

心肌梗死对比格犬左侧星状神经节时钟基因表达的影响

刘旨浩 王宇虹 王钧 周慧鑫 于中洋 张嵩 矫鹏莹 聂鹏庆 王悦怡 江洪 余锂镭

【摘要】 目的:探究心肌梗死对比格犬左侧星状神经节(LSG)时钟基因表达的影响。**方法:**12只成年比格犬随机分为心肌梗死组(MI组)和对照组,每组6只。2组动物均于麻醉后行左侧开胸术,暴露心脏,MI组行左前降支结扎术,对照组仅开胸不结扎。造模1h后分离各组LSG,行荧光实时定量聚合酶链反应检测核心时钟基因(*Bmal1*、*Clock*、*Per1*、*Per2*、*Cry1*和*Cry2*)及钟控基因(*Nr1d1*、*Nr1d2*、*Rora*和*Tim*)的mRNA表达水平。**结果:**与对照组相比,MI组LSG中*Per2*、*Nr1d1*的mRNA表达水平显著降低,*Cry1*、*Cry2*、*Tim*的mRNA表达水平显著升高(P 均 <0.05)。**结论:**心肌梗死可引起LSG中时钟基因的表达异常,这可能与心肌梗死后猝死事件发生的昼夜节律有关。

【关键词】 心肌梗死;左侧星状神经节;时钟基因;昼夜节律

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.06.013

Alterations in clock gene expression of left stellate ganglion induced by myocardial infarction in beagles LIU Zhihao, WANG Yuhong, WANG Jun, ZHOU Huixin, YU Zhongyang, ZHANG Song, JIAO Liying, NIE Liqing, WANG Yueyi, JIANG Hong, YU Lilei Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiac Autonomic Nervous System Research Center of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute, Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of myocardial infarction (MI) on clock gene expression in left stellate ganglion (LSG) of beagles. **Methods:** Twelve adult beagles were randomly divided into MI group ($n=6$) and control group ($n=6$). Left thoracotomy was performed after anesthesia, and MI model was built by ligating left anterior descending coronary artery. One hour later, LSG was resected for all beagles. The mRNA expression of core clock genes (*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* and *Cry2*) and clock controlled genes (*Nr1d1*, *Nr1d2*, *Rora* and *Tim*) was detected by RT-qPCR. **Results:** Compared with control group, the mRNA expression of *Per2* and *Nr1d1* in LSG was significantly decreased for MI group, while the mRNA expression of *Cry1*, *Cry2* and *Tim* was significantly increased. **Conclusion:** MI causes abnormal expression of clock genes in LSG, which may be related to circadian rhythm of sudden death after a heart attack.

【Key words】 Myocardial infarction; Left stellate ganglion; Clock gene; Circadian rhythm

生物钟几乎存在于哺乳动物的所有细胞中,通过一系列复杂的转录-翻译反馈环路(TTFL)实现组织和器官功能上的昼夜波动^[1]。这些TTFL主要由核心时钟基因(*Bmal1*、*Clock*、*Per1*、*Per2*、

*Cry1*和*Cry2*等)和钟控基因(*Nr1d1*、*Nr1d2*、*Rora*和*Tim*等)相互作用形成,共同调节机体行为的昼夜节律^[1]。研究表明,心肌梗死后猝死事件的发生具有明显的昼夜分布,其潜在机制尚不清楚^[2-3]。既往研究发现,左侧星状神经节(LSG)是心脏交感神经过度激活并触发心肌梗死后猝死事件的关键环节^[4]。本研究旨在探究心肌梗死对比格犬LSG时钟基因表达的影响。

基金项目:国家自然科学基金(81871486, 81970287)
作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科,武汉大学心脏自主神经研究中心,武汉大学心血管病研究所,心血管病湖北省重点实验室
通信作者:余锂镭, E-mail: lileiyu@whu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

12 只健康成年雄性比格犬由武汉大学人民医院动物中心提供, 体质量为 18~22 kg, 饲养于温度和湿度适宜的环境中, 光照周期为光照和黑暗各 12 h。12 只比格犬随机分为心肌梗死组 (MI 组, 行左前降支结扎术, $n=6$) 和对照组 (仅开胸不结扎动脉, $n=6$), 本研究方案由武汉大学动物实验伦理委员会批准进行。

