

心肌梗死对 C57BL/6J 小鼠跑轮运动日节律的影响

周 岚 曹济民

摘要 目的 心脏活动的昼夜变化受生物钟中枢视交叉上核(SCN)调控,因而反映心脏活动的生理指标(如血压、心率、心排出量)乃至心源性猝死事件呈现明显的昼夜节律。反过来,心脏疾病也可能影响SCN的昼夜节律振荡。本研究旨在探讨心肌梗死对SCN日节律的影响。**方法** 通过经腹腔横膈膜液氮冷冻致局部心肌坏死的方法模拟小鼠心肌梗死,利用Mini Mitter跑轮活动监测系统实时监测C57BL/6J小鼠心肌梗死前后跑轮运动节律的改变。**结果** 心肌梗死后小鼠的运动周期由 23.76 ± 0.27 h缩短到 23.21 ± 0.15 h,但运动活性改变不明显。**结论** 心肌梗死使C57BL/6J小鼠的跑轮运动日节律周期缩短,推测心肌梗死可能重调中枢SCN的周期振荡。

关键词 心肌梗死 昼夜节律 跑轮运动

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.011

Influence of Myocardial Infarction on the Circadian Rhythm of Locomotor Activities in C57BL/6J Mouse. Zhou Lan, Cao Jimin. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective The circadian variation of cardiac activity is controlled by the suprachiasmatic nucleus (SCN), and thus parameters reflecting cardiac activities (such as blood pressure, heart rate, cardiac output) and even cardiac events show obvious circadian oscillations. On the other hand, cardiac diseases may also affect the circadian rhythm. This study aimed to test the hypothesis that myocardial infarction (MI) affects the SCN-controlled circadian locomotor activities. **Methods** Myocardial necrotic injury was created by focal cold shock with liquid nitrogen across the intact diaphragm to mimic MI in C57BL/6J mice. Circadian wheel-running activities were continuously monitored by the Vitalview data acquisition system before and after MI. **Results** MI shortened the period length of circadian locomotor activities (before MI 23.76 ± 0.27 h; after MI 23.21 ± 0.15 h, $P < 0.05$). However, the activity intensities were not significantly affected by MI. **Conclusion** MI shortens the period length of the circadian rhythm, but did not significantly affect the activity intensity, in C57BL/6J mice. The study suggests that MI affects the circadian oscillation of the central clock SCN.

Key words Myocardial infarction; Circadian rhythm; Running-wheel activity

在自然界中,从单个细胞到高等动植物,以及人类的所有生命活动均存在着按照一定时间顺序规律运行的周期性(节律性)的生命活动现象,称为生物节律,其中最重要的生物节律是昼夜节律。心血管系统的活动也存在明显的昼夜节律。已知血压、心率、心排出量等心血管活动指标均存在昼夜节律,一些致命心血管事件,如心肌梗死、心源性猝死的发生也呈现出发病的昼夜时间倾向^[1-3]。心血管系统自身细胞内的分子钟可以使其对外界的神经体液刺激产生及时恰当的反应。这种分子钟节律振荡的衰减会影响心血管对外界环境刺激及时有效的反应,从而影响

一些心血管疾病的发生、发展。同时,在各种心血管疾病模型中也发现了昼夜节律的改变。例如,在压力负荷增加导致的心肌肥大时会出现 dbp、hlf、tef、pdk4、ucp3 基因表达节律的衰减^[4]。在高盐饮食引起的高血压模型中,肥大心肌内钟基因的振荡明显衰减^[5],而在自发性高血压模型中却发现钟基因的振荡的增强^[6]。在糖尿病性心脏病中发现钟基因的双向节律出现明显相移^[7,8]。但心肌梗死对昼夜节律的影响目前研究较少。本研究旨在观察C57BL/6J小鼠心肌梗死对跑轮运动昼夜节律的影响。

对象与方法

1. 对象: C57BL/6J 小鼠,由中国医学科学院动物研究中心提供。

2. 方法:(1)转轮运动实验室及动物准备:转轮实验需要一间配备空调、有遮光暗室功能的专用实验室。实验室内除进出门外,所有窗体都完全密闭不透光,室内配备红光灯。内

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071072)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com

