中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：光转导通路介导的斑马鱼年龄相关昼夜节律紊乱研究
作者：黄梦莹，鲁海菲，叶子靖，王平，夏婧
收稿日期：2026-07-15
网络首发日期：2026-10-19
引用格式：黄梦莹，鲁海菲，叶子靖，王平，夏婧．光转导通路介导的斑马鱼年龄相关昼夜节律紊乱研究[J/OL]．中国比较医学杂志．
https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20261019.1107.004

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

光转导通路介导的斑马鱼年龄相关昼夜节律紊乱研究

黄梦莹[1]，鲁海菲[1]，叶子靖[1]，王 平[1,2]✉，夏 婧[1,2]✉

(1.湖北中医药大学，老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心，武汉 430065；2.湖北时珍实验室，武汉 430065)
*通信作者 王平（1962—），男，博士，教授，主任医师，博士生导师，研究方向：中医药防治老年脑病。E-mail：pwang54@aliyun.com;夏婧（1990—），博士，助理研究员，研究方向：中医药防治老年脑病。E-mail：xiajing90514@126.com

摘要 目的 通过比较不同月龄斑马鱼的昼夜节律变化，分析睡眠-觉醒节律与年龄的相关性，并探讨其潜在的分子机制。方法 选取 168 尾 AB 系野生型斑马鱼（4、12、24 月龄）分别分为 Young 组、Adult 组、Old 组，每组 56 尾。采用 24 h 运动行为学检测昼夜运动轨迹，T 型迷宫观察斑马鱼进入 EC 区（营养富集区）的潜伏期，评估学习记忆能力，HE 染色观察眼球形态，透射电镜观察脑组织细胞超微结构，转录组学测序分析脑组织差异，筛选影响昼夜节律的关键基因或信号通路，并对差异表达基因进行实时荧光定量逆转录 PCR（RT-qPCR）验证。结果斑马鱼睡眠-觉醒模式随年龄呈非线性变化，青年活动多、睡眠少，中年睡眠深而集中，老年睡眠减少。Adult 组静息时长显著高于 Young 组（$P<0.01$），Old 组介于其间。学习记忆方面，Young 和 Adult 组进入 EC 区潜伏期短于 Old 组（$P<0.01$），前两组无显著差异（$P>0.05$）。眼球与脑组织病理显示，Young 组视网膜结构完整，神经元形态正常，Adult 组出现早期衰老性改变，Old 组退变明显。转录组分析显示差异基因富集于免疫、昼夜节律、视觉感知、光传导通路等。眼球内，Young 组磷酸二酯酶 6Gb（*pde6gb*）与视网膜鸟苷酸环化酶 2D（*gucy2d*）呈昼低夜高节律，Adult 组和 Old 组转为昼高夜低且表达降低（$P<0.01$）；Young 组环磷酸鸟苷（cGMP）与褪黑素（MT）峰值显著高于 Adult 及 Old 组（$P<0.01$）。脑组织内，3 组磷酸二酯酶 6A（*pde6a*）节律一致；*pde6gb* 与 *gucy2d* 在 Adult 和 Old 组呈昼高夜低节律，Young 组相反；cGMP 与 MT 的峰值均在清晨，谷值见于傍晚，Young 组浓度显著高于 Old 组（$P<0.01$），Adult 组次之，Old 组昼夜波动幅度最小。结论 斑马鱼衰老导致行为、结构与分子昼夜节律紊乱，光转导基因及 MT 节律相位偏移、振幅衰减，削弱生物钟光周期响应能力，提示 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* 及 cGMP 信号通路是潜在的干预靶点。

关键词 斑马鱼；昼夜节律；年龄；生物钟基因；光信号转导

Study on age-related circadian rhythm disorders in zebrafish mediated by light transduction pathways

HUANG Mengying[1]，LU Haifei[1]，YE Zijing[1]，WANG Ping[1,2]✉，XIA Jing[1,2]✉

(1. Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Protection Technology and New Product R&D for Geriatric Brain Health, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China. 2.Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065)

Abstract Objective By comparing the circadian rhythm changes of zebrafish of different ages, the correlation between sleep-wake rhythm and age is analyzed, and the potential molecular mechanism is explored. Methods One hundred and sixty-eight AB wild-type zebrafish of 4, 12 and 24 months old were selected and divided into Young, Adult and Old groups, with 56 fish in each group. The 24-hour locomotor behavior was detected to observe the diurnal movement trajectory. The T-maze was used to observe the latency of zebrafish entering the EC zone (nutrient-enriched area) to assess their learning and memory abilities. The morphology of the eyeball was observed by HE staining. The ultrastructure of brain tissue cells was observed by transmission electron microscopy. The differences in brain tissue were analyzed by transcriptome sequencing to screen the key genes or signaling pathways affecting the circadian rhythm, and the differentially expressed genes were verified by reverse transcription quantitative PCR. Results The sleep-wake pattern of zebrafish changes nonlinearly with age. Young individuals have more activity and less sleep, middle-aged individuals have deep and concentrated sleep, and elderly

收稿日期：2026-07-15
基金项目：国家自然科学基金青年项目（82205232）；湖北省自然科学基金中医药创新发展联合基金项目（2025AFD587）；中医脑健康理论传承创新及应用研究（2024KJCX002）。
作者简介：黄梦莹（1999—），女，在读博士研究生，研究方向：中医药防治老年脑病。E-mail：1073218454@qq.com
网络首发时间：2026-10-19 11:25:29 网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20261019.1107.004

individuals have less sleep. The resting duration of the Adult group was significantly longer than that of the Young group (P<0.01), and the Old group was in between. In terms of learning and memory, the latency to enter the EC zone was shorter in the Young and Adult groups than in the Old group (P<0.01), while there was no difference between the first two groups (P>0.05). The pathological changes of the eyes and brain tissues showed that the Young group had a complete retina structure and normal neuronal morphology, while the Adult group showed early senescence changes and the Old group showed significant degeneration. Transcriptome analysis revealed that the differentially expressed genes were enriched in immunity, circadian rhythm, visual perception, and light conduction pathways. In the eyes, the phosphodiesterase 6Gb (*pde6gb*) and guanylate cyclase 2D (*gucy2d*) in the Young group showed a diurnal low and nocturnal high rhythm, while the Adult group and the Old group shifted to a diurnal high and nocturnal low rhythm and had lower expression (P<0.01); cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and melatonin (MT) in the Young group had significantly higher peaks than those in the Adult and Old groups (P<0.01). In the brain tissue, the rhythms of the three groups of phosphodiesterase 6A (pde6a) were consistent; *pde6gb* and *gucy2d* showed a diurnal high and nocturnal low rhythm in the Adult and Old groups, while the rhythm was reversed in the Young group; the peaks of cGMP and MT were all in the morning, and the troughs were in the evening, with the concentration in the Young group being significantly higher than that in the Old group (P<0.01), followed by the Adult group, and the fluctuation amplitude was the smallest in the Old group. Conclusions The aging of zebrafish leads to disruptions in behavioral, structural and molecular circadian rhythms. The phototransduction genes and the phase and amplitude of the MT rhythm are shifted, weakening the ability of the biological clock to respond to the light cycle, suggesting that the *pde6a*,*pde6gb*, *gucy2d* and cGMP signaling pathways are potential intervention targets.
Key words zebrafish; circadian rhythm; age; biological clock gene; light signal transduction

随着老龄化加剧，心血管疾病、神经退行性疾病、代谢性疾病等衰老相关疾病的发病率显著上升，社会负担日益加重。近年研究表明，昼夜节律作为生物体内普遍存在的约 24 h 周期性波动，对维持机体健康至关重要，广泛调控睡眠-觉醒[1]、代谢稳态[2]、认知功能[3]及情绪状态[4]等多个方面。这些内源性节律对生物体的生存具有重要意义，因为它们使生物能够通过协调内部生理功能与外部环境同步（尤其是昼夜交替的光照周期）[5]。机体为维持上述节律，在全身分布昼夜节律时钟，构成一套分层计时调控系统[6]。衰老进程中，生物体的机能出现衰退，其维持自身稳态和应对外界环境变化的能力不断降低，并最终走向死亡。昼夜节律是影响哺乳动物衰老过程的重要机制之一，衰老的诸多特征（如视交叉上核功能失调、节律振幅减弱及外周时钟失同步等）既受到生物钟的调节，又对昼夜节律功能产生反馈影响[7]。

