

*Bmal1*过表达对动脉粥样硬化斑块病变程度及稳定性的影响

朱胜奎 丁家望 汪心安 张再强 万剑桥

【摘要】 目的:探讨昼夜节律基因脑肌类芳烃受体核转位样蛋白 1 (*Bmal1*) 过表达对小鼠动脉粥样硬化斑块病变程度及斑块稳定性的影响。**方法:**12 只血管平滑肌细胞特异性 *Bmal1* 转基因的 SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 小鼠和 12 只 ApoE^{-/-} 小鼠均予以高脂饮食, 行颈总动脉 CAST 套管结扎术使小鼠形成动脉粥样硬化斑块。喂养 11 周后处死动物, 取出颈总动脉血管, 行苏木精-伊红染色检测小鼠主动脉粥样硬化程度及斑块面积, Western blot 法检测及基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9 的蛋白表达水平。**结果:**与 ApoE^{-/-} 组相比, SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 组三酰甘油 (TC)、总胆固醇 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平均明显降低 (P 均 <0.05), 2 组高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平的差异无统计学意义。SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 组小鼠颈总动脉斑块减少约 25%, 内膜增厚不明显。与 ApoE^{-/-} 组相比, SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 组 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达水平均明显降低 (P 均 <0.05)。**结论:***Bmal1* 可抑制动脉粥样硬化斑块病变程度, 下调主动脉粥样斑块内 MMP-2、MMP-9 水平, 具有抗动脉粥样硬化的作用。

【关键词】 脑肌类芳烃受体核转位样蛋白 1; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.06.014

Effect of *Bmal1* gene overexpression on the degree of atherosclerosis and plaque stability ZHU Shengkui, DING Jingwang, WANG Xinan, ZHANG Zaiqing, WAN Qianqiao
Department of Cardiology, Yichang Central People's Hospital, First Medical College of Sanxia University, Yichang 443003, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of circadian rhythm gene *BMAL1* on the degree of atherosclerosis and plaque stability. **Methods:** *BMAL1* overexpression mice (SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-}) and ApoE^{-/-} mice were treated with high-fat diet, and atherosclerotic plaque was created by carotid artery ligation with a CAST cannula. All animals were then sacrificed after 11 weeks of feeding. The whole segment of carotid artery was taken out for HE staining and western blot to determine the degree of aortic atherosclerosis. The protein expression levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were assessed. **Results:** Blood levels of triglyceride, total cholesterol, and low-density lipoprotein were lower in SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} mice than those in ApoE^{-/-} mice (all $P < 0.05$), but high-density lipoprotein level was similar in both groups. Compared with ApoE^{-/-} mice, the degree of carotid atherosclerotic plaque was decreased by 25% without obvious intimal thickening in SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} mice. In addition, MMP-2 and MMP-9 levels were significantly reduced in SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} mice (all $P < 0.05$). **Conclusion:** This study suggests that overexpression of *Bmal1* gene could inhibit the degree of atherosclerosis and exert a beneficial effect on plaque stabilization.

【Key words】 Bmal1; Atherosclerosis; Matrix metalloproteinases

基金项目: 国家自然科学基金 (81770456)