置密闭、通风、完全光控,可分别容纳转轮装置的小室。C57BL/6J小鼠体重一般为22~26g。每只小鼠分别饲养在装有转轮(直径11.5cm)的塑料小笼(45cm×25cm×20cm)内。实验初首先给予12h光照、12h黑暗[light(L):dark(D)=12:12]光照周期至少1周,当小鼠完全适应环境以及运动节律趋于稳定后,再改为完全黑暗(DD)的环境记录。当动物处于DD环境时,SCN内钟基因仍能产生昼夜节律振荡,维持机体昼夜节律行为的稳定存在。在DD环境下表现白天行为(如夜行动物小鼠的睡眠时段)的时间段称为主观白天(subjective day);而表现黑夜行为(如小鼠的清醒状态和转轮运动)的时间段称为主观黑夜(subjective night)。在这种环境下记录的时间称为CT(circadian time)时间。通常1个昼夜周期为24h,规定CT0(也即CT24)代表白天的开始(相当于早晨6:00);CT6代表正午时分(12:00);CT12代表傍晚时分(18:00);CT18代表午夜(24:00)。整个实验过程中都供给足量的常规食物和水,定期清洁笼内粪便。(2)动物分组及心肌梗死模型建立:动物分为两组,分别是心肌梗死组($n=5$)和假手术组($n=5$)。采用经腹腔横膈膜液氮冷冻致局部心肌梗死的方法模拟小鼠心肌梗死^[9]。用1%戊巴比妥钠[0.1毫升/(10克·体重)]腹腔注射麻醉,无菌条件下做正中约1cm长切口,伸入5ml注射器套管,轻轻拨开肝左叶,暴露横膈膜,此时可见心脏搏动。套管头部轻压在横膈膜上,将液氮充分预冷的铝棒(铝棒由有色金属研究院提供,长10cm,直径0.6cm,心脏接触面呈45°并打磨光滑)。通过套管,接触横膈膜波动最明显处(心尖部),轻轻施压持续10s。然后关腹。假手术组只开腹,不做液氮损伤。术后每日标准饮食和饮水。术后腹腔注射青霉素25000单位/(30克·体重),以预防感染。(3)小鼠转轮运动节律监测:采用Vitalview动物行为节律记录仪,配备Actiwatch节律数据分析软件。这些设备购于美国Mini Mitter公司。C57BL/6小鼠从LD光制转入DD光制1周后,根据每只小鼠自身的昼夜时间(CT),规定以小鼠开始运动为CT12,手术在CT6进行,首先在红光线下将小鼠取出,麻醉后用红布遮掩双眼,打开手术灯给小鼠实施心肌梗死手术,术后在红光线下重新将小鼠放回笼内继续记录1周。

3. 统计学方法:实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用GB-STAT软件进行统计学处理。自身对照用配对t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HE染色鉴定局部心肌梗死:本实验采用经腹腔横膈膜液氮冷冻致局部心肌梗死的方法模拟小鼠心肌梗死。手术后10天取出心脏,在左心室的前下部可发现瘢痕形成,壁很薄,向内塌陷,显然已经发生纤维化。HE染色发现心肌坏死部位主要位于左心室前下壁外层心肌(图1),心肌坏死面积约占整个心室面积的8%~10%。

2. 小鼠转轮运动节律实时监测结果:笔者用Ac-

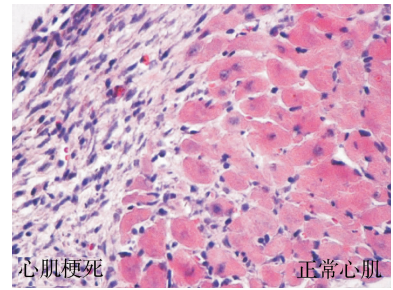


图1 HE染色显示小鼠液氮冷冻致心肌坏死(×20) 左侧为坏死心肌纤维化修复瘢痕,右侧为正常心肌

tiview数据分析系统对小鼠转轮运动节律进行了实时监测,每5min记录1次数据。图2A为1只小鼠心肌梗死前后跑轮运动节律的代表性原始记录图。正常情况下C57BL/6J小鼠在DD环境下表现出自身内源性节律振荡,其内源性振荡节律<24h,因此表现为每天运动开始时间前移,而且每只小鼠在没有外界干预的情况下运动周期是恒定不变的。图2A中的黑色实线代表记录小鼠的恒定内源性周期。小鼠心肌梗死后,继续记录小鼠转轮运动节律,发现每天运动开始时间比心肌梗死前提前,图2A中的虚线即代