基于上述背景，本研究旨在阐明不同年龄阶段斑马鱼的昼夜节律行为、神经结构，以及年龄对昼夜节律的影响及其潜在机制。这不仅有助于深入理解衰老进程、推动衰老相关疾病的防治，还可为揭示生物钟衰老的生物学基础提供实验依据，并有望为年龄相关性昼夜节律疾病的防治提供全新视角与潜在靶点，具有重要的理论与现实意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究选用 4、12、24 月龄野生型 AB 系雄性斑马鱼各 56 尾，购自国家斑马鱼资源中心，集中饲养于湖北中医药大学老年医学研究所斑马鱼实验室。斑马鱼饲养在温控养殖设施（pH=7.0~8.0，27.5~28.5 ℃，电导率 450~500 μs/cm），采用光暗循环自动计时器，设置 14 h/10 h 光照/黑暗条件循环。一天两次定时投喂丰年虾，每天更换循环水。

1.2 主要试剂与仪器

FAS 眼球固定液、电镜固定液、TRIzol（北京索莱宝科技有限公司，批号分别为 G1109、P1126、R1100）；HE 染色试剂盒（武汉四维加生物科技有限公司，批号 S10010）；VAHTS Universal V6 RNA-seq（上海欧易生物医学科技有限公司，批号 NR604-02）；褪黑素（melatonin, MT）、环磷酸鸟苷（cyclic guanosine monophosphate, cGMP）酶联免疫吸附测定法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（泉州市睿信生物科技有限公司，批号分别为 RXJ1300638F、RXJW1300678F）；PBS 溶液（武汉四维加生物科技有限公司，批号 S002005）；实时荧光定量逆转录 PCR（reverse transcription quantitative PCR，RT-qPCR）试剂盒（艾科瑞生物工程公司，批号

AG11701）。

斑马鱼行为分析系统、T 迷宫行为学追踪系统（法国 View Point 公司，Videotrack Track3.5）；JEM-1400Flash 型投射电子显微镜（日本电子公司）；Agilent 2100 Bioanalyzer（美国安捷伦公司）；llumina Novaseq 6000 测序平台（美国 Illumima 公司）；DR-200Bs 型酶标仪（迪亚泰克仪器有限公司）；Q225 型 Real-time PCR 仪（莫纳生物科技有限公司）；TGL-16c 台式离心机（上海安亭科学仪器厂）。

1.3　实验方法

1.3.1　分组

4 月龄、12 月龄、24 月龄野生型 AB 系雄性斑马鱼各 56 尾，分别对应分为 Young 组、Adult 组和 Old 组。

1.3.2　行为学检测

（1）24 h 运动行为追踪

每组随机选取 6 尾斑马鱼，置于直径为 15 cm 的圆形养鱼缸中，使用斑马鱼行为分析系统追踪斑马鱼的自主运动，监测 24 h 内不同状态下斑马鱼的运动轨迹。监测结束后，统计每只斑马鱼的运动速度和静息期的静息时长。

（2）T 型迷宫实验

每组随机选取 6 尾斑马鱼进行 T 迷宫测试，T 迷宫由一个垂直甬道和左右两臂组成，且甬道的起始部有一个起始区。基于斑马鱼对相应颜色的趋向性，将红色和绿色胶布分别标记左右两臂内侧，且右臂深水区域内放置诱饵称为营养富集区（EC 区）。T 迷宫分为训练阶段和测试阶段，记录 6 min 内斑马鱼首次进入 EC 的潜伏期，评估斑马鱼学习记忆能力。

1.3.3　HE 染色观察斑马鱼眼球形态

每组随机取 4 尾斑马鱼，在 4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼，立即分离眼球组织，用 FAS 眼球固定液固定。石蜡包埋后切片，经二甲苯脱蜡；苏木素水溶液浸染，分色，冲洗，脱水，伊红染色液染色；脱水，中性树胶封片，显微镜下观察眼球的形态改变。

1.3.4　透射电镜观察脑组织超微结构

每组随机取 3 尾斑马鱼，在 4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼，立即分离脑组织，用电镜固定液固定，使用 1%锇酸对斑马鱼脑组织进行后固定 2 h。乙醇脱水、树脂包埋、切片（60~80 nm），用 2%醋酸铀和 2.6%柠檬酸铅双重染色，将切片置于 150 目铜网，用透射电子显微镜采集成像。

1.3.5　转录组学测序分析

每组随机取 3 尾斑马鱼，在 4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼，取斑马鱼脑组织进行转录组学测序，样本处理及 cDNA 文库建立由上海欧易生物医学科技有限公司完成。提取样本 RNA 用于文库构建，使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序。根据 HISAT2 软件进行参考基因组比对，并进行基因表达量计算，并通过 HTSeq-count 获得每个基因的序列计数值。利用 DESeq2 软件进行差异表达基因分析，其中符合|logFC|≥1 且 $P<0.05$ 的基因被定义为差异表达基因（DEGs）。富集分析采用京都基因和基因组百科全书（KEGG）通路分析进行。

1.3.6　RT-qPCR 检测磷酸二酯酶 6A（phosphodiesterase 6A，*pde6a*）、磷酸二酯酶 6Gb（phosphodiesterase 6Gb，*pde6gb*）、视网膜鸟苷酸环化酶 2D（guanylate cyclase 2D，*gucy2d*）的 mRNA 表达

每组随机取 20 尾斑马鱼，分 6：00、12：00、18：00、24：00 四个时间点在 4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼，立即分离眼球和脑组织，充分研磨后滴加 TRIzol 试剂，匀浆离心沉淀后，提取总 RNA，并逆转录。反应条件为 95 ℃预变性 5 min，1 个循环，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s。以 β-actin 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算，引物设计由四维加生物科技有限公司代合成，基因及引物序列见表 1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	基因序列（5’ - 3’） Primer sequences（5’ - 3’）	长度/bp Length/bp
pde6a	F：GAGGGCCGTGTTTAACCTCA	146
	R：ATTCCTCCAGGGTAGCGTCT	146
pde6gb	F：CGGTGACGTCCACAACTGTA	105
	R：TTGGGCGGCTCAAGATTCAT	105
gucy2d	F：TCAGCTGAAGAGGTTTCTCCAT	180
	R：AGTACCTCCCGATATCCGCT	180
β-actin	F：ACATCAGCATGGCTTCTGCT	106
	R：GAAGTCCTCTCGGGGAAAGC	106

1.3.7 ELISA 检测脑组织和眼组织 MT 含量

每组随机取 20 尾斑马鱼，分 6：00、12：00、18：00、24：00 四个时间点在 4 ℃冰水混合物中处死斑马鱼，立即分离眼球和脑组织，匀浆提取上清液，根据 ELISA 试剂盒说明书，检测脑组织和眼球中 cGMP、MT 含量。

