

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-096

生物振荡的设计原理与人工合成

姜源旭^{1,2}, 范盈盈¹, 魏平^{1,2}

(¹ 中国科学院深圳先进技术研究院, 定量合成生物学全国重点实验室, 深圳合成生物学创新研究院, 细胞与基因线路设计中心 广东 深圳 518055; ² 北京大学前沿交叉学科研究院, 定量生物学中心, 北京 100871)

摘要: 振荡现象在各类生物体系中发挥着关键的生理功能。自20世纪50年代以来, 学界就已经开始了关于生物振荡成因的理论探索。进入21世纪, 三抑制振荡子 (repressilator) 系统的人工合成, 标志着现代合成生物学的开端, 也标志着人工合成生物振荡的研究开启了黄金时代。本文将回顾本领域近二十余年的发展成果, 从设计原理、人工合成与实际应用三个方面加以论述。生物振荡产生的三个主要条件是负反馈网络结构、足够长的时间延迟和非线性调控关系; 通过调整网络拓扑结构或引入外界周期信号, 可以提升振荡的可调性与稳定性。最早的合成振荡系统完全基于转录调控, 而时至今日, 在蛋白、代谢乃至多细胞群体水平的合成振荡都已实现。这种人工合成的振荡系统将有助于调控种群生长、提高发酵效率、影响细胞命运, 并有望为免疫治疗提供全新的思路。

关键词: 生物振荡; 调控网络; 网络拓扑; 同步化; 人工合成

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Design principles and artificial synthesis of biological oscillators

JIANG Yuanxu^{1,2}, FAN Yingying¹, WEI Ping^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Quantitative Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Center for Cell and Gene Circuit Design, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China; ² Center for Quantitative Biology, Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Oscillation plays a crucial role in functioning properly for various biological systems, including circadian regulation, cell cycle, neuron activity and intracellular signal transduction. Ever since the first discovery of glycolysis oscillation back to the 1950s, more and more researchers have been engaged in the theoretical exploration of criteria for biological oscillations. At the turn of this century, the artificial synthesis of the repressilator system, which composed of the prokaryotic transcriptional repressors LacI, TetR and λ cI, marked the beginning of modern synthetic biology and leading to a golden age for research on artificially synthesized biological oscillators. This article reviews the development in this field that was achieved within the past two decades, discussing them from three aspects: design principles, experimental synthesis, and practical applications. The three main conditions for generating biological

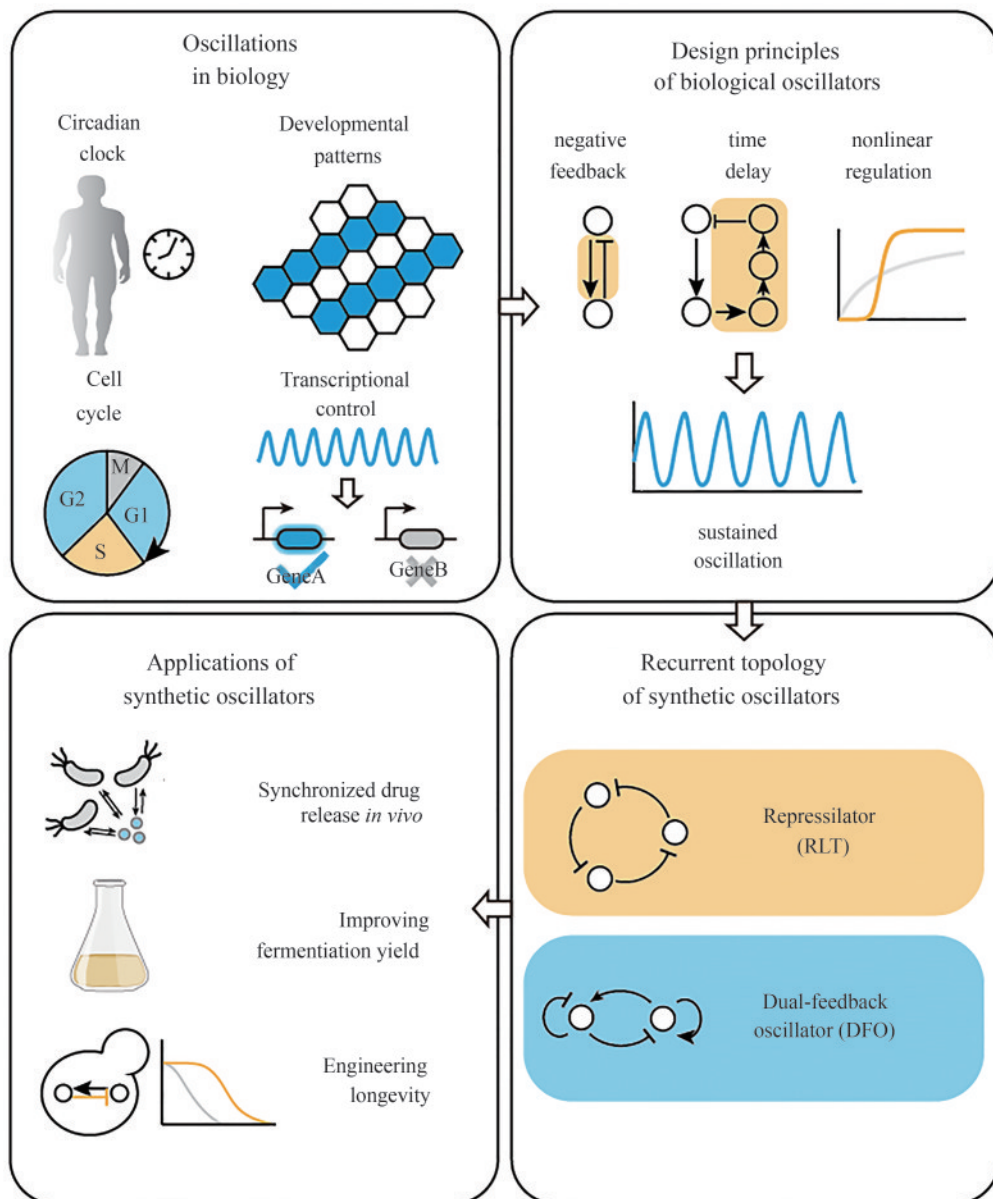
收稿日期: 2024-12-18 修回日期: 2025-03-04

基金项目: 国家重点研发计划 (2024YFA0919500, 2023YFF1204500)

引用本文: 姜源旭, 范盈盈, 魏平. 生物振荡的设计原理与人工合成[J]. 合成生物学, 2025, 6(3): 516-531

Citation: JIANG Yuanxu, FAN Yingying, WEI Ping. Design principles and artificial synthesis of biological oscillators [J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(3): 516-531

oscillations are a negative feedback network structure, sufficient delay over long time, and nonlinear regulatory relationship. Time delay can be achieved by directly introducing biochemical interactions with slow timescales, adding multiple intermediate reaction steps, or forming interlinked positive feedback loops. By adjusting the network topology or introducing external periodic signals, the tunability and stability of oscillations can be enhanced. With computational approaches, researchers are able to scan all the possible network topologies with less than three nodes for robust oscillation emergence and noise resistance. The earliest synthetic oscillatory systems were entirely based on transcriptional regulation in *E. coli*, yet now synthetic oscillators have been developed at the protein, metabolite, and even multicellular population levels as well as in biological chassis ranging from bacteria, yeast and mammalian cells. These artificially synthesized oscillatory systems have been demonstrated to be able to potentiate the precise regulation of population growth and drug delivery, improve fermentation efficiency in engineered strains, reprogram cell aging, and potentially offer new perspectives for immunotherapy and beyond.



Keywords: biological oscillation; regulatory network; network topology; synchronization; artificial synthesis

1 振荡在生物系统中的核心作用

周期振荡在生物系统的各个层面广泛存在。从昼夜节律^[1-4]、细胞分裂^[5-7]、代谢调控^[8-10]，到体节发育^[11-13]、信号转导^[14-18]、群体通信^[19-21]、神经认知^[22-24]，生物振荡都在其中扮演了至关重要的角色。由 Cyclin 蛋白和周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 调控的细胞分裂过程是所有真核生物生存繁衍的基础^[5]。由 PER/BMAL1 调控的生物钟振荡是动物赖以生存的二十四小时节律的主要维系者^[2]。由 Notch 和 FGF 信号调控的周期振荡与行波是体节发育的核心控制器，破坏这种振荡或改变其周期将造成明显的发育失调^[11]。在血液循环过程中，自主兴奋神经周期性的电脉冲发放对于维持心脏的正常搏动不可或缺^[24]；在信号转导过程中，诸如 NF- κ B、p53 等核心转录因子在特定情况下表现出周期式的出入核现象，这种周期振荡有利于提高细胞修复 DNA 的效率^[15]，对外界抗原信息产生特异性应答^[17]。

振荡不仅体现在单细胞层面，还在群体水平的通信与自组织过程中发挥核心的调控功能。在著名的社会性单细胞生物盘基网柄菌中，信号分子环腺苷单磷酸 (cAMP) 的同步化振荡是使单细胞聚集成多细胞菌丝的关键。这种群体层面的振荡同步化不仅局限于低等生物，还在高等动物的群体行为 (如萤火虫的闪光^[25-26]、树蛙的鸣叫^[27]) 中得以体现，并对个体间信息传递、交配与繁衍具有重要意义。