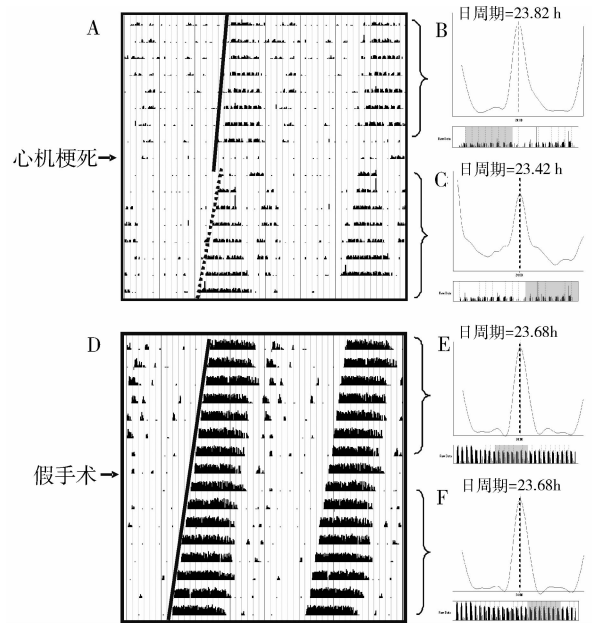


图2 心肌梗死对C57BL/6J小鼠转轮运动节律的影响 A. 心肌梗死前后C57BL/6J小鼠转轮运动节律变化的原始记录图。图中黑色实线为小鼠心肌梗死前运动周期的变化趋势线,黑色虚线为小鼠心肌梗死后运动周期的变化趋势线;B. 小鼠心肌梗死前昼夜运动周期;C. 小鼠心肌梗死后昼夜运动周期;D. 假手术前后C57BL/6J小鼠转轮运动节律变化的原始记录图;E. 小鼠假手术前昼夜运动周期;F. 小鼠假手术后昼夜运动周期。黑箭头代表心肌梗死或假手术当天

表了小鼠心肌梗死后的内源性周期。同时笔者通过 Actview 数据分析软件对该只小鼠心肌梗死前后 1 周的转轮运动周期进行了分析,发现心肌梗死前运动周期为 23.82h,心肌梗死后为 23.42h(图 2 中 B、C),也即该小鼠的内源性运动周期缩短了 0.4h,即 24min。而假手术组的 1 只代表性小鼠的转轮运动在手术前、后未发生改变(图 2 中 D、E、F)。

3. 小鼠转轮运动节律统计结果:对各组所有小鼠心肌梗死前后 1 周的运动周期进行统计学分析,结果显示,在 DD 环境下,心肌梗死前 C57BL/6J 小鼠的转轮运动周期为 23.76 ± 0.21 h,心肌梗死后小鼠的转轮运动周期为 23.21 ± 0.15 h,心肌梗死后运动周期平均缩短 0.55 ± 0.19 h(图 3)。运动活性下降不明显。而假手术组小鼠的转轮运动周期始终未发生改变,其平均周期为 23.68 ± 0.18 h。

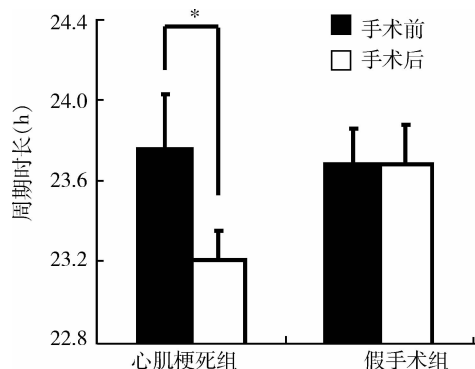


图 3 心肌梗死前后 C57BL/6J 小鼠转轮运动周期统计图

* $P < 0.05$, 每组 $n = 5$

讨 论

生物钟可从不同途径影响心血管活动的昼夜节律。通过逆行性伪狂犬病毒示踪技术证明,SCN 与心脏之间存在自主神经的多突触联系,说明中枢钟可以通过直接的神经联系调节心脏功能^[10]。心血管系统自身钟基因则对环境的周期性刺激作出提前反应,使机体准确迅速地对外界变化作出反应,例如在机体觉醒之前,交感神经活性已经增加。因此中枢钟和外周钟通过相互整合来共同调节心血管功能节律性变化。

