光照不是产生生物钟节律的原因, 但它能够调节和重置昼夜节律生物钟的相, 并使其同步。

第一幅人体生物节律曲线图

在日常生活中, 几乎每个人都有这么一种感觉: 有时体力充沛, 情绪饱满, 精神焕发, 而有时却又感到浑身疲乏, 情绪低落, 精神萎靡。迥

然不同的两种情况是怎么在同一个人身上发生的呢?

20世纪初, 德国内科医生威尔赫姆·弗里斯 (Wilhelm Fliess) 和奥地利心理学家赫尔曼·斯瓦波达 (Alfred Teltcher), 这两位素不相识的科学家, 各自通过长期的观察、研究, 然后用统计学的方法对观察到的大量事实进行分析后惊奇地发现: 人的体力、情绪和智力的变化是有规律的。人的体力存在着一个从出生之日算起, 以23天为一周期的“体力盛衰周期”; 人的感情和精神状况则存在着一个从出生之日算起, 以28天为一周期的“情绪波动周期”。大约过了20年, 奥地利因斯布鲁大学的阿尔弗雷特·泰尔其尔 (Alfred Telmore) 教授在研究了数百名高中和大学学生的考试成绩后发现: 人的智力存在着一个从出生之日算起, 以33天为一个周期的“智力强弱周期”。

他们的发现, 揭开了人的体力、情绪和智力存在着周期性变化的秘密。后来, 人们把这三位科学家发现的三个生物节律 (也就是生物钟) 总结为“人体生物三节律”, 外国人叫作“PSI周期”。PSI是英文Physical (体力)、Sensitive (情绪)、Intellectual (智力) 的缩写。

后来科学家们又发现: 人的体力状况、情绪和智力状况, 按正弦曲线规律变化。人的体力、情绪与智力“生物三节律”中, 可分为“高潮期”“低潮期”“临界点”“临界期”。于是, 科学家们将体力、情绪与智力盛衰起伏的周期性节奏, 绘制出了三条波浪形的人体生物节律曲线图, 被形象地喻为一曲优美的生命重奏。

1946年, 瑞典商人乔治·汤姆 (George Tom) 听说他的一位朋友汉斯·弗若恩 (Hans Fron) 在一次火车相撞事故发生之后, 计算了出事的两列火车上的司机和司炉的人体生物节律曲线图, 出乎意外地发现其中三人生物节律处在“临界期”, 另一人生物节律则处于“低潮期”。一年以后, 另一起几乎类似的事发生了。乔治这次计算了事故中的司机和司炉的人体生物节律曲线图。他发现一个司机的两个生物节律周期正处于“低潮期”, 另一个司机和一名司炉



左为德国内科医生威尔赫姆·弗里斯

则处于“临界期”，第四位司炉的三个生物周期全部处于“低潮期”。乔治想起了汉斯的计算结果，看来两次事故中责任人的生物节律结果与事故发生的关系并非巧合。于是，乔治开始弃商从学，开始了生物节奏方面的深入研究。

这个时期的生物钟研究，虽然对生物钟存在的普遍性以及生物钟的某些基本特征和规律有了较为深入的了解，但此时的研究还基本停留在对现象的描述和对机理的猜想阶段，而对生物钟的元件和运行机理还一无所知。

生物钟研究历史上的重大突破

19世纪的生物钟研究只停留在植物学，而到了20世纪由于生态学、动物行为学、原生动物学、进化生物学、哺乳动物生理学以及人类生物医学、农学等学科的发展，人们发现这是存在于包括人类在内的多种生物体内的现象。而这个时钟其实有助于我们为日常的生理机能做好准备，这种规律性的适应被称为“昼夜节律”，但是人体内部生物钟的工作原理仍然是个谜。

到了20世纪60年代，生物钟的研究已经形成了一个细分的领域。1960年举行的冷泉港会议成了该领域的重要事件，会议后科林·皮坦德里格 (Colin Pittendrigh) 总结了16条生物钟特性。尽管当时大多数人相信生物钟是由内在因素导致的，但弗兰克·布朗 (Frank Brown) 等人却相信生物钟是由与地球自转相关的物质引起的。

如果要研究一个生物体内的体系，那么我们必须清楚该体系的性质，与此相关的解剖学位置，而且必须阐明它的内在机制。当时已经发现生物钟几乎与物理时钟一样精准，但却具有一定的适应性和动态性，而且几乎所有的真核生物都存在生物钟。如果要研究生物钟的内在机制，尽管当时存在争议，但基因研究仍然是比较好的策略。