因此，上述这些纷繁复杂的生物振荡现象背后是否存在统一的设计原理与调控规律，一直以来是系统生物学领域研究的核心问题之一。然而，传统生物学手段采取自上而下的方式，通过对天然系统进行局部干扰研究生物振荡，往往难以确认核心网络结构，也难以对其进行定量而系统的刻画^[28]。与此相反，合成生物学利用自下而上的手段，在非线性的动力学理论模型的指导下，基于简单的基因和蛋白元件人工重建振荡系统，为生物振荡研究打开了全新的视角和思路。本综述将首先介绍生物振荡的基本理论，系统性整理总结合成生物学在该领域 20 多年来的研究进展，并对合成生物振荡的应用与未来发展方向加以展望。

2 生物振荡的动力学理论

2.1 生物振荡的产生条件

自 20 世纪 50 年代生物振荡现象在糖酵解系统中被初次发现之后^[29-30]，理论生物学家便从未停止过在一般性原理层面探讨生物振荡的发生条件与调控机制。从热力学本质的角度来说，自发的生物化学振荡是一种远离热力学平衡态的、在时间尺度上高度有序的结构。维持这种结构需要持续的外部能量输入，也即一种远平衡态的耗散结构。对生物化学振荡的研究是现代非平衡态统计物理学的重要课题之一^[31-32]。从非线性动力学理论的角度来说，稳定的生物化学振荡可以对应于相平面或相空间中的稳定极限环 (stable limit cycle)。在大多数情况下，随着某一动力学参数的变化，系统将从单一的恒定状态 (稳定不动点) 逐渐演变为持续振荡的状态 (稳定极限环)，这种变化过程在动力学上被称为霍普夫分岔 (Hopf bifurcation)^[33]，是绝大多数生物化学振荡发生的动力学基础。然而，从合成生物学改造与重构的角度来说，更重要的是系统产生振荡的网络结构条件，即何种调控网络的拓扑结构与动力学参数的取值范围可以导致生物振荡的发生。在本节中，我们将尽量省略繁冗的数学推导，从相对定性的角度加以简要阐述。

从直观的角度考虑，一个特定的生物系统若要产生周期性的变化，其内部必须存在一定的“负调节”机制，使系统中各组分的含量能够“回复”到一定时间之前的状态。因此，负反馈回路 (negative feedback loop) 是产生生物振荡不可或缺的一个基础条件^[34-36] [图 1(a)]。在所有已知的生物振荡系统中均存在负反馈回路，比如对于生物钟系统，BMAL1 和 CLOCK 复合体促进了抑制蛋白 PER 和 CRY 的表达，而 PER/CRY 复合体则反过来抑制前者入核发挥功能^[2]。对于细胞周期振荡，后促进因子复合体 APC 抑制了 CDK 的功能，而 CDK 又可以通过一系列步骤活化 APC 使其发挥生物活性^[5]。负反馈对于振荡的必要性同样在理论层面上得到了验证：比如 Thomas^[37] 在基于布尔网络的理论研究中指出，反馈调控回路可以分为正反馈回路

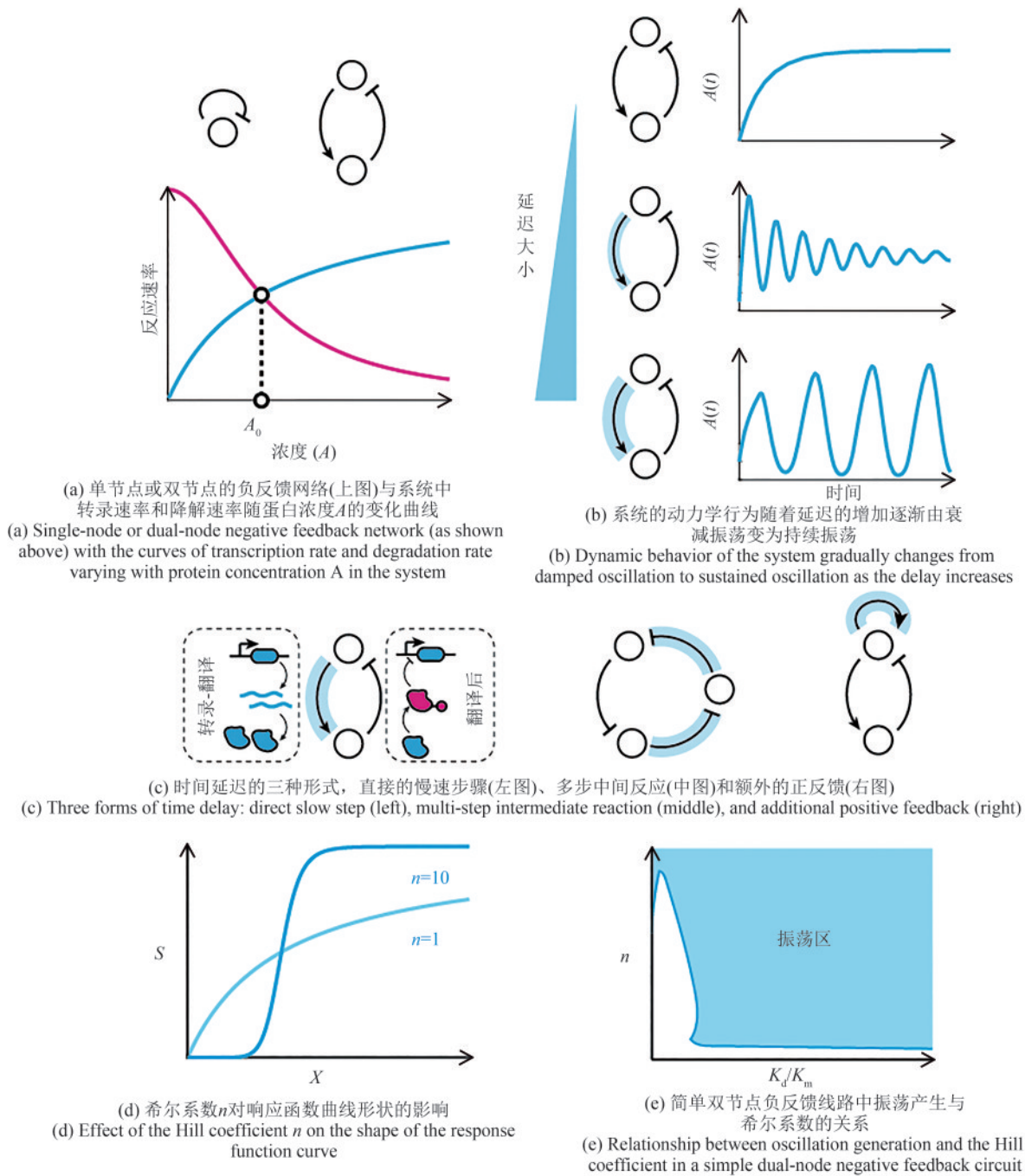


图1 产生生物振荡的主要条件

Fig. 1 Main conditions for generating biological oscillations

和负反馈回路两类，正反馈回路倾向于产生多稳态，而负反馈回路则更有可能产生周期振荡。François和Hakim^[38]通过遗传算法探索能够产生振荡的网络拓扑结构，发现了包含奇数个抑制节点的环状网络在随机生成的拓扑结构中更频繁地产生霍

普夫分岔，并量化了其参数区间的鲁棒性。

然而，单一的负反馈本身并不是产生振荡的充分条件。研究表明，快速的负反馈不仅不能引发振荡，反而会使系统加速趋于稳态，这一结论已在理论和实验两个层面得到了验证^[39-40]。因此，

为了使一个具有负反馈结构的系统产生振荡, 另一个必不可少的条件是系统内至少有一个反应步骤相较其他步骤而言具有足够的时间延迟 (time delay) [图 1(b)]. 延迟对振荡产生的影响可以用下述模型系统来理解. 对于一个具有自抑制调控的蛋白转录-降解系统, 可以写出描述其动力学过程的微分方程, 见式(1):

$$\frac{dA}{dt} = k_1 \frac{K_d^n}{K_d^n + A(t)^n} - k_2 \frac{A}{K_m + A} \quad (1)$$

在该系统中, 蛋白 A 的转录过程可被自身抑制, 其自身也可经由米氏动力学过程降解. 由此, 可以画出生成速率与降解速率关于 A 自身浓度的函数曲线 [图 1(a) 下图], 设其交点横坐标值为 A_0 , 当蛋白浓度 $A(t) > A_0$ 时, 降解速率大于生成速率, 浓度降低; 反之浓度升高. 因此, 系统将最终稳定在 $A(t) = A_0$ 处, 不会产生振荡.

