

昼夜节律与缺血性脑卒中的关系研究进展

王苗 刘晓晓 郭莉琼 张燕菊 苏丹丹 王钦鹏 王国娟 梁成

【中图分类号】 R743.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2020)05-0691-03
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.05.034

缺血性脑卒中是神经内科的常见病,以神经功能缺损为主要表现,存活者多留有后遗症或丧失自理能力,给社会带来巨大的经济负担。在我国缺血性脑卒中占有所有脑卒中类型的69.6%^[1],其发病机制复杂繁多,由多种致病因素共同参与其发生发展。近年来随着研究的深入,越来越多的研究表明昼夜节律与缺血性脑卒中的发病有密切关系,本研究就围绕昼夜节律在缺血性脑卒中发病中的作用机制进行总结分析,以期对缺血性脑卒中的预防与治疗提供新的视角。

1 昼夜节律及其调控机制

在哺乳动物中几乎所有的器官及细胞都有昼夜节律,它是以近 24 h 为周期的生命活动^[2]。位于下丘脑视交叉上核(Suprachiasmatic nucleus,SCN)的中枢钟和外周器官组织中的外周钟组成了昼夜节律产生和维持的生理基础。在光信号的刺激下视网膜上的特异性黑视素将信号通过视网膜神经节细胞传到视网膜下丘脑束,进而传递至 SCN,SCN 通过调控生物钟基因的周期性振荡表达产生节律信号,然后经由神经-体液调节系统和自主神经系统将节律信号传递至心、肺、肾、肝等外周组织的内源性生物钟,从而产生机体整体水平上的昼夜节律,共同维持机体正常的生命过程^[3]。除光刺激外,温度、食物以及代谢相关因子等多种因素也可作用于生物钟网络发挥作用,且外周生物钟亦可自主运行以调控其相应组织的特异性时钟基因的表达^[4]。

昼夜节律的分子机制由生物钟基因的转录-翻译反馈环完成,生物钟基因包括核心基因(clock, bmal1)和钟控基因(per, cry, rev-erb α , ror 等)。其经典的生物钟调控环路如下:由生物钟核心基因 clock、bmal1 表达产生的 CLOCK 蛋白与 BMAL1 蛋白构成的异二聚体可与 per、cry 等钟控基因启动子区的 E-BOX 结合,进而激活 PER、CRY 蛋白的表达;表达产生 PER 与 CRY 蛋白由细胞浆富集后进入细胞核抑制 CLOCK-BMAL1 异二聚体的转录^[5]。CLOCK-BMAL1 异二聚体还可以诱导孤儿核受体 REV-ERB α 和 ROR 的表达,前者通过与 bmal1 启动子结合抑制其转录,后者可促进 bmal1 的转录。此外, BMAL1 还可与 NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2)结合形成二聚体,其表达位于中枢神经系统的前脑^[6]。近年来,人们对生物钟基因调控机制认识的逐渐深入,翻译后的生物钟蛋白修饰(如乙酰化、磷酸化等)和降解(泛素化)亦可起到微调作用^[3]。此外,非编码 mRNA 也参与昼夜节律的调控^[7]。正是由于上述复杂精密

