

李纳,陈志彦,王力杰,等. *Bmal1* 时钟基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 49-54.

Li N, Chen ZY, Wang LJ, et al. Breeding and genotype identification of *Bmal1* clock gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 49-54.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.007

Bmal1 时钟基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定

李纳, 陈志彦, 王力杰, 刘哲, 郭炳彦*, 李拥军

(河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 对 *Bmal1* 基因敲除小鼠进行繁育及基因型进行鉴定, 为生物节律研究提供理想的动物模型。**方法** 将引进的 *Bmal1* 基因敲除小鼠, 以 1 雄 2 雌的合笼方式进行饲养繁殖, 从仔鼠中提取鼠尾基因组 DNA, PCR 扩增目的基因片段, 琼脂凝胶电泳进行基因结果判定, Western Blot 检测心肌组织中 *Bmal1* 蛋白表达进行结果验证。**结果** *Bmal1*^{-/-} 小鼠与 *Bmal1*^{+/+} 小鼠相比, 表型除体重外未见明显差异, 纯合敲除小鼠丧失繁殖能力; *Bmal1*^{-/-} 小鼠 24 h 血糖节律改变, *Bmal1* 基因敲除小鼠繁育成功, 获得一批基因敲除鼠。**结论** 应用 PCR 法可成功鉴定 *Bmal1* 基因敲除纯合小鼠, PCR 扩增法是检测小鼠基因的有效方法。

【关键词】 *Bmal1* 基因; 小鼠; 繁育; 基因型鉴定

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 01-0049-06

Breeding and genotype identification of *Bmal1* clock gene knockout mice

LI Na, CHEN Zhiyan, WANG Lijie, LIU Zhe, GUO Bingyan*, LI Yongjun

(Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Corresponding author: GUO Bingyan. E-mail: gbyan2008bs@163.com

【Abstract】 Objective The breeding and identification method of *Bmal1* knockout mice were analyzed to provide an ideal animal model to study various biological rhythms. **Methods** *Bmal1* knockout mice were fed and bred in cages of one male and two females. Tail genomic DNA of the mice was extracted from the offspring, the target gene fragment was amplified by PCR, and the PCR product was analyzed by gel electrophoresis. *Bmal1* protein expression in myocardial tissue was detected by Western Bolt to verify the results. **Results** Compared with those of *Bmal1*^{+/+} mice, the phenotypes of *Bmal1*^{-/-} mice showed no significant difference except for body weight, and homozygous knockout mice lost their reproductive ability. Changes in 24 h blood glucose rhythm of *Bmal1*^{-/-} mice. *Bmal1* knockout mice were successfully bred, and a batch of knockout mice was obtained. **Conclusions** PCR identified homozygous mice with *Bmal1* gene knockout. PCR amplification was an effective method to detect the mouse gene.

【Keywords】 *Bmal1* gene; mice; breeding; genotype identification

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

时钟节律是指生物机体为了适应环境, 从整体到组织、细胞各个层次都呈现明显的时间周期现象。目前克隆鉴定出哺乳动物的生物钟基因包括调控时钟基因 *Bmal1*、*Clock*、*Per* 及 *Cry* 等, 它们在转

录和转录后形成的自激振荡环路是昼夜节律产生的分子基础^[1]。昼夜节律的产生依赖于这些时钟基因及其蛋白质产物间的相互作用所形成的“转录-翻译反馈环路”。*Bmal1* 基因处于整个时钟体系

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金(81400217), 河北省自然科学基金面上项目(H2020206504)。

Funded by National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation(81400217), General Project of Natural Science Foundation of Hebei Province(H2020206504).