现在考虑蛋白 A 对自身的抑制作用具有延迟效果. 将生成项替换为式(2):

$$\frac{dA}{dt} = k_1 \frac{K_d^n}{K_d^n + A(t - \tau)^n} - k_2 \frac{A}{K_m + A} \quad (2)$$

从而, t 时刻的生成速率由 $t - \tau$ 时刻蛋白 A 的浓度决定. 在此情境下, 当 $A(t) = A_0$ 时, 其净变化率并不为 0, 而受到 $t - \tau$ 时刻的状态的影响. 需要注意的是, 要产生持续稳定的周期振荡, τ 必须足够大, 即延迟所带来的滞后效应必须足够强, 使得系统能够回复到上一周期结束时的状态, 否则就会变成衰减振荡. 图 1(b) 展示了 3 种不同取值条件下 A 的动力学行为. 事实上, 延迟的大小对振荡产生的影响与反应的非线性以及生成降解速率之间的比例均有关系: 若反应的非线性足够高且生成速率与降解速率相对平衡, 则产生振荡所需的延迟就更低^[34].

在真实的生物网络中, 产生时间延迟通常有 3 种方式: 第 1 种是直接引入具有更慢时间尺度的反应 [图 1(c) 左图], 比如对于同时涉及转录水平互动与蛋白水平互作的系统中, 转录所需的时间尺度通常显著慢于蛋白质水平酶促反应的时间尺度, 从而提供延迟^[41-42]. 第 2 种是在系统中通过引入 (一系列) 中间步骤 [图 1(c) 中图], 从而变相延缓总反应的表现速率, 比如在 p53 振荡中, 其负调控因子 Mdm2 受 p53 的调控需要额外的中间步

骤, 从而产生了时间延迟^[5]. 最后一种常见的方式是引入额外的正反馈 [图 1(c) 右图]^[43]. 因为时间延迟本质上是一种短时的记忆, 使系统能够维持在一段时间之前的状态; 而具有双稳态现象的正反馈网络则可以完美地提供这种记忆性, 从而使稳定振荡更容易发生.

最后, 生物振荡的产生通常还需要反应步骤中具有足够的非线性 (nonlinearity). 举例来说, 对于一个由希尔方程描述的信号激活过程, 见式(3):

$$s = \frac{x^n}{K^n + x^n} \quad (3)$$

当其中的希尔系数 n 大于 1 时, 称这一过程是非线性的. 希尔系数越大, 非线性的程度就越高 [图 1(d)].

如果考虑一个最简单的由希尔方程描述的二维自抑制表达系统 (改编自 Novák & Tyson, 2008)^[34], 如式(4)和式(5):

$$\frac{dX}{dt} = k_1 \frac{K_d^n}{K_d^n + Y^n} - k_2 X \quad (4)$$

$$\frac{dY}{dt} = k_3 X - k_4 \frac{Y}{K_m + Y} \quad (5)$$

式中, $k_1 \sim k_4$ 为速率常数; K_d 为半抑制常数; K_m 为半激活常数. 通过在一定范围内遍历参数空间的取值, 可以得到系统产生振荡的参数条件 [图 1(e)]. 结果表明, 只有在方程中的希尔系数大于 1 时, 系统才有可能产生振荡. 从本质上讲, 非线性对于振荡的作用其实是变相提供时间延迟: 当非线性响应函数的自变量 (对应于系统内某一组分的浓度) 波动较小时, 响应函数的值几乎不发生变化, 仅在该组分的浓度发生显著提高时, 响应函数的值才会明显改变.

一个生物调控网络产生振荡的主要条件是存在负反馈回路、充足的时间延迟和较强的非线性调控关系. 这是设计人工合成振荡系统的基本立足点.

2.2 生物振荡的定量控制

由于振荡在诸多生理活动中都发挥着关键的功能, 如何调控生物振荡的定量属性同样是一个重要而基础的问题. 振荡的定量控制有两个层次

的含义：其一是关于振荡参数的“可调性”（*tunability*），即生物如何调节内部振荡的振幅、频率等定量属性，以通过振荡精确响应外界刺激；其二是关于振荡的“稳定性”（*stability*）或“鲁棒性”（*robustness*），即生物如何使振荡在外界噪声存在的情况下保持稳定的节律。

生物振荡的频率、振幅等定量的信息能够编码复杂的细胞内外的信息，近年来在不同细胞体系中被大量研究和发现^[44-45]。酵母细胞中转录因子 Crz1 脉冲式出入核的频率可以编码外界钙离子的浓度信息，并协调下游基因表达强度的比例。哺乳动物细胞中 p53 振荡动力学形式的改变可以编码 DNA 的损伤程度与类型，免疫细胞中 NF- κ B 的振荡编码外界免疫原的种类与强度^[46]等。相应地，下游基因调控网络也可以通过带通线路（比如一致性前馈线路可以选择性过滤高频信号）^[47-48]，染色质开放程度的差异^[49-50]、启动子区与转录因子结合解离常数^[49-50]的调整等方式，特异性地对振荡信号的频率、振幅做出响应从而产生差异化的应答，以解码复杂的上游信号。因此，如何定量调控振荡的各种动力学属性，对于生物响应外界信息至关重要。诚然，对于一般的生物振荡而言，通过调整系统的动力学参数可以改变振荡的各项属性，如 Stricker 等^[51]展示了通过改变外界温度、刺激强度与培养基成分可以定量调控大肠杆菌合成振荡的周期。然而，通过外部参数调整振荡动力学一般是多效的，特别是振荡频率的改变与振幅的改变往往是相互耦合的^[52]。因此，如何正交地调控振荡的频率和振幅是一个重要的理论问题。Tsai 等^[53]的研究表明，额外引入的正反馈环路可以带来正交化的调频区间，即在该区间内振幅几乎不变而频率可以连续变化，后续 Tomazou 等^[54]进一步探讨了独立调频/调幅所需的网络拓扑结构与参数区间。Zhang 等^[55]进一步通过额外引入调控节点的方式，在实验层面上使经典的三抑制合成振荡线路（*repressilator*）可以被正交化地调频与调幅。Heltberg 等^[56]还发现当存在两种或两种以上的外部周期性刺激时，通过调节外部信号的相位差，能够使内部振荡的振幅独立于频率进行改变。这种振幅改变可以导致下游基因表达水平的显著差异。除此之外，生物振荡的属性除了振幅

与频率，还可以采取进一步细化的静息时间（*rest time*）、起峰时间（*rise time*）、下降时间（*decay time*）与振幅4个参数来描述。Zhang 等^[57]利用酵母中的合成 NF- κ B 振荡线路，系统揭示了振荡的各项动力学属性如何随着反馈强度、信号强度、蛋白浓度和蛋白降解速率发生改变。以上这些工作均为生物振荡的定量调控机制提供了深入理解。

在另一些情境下，如对于细胞分裂、生物钟、体节发育钟等生物振荡，其存在的意义是为了维持稳定的节律。因此，如何使这些振荡不受外界噪声的干扰而稳定发挥功能就显得尤为重要。生物系统中的噪声可分为内源噪声与外源噪声两类。内源噪声源于生命活动的基本随机性，例如基因表达过程中转录因子与 DNA 结合的随机性、低分子数反应导致的浓度涨落（如 mRNA 或蛋白质的合成与降解），以及细胞分裂时分子分配的不均等性^[58]。这类噪声本质上由热力学涨落和量子效应驱动，其强度与系统尺度密切相关——分子数量越少的系统（如单细胞内的基因网络），噪声效应越显著。外源噪声则来自外部环境的动态扰动，例如温度或 pH 的波动、光照周期的变化、细胞间信号传递的异步性（如群体感应中的信号延迟），以及营养供给的空间异质性^[59]。这类噪声通常表现为广谱随机信号，可能包含周期性成分（如昼夜光暗循环）或突发性扰动（如代谢物浓度骤变）。强噪声可能通过相位扩散破坏振荡（如振幅衰减或节律失稳），但也有研究表明，弱噪声能通过随机共振（*stochastic resonance*）增强系统对亚阈值信号的响应能力^[60]；在周期性上，噪声会拓宽振荡周期的分布范围，但周期性环境噪声（如 24 h 光暗循环）可通过强迫同步机制驱动内源节律与之锁定；振幅方面，强噪声可能导致振荡被压制，但在特定参数范围内，相干共振（*coherence resonance*）现象可使噪声能量转化为有序振荡，使振幅达到峰值^[61-62]。在心脏起搏细胞中，耦合振荡器网络通过细胞间电耦合实现噪声平均化，当多个相位振荡器通过扩散耦合连接时，系统整体相位方差随耦合强度增加呈指数衰减，从而显著降低单个细胞的节律波动^[63]。噪声滤波策略则利用生物系统的时空尺度分离特性，例如基因调控网络常通过慢变蛋白的累积效应（时间滤波）或

细胞群体间的信号整合（空间滤波）滤除高频噪声^[64]。这些非线性效应表明，生物系统并非被动承受噪声，而是演化出复杂机制将其转化为功能调控的工具。

在合成系统方面，Potvin-Trottier等^[65]对传统的三节点互抑制振荡线路进行了细致的理论分析，通过去除抑制蛋白的降解标签、提高TetR诱导启动子的拷贝数等方式，以抵抗由于细胞分裂带来的不均等蛋白分配（内源噪声）对系统造成的影响，显著提升了初始振荡的稳定性。Qiao等^[66]利用动力学模拟方法，系统分析了所有两节点或三节点网络的动力学特征，首次发现了三节点相互抑制网络与正反馈调控的组合能够有效抵御内源和外源噪声。此外，三节点互抑制网络的抗噪性能要强于双节点负反馈网络，或负反馈与正反馈网络的组合。较长的振荡周期更容易消除外源噪声的影响，而较高的振幅更容易消除内源噪声的影响。这一工作为振荡网络的鲁棒性设计提供了重要的理论支持。