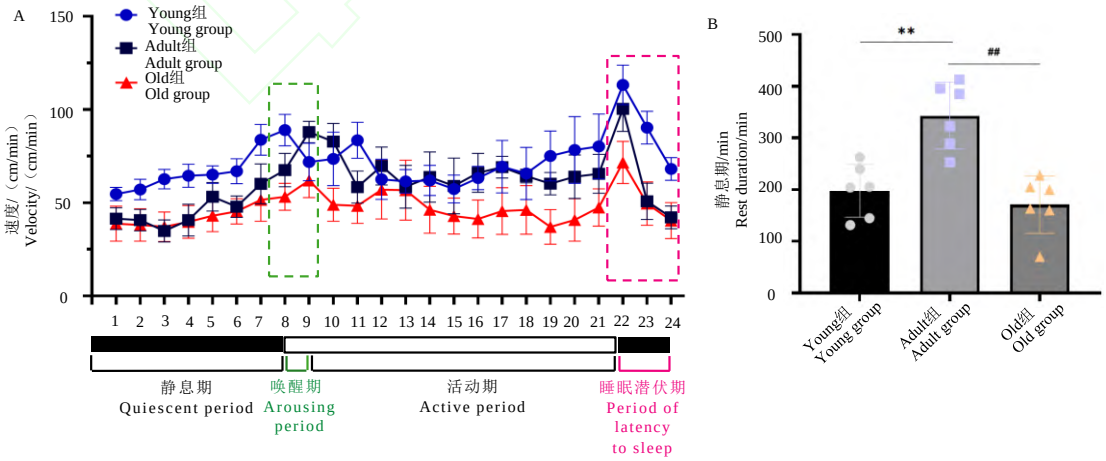
1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件分析，计量资料符合正态分布用平均数±标准误差（$\bar{X}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），方差齐时，组间比较采用 LSD 法，方差不齐时，组间比较采用 Tamhane’s T2 法，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同月龄斑马鱼 24 h 行为学结果

本研究通过监测 24 h 斑马鱼昼夜活动节律，分析不同年龄斑马鱼的运动速度，数据显示 Young、Adult、Old 组斑马鱼均观察到相似的睡眠潜伏期（22：00~24：00），Adult、Old 组斑马鱼有着相似的静息期（0：00~8：00）、觉醒期（8：00~9：00）、活跃期（9：00~22：00），而 Young 组斑马鱼的觉醒期峰值相位前移（图 1A）。不同年龄斑马鱼静息期的静息时长结果显示，与 Young 组（198.14±20.97）相比，Adult 组（343.15±26.41）静息时长明显升高（P＜0.01），而 Old 组（170.94±22.77）差异无统计学意义（P＞0.05），且 Adult 组与 Old 组比较有统计学意义（P＜0.01，图 1B）。结果提示，斑马鱼的睡眠-觉醒模式随年龄呈非线性变化，表现为青年活动多、睡眠少；中年睡眠深而集中；老年睡眠减少，可能伴随质量下降。



注：A：各组 24 h 运动速度；B：各组静息期运动时长。与 Young 组相比，$^{**}P$＜0.01；与 Adult 组相比，$^{\#\#}P$＜0.01。

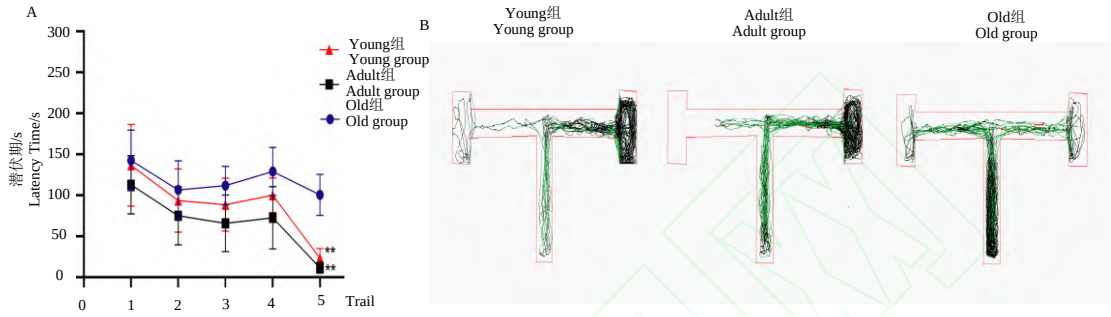
图 1　不同月龄斑马鱼 24 h 行为学

Note. A, 24-hour movement speed for each group. B, Rest period duration for each group. Compared with Young group, $^{**}P<0.01$. Compared with Adult group, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 1 24-hour behavioral studies of zebrafish at different ages

2.2　不同月龄斑马鱼学习记忆能力结果

T 型迷宫测试结果见图 2，Old 组斑马鱼到达 EC 区潜伏期显著延长。与 Old 组斑马鱼相比，Young、Adult 组斑马鱼显著缩短了进入 EC 区的潜伏期（$P<0.01$）。Young 组与 Adult 组斑马鱼相比，差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果表明，老年斑马鱼在空间学习记忆方面存在认知能力不足。



注：A：各组学习记忆能力对比; B：T 型迷宫运动轨迹。与 Young 组相比，$^{**}P<0.01$。

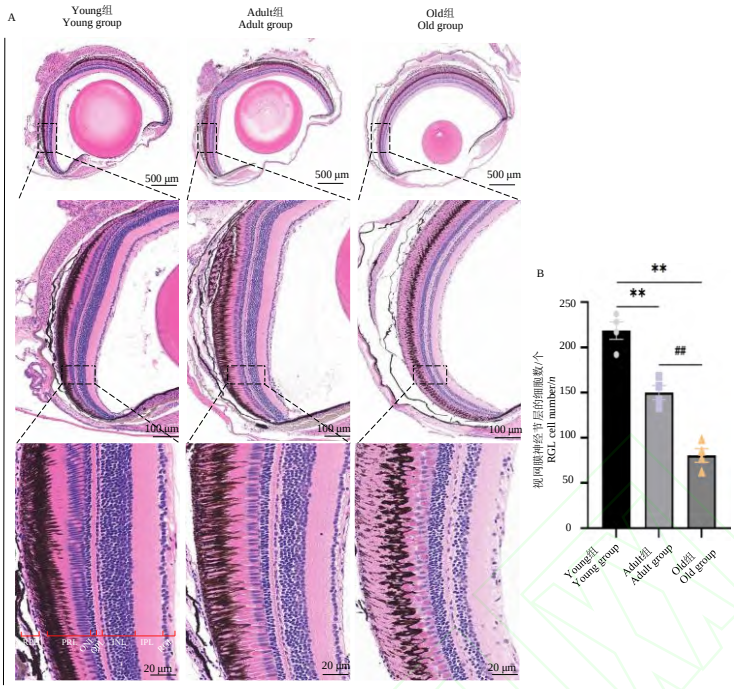
图 2　不同月龄斑马鱼 T 迷宫结果

Note. A, Comparison of learning and memory abilities among groups. B, T-maze movement trajectory diagram. Compared with Young group, $^{**}P<0.01$.

Figure 2 Results of the T-maze test in zebrafish at different ages

2.3　不同月龄斑马鱼眼球形态 HE 染色

如图 3 所示，Young 组斑马鱼的眼球组织切片中的视网膜结构形态完整，排列紧密，可清晰的分为 6 层，由内到外分别是视网膜神经节细胞层（retinal ganglion cell layer，RGL）、内丛状层（inner plexiform layer, IPL)、内核层（inner nuclear layer, INL)、外丛状层（outer plexiform layer, OPL）、外核层（outer nuclear layer, ONL）、视杆视锥层（rods and cones layer, RCL）、视网膜色素上皮层（retinal pigment epithelium, RPE）。结果显示，与 Young 组斑马鱼相比，Adult 组斑马鱼视网膜出现早期衰老性改变，PRL、ONL 细胞密度轻度下降，IPL 和 OPL 偶见微小空泡，RGL 细胞数量轻微减少；而 Old 组斑马鱼视网膜结构更为模糊，呈现明显的衰老性改变，感光细胞外节大量断裂、丢失，PRL、ONL 显著变薄，IPL 和 OPL 广泛空泡化，RGL 细胞数量显著减少。



注：A：眼球组织 HE 染色（4×、20×、40×）；RGL：视网膜神经节细胞层；IPL：内丛状层；INL：内核层；OPL：外丛状层；ONL：外核层；RCL：视杆视锥层；RPE：视网膜色素上皮层；B：视网膜神经节层的细胞数统计（n=4）。与 Young 组相比，$^{**}P$＜0.01；与 Adult 组相比，$^{\#\#}P$＜0.01。

图 3　不同月龄斑马鱼眼球组织 HE 染色结果

Note. A, HE-stained image of ocular tissue（4×, 20×, 40×）. RGL, Retinal ganglion cell layer. IPL, Inner plexiform layer. INL, Inner nuclear layer. OPL, Outer plexiform layer. ONL, Outer nuclear layer. RCL, Rods and cones layer. RPE, Retinal pigment epitheli um. B, Cell count histogram of the retinal ganglion cell layer（n=4）. Compared with Young group, $^{**}P$＜0.01. Compared with Adult group,$^{\#\#}P$＜0.01.