的调控机制维持着机体 24 h 昼夜节律的波动。

2 昼夜节律与缺血性脑卒中发病的关系

缺血性脑卒中是多种致病因素共同作用的结果,很多研究表明昼夜节律紊乱与缺血性脑卒中的危险因素密切相关,可直接或间接导致缺血性脑卒中的发生。

2.1 昼夜节律与高血压病

高血压病是缺血性脑卒中的重要危险因素,非勺型高血压与缺血性脑卒中密切相关。在生理状态下血压呈现夜间血压降低、晨起后 4 h 左右血压升高,即血压晨峰现象^[8]。当正常的昼夜节律受影响时血压随之会出现异常。在对轮班工人的研究中发现,急性昼夜节律紊乱可使收缩压、舒张压及炎性标志物水平显著升高,进而导致发生心脑血管疾病的风险增加^[9]。国内研究发现,平滑肌细胞中 Bmal1 特异性敲除的小鼠其血压降低、血压昼夜波动幅度减小、脉压昼夜节律消失,其机制是 BMAL1 通过调节 ROCK2 的表达而实现^[10]。CHANG 等研究显示,血管外周脂肪组织(PVAT)中 Bmal1 特异性敲除的小鼠静息期血压下降呈超勺型,血管紧张素原 mRNA 和血管紧张素 II 水平显著降低,其机制可能通过 Bmal1 上调血管紧张素原的表达而使血管紧张素 II 水平增加,进而调节机体血压及血管活性^[11]。此外,动物试验发现生物钟基因 clock、cry1/2、per 基因亦参与血压的维持和调控^[12]。因此,当各种外源性或内源性因素导致昼夜节律紊乱时机体的正常血压节律随之受到影响。

2.2 昼夜节律与血脂异常

甘油三酯、低密度脂蛋白、胆固醇等血脂成分水平异常与缺血性脑卒中的发生密切相关。在正常情况下机体的血脂水平在 1 个狭窄的范围内形成昼夜节律,生物钟基因可通过调控脂类吸收、合成与分解代谢过程中关键酶的表达而参与血脂代谢。Pan 等研究发现肠道内脂摄取和代谢的部分功能蛋白具有昼夜节律如载脂蛋白 B、肠微粒体甘油三酯转运蛋白和肠脂肪酸结合蛋白^[13]。Filiano 等研究表明,脂类代谢分解过程中与脂肪水解相关的甘油三酯脂肪酶和激素敏感脂肪酶、与脂肪酸 β -氧化有关的肉碱棕榈酰转移酶和中链酰辅酶 A 脱氢酶在多种组织中的基因表达水平呈现昼夜节律振荡^[14]。胆汁酸合成是胆固醇代谢的主要途径,其合成过程中的关键酶-胆固醇 7 α -羟化酶亦呈现出夜间水平达到高峰,白天水平下降的昼夜节律变化^[15]。在生物钟基因的研究中 PAN 等研究表明, bmal1 全基因敲除的 Apo e-/- 和 ldlr-/- 小鼠高脂血症和动脉粥样硬化的发生率增加,而过表达 BMAL1 的小鼠则发生率降低^[16]; rev-erb α -/- 小鼠肝和血清中载脂蛋白 C(ApoC)表达增强,极低密度脂蛋白和

甘油三酯水平升高^[17]。由此可见,昼夜节律紊乱与血脂水平异常密切相关。近年来,研究者还发现脂代谢与生物钟基因调控呈现双向作用,即昼夜节律基因表达紊乱导致血脂水平异常,同样高脂饮食也会扰乱正常的昼夜节律。动物试验发现高脂饮食可引起小鼠脂肪、肌肉、肝脏组织 BMAL1 功能变化^[18],机制可能与下丘脑暴露于高水平的游离脂肪酸诱发神经炎症、内质网应激和神经肽合成紊乱有关^[19]。