除了调整网络结构的方式，另一种使振荡稳定的方法是利用外源周期信号将群体进行同步化，将在下一小节阐述。需要指出的是，可调性和稳定性并不总是相互矛盾的两类需求：一方面，生物振荡可能需要调节其动力学特征以响应外界信息的变化；另一方面，为了精确而定量地编码外界信息，生物振荡又必须保证不受到其他无关变量和噪声的干扰^[67]。这种双功能性是天然振荡系统执行正常生理功能的必然需求，也是人工设计合成振荡线路的难点所在。

2.3 生物振荡的同步化

通过响应外界周期性刺激，生物振荡可以被同步化。同步化可以发生在内部振荡与外部公共信号之间，也可以发生在相互通信的生物振荡之间。同步化的生物振荡往往表现出更强的振幅、更稳定的频率以及更优越的抗噪性能^[56]。生物振荡发生同步化需要特定的参数条件。一般认为，控制同步化的主要参数有两个：其一是振荡的天然频率之比；其二是振荡之间的耦合强度。在由这两个参数构成的相平面上，发生同步化的区域

常呈现互相重叠的倒三角形形状，因此这种区域又被形象地称为“阿诺德舌头”[Arnold tongues, 图2(a)]^[68-70]。

在相图中，振荡之间不仅能够发生1:1的严格同步化，还可能发生2:1、3:2等各个比例的频率锁定现象，这种现象被称为夹带（entrainment）^[71-72]。夹带现象可以使生物振荡进一步复杂化，比如在噪声驱动下，与外部公共信号耦合的内部振荡可以在两个离散的频率上发生随机跳转（mode hopping）^[73]，甚至在耦合强度足够强时产生确定性混沌（chaos）^[74]，尽管后者目前仍然停留于理论假设层面，并未获得实际实验的支持。内部振荡与多重外部公共信号的耦合可以进一步提高振荡的稳定性，同时带来全新的调幅模式^[56]。两种内部振荡之间的耦合同样可以产生丰富多样的锁频比例，这一现象在小鼠胰岛 α 和 β 细胞的钙离子振荡中已获验证^[75]。

此外，同步化的振荡在空间层面还会形成复杂的自组织斑图（patterns）。比如，体节发育过程中关键的时钟基因Hes7表达会经由空间同步化形成行波（travelling waves），其从胚胎尾端起始，逐渐向头部扩散，并在最终停止的位置诱导体节的形成[图2(b)]^[11]。这种多细胞间的行波振荡是由相邻细胞间Notch/Dll信号转导的时间延迟所形成的，过长或过短的时间延迟均会导致同步化失败。阿兰·图灵^[76]在其于1952年发表的经典论文《形态发生的化学基础》中提出，两种或更多扩散速率不同的化学物质（“形态素”）通过激活-抑制反馈可自发形成空间周期性斑图，比如斑马鱼的色素条纹、哺乳动物的指纹、虎豹等动物皮肤上的斑点等，均被广泛认为是通过图灵机制产生的生物图案。斑图还在生理调控过程中起到重要作用，比如心肌细胞的钙振荡在空间上可以被看作是一个反应-扩散-兴奋系统，其在细胞间通过间隙连接形成跨组织的同步化钙波，确保心脏整体收缩协调；在病理状态下（如心衰或房颤），肌浆网钙泄漏增加或RyR磷酸化导致钙火花频发但同步性丧失，钙振荡斑图从全局协调的平面波退化为螺旋波或混沌碎片化波（如钙交替波），引发心律失常^[77-78]。一项最新的研究通过在哺乳动物细胞中重构细菌的MinD/E振荡系统，在单个细胞中诱

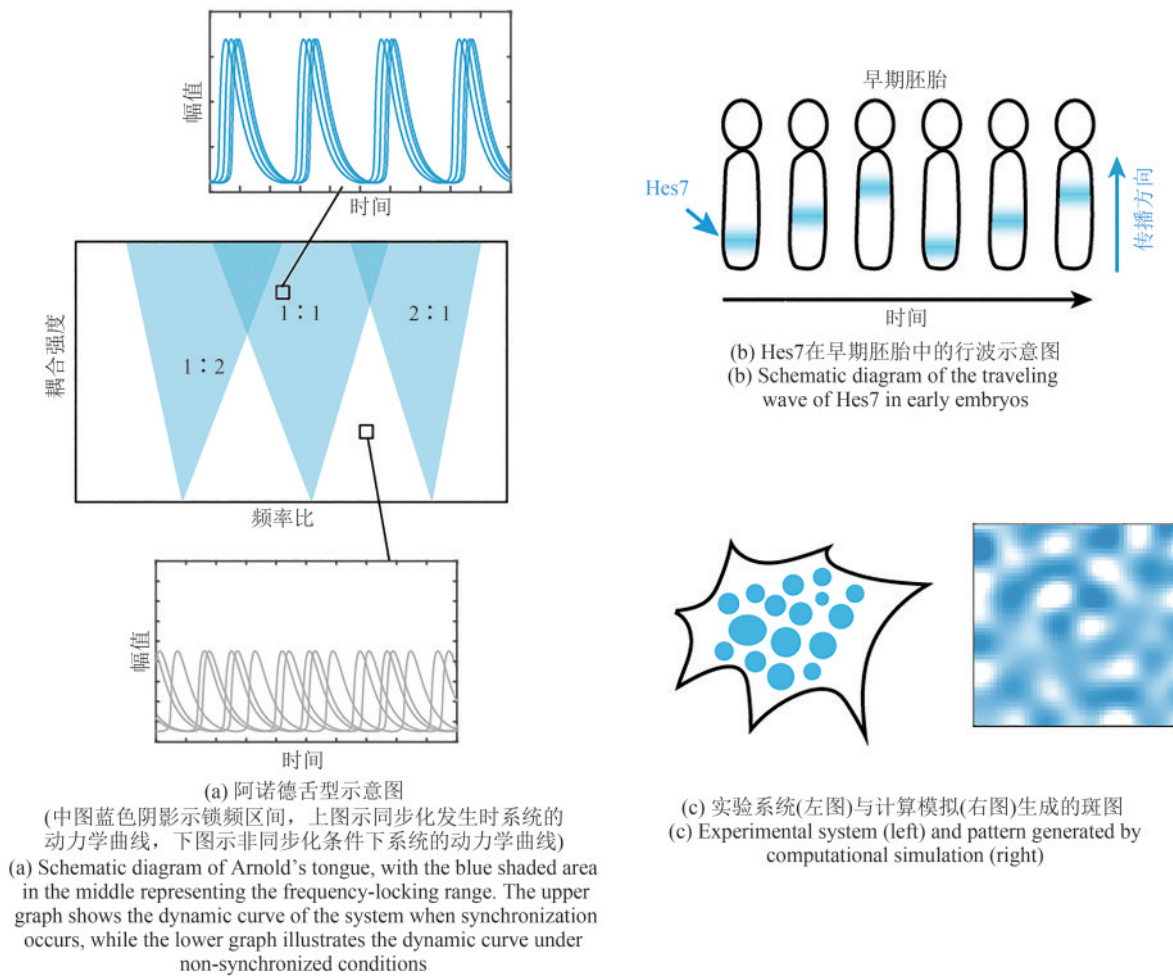


图2 生物振荡的同步化

Fig. 2 Synchronization of biological oscillations

导产生了丰富多样的时空斑图, 包括螺旋波、斑点和条纹等 [图2(c)]^[79]。尽管具体调控这些图案产生的机理仍不完全明晰, 但其展示了利用合成生物学手段人工构建复杂斑图的可能性。

3 生物振荡的人工设计与合成

3.1 基因转录水平的合成振荡线路

第1例人工合成的生物振荡是由 Michael Elowitz 和 Stanislas Leibler^[80] 在2000年所构建完成的。由于该振荡线路利用了3组抑制性的转录因子-启动子组合, 因此也被称为抑制振荡子 (repressilator, RLT), 是一种经典的振荡网络拓扑类型。在此调控网络中, 3种抑制蛋白 LacI、TetR

和 λ cI 按顺序依次抑制相应基因的表达, 形成类似“石头-剪刀-布”式的负反馈网络 [图3(a)]。在该系统中, 三节点负反馈网络相比于两节点网络提供了额外的中间步骤, 从而产生足够的时间延迟。此外, LacI、 λ cI 蛋白发挥抑制作用需要形成四聚体, TetR 发挥抑制作用需要形成二聚体^[81-82], 都为转录调控提供了非线性的来源。虽然, 初代版本的合成振荡受噪声干扰较强, 且表现出随时间逐渐增加的本底荧光强度, 后续工作通过调整蛋白降解速率、启动子浓度等细节参数, 已经可以使该基因调控线路产生稳定的振荡^[65]。需要指出的是, 参与这一合成线路的3个转录因子本身并不是任何天然生物振荡的组成部分。该研究清晰表明了动力学理论模型的指导下, 利用简单的转录调控元件, 设计具有全新表型的合成调控网络完全可行。