1.2 建立心肌梗死模型及取材

所有比格犬通过前肢静脉注射 3% 戊巴比妥 (剂量为 30 mg/kg) 进行麻醉, 并以 2 mg/(kg·h) 维持麻醉状态。麻醉后将比格犬置于手术台, 行气管插管连接正压呼吸机通气, 调整氧流量 4~6 L/min。右侧股静脉置管建立静脉通道, 滴注生理盐水。持续监测体表心电图 (Lead7000, 四川锦江电子科技有限公司)。整个实验过程中, 于比格犬下方放置电热板以维持正常体温。所有比格犬取右侧卧位, 经左侧第四肋间开胸, 剪开心包, 暴露心脏。小心分离冠状动脉左前降支, 在距离左前降支起始处约 2 cm 的下方穿入 1 根 3/0 线, 结扎左前降支建立心肌梗死模型。模型建立成功标志: 心肌缺血区域出现局部发绀, 心电监测示 II 导联 ST 段明显改变 (≥ 0.1 mV 抬高或压低)。保持结扎 1 h。对照组比格犬行相同操作但不结扎。安乐死处死动物, 于左侧第三肋间开胸, 收集 LSG, 解剖学位置如图 1 所示, 所有比格犬的取材操作均于 20:00~24:00 间完成。

1.3 时钟基因检测

Trizol 法提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA, 使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行荧光实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR), 引物由上海生工生物工程公司提供, 引物序列见表 1, 实验条件为 95 °C 10 min 预变性, 95 °C 15 s 变性, 60 °C 30 s 退火/延伸, 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 所有数据均通过 Shapiro-Wilk 检验是否符合正态分布。数据均以均数 \pm 标准差表示, 采用独立样本 t 检验对组间差异进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

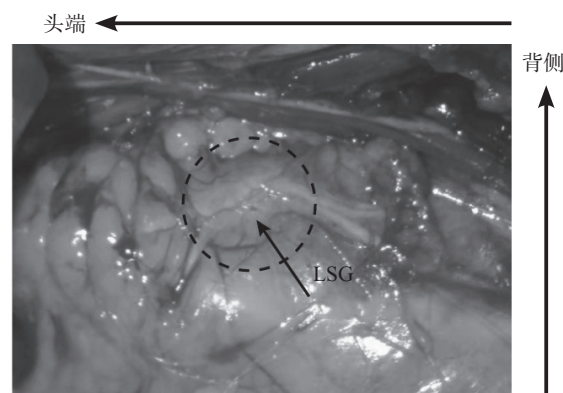


图1 左侧星状神经节的解剖位置

表1 qRT-PCR引物序列

基因名称	引物序列 (5'→3')
<i>GAPDH</i>	上游: ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG 下游: GCCATCACGCCACAGTTTC
<i>Bmal1</i>	上游: GCTCCACCGACTACCAACTTGATG 下游: GACGCCTCTTCTCAATCTGACTGTG
<i>Clock</i>	上游: AGTCACACAACAGCAGCAGCAG 下游: CCGTGGAGCAACCTTGAAGTCTG
<i>Per1</i>	上游: CTCTTCTGGCAATGGCAAGGACTC 下游: GGAGGCTGTAGGCAATGGAAGTCTG
<i>Per2</i>	上游: TCCTTCATCATTGGCAGACACAGAG 下游: TCCTTCTCCTCCACGAGCGATG
<i>Cry1</i>	上游: ACCATTTAGCCAGACATGCAGTAGC 下游: ACAAGACAGCCACATCCAAGTCC
<i>Cry2</i>	上游: CATCCAGGACAACCATGACGACAC 下游: ACCCAAGCCTTCCGTTCCAAATG
<i>Nr1d1</i>	上游: TTCCTCATCGTCATCCTCCTCCTTC 下游: TGGTGATGTGCTGGTGCTCTTG
<i>Nr1d2</i>	上游: TGCTGTTTCGGTTTGGTCGTATTC 下游: TGGCTGTTTCATCATGGTCTTTCATCG
<i>Rora</i>	上游: AGACCCCGCTGAACCAGGAATC 下游: TGCCTGCCATGTATGTGTCTTCTTC
<i>Tim</i>	上游: ACTCGGAGTAATTGCCTGCATTGG 下游: GACAACCTTGCTCCAGTCCCTTCAC

2 结果

2.1 心肌梗死对LSG中核心时钟基因表达的影响

与对照组相比, MI 组 *Per2* 的 mRNA 表达水平显著降低, *Cry1*、*Cry2* 的 mRNA 表达水平显

著升高 (P 均 <0.05), *Bmal1*、*Clock* 和 *Per1* 的 mRNA 表达水平变化不显著。见表 2。

表2 2组LSG中核心时钟基因mRNA表达水平比较

基因名称	mRNA表达水平	
	对照组	MI组
<i>Bmal1</i>	0.33 ± 0.05	0.61 ± 0.24
<i>Clock</i>	1.18 ± 0.58	0.51 ± 0.22
<i>Per1</i>	0.91 ± 0.29	1.19 ± 0.23
<i>Per2</i>	1.00 ± 0.44	$0.13 \pm 0.09^{(1)}$
<i>Cry1</i>	1.00 ± 0.47	$4.77 \pm 1.19^{(2)}$
<i>Cry2</i>	0.98 ± 0.24	$2.09 \pm 0.65^{(1)}$