2.3 昼夜节律与 2 型糖尿病

2 型糖尿病是缺血性脑卒中的独立危险因素,胰岛素抵抗和胰岛 B 细胞功能减低为其主要发病机制。视交叉上核的中央时钟通过调整进食、能量消耗、全身组织的胰岛素敏感性等,使参与糖代谢的外周组织(如胰腺、肝、骨骼肌、脂肪等)中的外周钟同步微调,共同维持机体内血糖稳态。在人和啮齿动物中存在不受进食、运动等导致血糖波动的外源性因素影响的血糖波动节律,糖耐量、全身组织胰岛素的敏感性、胰岛素的分泌亦受到生物钟基因的调节而随之出现波动^[4]。视交叉上核的中央时钟由血管活性肠肽阳性的腹外侧振荡器和精氨酸加压素阳性的背内侧振荡器耦合形成,后者可以作为血糖变化的感受器^[20]。在糖代谢相关的外周组织中肝脏在维持血糖稳态中发挥重要作用,肝特异性 Bmal1 缺陷的小鼠中空腹血糖和葡萄糖转运蛋白-2(glucose transporter, Glut2)的表达没有节律性^[21]。在进食后葡萄糖进入肝细胞进行糖酵解代谢,而多余的葡萄糖可贮存为肝糖原供能,clock 基因突变可抑制肝糖原含量的昼夜节律以及肝糖原合成的限速酶 Gys2(glycogen synthase 2)的昼夜 mRNA 和蛋白表达^[22]。在禁食状态下肝糖原生是提升血糖水平的重要途径,CRY 可通过节律性自噬降解实现肝糖原生过程的节律波动^[23]。同时,昼夜节律调控胰岛素运输和分泌的基因表达,但不参与胰岛素的合成;骨骼肌、脂肪、肠道也通过其对胰岛素敏感性的节律变化来参与血糖代谢^[4]。因此,当昼夜节律紊乱时会影响血糖代谢。倒班工作、睡眠质量下降会导致葡萄糖耐量和胰岛素敏感性的降低,2 型糖尿病的患病风险增加^[24]。此外,生物钟基因的多态性与葡萄糖稳态及对 2 型糖尿病的易感性有关,其中 CLOCK-rs4580704 SNP 与糖尿病患者的脑卒中风险相关^[25]。

2.4 昼夜节律与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是缺血性脑卒中的常见病因,目前被认为是一种慢性炎症性疾病,它的形成涉及内皮功能障碍、脂质浸润、平滑肌细胞迁移、炎症等多种学说。有研究发现,与正常明暗周期的小鼠比较,轮班工作模型小鼠的动脉粥样硬化程度及病变大小增加约 2 倍,其损伤处巨噬细胞水平较高,血管壁炎症、氧化应激和趋化因子的标记物表达水平增高^[26],这表明昼夜节律紊乱与动脉粥样硬化的形成密切相关。目前普遍认为动脉粥样硬化病变的始动因素是内皮功能障碍,正常情况下血管内皮细胞及其功能存在自身的昼夜节律^[12],当昼夜节律紊乱时内皮功能发生障碍。有研究表明,per2 基因的缺失促进主动脉内皮功能障碍,可能与其导致血管舒张剂一氧化氮和血管舒张性前列腺素的产生减少有关^[27]。血管平滑肌细胞增殖也是动脉粥样硬化形成学说之一。Takaguri 等研究表明 BMAL1 基因敲除可显著降低血小板衍生生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖^[28]。此外,炎症介质在动脉粥样硬化形成过程中亦发挥重要作用。单核-巨噬细胞是动脉粥

样硬化病变的主要免疫细胞类型,单核细胞固有型 BMAL1 被认为是参与单核细胞募集的趋化因子(如 CCL2)的转录抑制因子,阻断 CCL2 的信号传导可消除节律性白细胞粘附^[29];有研究发现动脉粥样硬化小鼠模型中 CRY1 的过度表达显著降低促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)等的表达;下调血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和 E-选择素等黏附分子的表达;降低动脉粥样硬化小鼠主动脉壁的斑块面积和总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇的水平,其机制可能是通过调节 toll 样受体/NF- κ B 途径来发挥作用^[30]。以上证据均证明,生物钟基因在动脉粥样硬化形成的过程中发挥着重要的作用。