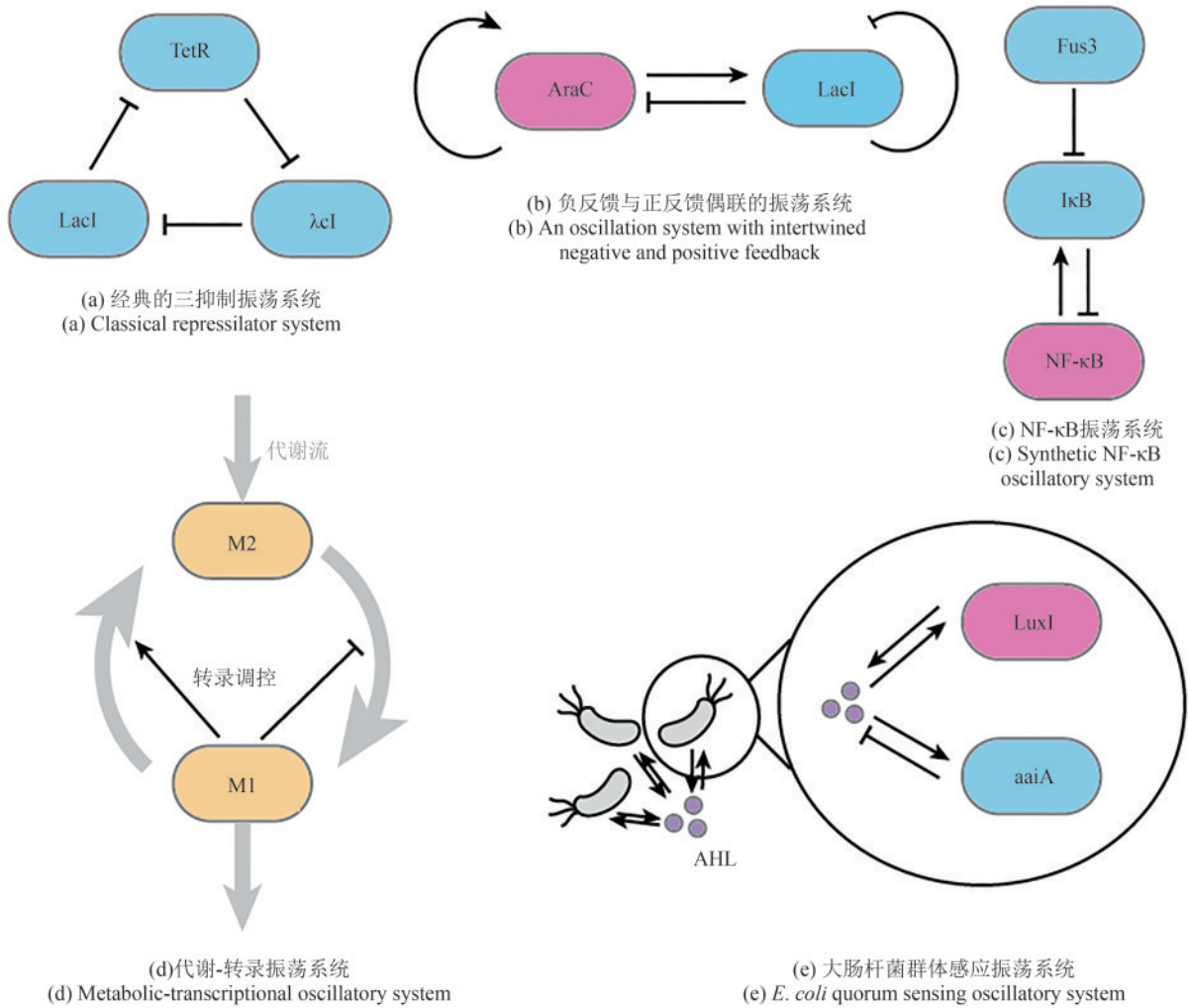


图3 各类代表性合成振荡线路

Fig. 3 Representative synthetic oscillatory circuits

自此以后，基于转录调控网络的合成生物振荡系统不断涌现。比较有代表性的包括Jeff Hasty课题组^[51]提出的利用阿拉伯糖操纵子和乳糖操纵子结合的振荡线路，这一线路采取了负反馈与正反馈耦合的模式（dual-feedback oscillator, DFO），是另一种经典的振荡网络拓扑类型。其涉及LacI和AraC两种转录因子，前者抑制后者的表达，而后者可以促进前者的表达[图3(b)]。此外，AraC蛋白本身可以进一步促进自身的表达，这种正反馈为合成系统带来足够的时间延迟而实现生物振荡。Martin Fussenegger课题组^[83]首次在哺乳动物细胞中构建了合成振荡线路，此线路的基本拓扑结构思路与前者类似，同样是采用负反馈与正反馈结合的模式，利用转录激活子PIR与抑制子tTA

构成核心负反馈线路，并利用正反馈为系统提供时间延迟。相较于其他在蛋白水平或代谢水平构建的合成振荡线路而言，完全基于基因调控网络的生物振荡往往具有相对更慢的振荡周期。随着相关领域的不断发展，纯粹利用转录调控元件构建人工振荡系统的工作已经逐渐减少，后续工作大多是对上述经典振荡系统的模仿与改良，比如Santos-Moreno等^[84]利用CRISPRi系统复现了经典的三抑制振荡子repressilator，仅通过表达3种不同的sgRNA，就可以同样实现顺次抑制的效果。Park等^[85]通过引入光遗传元件，可以使整个repressilator系统受到周期性外界光照的调节，展示了这种与外部振荡的耦合如何产生同步化、周期倍增与混沌现象。

3.2 翻译后水平的合成振荡线路

相比于基因转录水平的合成振荡线路，基于蛋白质互作的振荡系统由于较难精确定量控制各组分之间的互作强度，因而对技术体系有更高的要求。目前，利用完全与天然振荡无关的蛋白、构建翻译后水平合成振荡线路的工作还相对较少，Kimchi等^[86]仿照蓝藻生物钟的KaiA/B/C系统设计了一套基于蛋白复合体结合-解离的振荡系统，但该系统目前仍然停留在理论层面，缺乏实际的实验验证。目前，绝大多数翻译后水平的合成线路仍需利用天然振荡调控网络的核心模块，在不同的细胞类型中重构；且这种振荡线路通常是翻译后水平与转录水平相结合的线路。

比较有代表性的工作是Zhang等^[57]在酿酒酵母细胞中对哺乳动物NF- κ B振荡系统的重构[图3(c)]。天然NF- κ B会促进其抑制蛋白I κ B的表达，而I κ B与NF- κ B之间的非共价结合又会将其扣压在细胞质中，形成负反馈回路。当外界刺激存在时，I κ B经上游激酶IKK磷酸化修饰后经泛素蛋白酶体途径降解，释放NF- κ B入核。研究者将NF- κ B/I κ B间的核心负反馈回路移植到酵母细胞中，并通过工程化改造I κ B蛋白使之带上可被酵母内源性激酶Fus3识别的降解标签，使得这一系统与酵母自身的有性生殖信号通路相偶联。在酵母底盘中，原本具有衰减振荡表型的NF- κ B系统表现出持续振荡的现象。利用这一合成振荡平台，研究者系统探究了NF- κ B振荡的定量属性如何被调控网络中的各种动力学参数影响。在后续工作中，研究者还进一步讨论了该系统在多重周期性刺激条件下的夹带行为，并发现了利用外界信号相位差调节基因表达水平的全新机制^[56]。与该工作类似，Toettcher等^[87]也对天然p53振荡线路进行了合成生物学改造，发现单一的负反馈回路足以产生衰减式的振荡表型；额外引入正反馈回路可以减弱这种衰减现象，而额外引入负反馈所带来的效果与此正好相反。

高等动物细胞中的振荡线路可以部分移植到酵母等单细胞生物中，反之，原核生物中的振荡系统也可以移植到高等哺乳细胞中。大肠杆菌中的MinD/MinE是一对经典的膜结合蛋白，两者在

细菌的细胞膜上以约1 min的周期往复振荡，共同调节细胞分裂环产生的位置。Rajasekaran等^[79]将这一系统移植到小鼠3T3细胞系中，并发现这种移植的振荡系统可以在哺乳动物细胞膜上形成从行波到斑点图案等一系列复杂的动力学表型。作者认为这种合成振荡系统赋予了每个细胞独特的频域标签，并展示了如何通过额外引入相分离相关元件改变系统的振荡频率、诱导细胞骨架重排等。

最后，除了蛋白水平的合成振荡线路，还有的工作尝试构建基于代谢通路的合成振荡。在这一方向上较有代表性的早期工作是Fung等^[88]在大肠杆菌中构建的代谢-转录振荡系统[图3(d)]。在天然细菌中，乙酰辅酶A和乙酰磷酸之间可通过磷酸乙酰转移酶(Pta)和乙酰辅酶A合成酶(Acs)相互转化，而乙酰磷酸可作为信号分子，抑制Pta的表达而促进Asc的表达，形成代谢-转录偶联的负反馈回路。当细胞糖酵解代谢速率足够大时，系统原本的定态将发生失稳，转而演化为持续的振荡。