注:与对照组相比, $^{(1)}P < 0.01$; 与对照组相比, $^{(2)}P < 0.001$

2.2 心肌梗死对LSG中钟控基因表达的影响

与对照组相比, MI 组 *Nr1d1* 的 mRNA 表达水平显著降低, *Tim* 的 mRNA 表达水平显著升高, (P 均 <0.05), *Nr1d2*、*Rora* 的 mRNA 表达水平变化不显著。见表 3。

表3 2组LSG中钟控基因mRNA表达水平比较

基因名称	mRNA表达水平	
	对照组	MI组
<i>Nr1d1</i>	1.00 ± 0.34	$0.19 \pm 0.08^{(1)}$
<i>Nr1d2</i>	0.73 ± 0.29	0.61 ± 0.34
<i>Rora</i>	0.77 ± 0.40	0.36 ± 0.27
<i>Tim</i>	0.56 ± 0.21	$14.74 \pm 3.77^{(2)}$

注:与对照组相比, $^{(1)}P < 0.001$; 与对照组相比, $^{(2)}P < 0.01$

3 讨论

近年来, 心肌梗死在我国的发病率及病死率呈上升趋势^[5]。研究表明, 心肌梗死后猝死事件(如室性快速性心律失常)的发生具有明显的昼夜分布特点, 表现出典型的清晨发病高峰, 但其机制尚不清楚^[2-3]。既往研究显示, 心脏交感神经节即 LSG 的过度激活是心肌梗死后猝死事件发生的重要环节, LSG 的神经活性同样具有昼夜节律性^[6], 提示心肌梗死后猝死事件发生的昼夜分布可能与 LSG 的昼夜节律相关。

哺乳动物的生物钟系统由位于下丘脑视交叉上核(SCN)的中央时钟与位于外周组织中的外周时钟构成^[7]。其中, 中央时钟是控制机体昼夜节律的主要部分, 其通过视网膜接受光信号实现与外界环境的同步, 并经神经体液途径(自主神经张力、体温和糖皮质激素等)整合外周时钟, 从而使机体

与环境、不同器官间保持同步, 调节生理活动。本团队前期通过将跨突触逆行示踪病毒——伪狂犬病病毒注射至大鼠心肌组织中, 发现颈上神经节(SCG, 与 LSG 功能类似)、下丘脑室旁核(PVN, 交感神经中枢)和 SCN 处均出现了伪狂犬病病毒标记的神经元, 说明可能存在“SCN-PVN-SCG-心脏”交感神经轴, 进一步研究发现昼夜节律紊乱可通过激活该交感神经轴, 使心肌梗死后的心脏重构恶化, 提示心脏交感神经节可以直接受到中央时钟的调控, 从而影响心肌梗死后心脏功能的改变^[8], 然而目前关于心脏交感神经节的外周时钟基因在心肌梗死前后的变化情况仍不清楚。为了更好地反映人类 LSG 时钟基因在心肌梗死前后的表达改变, 本研究采用了与人类生活作息相同(昼出夜伏)的比格犬作为实验动物, 通过结扎左前降支构建心肌梗死模型, 发现 MI 组 LSG 中 *Per2*、*Nr1d1* 的表达显著降低, *Cry1*、*Cry2*、*Tim* 的表达显著升高。

在生理状态下, 核心时钟基因及钟控基因通过形成一系列复杂的 TTFL 实现昼夜波动^[9]。核心 TTFL 主要由 4 个核心时钟基因蛋白驱动: 2 个正向调节因子(*Bmal1* 和 *Clock*)和 2 个负向调节因子(*Per* 和 *Cry*)。首先, 核心时钟基因蛋白 *Bmal1* 和 *Clock* 在细胞核中结合形成异二聚体, 并与 *Cry* 和 *Per* 基因启动子区域的 E-box 结合, 激活它们的转录。随后, *Per* 和 *Cry* 蛋白在细胞质中聚集, 结合形成异二聚体并重新转移至细胞核中, 抑制 *Bmal1*-*Clock* 异二聚体介导的基因转录过程^[9]。除此之外, *Bmal1*-*Clock* 异二聚体还可以激活钟控基因(如 *Nr1d1*、*Nr1d2*、*Rora*)的转录, 而 *Nr1d1*/*Nr1d2* 和 *Rora* 的积累又可以通过与 *Bmal1* 启动子区域的核受体反应元件结合, 分别抑制和促进 *Bmal1* 的表达, 进一步维持该反馈环路的稳定性^[10]。本研究结果显示心肌梗死会导致 LSG 核心时钟基因的负向调节因子 *Per2* 表达显著降低, *Cry1*、*Cry2* 表达显著升高, 而正向调节因子 *Bmal1* 和 *Clock* 的表达则无明显改变。本研究同样发现心肌梗死会导致 LSG 中钟控基因的负向调节因子 *Nr1d1* 表达显著降低, 而对正向调节因子 *Rora* 的表达无明显影响。这些结果提示心肌梗死主要影响 LSG 内 TTFL 负向调节因子的表达。

