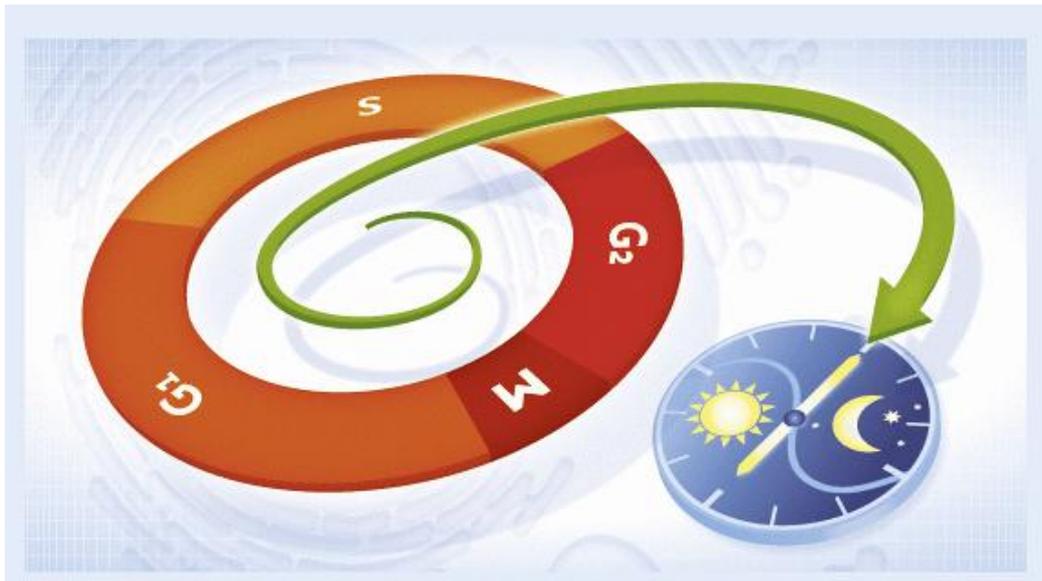


# Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells

(动物细胞中昼夜节律与细胞周期之间的稳健同步)



报告人：陶婧芬  
翻译：李根



华中农业大学

HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

- 
- **Introduction**
  - **Materials and Methods**
  - **Results**
  - **Discussion**
  - **Summary**



華中農業大學

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Introduction:

对于动物细胞来说，在一天范围内昼夜周期和细胞周期是两个基本的周期过程。

- 生物钟是细胞自主和自我持续周期**24h**，并认为是细胞的节拍器，从时间上控制细胞的关键生理活动包括代谢、氧化还原平衡、染色质表观遗传和转录水平以及细胞信号。
- 在生长条件下，细胞周期的连续分裂和生长同时被认为是一个周期过程。动物细胞分裂的持续周期通常也被认为是**1天**。

理论结果是这两个周期之间的耦合导致同步也就是锁模。



华中农业大学

HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Introduction:

- 通过几天时间内的**NIH3T3**成纤维小鼠细胞的实时成像技术预测这两种周期循环的相互作用。分析数以千计细胞分裂的昼夜周期。结果表明两个周期以**1: 1**的锁模运行，且细胞分裂发生在紧挨着的报告基因**Rev-Erba-YFP**基因的表达达到峰值的前**5h**。
- 而且，温度、基因和药物的干扰表明相互作用的两个细胞周期显示同步，并且在一个很宽的参数范围表现很强的鲁棒性。



华中农业大学

HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Materials and Methods:

## ◆细胞培养:

NIH3T3-Rev-VNP-1细胞, shScramble-NIH3T3-Rev-VNP-1细胞, shCry2-NIH3T3-Rev-VNP-1细胞, HeLa细胞中加入10%FCS和1%PSG抗生素的DMEM。当不同的FCS浓度NIH3T3-Rev-VNP-1细胞在转换到新浓度的一天前开始记录。

昼夜周期复位在100 $\mu$ m的地塞米松30min或者10 $\mu$ m的毛喉素, 细胞周期的扰乱使用CDK1抑制剂RO-3306或者CDK1/2抑制剂 II NU-6102在1,5,7,10 $\mu$ m的浓度。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Materials and Methods:

## ◆ 荧光显微实时成像技术:

使用自定义的方法将单个荧光图像分离，同时使用标准算法进行追踪。昼夜周期Rev-Erba-YFP的峰值时间自动的从单细胞信号中探测，同时分次通过数据跟踪和荧光信号进行检测。每个图像的分割都进行人工验证和矫正，同样的每个昼夜峰和细胞分裂峰也是。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Materials and Methods:

## ◆ 增值实验:

细胞使用自动细胞计数器，HeLa or NIH3T3-Rev-VNP-1细胞在各种条件下同时经过48h在0.1%DMSO和5 $\mu$ mLongdaysin（可影响生物钟的新型化合物）计数。在0.2%Trypan蓝的DMEM稀释液中细胞消化和下沉和悬浮。

## ◆ 昼夜周期的瞬时估计:

预测Rev-Erba-YFP信号发出的荧光推测昼夜阶段使用Markov模型，最有可能的瞬时位置的结果和幅度由Viterbi算法得出。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

## 随机相位模型

使用 $\theta=0$ 对应昼夜周期的峰， $\Phi = 0$ 代表一个有丝分裂。  
一般的随机耦合微分方程：

$$\begin{aligned}d\theta_1 &= 2\pi/T_1 dt + F_1(\theta_1, \varphi_1) dt + \sigma_1 dW_1 \\d\varphi_1 &= 2\pi/T_2 dt + F_2(\theta_1, \varphi_1) dt + \sigma_2 dY_1\end{aligned}$$

在两个周期之间缺少互作时，阶段遵循布朗运动，伴随固有周期 $T_1$ 和 $T_2$ 以及扩散系数 $\sigma_1\sigma_2$ 。 $dW_t$ 和 $dY_t$ 是两个独立的Wiener过程。两个周期的互作是由两个函数描述， $F_1$ 和 $F_2$ 。 $F_1$ 代表细胞周期在昼夜时钟上的影响，正的的代表促进，负的代表抑制。同样的 $F_2$ 则是昼夜周期在细胞周期上的影响。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Materials and Methods:

通过系统分析细胞周期和昼夜周期之间的耦合性，通过实时成像技术显示的在生物钟控制下的含有荧光标记的小鼠成纤维细胞。半自动单细胞分离可跟踪单细胞昼夜节律和预估分裂时间，使我们能够收集足够的定量分析两个过程在多条件下的相互关系，包括几种血清浓度，不同的温度，药物干扰一个或者两个细胞周期，还有shRNA抑制昼夜节律器。



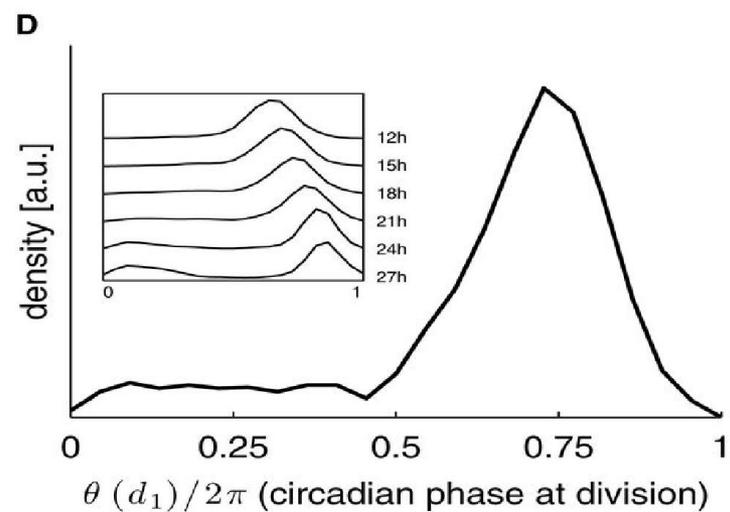
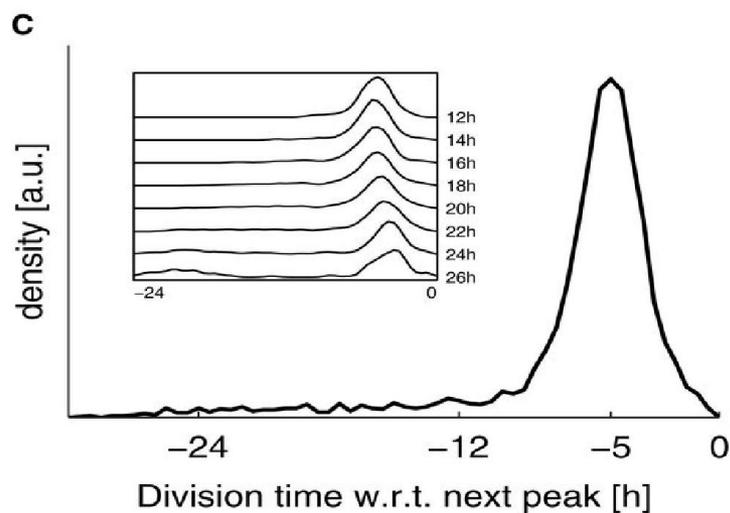
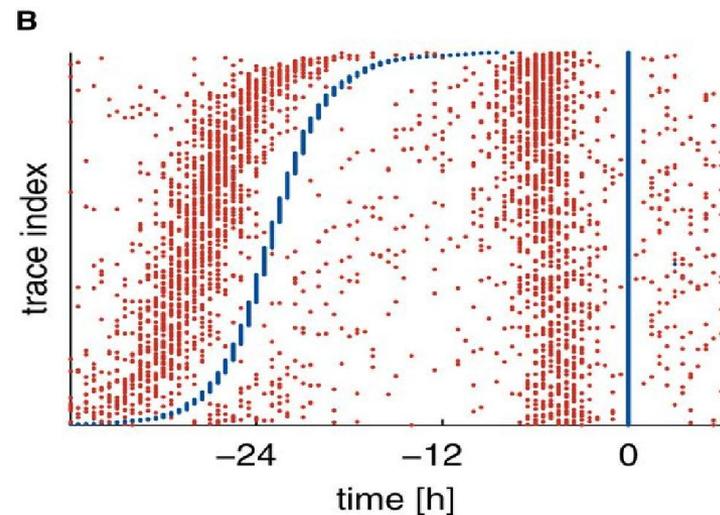
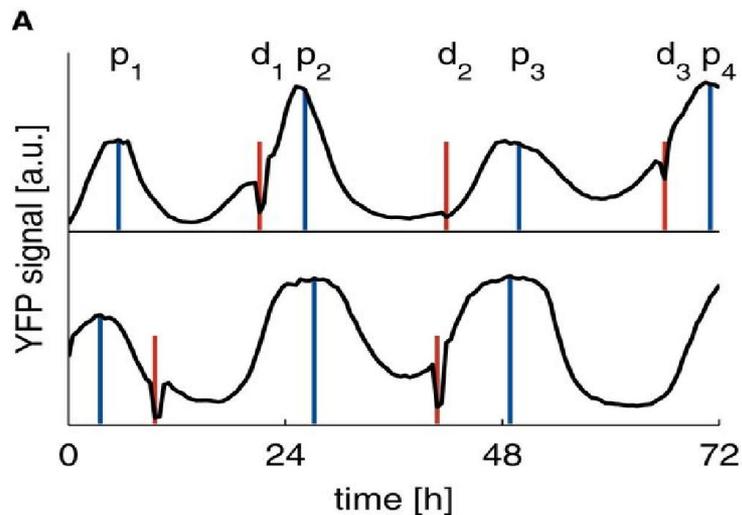
华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Results