最早研究果蝇生物钟分子机理的是美国生物学家西莫尔·本泽 (Seymour Benzer) 和他的学生罗纳·康诺普卡 (Ronald Konopka)。



美国生物学家西莫尔·本泽

本泽利用他在工程物理上的专长研究果蝇的行为，还发展了记录果蝇脑电、眼电的种种技术。果蝇的破蛹羽化有着特定节律，野生品种只在一天中的特定时刻出蛹，周期是24小时。在1971年，他们首先用化合物诱导了果蝇DNA的突变，然后从发生了基因突变的子代果蝇中筛选到了生物钟行为发生了改变的果蝇突变种。这些突变种果蝇，有的是完全失去了昼夜节律的变种，叫“无周期突变”；有的虽然仍然保持规律性的运动，但它们的昼夜节律周期变得长短不一，有的比24小时长，叫“长周期突变”，有的比24小时短，叫“短周期突变”；有的昼夜节律完全消失，成为一个“夜游神”——白天睡觉，晚上嗡嗡叫。而最重要的是，康诺普卡和本泽发现，这些昼夜节律发生变化的突变果蝇，在基因组的同一区域都发生了突变，从而定位到了一个生物钟基因。他们给这个新基因起了个名字：周期基因 (period gene, 简称per)。但限于技术发展水平，人们当时无法弄清这个基因的代码序列，因为克隆果蝇DNA的技术于20世纪70年代晚期才出现。

需要说明的是，本泽和他的学生仅仅从两千只果蝇中，就筛选到三只突变果蝇，而且竟然是同一个基因的三个影响完全不一样的突变。遗传学研究的历史上，可能只有这一次小规模筛选



2017年诺贝尔生理学或医学奖得主，从左到右分别是迈克尔·罗斯巴什、杰弗里·霍尔、迈克尔·杨

中，出现一个基因的三个功能改变的情况。这是生物钟研究历史上的惊天大事！

遗憾的是，本泽2007年去世，康诺普卡2015年去世。如果他们都健在的话，生物钟的诺奖历史恐怕要重新改写。2017年诺贝尔生理学或医学奖获得者之一罗斯巴什，在为康诺普卡撰写的悼词中说，“无法想象，如果没有本泽和康诺普卡，生物钟基因研究领域会是什么样”，足见本泽和康诺普卡1971年发现*per*基因的开山意义。

基因的一切功能就是给蛋白质编码，而蛋白质则完成有机体的绝大部分功能，担当的角色有调节器、酶、信号传输分子，以及细胞的结构成分。假如*per*真的存在的话，那么就一定有一种相

应的蛋白质PER。那么这种蛋白质是什么呢？它在哪里？它的功能又是什么？在20世纪70年代要回答这些问题还相当困难，因为分子生物学家需要用到的一些实验手段，比如基因克隆、聚合酶链式反应、基因数据库等在当时根本还未出现。

最初，人们认为PER在细胞连接处发挥作用，以便细胞间进行交流。但直到数年之后，了解PER是如何参与生物钟功能的研究才迈出关键的第一步。凯西·西维基(Kathy Siwicki)和杰夫·霍尔(Jeff Hall)（本泽的另一个学生）在果蝇体内的单细胞中发现并定位了PER。1988年他们发现，尽管在身体的许多不同组织中都存在PER，但果蝇大脑（侧神经元）和眼睛的一小部分细胞中的PER蛋白质丰度存在24小时节律。

发现并克隆出果蝇生物钟基因

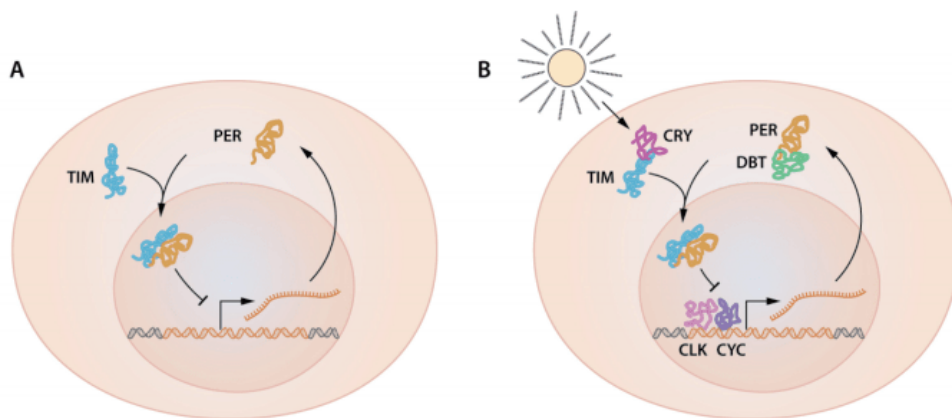
尽管本泽和康诺普卡发现了果蝇的生物钟基因 per ，但调节果蝇昼夜节律的具体机制仍是个谜。那么，这个基因是如何影响节律的呢？这时候，三位未来的2017年诺贝尔生理学或医学奖得主陆续出场了！他们经过十多年的艰苦探索，揭开了生物钟运行背后的分子机制。