Tim 基因最初在果蝇中被发现, 其编码的 *Tim* 蛋白主要通过与 *Per* 蛋白结合, 以异二聚体的形式转入细胞核中抑制 *Per* 基因的转录, 从而参与维持

果蝇正常的昼夜节律^[11]。目前关于 Tim 蛋白在哺乳动物中的作用尚不清楚。Barnes 等^[12]通过选择性敲除小鼠 SCN 中 *Tim* 基因发现, *Tim* 表达下调可显著降低 *Per* 蛋白的表达, 升高 *Cry* 蛋白的表达, 并严重破坏 SCN 的昼夜节律, 表明 *Tim* 很可能也参与了哺乳动物昼夜节律的维持。除了驱动昼夜节律外, 近年来研究表明 *Tim* 还与细胞周期、DNA 复制及 DNA 损伤有关^[13]。本研究发现心肌梗死显著地增加了 LSG 中 *Tim* 基因的转录水平, 但降低了 *Per2* 的表达, 升高了 *Cry1/Cry2* 的表达, 这与 Barnes 等^[12]的研究结果并不一致, 提示心肌梗死很可能是通过其他机制影响 *Tim* 的表达, 其中的潜在机制需要进一步研究。

综上所述, 本研究发现心肌梗死主要影响 LSG 内 TTFL 的负向调节因子 (*Per2*、*Cry1*、*Cry2* 及 *Nr1d1*) 的表达, 推测这可能与心肌梗死后猝死事件发生的昼夜分布有关。后续研究将进一步验证 LSG 内 TTFL 的负向调节因子的表达改变与猝死事件发生的联系及潜在机制。此外, 基于 *Tim* 在心肌梗死前后的显著改变, 我们推测 *Tim* 很可能参与了该过程。

参 考 文 献

- [1] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock[J]. Science, 2000, 288(5468):1013-1019.
- [2] Englund A, Behrens S, Wegscheider K, et al. Circadian variation of malignant ventricular arrhythmias in patients with ischemic and nonischemic heart disease after cardioverter defibrillator implantation. European 7219 Jewel Investigators[J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 34(5):1560-1568.
- [3] Kozák M, Krivan L, Semrád B. Circadian variations in the occurrence of ventricular tachyarrhythmias in patients with implantable cardioverter defibrillators[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2003, 26(3):731-735.
- [4] Yu LL, Zhou LP, Cao G, et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(22):2778-2790.
- [5] 《中国心血管健康与疾病报告》编写组. 《中国心血管健康与疾病报告2020》概述[J]. 中国心血管病研究, 2021, 19(7):582-590.
- [6] Jung BC, Dave AS, Tan AY, et al. Circadian variations of stellate ganglion nerve activity in ambulatory dogs[J]. Heart Rhythm, 2006, 3(1):78-85.
- [7] Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, et al. A circadian gene expression Atlas in mammals: implications for biology and medicine[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(45):16219-16224.
- [8] Wang YH, Jiang WL, Chen H, et al. Sympathetic nervous system mediates cardiac remodeling after myocardial infarction in a circadian disruption model[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8:668387.
- [9] Koike N, Yoo SH, Huang HC, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals[J]. Science, 2012, 338(6105):349-354.
- [10] Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72:517-549.
- [11] Voss hall LB, Price JL, Sehgal A, et al. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless[J]. Science, 1994, 263(5153):1606-1609.
- [12] Barnes JW, Tischkau SA, Barnes JA, et al. Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity[J]. Science, 2003, 302(5644):439-442.
- [13] Mazzocchi G, Laukkanen MO, Vinciguerra M, et al. A Timeless link between circadian patterns and disease[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(1):68-81.

(收稿:2022-02-27 修回:2022-09-08)

(本文编辑:胡晓静)