3.3 群体多细胞水平的合成振荡线路

除单细胞水平的合成振荡线路之外，通过人工重构细胞间的通信线路，也可以实现在多细胞水平上的群体振荡。本领域较有代表性的工作是Jeff Hasty实验室^[89]在大肠杆菌中的群体感应基因线路[图3(e)]，该线路基于细菌对于群体感应分子高丝氨酸内酯(AHL)的响应，当细胞数量足够多时，一方面会促进荧光报告基因的表达，另一方面也可以促进负调控蛋白aiiA的表达，抑制AHL的合成，减弱群体的荧光强度。研究者还展示了群体同步化振荡如何随着微流装置中的液流速率发生变化：当液流速率较高时，AHL的清除速率快，系统表现出高频、低幅值、高基线水平的振荡，而较慢的液流速率则会导致低频、高幅值、低基线水平的振荡。在后续的工作中，研究者进一步将这种合成线路推广到了两种细胞群体相互通信的情况：“激活菌株”(activator strain)能够分泌具有促进荧光基因表达功能的C4-HSL分子，而“抑制菌株”(repressor strain)能够分泌具有抑制荧光基因表达功能的3-OHC14-HSL分

子^[90]。基于这一基本设计,研究者探索了不同的群体通信网络拓扑结构对振荡稳定性的影响,发现具有两条正向调控关系和两条负向调控关系的群体通信网络具有最强的稳定性。

群体水平的振荡不仅可以在时间尺度上产生波动,还可以形成空间水平上的复杂图案。Liu等^[91-92]在大肠杆菌中设计了一种将细胞密度与细胞运动相偶联的群体通信线路,当细胞密度较高时,群体感应分子会抑制运动相关基因*cheZ*的表达;而在细胞密度较低时情况刚好相反。利用这一合成线路,研究者成功令大肠杆菌菌落生长出连续的环状条纹,成为人工构建复杂斑图领域的重要突破。

4 生物振荡的功能应用

4.1 利用合成生物振荡控制发酵

对于代谢工程改造后的细菌而言,乙酰辅酶A既是细胞代谢网络的核心,也是许多工业相关代谢产物的前体,因此,为了提高产物得率,必须提高细胞中乙酰辅酶A的产量并减少其在其他途径上的损耗。传统方法通过抑制从乙酰辅酶A流出的代谢流来提高产量往往不能获得很好的效果。为了解决这一问题,Guo等^[93]基于前文所述的代谢-转录振荡子,构建了基于全新SCTPK代谢途径的振荡系统。SCTPK途径能够以低碳排放的方式产生乙酰辅酶A的前体乙酰磷酸,后者作为信号分子,可以抑制SCTPK途径相关酶的表达而促进下游乙酰辅酶A转化相关基因的表达,从而构成负反馈线路。该线路在大肠杆菌细胞中成功产生了周期振荡。这样一来,当乙酰磷酸含量较低时,系统会促进乙酰磷酸的生产(即SCTPK途径),而当乙酰磷酸的含量较高时启动乙酰辅酶A下游合成代谢的通路。这种设计在维持低碳排放的同时显著提高了最终代谢产物的得率。

4.2 利用生物振荡调控种群生长与药物递送

细菌介导的药物递送是肿瘤细菌疗法中一个重要的研究方向^[94]。如何既能使细菌在肿瘤内部

同时释放达到有效浓度的药物,又控制细菌生长不超过人体免疫系统所能承受的限度,是相关领域内重要的难点之一。为了解决这一问题,Jeff Hasty等^[95]提出可以通过群体层面的振荡线路来周期性同步化释放药物,同时维持细菌密度在较低的水平。他们基于前文已介绍的群体感应通信线路,在减毒的沙门氏菌中额外引入了细菌裂解相关基因 ϕ X174E,同时引入受群体感应信号分子AHL诱导的溶血素E,以作为杀伤肿瘤的药物。通过给荷瘤小鼠口服工程化改造的细菌,与未经工程化改造相比,其细菌密度降低两个数量级以上,同时相比单独使用化疗药物能更有效地控制肿瘤生长。

4.3 合成振荡线路延缓酵母细胞衰老

酵母细胞的衰老通常被认为是一种命运决定过程。在衰老过程中,酵母细胞主要有两种可能经历的途径:其一是细胞核衰老,具体表现为细胞核结构损伤、核仁增大、rDNA稳定性降低等;其二是线粒体衰老,具体表现为线粒体的不正常聚集与降解、血红素含量下降等^[96-97]。研究表明,亮氨酸去乙酰化酶Sir2与细胞核rDNA稳定性的维持有关,而血红素激活蛋白HAP则参与维持线粒体的正常功能。Sir2和HAP的表达调控关系在天然状态下表现为相互抑制的正反馈网络,即随着酵母细胞的生长,其最终必然达到其中某一蛋白表达量相对较低的状态,导致对应类型的衰老。因此,研究人员大胆设想,或许可以通过改变Sir2与HAP之间的调控关系,将其从相互抑制的正反馈网络调整为一方抑制、另一方促进的负反馈网络,使其动力学表现从双稳态变为持续振荡。这样一来,Sir2和HAP两种关键蛋白的表达量都在相当长一段时间内不会落入低态,而是持续在基线水平附近振荡,进而提高酵母细胞的寿命。实验结果证实了这一想法,通过合成生物学重构的Sir2/HAP振荡系统可使酵母细胞的平均寿命延长近1倍^[98]。事实上,互抑制网络介导的双稳态现象被认为在细胞分化的命运决定过程中广泛存在^[99-103]。这一工作的成功为细胞命运决定领域带来了全新的思考:是否可能通过改造关键转录因

子的基因调控网络、引入振荡线路，从而延长细胞处于干性状态的时间，避免其向终末分支的状态分化？类似的思路可能有望推动解决干细胞在体外或体外条件下长期维持的关键问题。

5 展 望

人工合成生物振荡作为合成生物学研究的经典问题，至今已经历了20多年的发展。在理论水平，得益于前期的积累与计算技术的蓬勃发展，对于基本的小型生物调控网络（节点数 ≤ 3 ），其拓扑结构与振荡属性之间的对应关系已经研究得相对比较完善；在实验水平，研究的重心也逐渐从基于基因表达调控的振荡线路，转向基于蛋白相互作用、细胞-细胞通信等趋向复杂的振荡线路设计与合成。而对于后两者而言，进一步开发新的信号转导元件与细胞通信元件、提高合成振荡的可预测性与稳定性将是未来的研究重点。此外当前研究的底盘系统仍以大肠杆菌或酵母等简单细胞为主；相较而言，在哺乳动物细胞中实现基于细胞通信的振荡线路，相关研究仍然极度缺乏。最后，运用人工设计振荡线路，在空间水平实现有序的斑图，也是当前尚待开展的研究方向，当前的实验工具与技术尚不能完美匹配理论水平的理解，较多实验现象缺乏清晰明确的理论解释；而另一些较为经典的理论（如图灵斑图等）至今仍未在合成系统中完成令人信服的实验验证。对时空有序性斑图的系统性构建和理论解析，必将极大加深对于各类复杂天然生物系统（如发育）的理解，推动人工合成生命从细胞水平，逐步发展到多细胞及器官水平。

随着关于合成振荡基础研究的快速发展，有关合成振荡体系的实际应用也在不断涌现。目前的应用方向，不论是延缓衰老、提高发酵效率还是控制种群密度，大多是将振荡作为一种维持“相对动态平衡”的手段。事实上，人工合成的振荡系统还可以与已存在的天然生物振荡产生相互影响，进而带来更加激动人心的可能性。以肿瘤免疫学领域为例，虽然目前尚未有相关研究发表，但越来越多的工作表明人体内的免疫系统同样受到生物钟调控，不同的免疫细胞在不同时间段内

的免疫活性具有很大差异^[104-110]。近期一些前瞻性的研究已经表明，不同的给药时间将对病患的预后产生显著的影响^[111-112]。合理推论，在诸如免疫细胞治疗等场景中，通过工程化改造的免疫细胞中引入振荡调控线路，以实现细胞功能与昼夜节律耦合，是否极有可能为包括肿瘤免疫治疗的许多重大疾病治疗带来全新的机会？最后，运用人工振荡与机体本身节律之间的协同，是否有可能产生全新的复杂表型？这些问题仍需不断理论探索，并尝试设计构建复杂度逐步增加的人工振荡系统。

参 考 文 献

- [1] REPPERT S M, WEAVER D R. Coordination of circadian timing in mammals[J]. *Nature*, 2002, 418(6901): 935-941.
- [2] KORONOWSKI K B, SASSONE-CORSI P. Communicating clocks shape circadian homeostasis[J]. *Science*, 2021, 371(6530): eabd0951.
- [3] KÖBLER C, SCHMELLING N M, WIEGARD A, et al. Two KaiABC systems control circadian oscillations in one *Cyanobacterium*[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 7674.
- [4] NAKAJIMA M, IMAI K, ITO H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*[J]. *Science*, 2005, 308(5720): 414-415.
- [5] FERRELL J E JR, TSAI T Y, YANG Q. Modeling the cell cycle: why do certain circuits oscillate?[J]. *Cell*, 2011, 144(6): 874-885.
- [6] POMERENING J R, KIM S Y, FERRELL J E JR. Systems-level dissection of the cell-cycle oscillator: bypassing positive feedback produces damped oscillations[J]. *Cell*, 2005, 122(4): 565-578.
- [7] CHANG J B, FERRELL J E JR. Mitotic trigger waves and the spatial coordination of the *Xenopus* cell cycle[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 603-607.
- [8] MOJICA-BENAVIDES M, VAN NIEKERK D D, MIJALKOV M, et al. Intercellular communication induces glycolytic synchronization waves between individually oscillating cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(6): e2010075118.
- [9] BETZ A, BECKER J U. Phase dependent phase shifts induced by pyruvate and acetaldehyde in oscillating NADH of yeast cells[J]. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 1975, 6(2): 167-173.