## 1.NIH3T3细胞昼夜周期和细胞周期紧密同步





**Figure 1. Circadian and cell cycle oscillators are tightly synchronized in NIH3T3 cells.**



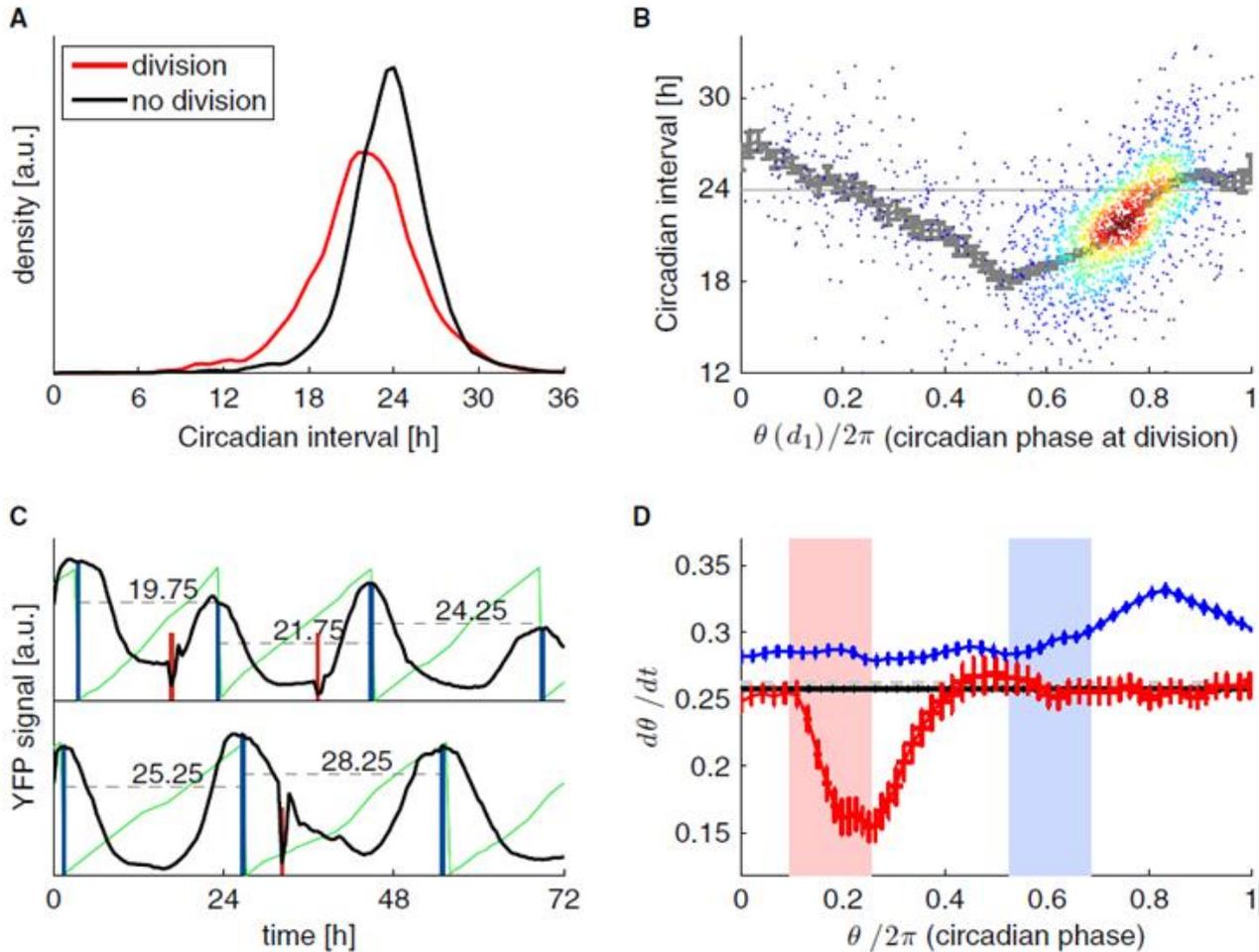
华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Results

