

生物钟基因在缺血再灌注及心肌重构中的研究

王姣 彭石 刘丽芳 吴波 姚亚丽

【摘要】 急性心肌梗死后缺血再灌注损伤是冠状动脉粥样硬化性心脏病（冠心病）常见的损伤加重原因。正常生物钟节律使机体适应外界环境变化，研究发现生物钟节律紊乱在心肌缺血再灌注及心肌重构中发挥重要作用。生物钟基因紊乱可能通过增加炎症因子及活性氧生成、阻碍线粒体自噬、加重铁死亡及生物钟自噬等多个方面加重缺血再灌注损伤，干扰心肌重构，导致心血管事件预后恶化。研究生物钟基因在缺血再灌注及心肌重构过程中可能的作用机制，有望为冠心病提供重要的治疗策略。

【关键词】 生物钟基因；缺血再灌注；心肌重构；生物钟自噬

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.04.003

缺血再灌注损伤是缺血组织恢复血液供应后，因炎症风暴扩散使心肌结构和功能损伤加重的病理变化^[1]。研究显示生物钟紊乱可加重缺血再灌注损伤，导致心肌修复异常，预后恶化^[2]，但相关研究较少。本文介绍生物钟基因在缺血再灌注及心肌重构中的作用及可能机制，为心血管疾病治疗提供潜在策略。

1 生物钟基因

生物钟基因包括核心基因 *Clock*, *Bmal1*, *Per1*、2、3, *Cry1*、2 及多种钟控基因。生物钟基因调节机体的多项生理功能，使其适应外界环境变化。生物钟转录因子 *Clock-Bmal1* 形成异二聚体，与 *Per*、*Cry* 基因启动子结合，进而增加 *Per* 和 *Cry* 蛋白生成。当 *Per* 达到一定浓度后，部分可与 *Cry* 蛋白结合，形成 *Per-Cry* 复合物，负性调节生物钟基因转录，而夜间 *Per-Cry* 复合物降解使基因转录再次激活。*Clock-Bmal1* 也与 *Rev* 基因的 E-box 元件结合，增加 *Rev-Erb* 蛋白生成。当 *Rev-Erb* 较多时，可与 *Arntl* 基因启动子上的视黄酸相关受体反应元件（*ROREs*）结合，竞争性抑制 *Ror* 蛋白的激活作用，进而抑制基因转录^[3]。正常的生物钟节律对维持机体内环境稳态至关重要，其紊乱可导致一系列心血管疾病的发生、发展^[4]。

2 生物钟紊乱与心血管事件

研究表明，生物钟节律中断会增加冠状动脉

粥样硬化性心脏病（冠心病）的发生风险，生物钟异常也影响缺血再灌注及心肌重构等过程^[5]。生物钟紊乱可使心肌细胞耐受缺氧的能力降低，组织炎症反应加重，细胞外基质沉积增多，进而加重缺血再灌注损伤，干扰心肌重构，使患者预后恶化^[2]。*Bmal1* 基因缺失小鼠会出现心血管生物钟节律减弱、广泛心肌纤维化，形成年龄依赖性扩张型心肌病，导致早期死亡率增加，提示生物钟缺失可导致相关基因表达改变、心肌肌联蛋白亚型改变及肌节结构破坏，引起疾病发生发展^[6]。人类急性 ST 段抬高型心肌梗死发作的昼夜时间影响梗死面积大小以及住院死亡率^[7]，清晨发作时心肌梗死面积增大，死亡风险增加。重症监护病房的光照、碎片化睡眠等加重生物钟紊乱，给患者的康复带来严重影响^[8]。