Figure 3 HE staining results of the eyeball tissues of zebrafish at different ages

2.4　不同月龄斑马鱼脑组织超微结构

如图 4 所示，不同月龄斑马鱼脑组织的超微结构呈现出与增龄相关的退行性改变。Young 组斑马鱼脑组织神经元细胞核形态规则，核膜清晰，线粒体形态正常，嵴排列整齐；Adult 组斑马鱼脑组织出现少量的线粒体嵴断裂；Old 组斑马鱼脑组织神经元核膜内陷，线粒体严重肿胀、空泡化，嵴断裂消失。

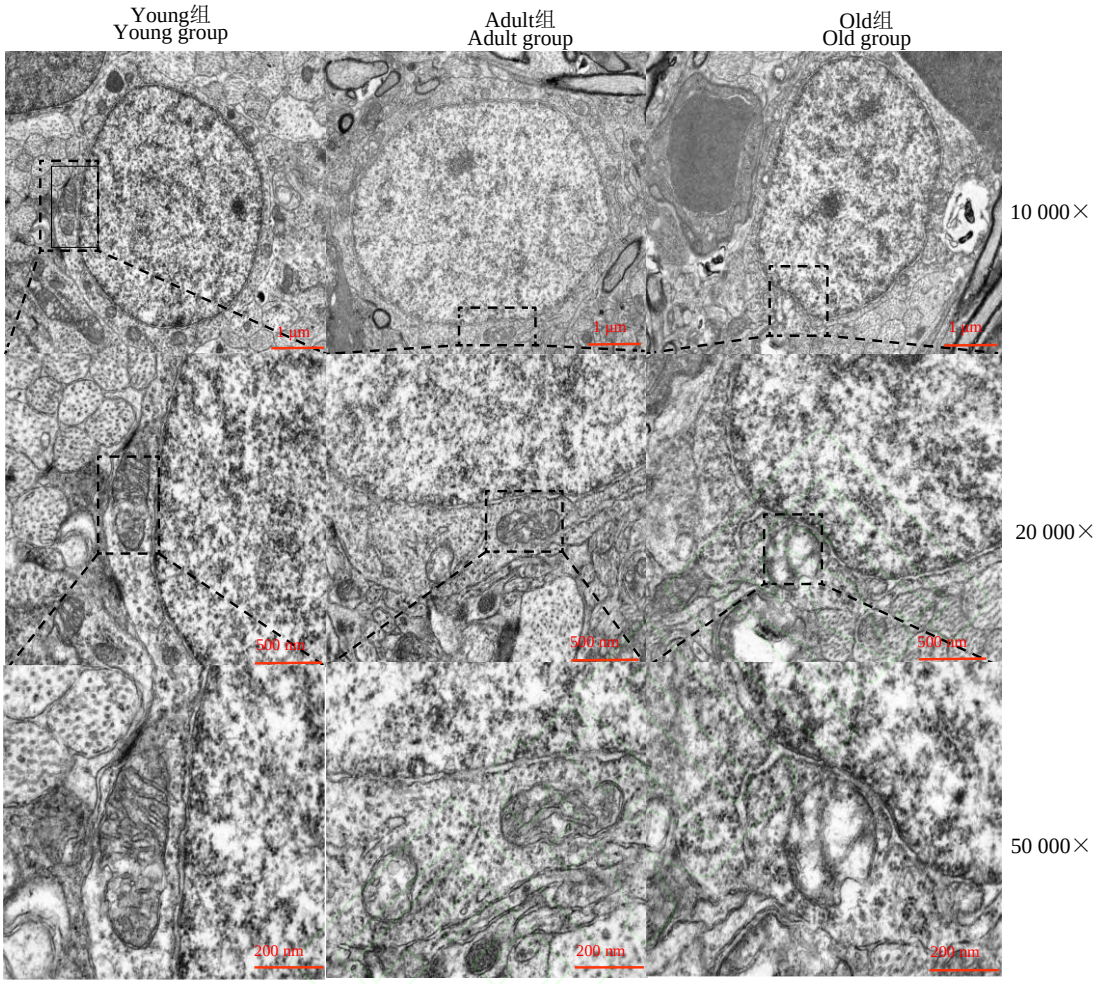
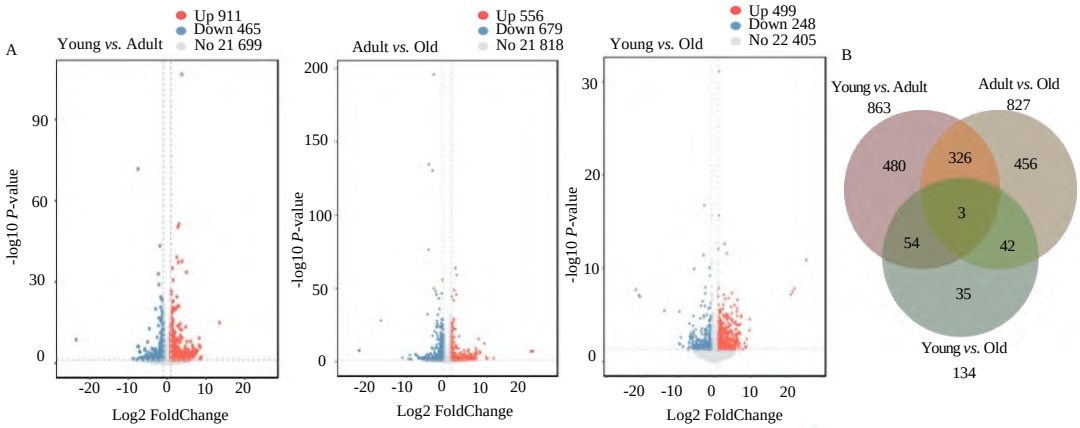


图 4　不同月龄斑马鱼脑神经元超微结构
Figure 4 Ultrastructural characteristics of brain neurons in zebrafish of different ages

2.5　不同月龄斑马鱼脑组织转录组分析

在实施控制措施消除实验误差后，对每组斑马鱼的脑组织 mRNA 谱进行了比较分析。值得注意的是，|logFC|≥1 且 $P<0.05$ 作为筛选和选择 DEGs 的阈值。如图 5A 所示，在 Young 组和 Adult 组之间共选择了 1 376 个差异基因（911 上调和 465 下调）；Adult 组和 Old 组之间观察到 1 235 个差异基因（556 上调和 679 下调）；Young 组和 Old 组发现 747 个 DEGs（499 上调和 248 下调）。使用韦恩图分析（图 5B）确定了 3 个年龄组中最常见的 DEGs。通过分层聚类分析，Young 组与 Adult 组、Adult 组与 Old 组、Young 组与 Old 组中上调和下调基因如图 6 所示。



注：A：火山图差异基因分析结果；B：差异基因韦恩图。

图 5 不同月龄斑马鱼的差异表达基因

Note. A, Analysis results of differential genes in volcano plot. B, Differential gene Venn diagram.