人们对心血管事件的昼夜节律已做了较详尽的研究。心肌梗死和心源性猝死在凌晨的几小时内发生率最高。而且心血管事件发生的时辰也会影响疾病的预后,例如在夜间发生心肌梗死的患者导致心力衰竭的危险性很高,而早晨发病的患者很少发生心力衰竭。Alibhai 等^[11]研究发现,心肌梗死小鼠如果同时伴随急性的昼夜节律紊乱,则心肌重塑能力减弱,

其长期的结构和功能都将受到影响。说明昼夜节律改变对心脏功能影响很大。另据报道,表现 S-T 段抬高的心肌梗死患者,心肌的昼夜功能差别出现了改变,说明心脏内源性的钟机制被破坏^[12]。

当急性心血管事件发生后,除了心肌的昼夜节律遭到破坏外,该事件是否还会影响中枢 SCN 的昼夜节律呢? 本研究发现,在 DD 环境下 C57BL/6J 小鼠心肌梗死后,每天比正常情况下提前出现跑轮运动,提示提前进入觉醒状态,经统计其转轮运动周期平均缩短 0.55 ± 0.19 h。一般来说,昼夜周期的改变往往是由于中枢 SCN 内钟基因的表达节律出现了重调。小鼠心肌梗死后,心率、血压都会出现相应的改变,笔者认为这种急性心肌坏死破坏了心脏内源性的钟机制,并通过某种途径改变了中枢 SCN 内钟基因的振荡节律,使 SCN 内源性钟机制发生重调。而 SCN 的节律振荡一旦发生改变,不仅会改变运动周期,还可能改变受 SCN 调控的自主神经的功能活性、激素的分泌及身体其他器官的功能,同时影响疾病的预后。

Boudreau 等^[13]曾报道心率的节律发生改变会影响与觉醒相伴随的交感迷走效应,从而增加清晨觉醒时急性心血管事件的发生频率。在笔者的实验中,心肌梗死导致小鼠跑轮运动节律改变,由于跑轮运动节律的改变直接反应了睡眠-觉醒节律的变化,势必会引起自主神经的昼夜活性改变,从而影响疾病的转归。另据报道心肌梗死会降低褪黑素的分泌,由于褪黑素的分泌存在明显的昼夜节律性且有心脏保护作用,因此褪黑素分泌节律改变也会影响心脏疾病的发生、发展^[14]。所以在后续的实验中,笔者将从自主神经活性、褪黑素等激素分泌等多方面探讨心肌梗死通过怎样的神经体液机制调控 SCN 节律,SCN 自身钟蛋白的节律振荡发生了怎样的变化。从时间生物学的角度寻找心肌梗死的治疗手段。靶向调整昼夜钟节律、使之正常化可能成为未来心血管疾病的治疗策略之一。

参 考 文 献

- 1 Boudreau P, Yeh WH, Dumont GA, *et al.* Circadian variation of heart rate variability across sleep stages [J]. *Sleep*, 2013, 36(12): 1919 - 1928
- 2 Manfredini R, Boari B, Salmi R, *et al.* Twenty - four - hour patterns in occurrence and pathophysiology of acute cardiovascular events and ischemic heart disease [J]. *Chronobiol Int*, 2013, 30(1 - 2): 6 - 16
- 3 Takeda N, Maemura K. Cardiovascular disease, chronopharmacotherapy, and the molecular clock [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62: 956 - 966
- 4 Young ME, Razeghi P, Taegtmeier H, *et al.* Clock genes in the