【作者简介】 李纳(1994—)女, 硕士研究生, 研究方向: 心血管内科学。Email: hbyln@163.com

【通信作者】 郭炳彦(1976—)女, 主任医师, 医学博士, 研究方向: 心血管病基础与临床。Email: gbyan2008bs@163.com

的上游,其表达产物 *Bmal1* 蛋白是正反馈环路的调节因子之一,CLOCK 蛋白是其分子伴侣。*Bmal1* 蛋白与 CLOCK 蛋白结合所生成的 *Bmal1*/CLOCK 异二聚体是整个中心振荡环的正向元件^[2]。近年来研究发现,*Bmal1* 基因不仅在调控生物的时钟节律中发挥一定作用,而且在糖代谢、能量平衡、脂肪细胞的增殖和分化等方面都起着关键作用^[3]。*Bmal1* 基因的缺失会导致小鼠昼夜节律振荡的丧失,是心血管内科,神经内科,内分泌等学科的共同关注的热点。Kondratov 等^[4]在早年研究表明 *Bmal1* 敲除纯合小鼠丧失繁殖能力,培育出纯合率更高的基因敲除小鼠,提供实验周期更短的时钟动物模型是亟待突破实验技术。本实验室通过引进 *Bmal1* 基因敲除鼠,在 SPF 级动物房内以 1 雄 2 雌的合笼方式进行了饲养、保种繁育,并对繁育出生的仔鼠进行基因鉴定,结果获得了稳定的 *Bmal1*^{-/-} 基因型小鼠。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 ~ 12 周龄 SPF 级 C57BL/6J *Bmal1* 基因敲除杂合子小鼠 3 只,雌鼠 2 只及雄鼠 1 只自美国 Jackson 实验室引进,美国政府健康证书【1911A03594】,品系名:B6.129-Arnl1<tml Bra>/J,遗传背景 C57BL/6J,基因型:*Bmal1*^{+/-}。所有引进小鼠饲养于河北医科大学第四医院实验动物中心【SYXK(冀)2018-001】SPF 级标准饲养,室温(23±3)℃,12 h 光照/黑暗循环,自由取食、饮水,所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审查备案号:IACUC-4th Hos Hebmu-1018001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

5×Green buffer(普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号:0000322802),Go Taq DNA 聚合酶(普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号:0000324964),DNTP(天根生化科技(北京)有限公司,货号:Q5818),Marker(中科瑞泰(北京)生物科技有限公司,货号:RTM415-02),4S RED PLUS 核酸染色(BBI 生命科学有限公司,货号:A606695),*Bmal1*(abcam,货号:ab230822 批号:GR3340956-2,英国),ACTIN(abclonal,货号:AC026,批号:9100026001),小鼠二抗(bioeasy,货号:BE0102,批号:808000805,中国),兔二抗(bioeasy,货号:BE0101,批号:808000901,中国)。

PCR 扩增仪(艾本德德国生命科技公司,型号:Mastercycler Nexus),凝胶成像系统(普诺森生物科技(上海)有限公司,型号:AlphaImager HP),电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYY-7C 电泳仪),台式冰冻离心机(苏州赛恩斯仪器有限公司,型号:Thermo),鱼跃 580 血糖仪,洁净工作台(中国北京设备一厂),电子称重仪(VP202 N 中国上海精密仪器有限公司),电子天平(Sartorius 公司,德国),移液枪(Eppendorf 公司,法国),-80℃ 低温冰箱(青岛海尔),4℃ 低温冰箱(青岛海尔),PVDF 膜(Millipore,美国),医用 X 射线胶片(柯达公司,美国),通用显影粉、酸性定影粉(天津天陆海感光材料厂),高速离心机(Eppendorf 公司,德国),转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司),凝胶玻璃板、固定夹(北京六一仪器厂),垂直电泳槽(北京六一仪器厂),转移槽(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据美国 Jackson 实验室公布的小鼠 *Bmal1* 基因序列,设计检测鼠 *Bmal1* 基因位点引物,设计引物及序列如下:Arntl-Commom (5'-GCCCACAGTCAGATTGAAAAG-3'); Arntl-WT (5'-CCCACATCAGCTCATTAACAA-3'); Arntl-M Reverse (5'-GCCTGAAGAACGAGATCAGC-3')。