3 生物钟基因与缺血再灌注

缺血再灌注时，缺血心肌通过产生活性氧（*ROS*）和激活细胞死亡程序，诱发组织炎症细胞浸润，线粒体激活^[2,9]，致使血管损伤，形成微血管阻塞（*MVO*），造成“无回流”现象，加剧心肌损伤^[1]。生物钟基因紊乱可增加 *ROS* 及炎症因子生成^[10-11]，加重线粒体功能缺陷，增加细胞铁死亡及生物钟自噬，加剧缺血再灌注损伤^[2]。

3.1 生物钟基因与炎症因子生成

清晨发生的心肌梗死具有更大的梗死面积^[12]，可能由于清晨梗死发作后早期优先触发与炎症反应相关的基因表达，导致梗死部位白细胞介素（*IL*）-6、肿瘤坏死因子（*TNF*）等炎症因子水平增加，炎症

基金项目：甘肃省卫生行业科研计划项目（*GSWSKY-2015-44*）
作者单位：730000 兰州大学第一临床医学院（王姣，彭石，刘丽芳，吴波）；730000 兰州大学第一医院心血管内科心脏中心（姚亚丽）
通信作者：姚亚丽，E-mail: yaoyali6373@163.com

反应增强, 心肌损害加重^[13]。生物钟紊乱如何加重缺血再灌注损伤的相关机制尚未完全清楚, 研究提示生物钟紊乱通过促进巨噬细胞向 M1 型极化、单核细胞趋化、白细胞激活和炎性小体激活增加等机制, 加重再灌注损伤, 干扰心肌修复^[14]。生物钟紊乱使极化的巨噬细胞分泌 IL-23 增加, 从而驱动适应性辅助性 T 细胞 17 (Th17 细胞) 产生并激活 IL-17, 导致心肌细胞死亡^[15]。生物钟紊乱可导致 C 反应蛋白 (CRP) 升高, 后者与再次心肌梗死和冠心病死亡率增加相关。

3.2 生物钟基因与细胞收缩功能障碍

在生物钟基因缺失小鼠的血管中, 内皮源性血管舒张因子一氧化氮 (NO) 及血管扩张剂生成减少^[9], 血管收缩因子环氧化酶 -1 (COX1) 表达增加, ROS 生成增多, 加重再灌注损伤, 提示缺血再灌注损伤与生物钟紊乱导致内皮型一氧化氮合酶偶联受损有关^[16]。生物钟异常通过加剧氧化应激, 使基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 活性增强, 造成心肌收缩蛋白的降解及肌丝结合 Ca^{2+} 能力的下降^[17], 导致心肌收缩功能障碍。Bmal1 缺失的心肌细胞出现胞质 Ca^{2+} 瞬态振幅降低、肌丝对 Ca^{2+} 敏感性降低等表现^[18], 这与 Bmal1 基因调控 Titin-cap 蛋白 (TCAP) 表达相关。TCAP 在维持心肌肌节完整性中起重要作用^[19], 生物钟缺失使 TCAP 亚型组成改变, 心肌肌节结构破坏^[20], 影响心肌收缩力受损修复及心脏修复。

3.3 生物钟基因线粒体功能障碍

线粒体功能障碍被认为是心血管疾病进展的关键因素。生物钟异常影响线粒体介导的细胞自噬等多种功能。Bmal1 缺失的心肌细胞出现线粒体形态伸长, 嵴结构异常, 融合标志物表达升高, 自噬伴侣蛋白与自噬体微管相关蛋白表达降低, 自噬蛋白 BNIP3 表达降低, 导致线粒体自噬功能受损, 加重心肌受损^[18]。Bmal1 缺失可抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬, 在缺血早期, 正常的自噬激活对去除受损细胞器、避免蛋白质毒性应激反应至关重要^[21], 自噬延迟会加重再灌注损伤, 加速细胞死亡, 造成心肌异常重构和心功能障碍。生物钟紊乱可改变线粒体内膜通透性, 诱导线粒体膜通透性转换孔 (mPTPs) 开放, 使细胞中 ROS 生成增多, 加重细胞膜和 DNA 损伤及脂质过氧化, 加速细胞死亡^[1]。糖原合成酶激酶 -3 β (GSK-3 β) 可能为生物钟基因, 研究发现 mPTPs 开放与 GSK-3 β 相关^[2]。