2.5 昼夜节律与血栓形成

缺血性脑卒中常见的病因是动脉粥样硬化性血栓形成,血小板和纤维蛋白原是血栓的重要成分。Scheer 等研究发现,人体血小板聚集、血小板-白细胞粘附、血小板-内皮细胞粘附的标志物表现出明显的昼夜节律波动,且在晨 8 点-9 点达到昼夜节律的峰值^[31],而生物钟基因参与血小板功能的波动及产生。Clock 基因可促进血小板生成素(TPO)的节律性表达,TPO 可抑制巨核细胞的血小板生成^[32]。BMAL1-/-小鼠表现更快的止血和伤口愈合,血小板聚集和粘附增强,血栓形成前基因 von Willebrand 因子(vWF)、纤维蛋白原和纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)表达增加^[33],而 PER2-/-小鼠表现出较慢的止血,血小板形成、凋亡和聚集功能明显减弱^[34]。血栓形成还涉及纤溶机制,生理状态下组织纤溶酶原激活剂(t-PA)和尿激酶可促进纤维蛋白溶解,而 PAI-1 则可抑制此过程的发生,上述物质可相互制约来维持纤溶机制的平衡,因此 PAI-1 在纤溶系统中作用重大。正常血浆中 PAI-1 水平于晨 6 点达峰值^[35],这与缺血性脑卒中的高发时间段一致。PAI-1 的表达同样受时钟基因控制,CLOCK-BMAL 通过结合其启动子的 E-BOX 来促进 PER,CRY,REV-ERB α ,PAI-1 的转录;反过来 PER 和 CRY 结合并抑制 CLOCK-BMAL 介导的转录。此外,REV-ERB α 可以通过结合 PAI-1 启动子上的视黄酸受体相关的孤儿受体反应(ROREs)来抑制 PAI-1 的转录^[36]。因此,当昼夜节律紊乱导致血小板功能、纤溶系统异常时血栓形成风险增高,发生脑卒中的风险亦显著升高。

3 小结与展望

昼夜节律与缺血性脑卒中的多种危险因素及病理机制相关,因此昼夜节律的调节及生物钟基因可作为未来缺血性脑卒中预防和治疗的新靶点,但因昼夜节律的调控机制复杂精密,且目前多为细胞、动物试验,仍需进一步探寻更多与缺血性脑卒中相关的临床证据。目前通过对生物钟基因及昼夜节律的认识,既可以通过调整生活方式来改善昼夜节律紊乱,从而预防疾病,又可利用昼夜节律寻找合理的用药时间,以期达到更精准有效的治疗。此外,对于直接作用于昼夜节律基因的分子机制途径的药物也具有广阔的开发前景,目前