Figure 5 Differentially expressed genes in zebrafish of different ages

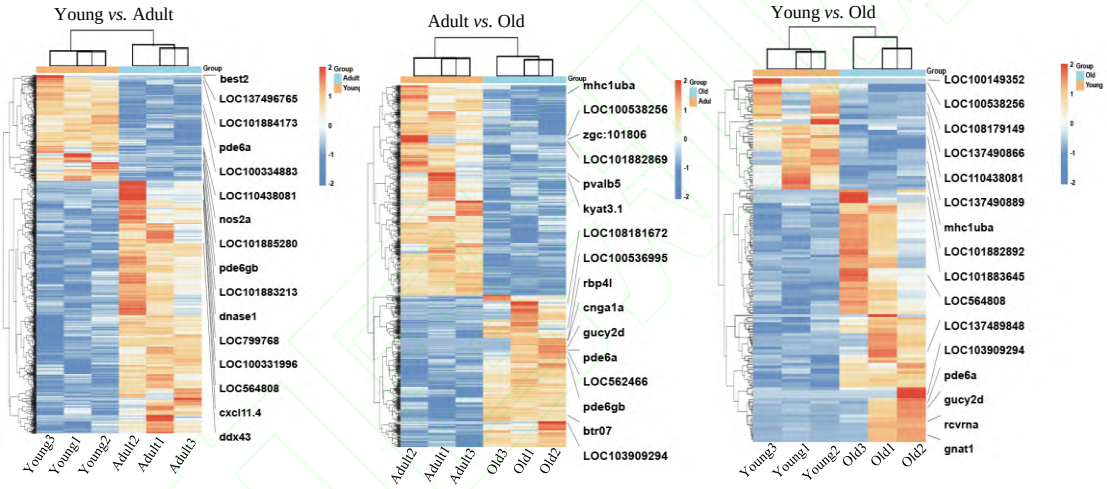


图 6 聚类热图分析不同组别间的上调和下调基因

Figure 6 Cluster heatmap analysis show the up-regulated and down-regulated genes among different groups

GO 功能富集分析显示，Young 组与 Adult 组斑马鱼相比，DEGs 在免疫应答、趋化因子介导的信号通路、基因表达的昼夜节律调控、细胞外间隙、核受体活性方面显著富集；Adult 组与 Old 组斑马鱼相比，DEGs 在视觉感知、可见光的光传导、感光细胞盘膜、感光细胞外节膜、环磷酸鸟苷结合、一元羧酸转运方面显著富集；Young 组与 Old 组斑马鱼相比，DEGs 在视觉感知、对刺激的反应、可见光的光传导、视杆感光细胞外节、环磷酸鸟苷结合方面显著增强（图 7）。

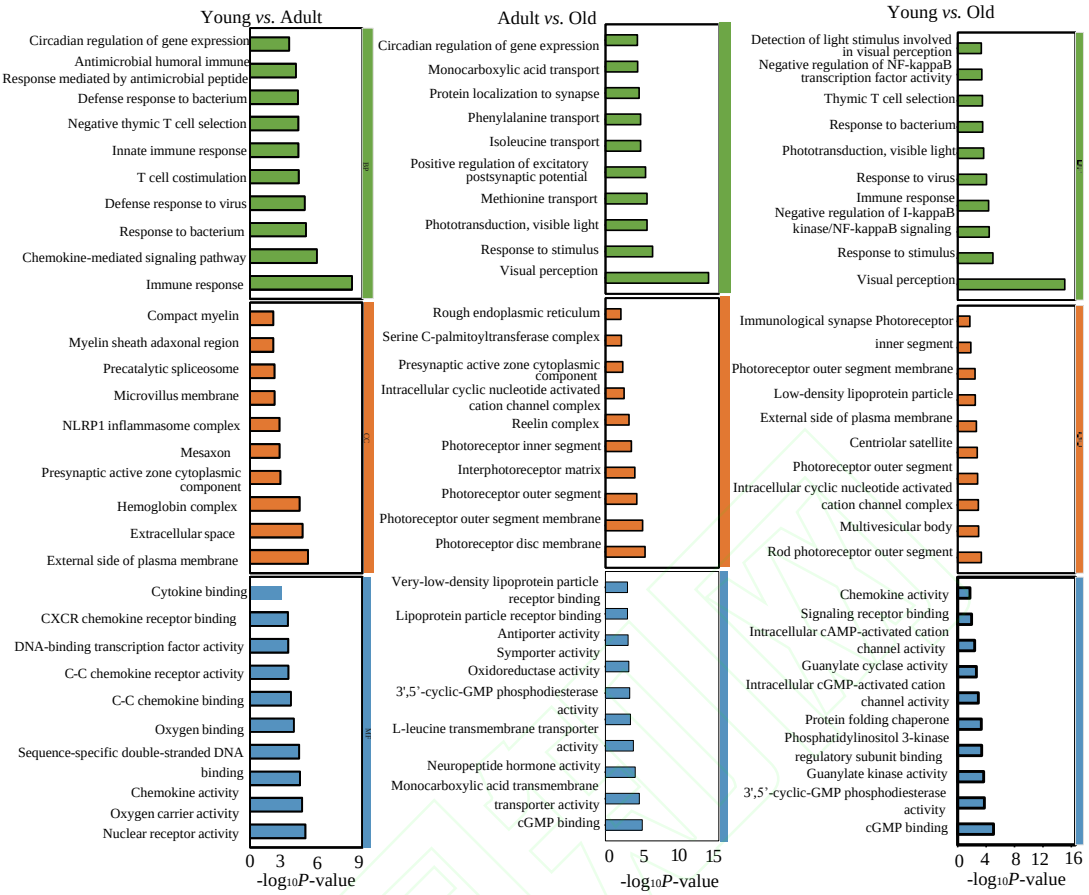


图 7　GO 功能富集分析
Figure 7 GO function enrichment analysis result

通过 KEGG 通路富集分析进一步评估了 DEGs 的生物学意义。观察发现，Young 组与 Adult 组斑马鱼相比，DEGs 在细胞因子-细胞因子受体相互作用、肠道 IgA 生成的免疫网络、谷胱甘肽代谢、Toll 样受体信号通路、p53 信号通路方面显著丰富；Adult 组与 Old 组斑马鱼相比，DEGs 在光传导、花生四烯酸代谢、类固醇激素生物合成、谷胱甘肽代谢方面均有显著增强；Young 组与 Old 组斑马鱼相比，DEGs 在光传导、嘌呤代谢、VEGF 信号通路、视黄醇代谢、α-亚麻酸代谢方面显著富集（图 8）。

值得注意的是，3 组比较之间均显示富集光传导信号通路。因此，这类信号通路可能与昼夜节律紊乱密切相关。上述结论基于 RNA- seq 测序结果获得，仍需开展实验验证以进一步探究其调控机制。基于 KEGG 通路富集分析筛选出的光转导相关显著通路，本研究选取 3 个关键基因 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* 进行 RT-qPCR 验证。同时，对通路中重要的信号分子 cGMP 进行 ELISA 检测。