1.2.2 *Bmal1* 基因敲除小鼠的饲养繁育

采用将 F0 代 1 雄 2 雌(*Bmal1*^{+/-})合笼方式进行 3 个月保种繁殖,得到 54 只后代小鼠后将小鼠进行鼠尾鉴定,将 F1 代杂合子小鼠(*Bmal1*^{+/-})饲养至 8 周龄进行近交系繁殖,本实验将 10 笼合笼的杂合 *Bmal1* 基因敲除鼠(20 ~ 44 周龄)的生产情况进行 24 周的记录,对仔鼠数量进行基因鉴定及统计计算。

1.2.3 *Bmal1* 敲除小鼠表型分析

每周定期观察小鼠体型以及被毛、皮肤形态的变化,详细记录;检测 8 周龄基因敲除小鼠 24 h 小鼠血糖、体重变化。开灯时间上午 6:00 规定为 ZT0 (zeitgeber time),分别测定 *Bmal1*^{-/-} 及 *Bmal1*^{+/-} 每组 3 只,本实验设计测定每 4 h 的血糖值,分别为 ZT0 (6:00)、ZT4 (10:00)、ZT8 (14:00)、ZT12 (16:00)、ZT14 (20:00) 及 ZT20 (0:00) 6 个时间点血糖,并利用 Graph Pad Prism 8 绘制血糖曲线图。

1.2.4 *Bmal1* 敲除小鼠鉴定

(1) 鼠尾基因组 DNA 提取:剪取小鼠尾尖 2 ~

3 mm 的组织置于 0.2 mL 薄壁管中并置于冰上, -80℃ 冻存。DNA 提取方法, 加 A 液 (25 mmol/L NaOH; 0.2 mmol/L EDTA) 98℃ 干浴, 消化 1 h 后, 加 B 液 (40 mmol/L Tris-HCl; 40 mmol/L Tris) 终止消化, 即可得到 DNA 消化产物。

(2) PCR 扩增: 鉴定引序列上海生工生物工程技术有限公司合成, 以上 3 种引物按照 1:1:1 比例混合至 4 μ mol/L, 进行 PCR 反应。PCR 反应体系 (20 μ L): 5 $\times$ PCR Mix 5.7 μ L, 引物混合物 2.4 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 灭菌 ddH₂O 10.9 μ L。采用 PCR 扩增仪进行循环扩增, 反应条件: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 30 s, 复性 60℃ 30 s, 延伸 72℃ 50 s, 循环 30 次; 最后延伸 72℃ 10 min; 10℃ 停留。

(3) 琼脂糖凝胶电泳: 取 PCR 产物 10 μ L, 在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析, 以 110 V 36 mA 由负极向正极电泳 25 min, 在化学发光凝胶成像系统中拍照分析。

(4) 基因型结果判定: 按照条带不同来区分小鼠基因情况。PCR 产物 DNA 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳基因型片段为: Commom 和 mutant Reverse 引物扩增长度为 160 bp 左右, 为突变型 (KO) 小鼠; Commom 和 Wild type reverse 片段为 330 bp 左右为野生型 (WT); 160 bp 和 330 bp 之间两条电泳条带均存在的为杂合子 (HET) 小鼠。

1.2.5 Western Blot 检测心肌组织中 *Bmal1* 蛋白表达情况

(1) 制备 SDS-PAGE 凝胶: 配制 10% 分离胶 10 mL, 快速灌入凝胶玻璃槽中, 使其液面至标志线位置。去离子水覆盖胶面, 室温放置约 40 min 至分离胶凝固。配制 5% 浓缩胶 2 mL。将凝胶板重新垂直放置, 轻轻加入 5% 浓缩胶液, 插入样品梳, 室温凝胶约 40 min, 固定在电泳槽上。

(2) 样品变性及电泳: 根据蛋白定量结果, 加入相应体积的总蛋白样品与 5 $\times$ 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液, 轻轻混合, 95℃ 变性 10 min, 立即插入冰中待用。将样品轻轻加至凝胶孔中, 电泳仪设置成稳压状态, 接通电源, 将电压调至 80 V 使样品通过浓缩胶与分离胶 (电压约 8 V/cm)。电泳使染料至分离胶适当位置, 结束电泳。

(3) 凝胶转膜及其检测: 凝胶电泳结束后, 将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至固相支持物上, 然后分别用非标记一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗对其进行孵育、检测。用于