## 2.细胞周期影响昼夜节律阶段的过程





**Figure 2. The cell cycle influences circadian phase progression.**



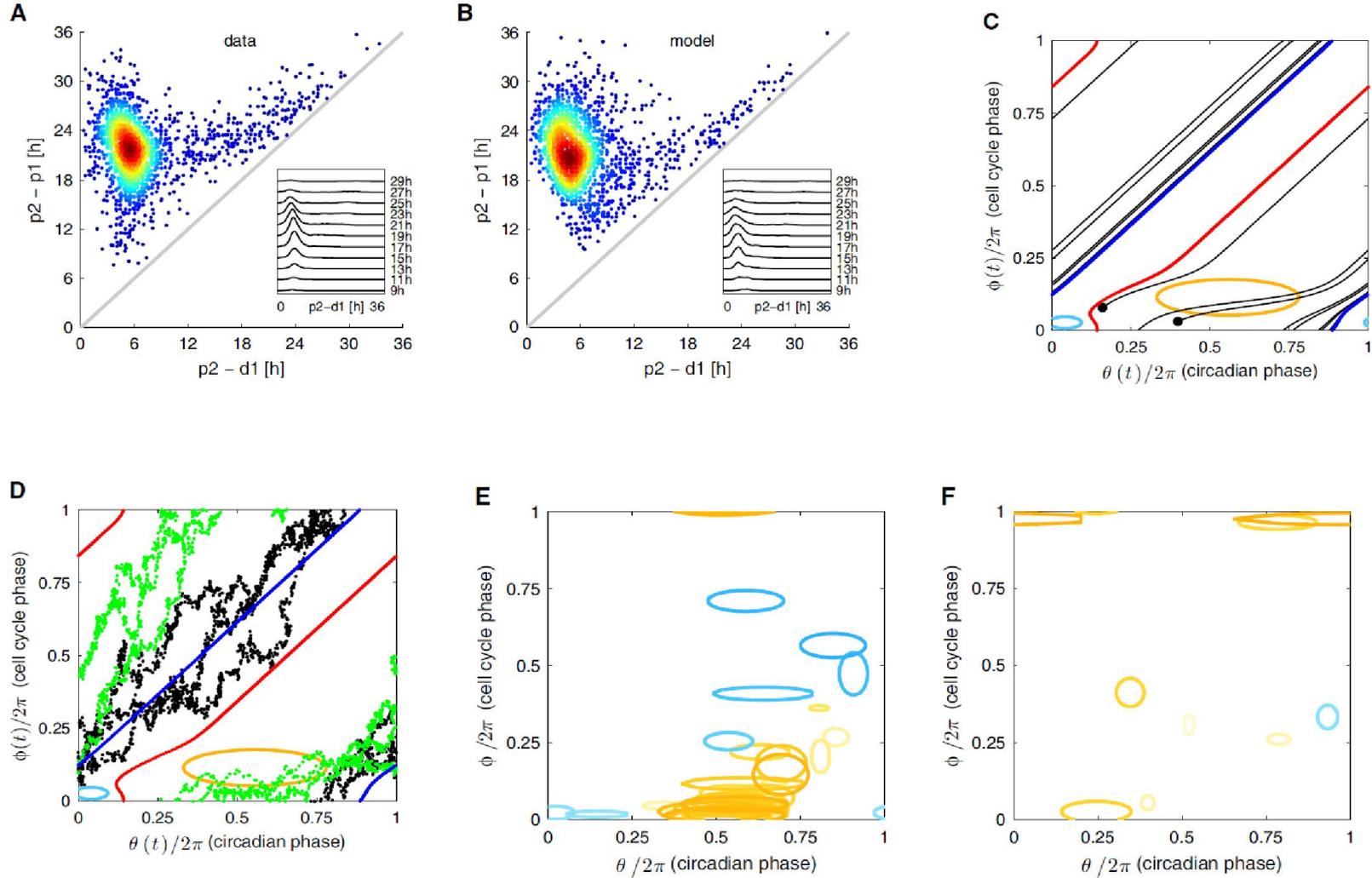
华中农业大学

HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Results

## 3. 两个周期的随机模型显示细胞周期在昼夜周期上的影响





**Figure 3. A