3.4 生物钟基因生物钟自噬

生物钟自噬 (clockophagy) 是一种选择性自噬过程, 是芳基羟受体核转位样蛋白 1 (Arntl1) 通过自噬相关蛋白 5 和泛素化结合蛋白依赖的选择性自噬降解, 导致人脯氨酰羟化酶 2 (EGLN2) 表达升高, 缺氧诱导转录因子 -1 α (HIF-1 α) 稳定性降低, 脂肪酸氧化及铁死亡增加, 加重心肌损害^[22], 而 Arntl1 为重要的生物钟基因。再灌注中的铁死亡使缺氧细胞释放游离铁, 铁诱导 ROS 生成和脂质过氧化物积累, 使心肌细胞死亡^[22]。Per2 缺失小鼠缺氧细胞中 HIF-1 α 的稳定性降低, 导致其耐受缺氧的能力下降, 且对缺氧诱导的炎性反应的抵抗能力减弱, 心肌细胞铁死亡增加。生物钟紊乱可通过 HIF-1 α /BNIP3 途径使心肌细胞线粒体通透性改变, 加重再灌注损伤^[23]。

4 生物钟基因与心肌重构

心脏重构是在 ROS 及炎性因子的刺激下, 心肌细胞、成纤维细胞和细胞外基质等发生结构及功能改变, 使心肌肥厚、纤维化, 最终进展为心力衰竭^[1,24]。氧化应激可造成心肌细胞外基质成分及相关因子的异常表达, 干扰正常的心肌修复。生物钟紊乱使巨噬细胞极化^[24], 诱导血管紧张素 II (Ang II) 生成, 改变还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶亚型, 使 ROS 产生增多, 促进细胞外基质降解, 造成异常的心肌重构^[9]。生物钟基因缺失使线粒体膜通透性改变, 从而增加 MMP-2 活性, 导致有正常结构和功能的胶原蛋白降解, 进而促使心肌细胞外基质分解, 加速心肌重构^[1]。

5 生物钟基因在缺血再灌注损伤治疗中的作用

时间治疗方法是以生物钟节律、药动学及药效学为基础, 制定特定给药时间, 以提高治疗效果^[25]。Ang II 在心肌重构方面起到重要作用, 且受生物钟基因调控, 血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 特定的给药时间可降低 Ang II 水平, 同时降低下游氧化应激反应, 改善异常重构^[1]。以生物钟基因为靶点的生物学治疗为促进心肌修复提供了潜在的治疗方案。Rev-Erba 激活剂 SR9009 可减轻炎症反应, 促进心肌组织修复, 有利于心肌功能的恢复^[11]。通过控制 Per2 基因的稳定性而治疗心肌缺血成为潜在的治疗策略^[26]。Cry 稳定剂 KL001 可能对降低心血管不良事件有潜在作用, 但仍需大量研究来评估其准确性^[27]。

6 小结

生物钟紊乱可引起内皮功能障碍、心肌收缩力损伤、ROS 和炎症因子增加、生物钟自噬和铁死亡增加及 ECM 降解增加,在缺血再灌注损伤和心肌重构中起到关键作用。生物钟基因与缺血再灌注损伤和心肌重构密不可分,仍需要深入探究其作用机制及其在心血管疾病治疗中的应用。