Western Blot 的固相支持物有多种, 本实验采用 PVDF 膜作为固相支持物。本实验采用湿转的转膜方式。

1.3 统计学分析

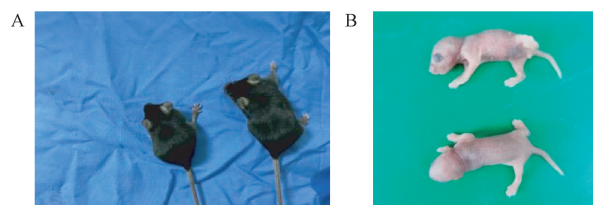
结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 6 软件处理, 多组间比较使用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 *Bmal1* 敲除小鼠表型

2.1.1 小鼠外形特征

C57BL/6 遗传背景的 *Bmal1* 基因敲除小鼠成年鼠被毛为黑色, 体重上, 纯合型鼠 (20.3 ± 1.6) g 明显低于野生型 (25.8 ± 1.2) g, 体型肉眼可见较小, 其余未见差异。繁殖小鼠交配后的子代新生仔鼠, 皮肤为粉嫩肉红色, 双眼未睁, 四肢躯干向腹侧蜷缩, 与野生型仔鼠外观形态无显著性差异, 本实验结果不排除实验室饲养条件、环境因素等对小鼠状态的影响, 但经观察, 杂合子繁殖小鼠生产出的野生型小鼠同等条件下与动物实验中心其他小鼠体重无明显差异 (图 1)。



注: A: 左为纯合成年鼠, 右为野生成年鼠; B: 上为 1 d 纯合仔鼠, 下为 1 d 野生仔鼠。

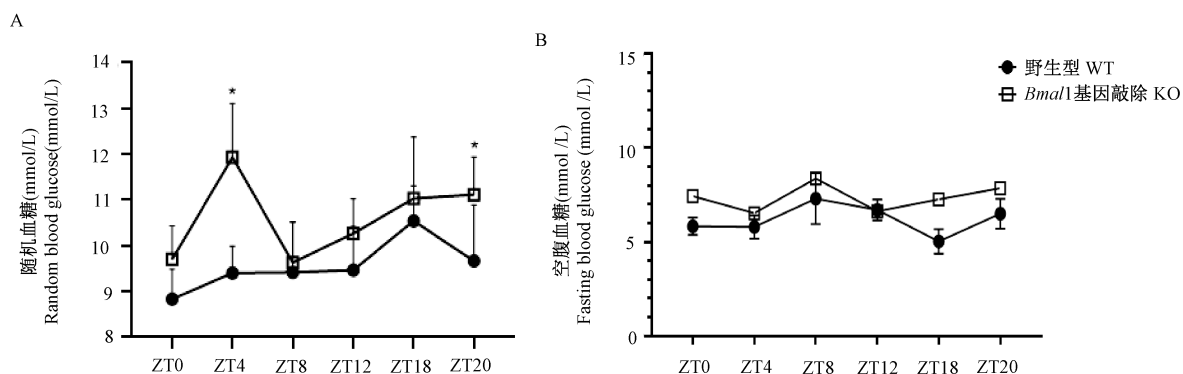
图 1 野生型和基因敲除型成年及仔鼠外形特征

Note. A. Left is adult mice of knockout type, right is adult mice of wild-type mice. B. Top is neonatal mice of knockout type, bottom is neonatal mice of wild-type mice.

Figure 1 Physical signs of wild-type and knockout type adults and neonatal mice

2.1.2 小鼠 24 h 血糖变化

本实验室采取随机测定血糖法和空腹 12 h 测定法分别测定 *Bmal1*^{-/-} 和 *Bmal1*^{+/+} 两组血糖 24 h 节点血糖值, 两组实验及结果如下: 测定 WT 及 KO 小鼠各 6 只, 24 h 各个时间的血糖值, 观察节律并绘制折线图。取尾血利用鱼跃血糖仪测定。可见两组小鼠随机血糖在 ZT4 和 ZT20, 这 2 个时间点时血糖水平具有统计学差异 ($P < 0.05$), 然而两组小鼠空腹 12 h 各个时间点未见明显差异 (图 2)。



注:与野生型比, * $P < 0.05$ 。

图2 *Bmal1*^{-/-}与*Bmal1*^{+/+}两组小鼠24 h血糖曲线图

Note. Compare with WT, * $P < 0.05$.

