

改善昼夜节律紊乱减轻糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤

秦小英¹, 刘慧¹, 韩冲芳^{2*}, 贺建东²

1. 山西医科大学麻醉学院, 山西太原 030001; 2. 山西白求恩医院麻醉科, 山西太原 030001

摘要:目的 探讨间断补充睡眠能否减轻昼夜节律紊乱加重的糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤。方法 给大鼠腹腔注射1%链脲佐菌素(STZ)30 mg/kg及高脂高糖饮食构建糖尿病模型。造模成功的40只糖尿病大鼠,随机分为4组,每组10只:假手术组(Sham组)、缺血/再灌注组[I/R组,结扎左冠状动脉前降支(LDA)30 min,再灌注120 min]、昼夜节律紊乱组(Crd组,每日持续24 h光照并提供食物)、间断补充睡眠组(Dss组,夜间每光照3 h关闭1.5 h补充睡眠)。三苯基四氮唑(TTC)染色法计算心肌梗死体积;ELISA测定血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性、肌钙蛋白I(cTnI)含量;Western blot测定心肌生物钟基因*Bmal1*、*Rev-erba*的表达量。结果 与Sham组相比,I/R组心肌梗死体积明显增大,血清CK-MB活性和cTnI含量明显升高,心肌组织*Bmal1*表达下调,*Rev-erba*上调($P<0.05$);与I/R组相比,Crd组心肌梗死体积增大,血清CK-MB活性和cTnI含量升高,心肌组织钟基因*Bmal1*表达下调,*Rev-erba*表达上调($P<0.05$);与Crd组相比,Dss组心肌梗死体积减小,血清cTnI含量和CK-MB活性降低,钟基因*Bmal1*表达上调,*Rev-erba*表达下调($P<0.05$)。结论 间断补充睡眠可减轻由昼夜节律紊乱加重的糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤。

关键词: 生物钟基因;昼夜节律紊乱;糖尿病;心肌缺血/再灌注

中图分类号:R587 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2024.02.0231

Improving circadian rhythm disturbance reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats

QIN Xiaoying¹, LIU Hui¹, HAN Chongfang^{2*}, HE Jiandong²

1. College of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;

2. Department of Anesthesiology, Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To investigate whether discontinuous sleep supplementation can reduce myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats aggravated by circadian rhythm disorder. **Methods** The rats were injected intraperitoneal with 1% streptozotocin (STZ) 30 mg/kg combined with high-fat and high-glucose diet to replicate diabetic model. Forty diabetic rats were randomly divided into four groups with 10 in each: sham surgery group (Sham group), ischemia-reperfusion group (I/R group), in which the left anterior descending coronary artery (LDA) was ligated for thirty minutes and reperfusion for 2 h, circadian rhythm disorder group (Crd group, 24 h daily light and food), discontinuous sleep supplementation group (Dss group, every 3 hours of illumination and 1.5 hours break at night). We analyzed the myocardial infarct size (by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining), determined serum creatine kinase-myoglobin (CK-MB) activity and cardiac troponin I (cTnI) concentrations;

收稿日期:2023-07-31 修回日期:2023-11-27

基金项目:山西白求恩医院优秀青年启动基金(2019YJ11)

*通信作者 (corresponding author): hanchongfang2003@foxmail.com

the expression level of BMAL1 and REV-ERB α was determined by Western blot. **Results** Compared to the sham group, the I/R group showed a significantly increased in myocardial infarct size, serum CK-MB activity and cTn I concentration. The expression of the myocardial biological clock gene BMAL1 was down-regulated, while the expression of REV-ERB α was up-regulated ($P < 0.05$). Compared to the I/R group, the Crd group showed a significantly increase in myocardial infarct size, serum CK-MB activity and cTn I concentration. The expression of the myocardial biological clock gene BMAL1 was down-regulated, while the expression of REV-ERB α was up-regulated ($P < 0.05$). Compared to the Crd group, Dss group showed a significantly decrease in the myocardial infarct size, serum cTn concentration and CK-MB activity. Furthermore, there was an increased protein expression of BMAL1 and a decrease of REV-ERB α ($P < 0.05$). **Conclusions** Discontinuous sleep supplementation can reduce myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats aggravated by circadian rhythm disorder.