作者单位: 443003 宜昌, 三峡大学第一临床医学院, 宜昌市中心人民医院心内科

通信作者: 丁家望, E-mail: dingjiawang@qq.com

动脉粥样硬化是大、中型动脉的慢性非特异性炎症病变,是冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)最常见的病理基础^[1]。动脉粥样硬化发病机制复杂,涉及炎症反应、氧化应激、凋亡等。研究发现,昼夜节律相关基因参与了动脉粥样硬化的形成过程,昼夜节律紊乱会引起动脉粥样硬化的病理紊乱,促进心血管疾病的发生发展^[2-3]。生物钟基因是生物昼夜节律呈现的分子基础,哺乳动物的生物钟主要位于下丘脑视交叉上核(SCN)。脑肌类芳烃受体核转位样蛋白 1 基因(*Bmal1*)在昼夜节律系统中至关重要,是唯一单独缺失即可导致全身节律丧失的核心时钟基因^[4-5],可影响动脉粥样硬化的发生发展过程^[6-7]。基质金属蛋白酶(MMP)可局灶性破坏细胞外基质,导致粥样斑块不稳定^[8]。本研究建立小鼠动脉粥样硬化模型,探讨 *Bmal1* 对动脉粥样硬化病变程度及斑块稳定性的影响,为动脉粥样硬化的防治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级 ApoE^{-/-} 雄性、雌性种鼠各 3 只,血管平滑肌细胞特异性 *Bmal1* 转基因的 SM-*Bmal1*-TG/ApoE^{-/-} 雄性、雌性小鼠各 3 只,均购自武汉大学动物实验中心并分笼喂养于三峡大学实验动物中心,繁殖后选取符合实验要求的小鼠,生产许可证号为 SCXK(鄂)2016-0006。所有实验小鼠 11 周龄,体质量为 15~20 g。动物饲养间温度(22±2)℃,湿度(60±5)%,保持明暗交替的光照条件,均予以高脂饮食(蛋白质 15.8%、脂肪 40%、碳水化合物 44.2%),实验经动物实验伦理委员会批准,实验动物设施使用证明许可证号为 SYXK(鄂)2017-0061。实验小鼠分为 2 组, ApoE^{-/-} 组(雄性小鼠, *n*=12)、SM-*Bmal1*-TG/ApoE^{-/-} 组(雄性小鼠, *n*=12)。

1.2 动物模型构建

取出生 1 周后的小鼠脚趾或尾部组织,运用琼脂糖凝胶电泳进行 *Bmal1* 转基因小鼠的鉴定。小

鼠 11 周龄时,分离 ApoE^{-/-} 小鼠、SM-*Bmal1*-TG/ApoE^{-/-} 小鼠左侧颈总动脉血管,血管外置入外径 0.5 mm、内径 0.3 mm、长度为 10 mm 的 CAST 套管,造成局部血管狭窄,以利于形成湍流,促进动脉粥样硬化形成,小鼠造模前高脂喂养 2 周,造模后继续高脂喂养 9 周。

1.3 血脂水平检测

各组小鼠通过眶静脉采血,按照试剂盒说明书检测三酰甘油(TC)、总胆固醇(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。

1.4 苏木精-伊红染色

处死小鼠后分离小鼠行 CAST 套管手术的颈总动脉,清除血管外组织,置于 4% 多聚甲醛缓冲液中固定,苏木精-伊红(HE)染色。镜下观察病理切片形态,每只动物取 5 张切片,计算斑块面积平均值。

1.5 Western blot法检测MMP-2、MMP-9的蛋白表达水平

采用 RIPA 裂解液提取小鼠颈总动脉组织总蛋白,测定蛋白浓度。蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜后, TBST 室温封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜,洗膜后二抗室温孵育 30 min,进行 Western Blot 检测。扫描条带并计算目的蛋白的相对表达水平,具体操作步骤按试剂盒说明书进行,本实验所用试剂盒购于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组小鼠血脂水平比较

与 ApoE^{-/-} 组比较, SM-*Bmal1*-TG/ApoE^{-/-} 组 TG、TC、LDL-C 均显著降低(*P*均<0.05), 2 组 HDL-C 水平差异无统计学意义。见表 1。

表1 2组小鼠血脂水平比较(*n*=12)

组别	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹
ApoE ^{-/-} 组	22.11±0.15	2.31±0.57	4.08±0.26	0.89±0.11
SM- <i>Bmal1</i> -TG/ApoE ^{-/-} 组	10.33±0.99 ⁽¹⁾	1.55±0.46 ⁽¹⁾	3.24±0.39 ⁽¹⁾	1.10±0.22