Figure 2 24 h blood glucose curves of *Bmal1*^{-/-} and *Bmal1*^{+/+} mice

2.2 小鼠繁殖情况

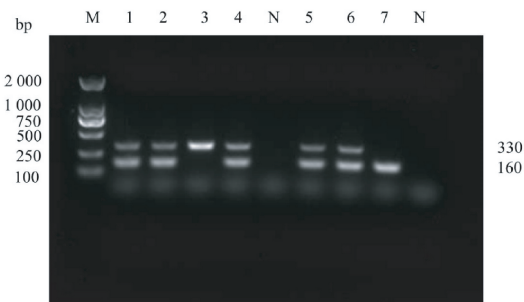
Bmal1 基因敲除杂合母鼠妊娠期为 22 d 左右, 哺乳期为 21 d 左右, 小鼠性成熟期约为 60 ~ 84 d, 以上生理特征与野生型小鼠无明显差异, 但纯合 *Bmal1* 敲除鼠合笼 12 周雌鼠均未受孕繁殖。通过对 3 笼纯合鼠合笼观察记录, 判定实验中 *Bmal1* 敲除纯合小鼠丧失繁殖能力。比较野生 8 笼鼠及杂合 12 笼鼠, 16 ~ 40 周龄产仔数量上每胎 6 ~ 11 只, 两组相比无明显差异。对生产的仔鼠数量进行统计计算。野生型小鼠, 在 6 个月期间 8 笼小鼠共计生产 22 胎, 产仔数量总数为 132 只, 平均每胎为 (6.0 ± 1.8) 只, 与杂合鼠比较, 6 个月期间 12 笼小鼠共计生产 38 胎, 产仔数量总数为 241 只, 平均每胎为 (6.3 ± 2.6) 只, 其中纯合鼠 40 只, 纯合鼠出生率约 16.4%。

2.3 小鼠基因鉴定结果

以下结果来自部分实验小鼠中鼠中, 小鼠鼠尾基因组 DNA 扩增产物鉴定结果。如下图: N 为阴性水对照, 未见条带。7 号样品条带在 160 bp 位置左右, 为 *Bmal1* 基因敲除小鼠, 3 号样品条带在 330 bp 位置左右, 为野生型小鼠。1、2、4、5、6 为杂合基因型鼠(图 3)。

2.4 敲除小鼠在心脏中 *Bmal1* 表达情况

Western Blot 检测 F1、F2 代 *Bmal1*^{-/-} 小鼠和 *Bmal1*^{+/+} 小鼠心肌组织蛋白水平表达水平(图 4), *Bmal1*^{+/+} 小鼠均有 *Bmal1* 表达, 而 *Bmal1*^{-/-} 小鼠中未检测到 *Bmal1*, 说明 *Bmal1* 基因敲除鉴定结果与 PCR 鼠尾鉴定结果一致。



注: M: Marker (2×10^3 DNA marker); 1、2、4、5、6: 杂合型样品; 3: 野生型小鼠; 7: *Bmal1* 基因敲除小鼠; N: 阴性对照。

图3 部分小鼠 PCR 基因型鉴定结果

Note. Marker (2×10^3 DNA marker). 1, 2, 4, 5, 6. Heterozygote samples. 3. Wild type. 7. Knock out type. N. Negative control.