Key words: biological clock gene; circadian rhythm disorder; diabetes; myocardial ischemia-reperfusion

昼夜节律作为生物体内的一种重要内源性调节机制,利用光信号与外界环境同步,严密地控制着生物体的饮食、觉醒以及禁食、睡眠等节律,这种节律的同步性确保生物体与外界环境及不同外周器官间生物钟节律的一致^[1]。缺血性心脏病是糖尿病的主要心血管并发症和死亡原因,而血清肌酸激酶同工酶(creatine kinase-myoglobin, CK-MB)活性和肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTn I)含量常作为临床首选的生化指标来检测急性心肌缺血,且糖尿病患者的肌钙蛋白 I 更容易受到缺血/再灌注损伤的影响^[2]。在糖尿病患者中,昼夜节律紊乱的发生率很高,昼夜节律紊乱会导致糖尿病的胰岛素敏感性降低,影响糖尿病控制和预后^[3]。改善昼夜节律紊乱可以改善血糖水平以及糖尿病的并发症,从而提高糖尿病患者的生活质量。然而,对于改善昼夜节律紊乱对糖尿病心肌缺血/再灌注的研究目前尚不清楚,因此本研究旨在探讨间断补充睡眠是否可减轻昼夜节律紊乱加重的糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:SPF级SD大鼠,体质量250~300g[山西医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证编号:SYXK(晋)2019-0007],严格遵守国家动物福利伦理及保护规定进行实验。

1.1.2 药物、试剂(盒):1%链脲佐菌素(STZ, Sigma-Aldrich公司);ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);REV-ERB α 一抗(武汉爱博泰克生物科技股份有限公司);BMAL1一抗、GAPDH

一抗、二抗(上海艾博抗生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠的分组及处理:将构建成功的糖尿病大鼠分为:假手术组(Sham);缺血/再灌注组(I/R),结扎左冠状动脉前降支(left anterior descending coronary artery, LDA)30 min,再灌注120 min];昼夜节律紊乱组(circadian rhythm disorder, Crd),I/R组基础上,每日持续24 h光照并提供食物使大鼠昼夜节律紊乱);间断补充睡眠组(discontinuous sleep supplementation, Dss),在Crd组基础上,夜间12 h不提供食物,且每光照3 h关闭1.5 h让其补充睡眠。Sham组和I/R组每日光照12 h并规律进食3餐,夜晚关闭光照并停止提供食物。

大鼠禁食12 h,1%戊巴比妥钠60 mg/kg腹腔注射麻醉。持续监测II导联心电图。颈部正中第3、4气管软骨环之间行气管切开术,置入16 G气管导管行机控呼吸(参数:潮气量5 mL/200 g,呼吸频率60次/min,吸呼比1:2)。暴露大鼠左侧腹股沟区,结扎左股静脉远心端,并用28 G套管针刺置管。切开胸腔,充分暴露心脏,在左心耳根部下2 mm左右的位置用丝线穿过LDA,在丝线的两端穿过一段硅胶管,缩紧套管并固定丝线以造成大鼠心肌缺血。结扎LDA 30 min,心电图反映出ST段抬高、QRS波增宽增高、T波高尖,同时结扎的远端心尖及左室前壁组织发绀且跳动无力,为结扎成功的标志;结扎30 min后进行120 min再灌注,ST段回落以及结扎的远端心尖及左室前壁组织逐渐变红,是再灌注成功的标志。Sham组LDA仅穿线不结扎;I/R组、Crd组和Dss组LDA均结扎30 min后行

120 min 再灌注。

1.2.2 三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 法检测心肌梗死体积百分比: 随机取 5 只大鼠, 再次结扎其 LDA, 通过股静脉置管注入 3 mL 1% 伊文氏蓝 (Evans blue) 染液, 当正常组织完全上色, 缺血区组织未染色后, 立即处死大鼠, 取出其心脏。用冷 0.9% 氯化钠溶液冲洗心脏, 后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 1 h, 垂直于其长轴切成 2 mm 厚的切片, 放入现配的 1% TTC 溶液中, 使之均匀染色, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 重复 3 次。用 PBS 缓冲液冲洗切片后放入 4% 甲醛组织固定液中固定 15 min, 扫描仪扫描心脏切片进行保存。正常心肌呈蓝色, 缺血区心肌为砖红色, 梗死的心肌则为灰白色。用 Image ProPlus 7.0 图像分析软件 (Media Cybernetics 公司) 计算心脏缺血区体积以及缺血区梗死体积, 然后计算出心肌梗死体积百分比, 公式为: 缺血区梗死体积/缺血区体积 $\times 100\%$ 。