故事很长、很曲折。这里，仅对三位诺奖获得者的研究成果和昼夜节律运行的分子机制小结一下，他们发现三个控制昼夜节律的基因，分别为：周期基因（period gene，简称 per ）、恒定基因（timeless gene，简称 tim ）和双倍时间基因（doubletime gene，简称 dou ）。 Per 基因会编码PER蛋白质，这种蛋白质在夜晚通过 tim 基因编码产生的TIM蛋白质从细胞质转移到细胞核，并在细胞核中堆积，而PER蛋白质在白天降解，这一个堆积降解的过程约为24小时，对应着人们的白昼和黑夜。 Dou 基因编码的DBT蛋白的作用，就是减缓PER蛋白的积累，从而可以实

现昼夜节律的精确调控。如果把控制人昼夜节律的过程比喻成锁和钥匙的话，那么解开这把锁需要两把钥匙：一把名为PER蛋白，由叫 per 基因的把控；另一把叫TIM蛋白，由 tim 基因掌控。而开门的频率，则由 dou 基因编码的DBT蛋白掌控。这就是昼夜节律的大致过程。在这个过程中：TIM蛋白和PER蛋白一起绑定后进入细胞核会抑制 per 基因的表达；而另一个关键的发现是TIM蛋白可以根据日照来进行昼夜节律的调节，这就是人们常说的“倒时差”的过程，就是TIM蛋白在起作用。而在这个过程中，三位诺主的齐心协力合作才使得一个完整的昼夜节律的轮转过程被呈现在世人面前。

这三位新科诺贝尔奖得主的研究，阐述了生物钟的理论基础。在随后的几年里，其他一些生物钟基因也陆续被发现，进一步解释了生物钟的机理和稳定性。随着一个个调控基因的发现和研究，生物钟的内在机理也逐渐明朗。

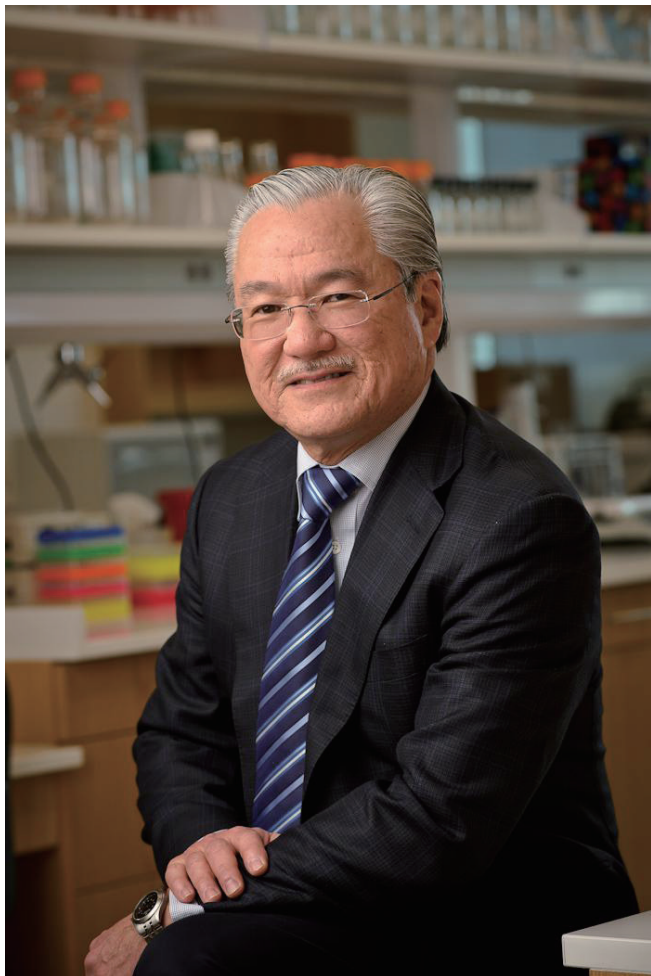
需要说明的是，在获得诺贝尔奖的工作过程中，这3位科学家的工作既相对独立又相互关联，霍尔和罗斯巴什合作克隆了第一个生物钟基



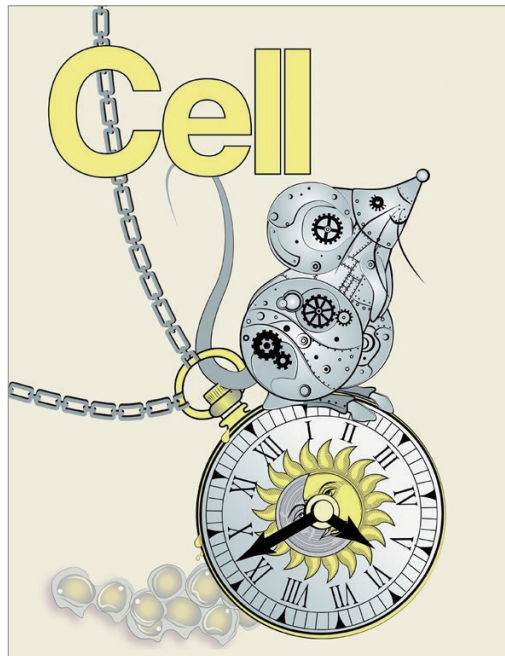
周期基因反馈调节机制

A 周期mRNA和PER蛋白的浓度都在振荡，PER蛋白在周期mRNA达峰值后数小时积聚。PER蛋白定位于细胞核中，并且在 per 基因（周期基因）活性由于PER蛋白反馈抑制其自身基因而产生振荡。

B 额外的蛋白质对 per 基因（周期基因）的振荡是必需的。由恒定基因 tim 编码的TIM也在振荡，并与PER蛋白相互作用。这种相互作用对PER蛋白的积累和对周期基因的抑制至关重要。DBT蛋白由双倍时间基因 dou 编码。DBT是磷酸化PER的蛋白激酶，导致PER蛋白降解。DBT介导的PER蛋白降解促进了周期mRNA与PER蛋白积累之间的延迟。由时钟和周期基因编码的CLK和CYC是激活周期基因的两种转录因子。



美国日裔科学家约瑟夫·高桥



1997年，高桥实验室在《细胞》杂志发表两篇论文，报道他们克隆的小鼠*clock*基因

因*per*，发现了不同细胞的生物钟之间的协调同步，完善了昼夜节律分子机理的转录翻译负反馈调控（transcription translation negative feedback, TTFL）模型。杨的主要贡献是与霍尔和罗斯巴什同时独立克隆了*per*基因。其后，他又克隆了另一个生物钟基因*tim*，发现了TIM和PER蛋白的相互作用及功能，并发现了光对TIM的调控以及对生物钟相位的调控。

找到哺乳类生物钟基因的英雄

如果果蝇的*per*基因只是在果蝇和昆虫里起作用，那么意义就有限。如果找到高等动物的*per*基因并因此开启研究高等动物生物钟的分

子机理，那么意义就很大了。

进一步的一个重要工作是确认能否在其他生物中找到同样的基因、调控因子和同样的调控机理，尤其找到哺乳类生物钟的基因。

果蝇的*per*基因在1984年被克隆后，长期有人试图在高等动物中寻找*per*基因，但无结果。一般来说，一个基因在低等动物中被发现后，在高等动物中比较容易找到，有多种方法可以通过DNA序列相似性找到。找不到有几种可能：*per*基因在高等动物中不存在，例如果蝇的生物钟可能与高等动物的生物钟不同，也可能是果蝇和高等动物生物钟大体类似但其中有分子不同（如果蝇用*per*，但高等动物不用）。另一可能是研究者技术上的问题，在高等动物中存在*per*

基因, 但未被找到。从1984年到1997年, 在众人的努力都找不到哺乳动物 per 基因的情况下, 很多人灰心丧气地认为恐怕哺乳类无 per 基因。

1994年, 在美国德克萨斯大学达拉斯西南医学中心工作的日裔科学家约瑟夫·高桥 (Joseph S Takahashi) 决定用小鼠做遗传筛选。正如本泽在对果蝇进行研究所做的那样, 他们让小鼠接触诱变剂, 然后研究诱变后子代小鼠的昼夜节律有无异常现象。和小鼠相比, 小小的果蝇繁殖力旺盛, 需要的空间不大, 而且也不需要怎么养护, 因此在过去几百年来一直是研究的首选对象。而小鼠就不行, 要进行果蝇那样的昼夜节律筛选所花的成本和时间起码要多100倍。高桥打算筛选数千只小鼠, 但刚找了25只就发现了一个具有长昼夜节律周期的突变小鼠, 从而发现了影响小鼠生物钟的基因, 他们将这个基因命名为“钟”(Clock)。正常小鼠生物钟的周期是23.7小时, 基因突变的小鼠的昼夜节律为24.8小时, 变化可谓微妙, 需要可靠的检测才能发现。从杂合体检测出微小但可靠的变化后, 高桥实验室很容易通过交配小鼠而获得 $clock$ 基因突变的纯合体, 其表型很强: 完全丧失节律。

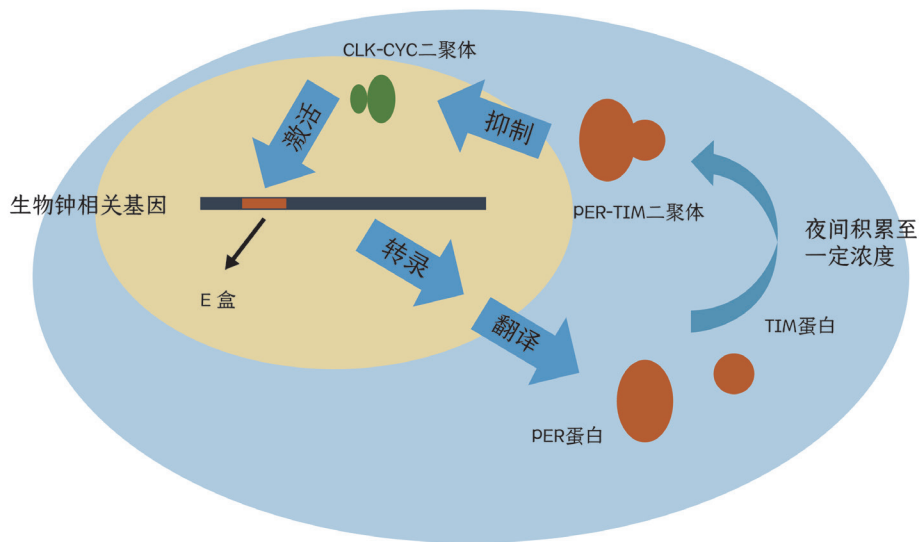
1997年, 高桥实验室在《细胞》杂志发表两篇论文, 报道他们克隆的小鼠 $clock$ 基因。接着, 高桥团队还发现人、鸡、蜥蜴、蛙、鱼等也

都有 $clock$ 基因。有趣的是, 1998年, 霍尔—罗斯巴什小组通过遗传筛选, 在果蝇中找到的 Jrk 基因即果蝇的 $clock$ 基因。这样, 在果蝇中发现的 per 基因在哺乳类中找到了, 而在小鼠上发现的 $clock$ 基因也在果蝇中发现。这种生物钟基因的高度保守性, 显示了生物钟在基因水平的共同性、普适性和可遗传性。

之所以把高桥称为“英雄”, 是因为高桥实验室用小鼠筛选生物钟突变基因需要勇气。大家都知道, 果蝇很小、生活周期短, 选用果蝇做实验方便且便宜, 用小鼠要贵很多。运气不好的话, 需要超过十万只的小鼠才能筛一遍。1994年, 可能世界上没有一个实验室认为自己有足够的经费。很可能用完了经费, 还找不到影响小鼠生物钟的基因, 所以没人敢做。难怪当时有人笑话高桥是胆大妄为。

现在, 越来越多的科学家加入到生物钟分子机制的研究领域, 分离出大量调控生物钟的基因。他们逐渐发现, 生物钟实际上是一个非常复杂的调控网络, 不管是基因突变原因, 还是环境变化原因, 任何一个环节发生紊乱都会引发昼夜节律异常, 严重时将引发一系列疾病。而科学家对生物钟的深入研究, 也将为这些疾病的预防和治疗提供巨大的帮助。

(责编 桑新华)



生物钟的转录翻译负反馈回路图解 绘图 / Tianyi