Figure 3 Results of genotype identification of some mice by PCR

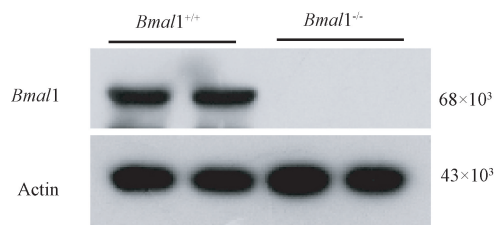


图4 F1 和 F2 中 *Bmal1*^{-/-} 及 *Bmal1*^{+/+} 小鼠心肌组织 *Bmal1* 表达情况分析

Figure 4 Expression of *Bmal1*^{-/-} and *Bmal1*^{+/+} in myocardial tissue of mice in F1 and F2

3 讨论

目前基因敲除小鼠广泛应用到各种疾病的研究之中,但部分基因纯合敲除小鼠丧失繁殖能力^[5],因此小鼠保种繁殖方法成为科学研究首先考虑的实验步骤,基因鉴定是基因敲除小鼠保种繁殖的重要环节之一^[6],其中常见小鼠基因敲除鉴定所使用的检测方法之一为 PCR 法^[7]。本实验采用 *Bmal1*^{+/-}小鼠合笼法获得子代,并采用 NaOH 法提取鼠尾组织基因组 DNA,PCR 扩增和凝胶电泳等鉴定出 *Bmal1* 敲除鼠的基因型,通过 Western Blot 法检测心脏组织中的 Bmal1 蛋白证实此法准确有效。整个实验时间、经济成本均较为适中,通过本次实验可以明确 *Bmal1* 基因敲出小鼠的保种繁育可以应用此法。此外,本次实验通过两种血糖检测方法检测不同基因的小鼠血糖水平,得到 *Bmal1* 敲除小鼠在随机血糖测量中血糖差异性明显,实验证实小鼠血糖水平与时钟基因具有相关性以及关于血糖测定方式选择也提供了思路^[8]。

Kondratov 等^[4]在早年研究表明 *Bmal1* 敲除纯合小鼠丧失繁殖能力,这一结论与本次研究中的结果相一致,*Bmal1* 敲除小鼠不具有生育能力,保种繁殖需根据遗传定律通过合笼杂合子小鼠,进而得到纯合的 *Bmal1* 基因敲除鼠。*Bmal1* 基因是调节生物 24 h 节律时钟环路中的重要部分,所以推测,敲除后小鼠除了生物节律的丧失外,还会对机体内其他分子通路有损伤,导致小鼠繁殖能力的丧失。*Bmal1* 是具体通过何种分子通路影响小鼠繁殖能力,仍尚不明确。

生物钟基因,指能够使生物体产生昼夜节律,并控制其运转的基因,是生物钟的分子基础^[9]。在转录水平上,生物钟蛋白可作为转录因子,通过 E-box、D-box 和 RORE 等顺式作用元件直接控制钟控基因的表达;可分为正性调控因子(如 *Bmal1*、CLOCK)和负性调控因子(如 PER、CRY)。其中 *Bmal1* 蛋白与 CLOCK 在细胞核内形成异二聚体 CLOCK/*Bmal1*,可激活目标基因 Per、Cry 和 Rev-erb 的转录,是时钟环路中的重要步骤之一^[10],作为时钟环路中的重要元件之一,*Bmal1* 在机体内几乎所有组织细胞均有时钟节律的振荡^[11]。

在心血管领域,*Bmal1* 基因的表达水平与多种疾病具有相关性,如直接调节血压的昼夜节律,是血压调节的关键基因^[12]。有研究发现 *Bmal1*^{-/-}小

鼠持续维持低血压状态,血压活动节律完全消失。这与 *Bmal1*^{-/-}小鼠血管内皮细胞中 Nox 过表达,NO 信号解耦连使得超氧化物增加,诱发血管内皮功能障碍所致相关^[13]。除此之外,小鼠实验已明确 *Bmal1* 在脂质代谢中发挥着关键作用^[14]。*Bmal1*^{-/-}小鼠血脂异常、动脉粥样硬化的发生率明显升高,当过表达 *Bmal1* 时则可减缓二者的发生和发展^[15]。此外,动物实验证实小鼠内皮细胞 *Bmal1* 基因的缺失会导致趋化因子 CXCL5、CCL20 和 CCL8 表达增加,致使血管屏障功能和内皮细胞完整性受损,致白细胞迁移至内皮细胞层^[16],进而引起血管炎症反应。