1.2.3 ELISA 检测血清 cTn I 含量、CK-MB 活性: 120 min 再灌注后, 从右侧颈动脉抽取 5 mL 血样, 静置 2 min 后, 2 000 r/min 离心 15 min, 离心半径 8.5 cm, 随后严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.4 Western blot 测定心肌组织生物钟基因 *BMAL1*、*REV-ERB α* 的表达水平: 取心肌缺血区的组织按 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的比例加入 RIPA 裂解液, 用超声波粉碎机破碎组织样品后置于冰上裂解 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 12 000 r/min, 采取 BCA 法进行蛋白质定量。取 200 μL 上清液倒入离心管, 以 4:1 比例加入 5 \times 蛋白质上样缓冲液, 将其置于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min, 使蛋白彻底变性。将样品置于冰上进行冷却, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 000 r/min, 离心 1 min。根据蛋白分子量调配 SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶, 通过凝胶电泳和转膜后, 用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 并用 TBST 洗涤 5 min $\times 3$ 次。加入 *REV-ERB α* 一抗 (1:1 000)、*BMAL1* 一抗 (1:1 000)、*GAPDH* 一抗 (1:6 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 5 min $\times 3$ 次, 加入二抗 (1:50 000), 在室温下孵育 2 h, TBST 洗涤 5 min $\times 3$ 次。用 IPWIN60 软件处理系统来分析目标条带的吸光度值。以 *GAPDH* 为内参, 根据 *BMAL1*、*REV-ERB α* 条带吸光度值与 *GAPDH* 条带吸光度值之比衡量 *BMAL1*、*REV-ERB α* 的表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件实施统计学分析, 正态分

布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 心肌梗死体积百分比及 cTn I 含量、CK-MB 活性

与 Sham 组相比, I/R 组心肌梗死体积明显增大, 血清 CK-MB 活性和 cTn I 含量明显升高 ($P<0.05$); Crd 组同 I/R 组相比, 心肌梗死体积增大, cTn I 含量和 CK-MB 活性升高 ($P<0.05$); Dss 组同 Crd 组相比, 心肌梗死体积减小, 血清 CK-MB 活性和 cTn I 含量降低 ($P<0.05$) (表 1)。

表 1 大鼠心肌梗死体积百分比及血清中 cTn I、CK-MB 的比较

Table 1 Comparison of the percent of myocardial infarction and serum CK-MB activity and cTn I concentration in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| group | percent size of myocardial infarction/% | cTn I / (ng/mL) | CK-MB / (ng/mL) |
|-------|-----------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Sham | 0 | 0.35 \pm 0.07 | 1.51 \pm 0.11 |
| I/R | 52.3 \pm 1.8* | 1.64 \pm 0.12* | 3.46 \pm 0.21* |
| Crd | 74.6 \pm 2.3 [#] | 2.49 \pm 0.10 [#] | 5.19 \pm 0.17 [#] |
| Dss | 63.5 \pm 2.1 Δ | 1.97 \pm 0.15 Δ | 4.32 \pm 0.25 Δ |

* $P<0.05$ compared with Sham; [#] $P<0.05$ compared with I/R; $\Delta P<0.05$ compared with Crd.

2.2 心肌组织生物钟基因 *BMAL1*、*REV-ERB α* 的蛋白表达

与 Sham 组相比, I/R 组心肌生物钟基因 *BMAL1* 表达下调, *REV-ERB α* 上调 ($P<0.05$); Crd 组同 I/R 组相比, 心肌组织 *BMAL1* 表达下调, *REV-ERB α* 上调 ($P<0.05$); Dss 组同 Crd 组相比, 心肌组织 *BMAL1* 表达上调, *REV-ERB α* 下调 ($P<0.05$) (图 1, 表 2)。

3 讨论

生物钟由 10 个以上相互关联的转录调节因子组成, 所有这些调节因子都可能对心脏的代谢过程产生影响, 而芳香烃受体核转运蛋白的类似蛋白 1 (*BMAL1*) 是生物钟转录调节因子的核心组成部分, 在心肌细胞稳态中起着重要作用, 并受孤儿核受体 *REV-ERB α* 的负调控, *BMAL1* 诱导 *REV-ERB α* 表达, 而 *REV-ERB α* 会进一步反馈抑制 *BMAL1* 的表达^[4],

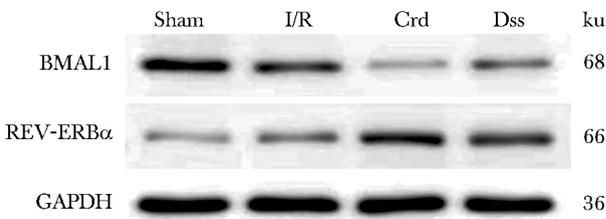


图1 Western blot 检测大鼠心肌组织 BMAL1 和 REV-ERB α 的蛋白表达

Fig 1 Western blot assay of protein expression of BMAL1 and REV-ERB α in rat myocardial tissue