参 考 文 献

- [1] Khaper N, Bailey C, Ghugre NR, et al. Implications of disturbances in circadian rhythms for cardiovascular health: a new frontier in free radical biology[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 119:85-92.
- [2] Rabinovich-Nikitin I, Lieberman B, Martino T, et al. Circadian-regulated cell death in cardiovascular diseases[J]. *Circulation*, 2019, 139(7):965-980.
- [3] Ruan W, Yuan X, Eltzschig HK. Circadian rhythm as a therapeutic target[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(4):287-307.
- [4] Asgari-Targhi A, Klerman EB. Mathematical modeling of circadian rhythms[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2019, 11(2):e1439.
- [5] Thosar SS, Butler MP, Sa SA. Role of the circadian system in cardiovascular disease[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(6):2157-2167.
- [6] Lefta M, Campbell KS, Feng HZ, et al. Development of dilated cardiomyopathy in Bmal1-deficient mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(4):H475-H485.
- [7] Fournier S, Taffé P, Radovanovic D, et al. Myocardial infarct size and mortality depend on the time of day—a large multicenter study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0119157.
- [8] Engwall M, Fridh I, Johansson L, et al. Lighting, sleep and circadian rhythm: an intervention study in the intensive care unit[J]. *Intensive Crit Care Nurs*, 2015, 31(6):325-335.
- [9] Man A, Li H, Xia N. Circadian rhythm: potential therapeutic target for atherosclerosis and thrombosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):676.
- [10] Hergenhan S, Holtkamp S, Scheiermann C. Molecular interactions between components of the circadian clock and the immune system[J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(12):3700-3713.
- [11] Huang H, Li Z, Ruan Y, et al. Circadian rhythm disorder: a potential inducer of vascular calcification?[J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76(4):513-524.
- [12] Schloss MJ, Horckmans M, Nitz K, et al. The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(8):937-948.
- [13] Steffens S, Winter C, Schloss MJ, et al. Circadian control of inflammatory processes in atherosclerosis and its complications[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(6):1022-1028.
- [14] Fioranelli M, Bottaccioli AG, Bottaccioli F, et al. Stress and inflammation in coronary artery disease: a review psychoneuroendocrineimmunology-based[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2031.
- [15] Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2):117-129.
- [16] Bhatwadekar AD, Beli E, Diao Y, et al. Conditional deletion of Bmal1 accentuates microvascular and macrovascular injury[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(6):1426-1435.
- [17] Sawicki G. Intracellular regulation of matrix metalloproteinase-2 activity: new strategies in treatment and protection of heart subjected to oxidative stress[J]. *Scientifica*, 2013, 2013:130451.
- [18] 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.
- [19] Takaguri A, Sasano J, Akihiro O, et al. The role of circadian clock gene BMAL1 in vascular proliferation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 872:172924.
- [20] Soares AC, Fonseca D. Cardiovascular diseases: a therapeutic perspective around the clock[J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(6):1086-1098.
- [21] Mistry P, Duong A, Kirshenbaum L, et al. Cardiac clocks and preclinical translation[J]. *Heart Fail Clin*, 2017, 13(4):657-672.
- [22] Yang M, Chen P, Liu J, et al. Clockophagy is a novel selective autophagy process favoring ferroptosis[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7):eaaw2238.
- [23] Chaanine AH, Gordon RE, Kohlbrenner E, et al. Potential role of BNIP3 in cardiac remodeling, myocardial stiffness, and endoplasmic reticulum: mitochondrial Calcium homeostasis in diastolic and systolic heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(3):572-583.
- [24] Chen S, Fuller KK, Dunlap JC, et al. A pro- and anti-inflammatory axis modulates the macrophage circadian clock[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:867.
- [25] Crnko S, Cour M, Van LL, et al. Vasculature on the clock: circadian rhythm and vascular dysfunction[J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 108:1-7.
- [26] Tarquini R, Mazzocchi G. Clock genes, metabolism, and cardiovascular risk[J]. *Heart Fail Clin*, 2017, 13(4):645-655.
- [27] Wu Y, Tang D, Liu N, et al. Reciprocal regulation between the circadian clock and hypoxia signaling at the genome level in mammals[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(1):73-85.

(收稿:2021-12-06 修回:2022-04-19)

(本文编辑:胡晓静)