- [10] RICHARD P, BAKKER B M, TEUSINK B, et al. Acetaldehyde mediates the synchronization of sustained glycolytic oscillations in populations of yeast cells[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 235(1-2): 238-241.
- [11] YOSHIOKA-KOBAYASHI K, MATSUMIYA M, NIINO Y, et al. Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock[J]. *Nature*, 2020, 580(7801): 119-123.
- [12] DIAZ-CUADROS M, WAGNER D E, BUDJAN C, et al. *In vitro* characterization of the human segmentation clock[J]. *Nature*, 2020, 580(7801): 113-118.
- [13] SONNEN K F, LAUSCHKE V M, URAJI J, et al. Modulation of phase shift between Wnt and Notch signaling oscillations controls mesoderm segmentation[J]. *Cell*, 2018, 172(5): 1079-1090. e12.
- [14] HO C, JUTRAS-DUBÉ L, ZHAO M L, et al. Nonreciprocal synchronization in embryonic oscillator ensembles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(36): e2401604121.
- [15] HOFFMANN A, LEVCHENKO A, SCOTT M L, et al. The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation[J]. *Science*, 2002, 298(5596): 1241-1245.
- [16] LIN Y H, SOHN C H, DALAL C K, et al. Combinatorial gene regulation by modulation of relative pulse timing[J]. *Nature*, 2015, 527(7576): 54-58.
- [17] PURVIS J E, KARHOHS K W, MOCK C, et al. p53 Dynamics control cell fate[J]. *Science*, 2012, 336(6087): 1440-1444.
- [18] CAI L, DALAL C K, ELOWITZ M B. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation[J]. *Nature*, 2008, 455(7212): 485-490.
- [19] GREGOR T, FUJIMOTO K, MASAKI N, et al. The onset of collective behavior in social amoebae[J]. *Science*, 2010, 328(5981): 1021-1025.
- [20] CHEN C, LIU S, SHI X Q, et al. Weak synchronization and large-scale collective oscillation in dense bacterial suspensions [J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 210-214.
- [21] SHNIDERMAN E, AVRAHAM Y, SHAHAL S, et al. How synchronized human networks escape local minima[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 9298.
- [22] GONZALO COGNO S, OBENHAUS H A, LAUTRUP A, et al. Minute-scale oscillatory sequences in medial entorhinal cortex[J]. *Nature*, 2024, 625(7994): 338-344.
- [23] FITZHUGH R. Thresholds and plateaus in the Hodgkin-Huxley nerve equations[J]. *The Journal of General Physiology*, 1960, 43(5): 867-896.
- [24] HAMILL O P. Arterial pulses link heart-brain oscillations[J]. *Science*, 2024, 383(6682): 482-483.
- [25] SARFATI R, HAYES J C, SARFATI É, et al. Spatio-temporal reconstruction of emergent flash synchronization in firefly swarms *via* stereoscopic 360-degree cameras[J]. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2020, 17(170): 20200179.
- [26] MIROLLO R E, STROGATZ S H. Synchronization of pulse-coupled biological oscillators[J]. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 1990, 50(6): 1645-1662.
- [27] JONES D L, JONES R L, RATNAM R. Calling dynamics and call synchronization in a local group of unison bout callers[J]. *Journal of Comparative Physiology A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 2014, 200(1): 93-107.
- [28] ELOWITZ M, LIM W A. Build life to understand it[J]. *Nature*, 2010, 468(7326): 889-890.
- [29] RICHTER P H, ROSS J. Concentration oscillations and efficiency: glycolysis[J]. *Science*, 1981, 211(4483): 715-717.
- [30] PYE K, CHANCE B. Sustained sinusoidal oscillations of reduced pyridine nucleotide in a cell-free extract of *Saccharomyces carlsbergensis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 55(4): 888-894.
- [31] CAO Y S, WANG H L, OUYANG Q, et al. The free energy cost of accurate biochemical oscillations[J]. *Nature Physics*, 2015, 11(9): 772-778.
- [32] ZHANG D L, CAO Y S, OUYANG Q, et al. The energy cost and optimal design for synchronization of coupled molecular oscillators[J]. *Nature Physics*, 2020, 16(1): 95-100.
- [33] HIGGINS J. Theory of oscillating reactions[J]. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1967, 59: 19-62.
- [34] NOVÁK B, TYSON J J. Design principles of biochemical oscillators[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(12): 981-991.
- [35] FERRELL J E JR. Feedback loops and reciprocal regulation: recurring motifs in the systems biology of the cell cycle[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2013, 25(6): 676-686.
- [36] GOLDBETER A, BERRIDGE M J. Biochemical oscillations and cellular rhythms: the molecular bases of periodic and chaotic behaviour[M/OL]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1996[2024-11-01]. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511608193>.
- [37] THOMAS R. On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations[C/OL]/DELLA DORA J, DEMONGEOT J, LACOLLE B. Numerical methods in the study of critical phenomena. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981: 180-193[2024-11-01]. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81703-8_24.
- [38] FRANÇOIS P, HAKIM V. Design of genetic networks with specified functions by evolution *in silico*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(2): 580-585.
- [39] ROSENFELD N, ELOWITZ M B, ALON U. Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 323(5): 785-793.
- [40] GRÖNLUND A, LÖTSTEDT P, ELF J. Transcription factor

- binding kinetics constrain noise suppression *via* negative feedback[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1864.
- [41] MONK N A M. Oscillatory expression of Hes1, p53, and NF- κ B driven by transcriptional time delays[J]. *Current Biology*, 2003, 13 (16): 1409-1413.
- [42] SWINBURNE I A, MIGUEZ D G, LANDGRAF D, et al. Intron length increases oscillatory periods of gene expression in animal cells[J]. *Genes & Development*, 2008, 22(17): 2342-2346.
- [43] RUÉ P, GARCIA-OJALVO J. Modeling gene expression in time and space[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2013, 42: 605-627.
- [44] KHOLODENKO B N. Cell-signalling dynamics in time and space[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(3): 165-176.
- [45] PURVIS J E, LAHAV G. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 945-956.
- [46] CHENG Q J, OHTA S, SHEU K M, et al. NF- κ B dynamics determine the stimulus specificity of epigenomic reprogramming in macrophages[J]. *Science*, 2021, 372(6548): 1349-1353.
- [47] MANGAN S, ZASLAVER A, ALON U. The coherent feedforward loop serves as a sign-sensitive delay element in transcription networks[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 334(2): 197-204.
- [48] MANGAN S, ALON U. Structure and function of the feed-forward loop network motif[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(21): 11980-11985.
- [49] HAO N, O'SHEA E K. Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 19(1): 31-39.
- [50] CHEN S Y, OSIMIRI L C, CHEVALIER M, et al. Optogenetic control reveals differential promoter interpretation of transcription factor nuclear translocation dynamics[J]. *Cell Systems*, 2020, 11(4): 336-353. e24.
- [51] STRICKER J, COOKSON S, BENNETT M R, et al. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator[J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 516-519.
- [52] GOODWIN B C. *Temporal organization in cells. A dynamic theory of cellular control processes*[M]. London: Academic Press, 1963.
- [53] TSAI T Y, CHOI Y S, MA W Z, et al. Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops[J]. *Science*, 2008, 321(5885): 126-129.
- [54] TOMAZOU M, BARAHONA M, POLIZZI K M, et al. Computational re-design of synthetic genetic oscillators for independent amplitude and frequency modulation[J]. *Cell Systems*, 2018, 6(4): 508-520. e5.
- [55] ZHANG F Y, SUN Y H, ZHANG Y H, et al. Independent control of amplitude and period in a synthetic oscillator circuit with modified repressilator[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 23.
- [56] HELTBERG M S, JIANG Y X, FAN Y Y, et al. Coupled oscillator cooperativity as a control mechanism in chronobiology [J]. *Cell Systems*, 2023, 14(5): 382-391. e5.
- [57] ZHANG Z B, WANG Q Y, KE Y X, et al. Design of tunable oscillatory dynamics in a synthetic NF- κ B signaling circuit[J]. *Cell Systems*, 2017, 5(5): 460-470. e5.
- [58] ELOWITZ M B, LEVINE A J, SIGGIA E D, et al. Stochastic gene expression in a single cell[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1183-1186.
- [59] MCADAMS H H, ARKIN A. Stochastic mechanisms in gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(3): 814-819.
- [60] GAMMAITONI L, HÄNGGI P, JUNG P, et al. Stochastic resonance[J]. *Reviews of Modern Physics*, 1998, 70(1): 223.
- [61] PIKOVSKY A S, KURTHS J. Coherence resonance in a noise-driven excitable system[J]. *Physical Review Letters*, 1997, 78 (5): 775-778.
- [62] KELLOGG R A, TAY S. Noise facilitates transcriptional control under dynamic inputs[J]. *Cell*, 2015, 160(3): 381-392.
- [63] SIEBER J, OMEL'CHENKO O E, WOLFRUM M. Controlling unstable chaos: stabilizing chimera states by feedback[J]. *Physical Review Letters*, 2014, 112(5): 054102.
- [64] HASTY J, PRADINES J, DOLNIK M, et al. Noise-based switches and amplifiers for gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(5): 2075-2080.
- [65] POTVIN-TROTTIER L, LORD N D, VINNICOMBE G, et al. Synchronous long-term oscillations in a synthetic gene circuit [J]. *Nature*, 2016, 538(7626): 514-517.
- [66] QIAO L X, ZHANG Z B, ZHAO W, et al. Network design principle for robust oscillatory behaviors with respect to biological noise[J]. *eLife*, 2022, 11: e76188.
- [67] ZORZAN I, LÓPEZ A R, MALYSHAVA A, et al. Synthetic designs regulating cellular transitions: fine-tuning of switches and oscillators[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2021, 25: 11-26.
- [68] ARNOLD V I. Small denominators. I. Mappings of the circumference onto itself[M/OL]. *American Mathematical Society Translations: Series 2*, 1965, 46: 213-284[2024-11-01]. <https://doi.org/10.1090/trans2/046>.
- [69] JENSEN M H, BAK P, BOHR T. Transition to chaos by interaction of resonances in dissipative systems. I. Circle maps [J]. *Physical Review A*, 1984, 30(4): 1960.
- [70] GLASS L. Synchronization and rhythmic processes in physiology[J]. *Nature*, 2001, 410(6825): 277-284.