表2 大鼠心肌组织生物钟基因 BMAL1、REV-ERB α 相对表达量

Table2 Relative expression of myocardial biological clock gene BMAL1 and REV-ERB α in rats ($\bar{x}\pm s$, n=10)

| group | BMAL1 | REV-ERB α |
|-------|--------------------------|--------------------------|
| Sham | 0.56 \pm 0.03 | 0.03 \pm 0.01 |
| I/R | 0.27 \pm 0.02* | 0.14 \pm 0.02* |
| Crd | 0.06 \pm 0.01# | 0.36 \pm 0.02# |
| Dss | 0.18 \pm 0.03 Δ | 0.25 \pm 0.02 Δ |

* P <0.05 compared with sham; # P <0.05 compared with I/R; ΔP <0.05 compared with Crd.

在生物体内的反馈调节中起关键作用。此外, BMAL1 在心肌细胞中高度表达,对心脏的代谢、信号转导和收缩功能发挥了关键作用^[5]。昼夜节律调节

参考文献:

- [1] Qiu Z, Ming H, Lei S, *et al.* Roles of HDAC3-orchestrated circadian clock gene oscillations in diabetic rats following myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12:43. doi: 10.1038/s41419-020-03295-y.
- [2] Packer M. Heart Failure: the most important, preventable, and treatable cardiovascular complication of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41:11-13.
- [3] Rutters F, Nefs G. Sleep and circadian rhythm disturbances in diabetes: a narrative review [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2022, 15:3627-3637.
- [4] Mia S, Kane MS, Latimer MN, *et al.* Differential effects of REV-ERB α / β agonism on cardiac gene expression, metabolism, and contractile function in a mouse model of circadian disruption [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318: H1487-H1508.
- [5] 梁清, 陈丽红. 生物钟紊乱致心脏功能障碍的研究进展

生物钟的运行, 研究显示, 昼夜节律紊乱可能会影响生物钟基因 BMAL1 和 REV-ERB α 的转录, 从而加重糖尿病心肌缺血/再灌注损伤^[6-9]。在大鼠心肌缺血/再灌注损伤时, BMAL1 表达降低, REV-ERB α 表达升高^[10]。本实验结果显示, 与 Sham 组比较, I/R 组心肌梗死体积明显增大, 血清 CK-MB 活性和 cTnI 含量明显升高, 心肌组织生物钟基因 BMAL1 表达下调, REV-ERB α 上调, 提示心肌缺血/再灌注模型制备成功; Crd 组同 I/R 组相比, 心肌梗死体积百分比增大、血清 CK-MB 活性和 cTnI 的含量升高, 同时心肌组织生物钟基因 BMAL1 表达降低、REV-ERB α 表达升高, 表明昼夜节律紊乱会加重糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤; Dss 组与 Crd 组相比, 心肌梗死体积百分比减小、血清中的 cTnI 含量和 CK-MB 活性降低, 心肌组织生物钟基因 BMAL1 表达升高, REV-ERB α 表达降低, 证明间断补充睡眠可以减轻昼夜节律紊乱加重的糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤。

综上所述, 昼夜节律紊乱加重了糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤, 而间断补充睡眠则可减轻这种损伤, 但对于其具体的机制目前尚不清楚。以上研究结果提示关注昼夜节律对预防糖尿病的并发症是有必要的, 但治疗糖尿病相关昼夜节律紊乱的方法仍需进一步研究。

[J]. 基础医学与临床, 2022, 42: 799-803.

- [6] Takeda N, Maemura K. The role of clock genes and circadian rhythm in the development of cardiovascular diseases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 3225-3234.
- [7] Škrlec I, Milić J, Cilenšek I, *et al.* Circadian clock genes and myocardial infarction in patients with type-2 diabetes mellitus [J]. *Gene*, 2019, 701: 98-103.
- [8] Parameswaran G, Ray DW. Sleep, circadian rhythms, and type 2 diabetes mellitus [J]. *Clin Endocrinol*, 2022, 96: 12-20.
- [9] Zhao Y, Lu X, Wan F, *et al.* Disruption of circadian rhythms by shift work exacerbates reperfusion injury in myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79: 2097-2115.
- [10] 邱珍, 张艺, 明浩, 等. Rev-erb α /Bmal1 信号通路在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用及其与自噬的关系 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2021, 41: 234-238.