stochastic model of two coupled-phase oscillators shows that the influence of the cell cycle on the circadian oscillator is predominant.**



华中农业大学

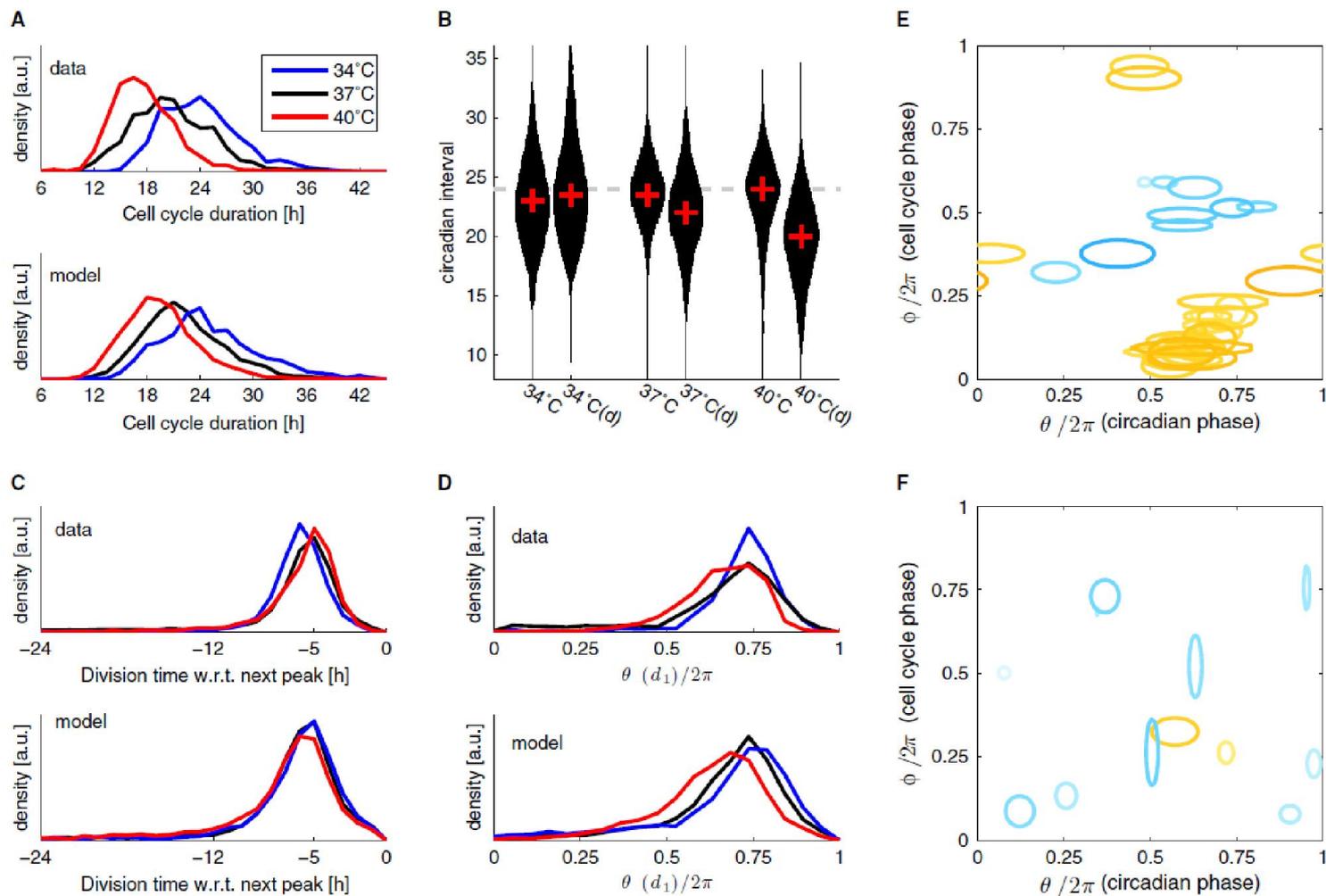
HUZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Results