- [71] MONDRAGÓN-PALOMINO O, DANINO T, SELIMKHANOV J, et al. Entrainment of a population of synthetic genetic oscillators [J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1315-1319.
- [72] ZAMBRANO S, DE TOMA I, PIFFER A, et al. NF- κ B oscillations translate into functionally related patterns of gene expression[J]. *eLife*, 2016, 5: e09100.
- [73] HELTBERG M, KELLOGG R A, KRISHNA S, et al. Noise induces hopping between NF- κ B entrainment modes[J]. *Cell Systems*, 2016, 3(6): 532-539. e3.
- [74] HELTBERG M L, KRISHNA S, JENSEN M H. On chaotic dynamics in transcription factors and the associated effects in differential gene regulation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 71.
- [75] REN H X, LI Y J, HAN C S, et al. Pancreatic α and β cells are globally phase-locked[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3721.
- [76] TURING A M. The chemical basis of morphogenesis[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 1952, 237(641): 37-72.
- [77] CHENG H, LEDERER W J, CANNELL M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle[J]. *Science*, 1993, 262(5134): 740-744.
- [78] WANG H L, ZHANG K, OUYANG Q. Resonant-pattern formation induced by additive noise in periodically forced reaction-diffusion systems[J]. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2006, 74(3 Pt 2): 036210.
- [79] RAJASEKARAN R, CHANG C C, WEIX E W Z, et al. A programmable reaction-diffusion system for spatiotemporal cell signaling circuit design[J]. *Cell*, 2024, 187(2): 345-359.e16.
- [80] ELOWITZ M B, LEIBLER S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 335-338.
- [81] BRAY D. Protein molecules as computational elements in living cells[J]. *Nature*, 1995, 376(6538): 307-312.
- [82] RAMOS J L, MARTÍNEZ-BUENO M, MOLINA-HENARES A J, et al. The TetR family of transcriptional repressors[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(2): 326-356.
- [83] TIGGES M, MARQUEZ-LAGO T T, STELLING J, et al. A tunable synthetic mammalian oscillator[J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 309-312.
- [84] SANTOS-MORENO J, TASIUDI E, STELLING J, et al. Multistable and dynamic CRISPRi-based synthetic circuits[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2746.
- [85] PARK J H, HOLLÓ G, SCHAEERLI Y. From resonance to chaos by modulating spatiotemporal patterns through a synthetic optogenetic oscillator[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 7284.
- [86] KIMCHI O, GOODRICH C P, COURBET A, et al. Self-assembly-based posttranslational protein oscillators[J]. *Science Advances*, 2020, 6(51): eabc1939.
- [87] TOETTCHER J E, MOCK C, BATCHELOR E, et al. A synthetic-natural hybrid oscillator in human cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(39): 17047-17052.
- [88] FUNG E, WONG W W, SUEN J K, et al. A synthetic gene-metabolic oscillator[J]. *Nature*, 2005, 435(7038): 118-122.
- [89] DANINO T, MONDRAGÓN-PALOMINO O, TSIMRING L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks[J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 326-330.
- [90] CHEN Y, KIM J K, HIRNING A J, et al. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium[J]. *Science*, 2015, 349(6251): 986-989.
- [91] LIU C L, FU X F, LIU L Z, et al. Sequential establishment of stripe patterns in an expanding cell population[J]. *Science*, 2011, 334(6053): 238-241.
- [92] FU X F, TANG L H, LIU C L, et al. Stripe formation in bacterial systems with density-suppressed motility[J]. *Physical Review Letters*, 2012, 108(19): 198102.
- [93] GUO L K, LIU M, BI Y J, et al. Using a synthetic machinery to improve carbon yield with acetylphosphate as the core[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5286.
- [94] ZHANG J, HASTY J, ZARRINPAR A. Live bacterial therapeutics for detection and treatment of colorectal cancer[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2024, 21(5): 295-296.
- [95] OMAR DIN M, DANINO T, PRINDLE A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery[J]. *Nature*, 2016, 536(7614): 81-85.
- [96] LI Y, JIANG Y F, PAXMAN J, et al. A programmable fate decision landscape underlies single-cell aging in yeast[J]. *Science*, 2020, 369(6501): 325-329.
- [97] JIN M, LI Y, O'LAUGHLIN R, et al. Divergent aging of isogenic yeast cells revealed through single-cell phenotypic dynamics[J]. *Cell Systems*, 2019, 8(3): 242-253. e3.
- [98] ZHOU Z, LIU Y T, FENG Y S, et al. Engineering longevity-design of a synthetic gene oscillator to slow cellular aging[J]. *Science*, 2023, 380(6643): 376-381.
- [99] MICHELSON A M. From genetic association to genetic switch [J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1803-1804.
- [100] SHU J, WU C, WU Y T, et al. Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers[J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1229.
- [101] LOH K M, LIM B. A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4): 363-369.
- [102] WU F Q, SU R Q, LAI Y C, et al. Engineering of a synthetic quadrastable gene network to approach Waddington landscape and cell fate determination[J]. *eLife*, 2017, 6: e23702.

- [103] ZHU R H, DEL RIO-SALGADO J M, GARCIA-OJALVO J, et al. Synthetic multistability in mammalian cells[J]. *Science*, 2022, 375(6578): eabg9765.
- [104] WANG Y, NARASIMAMURTHY R, QU M, et al. Circadian regulation of cancer stem cells and the tumor microenvironment during metastasis[J]. *Nature Cancer*, 2024, 5(4): 546-556.
- [105] WANG C, LUTES L K, BARNOUD C, et al. The circadian immune system[J]. *Science Immunology*, 2022, 7(72): eabm2465.
- [106] WANG C, ZENG Q, GÜL Z M, et al. Circadian tumor infiltration and function of CD8⁺ T cells dictate immunotherapy efficacy[J]. *Cell*, 2024, 187(11): 2690-2702. e17.
- [107] MASRI S, SASSONE-CORSI P. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(12): 1795-1803.
- [108] FORTIN B M, PFEIFFER S M, INSUA-RODRÍGUEZ J, et al. Circadian control of tumor immunosuppression affects efficacy of immune checkpoint blockade[J]. *Nature Immunology*, 2024, 25(7): 1257-1269.
- [109] KUBLI S P, BERGER T, ARAUJO D V, et al. Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(12): 899-919.
- [110] PFERDEHIRT L, DAMATO A R, DUDEK M, et al. Synthetic gene circuits for preventing disruption of the circadian clock due to interleukin-1-induced inflammation[J]. *Science Advances*, 2022, 8(21): eabj8892.
- [111] POMERENING J R, SONTAG E D, FERRELL J E JR. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2[J]. *Nature Cell Biology*, 2003, 5(4): 346-351.
- [112] WANG C, BARNOUD C, CENERENTI M, et al. Dendritic cells direct circadian anti-tumour immune responses[J]. *Nature*, 2023, 614(7946): 136-143.



通讯作者: 魏平(1980—),男,研究员,博士生导师。研究方向为细胞与基因线路的设计原理研究、人工合成技术及合成生物学设计软件开发;结合蛋白质工程、免疫与细胞工程方法,开发靶向复杂疾病的细胞与基因治疗的技术与应用方法。

E-mail: ping.wei@siat.ac.cn



第一作者: 姜源旭(1998—),男,博士研究生。研究方向为人工合成生物振荡系统与免疫信号网络重编程。

E-mail: jiangyx98@stu.pku.edu.cn