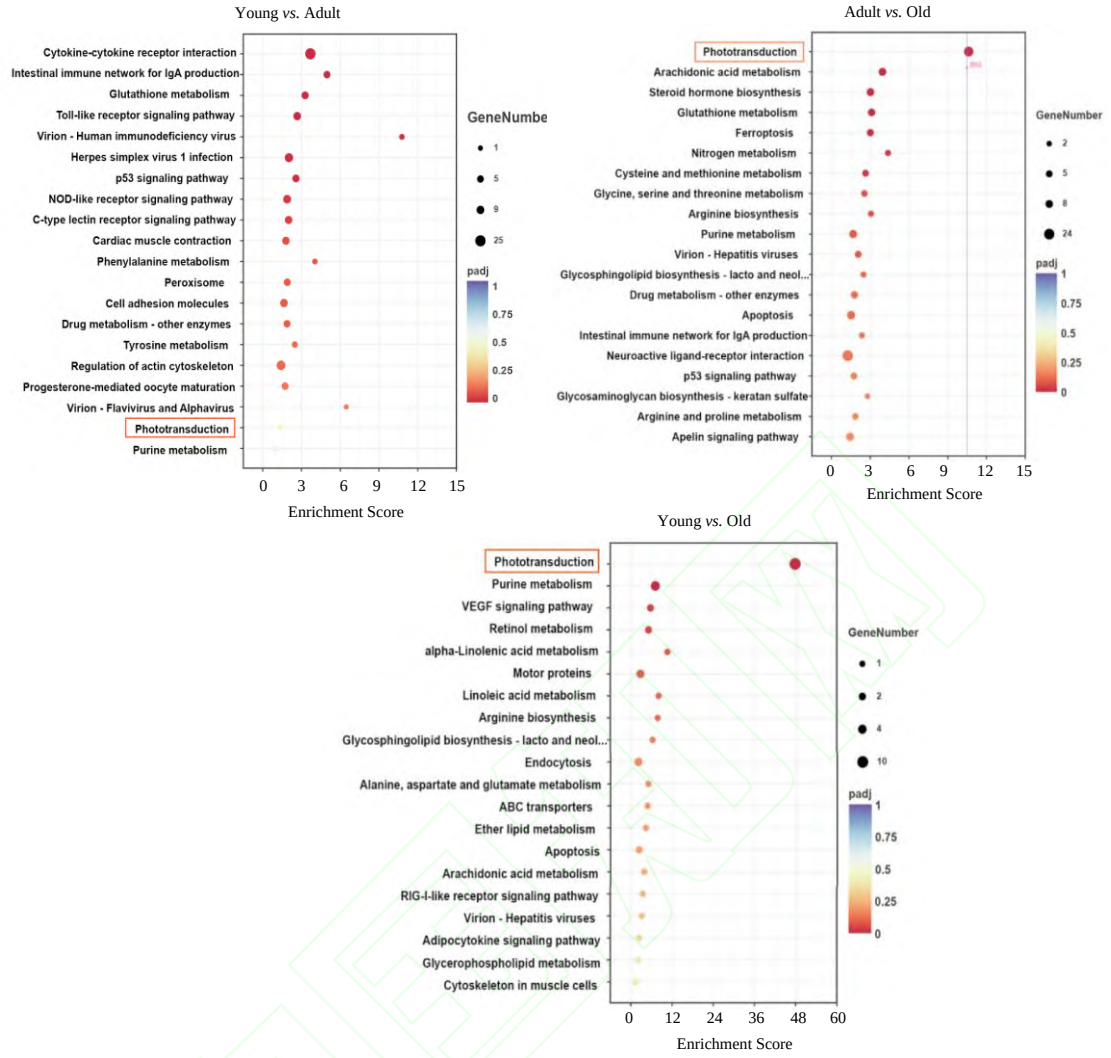


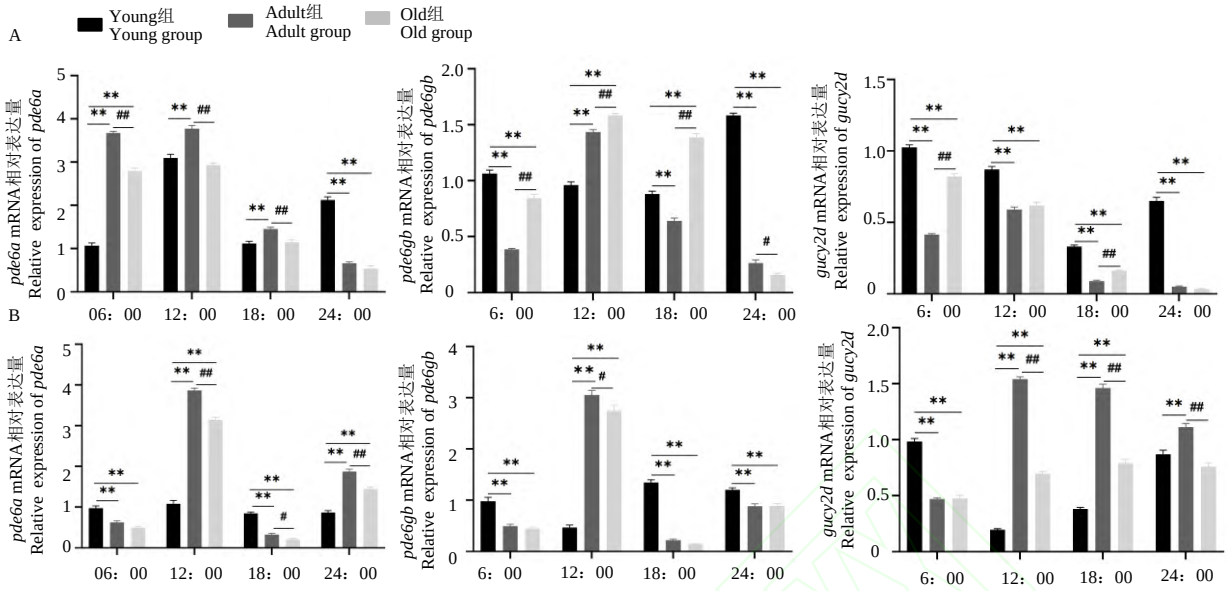
图 8 KEGG 通路富集分析结果

Figure 8 KEGG pathway enrichment analysis result

2.6 斑马鱼 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* mRNA 昼夜表达水平

通过 RT-qPCR 检测斑马鱼眼球和脑组织 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* 基因在 1 d 内不同时间点的表达水平。结果显示，Adult 组和 Old 组斑马鱼在上述基因的表达上出现相似的昼夜节律特征。在眼球组织中，Young 组斑马鱼的 *pde6gb*、*gucy2d* 均呈现与 Adult、Old 组相反的昼低夜高的变化，且表达峰值分别出现在 24:00 和 6:00，均显著高于 Adult、Old 组（$P>0.01$），谷值为 18:00，而 *pde6a* 则呈现波动性表达，其峰值在 12:00，谷值在 6:00；Adult 组和 Old 组斑马鱼的 *pde6gb* 表达峰值出现在 12:00，谷值在 24:00，与 Young 比较呈现相反的波动趋势；而 *gucy2d* 的表达峰值在 Old 组中较 Adult 组有所前移，但谷值仍均出现在 24:00（图 9A）。

在脑组织中，3 组斑马鱼的 *pde6a* 表达峰值和谷值分别为 12:00 和 18:00，但 Young 组的昼夜波动不明显。在 *pde6gb* 的表达节律上，Adult 组与 Old 组同样表现为峰值在 12:00、谷值在 18:00，而 Young 组则呈现出与这两组相反的波动趋势。Adult 组和 Old 组斑马鱼 *gucy2d* 的峰值出现在 12:00，谷值在 6:00，而 Young 组则表现出相反的节律变化（图 9B）。



注：A：各组眼球组织中 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* mRNA 表达水平; B：各组脑组织中 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* mRNA 表达水平。与 Young 相比，$^{**}P<0.01$；与 Adult 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