## 4.细胞周期对昼夜周期的影响的因素:

改变温度影响细胞周期的持续时间和缩短分裂细胞的昼夜间隔





**Figure 4. Changing temperature affects cell cycle duration and shortens circadian intervals only in dividing cells.**



华中农业大学

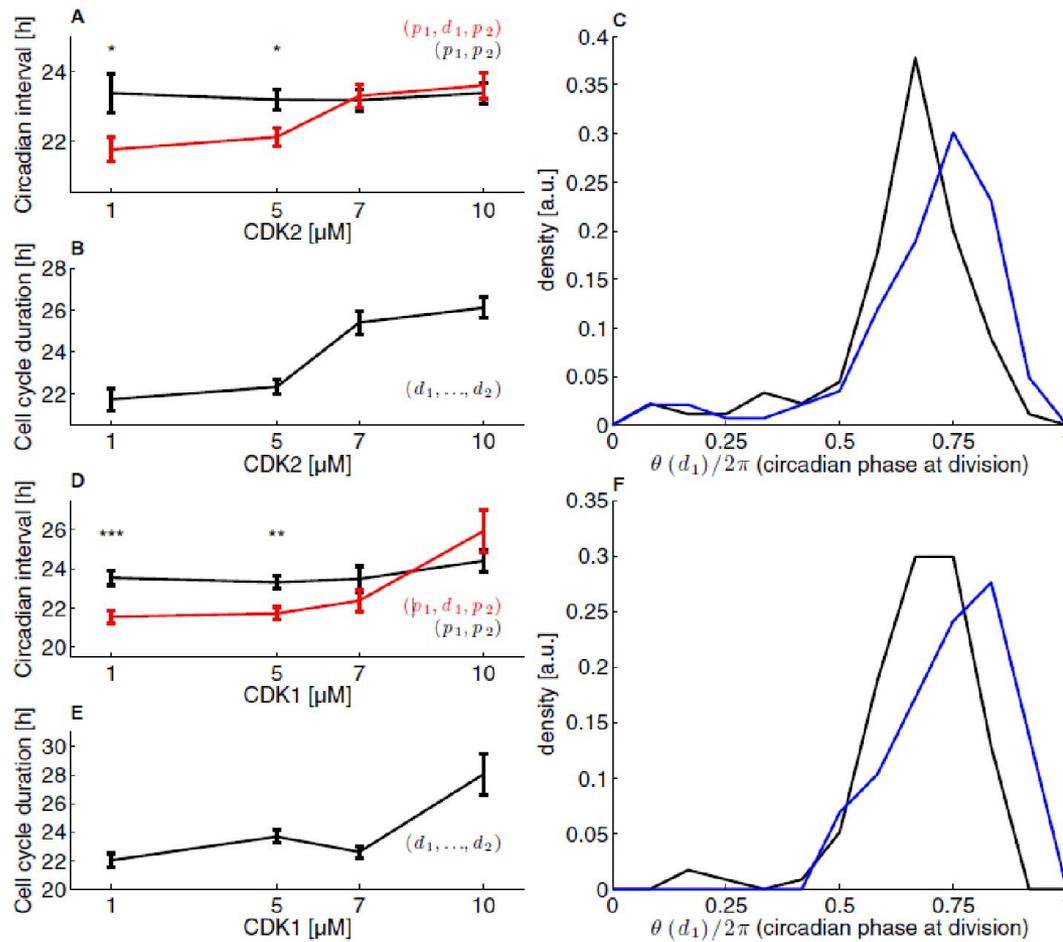
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Results