注:与ApoE^{-/-}组相比, ⁽¹⁾*P*<0.05

2.2 2组小鼠斑块病理学检测结果比较

HE 染色可见 ApoE^{-/-} 组小鼠颈动脉血管内皮下有脂质沉积, 动脉粥样硬化斑块形成, 血管内膜增厚, 并突向管腔, 管腔中央有血栓形成; SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 组小鼠颈动脉血管内皮下有少量

脂质沉积, 动脉粥样硬化斑块明显减少, 血管内膜部分增厚, 管腔中央可见少量血栓形成。与 ApoE^{-/-} 组小鼠相比, SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 组小鼠动脉粥样硬化斑块面积减少 25%[(14.62±0.79)% 对 (20.62±6.00)%], $P<0.05$], 见图 1。

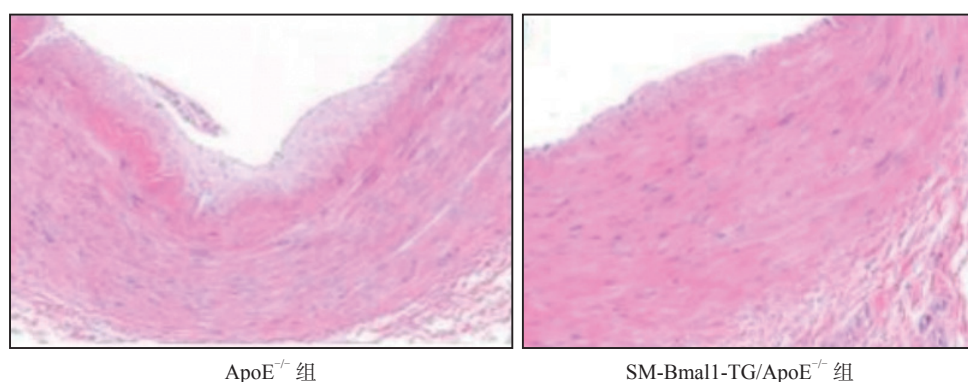


图1 2组小鼠颈总动脉HE 染色情况

2.3 2组小鼠MMP-2、MMP-9表达水平比较

与 ApoE^{-/-} 组相比, SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-} 组 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 见图 2。

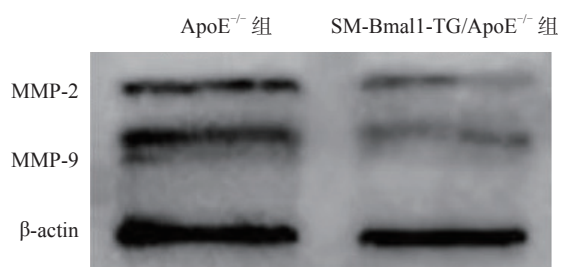


图2 2组小鼠MMP-2、MMP-9蛋白表达情况

3 讨论

动脉粥样硬化是长期的慢性炎症反应病变过程, 单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等多种炎性细胞共同参与斑块形成^[9]。既往研究报道, Bmal1 在血管损伤后作为血管平滑肌细胞增殖的正向调节因子, 可抑制血管内膜增厚程度, 提示 Bmal1 是治疗动脉粥样硬化的新靶点^[10]。敲除全身及肝细胞特异性 Bmal1, 可诱导 ApoE^{-/-} 小鼠高脂血症并增强动脉粥样硬化程度, 而过表达 Bmal1 后则可改善高脂血症及动脉粥样硬化程度^[11]。本研究旨在探讨昼夜节律基因 Bmal1 与动脉粥样硬化斑块病