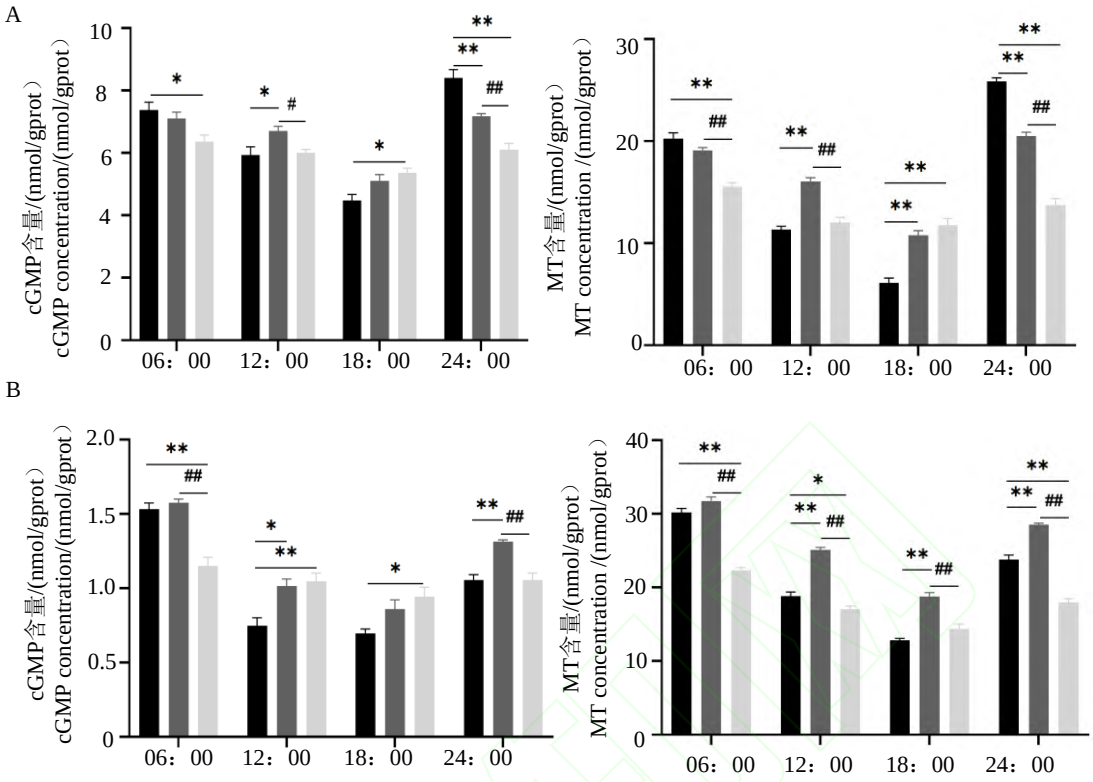
图 9　不同月龄斑马鱼 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* 的 mRNA 表达水平

Note. A, Expression levels of *pde6a*, *pde6gb* and *gucy2d* mRNA in each group of ocular tissues. B, Expression levels of *pde6a*, *pde6gb* and *gucy2d* mRNA in each group of brain tissues. Compared with Young group, $^{**}P<0.01$. Compared with Adult group, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 9 mRNA expression levels of *pde6a*, *pde6gb* and *gucy2d* in zebrafish of different ages

2.7　斑马鱼 cGMP、MT 昼夜含量分析

通过 ELISA 检测了斑马鱼眼球和脑组织中 cGMP 和 MT 浓度。结果显示，在不同月龄斑马鱼的眼球与脑组织中，cGMP 和 MT 的含量均呈现昼低夜高的变化特征。在眼球中，Young 组斑马鱼的 cGMP 和 MT 含量峰值均出现在 24:00，且显著高于 Adult 组和 Old 组（$P<0.01$），谷值为 18:00，且显著低于 Adult 组和 Old 组（$P<0.05$，$P<0.01$）；Adult 组斑马鱼在眼球中 cGMP、MT 含量峰值亦出现在 24:00，谷值均为 18:00，且显著高于 Old 组（$P<0.01$）；而 Old 组斑马鱼的 cGMP、MT 含量峰值出现在 6:00，谷值同样为 18:00（图 10A）。在脑组织中，三组斑马鱼 cGMP 和 MT 的表达峰值均出现在 6:00，谷值为 18:00。Young 组斑马鱼较 Old 组显著升高（$P<0.01$），相较于 Adult 组虽有下降趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；相比之下，Old 组斑马鱼在一天内 cGMP 与 MT 的含量波动幅度较小，昼夜差异不明显（图 10B）。



注：A：各组眼球组织中 cGMP、MT 含量表达; B：各组脑组织中 cGMP、MT 含量表达。与 Young 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 Adult 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 10　不同月龄斑马鱼 *cGMP*、MT 含量表达

Note. A, Expression of cGMP and MT contents in each group of ocular tissues. B, Expression of cGMP and MT contents in each group of brain tissues. Compared with the Young group, $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$. Compared with the Adult group, $^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

Figure 10 Expression of cGMP and MT contents in zebrafish of different ages

3　讨论

衰老伴随睡眠结构与昼夜节律的显著退化，表现为慢波睡眠显著减少、睡眠效率下降及节律相位前移[8-10]。昼夜节律作为生物体适应外界环境周期性变化的内在计时机制，其稳定性对于维持生理功能的有序运行至关重要。然而，在衰老过程中，生物钟系统往往表现出渐进性功能衰退，进而影响睡眠、代谢、认知等多方面的健康结局。因此，深入探究昼夜节律在衰老及相关疾病中的作用机制，对理解衰老进程、防治衰老相关疾病具有重要意义。斑马鱼作为昼夜节律研究与衰老生物学的重要模式生物，因其生物钟基因高度保守、发育迅速、易于观察行为节律等优势，已成为研究人类疾病的理想模型，故本实验选取斑马鱼作为研究对象[11]。

睡眠和活动模式的变化是人类衰老的标志之一，衰老会改变斑马鱼的睡眠，导致其整体睡眠时间缩短，且睡眠碎片化增加[12]。本研究发现不同月龄斑马鱼睡眠-觉醒模式随年龄呈现非线性变化，4 月龄活动多、睡眠少；12 月龄静息时长显著增加，睡眠深而集中；24 月龄静息时长回落，睡眠减少、碎片化增加。这种变化趋势可能与青年斑马鱼处于代谢率较高、活动较为旺盛的阶段有关[13]。

斑马鱼的平均寿命约 3 年，但在实验室条件下寿命可长达 4-5 年[14]，认知变化约从 2 岁开始变得明显[15]。本研究使用 T 型迷宫实验比较分析斑马鱼的认知功能，结果发现 24 月龄斑马鱼达到 EC 区的潜伏期显著延长，而 4 月龄、12 月龄表现相当，提示空间学习记忆能力随年龄下降。值得注意的是，4 月龄、12 月龄之间无显著差异，说明 12 月龄斑马鱼在学习中表现出与 4 月龄斑马鱼相当的适应能力，可能与斑马鱼处于“中年平台期”，其认知储备资源尚未耗尽，足以应对 T 迷宫等难度认知任务有关[15-17]。

视网膜和脑组织各层结构的完整性是维持正常功能的基础，其衰老性改变首先表现为细胞结构的渐进性退行性改变。组织学与超微结构显示，老年斑马鱼视网膜出现感光细胞外节断裂、外核层变薄、色素上皮层紊乱下丘脑神经元出现线粒体肿胀、嵴断裂、核膜内陷等，表明中枢生物钟的结构基础在衰老过程中逐步退化。上述结果与既往研究一致，即老年斑马鱼不仅视网膜出现增殖活性显著下降[18]、感光细胞外节破坏与 RPE 形态紊乱[19]，脑组织亦存在年龄增长导致的核膜结构破坏与神经元功能障碍[20]。这些变化可能导致光信号传导效率下降、生物钟对外界光周期的同步能力减弱。