- heart; characterization and attenuation with hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2001, 88: 1142 - 1150
- 5 Mohri T, Emoto N, Nonaka H, *et al*. Alterations of circadian expressions of clock genes in dahl salt - sensitive rats fed a high - salt diet [J]. *Hypertension*, 2003, 42: 189 - 194
 - 6 Naito Y, Tsujino T, Fujioka Y, *et al*. Augmented diurnal variations of the cardiac renin - angiotensin system in hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2002, 40: 827 - 833
 - 7 Oishi K, Kasamatsu M, Ishida N. Gene - and tissue - specific alterations of circadian clock gene expression in streptozotocin - induced diabetic mice under restricted feeding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317: 330 - 334
 - 8 Young ME, Wilson CR, Razeghi P, *et al*. Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin - induced diabetes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34: 223 - 231
 - 9 Vracko R, Thorning D. Freeze - thaw injury of rat heart across an intact diaphragm: a new model for the study of the response of myocardium to injury [J]. *Cardiovasc Res*, 1985, 19: 76 - 84
 - 10 Scheer FA, Ter Horst GJ, van Der Vliet J, *et al*. Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280: H1391 - H1399
 - 11 Alibhai FJ, Tsimakouridze EV, Chinnappareddy N, *et al*. Short - term disruption of diurnal rhythms after murine myocardial infarction adversely affects long - term myocardial structure and function [J]. *Circ Res*, 2014, 114(11):1713 - 1722
 - 12 Suzuki S, Ishii H, Ichimiya S, *et al*. Impact of the circadian rhythm on microvascular function in patients with ST - elevation myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(5):4948 - 4949
 - 13 Boudreau P, Yeh WH, Dumont GA, *et al*. A circadian rhythm in heart rate variability contributes to the increased cardiacsympathovagal response to awakening in the morning [J]. *Chronobiol Int*, 2012, 29(6):757 - 768
 - 14 Dominguez - Rodriguez A, Abreu - Gonzalez P, Avanzas P. The role of melatonin in acute myocardial infarction [J]. *Front Biosci*, 2012, 17:2433 - 2441

(收稿日期:2014 - 03 - 26)

(修回日期:2014 - 06 - 10)

Exendin - 4 对游离脂肪酸诱导肝细胞 sirt6 表达及其对糖异生作用的影响

肖元元 王倩倩 毛月芹 魏美林 韩峻峰 殷峻 魏丽

摘要 目的 观察 Exendin - 4 对游离脂肪酸诱导的肝细胞 sirt6 表达的影响及其在肝脏糖异生过程中的调控作用。方法 体外培养人肝癌细胞株 HepG2 细胞,根据干预措施分为正常对照组、Exendin - 4 (100nmol/L) 处理组、游离脂肪酸对待组、游离脂肪酸 + Exendin - 4 处理组。Western blot 法检测各组细胞中 sirt6 表达的变化。以 stealth siRNA 干扰 HepG2 细胞中 sirt6 的表达后给予相同处理,Western blot 法检测 sirt6 表达蛋白水平的变化,RT - PCR 检测 sirt6 及糖异生相关基因 G6Pase 和 PEPCK mRNA 水平的变化。**结果** 与正常对照组相比游离脂肪酸可显著降低肝细胞内 sirt6 蛋白的表达,而经 Exendin - 4 处理后,sirt6 表达显著升高。与正常对照组相比,游离脂肪酸可诱导肝细胞糖异生相关基因表达的升高,经过 Exendin - 4 处理后,可相应降低上述基因的表达。当下调 sirt6 表达后,则抑制了由 Exendin - 4 对改善游离脂肪酸诱导肝细胞糖异生相关基因的调节作用。**结论** 游离脂肪酸可降低肝细胞 sirt6 的表达,Exendin - 4 可改善由游离脂肪酸诱导的肝细胞 sirt6 表达的下降及糖异生相关基因表达的升高;Exendin - 4 可能是通过对 sirt6 的调节从而在肝脏糖异生过程中发挥重要作用的。

关键词 胰高血糖素样肽 - 1 糖异生 脂肪肝

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.012

Effect of Exendin - 4 on the Expression of Sirt6 and Hepatic Gluconeogenesis in the Free Fatty Acid - induced HepG2 Cell. Xiaoyuanyuan, Wang Qianqian, Mao Yueqin, *et al*. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Clinical Center for Diabetes, Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai Clinical Center for Metabolic Diseases, Shanghai 200233, China

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81370956);上海交通大学专项基金资助项目 (2011JDZX021)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病临床医学中心、上海市糖尿病重点实验室、上海市糖尿病研究所、上海市代谢病临床医学中心

通讯作者:魏丽,主任医师,电子信箱:weili63@hotmail.com