## 4.细胞周期对昼夜周期的影响的因素:

抑制剂的存在，细胞周期抑制昼夜间隔的延长同时延迟分裂阶段





**Figure 5. Inhibition of the cell cycle lengthens circadian intervals and delays division phase.**



# Results

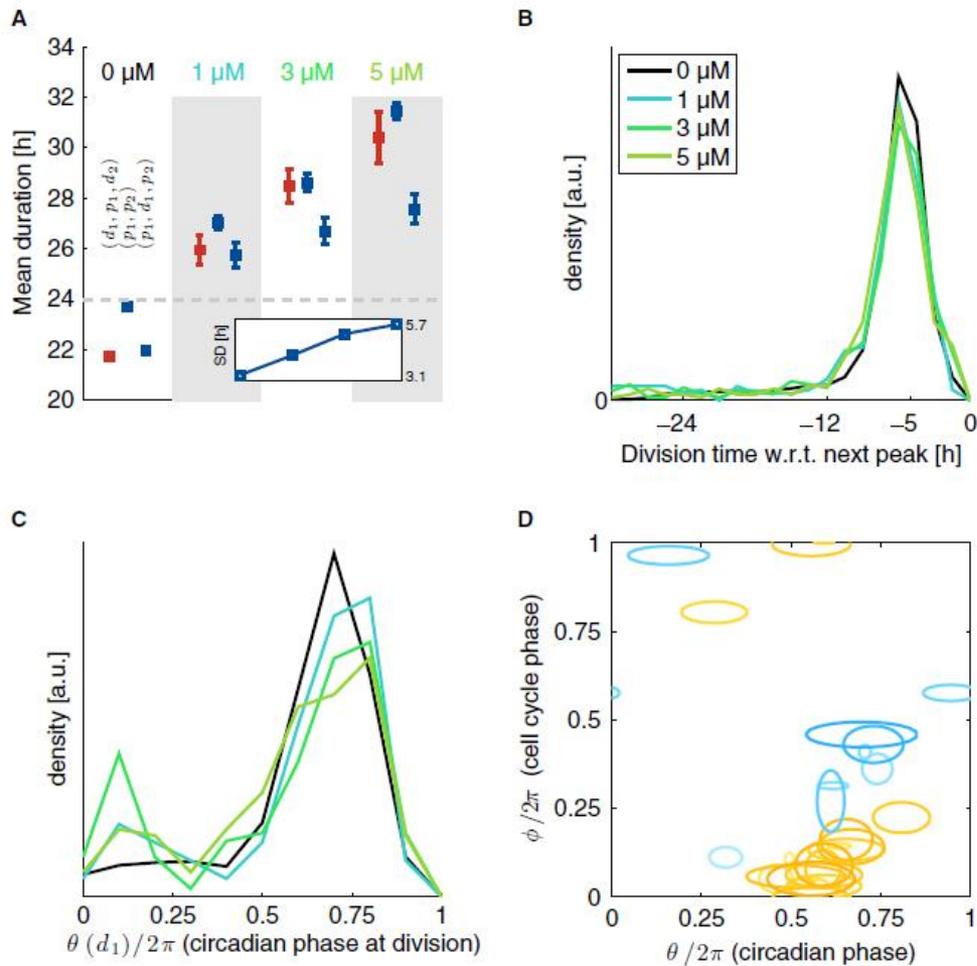
## 4. 细胞周期对昼夜周期的影响的因素:

**Longdaysin**处理延长昼夜间隔和细胞周期持续时间但是不干扰同步



華中農業大學

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY



**Figure 6. Treatment with Longdaysin lengthens circadian intervals and cell cycle durations but does not disrupt synchronization.**