转录组学及 qPCR 验证表明，光传导通路在不同年龄组间显著富集。关键分子 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* 和 cGMP，发现其表达节律在不同月龄组间存在相位偏移和振幅减弱。主生物钟位于大脑的视交叉上核，它需要根据外界光线信号来校准时间。这一过程依赖于光感受器对光的敏感度，而敏感度主要由 *pde6a*、*pde6gb* 和 *gucy2d* 等基因调控。这些基因的功能是否正常，直接决定了大脑能否接收到准确的昼夜时长信息。其中，cGMP 是光信号转导中的关键第二信使，在昼夜节律和睡眠调节中发挥着重要作用。*gucy2d* 负责催化 cGMP 的合成，pde6 复合体（由 *pde6a* 和 *pde6gb* 等亚基构成）则介导其降解，二者协同调控光感受器细胞内的 cGMP 水平，进而影响光暗信号的转换和视觉适应[21]。褪黑素是调节睡眠-觉醒周期的主要激素，随着年龄的增长，褪黑素的分泌量逐渐减少，这与老年人失眠发生率的升高呈负相关[22]。本研究发现，随着年龄增长，斑马鱼眼球和脑组织中 MT 及 cGMP 的昼夜节律发生显著改变，且与光转导关键基因 *pde6a*、*pde6gb*、*gucy2d* 的表达节律密切相关。Young 组眼球 *pde6a* 呈现波动性表达，*pde6gb* 和 cGMP 在 24:00 同时达峰，呈现典型的昼低夜高节律，同时 *gucy2d* 在 6:00 达峰。这看似矛盾——因为 *pde6gb* 降解 cGMP，其高表达应降低 cGMP。但考虑到基因表达与蛋白活性之间存在时间延迟及反馈调节，夜间高表达的 *pde6gb* 为即将到来的黎明做准备，但此时 pde6 全酶的总活性被抑制，因此不会降解 cGMP[23, 24]。而 *pde6a* 作为催化亚基，将 cGMP 水解，转化为 5’-GMP[25]，故呈现昼高夜低节律。此外，MT 与 cGMP 在眼球中呈同步节律，提示 MT 可能通过其受体调控 cGMP 代谢。与 Young 组相反，Adult 和 Old 组眼球的 *pde6gb* 和 *gucy2d* 节律相位发生反转或前移，导致 cGMP 和 MT 的昼夜波动幅度显著降低（Old 组尤为明显），表明衰老破坏了视网膜局部光转导与褪黑素系统的耦合。脑组织中，三组 MT 和 cGMP 峰值均出现在清晨，但 Old 组昼夜差异缩小且含量显著低于 Young 组，证实了褪黑素分泌随年龄下降的规律。眼球与脑组织节律相位的解耦联（眼球夜间峰值 vs.脑清晨峰值）反映了外周视网膜时钟对光照的快速响应更易受衰老影响。

综上所述，斑马鱼在衰老过程中表现出多层次、多系统的昼夜节律紊乱：从行为节律的振幅减弱，到视网膜结构与功能的退化，再到超微结构损伤，最终体现在光信号转导通路基因表达节律的改变及激素输出的节律减弱。这些变化共同削弱了生物钟对外界光周期的感知与响应能力，导致昼夜节律系统的整体失调。本研究为理解衰老相关昼夜节律紊乱提供了系统的实验依据，并为干预策略的开发提供了潜在靶点。未来可进一步通过基因敲除或药物干预手段，验证这些靶点在节律调控与衰老进程中的因果作用。

参考文献:

[1] 卢维杰， 吴国泰， 刘凯， 等. 生理性睡眠觉醒的潜在调节机制 [J]. 中国药理学通报， 2024， 40（3）： 421-426.
Lu W J, Wu G T, Liu K, et al. The regulatory mechanism of physiological sleep-wake [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(3): 421-426.
[2] 李旻典， 张舰心. 代谢生物钟：昼夜节律调控代谢研究的最新进展 [J]. 陆军军医大学学报， 2025， 47（4）： 285-289.
Li M D, Zhang J X. Circadian Metabolism: What’s new in circadian regulation of metabolism [J]. J Army Med Univ, 2025, 47(4): 285-289.
[3] 刘登峰， 张逸淳， 李家大. 昼夜节律紊乱与神经发育障碍 [J]. 生理学报， 2025， 77（4）： 678-688.
Liu D F, Zhang Y C, Li J D. Circadian rhythm disturbances and neurodevelopmental disorders [J]. Acta Physiol Sin, 2025, 77(4): 678-688.
[4] 文可奕， 张云妍， 王芳易， 等. 生物钟基因调控昼夜节律影响抑郁症研究进展 [J]. 中国神经精神疾病杂志， 2025， 51（9）： 565-570.
Wen K Y, Zhang Y Y, Wang F Y, et al. Advances in the role of circadian clock genes between circadian rhythms and depression [J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2025, 51(9): 565-570.
[5] Stowe T A, McClung C A. How does chronobiology contribute to the development of diseases in later life [J]. Clin Interv Aging, 2023, 18: 655-666.
[6] Patke A, Young M W, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 67-84.
[7] 李恩泽， 陈一凡， 卜军. 昼夜节律在衰老及相关疾病中的作用机制研究进展 [J]. 生命科学， 2026， 38（6）： 1095-1113.

Li E Z, Chen Y F, PU Jun. Research advances on the mechanisms of circadian rhythms in aging and age-related diseases [J]. Chin Bull Life Sci, 2026, 38(6): 1095-1113.
[8] Mander B A, Winer J R, Walker M P. Sleep and human aging [J]. Neuron, 2017, 94(1): 19-36.
[9] Leng Y, Musiek E S, Hu K, et al. Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(3): 307-318.
[10] 游添伊， 苏春晓， 马铁明. 基于脑功能调控机制探讨针灸治疗老年失眠的研究进展 [J]. 中国老年学杂志， 2025， 45（14）： 3572-3576.
You T Y, Su C X, Ma T M. Research progress on acupuncture treatment for senile insomnia based on brain function regulation mechanism [J]. Chin J Gerontol, 2025, 45(14): 3572-3576.
[11] Saluja D, Jhanji R, Kaushal S, et al. Importance of zebrafish as an efficient research model for the screening of novel therapeutics in neurological disorders [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20(2): 145-157.
[12] Zhdanova I V, Yu L, Lopez-Patino M, et al. Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance [J]. Brain Res Bull, 2008, 75(2/3/4): 433-441.
[13] Gómez-Requeni P, Conceição L E C, Olderbakk Jordal A E, et al. A reference growth curve for nutritional experiments in zebrafish (*Danio rerio*) and changes in whole body proteome during development [J]. Fish Physiol Biochem, 2010, 36(4): 1199-1215.
[14] Kishi S. The search for evolutionary developmental origins of aging in zebrafish: a novel intersection of developmental and senescence biology in the zebrafish model system [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2011, 93(3): 229-248.
[15] Yu L, Tucci V, Kishi S, et al. Cognitive aging in zebrafish [J]. PLoS One, 2006, 1(1): e14.
[16] Mazzitelli-Fuentes L S, Román F R, Castillo Elías J R, et al. Spatial learning promotes adult neurogenesis in specific regions of the zebrafish pallium [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 840964.
[17] Karoglu-Eravsar E T, Tuz-Sasik M U, Adams M M. Environmental enrichment applied with sensory components prevents age-related decline in synaptic dynamics: Evidence from the zebrafish model organism [J]. Exp Gerontol, 2021, 149: 111346.
[18] Hernández-Núñez I, Quelle-Regaldie A, Sánchez L, et al. Decline in constitutive proliferative activity in the zebrafish retina with ageing [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11715.
[19] Fu J, Nagashima M, Guo C, et al. Novel animal model of crumbs-dependent progressive retinal degeneration that targets specific cone subtypes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(1): 505-518.
[20] Chavali L, Yddal I, Bifulco E, et al. Progressive motor and non-motor symptoms in Park7 knockout zebrafish [J]. IJMS, 2023, 24(7): 6456.
[21] Hofmann F. The cGMP system: components and function [J]. Biol Chem, 2020, 401(4): 447-469.
[22] Poza J J, Pujol M, Ortega-Albás J J, et al. Melatonin in sleep disorders [J]. Neurologia, 2022, 37(7): 575-585.
[23] Lagman D, Franzén I E, Eggert J, et al. Evolution and expression of the phosphodiesterase 6 genes unveils vertebrate novelty to control photosensitivity [J]. BMC Evol Biol, 2016, 16(1): 124.
[24] Faillace M P, Keller Sarmiento M I, Rosenstein R E. Daily variations in cGMP, guanylate cyclase and phosphodiesterase in the golden *Hamster* retina [J]. Vis Res, 1996, 36(10): 1365-1369.
[25] Muradov H, Boyd K K, Artemyev N O. Rod phosphodiesterase-6 PDE6A and PDE6B subunits are enzymatically equivalent [J]. J Biol Chem, 2010, 285(51): 39828-39834.