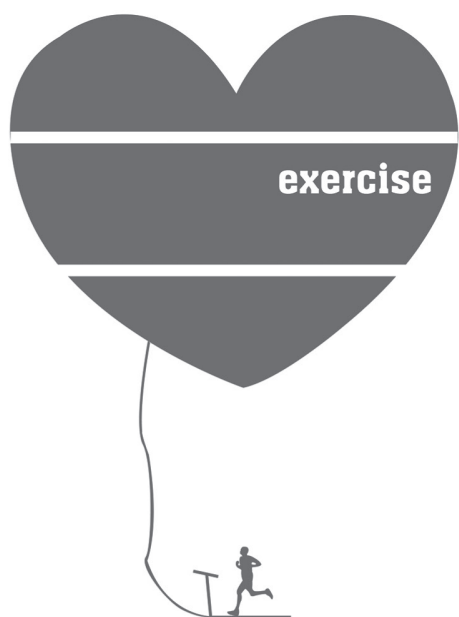
变程度及稳定性的相关性。MMP-2、MMP-9 属于 MMP 家族成员, 与斑块不稳定有密切关系。在不稳定斑块区域, MMP-2、MMP-9 表达水平较高, 酶活性明显增强, 易引起不稳定斑块发生破裂。MMP-2 和 MMP-9 是血管平滑肌细胞增殖和迁移所必需的, 在纤维帽的发育和维持中起重要作用, 尤其是在晚期斑块中, MMP-2、MMP-9 水平明显增加, 与巨噬细胞聚集有关, 其可能通过促进斑块内出血导致斑块破裂^[8,12]。研究显示, 在 Bmal1^{-/-} 小鼠的动脉中, MMP-2 和 MMP-9 表达水平均增加^[13]。Bmal1 过表达可维持斑块的稳定性。

本研究显示, SM-Bmal1-TG/ApoE^{-/-}、ApoE^{-/-} 小鼠经高脂喂养后, Bmal1 过表达小鼠的颈动脉斑块病变面积明显减少, 且斑块内 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平下降。因此, Bmal1 在一定程度上可抑制动脉粥样硬化斑块的病变程度并有利于维持斑块的稳定性, 具有抗动脉粥样硬化的作用。随着对动脉粥样硬化发病机制研究的不断深入, Bmal1 可能成为抗动脉粥样硬化的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis[J]. Nat Immunol, 2011, 12(3):204-212.
- [2] Oishi Y, Hayashi S, Isagawa T, et al. Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7086.
- [3] Zhu YH, Xian XM, Wang ZZ, et al. Research progress on

- the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3):80.
- [4] Gwon DH, Lee WY, Shin N, et al. BMAL1 suppresses proliferation, migration, and invasion of U87MG cells by downregulating cyclin B1, phospho-AKT, and metalloproteinase-9[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7):2352.
- [5] Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms[J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63:647-676.
- [6] Yang GR, Zhang JY, Jiang TT, et al. Bmal1 deletion in myeloid cells attenuates atherosclerotic lesion development and restrains abdominal aortic aneurysm formation in hyperlipidemic mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(6):1523-1532.
- [7] Rabinovich-Nikitin I, Lieberman B, Martino TA, et al. Circadian-regulated cell death in cardiovascular diseases[J]. *Circulation*, 2019, 139(7):965-980.
- [8] Brown BA, Williams H, George SJ. Evidence for the involvement of matrix-degrading metalloproteinases (MMPs) in atherosclerosis[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 197-237.
- [9] Linton MF, Babaev VR, Huang JS, et al. Macrophage apoptosis and efferocytosis in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Circ J*, 2016, 80(11):2259-2268.
- [10] 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.
- [11] Pan XY, Bradfield CA, Hussain MM. Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:13011.
- [12] Fiotti N, Altamura N, Orlando C, et al. Metalloproteinases-2, -9 and TIMP-1 expression in stable and unstable coronary plaques undergoing PCI[J]. *Int J Cardiol*, 2008, 127(3):350-357.
- [13] Anea CB, Ali MI, Osmond JM, et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 dysfunction underlie vascular stiffness in circadian clock mutant mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12):2535-2543.
- (收稿:2021-08-18 修回:2022-08-21)
(本文编辑:胡晓静)



运动演绎精彩

健康成就未来