在 rev-erb 受体激动剂方面有学者进行探索,为生物钟基因的靶向治疗开启新的篇章。因此,昼夜节律的研究在未来缺血性脑卒中的预防和治疗中有着无限前景。

参 考 文 献

- [1] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide Population-Based survey of 480687 adults[J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [2] Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals[J]. *Nature*, 2002, 418(6901): 935-941.
- [3] Astiz M, Heyde I, Oster H. Mechanisms of communication in the mammalian circadian timing system[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 10.
- [4] Dirk, Jan, Stenvers, et al. Circadian clocks and insulin resistance[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(2): 75-89.
- [5] Wang Z, Wu Y, Li L, et al. Intermolecular recognition revealed by the complex structure of human CLOCK-BMAL1 basic helix-loop-helix domains with E-box DNA[J]. *Cell Res*, 2010, 20(12): 213-224.
- [6] Brown, S A. Circadian clock-mediated control of stem cell division and differentiation: beyond night and day[J]. *Development*, 2014, 141(16): 3105-3111.
- [7] Wang H, Fan Z, Zhao M, et al. Oscillating primary transcripts harbor miRNAs with circadian functions[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 10.
- [8] Smolensky M H, Hermida R C, Portaluppi F. Circadian mechanisms of 24-hour blood pressure regulation and patterning[J]. *Sleep Medicine Reviews*, 2017, 33(6): 4-16.
- [9] Morris CJ, Purvis TE, Hu K, et al. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(10): E1402-E1411.
- [10] Xie Z, Su W, Liu S, et al. Smooth-muscle BMAL1 participates in blood pressure circadian rhythm regulation[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(1): 324-336.
- [11] Chang L, Xiong W, Zhao X, et al. Bmal1 in perivascular adipose tissue regulates resting phase blood pressure through transcriptional regulation of angiotensinogen[J]. *Circulation*, 2018, 138(1): 67-79.
- [12] Douma LG, Gumz ML. Circadian Clock-Mediated regulation of blood pressure[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 50(10): 1016-1024.
- [13] Hussain, Mahmood M. Regulation of intestinal lipid absorption by clock genes[J]. *Annu Rev Nutr*, 2014, 34(1): 357-375.
- [14] Filiano AN, Telisha MS, Russell J, et al. Chronic ethanol consumption disrupts the core molecular clock and diurnal rhythms of metabolic genes in the liver without affecting the suprachiasmatic nucleus[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): 0071684.
- [15] Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, et al. REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating Mammalian Circadian Output[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10.
- [16] Pan X, Bradfield C A, Hussain M M. Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(10): 13011.
- [17] Ma H, Zhong W, Jiang Y, et al. Increased atherosclerotic lesions in LDL receptor deficient mice with hematopoietic nuclear receptor rev-erb α Knock-Down[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(4): 000235.
- [18] Aleix RL, Baharan F, Christopher K, et al. Rosiglitazone reverses high fat diet-induced changes in BMAL1 function in muscle, fat, and liver tissue in mice[J]. *Int J Obes*, 2019, 43(3): 567-580.
- [19] Tse EK, Ashkan S, Clemenzi MN, et al. Role of the saturated fatty acid palmitate in the interconnected hypothalamic control of energy homeostasis and biological rhythms[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2017, 315(2): E133-E140.
- [20] Yang JJ, Cheng RC, Cheng PC, et al. KATP channels mediate differential metabolic responses to glucose shortage of the dorsomedial and ventrolateral oscillators in the central clock[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10.
- [21] Ando H, Ushijima K, Shimba S, et al. Daily fasting blood glucose rhythm in male mice: a role of the circadian clock in the liver[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(2): 1376-2015.
- [22] Doi R, Oishi K, Ishida N. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29): 22114-22121.
- [23] Miriam T, Ana BG, Emilio M, et al. Autophagy regulates the liver clock and glucose metabolism by degrading CRY1[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 28(2): 268-281.
- [24] Céline V, Dashti HS, Lane JM, et al. Night shift work, genetic risk, and type 2 diabetes in the UK biobank[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(4): 762-769.
- [25] Corella D, Asensio EM, Coltell O, et al. CLOCK gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and cardiovascular diseases in type-2 diabetic subjects: dietary modulation in the PREDIMED randomized trial[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15(1): 4.
- [26] Schilperoort M, Van Den Berg R, Bosmans LA, et al. Disruption of circadian rhythm by alternating light-dark cycles aggravates atherosclerosis development in APOE * 3-Leiden. CETP mice[J]. *J Pineal Res*, 2020, 68(1): 12614.
- [27] Viswambharan H, Carvas JM, Antic V, et al. Mutation of the circadian clock gene per2 alters vascular endothelial function[J]. *Circulation*, 2007, 115(16): 2188-2195.
- [28] Takaguri A, Sasano J, Akihiro O, et al. The role of circadian clock gene BMAL1 in vascular proliferation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 872(1): 179294.
- [29] Carla W, Carlos SR, Almudena OG, et al. Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis[J]. *Cell Metabolism*, 2018, 28(1): 175-182.
- [30] Yang L, Chu Y, Wang L, et al. Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF- κ B pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(1): 525-530.
- [31] Scheer FL, Michelson AD, Frelinger AL, et al. The human endogenous circadian system causes greatest platelet activation during the biological morning Independent of behaviors[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): 0024549.
- [32] Tracey CJ, Pan X, Catterson JH, et al. Diurnal expression of the thrombopoietin gene is regulated by CLOCK[J]. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*, 2012, 10(4): 1538-7836.
- [33] Somanath PR, Podrez EA, Chen J, et al. Deficiency in core circadian protein Bmal1 is associated with a prothrombotic and vascular phenotype[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 126(1): 132-140.
- [34] Zhao Y, Zhang Y, Wang S, et al. The clock gene Per2 is required for normal platelet formation and function[J]. *Thrombosis Research*, 2010, 127(2): 122-130.
- [35] Andreotti F, Kluff C. Circadian variation of fibrinolytic activity in blood[J]. *Chronobiol Int*, 1991, 8(5): 336-351.
- [36] Pritchett D, Reddy AB. Circadian clocks in the hematologic system[J]. *J Biol Rhythms*, 2015, 30(5): 374-388.