本次实验发现根据遗传规律进行保种繁育,并且利用 PCR 法测定能够准确检测 *Bmal1* 基因,为下一步关于疾病与时钟的作用,如与血糖水平密切相关的糖尿病心肌病发生发展等研究提供了实验动物基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Rabinovich NI, Lieberman B, Martino TA, et al. Circadian-regulated cell death in cardiovascular diseases [J]. Circulation, 2019, 139(7): 965-980.
- [2] Li E, Li X, Huang J, et al. *Bmal1* regulates mitochondrial fission and mitophagy through mitochondrial protein BNIP3 and is critical in the development of dilated cardiomyopathy [J]. Protein Cell, 2020, 11(9): 661-679.
- [3] Quagliarini F, Mir AA, Balazs K, et al. Cistronic reprogramming of the diurnal glucocorticoid hormone response by high-fat diet [J]. Mol Cell, 2019, 76(4): 531-545.
- [4] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in *Bmal1*, the core component of the circadian clock [J]. Genes Dev, 2006, 20(14): 1868-1873.
- [5] 赵家荣, 刘欢, 张涛, 等. 维生素 D 受体基因敲除小鼠品系的建立与鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 766-772.
Zhao JR, Liu H, Zhang T, et al. Establishment and identification of vitamin D receptor gene knockout mouse strain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(6): 766-772.
- [6] 陈亚坤, 孙婧, 蒋亚君, 等. I 型干扰素受体 (Ifnar) 基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(4): 35-38, 43.
Chen YK, Sun J, Jiang YJ, et al. Breeding and genotype identification of Ifnar gene knockout mice [J]. Lab Anim Sci, 2019, 36(4): 35-38, 43.
- [7] 黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 等. 巨噬细胞条件性 Atg5 基因敲除小鼠的构建及鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 770-775.
Huang XR, Huang YH, Ye L, et al. Construction and

- identification of macrophage conditioned Atg5 knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 770-775.
- [8] 汤琦, 施磊, 郑璐, 等. 禁食时间对昆明小鼠糖耐受和胰岛素分泌的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 61-65.
- Tang Q, Shi L, Zheng L, et al. Effects of fasting time on glucose tolerance and insulin secretion in KM mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 61-65.
- [9] Toledo M, Batista GA, Merheb E, et al. Autophagy regulates the liver clock and glucose metabolism by degrading CRY1 [J]. Cell Metab, 2018, 28(2): 268-281.
- [10] 杨瑾, 徐志峰, 苏嘉, 等. 生物钟基因与心血管疾病的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48(7): 610-615.
- Yang J, Xu ZF, Su J, et al. Research progress of clock gene and cardiovascular disease [J]. Chin J Cardiol, 2020, 48(7): 610-615.
- [11] Song F, Xue Y, Dong D, et al. Insulin restores an altered corneal epithelium circadian rhythm in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 798-801.
- [12] 袁泉, 赵博, 刘恋, 等. 时钟基因 *Bmal1* 在脑缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 医学综述, 2019, 25(5): 872-876.
- Yuan Q, Zhao B, Liu L, et al. Role of clock gene *Bmal1* in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Med Recapitulate, 2019, 25(5): 872-876.
- [13] Chang L, Xiong W, Zhao X, et al. *Bmal1* in perivascular adipose tissue regulates resting phase blood pressure through transcriptional regulation of angiotensinogen [J]. Circulation, 2018, 138(1): 67-79.
- [14] Zhang D, Jin C, Obi IE, et al. Loss of circadian gene *Bmal1* in the collecting duct lowers blood pressure in male, but not female, mice [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 318(3): F710-F719.
- [15] Wu X, Chen L, Zeb F, et al. Clock-*Bmal1* mediates MMP9 induction in acrolein-promoted atherosclerosis associated with gut microbiota regulation [J]. Environ Pollut, 2019, 252: 1455-1463.
- [16] de Juan A, Ince LM, Pick R, et al. Artery-associated sympathetic innervation drives rhythmic vascular inflammation of arteries and veins [J]. Circulation, 2019, 140(13): 1100-1114.

[收稿日期] 2020-09-24