华中农业大学

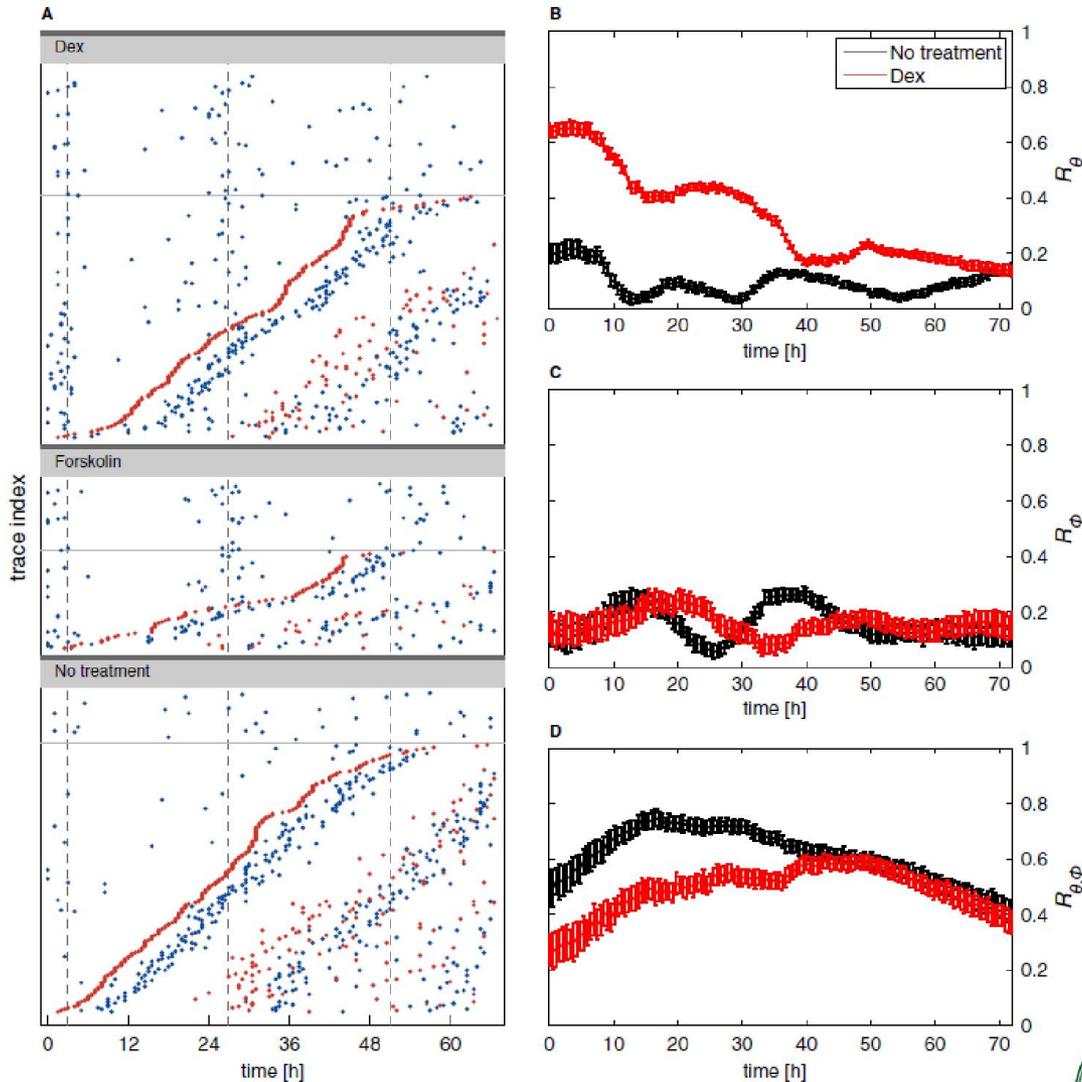
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Results

## 4. 细胞周期对昼夜周期的影响的因素:

昼夜阶段的复位不影响细胞周期和昼夜周期和细胞周期之间同步的瞬时干扰





**Figure 7. Circadian phase resetting does not influence the cell cycle and transiently perturbs synchronization of circadian and cell cycles.**



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# Discussion

## ◆细胞周期对昼夜节律中的影响

对昼夜节律的各种实验条件下进行大规模的定量分析NIH3T3细胞，包括生长条件的改变（血清和温度），以及遗传和药理学的干扰。主要的结果就是在稳态条件下，以1:1的模式固定运行，始终在Rev-Erba-YFP峰的前5h发生。

# Discussion

## ◆昼夜周期影响细胞周期可能的机制

细胞周期过程可以影响昼夜节律是一个不明确的机制，目前只能推测是为什么细胞周期导致昼夜间隔的缩短。有丝分裂通过稀释或搬运CRY蛋白有助于抑制Rev-Erba启动子，这种在一个CRY的表达状态的分裂细胞可能激活一个新的周期比不分裂的细胞更迅速。

# Discussion

## ◆两个周期耦合的动力学

耦合不仅生物学有意义动力学同样有意义你。无噪声的动力学源于两个周期的变量代表强力约束每个周期的状态。纯动力学机制导致的同步相对简单：由于细胞周期持续时间绝大多数比昼夜周期短，同步在有丝分裂附近的昼夜阶段产生瞬时的加速。

# Discussion

## ◆在增殖动物细胞和组织的昼夜规律相关性

最近的报告显示昼夜时钟在增殖中的重要作用，这些系统的24h制显示这些细胞类型可能已经找到了避免改变通过细胞分裂，或者选择系统的24周期可能覆盖甚至携带发生较短的细胞节律。这将导致组织中的增殖细胞相对于没有增殖的可能显示轻微的提前。

# Summary:

**创新点：**通过设置变量多方面的的研究两个周期，研究结果对昼夜周期在增生组织中有重要影响，同时在细胞实验的多种测量方法在昼夜周期经常使用。

**启发：**癌症细胞通过时间治疗相关的研究，可能扩大对癌症组织的认识。使用一种广泛的生物模型U2OS细胞系。在NIH3T3细胞在标准条件下生长的细胞昼夜对昼夜循环有决定性的支配作用。可能在增殖组织中有重要的意义。

**不足：**没有研究基因变化对于两者周期关系的影响。且模型还存在局限性，影响机制仍然不清楚。



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

---

THANK  
YOU!



華中農業大學

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY